



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

NEUROBIOLOGÍA

**El papel de la neurogénesis hipocampal adulta en la flexibilidad cognitiva
espacial a través de la consolidación de engramas hipocampales y corticales**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

SOFÍA GRECIA LÓPEZ OROPEZA

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ALONSO MARTÍNEZ CANABAL
FACULTAD DE CIENCIAS**

**COMITÉ TUTOR: DRA. ANA BRÍGIDA CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ
INSITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
DR. GABRIEL GUTIÉRREZ OSPINA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., AGOSTO, 2021



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.

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

OFICIO CPCB/627/2021

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión virtual del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 24 de mayo de 2021 se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **BIOLOGÍA EXPERIMENTAL** de la estudiante **LÓPEZ OROPEZA SOFÍA GRECIA** con número de cuenta **106002665** con la tesis titulada **“EL PAPEL DE LA NEUROGÉNESIS HIPOCAMPAL ADULTA EN LA FLEXIBILIDAD COGNITIVA ESPACIAL A TRAVÉS DE LA CONSOLIDACIÓN DE ENGRAMAS HIPOCAMPALES Y CORTICALES”**, realizada bajo la dirección del **DR. ALONSO MARTÍNEZ CANABAL**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. FATUEL TECUAPETLA AGUILAR
Vocal: DR. FRANCISCO XAVIER SOTRES BAYÓN
Vocal: DRA. MARÍA DE LA LUZ NAVARRO ANGULO
Vocal: DR. ROBERTO AGUSTÍN PRADO ALCALÁ
Secretario: DR. GABRIEL GUTIÉRREZ OSPINA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 01 de julio de 2021

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



I. Agradecimientos institucionales

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

A CONACYT y al Proyectos de Investigación PAPIIT no. IA207419 por otorgar el financiamiento necesario para realizar esta investigación.

Al Dr. Alonso Martínez Canabal por guiar de la mejor manera este proyecto a pesar de las adversidades que fuimos encontrando. No obstante, fueron estos infortunios que sirvieron como reto para aprender a cambiar los paradigmas previos y reemplazarlos por nuevos. Al final, me enseñaste que no importa que tan rápido cambien el mundo, lo importante es adaptarse y quedarse con los aprendizajes importantes, soltando lo que ya no funciona.

II. Agradecimientos personales

A mi madre, por apoyarme en este sueño loco de hacer ciencia. Por mantener un ojo en mí en caso de necesitar ayuda, por no soltarme cuando me caía, por no decirme que no podía; porque a pesar de no entender mucho del tema, me escuchaste con atención y presumiste siempre mis logros. Por dejarme salir a experimentar el mundo, y el mundo, aunque fuera domingo a las 9 am. Gracias por soltarme para que pudiera perseguir mis sueños.

A mi hermano, por escucharme, por comprenderme, por acompañarme, por nunca dejarme sola. Porque cuando la vida te da un hermano, te da un cómplice para toda la vida, cómplices que, aunque cambies de amores, de pasatiempos o de look, siempre te apoyan y creen en ti. Porque sé que no importa en qué etapa de la vida estamos, siempre podemos contar el uno con el otro.

A mi familia, quien, a pesar de la distancia y el aislamiento de este último año, siempre están para apoyarme, para abrazarme, para escuchar un poco de lo que esta mujer de ciencia quiere decir. Porque son ellos los que han forjado la mujer que soy ahora, porque sus consejos y memorias las llevo conmigo siempre que algo sale mal o no va de acuerdo con el plan. Porque son esas memorias y lo que representan lo que debe permanecer y ser compartido con la siguiente generación.

A mis amigos del laboratorio. A Dulce y a Martín que me recibieron desde el inicio con una calidez que no había sentido en otros laboratorios. Ustedes me mostraron que no todo es competencia y que siempre hay personas con buenas intenciones. Llegaron a mí

camino para darme una mano no sólo en los experimentos, sino en mi vida, que no es tarea fácil.

A mis amigas Jimena y Ana, quienes me han acompañado en este camino desde hace ya varios años. Son las mejores amigas que una mujer pudiera pedir, son amorosas, lindas, sororas y me han cuidado cuando yo no podía ver más allá de los traspiés de la vida en la ciencia. Más allá de su soporte en la academia, son mi red de apoyo cuando los engramas negativos superan a los engramas positivos. Sin embargo, siempre habrá una Jimena que te escuche y te pase videos de terapia cognitivo-conductual y una Ana que siempre ve lo cool de todas las personas.

A las niñas del laboratorio, a Ale, a Momo y a Montse. Cada una de ustedes que ha escogido este camino científico, me recuerda porque las mujeres somos y seremos el cambio que necesita el mundo para mejorar. Sus ideas, su energía, sus sueños son las cosas por las que merece la pena estudiar ciencia. Sin todas ustedes esta tesis no tendría futuro. Gracias por acompañarme por un rato en este camino de la vida.

A Cecilia Medina, por haberme acobijado en su hogar y su corazón. Quizá la vida no me dio un padre, pero me ha dado algo mejor y es a esta mujer que me ha tratado como una hija.

A Angelito, por ser mi soporte emocional y no dejarme caer nunca. Como decimos los biólogos, no sabemos hacia donde nos llevará la evolución, y es que nada está escrito. No obstante, en este presente me has dado el ambiente perfecto para florecer, para recuperarme, para amarme y seguir mis sueños. Gracias por ser el compañero perfecto, el amor inolvidable y el mejor amigo.

A mi comité tutor, a la Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Rincón, quien me aportó numerosos comentarios que enriquecieron semestre tras semestre mi formación académica. Al Dr. Gabriel Ospina que con incesantes cuestionamientos siempre me hizo buscar la manera de aprender más, de buscar otras respuestas, de salir de mi esfera de conformidad. A los dos, gracias por sus comentarios que mejoraron de manera innegable mi forma de hacer ciencia.

A la CEARC de la Facultad de Ciencias por la aprobación de bioética del proyecto de investigación CEARC/Bioética/02032021

A mi comité sinodal, al Dr. Fatuel Tecuapetla Aguilar por sus comentarios y su interés por discutir diferentes posturas sobre el trabajo aquí presentado. Al Dr. Francisco Xavier Sotres Bayón, quien ha seguido apoyándome en otro paso más dentro de la ciencia. A la Dra. María De la Luz Navarro Angulo y al Dr. Roberto Agustín Prado Alcalá por sus comentarios y revisiones a este trabajo. A todo mi comité sinodal porque sin duda sus revisiones y discusión a este trabajo fueron la pieza medular para presentar una investigación de calidad y con bases científicas sólidas.

A la Dra. Pilar Durán, por permitir que este trabajo tuviera un nicho en el que nacer y desarrollarse. Por el apoyo incondicional a este proyecto y a todos los involucrados en el mismo.

Al Laboratorio de Materiales de la Facultad de Ciencias, por todo su apoyo en la construcción de varios aparatos utilizados en este trabajo.

III. Dedicatoria

Este trabajo te lo dedicó a ti, Grecia. No olvides que, aunque tu familia y amigos siempre sea tu red de apoyo, solo tú eres la dueña de tu vida, de tus sueños y en ti está la fuerza que necesitas para poder lograr todo lo que te propongas. Se fuerte, se paciente, se feliz.

Contenido

I.	Agradecimientos institucionales	ii
II.	Agradecimientos personales.....	iii
III.	Dedicatoria.....	vi
IV.	Índice de figuras	x
V.	Lista de abreviaturas.....	xi
1	Resumen	1
2	Abstract	3
2	Introducción	5
2.1	El hipocampo como nicho neurogénico.....	5
2.1.1	Estructura y conectividad del hipocampo.....	5
2.1.2	Descubrimiento de la neurogénesis hipocampal adulta.....	13
2.1.3	De células troncales a neuronas: historia de vida de la neurogénesis hipocampal adulta	16
2.1.4	La participación del hipocampo en la memoria y el aprendizaje	20
2.1.5	El rol de la neurogénesis hipocampal adulta en la memoria y aprendizaje	22
2.1	El posible significado biológico de la neurogénesis hipocampal adulta reside en la consolidación de engramas espaciales	24
2.1.1	La codificación, almacenaje y evocación de engramas espaciales depende de la participación del hipocampo y la corteza prefrontal	24
2.1.2	La neurogénesis hipocampal en la plasticidad de la memoria y la consolidación de engramas espaciales	28
2.2	Implicación de la modificación de engramas en la flexibilidad cognitiva espacial	31
2.2.1	El olvido asociado a la neurogénesis hipocampal como sustrato para la flexibilidad cognitiva.....	31

2.2.2	La neurogénesis hipocampal y el reclutamiento de estructuras corticales como base de la flexibilidad cognitiva.....	36
3	Planteamiento	40
4	Hipótesis.....	41
5	Objetivos	41
5.1	Objetivo general.....	41
5.2	Objetivos particulares	41
6	Materiales y método	42
6.1	Animales y aparatos.....	42
6.1.1	Animales.....	42
6.1.2	Aparatos conductuales.....	43
6.2	Entrenamiento en el Laberinto acuático de Morris.....	45
6.2.1	Manipulación y pre-entrenamiento.....	45
6.2.2	Entrenamiento en el laberinto acuático de Morris.....	47
6.3	Incremento de la neurogénesis.....	50
6.4	Protocolo para realizar inmunotinciones	51
6.4.1	Perfusión y preparación de cerebros.....	51
6.4.2	Día 1 de inmunohistoquímica.....	53
6.4.3	Día 2 de inmunohistoquímica.....	54
6.5	Procesamiento de datos.....	56
8	Resultados	57
8.1	El enriquecimiento ambiental promueve la flexibilidad cognitiva espacial y esto correlaciona con el aumento de neurogénesis hipocampal.	57
8.2	El enriquecimiento ambiental promueve la flexibilidad cognitiva espacial reclutando diferencialmente estructuras hipocampales y corticales	72
9	Discusión.....	76

9.1	La neurogénesis hipocampal adulta facilita la flexibilidad cognitiva espacial a través de la activación del GD, CA3 y la COF.....	76
9.2	El rol de la NHA y la CPFm en la constante modificación de engramas espaciales y en la consolidación de engramas espaciales	79
9.3	La neurogénesis hipocampal adulta y su implicación en la actualización de paradigmas ambientales.....	83
9.3.1	La neurogénesis hipocampal adulta y su rol en la supervivencia de los mamíferos a lo largo de su historia evolutiva	83
9.3.2	La neurogenesis hipocampal adulta en la regulación de alteraciones afectivas en humanos.....	84
9.4	Limitaciones del estudio	86
9.5	Perspectivas	89
10	Conclusión.....	92
11	Referencias	93

IV. Índice de figuras

Figura 1 Esquematización de los dos tipos principales de neuronas en el hipocampo	7
Figura 2 Estructura hipocampal.....	9
Figura 3 Conectividad hipocampal.....	11
Figura 4 Esquematización de la conectividad cortico-hipocampal	13
Figura 5 Historia de vida de la neurogénesis hipocampal adulta.	20
Figura 6 Esquematización del laberinto acuático de Morris.	44
Figura 7 Esquematización del laberinto acuático de Morris durante el pre-entrenamiento .	47
Figura 8 Esquematización del protocolo experimental en el laberinto acuático de Morris .	50
Figura 9 Enriquecimiento ambiental	51
Figura 10 Esquematización el procedimiento de preparación de cerebros	53
Figura 11 Entrenamiento en el laberinto acuático de Morris.	59
Figura 12 Prueba de retención de memoria un día después de finalizado el entrenamiento	61
Figura 13 Distancia y velocidad recorridos durante el periodo de enriquecimiento ambiental	62
Figura 14 Prueba de retención de memoria un mes después del enriquecimiento ambiental.	65
Figura 15 Entrenamiento reverso en el laberinto acuático de Morris.....	67
Figura 16 Prueba de flexibilidad cognitiva espacial.....	69
Figura 17 El aumento de nuevas neuronas correlaciona con la expresión de la conducta durante la prueba 3, pero no en la prueba 2.....	71
Figura 18 Activación neuronal en el hipocampo después de la prueba de flexibilidad cognitiva espacial.	74
Figura 19 Activación de la corteza orbitofrontal y cingulada anterior después de la prueba de flexibilidad.	75

V. Lista de abreviaturas

AHN	adult hippocampal neurogenesis
BLA	amígdala basolateral
CA	cuerno de Amón
CE	corteza entorrinal
COF	corteza orbitofrontal
CPFm	corteza prefrontal medial
CS	colaterales de Schaffer
CTN	células troncales neurales
DCX	doblecortina
DG	dentate gyrus
EE	enriquecido, enriched
GD	giro dentado
LMT	terminales musgosas gigantes
LMT	lóbulo medial temporal
MAM	acetato de metilazoximetanol
NHA	neurogénesis hipocampal adulta
NMDA	N-metil-D-aspartato
no-EE	no enriquecido
non-EE	non enriched
SSRIs	Inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina
BO	bulbo olfatorio
PBS	buffer de fosfatos salino

PFC	prefrontal cortex
SUB	subículo
SZG	zona subgranular
TAM	tamoxifen
TBS-T	buffer salino con Tween
TMZ	temozolamida
ZG	Zona granular

1 Resumen

El giro dentado (GD) del hipocampo de los mamíferos continúa generando nuevas neuronas durante toda la vida; dicha neurogénesis hipocampal adulta (NHA) se ha relacionado con la memoria y el aprendizaje. Más recientemente también se ha investigado su relación con la flexibilidad cognitiva, que es la capacidad que poseen los organismos a cambiar eficientemente entre diferentes trazas neuronales (engramas) para responder a los cambios ambientales. En este proyecto se investigó cómo es que la NHA regula la flexibilidad cognitiva espacial a través de la consolidación de engramas.

El hipocampo es la región cerebral en donde se codifican en primera instancia las memorias espaciales, posteriormente éstas se consolidan en la corteza prefrontal; la NHA modifica este proceso facilitando su degradación en el hipocampo. Esta degradación podría deberse a que la NHA modifica las conexiones previamente establecidas entre el giro dentado (GD) y CA3; y permite generar un nuevo sustrato neuronal que puede facilitar la codificación de nuevas memorias sin interferencia de memorias previas. Sin embargo, aún queda la pregunta de cómo la NHA modifica los engramas hipocampales y corticales que facilitan la expresión conductual de la flexibilidad cognitiva espacial. En este proyecto buscamos esclarecer esta pregunta utilizando el laberinto acuático de Morris en su versión espacial. Tras un entrenamiento inicial los ratones fueron separados en dos grupos: un grupo con enriquecimiento ambiental durante un mes (EE) y un grupo no enriquecido durante el mismo periodo (no-EE). Posteriormente se realizó una prueba de retención de memoria en la que los ratones EE expresaron menor retención de memoria. Al siguiente día, los ratones fueron entrenados en un protocolo de aprendizaje reversa, en donde se movió la plataforma en la zona opuesta sin mover ninguna pista espacial. Posteriormente se realizó una prueba de

flexibilidad cognitiva espacial en la que el grupo EE pasó mayor tiempo en la nueva ubicación, mientras que el grupo no-EE insistió en la ubicación original de la plataforma. Estos resultados correlacionaron positivamente con el aumento de NHA medido con células positivas a DCX+, marcador que permite observar la cantidad de nuevas neuronas generadas un mes después del EE; sugiriendo que el grupo EE podría expresar la nueva memoria debido a la falta de interferencia de la memoria previa. Asimismo, al evaluar la activación neuronal mediante el gen de expresión temprana c-Fos el grupo EE tuvo mayor activación en el GD, CA3 y la corteza orbitofrontal. En conjunto, estos resultados sugieren que el aumento de la NHA por enriquecimiento ambiental modificó los engramas espaciales dentro del hipocampo y en la corteza prefrontal en dos pasos, el primero: modificando la consolidación de engramas previos, y el segundo: dejando un sustrato libre para incorporar nuevas engramas espaciales sin interferir con los previamente establecidos.

2 Abstract

The dentate gyrus (DG) of the hippocampus continuously generates newborn neurons through the lifespan; furthermore, such a characteristic has been involved in memory and learning processes. Recently, scientists have linked the adult hippocampal neurogenesis (AHN) to cognitive flexibility, a behavioral trait that allows a rapid shifting between memory traces (engrams) when the environment changes. Moreover, there is growing evidence that adult hippocampal neurogenesis (AHN) may play a role in cognitive flexibility. With this idea in mind, we asked whether the AHN facilitates cognitive flexibility throughout memory consolidation.

The hippocampus firstly encodes the spatial memory and afterward this memory migrates to the prefrontal cortex (PFC), where it consolidates. However, the AHN modifies memory engram consolidation by means of hippocampal engram degradation. Newborn axonal connections disrupt previously established connections with CA3, and thus create a free neuronal substrate for encoding new memory traces without interfering with the previously established memory traces, an example of cognitive flexibility. Nevertheless, it is still not clear how the AHN leads an efficient cognitive flexibility behavior by recruiting hippocampal and PFC engrams. After an initial training, mice were grouped and one group were placed in an enrichment environment (EE), while the other group was not exposed to the enrichment environment (non-EE). After a month of environmental enrichment, both groups were evaluated in a retrieval test. We observed that the EE mice moderately evoked the platform location memory, and so expressing forgetting. One day after, mice were trained in a reversal-learning protocol, in which the platform was placed in a different location without moving any spatial clues. On the next day, all mice were trained to find the platform

in the opposite zone, next they were tested in cognitive flexibility test. We observed that EE mice spent more time in the new platform location than in the previous one, on the contrary, no-EE mice insisted in the previous location. These observations suggested that EE mice were able to express a new memory engram without interference of the previously established memory engram, and thus correlated with the increasing of DCX+ cells. In addition, EE mice showed more neuronal activity in the orbitofrontal cortex, the dentate gyrus (DG), and CA3.

In conclusion, together these findings suggest that the increase of AHN due to environmental enrichment promotes cognitive flexibility in two phases: at first, the AHN modifying memory engram consolidation and then creating a new neuronal substrate for new memory engram encoding.

2 Introducción

2.1 El hipocampo como nicho neurogénico

2.1.1 Estructura y conectividad del hipocampo

El hipocampo es una estructura neuronal involucrada en la adquisición, almacenamiento y procesamiento de memorias episódicas (Tulving y Markowitsch, 1998). Se trata de una estructura con una organización y dinámica fisiológica únicas, con redes neuronales complejas entre sus distintas capas y una fuerte plasticidad estructural, electrofisiológica y molecular, que lo han posicionado como una de las regiones cerebrales más estudiadas en el campo de las neurociencias. Por esta razón, es crítico revisar la conectividad y citoarquitectura del hipocampo para entender su rol en la consolidación y modificación de engramas espaciales.

Cito arquitectura. El hipocampo es una estructura neuronal localizada en el lóbulo temporal medial de todos los mamíferos. La formación hipocampal, es un conjunto de estructuras conformadas por, los cuernos de Amón (1,2 y 3), el giro dentado (GD), el subículo (SUB) y la corteza entorrinal (CE) (Amaral y Witter, 1989). Los tipos de neuronas principales dentro del hipocampo son las neuronas piramidales presentes en los cuernos de Amón y en el subículo, así como las granulares del GD (figura 1). Las neuronas piramidales se caracterizan por un soma de forma triangular con varias dendritas basales muy ramificadas y una gran dendrita apical de la que parten también varias ramificaciones (Bannister y Larkman, 1995). Asimismo, las neuronas piramidales se caracterizan por tener un gran número de espinas dendríticas que pueden llegar hasta 30,000 (Irie y Yamaguchi, 2009) (figura 1). Estas células reciben proyecciones en el soma, las dendritas y el axón. Por lo general, el soma y el axón reciben mayormente señales inhibitorias GABAérgicas, mientras

las dendritas reciben mayoritariamente señales excitatorias glutamatérgicas (Somogyi *et al.*, 1985).

Las neuronas granulares presentan un soma de forma redonda del que se extienden una o dos dendritas y de ellas se ramifican varios ordenes de dendritas. En ratones, estas neuronas no presentan dendritas basales, pero si un gran axón que puede ramificarse abundantemente (Blaabjerg y Zimmer, 2007). Las neuronas granulares del GD presentan grandes botones pre-sinápticos llamados terminales musgosas grandes (LTMs) que generan contactos sinápticos con las dendritas piramidales de CA3 llamados excrecencias espinosas. Las LTM también exhiben protuberancias citoplasmáticas de tipo filopodios, las cuales en su extremo contienen terminales pre sinápticas (Frotscher *et al.*, 2000). Estas terminales presinápticas forman conexiones con neuronas inhibitorias cercanas a la capa CA3 (Frotscher *et al.*, 2000).

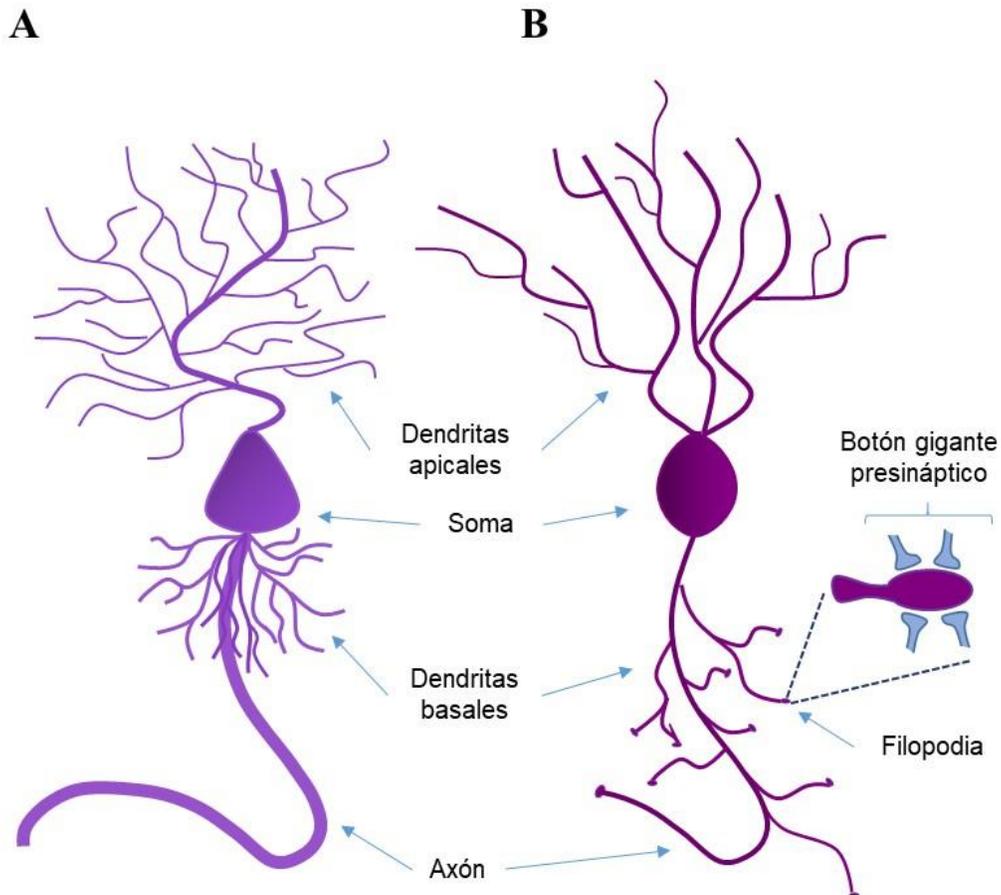


Figura 1 Esquemización de los dos tipos principales de neuronas en el hipocampo

A) Esquema de una neurona piramidal presente en el cuerno de Amón, se representan las partes principales de estas neuronas, siendo que estas poseen un soma cónico. B) Esquema de neurona granular presente en el GD, se señalan las partes principales de la neurona, haciendo énfasis en su soma redondeado y sus botones sinápticos gigantes.

Organización. Los cuernos de Amón son las capas hipocámpicas principales del hipocampo, y están definidas no sólo por los principales tipos neuronales que las componen, sino por los estratos que las rodean (Amaral y Witter, 1989). Las principales tres capas de hipocampo, CA3, CA2 y CA1 se encuentran rodeadas por el *stratum oriens* donde se acomodan las dendritas basales de las neuronas piramidales. Asimismo, CA1 y CA2 son muy parecidos

entre sí, siendo que los dos presentan *stratum radiatum* y no *stratum lucidum* como en CA3 en la zona de dendritas apicales (Figura 2) (Fogwe *et al.*, 2021). Adicionalmente, aunque el GD es una región anatómicamente diferente a las otras tres capas y está separada por una lámina de piamadre, la conectividad y función de este permiten que sea mencionado como una capa más del hipocampo (Amaral *et al.*, 2007). El giro dentado está conformado por tres capas: la capa molecular, granular y subgranular. La capa más exterior del GD es la molecular, y está conformada principalmente por las dendritas de las células granulares, axones provenientes de la vía perforante de la CE, neuronas inhibitorias y astrocitos (Wang *et al.*, 2014, Witter y Amaral, 1991, Martinez-Canabal *et al.*, 2013). Por otro lado, la capa granular contiene una gran densidad de cuerpos granulares, siendo que llega a medir ~60 µm de ancho en el cerebro de ratón (Amaral *et al.*, 2007). En la capa interna del GD se encuentra una de las dos zonas en donde continuamente se generan nuevas neuronas durante toda la vida adulta (Altman y Das, 1965). Esta región que presenta un conjunto de células troncales neurales, progenitores neurales y gliales, así como neuronas inmaduras, se denomina zona subgranular.

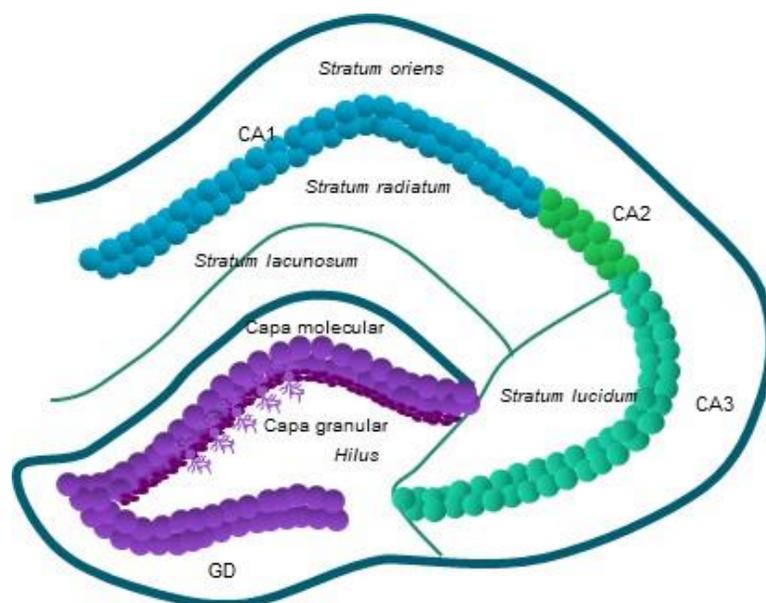


Figura 2 Estructura hipocampal

Se muestra la localización de cada una de las capas del hipocampo, así como las delimitaciones entre ellas. El giro dentado (GD) cuenta con una capa granular donde están los somas neuronales y otra molecular llena de dendritas; además se muestra en color morado fuerte el nicho neurogénico de donde proviene la neurogénesis hipocampal adulta. El GD se encuentra delimitado por pia madre (dibujada en azul marino) y el *hilus*, que es donde se conectan las fibras musgosas con las piramidales del cuerno de Amón 3 (CA3). CA3 está delimitado por el *stratum lucidum* que contiene los axones de esta misma capa. A un lado de CA3 se encuentra el cuerno de Amón 2 (CA2) que es una capa que no contiene *stratum lucidum* pero cuenta con *stratum radiatum*, el cual comparte con el cuerno de Amón 1 (CA1). Asimismo, los árboles dendríticos de CA1 se encuentran en el *stratum lacunosum*. Por último, los tres cuernos de Amón se encuentran rodeados por el *stratum oriens* y pia madre.

Conectividad intra hipocampal. El hipocampo, al contrario de lo que usualmente ocurre en estructuras corticales, presenta conexiones con un solo sentido entre capas conocido como el circuito trisináptico (Figura 3)(Amaral y Witter, 1989, Witter, 2010). La primera estructura de este circuito es la corteza entorrinal (CE); la cual tiene proyecciones desde la capa II hacia las neuronas granulares del giro dentado y las neuronas piramidales de CA3, asimismo, CA1 recibe aferencias inhibitorias monosinápticas de la capa V de la CE (figura 2)(Witter y Amaral, 1991). Estas proyecciones conforma la vía de entrada de información más importante del hipocampo, llamada vía perforante, la cual debe su nombre a que la piamadre que rodea el hipocampo para llegar a su destino (Knowles, 1992). Por otro lado, el GD no proyecta de regreso a la corteza entorrinal, pero si se conecta con las neuronas piramidales de CA3 en el tracto conocido como fibras musgosas, siendo aferencias excitatorias que

generan conexiones tanto con las neuronas piramidales de CA3 como con interneuronas del *stratum lucidum* y el *stratum radiatum* (Markakis y Gage, 1999). De igual manera, la capa granular del GD proyecta hacia la capa molecular del mismo. Dentro del *hilus* se hallan neuronas colaterales de CA3, que se restringen mayoritariamente a esta zona, sin embargo, se ha observado que existen algunas que se conectan a la zona molecular del GD (Scharfman, 2007).

Las neuronas piramidales de CA3 generan aferencias hacia CA1, la corteza entorrinal, y hacia sí mismas, mediante sus axones llamados colaterales de Schaffer (CS)(Knowles y Schwartzkroin, 1981). Además, existen varias conexiones aferentes y eferentes entre CA3 y el núcleo septal (Amaral y Witter, 1989). Es importante señalar que la CS tienen conectividad excitatoria con regiones proximales de las dendritas apicales de las piramidales de CA1 en el *stratum radiatum*, mientras que las aferencias provenientes de CE generan conectividad excitatoria con regiones más distales de CA1 en el *stratum lacunosum* (Bernard y Wheal, 1994). Siguiendo con la descripción del circuito trisináptico, CA1 no tienen conexiones de regreso a CA3, sino que sus proyecciones son hacia el subículo, la corteza entorrinal, la amígdala basolateral (BLA),, la corteza prefrontal medial (CPFm) y el bulbo olfatorio (OB) (Bernard y Wheal, 1994).

CA1 es una región que al igual que CA3 recibe proyecciones directas e indirectas provenientes de la CE (Bernard y Wheal, 1994). Las primera de ellas es desde la capa II de la CE hacia las dendritas distales de las piramidales de CA1; la segunda proveniente de las CS del circuito CE-GD-CA3 (Witter, 2010). Asimismo, CA2 a través de su conexión directa con la CE, promueve una fuerte respuesta excitatoria en CA3, que es mayor que la que se origina por el circuito CE-GD-C3-CA1 (Robert *et al.*, 2018). Es importante mencionar que

las conexiones con el subículo y la CE proporcionar de manera indirecta información sensorial, temporal y asociativa desde numerosos módulos corticales; así como reciben información de diferentes estructuras talámicas (Witter y Amaral, 1991). Por esta razón el hipocampo es un centro de integración de información tanto sensorial como ejecutiva.

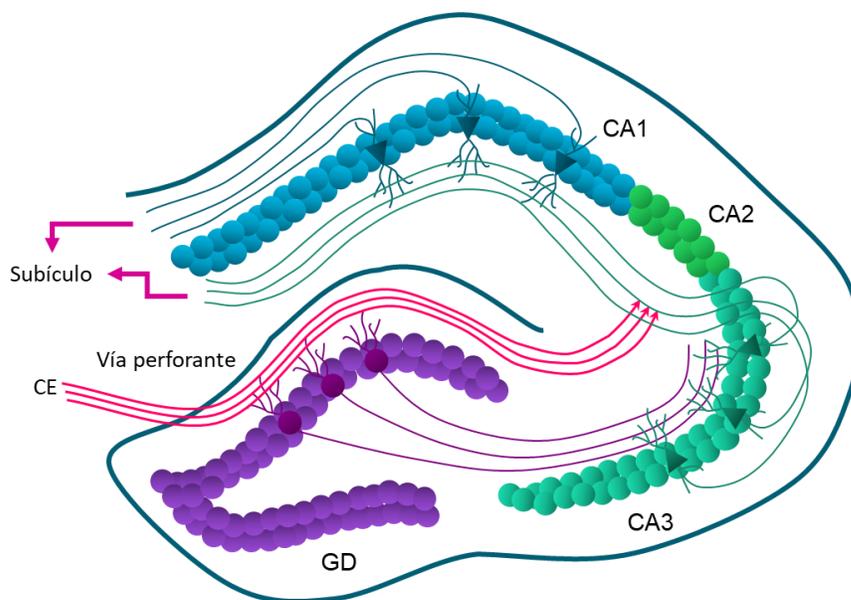


Figura 3 Conectividad hipocámpica

Se muestra en el esquema la interacción entre cada una de las capas dentro del hipocampo. Se ilustra en rosa la única vía de entrada de información proveniente de la corteza entorrinal (CE), que se comunica directamente con el giro dentado (GD), así como las fibras colaterales de Shaffer del cuerno de Amón 3 (CA3). El cuerno de Amón 2 (CA2) se ilustra como una pequeña población de neuronas entre CA3 y el cuerno de Amón 1 (CA1) que conecta con ambas. CA1 es el último relevo del circuito trisináptico y proyecta hacia el subículo y de regreso a la CE.

Conectividad cortico-hipocampal

CA1 y el subículo son los últimos relevos del circuito hipocampal y la mayor fuente de eferencias hipocampales (Knowles, 1992). Las neuronas piramidales de CA1 proyectan hacia la corteza perirrinal, la corteza prefrontal, la corteza retroespenial, la amígdala, el subículo y la corteza entorrinal (Van Groen y Wyss, 1990). Asimismo, la conexión hacia la CE conforma una parte del circuito de retroalimentación entre esta y el hipocampo, de manera que CA1 manda proyecciones excitatorias a la capa V y esta a su vez excita las capas II y III de la CE, cerrando el circuito hipocampal-CE (Naber *et al.*, 2001). Además de las eferencias excitatorias, existen eferencias inhibitorias de tipo GABAérgicas que proyectan hacia la corteza retroespenial (Miyashita y Rockland, 2007). Asimismo, se ha reportado que CA1/subículo generan proyecciones glutamatérgicas directas hacia las neuronas piramidales e interneuronas de la corteza prelímbica y orbitofrontal, ambas con un rol importante en la ejecución de funciones como la toma de decisiones o la flexibilidad cognitiva (Tierney *et al.*, 2004).

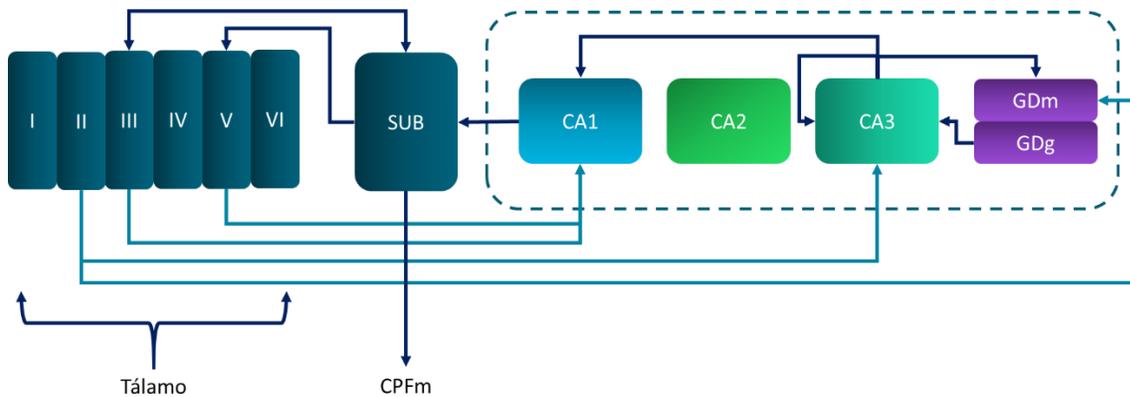


Figura 4 Esquematación de la conectividad cortico-hipocampal

De izquierda a derecha; en azul rey se representan las diferentes capas de la corteza que manda o reciben información proveniente del hipocampo. Asimismo, se ilustra el subículo (SUB) como estructura que conecta el hipocampo con la corteza prefrontal (CPFm). Encerrados en línea punteada se esquematizan los cuernos de Amón y el giro dentado (GD), en donde se muestran las conexiones intrahipocampales y parahipocampales. El sentido de las flechas indica la dirección del estímulo.

2.1.2 Descubrimiento de la neurogénesis hipocampal adulta

Durante gran parte del siglo XX se pensó que el cerebro adulto de los mamíferos no poseía la capacidad de generar nuevas neuronas. Fue Ramón y Cajal quien en su afán de describir la cito arquitectura del cerebro mamífero, llegó a la conclusión de que no había razones para sospechar que el tejido neural se regeneraba (Stahnisch y Nitsch, 2002). Este dogma permaneció incuestionable por varias décadas, hasta que los años de 1960 y 1970, avances en el uso de isótopos radioactivos en preparaciones histológicas permitieron a Joseph Altman usar un nuevo método con el que pudo identificar células mitóticas en secciones cerebrales de ratas (Altman y Das, 1965). Altman utilizó ^3H -timidina, un isótopo que se incorpora al ADN durante la fase S del ciclo celular, por lo que marca células en división. Además, con ese mismo método Michael Kaplan reportó presencia de células mitóticas en

cerebros de ratas adultas y primates no humanos (Kaplan y Hinds, 1977). No obstante, los estudios de ambos investigadores no impactaron en la comunidad neurocientífica, y el dogma de que no se generan nuevas neuronas en el cerebro posnatal continuó intacto durante varios años más (Owji y Shoja, 2020).

Durante la década de 1990 hubo un gran avance en el campo de las neurociencias, y los estudios de Altman y Kaplan volvieron a resurgir. Asimismo, durante este periodo se desarrolló una nueva técnica de inmunotinción utilizando 5-bromo-2'-deoxyuridina (BrdU); este marcador, al contrario de la ^3HH -Timidina, podía detectarse mediante anticuerpos lo que facilita su colocalización con marcadores específicos de neuronas o glia (Miller y Nowakowski, 1988). De esta manera, se logró confirmar la existencia de neurogénesis y gliogénesis en cerebros adultos de una gran variedad de vertebrados (Amrein *et al.*, 2011). No obstante, la presencia de neurogénesis adulta parece estar más restringida en los mamíferos, siendo que sólo se ha confirmado en dos regiones cerebrales (Kaplan y Hinds, 1977). En los mamíferos la neurogénesis adulta se ha observado en el epéndimo de los ventrículos laterales, desde donde las neuronas nuevas migran hacia el bulbo olfatorio, y en la capa subgranular del GD (SGZ) (Kaplan y Hinds, 1977). No obstante, no se ha observado neurogénesis adulta en todos los mamíferos, como son los cetáceos y algunas especies de murciélagos (Patzke *et al.*, 2015a). La presencia de neurogénesis hipocampal adulta parece estar regulada por la historia de vida de los mamíferos, siendo que la tasa de proliferación decrece con la edad (Amrein y Lipp, 2009). Por otro lado, la presencia de neurogénesis hipocampal adulta de humanos ha sido tema de discusión durante las últimas dos décadas (Moreno-Jiménez *et al.*, 2021).

Los estudios sobre neurogénesis hipocampal adulta (NHA) en humanos han mostrado evidencias contradictorias y por ello no se ha establecido un punto de vista generalizado (Moreno-Jiménez *et al.*, 2021, Paredes *et al.*, 2018). A finales del siglo XX, se publicó el primer estudio en dónde se observó NHA en humanos, en este se estudiaron cerebros *post mortem* de pacientes con cáncer, a los cuales se les inyectó en vida Brdu para monitorear el crecimiento de tumores (Eriksson *et al.*, 1998). Al hacer la autopsia, Eriksson y colaboradores (1998) se dieron cuenta que había células positivas a Brdu en el cerebro de los pacientes, confirmando por primera vez la presencia de NHA en humanos. Más adelante estos resultados fueron confirmados en otro estudio que utilizó otro enfoque innovador para cuantificar el número de NHA (Spalding *et al.*, 2013). El método se basó en la medición del aumento transitorio en la disponibilidad de ^{14}C durante ensayos nucleares correlacionado con la incorporación de este isótopo en neuronas granulares de cerebros *post mortem*. Spalding y colaboradores (2013) corroboraron que muchas células tenían en el DNA el perfil de ^{14}C que correspondería a las mediciones atmosféricas de distintos años de la vida de los individuos estudiados; concluyendo que se agregan 700 nuevas neuronas por día en humanos y esta tasa decae con la edad, pero no desaparece. Sin embargo, tiempo después otros estudios no lograron observar NHA en humanos después de la infancia (Dennis *et al.*, 2016, Cipriani *et al.*, 2018, Sorrells *et al.*, 2018). No obstante, en uno de estos estudios se evaluaron los niveles de nuevas neuronas y proliferación en sujetos con Alzheimer así como sujetos sanos, encontrando que en este caso si había presencias de NHA (Cipriani *et al.*, 2018). Otros estudios, usando diferentes métodos inmunohistoquímicos, también observaron NHA en humanos, en etapas adultas y durante toda la vida de humanos saludables, así como en personas con Alzheimer (Ernst *et al.*, 2014, Knoth *et al.*, 2010, Tobin *et al.*, 2019, Moreno-Jiménez *et al.*, 2019). En conclusión, es apresurado afirmar que la NHA en humanos no

existe, ya que como hemos revisado brevemente en el presente capítulo, existe basta literatura afirmando que la NHA existe en humanos (Moreno-Jiménez *et al.*, 2021). Además de esto, se puede inferir la presencia de NHA en humanos ya que es una característica presente en todos los mamíferos altriciales estudiados y más aquellos con heterocronía que en humanos se observa con infancias largas y la permanencia de caracteres infantiles que desaparecen en otros grandes primates (Siwak-Tapp *et al.*, 2007, Amrein *et al.*, 2011, Gould *et al.*, 1999).

2.1.3 De células troncales a neuronas: historia de vida de la neurogénesis hipocampal adulta

La neurogénesis hipocampal adulta requiere la presencia continua de células troncales neurales (CTN) capaz de renovarse a sí mismas mediante divisiones asimétricas. El proceso conlleva varias etapas; proliferación, diferenciación y maduración; todo este proceso se lleva a cabo en la zona subgranular (ZSG) y granular (ZG) del giro dentado y tiene una duración total de 4 a 6 semanas (Zhao *et al.*, 2006). Durante la proliferación las CTN generan células hijas de las que derivan tres tipos de progenitores neuronales (Figura 5). Asimismo, se ha observado que el proceso de neurogénesis adulta es similar al que ocurre en etapas tempranas del desarrollo (Espósito *et al.*, 2005).

Proliferación. Para iniciar, de las CTN derivan los tres tipos de progenitores neuronales. Los progenitores tipo I poseen un fenotipo de células gliales radiales positivas a la proteína glial fibrilar ácida (GFAP), al transportador de glutamato específico de astrocitos (GLAST), a la proteína de unión a Ca^{2+} S100 β y al filamento intermedio Nestina (Ne), los cuales pueden dar lugar a un número restringido de destinos celulares; pueden derivar en oligodendrocitos, astrocitos, y en la mayoría de los casos neuronas (Seri *et al.*, 2001, Filippov *et al.*, 2003). (Filippov *et al.*, 2003) (DeCarolis *et al.*, 2013) (Raponi *et al.*, 2007) (DeCarolis *et al.*, 2013). El tipo I de progenitor da origen al tipo II que expresa aún

algunos marcadores gliales como nestina, pero carece de las características radiales (Kronenberg *et al.*, 2003, Filippov *et al.*, 2003). Asimismo, en el progenitor tipo II comienza la expresión de marcadores que indican el destino neuronal como NeuroD1 y Prox1 (Steiner *et al.*, 2006). Estos progenitores neuronales poseen una actividad proliferativa más alta que los progenitores tipo I; y es en esta etapa donde se ha observado que los progenitores responden a cambios fisiológicos como el ejercicio aeróbico (Brandt *et al.*, 2010). Poco después de esta etapa, comienza a expresarse DCX y deja de aparecer la nestina (progenitor tipo III) (Plümpe *et al.*, 2006, Brown *et al.*, 2003), una proteína asociada a microtúbulos necesaria para la migración celular (Horesh *et al.*, 1999), esta proteína puede ser encontrada desde la fase de proliferación hasta tres semanas después de la división mitótica (Plümpe *et al.*, 2006, Brown *et al.*, 2003). Los progenitores tipo III tienen poca actividad proliferativa, no obstante se ha observado que el ejercicio aeróbico puede aumentar el número de estos progenitores (Brandt *et al.*, 2010).

Diferenciación. Los progenitores tipo III pasan por una división mitótica asimétrica, esto quiere decir que se origina una célula que hereda las características de progenitor y la otra seguirá un destino neuronal (Lin y Schagat, 1997). Aquellas células que siguieron el destino neuronal expresan mayormente DCX y comienzan a expresar marcadores que se asocian con maduración como NeuN y calretinina (Brandt *et al.*, 2003). Pocos días después de la última división mitótica, aumentan dramáticamente las células DCX+, pero estas disminuyen dramáticamente poco tiempo después al ser eliminadas por apoptosis, llegando a eliminarse cerca de un 90% (Kempermann *et al.*, 2003, Biebl *et al.*, 2000, Kuhn *et al.*, 2005). Uno de los efectos del enriquecimiento ambiental es la disminución de la apoptosis y la supervivencia de más neuronas inmaduras (Young *et al.*, 1999).

Maduración. Los neuroblastos empezarán a mostrar un fenotipo neuronal pocos días después de la proliferación celular. Estos neuroblastos tempranos están restringidos a la SZG y ya muestran pequeños potenciales de acción con pocas aferencias sinápticas, así como una resistencia muy alta en la membrana debido a los pocos canales (Ambrogini *et al.*, 2004, Ge *et al.*, 2006). Los neuroblastos de una semana de edad no poseen espinas dendríticas y su árbol dendrítico aún no llega a la capa más externa del GD (Zhao *et al.*, 2006). Pasadas 2 semanas, los neuroblastos pueden ser activados a través de la estimulación tetánica de la vía perforante o a través de convulsiones inducidas con kainato; en ambos casos esta activación induce la transcripción de genes de expresión temprana como *cfos*, *EGR-1*Fos, *8* y *HOMER1* (Jessberger y Kempermann, 2003, Bruel-Jungerman *et al.*, 2005). Posteriormente, a las 3 semanas de edad, los neuroblastos empiezan a recibir aferencias glutamatérgicas mediante la vía perforante y exhiben potenciales de acción de manera repetitiva y de rápida adaptación (Hastings y Gould, 1999). En la cuarta semana se completa el proceso de maduración y las neuronas inmaduras proyectan aferencias hacia CA3 que se unen a la vía musgosa, asimismo su árbol dendrítico alcanza la capa molecular del GG (Espósito *et al.*, 2005, Hastings y Gould, 1999).

La conectividad funcional de las nuevas neuronas con CA3, su zona blanco principal, comienza desde los 10 días post-mitosis. Se ha observado con ayuda de trazadores retrógrados inyectados en CA3, que estos comienzan a colocalizar con células +Brdu en el GD desde los 10 días después de la inyección; siendo que llega a su máxima colocalización a los 17 días posterior a la inyección de Brdu (Hastings y Gould, 1999). Asimismo, esta misma cuestión fue abordada por Zhao y colaboradores (2006) donde utilizan marcadores retrógrados en neuronas que expresan la proteína verde fluorescente (GFP). En este estudio,

los axones positivos a GFP alcanzaban CA3 al décimo días después de la inyección del marcador retrógrado, y esta conectividad aumentaba progresivamente hasta que los axones alcanzaron su distancia máxima a los días 16-56 (Zhao *et al.*, 2006). Por lo que podemos decir que existen axones funcionales y conectados antes de que los primeros arboles dendríticos se desarrollen (Jones *et al.*, 2003).

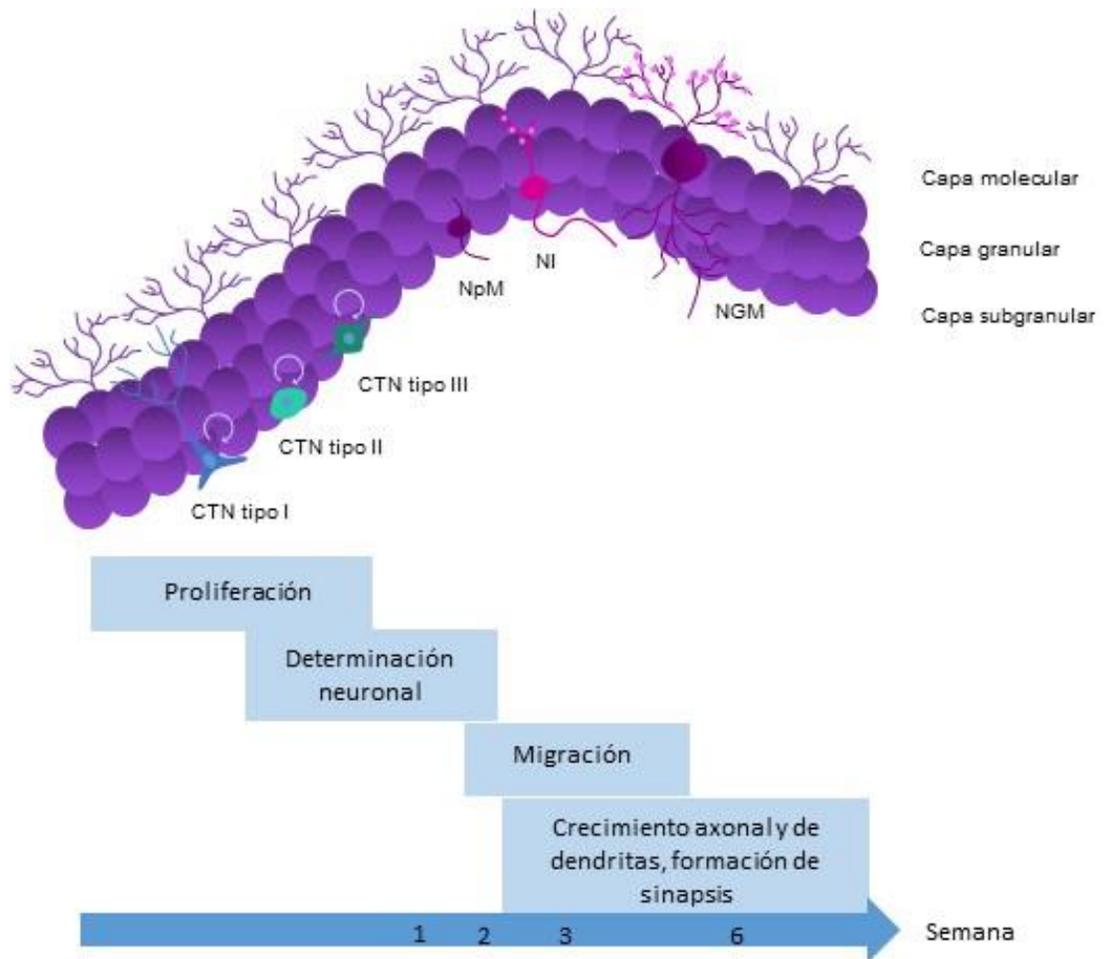


Figura 5 Historia de vida de la neurogénesis hipocampal adulta.

Se muestra en los recuadros azules la etapa de desarrollo para formar una nueva neurona, así como la duración de cada una de ellas representada en la flecha inferior. En este esquema ha sido representadas los diferentes tipos celulares que participan en la neurogénesis, las células troncales neurales tipo I (CTN I) son altamente proliferativas y dan lugar al siguiente tipo celular las células troncales neuronales tipo II y después al tipo III (CTN II y III). Las CTN III son menos proliferativas y dan origen por división asimétrica las primeras células con fenotipo neuronal (NpM). Posteriormente estas neuronas post-mitóticas van migrando y madurando, formando sus primeras espinas dendríticas (NI). Pasados 6 semanas post-mitosis las neuronas han madurado (NGM) y sus somas se encuentran en la capa granular y su árbol dendrítico en la capa molecular.

2.1.4 La participación del hipocampo en la memoria y el aprendizaje

La primera evidencia determinante de la importancia de la formación hipocampal en la adquisición de memorias episódicas fue a partir de las observaciones realizadas en el paciente H.M (Scoville y Milner, 1957). Este paciente sufrió un notable fallo en la memoria después de que se le removió quirúrgicamente gran parte del lóbulo temporal medial. H.M. sufría de amnesia anterógrada completa después de su cirugía, es decir, tras la intervención le fue imposible formar memorias de eventos posteriores a este procedimiento; también sufrió en mucho menor medida amnesia retrógrada de eventos recientes a la operación (Scoville y Milner, 1957). Sin embargo, la memoria motora de H.M. permaneció intacta debido a que era capaz de aprender y evocar habilidades motoras con facilidad, aunque eventualmente olvidara haberlas realizado (Milner *et al.*, 1968). La cirugía de H.M. fue realizada de manera cuidadosa para no lastimar partes de la corteza, que se pensaba eran las encargadas de la mayoría de los procesos cognitivos (Steinvorth *et al.*, 2005). Como resultado, solo removieron estructuras como el hipocampo, la corteza entorrinal y la

amígdala. Por lo que fue una gran sorpresa darse cuenta que la memoria declarativa de H.M. había sido afectada (Corkin *et al.*, 1997).

El hipocampo es una estructura esencial para crear representaciones espaciales y temporales de eventos que suceden a lo largo de la vida animal y humana (Tulving y Markowitsch, 1998). Además, participa en la evocación de situaciones específicas de la historia de vida o de conocimiento general, lo que es llamado: memoria episódica y semántica (Tulving, 1995). Por consiguiente, una lesión o desconexión del hipocampo resultaría en un déficit o pérdida de la memoria espacial y contextual. Por esta razón, varios estudios han optado por inactivar o lesionar el hipocampo y observar utilizando protocolos conductuales dependientes de hipocampo, como laberintos espaciales o condicionamiento asociados a contexto (Holt y Maren, 1999, Jarrard, 2002). Con relación a estos protocolos, se ha utilizado el condicionamiento al miedo contextual, un protocolo en donde se asocia un contexto específico a un choque eléctrico en las patas (Saxe *et al.*, 2006). Usando este protocolo, se observó que lesiones electrolíticas en hipocampo dorsal antes de colocarlos en a caja de condicionamiento impedía que los animales asociaran el contexto con la situación aversiva (Phillips y LeDoux, 1994); asimismo, una lesión inmediatamente posterior al condicionamiento impedía la evocación de la memoria de miedo (Maren, 1999, Phillips y LeDoux, 1994). Dentro de esta línea de pensamiento, otras investigaciones utilizando lesiones con colchicina, un fármaco que evita la polimerización de microtúbulos y genera apoptosis específicamente en el GD, pero no en CA3 y CA1, se observaron efectos deletéreos en la memoria espacial en el laberinto de brazos radiales y la tarea de evitación pasiva (ambos protocolos que presentan un importante componente contextual) (Tilson *et al.*, 1987, Walsh *et al.*, 1986). Por otro lado, la ablación específica de GD con colchicina también causó un

rendimiento bajo en el laberinto acuático de Morris y en la tarea de memoria de referencia especial (Sutherland *et al.*, 1983, Xavier *et al.*, 1999). En conclusión, los estudios anteriores demuestran el importante rol del hipocampo en el procesamiento de memorias episódicas, y no solo de las capas piramidales sino también del giro dentado. No obstante, el rol de la NHA ha sido tema de debate desde su descubrimiento.

2.1.5 El rol de la neurogénesis hipocampal adulta en la memoria y aprendizaje

La neurogénesis hipocampal adulta es una característica del hipocampo mamífero que ha promovido la búsqueda del significado biológico a estas neuronas, más específicamente su rol en la memoria y aprendizaje (Koehl y Abrous, 2011, Oomen *et al.*, 2014). Al comienzo de estas investigaciones se utilizó como pensamiento general la hipótesis de que la NHA era necesaria para generar memorias dependientes de hipocampo, por lo que comenzaron por reducir los niveles de NHA. En una serie de experimentos para poner a prueba esta hipótesis, se sometieron a ratones a varias pruebas conductuales, entre ellas el laberinto acuático de Morris, el condicionamiento al miedo contextual y el laberinto elevado en cruz (Shors *et al.*, 2002). Usando acetato de metilazoximetanol (MAM), una droga que reduce significativamente la proliferación se observó que la disminución de la NHA antes de la adquisición de estos protocolos no tuvo efectos en el desempeño en los laberintos o en la expresión del miedo (Shors *et al.*, 2002). En otro experimento en donde se utilizó irradiación focal al hipocampo, se observó que los animales irradiados aprendían igual que los animales que no habían sido irradiados durante el entrenamiento en el laberinto acuático de Morris (Snyder *et al.*, 2005). No obstante, en esta misma investigación se observó que la irradiación si tenía efecto en la evocación de la memoria a largo plazo (Snyder *et al.*, 2005). Además de este estudio, se realizó una investigación similar en donde empleaban irradiación al

hipocampo y encontraron resultados poco concluyentes acerca de si la ablación de la NHA tenía efecto en el desempeño durante la navegación espacial en el laberinto acuático de Morris (Winocur *et al.*, 2006).

Además de estos experimentos en donde se reduce la cantidad de neuronas nuevas, también existen protocolos en donde se incrementa el nivel de NHA. Con relación a esto, uno de los protocolos utilizando ampliamente para incrementar la NHA es el enriquecimiento ambiental (Young *et al.*, 1999) y el ejercicio aeróbico (van Praag *et al.*, 1999b). Utilizando el ejercicio aeróbico como método de incremento de neurogénesis, se observó que este aumento mejoró el desempeño de los animales dentro del laberinto acuático de Morris (van Praag *et al.*, 1999a). Por otro lado, se ha observado que en animales sin NHA sometidos a un protocolo de enriquecimiento ambiental, tienen cambios en el aprendizaje espacial, reducción de ansiedad y una habituación más rápida a un lugar desconocido, todos efectos independientes de la NHA (Meshi *et al.*, 2006). No obstante, otro experimento que utilizó ratones de 18 meses de edad, que poseen significativamente menor tasa de NHA, tuvieron acceso a una rueda de ejercicio y mejoraron su desempeño en el laberinto acuático de Morris, llegando a los niveles de desempeño de los animales más jóvenes (van Praag *et al.*, 2005). En otro experimento, se utilizó una cepa de ratones transgénicos inducibles knock-out para la proteína Bax (Sahay *et al.*, 2011). Esta proteína pertenece a la familia de reguladores de apoptosis, por lo que los ratones knock-out tenían mayor sobrevivencia de neuronas nuevas. Estos ratones fueron sometidos a una tarea conductual diseñada para diferenciar entre el contexto seguro y el contexto aversivo, algo que fue llamado como separación de patrones; sorprendentemente los ratones con un incremento de la NHA diferenciaban mejor entre contextos (Sahay *et al.*, 2011). Sin embargo, estos resultados contrastan con los hallazgos

anteriores sobre que la apoptosis es un mecanismo de regulación necesario para la formación de memorias espaciales (Dupret *et al.*, 2007). También contrastan con datos que muestran que la ablación de neurogénesis previa al entrenamiento no afecta la separación de patrones, únicamente cuando esta se realiza post-entrenamiento (Arruda-Carvalho *et al.*, 2011).

A pesar de los innumerables esfuerzos para dilucidar si la NHA es necesaria o no para la adquisición o la evocación de la memoria, las evidencias han arrojado poca nitidez al respecto. No obstante, quizá la participación de la NHA no es tan simple como permitir o no el aprendizaje y la evocación a corto plazo de engramas espaciales, pero si en cómo la memoria puede ser modificada a largo plazo.

2.1 El posible significado biológico de la neurogénesis hipocampal adulta reside en la consolidación de engramas espaciales

2.1.1 La codificación, almacenaje y evocación de engramas espaciales depende de la participación del hipocampo y la corteza prefrontal

La participación de la neurogénesis hipocampal adulta en la memoria y aprendizaje ha sido un debate constante dentro de las neurociencias. Los primeros experimentos se enfocaron en probar la hipótesis de que entre más neuronas se mejora la memoria (Meshi *et al.*, 2006, Shors *et al.*, 2002, van Praag *et al.*, 1999a, Winocur *et al.*, 2006, Young *et al.*, 1999, Sahay *et al.*, 2011); sin embargo, esta idea no ha sido aceptada ya que se ha observado que un incremento incontrolado de la NHA resulta en un peor desempeño cognitivo (Dupret *et al.*, 2007). A pesar de los resultados poco concluyentes, existe otra aproximación que requiere pensar que los engramas son flexibles, es decir son susceptibles de modificaciones que a largo plazo pueden ser una característica necesaria para responder a los constantes estímulos

cambiantes del medio (Josselyn y Tonegawa, 2020). Por esta razón, es necesario que primero se entienda el proceso que sufre la memoria para ser almacenada en engramas.

Las memorias episódicas, registros de las experiencias que hemos vivido, se forman en el cerebro a través de un proceso neuronal en donde son transformadas desde un estado inmaduro y lábil hacia un estado maduro y estable (Dudai, 2004, Lechner *et al.*, 1999). Este proceso de maduración y estabilización ha sido llamado consolidación (Lechner *et al.*, 1999). Durante la consolidación se pueden observar dos procesos, el primero de ellos sucede dentro de las primeras horas después del aprendizaje e incluye la organización sináptica de circuitos locales, por ejemplo, la aparición de nuevas conexiones sinápticas (Dudai, 2004). Por otro lado, el segundo proceso existe una reorganización neuronal que involucra regiones cerebrales que almacenan la memoria, este es un proceso más prolongado que puede incluir una reorganización en los circuitos que permiten evocar la memoria (Dudai, 2004). Estos circuitos son el sustrato neuronal en donde es almacenada la memoria, asimismo, son llamados engramas (Josselyn y Tonegawa, 2020). Este proceso de consolidación de engramas ha sido estudiado ampliamente en memorias espaciales que dependen de la organización espacio-temporal entre el hipocampo y la CPFm (Frankland y Bontempi, 2005).

Las memorias espaciales son codificadas en primera instancia en el hipocampo, en donde la traza neuronal es relativamente lábil y poco estable, asimismo la evocación de la memoria depende mayoritariamente del hipocampo (Frankland y Bontempi, 2005). Posteriormente, el engrama espacial consolida migrando hacia la CPFm donde se encuentra la mayor parte de la traza neuronal, lo que significa que la evocación de la memoria espacial depende mayoritariamente de la activación del engrama cortical y no del engrama hipocampal (Frankland y Bontempi, 2005). Esta idea de que los engramas espaciales conlleva

un cambio espacial y temporal dentro de los circuitos hipocampales y corticales fue respaldada tanto por observaciones clínicas en humanos como en modelos animales. De esta manera, el paciente H.M., quien tuvo una cirugía para extraer gran parte del lóbulo temporal medial (LTM), mostró las primeras evidencias sobre el tipo de memoria que necesitaba de la participación de esta región para ser almacenada y evocada (Steinvorth *et al.*, 2005, Schmolck *et al.*, 2002). Posterior a la cirugía, H.M. había perdido la capacidad para formar memorias declarativas nuevas, tanto las memorias de eventos y experiencias de vida (memorias episódicas) como la capacidad de adquirir nuevo conocimiento o hechos de vida (memoria semántica) (Schmolck *et al.*, 2002). A pesar de este problema, el paciente H.M. no había perdido los recuerdos más viejos de su vida, como los de la infancia, pero sí padecía de una ligera amnesia retrógrada que le impedía evocar muchos recuerdos de los 11 años previos a la cirugía (Corkin, 1984). Además de esto, varias investigaciones han observado que el grado de amnesia retrógrada está correlacionado positivamente con el tamaño de la lesión del LTM (Bayley *et al.*, 2003, Simons y Spiers, 2003). Estas últimas observaciones nos dejan con la duda de que tanto tiempo se necesita para que una memoria episódica migre y si depende en su totalidad de engramas corticales, o si el proceso de consolidación es más complicado de lo que previamente se planteó. Por esta razón, aunque las observaciones clínicas son concordantes con la teoría general de la consolidación de engramas espaciales, presentan varios problemas al ser estudios retrospectivos, en donde no se puede observar todo el proceso de formación de la memoria.

Además de las observaciones clínicas, se han utilizado varios modelos animales en conjunto con varias aproximaciones experimentales, como las lesiones farmacológicas o genéticas. De esta manera, en un experimento se bloqueó de manera inducible la expresión

de la subunidad NR1 del receptor NMDA (N-metil-D-aspartato), receptor necesario para la formación de la memoria a largo plazo (Cui *et al.*, 2004), para evaluar la participación del hipocampo en la consolidación de la memoria (Shimizu *et al.*, 2000). Los animales fueron entrenados en el laberinto acuático de Morris o en el condicionamiento contextual, una semana posterior al entrenamiento se bloqueó la actividad de los receptores NMDA y observaron que se impedía la consolidación de la memoria. Por otro lado, si el bloqueo de los receptores NMDA sucedía posterior a una semana del entrenamiento, el proceso de consolidación seguía su curso. Asimismo, otra investigación utilizó lidocaína, un bloqueador de canales de sodio, para inactivar temporalmente la actividad del hipocampo dorsal y de la corteza cingulada anterior (CCA) durante la evocación reciente y remota de una memoria espacial (Teixeira *et al.*, 2006). Teixeira *et al.* (2006) observaron que al bloquear la actividad de la CCA se impedía la evocación de la memoria a largo plazo, no así a corto plazo. Contrariamente, bloquear la actividad del hipocampo dorsal evitaba la evocación de la memoria a corto plazo, pero no afectaba la evocación a largo plazo. Con relación a esto, en esta misma investigación se observó la actividad neuronal tanto de la CCA y del hipocampo dorsal usando el marcador c-Fos, factor de transcripción derivado de un gen de expresión temprana cuya transcripción depende de la activación de canales de calcio dependientes de voltaje tipo L (Murphy *et al.*, 1991). La expresión de c-Fos confirmó que había mayor actividad neuronal en el hipocampo dorsal, y no de la CCA, durante la prueba de memoria un día después de la adquisición de la memoria espacial (Teixeira *et al.*, 2006). En otro estudio en donde utilizaron un protocolo de condicionamiento contextual y observaron que la evocación remota incrementaba los núcleos positivos a c-Fos de la CPFm; como la CCA, la corteza prelímbica e infralímbica y la corteza orbitofrontal, así como algunos núcleos talámicos (Wheeler *et al.*, 2013). De manera interesante el hipocampo, tanto en la evocación

de memorias recientes o remotas, fue activado significativamente, aunque esta actividad disminuía con el tiempo (Wheeler *et al.*, 2013). Además de que es necesaria la integridad de los circuitos corticales e hipocampales, también es necesaria la conectividad entre ambas estructuras para que se termine el proceso de consolidación (Remondes y Schuman, 2004). Con relación a esto, en una investigación se observó que si se lesionaba las proyecciones entre la capa III de la CE y CA1 no afectaba el aprendizaje, pues los animales realizaban bien la tarea en el laberinto acuático de Morris, no obstante, esta misma lesión impedía la evocación a largo plazo (Remondes y Schuman, 2004).

En conjunto, estas observaciones son concordantes con la teoría original de la consolidación de engramas espaciales, que sustenta que las memorias episódicas van madurando y estableciéndose en circuitos corticales donde son difícilmente susceptibles a una modificación (Dudai, 2004, Frankland y Bontempi, 2005). Asimismo, el engrama espacial al ir madurando va siendo menos dependiente del hipocampo, siendo que se pensaría que la traza sólo se encuentra en la CPFm. No obstante, los resultados con c-fos de Wheeler *et al* (2013) y Teixeira *et al* (2006) así como las observaciones clínicas en pacientes con lesiones en LTM, sugieren que la actividad hipocampal en la expresión de memoria remotas es necesaria. Además de esto, el papel de la NHA no está presente en la hipótesis de consolidación de engramas, lo que resulta sumamente llamativo ya que es una característica significativa del hipocampo.

2.1.2 La neurogénesis hipocampal en la plasticidad de la memoria y la consolidación de engramas espaciales

La hipótesis de la consolidación de engramas espaciales fue el comienzo de la búsqueda de las trazas neuronales. Ahora no sólo nos interesaba saber cuál era el sustrato de

nuestras memorias, sino que estructuras participaban en la codificación, en el almacenamiento y la evocación tanto de memorias remotas como recientes. Dentro de estas investigaciones, se asomó de nuevo la sombra de la neurogénesis hipocampal adulta. Con este pensamiento en mente, algunos investigadores comenzaron a pensar que el rol de la NHA yacía en la plasticidad del circuito hipocampal y como esto afecta la codificación de nuevas memorias (Bruehl-Jungerman *et al.*, 2007).

Las neuronas nuevas del GD en el hipocampo poseen una característica electrofisiológica única, y es que se sabe que entre las 4 y 6 semanas de edad presentan un umbral más bajo para producir un LTP (potenciación a largo plazo) (Durand *et al.*, 1996). El LTP de estas neuronas nuevas les permite ser más fácilmente reclutadas para formar parte de un engrama espacial. Esta hipótesis sobre la ventana de plasticidad que poseen las nuevas neuronas fue la génesis de varios estudios importantes para entender el rol de la NHA en la memoria. Utilizando esta idea en mente, estudios computacionales y teóricos propusieron la hipótesis de que esta plasticidad de la NHA podría estar involucrada en eventos de eliminación de ambigüedades al proporcionar un grupo no decreciente de nuevas neuronas disponibles para codificar experiencias nuevas (Aimone *et al.*, 2009, Becker, 2005). De esta manera diferentes patrones pueden ser fácilmente codificados sin interferencia (Wiskott *et al.*, 2006). No obstante, se ha observado que las neuronas nuevas al madurar e incorporarse a la capa de neuronas granulares pre-existentes, responden de la misma manera y poseen la misma probabilidad de que sean reclutadas que las neuronas de origen embrionario (Stone *et al.*, 2011). La idea de la ventana de plasticidad de la NHA se volvió popular y se realizaron otros experimentos tratando de mostrar evidencia suficiente para demostrar su veracidad (Tashiro *et al.*, 2007, Aimone *et al.*, 2006, Rangel *et al.*, 2014, Wiskott *et al.*, 2006). No

obstante, hasta la fecha no hay evidencia empírica determinante que demuestre que la plasticidad de la NHA en un periodo crítico de su desarrollo es necesaria para adquirir nuevas memorias.

Mas investigaciones se continuaron haciendo durante la década pasada y surgió una en particular que buscaba entender el rol de la NHA en la consolidación de engramas espaciales (Kitamura *et al.*, 2009). En esta investigación se utilizó la irradiación como método de ablación de la NHA, que provoca desacoplamiento en el ADN de células en fase S, lo que hace susceptibles a las células en proliferación del GD. La teoría de consolidación de engramas espaciales dicta que existe una disminución progresiva de la dependencia hipocampal de memorias espaciales, conforme estas memorias van madurando (Frankland y Bontempi, 2005). De esta forma, utilizando irradiación focal, se eliminó la NHA en ratones que fueron sometidos a un condicionamiento contextual (Kitamura *et al.*, 2009). Al realizar una prueba de memoria un día después, la inactivación farmacológica del hipocampo del grupo irradiado y no irradiado evitó que se evocara la memoria de miedo contextual; siendo que la memoria aún era dependiente del hipocampo. Posteriormente, los investigadores observaron que la inactivación del hipocampo 5 semanas después del condicionamiento, afectó la evocación de memoria sólo de los ratones irradiados; lo que significaba que el engrama del condicionamiento aún dependía del hipocampo. Con estos resultados, se podría sugerir que en ausencia de NHA, el proceso de consolidación de memorias dependientes de hipocampo se ve ralentizada, entonces un aumento en la NHA aceleraría este proceso.

Esta hipótesis fue utilizada en esta misma investigación, y observaron que el aumento de NHA, por ejercicio aeróbico, provocaba que la memoria de miedo contextual dejara de depender del hipocampo tan solo 14 días después del condicionamiento (Kitamura *et al.*,

2009). Las observaciones de este estudio pueden deberse a un re-arreglo en las trazas hipocampales. De esta manera, las nuevas neuronas forman sinapsis con las piramidales de CA3 que desplazan las sinapsis previas, degradando el circuito previo e impidiendo que las trazas previamente codificadas no puedan ser evocadas correctamente (Toni *et al.*, 2007, Weisz y Argibay, 2012). Por lo tanto, un aumento de la NHA degradaría tanto el circuito previo que a 15 días después del entrenamiento no hubo evocación de la memoria. Asimismo, esta memoria no generó una traza funcional en la CPFm por falta de tiempo de maduración, suficientemente para evocar la memoria del miedo contextual.

En contraste con los demás estudios, Kitamura y colaboradores (2009) nos muestran que un significado biológico muy importante de la NHA yace en cómo modula el almacenamiento y reorganización de trazas hipocampales. Esto sugiere que la NHA es una característica que provee al hipocampo de un mecanismo que evita el almacenamiento descontrolado de memorias que son eventualmente intrascendentes, y a su vez permite la adquisición de memorias relevantes y actualizadas. Ambas son características conductuales esenciales en la adaptación de los mamíferos en un ambiente cuyas reglas cambian constantemente.

2.2 Implicación de la modificación de engramas en la flexibilidad cognitiva espacial

2.2.1 El olvido asociado a la neurogénesis hipocampal como sustrato para la flexibilidad cognitiva

Los mamíferos son un grupo de vertebrados que pasaron de ser pequeños animales confinados a pocos nichos ecológicos, a distribuirse en casi todos los nichos posibles. Por esta razón, una característica que debieron poseer los mamíferos del cretácico fue una plasticidad fenotípica capaz de responder al desafío de explorar nuevos ambientes (Kemp y

Kemp, 2005). La plasticidad fenotípica es la capacidad que poseen los organismos de dar origen a varios fenotipos dado un solo genotipo, y estos fenotipos pueden expresarse a varios niveles, desde codificar nuevas enzimas hasta nuevos comportamientos (Fusco y Minelli, 2010, West-Eberhard, 2003). Con relación a esto, los mamíferos son capaces de aprender constantemente nuevas respuestas conductuales al medio debido a que el cerebro puede codificar diferentes trazas de memoria y expresar la más conveniente, lo que es llamado como flexibilidad cognitiva (Crone *et al.*, 2004, Ghalambor *et al.*, 2010). La flexibilidad cognitiva es esencial para enfrentan a varios retos conductuales como la búsqueda de alimento, de pareja o incluso de hábitat, todos comportamientos que requieren, entre otras cosas, el procesamiento de memorias episódicas-espaciales (Jacobs, 1996, Ghalambor *et al.*, 2010). Como se mencionó en capítulos previos, el hipocampo es la estructura cerebral encargada de la codificación, almacenaje y evocación de estas memorias (Frankland y Bontempi, 2005). Asimismo, el hipocampo mantiene una tasa proliferativa durante toda la vida, y que posee la capacidad de reorganizar las trazas hipocampales y modifica el proceso de consolidación (Kitamura *et al.*, 2009). Esta importante participación de la NHA parece ser la responsable de mantener las memorias hipocampales importantes accesibles, y deshacerse de aquellas memorias que no son útiles. De esta manera, el hipocampo regula la cantidad de engramas que pueden almacenarse para que puedan codificarse nuevos engramas (Ridderinkhof *et al.*, 2004).

En 2014, Akers y colaboradores publicaron un artículo en donde hablaban de la relación entre altas tasas de NHA y la retención de la memoria. Ellos sometieron a ratones adultos a un condicionamiento contextual al miedo (asociar un contexto específico a un evento peligroso) y posterior a ello los colocaron durante un mes en una caja con acceso libre

a una rueda para hacer ejercicio. Después de este tiempo los ratones fueron sometidos a una prueba de memoria en el mismo contexto, sorprendentemente, los ratones corredores no expresaron la memoria de miedo, es decir olvidaron. Estos resultados conductuales correlacionaron con la alta tasa de NHA que había sido promovida por el ejercicio aeróbico. Por el contrario, los mismos autores pensaron que si se bloqueaba la NHA de estos animales corredores, evitarían que olvidaran. Como los autores hipotetizaron, los ratones corredores con baja neurogénesis no presentaron olvido y expresaron la memoria de miedo. Con ello los autores pudieron asegurar que el efecto en la retención de la memoria era dependiente de la cantidad de NHA y no del ejercicio aeróbico.

Además de estos resultados, se buscó si el efecto en la retención de la memoria se podía observar en ratones que normalmente tienen altas tasa de neurogénesis, como los ratones infantiles. Para ello, se sometió a ratones de 17 días posnatales a un condicionamiento contextual. Los investigadores observaron que un día después del aprendizaje los ratones expresaban la memoria de miedo, no obstante 30 días después no se mostraba retención de la memoria de miedo. Si a estos ratones infantiles se les inyectaba temozolamida (TMZ, un fármaco utilizado para tratar tumores) para evitar la proliferación en el GD, se daba un rescate de la memoria 30 días después del condicionamiento (Akers *et al.*, 2014).

El incremento de la NHA posterior a cualquier aprendizaje dependiente de hipocampo parece debilitar la traza asociada a este aprendizaje, por lo que se observa el fenómeno de olvido (Akers *et al.*, 2014, Weisz y Argibay, 2012). Sin embargo, esta degradación de la memoria podría permitir la codificación de un nuevo aprendizaje similar al aprendizaje original, pero sin interferir con este (Epp *et al.*, 2016, Guskjolen *et al.*, 2017). Epp y colaboradores (2016) utilizaron el laberinto acuático de Morris para probar esta hipótesis.

Para ello los animales fueron sometidos a un entrenamiento en el laberinto y posterior a esto tuvieron acceso libre a una rueda de ejercicio. Un mes después de esto, observaron un aumento en la NHA y poca retención de memoria espacial, comprobando que si había habido olvido. Posterior a esto los ratones fueron sometidos a un entrenamiento reverso, que consiste en mover de lugar la plataforma. En el entrenamiento reverso los ratones deben volver a crear una nueva memoria espacial que les permita llegar eficientemente a la nueva localización. Este tipo de tarea requiere que los ratones expresen flexibilidad cognitiva espacial que les permitirá adaptarse a los cambios del laberinto. De manera sorprendente, los ratones que previamente habían olvidado la ubicación original de la plataforma eran más eficaces para encontrar la nueva ubicación. Por el contrario, los ratones no corredores tuvieron dificultad para encontrar la nueva ubicación. Durante una prueba de flexibilidad cognitiva espacial un día después del entrenamiento reverso, los ratones corredores pasaron mayor tiempo en la nueva ubicación desde el inicio de la prueba, mientras que los ratones no corredores nadaban de la ubicación original a la nueva de manera incesante, persistiendo mayormente en la ubicación original. Asimismo, en otra investigación no sólo replicaron estos resultados, sino que observaron que ratones envejecidos con alta tasa de NHA mejoraban notablemente en su desempeño en la misma tarea de flexibilidad cognitiva espacial (Guskjolen *et al.*, 2017). Estos resultados sugieren que a mayor cantidad de NHA resulta en menor interferencia entre la traza original y la traza nueva; es decir, la incorporación de nuevas neuronas al circuito pre-existente degrada parcialmente la traza original permitiendo que una nueva traza sea codificada y sea el sustrato para una nueva memoria (Weisz y Argibay, 2012). De esta manera, los ratones corredores presentaban una mejor flexibilidad cognitiva espacial para adaptar su conducta de manera rápida a los cambios del medio.

El olvido de memorias hipocampales debido a una alta tasa de NHA ha sido tema de debate, ya que no se sabe con claridad si es causada por la degradación del circuito previo o por la inaccesibilidad a este. Un estudio inicial utilizó el mismo protocolo de entrenamiento en el laberinto acuático de Morris citado previamente. En dicho estudio Guskjolen y colaboradores 2018, observaron que si a los ratones se les presentaba un recordatorio antes de realizarse la prueba de retención de memoria (un mes después del entrenamiento), estos lograban recordar la ubicación de la plataforma. No obstante, esta recuperación de la memoria fue transitoria ya que, si se volvía a realizar una prueba de memoria un día después del recordatorio, los animales fallaban en encontrar la ubicación. Estos resultados sugieren que el olvido se debe mayormente a que no se puede acceder a la traza original más que esta memoria no haya sido guardada

Por otro lado, en otra investigación se utilizó un método más refinado para abordar este debate (Guskjolen *et al.*, 2018). Para esto, se utilizó un sistema de transgénico de tipo Cre-recombinasa inducible por Tamoxifen (TAM) que permitía la expresión de canalrodopsina en neuronas que expresaron el gen de expresión temprana *Arc* durante la evocación de una memoria. La canal-rodopsina que se expresa en las neuronas pertenecientes a la traza de memoria puede ser activada mediante una estimulación láser, es decir, pueden activarse con técnica optogenética. Utilizando el mismo protocolo anteriormente descrito (Akers *et al.*, 2014), se utilizaron ratones infantiles de 17 días posnatales (con alta tasa de neurogénesis) que fueron inyectados con TAM antes del condicionamiento para etiquetar la traza neuronal que subyacía la memoria de miedo. A los 15 días después del entrenamiento, lo ratones fueron sometidos a una prueba de retención y como era de esperarse ya presentaban olvido. Sin embargo, la activación por estimulación optogenética a los 15 días post-

condicionamiento, permitía la expresión de la memoria de miedo. Asimismo, la estimulación optogenética permitía la recuperación de la memoria de miedo a los 30 o 90 días después del condicionamiento. No obstante, a pesar de haber recuperado la memoria de miedo, esta recuperación únicamente fue parcial, dado que la inmovilización presentada en la prueba 30 o 90 días después del condicionamiento fue de aproximadamente 30% mientras que el nivel de condicionamiento original fue de 60%.

En conjunto, los experimentos de Guskjolen *et al* (2018) y Epp *et al* (2016), sugieren que el fenómeno de olvido se debe tanto a una falla en el almacenamiento de la memoria, ya que al estimular por optogenética el circuito previamente etiquetado sólo se recuperaba parcialmente; como a la inaccesibilidad a este, ya que la activación optogenética del circuito permitió expresar la memoria aún en tiempos muy remotos. Estos dos procesos biológicos que subyacen el olvido explica porque se facilitan aprendizajes nuevos, no obstante, es necesario entender la dinámica de la traza completa que subyace la memoria episódica-espacial.

2.2.2 La neurogénesis hipocampal y el reclutamiento de estructuras corticales como base de la flexibilidad cognitiva.

La teoría de la consolidación de engramas estipulaba que las trazas de memorias espaciales son codificadas primeramente en el hipocampo y posteriormente migraban a la CPFm en donde eran consolidadas (Frankland y Bontempi, 2005). No obstante, estudios recientes apuntan que para el aprendizaje de engramas espaciales es necesaria tanto la participación del hipocampo como de la CPFm, asimismo, la evocación a largo plazo de estos engramas depende tanto de la CPFm como del hipocampo (Kitamura *et al.*, 2017). Aunado a esto, la NHA modifica la consolidación de engramas espaciales degradando y desconectando

la traza original permitiendo un constante re-arreglo de las trazas hipocampales (Akers *et al.*, 2014, Epp *et al.*, 2016, Guskjolen *et al.*, 2017, West-Eberhard, 2003). Por lo tanto, la NHA al modificar los engramas ya establecidos debería afectar la activación de circuitos prefrontales, que también subyacen la memoria espacial.

Recientemente, una investigación aprovechó los hallazgos recientes sobre flexibilidad cognitiva espacial facilitada por a NHA para probar una nueva forma de tratar la recuperación espontánea del miedo (Martinez-Canabal *et al.*, 2019). La recuperación espontánea del miedo es un fenómeno que sucede cuando se vuelve a expresar la conducta de miedo tras un aprendizaje de extinción exitosa a pesar de haberla extinguido (Rescorla, 2004). El proceso de extinción o terapia de exposición en humanos, es el proceso por el cual a los individuos se les presenta el estímulo aversivo pero sin ninguna consecuencia peligrosa, de esta manera los pacientes dejan de presentar conductas de miedo progresivamente (Craske y Mystkowski, 2006). Sin embargo, a pesar de las terapias, el miedo siempre regresa y es un problema serio al presentarse de manera persistente en pacientes con fobias o estrés postraumático (Rescorla, 2004).

En la investigación de Martínez-Canabal *et al* (2019) se utilizó un protocolo de condicionamiento contextual al miedo seguido de un entrenamiento de extinción, para evaluar la recuperación espontánea del miedo. Posterior al condicionamiento y la extinción, los animales fueron sometidos a un protocolo de enriquecimiento ambiental y ejercicio aeróbico. Un mes después del enriquecimiento ambiental, los animales incrementaron su neurogénesis y mostraron menor recuperación espontánea respecto a los animales control. Por otro lado, la irradiación focal del hipocampo posterior al condicionamiento y la extinción generó una dramática disminución de la neurogénesis y se incrementó la expresión de la

memoria de miedo. En dicho estudio, también se cuantificó la actividad neuronal mediante la expresión de c-Fos en regiones hipocampales y corticales. La capa CA3 de los animales enriquecidos presentaba mayor activación de c-Fos+ mientras que en los animales irradiados disminuyó. También se encontraron diferencias en la activación de c-Fos en la corteza prefrontal e infralímbica, áreas críticas en la expresión de conductas de miedo (Sotres-Bayon y Quirk, 2010). En este experimento quedó establecido que el incremento de la conducta de miedo, por menor NHA, se asoció a una menor activación de CA3 y de la corteza infralímbica. Por el contrario, una alta tasa de NHA evitó la expresión del miedo y esto promovió la activación de CA3 y la inhibición de la corteza prefrontal (Martínez-Canabal *et al.*, 2019). Estos resultados muestran que la alteración de los niveles de NHA tienen un efecto en el patrón de activación del circuito hipocampal y cortical, una característica importante que permitió la inhibición o la expresión de la conducta de miedo.

A pesar de la importante participación de la NHA en procesos de flexibilidad cognitiva espacial (Garthe *et al.*, 2016, Garthe *et al.*, 2009), no parece haber un estudio que aborde la dinámica cortico-hipocampal que gobierna esta flexibilidad. El estudio de Martínez-Canabal *et al* (2019) nos da una aproximación de lo que puede estar ocurriendo en situaciones que requieren un cambio de paradigma, es decir, dejar de asociar un contexto a una situación peligrosa. Por otro lado, varios estudios en pacientes con estrés postraumático, fobias o alteraciones afectivas, presentan un patrón morfo-funcional diferente del hipocampo y la CPFm (Videbech y Ravnkilde, 2004, Villarreal *et al.*, 2002). Lo anterior es relevante porque se ha planteado que aquellas personas que presentan afecciones psiquiátricas carecen de la capacidad de formar nuevos patrones de conducta, es decir, no poseen flexibilidad cognitiva (Ben-Zion *et al.*, 2018a, Moustafa, 2013). De esta manera, resulta sumamente

importante entender los mecanismos neuronales que subyacen la flexibilidad cognitiva facilitada por la neurogénesis hipocampal adulta.

3 Planteamiento

El hipocampo es una estructura cerebral encargada del procesamiento, almacenamiento y evocación de las memorias espaciales. Asimismo, es una de las regiones cerebrales que posee la capacidad de generar nuevas neuronas durante toda la vida de la mayoría de los mamíferos. Esta característica ha impulsado una búsqueda sobre su posible significado biológico en procesos de memoria y aprendizaje. Con relación a esto, uno de los procesos de memoria que se ve afectado por la NHA es la consolidación de engramas espaciales. Durante la consolidación de engramas espaciales es el hipocampo que en primera instancia se encarga de codificar los engramas espaciales, posteriormente esta traza de memoria migra a módulos corticales donde consolida. No obstante, este proceso puede modificarse con la integración de nuevas neuronas dentro del circuito hipocampal. De esta manera, se ha observado que la NHA promueve el re-arreglo de circuitos desplazando las conexiones previamente establecidas, y creando un nuevo sustrato neuronal para la codificación de memorias espaciales nuevas. Como resultado, el hipocampo tiene la capacidad de reemplazar engramas espaciales antiguos con poca relevancia y reemplazarlos por engramas nuevos más importantes. Esta plasticidad del circuito hipocampal podría permitir la expresión de la flexibilidad cognitiva espacial necesaria para cambiar rápidamente entre trazas de memoria según las exigencias ambientales. Además de esto, se ha observado que la NHA induce la activación de la CPFm para llevar a cabo tareas con cambios de paradigma. Con estas ideas en mente, nosotros nos preguntamos si la NHA mejora la flexibilidad cognitiva espacial en el laberinto acuático de Morris, a través de la activación del hipocampo y la CPFm.

4 Hipótesis

La neurogénesis hipocampal adulta facilita el reclutamiento diferencial de estructuras cortico-hipocampales modificando la consolidación de engramas y promoviendo la flexibilidad cognitiva.

5 Objetivos

5.1 Objetivo general

Determinar si el aumento de la neurogénesis hipocampal promueve flexibilidad cognitiva espacial, a través del reclutamiento diferencial de estructuras cortico-hipocampales.

5.2 Objetivos particulares

- Objetivo particular 1 Determinar si el aumento de la neurogénesis hipocampal promueve la flexibilidad cognitiva espacial en el laberinto acuático de Morris.
- Objetivo particular 2 Establecer una correlación entre la conducta de flexibilidad y el aumento de neurogénesis hipocampal usando DCX.
- Objetivo particular 3 Determinar que estructuras cortico-hipocampales se están activando durante la prueba de flexibilidad cognitiva.

6 Materiales y método

6.1 Animales y aparatos

6.1.1 Animales

Declaración de ética. Todos los experimentos realizados en este proyecto fueron aprobados por el comité de ética de la Facultad de Ciencias con el oficio CEARC/Bioética/02032021. Por lo que los protocolos se apegaron de manera estricta a los lineamientos de bioética de la UNAM que se corresponden con estándares internacionales.

Crianza. Se utilizó la primera generación de ratones de la cruce (cruza C/B) entre la cepa C57BL/6 y BALB/c, ambas cepas fueron proporcionado por el bioterio de la Facultad de Ciencias. La crianza y el mantenimiento fueron responsabilidad del experimentador. Se utilizaron ratonas BALB/c de dos meses de edad, las cuales se cruzaron con machos C57Bl/6. Se escogieron como madres las ratonas BALB/c debido a que presentaron mejores patrones de crianza que las ratonas de la cepa C57Bl/6. Se optó por crear la cepa C/B debido a que se ha reportado que esta cruce se adapta mejor al manejo humano y a la experimentación conductual (Carola *et al.*, 2004). Para llevar a cabo la cruce, se colocaban dos hembras por un macho en una caja convencional de acrílico de 19×29×12 cm con rejilla metálica como tapa, en donde se les proporcionó comida específica para madres gestantes (Comida en pellets para roedor 5008, Labdiet). Los machos permanecieron al menos diez días con las hembras para que las hembras tuvieron dos ciclos estrales y asegurar la fecundación; posterior a ello los machos eran removidos. Las hembras de pie de cría sólo podían realizar tres apareamientos con cruce exitosa; no obstante, los machos fueron utilizados como pie de cría de 6 meses a 1 año. Las hembras gestantes fueron separadas una semana antes del parto y se colocaron en cajas estándar de acrílico, junto con una madriguera y material de nidificación. Las madres y sus crías recién nacidas no fueron molestadas por al menos 5 días después del parto, esto para evitar estrés; pasado este tiempo el

experimentador estuvo en contacto directo con las crías para acostumbrarlas a la manipulación humana.

Destete y experimentación. Pasados 21 días de crianza los animales fueron destetados y sexados para ser pasados a sus cajas-hogar, asimismo se les cambió el tipo de comida (Comida en pellets para roedor 5001, Labdiet). Se utilizaron tanto hembras como machos de dos meses de edad con un peso de entre 22-24 g para hembras y 30-34 g para machos. Los ratones fueron colocados en grupos de 3-4 animales en cajas de acrílico de estándar en un cuarto con ciclo de luz-oscuridad 12/12 horas en un ciclo normal (luz: 7am- 7pm y oscuridad 7pm-7am). La temperatura y la humedad fueron controladas para que permanecieran bajo nuestros estándares de calidad (temperatura = 22 ± 2 °C y humedad = 40-60%). Tanto los animales de pie de cría y los animales de experimentación tuvieron comida y agua *ad libitum*.

6.1.2 Aparatos conductuales

Para esta investigación, se hizo uso de un laberinto acuático de Morris de fibra de vidrio, con fondo y paredes blancas con las siguientes medidas 120d × 40h cm. Asimismo, se elaboró una plataforma de acrílico transparente (en el Laboratorio de Materiales de la Facultad de Ciencias de la UNAM) pintada de color blanco de 10 cm de diámetro, colocada 0.5 cm por debajo de la superficie del agua. El agua del laberinto se pintó con pintura blanca acrílica no tóxica. El agua se coloreaba hasta que la plataforma de acrílico fuera imperceptible a la vista humana. El agua fue calentada a 25 ± 1 °C con ayuda de dos resistencias de 1200 W con termostato. Igualmente, para mantener la circulación del agua se sumergió una bomba de aire (Lawn industries, modelo WP-1200). Las condiciones de luz y temperatura fueron controladas, siendo que el cuarto de experimentación se mantuvo a 22 ± 2 °C y una intensidad lumínica de 24 lx (luxes) en el entrenamiento y pruebas posteriores, y 170 lx durante el pre-entrenamiento.

En el cuarto en donde se encontraba el laberinto se colocaron cuatro pistas espaciales hechas de tela blanca (90 × 90 cm) y en el centro un símbolo de color negro, para que los animales se guiaran dentro del laberinto. Las pistas fueron colocadas en las paredes de la habitación en cada uno de los puntos cardinales a una distancia de 60 cm arriba del borde del laberinto. De igual manera, para el análisis de la conducta, el laberinto fue dividido virtualmente en cuatro cuadrantes y cuatro zonas. Las zonas fueron estandarizadas a 20 cm de diámetro alrededor de la ubicación de la plataforma o el *annulus* y situadas en el centro de cada cuadrante (Figura 7A y B), esta división se realizó con ayuda del software de conducta AnyMaze™, en donde se recreó un mapa del laberinto acuático.

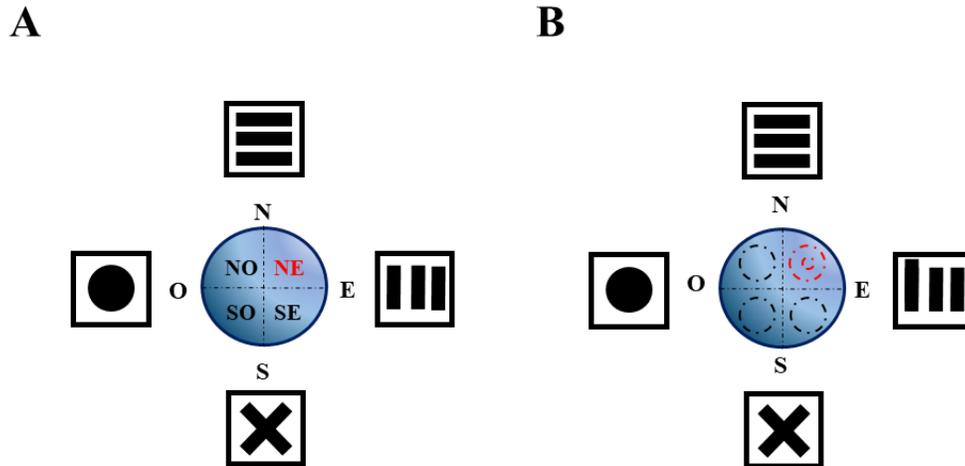


Figura 6 Esquematización del laberinto acuático de Morris.

A) Se ilustra los cuadrantes en los que se dividió el laberinto, así como las posiciones de las pistas espaciales. Se muestra remarcado en color rojo el cuadrante en donde se colocó la plataforma durante el entrenamiento. B) Se esquematiza las zonas en las que fue dividido el laberinto, marcando con rojo la zona en donde se colocó la plataforma durante el entrenamiento.

6.2 Entrenamiento en el Laberinto acuático de Morris

6.2.1 Manipulación y pre-entrenamiento

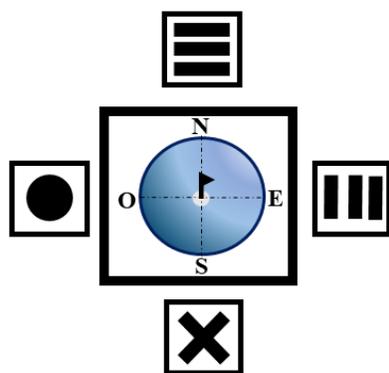
Los animales utilizados para llevar a cabo esta investigación desde su nacimiento hasta su deceso fueron manipulados por el experimentador, por lo que estaban habituados a tratar con humanos. No obstante, una semana antes de comenzar el entrenamiento en el laberinto acuático, los animales fueron manipulados en el cuarto de conducta donde se encontraba el laberinto de Morris. Cada animal fue manipulado durante al menos 5 minutos diariamente durante dos semanas previas al entrenamiento. Esta parte del experimento tuvo como objetivo habituar a los animales a la constante manipulación y movimiento dentro de la mano del experimentador, bajando así el estrés generado durante el aprendizaje de la tarea.

El siguiente paso del experimento fue pre-entrenar a los ratones en el laberinto acuático. Durante el pre-entrenamiento las pistas espaciales se ocultaron utilizando una cortina negra colocada alrededor del laberinto. De esta manera los animales solo estaban siendo habituados al laberinto, al nado y al proceso de búsqueda de la plataforma seca. Por otro lado, la plataforma era visible gracias a una bandera negra de polietileno (15 cm), a diferencia de los entrenamientos espaciales donde la plataforma no es visible. El primer día de pre-entrenamiento la plataforma fue colocada en el centro del laberinto y los ratones tuvieron 60 s para encontrarla (Figura 8A y B). Si el ratón no encontraba la plataforma en ese tiempo, era guiado por el experimentador hasta la plataforma. Se realizaron 4 ensayos de 60 s y se consideraba que el ratón había aprendido la contingencia (llegar a la plataforma dentro de los 60 s) si realizaba 3 ensayos seguidos correctos. De no ser así, el animal era colocado en el laberinto dos veces más hasta conseguir la conducta esperada.

El segundo día de pre-entrenamiento se realizaron 4 ensayos de 60 s, en cada ensayo la plataforma con la bandera se movía aleatoriamente dentro de los 4 cuadrantes. De esta manera, los

ratones fueron motivados a buscar la plataforma. De igual manera, se consideraba que los ratones aprendían esta contingencia si realizaban 3 ensayos seguidas correctas. El laberinto acuático de Morris es una tarea espacial ampliamente usada, pero que se ha observado modifica los niveles de estrés en ratones (Harrison *et al.*, 2009). Asimismo, en los experimentos de estandarización de esta conducta en nuestro estudio (no se muestran) observamos que el primer día de entrenamiento pasaban la mayor parte de tiempo mostrando comportamiento tigmotáxico, una conducta asociada a estrés (Huang *et al.*, 2012). Además de esto, esta tarea requiere no sólo de aprender estrategias de navegación, sino que los ratones aprendan que la plataforma es un lugar seguro y que deben esperar ahí hasta que el experimentador los remueva; la fuerza y coordinación para subir a la plataforma; aprender a nadar mientras buscan la plataforma, entre otros. Por esta razón, varios otros estudios han incluido un pre-entrenamiento en dónde los ratones se familiarizan con los componentes no espaciales de la tarea, y con ello se reduce considerablemente el estrés y ansiedad que se observa el primer día de entrenamiento (Morris, 1989, Beiko *et al.*, 1997, Warburton *et al.*, 1999, Da Cunha *et al.*, 2007).

A



B

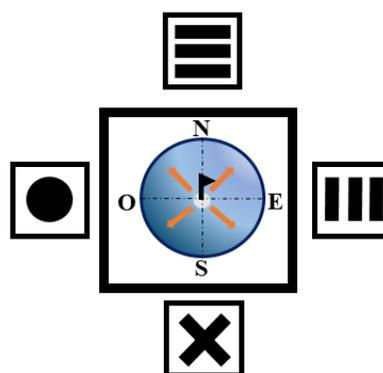


Figura 7 Esquematación del laberinto acuático de Morris durante el pre-entrenamiento

A) Esquematación del laberinto durante el primer día de pre-entrenamiento, se ilustra un cuadro negro alrededor del laberinto que representa la cortina negra que evita que los ratones vean las pistas. Asimismo, el laberinto es dividido en cuadrantes y zonas, siendo que a centro del laberinto se encuentra la plataforma señalizada con una bandera negra. B) Esquematación del laberinto el día 2 del pre-entrenamiento, la división de los cuadrantes y la cortina negra siguen a disposición del primer día, en esta ocasión se ilustra que la plataforma junto con la bandera negra cambia de lugar entre cada sesión de entrenamiento (flechas naranjas).

6.2.2 Entrenamiento en el laberinto acuático de Morris

Para evaluar cómo la neurogénesis hipocampal adulta participa en una tarea de flexibilidad cognitiva, los animales fueron sometidos a un protocolo conductual que evalúa memorias espaciales dependiente del hipocampo. El laberinto acuático de Morris, utilizado comúnmente para evaluar el aprendizaje y evocación de la memoria (Vorhees y Williams, 2006) es utilizado en este trabajo para evaluar flexibilidad cognitiva. Hemos seguido protocolos utilizados de manera robusta con anterioridad, incorporando un entrenamiento reverso para evaluar flexibilidad cognitiva espacial (Boulougouris *et al.*, 2007)

Entrenamiento.

Durante el primer día de entrenamiento las pistas espaciales fueron visibles y se mantuvieron en la misma posición hasta concluir el experimento. Asimismo, la plataforma ya no se encontraba señalizada y permaneció en el cuadrante noreste (NE) durante todo el entrenamiento. Los animales fueron entrenados para encontrar la plataforma en 6 ensayos repartidos en 2 sesiones, durante 4 días consecutivos. En cada ensayo el ratón era colocado en el laberinto desde alguno de los 4 puntos cardinales de manera aleatoria. Es importante señalar que el punto de partida de cada entrenamiento cambiaba al pasar de los días. Cada ensayo tuvo una duración de 60 s, si al concluir este tiempo el ratón no llegaba a la plataforma, este era guiado por el entrenador. Al llegar a la plataforma, el

entrenador esperaba 15 s antes de pasar por el ratón y llevarlo al siguiente punto de partida; esto con el fin de que el ratón reconociera su situación espacial. Durante los 4 días de entrenamiento se cuantificó el tiempo que les tomaba a los ratones llegar a la plataforma, así como la velocidad y distancia recorridas con ayuda del Software de conducta AnyMaze©.

Concluido el entrenamiento, el día 5 los animales fueron sometidos a una prueba (prueba 1) de memoria, en dónde se evaluó si los animales aprendieron la ubicación correcta de la plataforma. Para esto, la plataforma de acrílico fue removida y las pistas contextuales permanecieron intactas. De esta manera solo aquellos ratones que fueron capaces de generar un mapa espacial del laberinto para encontrar la plataforma encontrarían la ubicación correcta, aunque la plataforma no estuviera presente. Para asegurarnos que los ratones habían generado un mapa espacial del laberinto, se cuantificó el tiempo que pasaron en el cuadrante o la zona correcta; de la misma forma se cuantificaron los cruces por el *annulus*. Al terminar la prueba, se analizó el porcentaje de tiempo que los animales pasaron en el cuadrante y la zona correcta, siendo que estos debían ser mayores al 25% y 11% respectivamente, para considerar que los animales habían generado una memoria espacial del laberinto. Si alguno de los ratones no cumplía con este criterio, era excluido del experimento. Los porcentajes de tiempo para exclusión se establecieron tomando en cuenta el tiempo mínimo que de manera aleatoria los ratones podrían pasar por el cuadrante y zona correctos. Esto significa que de manera aleatoria los ratones pueden pasar una cuarta parte del tiempo en el cuadrante correcto (25%) o casi una octava parte de tiempo en la zona correctas (11%).

Una vez aplicados los criterios de exclusión, se procedió a separar de manera aleatoria a los animales en dos grupos: no enriquecido (no-EE) y enriquecido (EE). Cualesquiera que fuese el grupo en el que se encontraran los ratones, estos permanecieron 28 días en su casa/hogar recibiendo el tratamiento correspondiente. Pasados los 28 días los ratones fueron sometidos a una prueba de retención de memoria (prueba 2) para observar la evocación de la memoria espacial. Durante esta

prueba se cuantificó el porcentaje de tiempo que los animales pasaron en el cuadrante o zona correcta, así como los cruces en el *annulus*. Cabe mencionar que durante la prueba 2, las pistas espaciales estaban colocadas en las mismas posiciones que 28 días antes.

Entrenamiento reverso

Al día siguiente de la prueba 2, los animales fueron sometidos a un protocolo para evaluar flexibilidad cognitiva. Este consistió en entrenar a los ratones en el mismo laberinto, pero cambiando la ubicación de la plataforma al cuadrante opuesto, por lo que la nueva ubicación sería el cuadrante sureste (SE). Es importante señalar que las pistas espaciales no fueron cambiadas de posición, esto con el fin de evaluar si los animales eran capaces de generar un nuevo mapa espacial para encontrar la nueva ubicación de la plataforma (flexibilidad cognitiva). El entrenamiento reverso consistió en 6 ensayos repartidos equitativamente en dos días. Cada ensayo tenía una duración de 60 s y si los animales no encontraban la plataforma eran guiados hasta ella. De igual manera, los ratones permanecieron 15 s sobre la plataforma para que aprendieran su nueva ubicación. Al término del entrenamiento reverso los ratones eran sometidos a una prueba de flexibilidad cognitiva espacial (prueba 3), para evaluar la capacidad de ambos grupos para encontrar la nueva ubicación. Es decir, esta prueba evalúa la flexibilidad cognitiva, la cual permite la incorporación de nuevas memorias dentro del circuito preexistente. Posteriormente, los animales fueron sacrificados 90 min después de la prueba 3 y sus cerebros se colectaron para evaluar marcadores de actividad neuronal, proliferación neuronal y número de neuronas nuevas.

Todos los entrenamientos y pruebas conductuales fueron realizadas entre las 10 de la mañana y 13 de la tarde, en un horario constante.

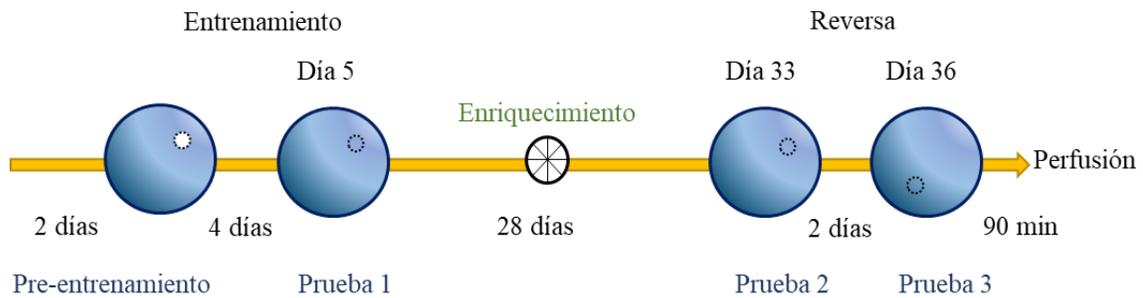


Figura 8 Esquematación del protocolo experimental en el laberinto acuático de Morris

En este protocolo de entrenamiento se llevaron a cabo 2 días de pre-entrenamiento antes de comenzar el entrenamiento en sentido estricto. Se realizaron 4 días de entrenamiento, seguidos de 1 día de prueba de aprendizaje (prueba 1). Posterior a esto se llevó a cabo el incremento de NHA por enriquecimiento ambiental y ejercicio aeróbico. Al cumplir los 28 días de enriquecimiento los animales pasaron por una prueba para evaluar retención de memoria (prueba 2). Al día siguiente los animales pasaron por un entrenamiento reverso y finalizó el experimento con una prueba de flexibilidad cognitiva espacial (prueba 3).

6.3 Incremento de la neurogénesis

Para poder contestar nuestra pregunta de investigación, llevamos a cabo un protocolo de enriquecimiento ambiental y ejercicio aeróbico, ambos han demostrado aumentar la neurogénesis hipocampal (van Praag *et al.*, 1999b, van Praag *et al.*, 2005). Los animales fueron colocados en cajas de vidrio transparente construidas por el Taller de Materiales de la Facultad de Ciencias. Las dimensiones de las cajas fueron de 30×32×20 cm, con una tapa de acrílico con agujeros para permitir la circulación de aire. Asimismo, los animales eran colocados en grupos de 2 a 3 individuos por caja. En este protocolo los animales tuvieron acceso a una rueda de ejercicio, una casa-refugio, túneles para jugar y material para roer (Figura 10). El protocolo de enriquecimiento ambiental tuvo una duración de 28 días, establecido así por ser el periodo que se necesita para que una neurona nueva para madurar y conectarse exitosamente al circuito preexistente; generando el fenómeno de olvido, crucial para esta investigación (Akers *et al.*, 2014).

A**B**

Figura 9 Enriquecimiento ambiental

A) Vista lateral de la caja de enriquecimiento ambiental, en donde se observa la rueda de ejercicio aeróbico al fondo, un túnel y una madriguera de color rojo. Asimismo, el alimento y agua se localizan a una altura que el animal pueda alcanzarla. B) Vista superior de la caja de enriquecimiento, se observa la disposición del alimento, la rueda, la madriguera y el túnel.

6.4 Protocolo para realizar inmunotinciones

6.4.1 Perfusión y preparación de cerebros

Perfusión. Posterior a la prueba de flexibilidad cognitiva, 90 min después de ella, los animales fueron sacrificados por perfusión. Se utilizó una dosis letal de pentobarbital sódico en una dosis de 210 mg/kg (Pisabental ®, en solución salina 0.9%), la cual fue inyectada de manera intraperitoneal con una jeringa de insulina. Una vez que los ratones estaban anestesiados y no presentaban signos de sensibilidad muscular no autónoma, fueron colocados en una rejilla metálica en posición dorsal. Con ayuda de unas tijeras quirúrgicas se realizó una incisión en el abdomen para abrir la caja torácica y exponer el corazón del ratón. Inmediatamente, con ayuda de unas pinzas de sujeción se tomó con cautela la punta del corazón y se insertó una aguja sin bisel en el ventrículo izquierdo para entrar a la circulación mayor. Se perfundió con ayuda de una jeringa, 50 ml de solución salina al (NaCl 0.9%, Sigma), a una velocidad de 15 ml por minuto. Una vez que se limpiaron los tejidos, se cambió la solución salina por 50 ml de paraformaldehído (4%, Sigma) para fijar el tejido. Al término de la

perfusión se decapitó al ratón y el cráneo fue extraído. El cerebro junto con el cráneo fue guardado durante dos días en una solución de paraformaldehído al 4%.

Preparación de las secciones. Los cerebros fueron extraídos del cráneo y se colocaron en una solución de sacarosa (30%, Baker, en PBS 1X). Una vez que la sacarosa había embebido el cerebro, esto se observó cuando el cerebro llegó a la base del frasco, se consideraba que estaba listo para ser cortados. Se utilizó un criostato (CM 1520; Leica) a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, para hacer cortes de $50\text{ }\mu\text{m}$ y estos se colectaron en cajas de cultivo de 12 pozos con anticongelante (40% glicerol, J. T. Baker; 10% etilén glicol, J. T. Baker; en PBS 1X) y permanecieron guardadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. Cada sección de cerebro fue colectada cuidadosamente de la siguiente manera: la sección 1 se colocó en el pozo 1, la sección 2 en el pozo 2 y así sucesivamente hasta llenar los 6 pozos de cada fila; posteriormente la sección 7 se colocaba en el pozo 1, la sección en el pozo 2 y así sucesivamente hasta colectar todas las estructuras de interés (Figura 11). Esta manera de recolección permitió que en cada pozo de cultivo hubiera secciones de cerebro separadas por $300\text{ }\mu\text{m}$ y tener un muestreo aleatorio al momento de realizar las inmunotinciones (ver Figura 11).

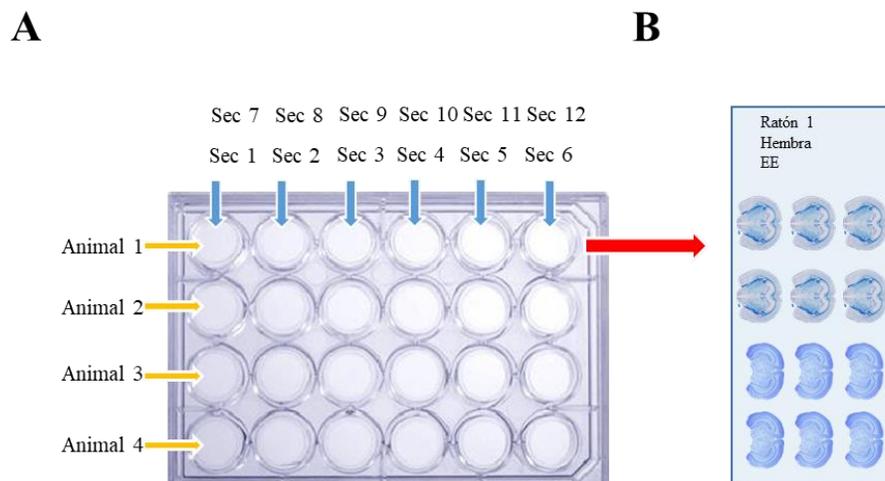


Figura 10 Esquemática del procedimiento de preparación de cerebros

A) Se ilustra el proceso de recolección de secciones dentro de una caja de cultivo de 24 pozos, las flechas amarillas representan que en cada fila se recolecta el tejido de un solo animal y en azul el proceso de recolección. B) Se ilustra con una flecha en rojo que de un solo pozo se realiza el montaje de tejido, siendo que estos tejidos representan una muestra aleatoria.

6.4.2 Día 1 de inmunohistoquímica

Para comenzar el proceso de inmunohistoquímica, se tomó un solo pozo de las cajas de cultivo y las rebanadas de cerebros fueron colocadas en laminillas de vidrio previamente gelatinizadas (gretina y cromalmina); de esta manera las rebanadas serían capaces de pasar por el proceso siguiente. Las laminillas fueron colocadas en una solución de paraformaldehído al 4 % and PBS 1X durante 30 min, con el fin de terminar de fijar el tejido. Posteriormente, las laminillas pasaron por un gradiente de alcoholes, 75%, 100% (1), 100% (2) y Xileno 100% y pasaron 5 min en cada uno de ellos. Al terminar, las laminillas pasaron por el gradiente de regreso, quedándose 2 min en cada uno de los alcoholes. Este proceso tuvo como finalidad precipitar las proteínas del tejido y de la gelatina para que ambas se volvieran insolubles y permanecieran adheridas una a la otra, así como al vidrio. Finalmente, las laminillas fueron enjuagadas con PBS 1X durante 10 min.

Recuperación del antígeno. Pasados los 10 min de enjuague, las laminillas fueron colocadas en una caja coplin de plástico en donde estuvieron inmersas en un buffer de citratos (0.01 M, 0.05 % Tween-20, pH 6 ajustado con NaOH, Sigma) para DCX y Ki67, mientras que para c-Fos se utilizó un buffer de EDTA (0.01 M) pH 8.0 con 0.05% Tween-20. Adicionalmente, esta caja Coplin se colocó dentro de una olla con agua, la cual fue sometida a presión. De esta manera las proteínas del tejido fueron desnaturalizadas y se expuso el lugar de unión del anticuerpo primario. Al terminar, se realizaron 2 lavados de 5 minutos con PBS 1X.

Bloqueos. Inmediatamente después de los lavados con PBS, se vertió una solución de peróxido de hidrógeno al 3 % solución final (Peróxido de hidrógeno al 30% en PBS Sigma), a las laminillas. Esto fue con la finalidad de bloquear las peroxidases endógenas del tejido, que pudieran interferir con la solución de revelado. A continuación, las laminillas fueron lavadas con TBS-T 1X (0.1M, 0.05% Tween, pH 7.4, Sigma), se realizaron 2 lavados de 5 min cada uno. Al terminar los lavados, los tejidos fueron desprendidos cuidadosamente de las laminillas con ayuda de una navaja, y colocados dentro de pozos para cultivo con 1 ml de solución de bloqueo de proteínas (1% Albúmina de Suero Bovina (BSA), santa Cruz Biotechnology; 1% Suero Normal de Cabra NGS, Jackson, en TBS-T). Este paso es necesario para eliminar cualquier proteína cargada que pudiera ser confundida por el anticuerpo. Los tejidos se mantuvieron sumergidos en la solución de bloqueo durante 1 h en agitación, 120 rpm (revoluciones por minuto).

Colocación del anticuerpo primario. Posterior a la hora de bloqueo de proteínas, se procedió a colocar el anticuerpo primario. Se utilizaron tres diferentes anticuerpos; Doblecortina Conejo Monoclonal #4604S 100 UL (Cell Signaling Technology) a una concentración de 1:8000 y c-Fos Conejo Policlonal #CU115933 (Abcam) a una concentración de 1:4000. Se colocó 1 ml de solución 1:2 con anticuerpo primario y solución de bloqueo en los pozos de cultivo y los tejidos permanecieron sumergidos en ella durante 48 h a 120 rpm.

6.4.3 Día 2 de inmunohistoquímica

Colocación del anticuerpo secundario. Pasadas las 48 h de incubación del anticuerpo primario, los tejidos fueron lavados con TBS-T 1X, para esto se realizaron 6 lavados de 10 min cada uno con TBS-T 1X. Pasada la hora de lavados se colocó el anticuerpo secundario en una solución 1:2 de solución de bloqueo, a una concentración de 1:1000 para DCX, mientras que para c-Fos se empleó una concentración de 1:4000. Los tejidos permanecieron embebidos en el anticuerpo secundario por una hora a 120 rpm.

Colocación del complejo avidina-biotina. Al terminar la hora de incubación del anticuerpo secundario, los tejidos fueron lavados nuevamente. Para esto, se realizaron 6 lavados de 10 min cada uno con TBST-T 1X. Durante el tercer lavado se preparó el complejo avidina-biotina (ABC) en una solución de TBS-T 1X, utilizando el kit ABC-peroxidasa Elite VECTASAN®. Una vez que se terminaron los lavados, los tejidos fueron colocados en el complejo ABC durante una hora a 120 rpm.

Revelado del tejido. Posterior a la incubación del complejo ABC, se realizaron 6 lavados de 10 min cada uno con TBST-T. Durante el quinto lavado se preparó la solución de revelado. Primero se vertió Ni (25 mg/mL, Sigma) en TBS-T 1X, posteriormente el DAB (diaminobenzidina, 20mg/mL, Sigma), se agitó la solución con ayuda de un vórtex, después fue aforada usando TBS-T 1X, a la cantidad que fuera necesaria según el número de pozos a revelar, y por último se añadió el peróxido 1:4000 (30%, J. T. Baker). Tras el último lavado, se colocaron las rebanas en una caja de cultivo limpia y se colocó 1 mL de solución de trabajo DAB-Ni (1:60 Ni, 1:60 DAB, 1:4000 H₂O₂ en TBS-T) en cada pozo. La reacción fue monitoreada a partir de los 5 minutos colocando una rebanada en una laminilla gelatinizada observada en el microscopio. Después de confirmar una buena señal la reacción se detenía usando TBS-T 1X. Para finalizar, se realizaron 3 lavados de 10 minutos con TBS-T 1X, y permanecieron en TBS-T hasta ser montadas en laminillas gelatinizadas.

Contratinción del tejido. Después de colocar los tejidos en laminillas, estas se dejaban secar el tiempo que fuera necesario para que se adhirieran al vidrio. Las laminillas ya secas, eran colocadas en una caja coplin con Verde de Metilo (1%, p.H. 4.2 ajustado con Buffer de Acetatos 0.1M, J. T. Baker) durante 20 minutos a 120 rpm. Pasado el tiempo, se enjuagaba con agua destilada. Después eran colocadas en alcohol al 95%, seguido de alcohol 1 100%, luego a alcohol 2 100% y por último a Xileno 100%. Para finalizar se vertió Permount (Fisher) en las laminillas y se les colocó un cubreobjetos. Se dejaron secando las laminillas durante varios días hasta poder ser usadas para realizar los conteos pertinentes.

6.5 Procesamiento de datos

Conteos celulares. Una vez obtenidas las laminillas con las secciones ya teñidas, se procedió a realizar los conteos celulares para c-Fos o DCX. En el caso de las células +DCX los conteos se realizaron de manera manual utilizando un microscopio óptico (Nikon Eclipse) con el objetivo de 40x (N.A. 0.75) y una aplicación para contar (Tally Counter, 2.1.3 v). Los conteos se realizaron por sección, siendo que por cada animal se contaban alrededor de 12 secciones de hipocampo, al final se obtuvo un promedio de secciones por animal.

Por otro lado, los conteos para las células +c-Fos se realizó de manera semi-manual: se tomaron fotografías por sección de las estructuras de interés (GD, CA3, CA1, COF y CCA) con un microscopio óptico (Nikon Eclipse) con el objetivo de 10x (N.A 0.30) con ayuda de programa AmScope (x64, 3.7.7303) y una cámara digital (AmScope, MU 1000). Cada fotografía fue procesada con el programa ImageJ (1.48 v) en el cual de manera manual fue seleccionada el área de cada estructura, utilizando siempre un Atlas de Histología como referencia (Paxinos y Franklin, 2019), y posteriormente se marcaron manualmente los núcleos +c-Fos. Utilizando el programa ImageJ fue posible obtener la densidad utilizando los datos de área en μm^2 y número de núcleo +c-Fos previamente marcados manualmente.

Análisis de datos celulares. Los datos obtenidos acerca de la densidad de +cFos y el número de células +DCX fueron graficadas utilizando el programa GraphPad Prism® (7 v) y todas las pruebas (t de Student y Correlación de Pearson) estadísticas para observar si existían diferencias significativas fueron realizadas en el software Statistica64© (10 v).

Análisis de datos conductuales. La conducta de los animales fue grabada automáticamente por el programa AnyMaze (versión 5.0) para poder obtener el tiempo que pasaron los animales en cada cuadrante y zona del laberinto, así como los cruces por *el annulus*. De esta manera se pudo cuantificar

el porcentaje de tiempo que los animales pasaron por el cuadrante y zona correcta; asimismo se graficaron los datos conductuales con el programa GraphPad Prism® (7 v) y los análisis estadísticos se realizaron en el programa Statistica64© (10 v). Las pruebas estadísticas que se llevaron a cabo fueron ANOVAS de dos vías de medidas repetidas, U de Mann-Whitney y post-hoc Sidak, siendo que tomamos que existían diferencias significativas una p con un valor menor a 0.05.

8 Resultados

8.1 El enriquecimiento ambiental promueve la flexibilidad cognitiva espacial y esto correlaciona con el aumento de neurogénesis hipocampal.

Para evaluar cuales son las estructuras que se reclutan durante la tarea de flexibilidad cognitiva espacial se llevó a cabo el entrenamiento en el laberinto acuático de Morris. Se puede observar que las latencias para encontrar la plataforma sumergida decrecieron significativamente con el paso de los días tanto en el grupo EE como en el no-EE (Figura 11A) (ANOVA de medidas repetidas, interacción $F_{(3, 57)} = 1.09$, $p = 0.35$; tiempo $F_{(3, 57)} = 20.65$, $p < 0.0001$; grupo, $F_{(1, 57)} = 0.004$, $p = 0.95$), mostrando una curva de aprendizaje esperada para esta conducta. La velocidad de nado durante las sesiones de aprendizaje no presentó cambios a través del tiempo (Figura 11C) (ANOVA de medidas repetidas, interacción, $F_{(3, 57)} = 1.08$, $p = 0.36$; tiempo, $F_{(3, 57)} = 21.82$, $p < 0.0001$; grupo, $F_{(1, 57)} = 0.34$, $p = 0.56$), este resultado muestra que no hubo conductas de ansiedad o motrices que afectaran el entrenamiento. Por otro lado, la distancia recorrida por los animales a través del entrenamiento disminuyó con el paso de los días sin que los grupos mostraran diferencias entre sí (Figura 11B) (ANOVA de medidas repetidas, interacción, $F_{(3, 57)} = 0.21$, $p = 0.89$; tiempo, $F_{(3, 57)} = 3.18$, $p < 0.03$; grupo, $F_{(3, 57)} = 0.005$, $p = 0.94$).

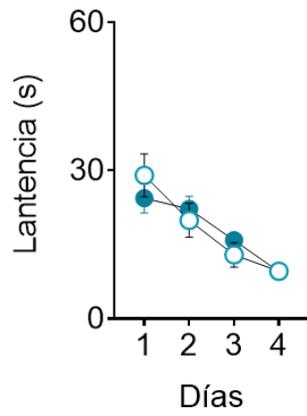
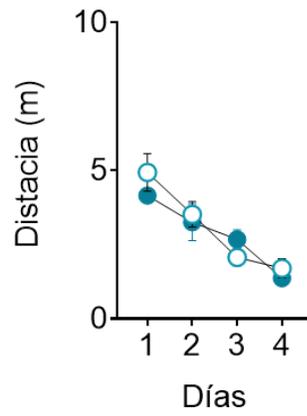
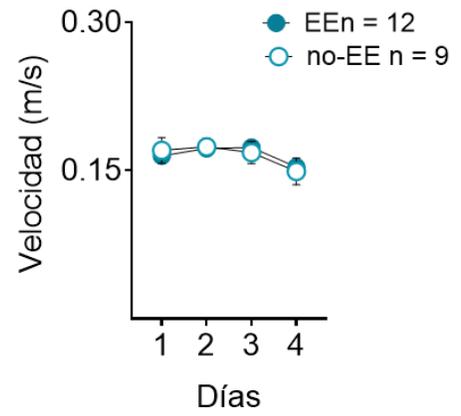
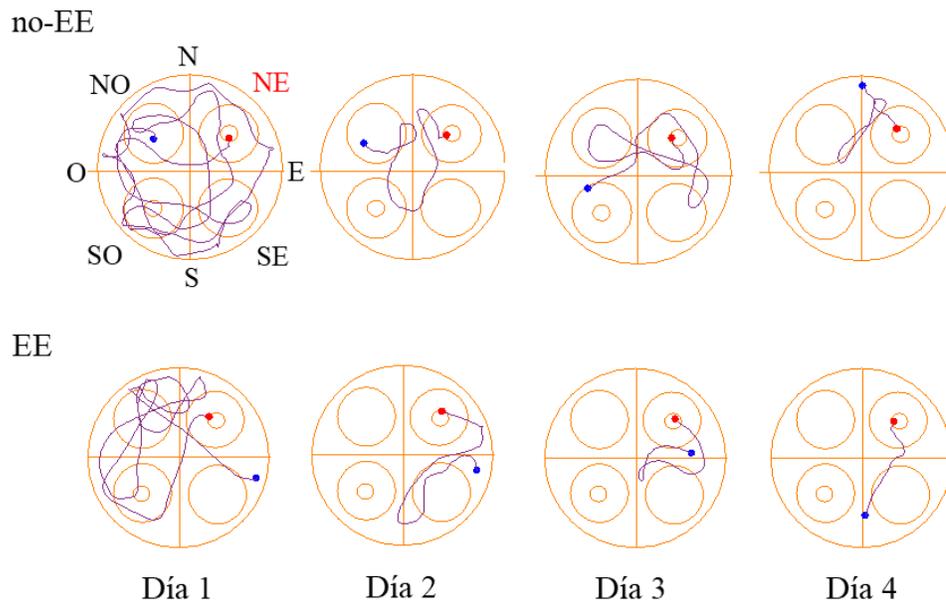
A**B****C****D**

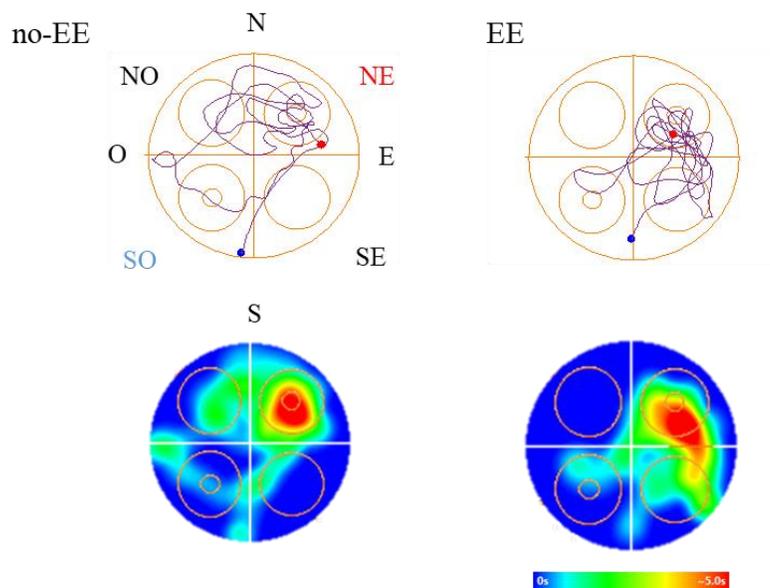
Figura 11 Entrenamiento en el laberinto acuático de Morris.

A) Se muestra la latencia en segundos que tardan los animales de ambos grupos en encontrar la plataforma, siendo que ambos grupos se comportaron igual. B) Se muestra la distancia (m) recorrida en cada uno de los días de entrenamiento, la cual no fue diferente entre grupos. C) Se observa la velocidad (m/s) de los animales durante cada día de entrenamiento. D) Se muestra el camino recorrido por un animal representativo de cada grupo durante una sesión por día de entrenamiento. El punto rojo dentro del esquema representa la llegada a la plataforma y el final de la sesión, por otro lado, el punto azul representa el lugar de inicio de la sesión. Al esquema del laberinto acuático se le ha agregado los puntos cardinales que se usaron para realizar el análisis de conducta, siendo que en el lugar NE es dónde se estableció el cuadrante y zona correctas. Asimismo, el esquema se encuentra dividido en cuadrantes y zonas, y se ha señalado el anillo donde se la plataforma (NE).

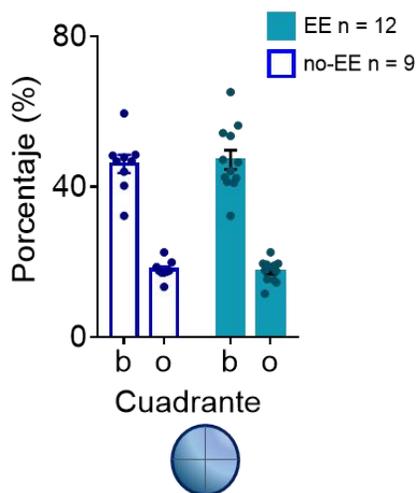
Al día siguiente de finalizado el entrenamiento, los animales fueron sometidos a una prueba de retención de memoria espacial retirando la plataforma de escape y rastreando las rutas seguidas por los animales en el laberinto. En esta primera prueba de retención se observó que ambos grupos pasaban mayor tiempo en el cuadrante blanco con respecto a los otros tres cuadrantes (Figura 12B) (ANOVA de medidas repetidas, Interacción $F_{(1, 19)} = 0.11$, $p = 0.75$; Cuadrante $F_{(1, 19)} = 144.2$, $p < 0.0001$; Grupo $F_{(1, 19)} = 0.12$, $p = 0.73$). Asimismo, los animales pasaron mayor porcentaje de tiempo en la zona circular de 20 cm de diámetro alrededor de donde se encontraba la plataforma (Figura 12C) (ANOVA de medidas repetidas: Interacción $F_{(1, 19)} = 0.002$, $p = 0.96$; Cuadrante $F_{(1, 19)} = 140.5$, $p < 0.0001$; Grupo $F_{(1, 19)} = 0.21$, $p = 0.65$). Este patrón fue consistente para el número de cruces para ambos grupos (Figura 12D) (Prueba de Mann Whitney, $U = 39$, $n_1 = 12$, $n_2 = 9$, $p = 0.29$). Por lo tanto, todos los animales aprendieron la ubicación de la plataforma utilizando la orientación espacial durante las sesiones de entrenamiento inicial. Asimismo, debido a que en todo el experimento se utilizaron hembras y machos, se decidió realizar una ANOVA factorial para buscar si el sexo tenía un efecto en

la conducta. El resultado de esta prueba permitió establecer que los resultados encontrados en la conducta no se ven afectados por el sexo de los ratones en ninguno de los grupos (ANOVA factorial de porcentaje en zona vs sexo: $F_{(1, 17)} = 0.04$, $p = 0.84$).

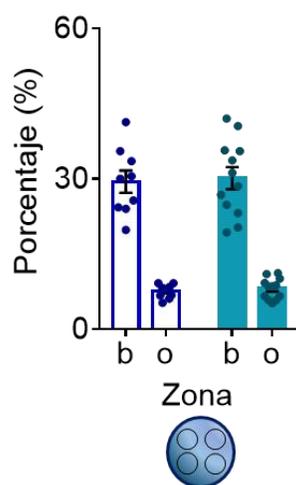
A



B



C



D

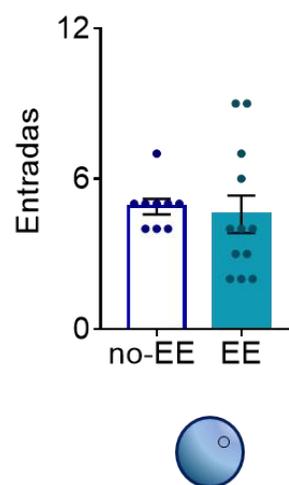


Figura 12 Prueba de retención de memoria un día después de finalizado el entrenamiento

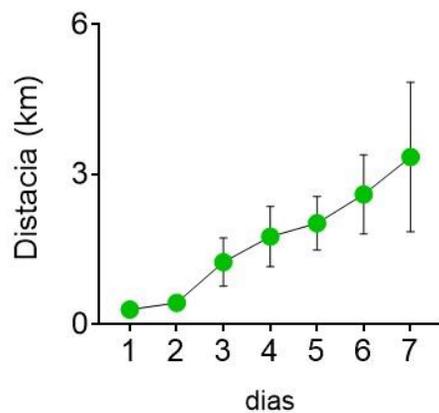
A) Se muestra en el panel superior el recorrido de un animal representativo de cada grupo, en donde se observa que pasaron mayor tiempo en la zona y cuadrante NE. El punto rojo dentro del esquema representa el final de la sesión y el punto azul representa el lugar de inicio de la sesión (S = sur). Asimismo, en el panel inferior se muestran los mapas de calor durante esta prueba, siendo que entre más rojo mayor tiempo significaba que el animal pasaba más tiempo en ese lugar. La barra de escala representa 5 s. B) Se muestra el porcentaje de tiempo que los animales pasaron en el cuadrante blanco (b) y en los demás cuadrantes (o), siendo que ambos grupos aprendieron la ubicación de la plataforma. C) Se observa el porcentaje de tiempo que ambos grupos pasaron en la zona blanco (b) y otras zonas (o). D) Se muestra el número de cruces en el lugar donde se hallaba la plataforma de ambos grupos. EE = enriquecido, no-EE = no enriquecido.

A continuación, un grupo de animales fue sometido a enriquecimiento ambiental y ejercicio aeróbico. Los animales fueron colocados en cajas de enriquecimiento (Figura 13). Por otro lado, los animales no enriquecidos (no-EE) fueron colocados en cajas de acrílico estándar de colonia. El tiempo de enriquecimiento fue establecido en 30 días, ya que en este tiempo las nuevas neuronas proliferan, maduran y establecen conexiones con CA3 (Hastings y Gould, 1999).

A



B



C

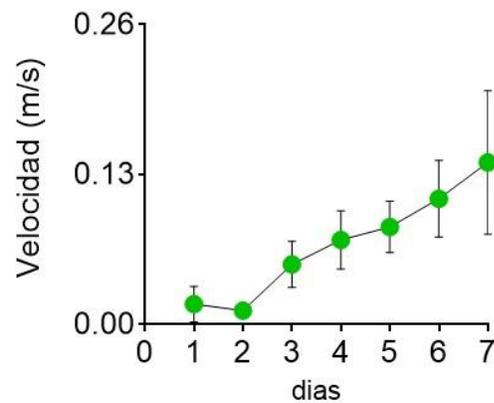


Figura 13 Distancia y velocidad recorridos durante el periodo de enriquecimiento ambiental
A) Se muestran dos fotografías en posición lateral y superior de cómo fueron colocados los elementos del enriquecimiento ambiental, así como la rueda de ejercicio. B) Se observa la distancia (km) recorrida en promedio de todas las cajas de enriquecimiento que se utilizaron en este experimento. En dónde sólo se muestra la distancia recorrida durante la primera semana de enriquecimiento, la cual se va incrementando con el paso de los días. C) Se observa la velocidad (m/s) en promedio de todas las cajas de enriquecimiento que se utilizaron en este experimento. En dónde sólo se muestra la velocidad durante la primera semana de enriquecimiento, la cual va incrementando con el tiempo.

Pasados los 30 días de enriquecimiento ambiental y ejercicio aeróbico, los animales fueron sometidos a una prueba para evaluar la persistencia de la memoria remota espacial. Durante esta prueba se mostró una disminución de retención en el grupo enriquecido que se interpreta como olvido parcial del mapa espacial previamente aprendido. El olvido de los animales expuestos a enriquecimiento se observó en el porcentaje de tiempo que pasaron en la zona o cuadrantes correctos. Una ANOVA de medidas repetidas demostró que los animales EE pasaron menor porcentaje de tiempo el cuadrante con la localización original de la plataforma en comparación con el tiempo en los otros tres cuadrantes (Figura 14B). (ANOVA de medidas repetidas: Interacción $F_{(1, 19)} = 20.66$, $p = 0.0002$; cuadrante $F_{(1, 19)} = 0.92$, $p = 0.35$; grupo $F_{(1, 19)} = 12.32$, $p = 0.002$; post-hoc Sidak, $p < 0.001$). Asimismo, los animales EE pasaron menor porcentaje de tiempo en la zona blanco, delimitada por la circunferencia de 20 cm de radio alrededor de la plataforma, en comparación con el tiempo pasado en las otras tres zonas equivalentes (Figura 14C) (ANOVA de medidas repetidas: Interacción $F_{(1, 19)} = 12.24$, $p = 0.002$; zona $F_{(1, 19)} = 2.45$, $p = 0.13$; grupo $F_{(1, 19)} = 11.46$, $p = 0.0031$, post-hoc Sidak, $p < 0.001$). Igualmente, este olvido se observó en el número de cruces dramáticamente menor en el grupo enriquecido con respecto al grupo sedentario (Figura 14D) (Prueba de Mann Whitney, $U = 22$, $n_1 = 12$, $n_2 = 9$, $p = 0.02$). El fenómeno de olvido es crucial para contestar nuestra pregunta, ya que como hemos establecido en los antecedentes; el olvido se debe a la integración de nuevas neuronas en el giro dentado, que proporcionan un sustrato libre para la codificación de nuevos engramas sin interferir con los engramas previamente establecidos.

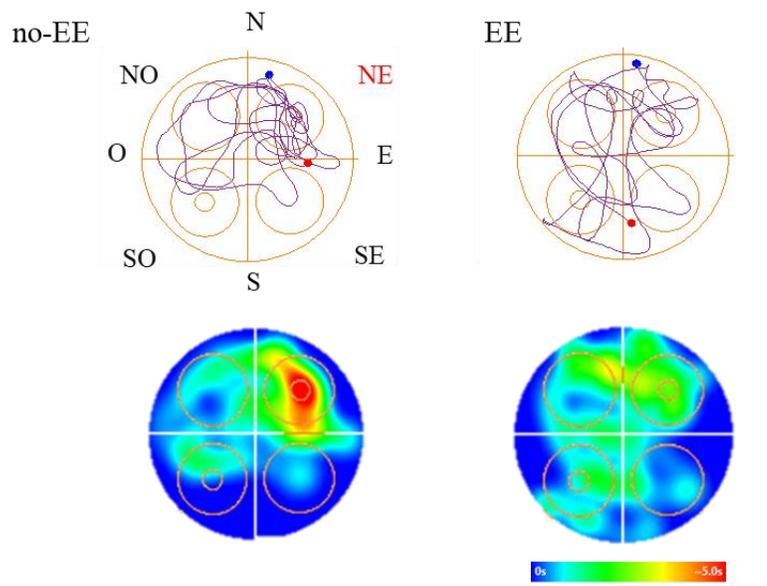
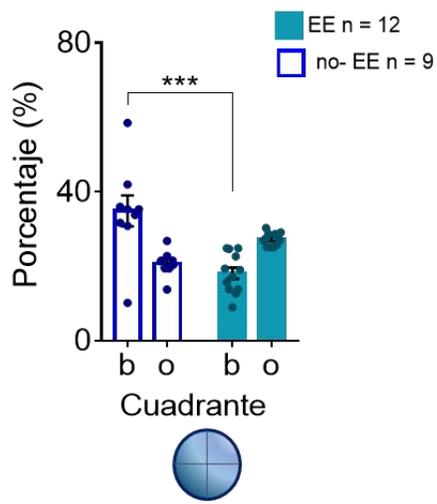
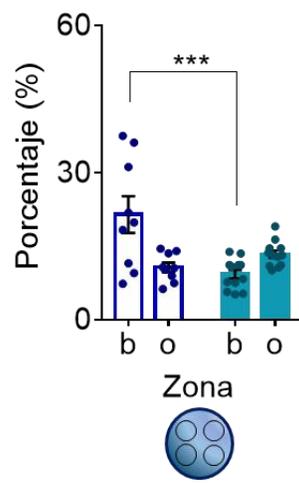
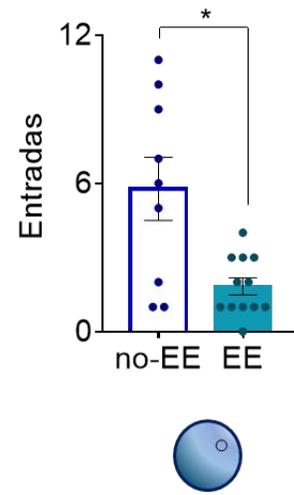
A**B****C****D**

Figura 14 Prueba de retención de memoria un mes después del enriquecimiento ambiental.

A) Se muestra en el panel superior el recorrido de un animal representativo de cada grupo, en donde se observa que los animales EE pasaron poco tiempo en la zona y cuadrante NE. El punto rojo dentro del esquema representa el final de la sesión y el punto azul representa el lugar de inicio de la sesión (S = sur). Asimismo, en el panel inferior se muestran los mapas de calor durante esta prueba, siendo que entre más rojo mayor significaba que el animal pasaba más tiempo en ese lugar. La barra de escala representa 5 s. B) Se muestra el porcentaje de tiempo que los animales pasaron en el cuadrante blanco (b) y en los demás cuadrantes (o), siendo que el grupo EE paso menor tiempo en el cuadrante b. C) Se observa el porcentaje de tiempo que ambos grupos pasaron en la zona blanco (b) y en los demás cuadrantes (o), siendo que los animales EE pasaron menor tiempo en la zona b. D) Se muestra el número de cruces en el lugar donde se hallaba la plataforma tanto de los animales no-EE y los animales EE, el cual fue diferente entre grupos. EE = enriquecido, no-EE = no enriquecido. Post-hoc Sidak **** $p < 0.001$, * $p < 0.05$

La ANOVA factorial entre el porcentaje de tiempo en la zona blanco y el sexo, mostró que este último no determina la conducta observada para la prueba un mes después del enriquecimiento ambiental ($F_{(1, 17)} = 0.64$, $p = 0.43$).

Al día siguiente los ratones fueron sometidos al protocolo de entrenamiento reverso, en el mismo laberinto. Durante el entrenamiento reverso, la plataforma fue colocada en el cuadrante opuesto al entrenamiento previo; sin embargo, las pistas espaciales permanecieron en el mismo lugar. Esto con el fin de que los animales crearan un nuevo mapa espacial para encontrar la nueva ubicación sobre la misma memoria. Se observó que ambos grupos aprendieron la nueva ubicación en el mismo tiempo (Figura 15A) (ANOVA de medidas repetidas: Interacción $F_{(1, 19)} = 0.13$, $p = 0.72$; tiempo $F_{(1, 19)} = 0.07$, $p = 0.79$; grupo $F_{(1, 19)} = 6.53$, $p = 0.02$). Asimismo, se analizó la distancia en la que no hubo diferencias entre grupos (Figura 15B) (ANOVA de medidas repetidas, Interacción $F_{(1, 19)} = 2.61$, $p = 0.12$; tiempo $F_{(1, 19)} = 2.66$, $p = 0.12$; grupo $F_{(1, 19)} = 2.45$, $p = 0.13$) y la velocidad durante el entrenamiento reverso, donde se muestra que las latencias no se vieron influenciadas por el ímpetu de

nado (Figura 15C) (ANOVA de medidas repetidas: Interacción $F_{(1, 19)} = 0.00002$, $p = 0.99$; tiempo $F_{(1, 19)} = 1.25$, $p = 0.28$; grupo $F_{(1, 19)} = 1.48$, $p = 0.24$).

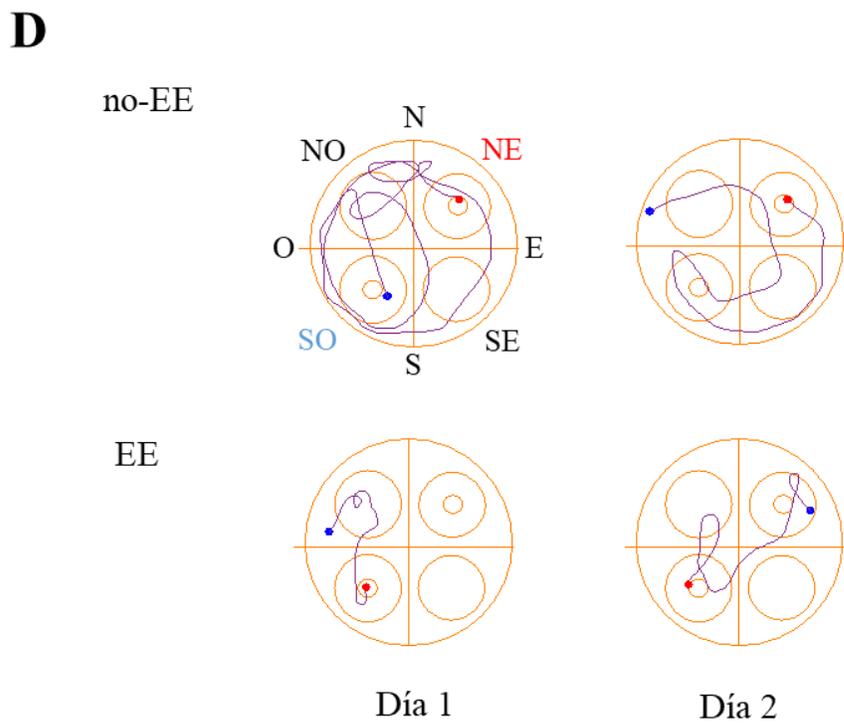
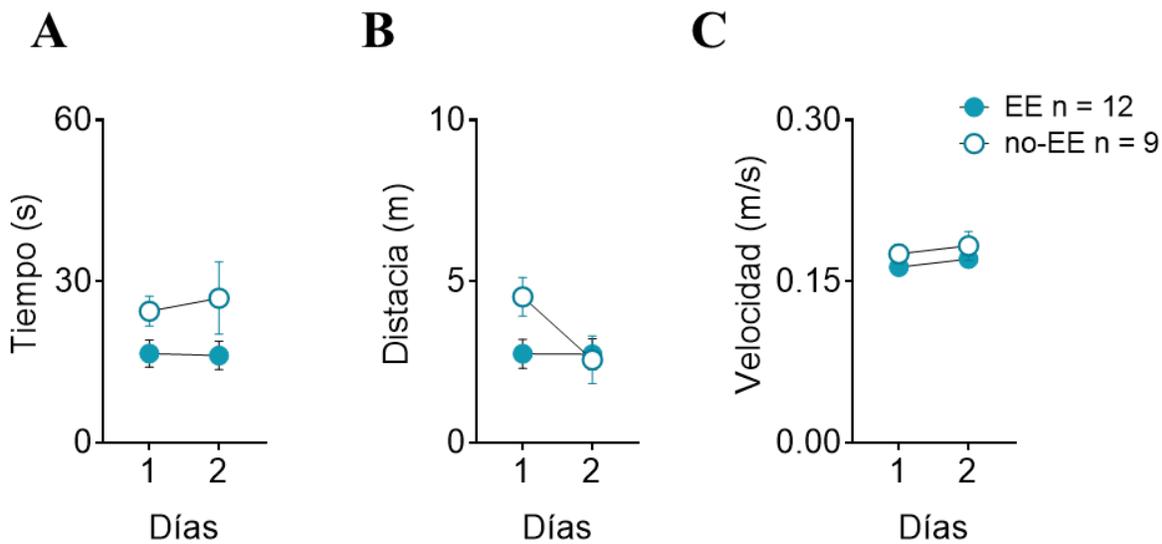


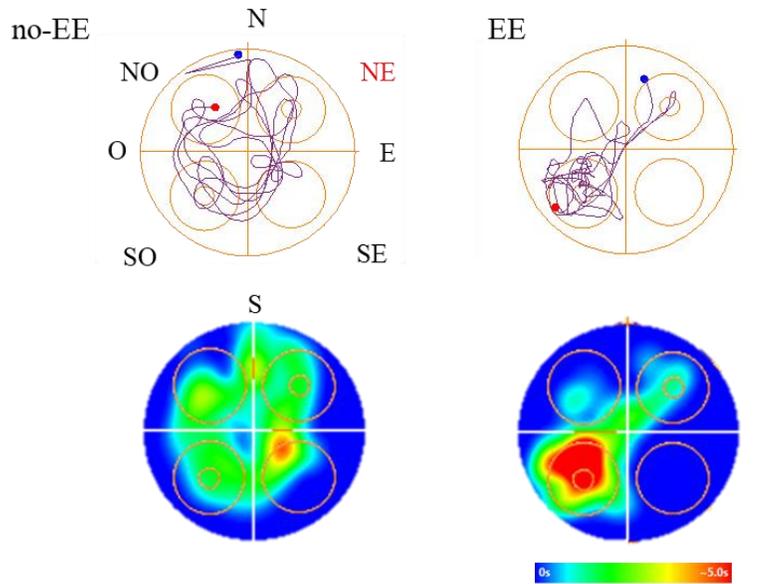
Figura 15 Entrenamiento reverso en el laberinto acuático de Morris

A) Se muestra la latencia en segundos que tardan los animales de ambos grupos en encontrar la plataforma. B) Se muestra la distancia (m) recorrida en cada uno de los días de entrenamiento. C) Se observa la velocidad (m/s) de los animales durante cada día de entrenamiento. D) Se muestra el camino recorrido por un animal representativo de cada grupo durante una sesión por día de entrenamiento. El punto rojo dentro del esquema representa la llegada a la plataforma y el final de la sesión, por otro lado, el punto azul representa el lugar de inicio de la sesión. Al esquema del laberinto acuático se le ha agregado los puntos cardinales que se usaron para realizar los análisis de conducta, siendo que en el lugar SO es dónde se estableció el cuadrante y zona correctas. Asimismo, el esquema se encuentra dividido en cuadrantes y zonas, y se ha señalado el anillo de la plataforma original en rojo (NE) y el anillo nuevo en azul (SO).

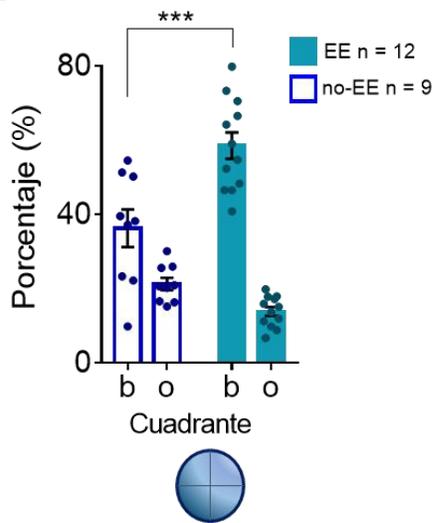
Una vez concluido el entrenamiento reverso, los animales fueron sometidos a una prueba de retención de memoria, para evaluar la flexibilidad cognitiva espacial o la retención del cambio de lugar de plataforma con las mismas pistas espaciales. En la prueba de flexibilidad se observó que el grupo con enriquecimiento ambiental mostró mayor retención de la nueva localización de la plataforma, en comparación con los animales sin enriquecimiento. Los animales enriquecidos pasaron más tiempo en el cuadrante blanco que los no enriquecidos (Figura 16B) (ANOVA de medidas repetidas: Interacción $F_{(1, 19)} = 13.89$, $p = 0.001$; cuadrante $F_{(1, 19)} = 55.86$, $p < 0.0001$; grupo $F_{(1, 19)} = 13.89$, $p = 0.001$; post-hoc Sidak, $p < 0.001$). Los animales enriquecidos también pasaron más tiempo en la zona blanco alrededor del cuadrante (Figura 16C) (ANOVA de medidas repetidas: Interacción $F_{(1, 19)} = 13.48$, $p = 0.001$; cuadrante $F_{(1, 19)} = 43.24$, $p < 0.0001$; grupo $F_{(1, 19)} = 11.69$, $p = 0.002$; post-hoc Sidak, $p < 0.001$). De igual manera, podemos observar que el número de cruces es mayor en el grupo EE que el grupo no-EE (Figura 16D) (Prueba de Mann Whitney, $U = 17.5$, $n_1 = 12$, $n_2 = 9$, $p = 0.006$). Asimismo, como en las pruebas anteriores, la ANOVA factorial entre el porcentaje de tiempo en zona y el sexo

demonstró que la conducta observada no depende del sexo del animal, esto es verdad para el grupo EE y no-EE ($F_{(1, 17)} = 2.46, p = 0.13$).

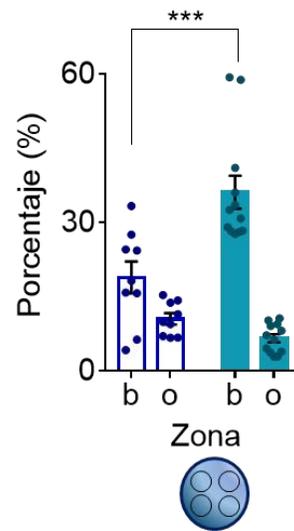
A



B



C



D

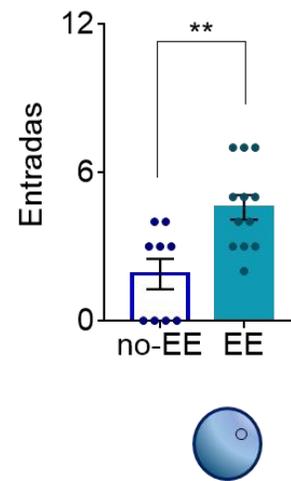


Figura 16 Prueba de flexibilidad cognitiva espacial

A) Se muestra en el panel superior el recorrido de un animal representativo de cada grupo, en donde se observa que los animales EE pasaron más tiempo en la nueva ubicación NO. El punto rojo dentro del esquema representa el final de la sesión y el punto azul representa el lugar de inicio de la sesión (N = norte). Asimismo, en el panel inferior se muestran los mapas de calor durante esta prueba, siendo que entre más rojo mayor tiempo significaba que el animal pasaba más tiempo en ese lugar. La barra de escala representa 5 s. B) Se muestra el porcentaje de tiempo que los animales pasaron en el cuadrante blanco (b) y en los demás cuadrantes (o), siendo que los animales EE pasaron mayor tiempo en el cuadrante b. C) Se observa el porcentaje de tiempo que ambos grupos pasaron en la zona blanco (b) y en los demás cuadrantes (o), siendo que el grupo EE paso mayor tiempo en la zona b. D) Se muestra el número de cruces en el lugar donde se hallaba la plataforma tanto de los animales no-EE y los animales EE, el cual fue diferente entre grupos. EE = enriquecido, no-EE = no enriquecido. Post-hoc Sidak ***

En este experimento se observó que el enriquecimiento ambiental promueve la flexibilidad cognitiva espacial posiblemente a través de la modificación de engramas. Por lo tanto, es necesario evaluar si los niveles de neurogénesis se corresponden con la facilitación de flexibilidad cognitiva espacial observada. Para ello se evaluó la proteína doblecortina (DCX), como marcador de presencia de neuronas inmaduras (Brown *et al.*, 2003). En el grupo enriquecido se cuantificaron mayores niveles de neuronas inmaduras DCX+ en comparación con los no enriquecidos, siendo que hubo un aumento del $\uparrow 73\%$ en DCX+ (Figura 17A y B) ($t_9 = 3.1$, $p = 0.01$). Asimismo, el número de neuronas inmaduras correlacionó negativamente con la expresión de la memoria espacial tras un mes de enriquecimiento, lo que implica que ante mayor neurogénesis más olvido de memoria espacial (Figura 17C) (Correlación de Pearson: EE $R = -0.51$, $p = 0.05$; no-EE $R = 0.94$, $p = 0.01$). Tras el entrenamiento reverso, se observó una correlación positiva para el grupo EE pero no el no-EE en las la prueba de flexibilidad cognitiva, esto significa que a mayor número de nuevas neuronas los animales pasan

mayor tiempo en la nueva localización de la plataforma de escape (Figura 17D) (Correlación de Pearson: EE $R = 0.57$, $p = 0.23$; no-EE $R = 0.57$, $p = 0.31$).

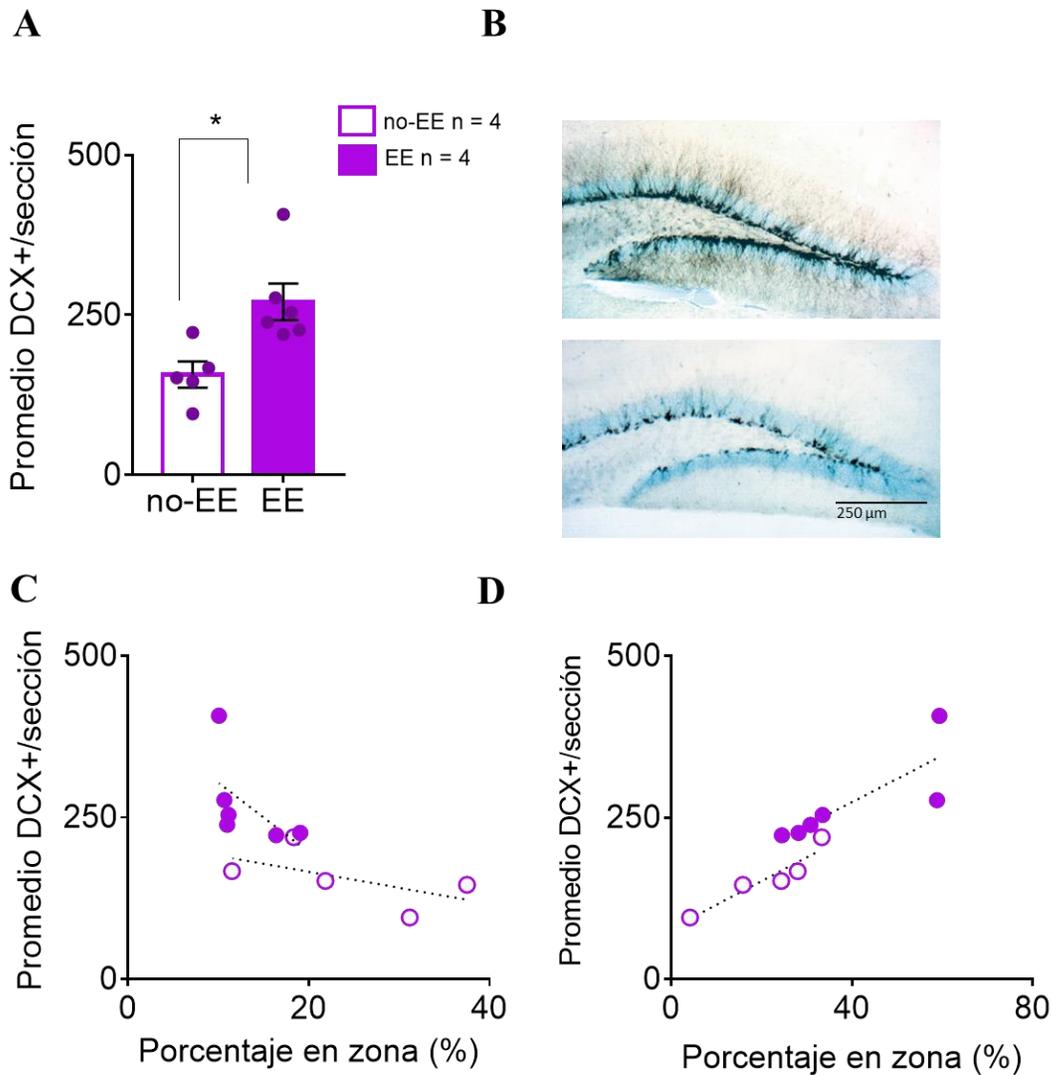


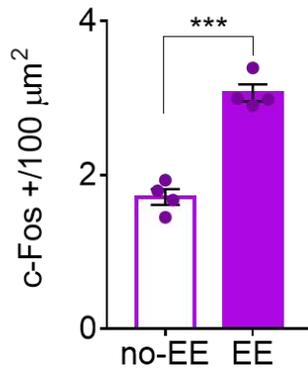
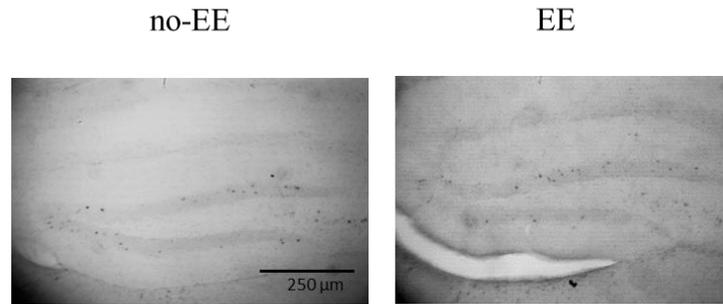
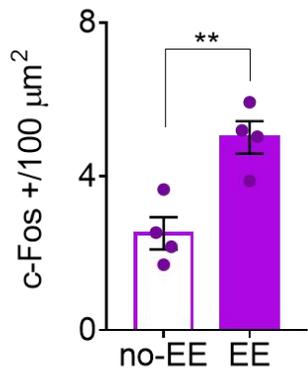
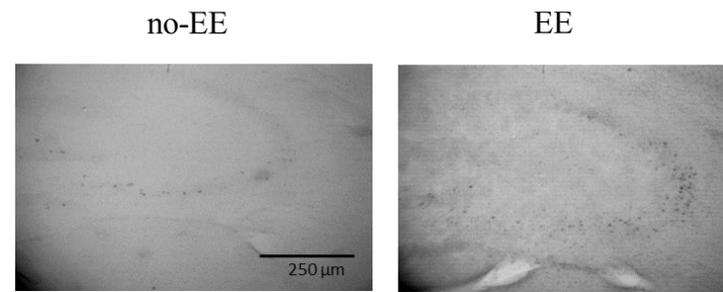
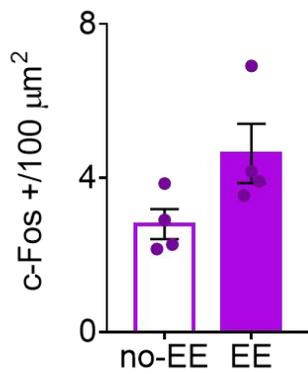
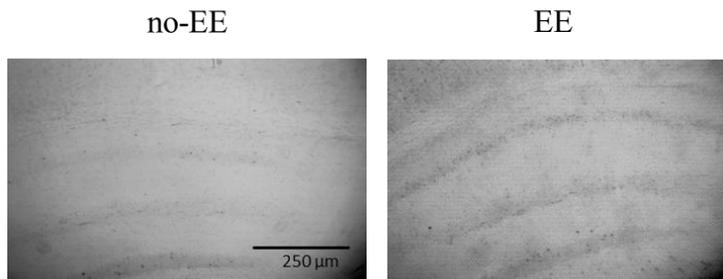
Figura 17 El aumento de nuevas neuronas correlaciona con la expresión de la conducta durante la prueba 3, pero no en la prueba 2

A) Se muestra el número de DCX+ por sección en los animales EE y no-EE, siendo que los animales EE presentar mayor número de nuevas neuronas. B) Se muestran imágenes representativas del GD de un animal EE y n animal no-EE, donde se puede observar las nuevas neuronas teñidas en negro con DCX y las neuronas granulares maduras en azul debido a la tinción con verde de metilo C) Se observa una tendencia negativa entre el número de nuevas neuronas y la expresión de la conducta durante la prueba 2. D) Se observa una correlación positiva entre el número de nuevas neuronas y la expresión de la conducta durante la prueba 3 en ambos grupos EE y no-EE. EE = enriquecido, no-EE = no enriquecido. * $p < 0.05$.

8.2 El enriquecimiento ambiental promueve la flexibilidad cognitiva espacial reclutando diferencialmente estructuras hipocampales y corticales

Se cuantificó la cantidad de células positivas al gen de expresión temprana c-Fos, para determinar neuronas activadas en la prueba de retención de la nueva localización de la plataforma. Esto con el fin de analizar en qué zonas del hipocampo y de corteza prefrontal hubo cambios de actividad neuronal en la tarea que implica flexibilidad cognitiva. Por lo tanto, con ayuda de un atlas de histología de cerebro de ratón se delimitaron las capas CA3, CA1 y el GD dentro del hipocampo y así realizar los conteos respectivos, tanto del hipocampo anterior como posterior. Por otro lado, con ayuda del mismo atlas de histología, se delimitó la corteza orbitofrontal lateral y medial, pero los resultados reportados muestran la cantidad de núcleos positivos a c-Fos+ en la totalidad de la COF. De la misma manera se delimitó la corteza cingulada anterior y posterior, siendo que se presentan estos conteos condensados en una sola gráfica.

De esta manera se pudo observar que en el hipocampo de los animales EE hubo mayor número de núcleos positivos a c-Fos+ en el GD (Figura 18A y B) y CA3 (Figura 19B y C) (GD $t_6 = 4.12$, $p = 0.005$; CA3 $t_6 = 9.01$, $p < 0.0001$). Por otro lado, la activación de CA1 entre animales EE y no-EE no presentó diferencias (Figura 18D y E) ($t_6 = 2.13$, $p = 0.07$). Además, se observó la actividad de la COF y la CCA, siendo que al evaluar la activación de la CCA se observó que no hubo diferencias entre los animales EE y no-EE (Figura 19A y B) ($t_6 = 1.92$, $p = 0.13$). Por otro lado, la COF de los animales EE presentó mayor número de núcleos positivos a c-Fos+ con respecto a los animales no-EE (Figura 19C y D) ($t_6 = 3.29$, $p = 0.017$).

A**B****C****D****E****F**

■ EE n = 4
 □ no-EE n = 4

Figura 18 Activación neuronal en el hipocampo después de la prueba de flexibilidad cognitiva espacial.

A) Se muestra la activación neuronal de c-Fos+ por área ($100 \mu^2$) para el GD, siendo que los animales EE mostraron mayor activación. B) Se muestran imágenes representativas del GD de un animal no-EE y EE, en donde se observa en negro los núcleos positivos a c-Fos, siendo mayor en el grupo EE. C) Se muestra la activación neuronal para CA3 de c-Fos+ por área ($100 \mu^2$), siendo que los animales EE mostraron mayor activación. D) Se muestran imágenes representativas de CA3 de un animal no-EE y EE, en donde se observa mayor actividad en el grupo EE. E) Se muestra la activación neuronal para CA1 de c-Fos+ por área ($100 \mu^2$), en este caso no hubo diferencias de activación neuronal entre los animales EE y no-EE. F) Se muestran imágenes representativas de CA1 de un animal no-EE y EE, en donde no se observan diferencias entre grupos. EE = enriquecido,

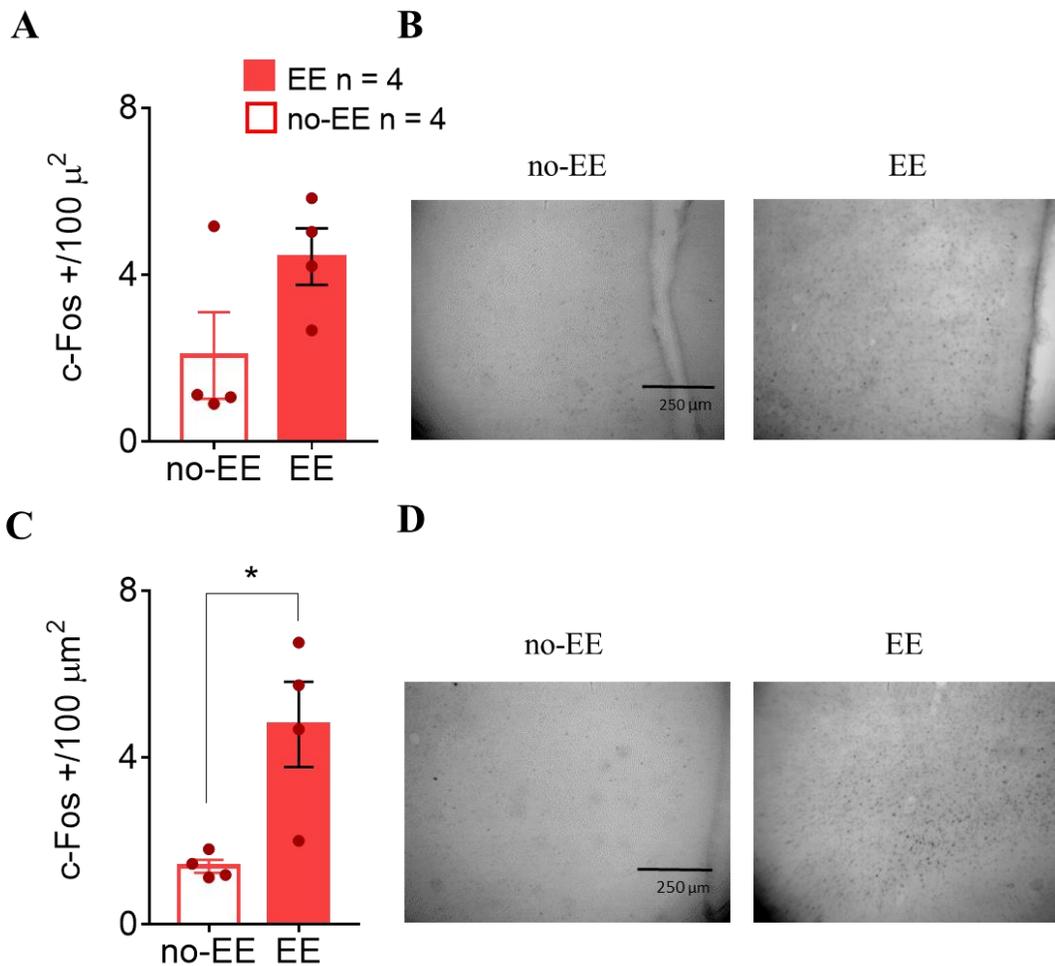


Figura 19 Activación de la corteza orbitofrontal y cingulada anterior después de la prueba de flexibilidad.

A). Se muestra la activación neuronal para la CAA de c-Fos+ por área ($100 \mu^2$), en donde no se encontraron diferencias entre grupos B) Se muestran imágenes representativas de la CCA de un animal no-EE y EE, en donde se observa en negro los núcleos positivos a c-Fos. C) Se muestra la activación neuronal para la COF de c-Fos+ por área ($100 \mu^2$), siendo que los animales EE mostraron mayor activación. D) Se muestran imágenes representativas de la COF de un animal no-EE y EE, en donde se observa en negro los núcleos positivos a c-Fos, siendo mayor la activación en el grupo EE. EE = enriquecido, no-EE = no enriquecido. * $p < 0.05$.

9 Discusión

El hipocampo es una región cerebral con la característica única de generar nuevas neuronas excitatorias durante toda la vida. Debido a que el hipocampo es una estructura imprescindible para la adquisición y regulación de las memorias episódicas-espaciales, desde un principio se pensó que la NHA posee un papel en esta regulación. De esta manera, se ha observado que un aumento en la NHA promueve olvido de memorias espaciales previas (Akers *et al.*, 2014) y favorece el aprendizaje de memorias nuevas, un tipo de flexibilidad cognitiva espacial (Epp *et al.*, 2016). No obstante, no se ha estudiado como la NHA cambia la dinámica neuronal de estructuras hipocampales y corticales necesarias para la flexibilidad cognitiva espacial. Por esta razón, en este proyecto se decidió investigar el rol de la NHA en la modificación de engramas cortico-hipocampales en la flexibilidad cognitiva espacial.

9.1 La neurogénesis hipocampal adulta facilita la flexibilidad cognitiva espacial a través de la activación del GD, CA3 y la COF

Utilizando el laberinto acuático de Morris en su versión espacial, entrenamos ratones a encontrar una plataforma de escape. Esto con el fin de generar una memoria espacial que pudiera ser probada más adelante en nuestro protocolo de flexibilidad cognitiva espacial. Posteriormente estos animales fueron sometidos a un protocolo de aumento de NHA por enriquecimiento ambiental. Este aumento de NHA permaneció durante 28 días siendo que, en este tiempo la memoria espacial inicialmente dependiente del hipocampo se deslinda de esta estructura y migra a zonas corticales, esta ventana temporal también coincide con el tiempo de maduración de las nuevas neuronas hipocampales. Sin embargo, al realizar una prueba de retención de memoria espacial un mes pasado el enriquecimiento ambiental los ratones EE no pudieron encontrar la ubicación de la plataforma, por el contrario de los ratones

no-EE evocaron exitosamente la memoria espacial. Lo que observamos en esta prueba es que el EE afectó la retención de la memoria espacial previamente aprendida. Lo que nosotros sugerimos es que el engrama espacial original debió poderse evocar exitosamente si es que la traza hipocampal permanecía intacta, como lo observamos en el grupo no-EE. No obstante, estas observaciones muestran que el olvido del engrama previamente aprendido se deba posiblemente a la degradación del engrama espacial en el hipocampo y de esta manera se modificó la consolidación de este, siendo que es probable que solo haya quedado la traza cortical de la memoria, la cual no es suficiente para evocarla exitosamente en la prueba de retención de memoria.

De esta forma, se sometió a los animales a un cambio de regla usando el mismo laberinto acuático y con esto probar la flexibilidad cognitiva entre ambos grupos. Ambos grupos de ratones fueron colocados en el mismo laberinto sin cambiar las pistas espaciales, pero colocando la plataforma en la zona opuesta a la zona original. Observamos que existía una tendencia de los ratones EE de aprender la nueva ubicación más rápido, no obstante, ambos grupos al final del entrenamiento mostraron latencias similares para encontrar la plataforma. A pesar de esto, al momento de someterlos a una prueba de retención del nuevo aprendizaje, los ratones EE pasaron mayor tiempo en la nueva ubicación, no así los ratones no-EE que buscaban sin ninguna preferencia en la ubicación original y la ubicación nueva. Si tomamos las observaciones hechas por Toni y colaboradores (2007) sobre el desplazamiento de conexiones previamente establecidas por la integración de nuevas neuronas; podemos sugerir que nuestros resultados muestran que del incremento de NHA degradó el engrama original y creó un sustrato nuevo para la codificación de una nueva memoria similar a la anterior, pero sin interferencia con ella. Por el contrario, una tasa normal

de NHA genera que la codificación de una memoria nueva interfiera con la memoria original que no ha sido degradada en el hipocampo.

Estas interpretaciones conductuales son respaldadas por las inmunotinciones contra DCX que permite observar la presencia de neuronas inmaduras. Es importante señalar que las neuronas DCX+ ya son responsivas a estímulos eléctricos y ya han formado contactos sinápticos con los axones de la vía perforante y con las neuronas piramidales e interneuronas de CA3 mediante las terminales musgosas. Asimismo, los animales EE mostraron un aumento considerable de DCX+ con respecto a los animales no-EE; además, estos resultados correlacionaron con la conducta durante la prueba de retención de memoria y flexibilidad de memoria. Se observó que a mayor número de células positivas a DCX+ la retención de la memoria decrece, pero la flexibilidad cognitiva aumenta. Demostrando que la degradación del engrama original permite la incorporación de un engrama nuevo sin que exista interferencia entre ambos engramas. Además, utilizando c-Fos observamos una alta actividad en CA3 y el GD en los animales EE que sugiere que las nuevas neuronas podrían estar siendo reclutadas para el nuevo aprendizaje, a su vez activan CA3 que es una capa que manda y recibe información de la CPFm, ya sea directa o indirectamente. Los resultados en CA1 no muestran este patrón de mayor actividad siendo que es una región que también manda y recibe proyecciones corticales a través del subículo y la corteza entorrinal; sin embargo, estos resultados muestran una tendencia hacia mostrar el mismo patrón de CA3 y el GD. Por otro lado, la actividad neuronal en la corteza prefrontal es más interesante siendo que la COF muestra mayor número de núcleos c-Fos+ y menor actividad en la CCA en los animales EE con respecto a los animales no-EE. La corteza orbitofrontal ha sido asociada en procesos ejecutivos como la toma de decisiones y la flexibilidad cognitiva, por lo que estos resultados

muestran un nuevo hallazgo sobre su función en la flexibilidad de memorias espaciales. Asimismo, es interesante observar que el incremento de la NHA promueva la activación de circuitos corticales, sugiriendo que es necesaria esta regulación por parte del hipocampo para expresar flexibilidad cognitiva.

9.2 El rol de la NHA y la CPFm en la constante modificación de engramas espaciales y en la consolidación de engramas espaciales

Los hallazgos encontrados en esta investigación son novedosos y sumamente importantes para la generación de conocimiento nuevo acerca de las implicaciones biológicas de la NHA en la memoria y aprendizaje de memorias espaciales. En este estudio se muestra una correlación positiva entre la NHA y la expresión de flexibilidad cognitiva espacial, así como correlación negativa con olvido en adultos. Previamente, los estudios de Akers et al (2014) mostraron correlaciones entre la retención de memoria y el aumento de NHA. En estos estudios se utilizaron ratones postnatales de 21 días los cuales presentan una alta tasa de NHA y poca retención de memorias espaciales previamente aprendidas. Además de estas observaciones, Akers y colaboradores (2014) bloquearon la generación de NHA en estos ratones con TMZ (temozolamida, un fármaco utilizado para tratar tumores), y observaron que la retención de memoria mejoraba significativamente. Es importante señalar que estos resultados fueron replicados en otros paradigmas dependientes de hipocampo como el laberinto acuático de Morris y el condicionamiento contextual al miedo. No obstante, el fenómeno de olvido no se observó en conductas poco relacionadas con el hipocampo, como fue el condicionamiento aversivo al sabor y el condicionamiento al tono. Más adelante, los estudios de Epp *et al.*, 2016, y Guskjolen *et a.*, 2017 demostraron que el aumento en la NHA dada por ejercicio aeróbico, promueve el olvido de memorias espaciales incrementando así

la flexibilidad cognitiva. En ambos estudios se replican los resultados previos de Akers y colaboradores de 2014, en donde una alta tasa de NHA impide la evocación de memorias remotas. Lo que estos estudios no mostraron fue la posible regulación de la NHA en el circuito cortico-hipocampal. Con los resultados presentados en este trabajo podemos sugerir que la expresión de la flexibilidad cognitiva se debe a la activación neuronal dentro del hipocampo así como fuera de este, influenciado por la incorporación de nuevas neuronas. A pesar de ser esto un hallazgo novedoso, resultados similares se encontraron en el trabajo de Martínez-Canabal *et al.*, 2019; donde se mostró que los cambios en los niveles de NHA modifican la activación de estructuras como la corteza prelímbica e infralímbica, así como de CA3. De manera opuesta, en este último estudio no se encontraron diferencias en la activación neuronal del GD, lo que sí sucede en la presente investigación; esto sugiere que por primera vez se arroja evidencia de que durante la flexibilidad cognitiva espacial podría existir una preferencia de las neuronas nuevas por ser reclutadas en los circuitos de memoria. Esta hipótesis se centraría en que durante la flexibilidad cognitiva se están realizando cambios de regla, lo que requeriría un sustrato neuronal que no haya sido utilizado en engrama previos. Otras opciones a ser consideradas serían la existencia de un circuito mediante el cual las nuevas neuronas favorecieran la activación de las neuronas granulares del giro dentado aunque no fuesen de origen reciente (Hashimoto *et al.*, 2017). Otra hipótesis alternativa sería que las altas tasas de neurogénesis generaran un circuito de retroalimentación positiva mediante el cual se incrementara la estimulación del giro dentado mediante las vías perforantes durante las pruebas de flexibilidad cognitiva.

Por otro lado, nuestros resultados muestran que el rol de hipocampo en la hipótesis de consolidación de memorias espaciales, es más interesante que el simple hecho de

almacenar estas memorias a corto plazo. Los estudios de Kitamura *et al.*, 2009 y 2018 ya mostraban evidencia de este pensamiento, sin embargo, nuestro trabajo coloca una pieza importante. Con respecto al tema, Kitamura *et al.* 2018 demostró que las memorias contextuales son dependientes a largo plazo del hipocampo tanto como de la corteza prefrontal a corto plazo. Esto quiere decir que la evocación y por consiguiente la modificación de estas memorias espaciales dependen de la participación en sinergia del hipocampo y de la corteza prefrontal. Asimismo, nuestros estudios apoyan estas observaciones, demostrando que la evocación de memorias espaciales a largo plazo se ve afectada por los niveles de NHA. Por lo que procesos de consolidación de engramas espaciales depende de la tasa de NHA. Como resultado una mayor tasa de NHA no promueve una rápida consolidación, si no una desestabilización del circuito que puede ser utilizado a favor del individuo, como ya lo hemos observado en la tarea de flexibilidad cognitiva. Por el contrario, una menor tasa de NHA podría favorecer el establecimiento de engramas espaciales, pero no proporcionaría un sustrato libre para codificar engramas nuevos sin interferencia con los engramas originales. Esta propuesta de menor interfeerencia corresponde con ideas similiares como la propuesta por Anacker y Hen., 2017. Sin embargo, existe un diferencia crucial entre los mecanismo que ellos proponen y lo que presentamos en este estudio. Estos investigadores han basado su hipótesis en la idea de que la NHA funciona como un filtro que separa trazas de memoria sumamente parecidas, algo llamado separación de patrones (Aimone *et al.*, 2011). De esta manera la NHA no estaría desestabilizando el circuito hipocampal, como varios otros trabajos ya han propuesto y demostrado (Akers *et al.*, 2014, Epp *et al.*, 2016, Guskjolen *et al.*, 2017, Guskjolen *et al.*, 2018). Como ya se comentó la idea de la separación de patrones ha sido fuertemente contestada por la evidencia experimental (Arruda-Carvalho *et al.*, 2011).

Además de la participación hipocampal en la consolidación de memorias espaciales, hemos hablado de la importancia de la CPFm durante la formación y evocación de estas memorias. Con relación a esto, el trabajo de Martínez-Canabal y colaboradores (2018) mostró que altos niveles de NHA impedían el regreso del miedo, por el contrario bajos niveles de NHA promovían la aparición del regreso del miedo. Conjuntamente con estas observaciones, la actividad neuronal en la corteza prelámbica e infralámbica, observada por núcleos positivos a c-Fos durante la expresión de la conducta de miedo, era modificada dependiendo de los niveles de NHA. Es importante señalar que en esta investigación los roedores fueron sometidos a un condicionamiento al miedo contextual seguido de un entrenamiento de extinción en el mismo contexto y posteriormente los roedores eran sometidos a una ablación o aumento de la NHA. Pasado un mes de enriquecimiento o ablación, los roedores fueron sometidos a una prueba para evaluar si regresaba el miedo a pesar del entrenamiento de extinción. Esta prueba mide de manera indirecta la flexibilidad cognitiva de los animales, debido a que deben pasar de aprender que un contexto en donde ocurrió un evento peligroso (condicionamiento) ya no lo es (extinción). Este cambio de paradigma requiere de la activación de la corteza prelámbica, que permite que los roedores se adapten más fácilmente a la nueva regla ambiental. Por el contrario, la activación de la corteza infralámbica no permite que los roedores aprendan esta nueva regla, lo se observó como persistencia de la conducta de miedo. Asimismo, otros estudios han mostrado que es importante la participación de la corteza prelámbica e infralámbica en ciertos paradigmas de flexibilidad cognitiva espacial, como en el laberinto en cruz (Ragozzino *et al.*, 1999a), en paradigmas con discriminación de olores (Ragozzino *et al.*, 2003) o en laberintos circulares (Ragozzino *et al.*, 1999b). De manera interesante en todos estos trabajos, la inactivación farmacológica de la corteza prelámbica e infralámbica no afectó la adquisición de la memoria

durante el entrenamiento en los laberintos, pero si se veían afectada su desempeño cuando las pistas visuales u odoríferas era modificado, y se requería aprender un cambio de regla. En el trabajo de Ragozzino y colaboradores (1999b) inactivaron la corteza prelímbica e infralímbica, previo e un entrenamiento reverso, observando que este se veía afectado pues los animales eran incapaces de aprender un cambio de regla. No obstante, la inactivación de la CCA en este mismo entrenamiento reverso, no afectó el desempeño de los animales. Este último resultado es consistente con lo que hasta ahora nosotros vimos con la activación con c-Fos de la CCA, en donde no hubo diferencias entre el grupo no-EE y EE. No obstante, estas investigaciones (Ragozzino *et al.*, 1999a, Ragozzino *et al.*, 2003, Ragozzino *et al.*, 1999b) juntos con los hallazgos de Martínez-Canabal y colaboradores (2018), reforzamos la idea de que es necesario buscar como es la activación de más áreas de la CPFm como la infralímbica y prelímbica en nuestro paradigma de flexibilidad cognitiva espacial.

9.3 La neurogénesis hipocampal adulta y su implicación en la actualización de paradigmas ambientales.

9.3.1 La neurogénesis hipocampal adulta y su rol en la supervivencia de los mamíferos a lo largo de su historia evolutiva

Los hallazgos mostrados sugieren que la NHA es un sistema de regulación dentro del hipocampo que mantienen en constante re-arreglo las trazas hipocampales; manteniendo aquellas que están actualizadas y degradando las que ya no lo están. Este rol del hipocampo podría estar relacionado con la demanda ambiental a la que han estado sometidos los mamíferos durante su historia evolutiva (Kemp y Kemp, 2005). Los primeros mamíferos fueron un grupo de vertebrados que estuvo confinado a nichos reducidos y normalmente con actividad nocturna, para evitar toparse con depredadores diurnos (Kemp y Kemp, 2005). Por lo que debieron poseer una conducta de navegación espacial desarrollada que les permitiera

recorrer el ambiente en ausencia de luz. Si bien es cierto que hoy en día la presencia de la NHA en todo el grupo de mamíferos es variable, no podemos dejar de lado que existe una correlación entre altos niveles de NHA y las exigencias ambientales (Kemp y Kemp, 2005). Con respecto a esto, se ha observado que aquellos mamíferos que poseen nula o reducida NHA presentan otro sistema neuronal que podría suplir el rol de NHA (Patzke *et al.*, 2015a, Amrein *et al.*, 2007). Tal es el caso de los cetáceos o murciélagos, que se valen del un sistema de ecolocalización para su navegación espacial (Patzke *et al.*, 2015b, Amrein *et al.*, 2011). Por otro lado, animales con una gran capacidad para generar mapas espaciales como son los roedores, poseen una tasa de neurogénesis muy alta dentro del grupo de los mamíferos (Amrein *et al.*, 2011).

Por lo tanto la NHA ha estado sujeta a presiones de selección natural que han desencadenado una enorme plasticidad fenotípica de este carácter, confiriéndole a los mamíferos la capacidad de adaptarse rápidamente a los cambios del ambiente (Amrein y Lipp, 2009). Esta plasticidad fenotípica se puede observar no sólo en la presencia y ausencia de NHA, si no en la cantidad de nuevas neuronas a lo largo del clado de los mamíferos y en la posible diversa funcionalidad en procesos cognitivos que han tenido a lo largo de su historia evolutiva (Amrein *et al.*, 2011, Amrein y Lipp, 2009).

9.3.2 La neurogenesis hipocampal adulta en la regulación de alteraciones afectivas en humanos

Los resultados presentados en este trabajo, tanto a nivel conductual y de activación neuronal, indican que la NHA puede promover la renovación constante de memorias a través de la activación de CA3, el GD y de estructuras corticales como la COF. Esta dinámica neuronal cobra importancia en en la psiquiatría clínica con relación a pacientes con

desordenes afectivos. Se ha observado que en ciertos desórdenes afectivos se vea afectada la función ejecutiva de flexibilidad cognitiva . En los pacientes con trastorno de depresión mayor (TDM) (Murphy *et al.*, 2012) y trastorno por estrés postraumático (TEPT) (Ben-Zion *et al.*, 2018b) existe una disminución notable de la flexibilidad cognitiva en tareas que requieren un cambio de reglas; es decir, los individuos presentan dificultades de cambiar entre un set de reglas previamente aprendidas (esquemas de pensamiento) por un nuevo set de reglas necesarias para resolver alguna tarea (Deveney y Deldin, 2006, Murphy *et al.*, 2012). Estos pacientes suelen tener problemas de autoregulación y autocontrol cognitivo, que se observa en la incapacidad para inhibir respuestas emocionales reactivas y la desvinculación de pensamientos irrelevantes o poco críticos para responder al ambiente (Ben-Zion *et al.*, 2018b, Cisler *et al.*, 2011). Un ejemplo de esto es una conducta llamada rumiación, que es la perseverancia de pensar sobre emociones negativas de uno mismo o sobre algún problema (Michl *et al.*, 2013). En estos casos, se piensa que los individuos no pueden desvincularse de estos pensamientos negativos debido a que no poseen los mecanismos neurales para cambiar entre esquemas de pensamiento (Michl *et al.*, 2013, Demeyer *et al.*, 2012) .

Es relevante la observación de que los pacientes con trastornos del estado de ánimo suelen presentar alteraciones estructurales en el hipocampo. Estas modificaciones van desde un volumen menor de este (Schmaal *et al.*, 2016), una disminución en el volumen de las subestructuras CA3 y GD que pueden indicar menor presencia de fibras musgosas (Wang *et al.*, 2010), una capa granular más delgada (Lucassen *et al.*, 2010) o hasta una reducción significativa de células neuronales progenitoras (Lucassen *et al.*, 2010, Boldrini *et al.*, 2013). Aunado a esto, un estudio con MRI de alta resolución encontró una correlación entre el

volumen del GD y *cornu ammonis* de paciente diagnosticados con TEPT y pacientes con TDM no medicados (Huang *et al.*, 2013). Aunado a estos cambios en la formación hipocampal, también se han observado modificaciones en la corteza prefrontal, específicamente en la COF, que pueden remitir con terapia cognitivo conductual y antidepresivos SSRI (inhibidores de la recaptura de serotonina) que también se conocen por incrementar la neurogénesis. (Levy-Gigi *et al.*, 2013, Boldrini *et al.*, 2009).

Como se revisió, el estudio de Martínez-Canabal *et al.*, (2019) muestra que la extinción (terapia de exposición en humanos), utilizada regularmente para tratar TEPT, podría mejorar su eficacia en presencia de la NHA y que esto puede activar la corteza prefrontal. Por tanto, podemos inferir que la comunicación entre la CPFm y el hipocampo es modulada por la NHA y puede facilitar los cambios entre esquemas de pensamiento, como pasar entre un esquema basado en un engrama asociado a una memoria de miedo a uno que represente seguridad. Aunque esta idea aún está en debate, pacientes con medicación que incrementa los niveles de NHA como los SSRIs han presentado recuperación respecto a la ruminación y regreso a esquemas previos (Mateus-Pinheiro *et al.*, 2013, Santarelli *et al.*, 2003, Perera *et al.*, 2007). Por todo esto, nuestros resultados apoyen la idea de que la NHA es una característica que facilitaría la flexibilidad cognitiva en paciente con desordenes afectivos y esto mejoraría significativamente sus procesos cognitivos.

9.4 Limitaciones del estudio

El trabajo aquí presentado fue planteado en un inicio para tratar de responder nuestra pregunta de manera no sólo correlativa sino causal. Por lo que en un comienzo se establecieron más objetivos que los aquí presentados, uno de los cuales incluían realizar correlaciones de actividad neuronal con c-Fos entre estructuras corticales e hipocampales.

Este objetivo sería concluido al terminar el experimento de flexibilidad cognitiva, al procesar y teñir los cerebros. Sin embargo, la estandarización de este protocolo conductual tomo poco mas de medio año, debido a la logistica de la crianza de los ratones y de la estandarización de todas las etapas del protocolo. Por esta razón, al concluir en primer año de esta investigación ya se contaba con los cerebros necesarios para llevar a cabo las inmunotinciones necesarias, pero no todos pudieron ser inmunoteñidos.

Se realizaron pruebas de estandarización con los anticuerpos para DCX, ki67 y c-Fos, de los cuales solo pudieron realizarse algunas inmunotinciones con DCX y c-fos, por lo que se tiene en mente que los resultados de actividad neuronal presentados en este estudio son preliminares y sin duda falta realizar más inmunotinciones, así como incluir observaciones de la actividad neuronal de otras estructuras con la corteza prelámbica e infralámbica. Por otro lado, las inmunotinciones con ki67 son importantes para establecer si el enriquecimiento ambiental aumenta la tasa de proliferación tanto como la generación de nuevas neuronas (DCX), resultados que se han observados en otras investigaciones.

Para establecer una relación causal entre el aumento de la NHA y la expresión de flexibilidad cognitiva. Este experimento requería la irradiación focal al hipocampo para reducir la NHA. Previamente, en otra investigación, habíamos utilizado este mecanismo de reducción de NHA, no obstante, para este experimento decidimos ser más precisos y efectivos, por lo que también estandarizamos el protocolo de irradiación. Desafortunadamente, aunque llevamos a cabo la irradiación del hipocampo, el experimento en su totalidad se vio afectado por el cierre de las instalaciones de la universidad. Por lo tanto no se pudieron obtener estos resultados necesarios para establecer que el efecto observado en la prueba de flexibilidad cognitiva se debía al incremento de la NHA y no de otros procesos

modificados por el mismo enriquecimiento ambiental. No obstante, el estudio previo que realizamos utilizando irradiación al hipocampo mostró que sin lugar a dudas el efecto conductual observado se debía al rol de la NHA. Por esta razón consideramos que en este estudio hubiésemos replicado estas observaciones.

Por otro lado, las inmunotinciones de c-Fos y DCX que se llevaron a cabo antes del cierre de instalaciones fueron pocas ya que nos encontramos en la parte de estandarización del anticuerpo primario. Además de esto, los conteos requerían del uso de un microscopio óptico al que no se ha logrado tener acceso durante la pandemia actual. No obstante, con permiso de la dirección de la Facultad de Ciencias se pudieron concluir los conteos de las inmunotinciones que ya se habían realizado.

Asimismo, se planteó otro experimento necesario para establecer que la comunicación del circuito cortico-hipocampal es necesario para la facilitación de la flexibilidad cognitiva espacial. Con esta línea de pensamiento, se pensó en realizar una desconexión contralateral del hipocampo y la corteza prefrontal utilizando el fármaco excitotóxico NMDA. Si se toman en cuenta los resultados de actividad neuronal con c-Fos, se establecería las regiones cortico-hipocampales que podrían estar liderando la conducta de flexibilidad cognitiva. Con nuestros resultados preliminares hipotetizamos que la inactivación de la COF y de CA3 de forma contralateral previamente a la prueba de flexibilidad cognitiva afectaría el desempeño de los ratones para encontrar la ubicación nueva. Con estos resultados podríamos sugerir que no es suficiente el incremento de la NHA para facilitar la flexibilidad cognitiva, si no que es necesario que la NHA module la comunicación entre el hipocampo y la corteza.

Como último experimento se planteó determinar el circuito morfo-funcional que subyace la conducta de flexibilidad cognitiva espacial. Para ello, se estableció utilizar un

trazador retrógrado fluorescete, en este caso subunidad B de toxina colérica acoplada a un fluoróforo, que permitiera marcar la vía axonal entre el hipocampo y la corteza prefrontal. Posteriormente, utilizando colocalización con c-Fos se podría establecer cual de estas vías marcadas previamente estarían siendo reclutadas durante la prueba de flexibilidad cognitiva espacial. Asimismo, junto con el experimento de desconexión, se podría establecer la dinámica neurofisiológica que lidera el proceso de flexibilidad cognitiva espacial durante la última prueba del experimento. De esta manera es que al concluir estos experimentos podríamos hablar del engrama que subyace la conducta de flexibilidad cognitiva y no sólo de actividad neuronal.

9.5 Perspectivas

A pesar de los experimentos planteados originalmente no pudieron concluirse, hemos presentado datos relevantes e importantes para el avance en el entendimiento de la relación entre la flexibilidad cognitiva espacial con la neurogénesis hipocampal. Los resultados preliminares de actividad neuronal así como las correlaciones con DCX son observaciones nuevas y bien cimentadas sobre los mecanismos neuronales que lideran procesos cognitivos tan importantes como la flexibilidad cognitiva espacial. Estos procesos, ya sean desde un punto de vista evolutivo y comparativo o desde la psiquiatría clínica, no dejan de ser interesantes y siempre se agrega nuevo conocimiento al respecto. Por esta razón, consideramos que se debe concluir la investigación con los experimentos previamente expuestos, así como otros más que en transcurso de la experimentación se han planteado con base en los resultados.

➤ Otras interrogantes que surgieron a partir de los resultados encontrados en este estudio, es buscar si las nuevas neuronas son aquellas que se están reclutando con mayor

facilidad durante la tarea de flexibilidad cognitiva espacial. Para ello, sería crucial utilizar Brdu como marcador inmonohistoquímica para poder marcar las nuevas neuronas que se generen durante el enriquecimiento. Este marcador es una análogo de la timidina, por lo que se une al ADN (ácido desoxiribonucleico) en células en proliferación y permanece en las células hijas durante toda su vida. Por lo que este marcador en conjunto con c-Fos, podría ayudarnos a identificar si las neuronas que se están activando durante la tarea de flexibilidad cognitiva espacial son nuevas neuronas o neuronas postnatales.

➤ Asimismo, a la luz de los resultados con c-Fos, hemos planeado que sería necesario observar la actividad neuronal durante la prueba de retención de memoria un mes después del enriquecimiento. Esto con el fin de observar si la actividad dentro y fuera del hipocampo es diferente a la observada en la prueba de flexibilidad cognitiva espacial. Nosotros hipotetizamos que la actividad del GD y CA3 será menor en los animales enriquecidos ya que tienen poca retención de la memoria espacial previamente aprendida. Estos resultados sugerirían que el fallo en la evocación se debe a la degradación parcial o total del engrama original, como ya lo han demostrado investigaciones previas.

➤ Algunas de las interrogantes que se han planteado son encaminar estos resultados hacia aplicaciones psiquiátricas. Por esta razón, se podrían realizar experimentos en donde evaluemos si animales con conductas ansiosas o depresivas resuelven tareas de flexibilidad cognitiva espacial de mejor manera con tratamientos que incrementen la NHA. Asimismo, sería interesante averiguar si la resiliencia que proporciona la NHA en tareas de flexibilidad cognitiva espacial puede ser heredada epigenéticamente. Esta cuestión sale a la luz debido a que se sabe que muchas alteraciones afectivas son heredadas por los padres que la desarrollaron durante su vida. Con esto en mente, nosotros hemos observado que el incremento de NHA por enriquecimiento en madres ratonas, incrementa la amnesia infantil

y la tasa de proliferación en su descendencia. No obstante, no sabemos si este efecto persiste en la adultez y si esto tiene efecto en tareas de flexibilidad cognitiva espacial.

➤ La plasticidad fenotípica de la NHA es una característica que puede ayudar a encontrar una terapia conductual y farmacológica que permita mejorar la cognición de pacientes con alteraciones afectivas. Por lo que es sumamente necesario continuar con estos estudios que permitan caracterizar cada componente neuronal que permite el cambio entre paradigmas. Por esta razón, nosotros proponemos que es necesario proporcionar un sustrato neuronal flexible incrementando la NHA, posteriormente con terapia psicológica enseñarle al individuo a generar esquemas actualizados que suplanten aquellos esquemas previos, que son irrelevantes o negativos. Nosotros sugerimos que con este esquema de terapia, podría haber mejoría en estos individuos. No obstante, quizá el primer paso sea investigar más acerca de si los mecanismos neuronales que participan en la flexibilidad cognitiva espacial en roedores, también lo son en humanos, y más aún si esto es liderado por la NHA.

➤ Asimismo, estos resultados son fundamentales para entender como en el transcurso de la evolución de los mamíferos altos niveles de NHA han podido ser heredados y modificados a través de las generaciones. Siendo una característica conservada por la selección natural en aquellos grupos de mamíferos que les ha permitido incrementar su éxito ecológico. Aunque nuestros estudios, y la gran mayoría, se basan en experimentación en clados específicos de mamíferos podemos inferir que la plasticidad fenotípica de la NHA se presentó desde inicios de la evolución de mamíferos y se ha ido perdiendo en organismos que han desarrollado otras estructuras para obtener flexibilidad cognitiva espacial. Este es un tema poco estudiado por varias razones éticas, y es que no podemos experimentar en todos los mamíferos del mundo solo para resolver esta cuestión. Sin embargo, los datos celulares y conductuales que hasta

ahora tenemos, nos indican que nuestra hipótesis puede ser cierta. Por lo tanto, es un tema que se puede seguir estudiando desde la etología y la anatomía comparada.

10 Conclusión

En este estudio logramos establecer que el enriquecimiento ambiental promueve el incremento de la neurogénesis hipocampal y con ello se facilita la flexibilidad cognitiva espacial. Asimismo, observamos que durante la tarea de flexibilidad cognitiva y debido al incremento de la neurogénesis hipocampal, se activan de manera diferencial el GD, CA3 y la COF.

11 Referencias

- Aimone, J. B., Deng, W. y Gage, F. H. 2011. Resolving new memories: a critical look at the dentate gyrus, adult neurogenesis, and pattern separation. *Neuron*, 70, 589-96.
- Aimone, J. B., Wiles, J. y Gage, F. H. 2006. Potential role for adult neurogenesis in the encoding of time in new memories. *Nature Neuroscience*, 9, 723-727.
- Aimone, J. B., Wiles, J. y Gage, F. H. 2009. Computational influence of adult neurogenesis on memory encoding. *Neuron*, 61, 187-202.
- Akers, K. G., Martinez-Canabal, A., Restivo, L., Yiu, A. P., De Cristofaro, A., Hsiang, H. L., Wheeler, A. L., Guskjolen, A., Niibori, Y., Shoji, H., Ohira, K., Richards, B. A., Miyakawa, T., Josselyn, S. A. y Frankland, P. W. 2014. Hippocampal neurogenesis regulates forgetting during adulthood and infancy. *Science*, 344, 598-602.
- Altman, J. y Das, G. D. 1965. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol*, 124, 319-35.
- Amaral, D. G., Scharfman, H. E. y Lavenex, P. 2007. The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *The Dentate Gyrus: A Comprehensive Guide to Structure, Function, and Clinical Implications*.
- Amaral, D. G. y Witter, M. P. 1989. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *J Neurosci*, 31, 571-591.
- Ambrogini, P., Lattanzi, D., Ciuffoli, S., Agostini, D., Bertini, L., Stocchi, V., Santi, S. y Cuppini, R. 2004. Morpho-functional characterization of neuronal cells at different stages of maturation in granule cell layer of adult rat dentate gyrus. *Brain research*, 1017, 21-31.

- Amrein, I., Dechmann, D. K. N., Winter, Y. y Lipp, H.-P. 2007. Absent or Low Rate of Adult Neurogenesis in the Hippocampus of Bats (Chiroptera). *PLoS One*, 2, e455.
- Amrein, I., Isler, K. y Lipp, H. P. 2011. Comparing adult hippocampal neurogenesis in mammalian species and orders: influence of chronological age and life history stage. *Eur J Neurosci*, 34, 978-87.
- Amrein, I. y Lipp, H.-P. 2009. Adult hippocampal neurogenesis of mammals: evolution and life history. *Biology letters*, 5, 141-144.
- Arruda-Carvalho, M., Sakaguchi, M., Akers, K. G., Josselyn, S. A. y Frankland, P. W. 2011. Posttraining ablation of adult-generated neurons degrades previously acquired memories. *J Neurosci*, 31, 15113-27.
- Bannister, N. y Larkman, A. 1995. Dendritic morphology of CA1 pyramidal neurones from the rat hippocampus: I. Branching patterns. *Journal of Comparative Neurology*, 360, 150-160.
- Bayley, P. J., Hopkins, R. O. y Squire, L. R. 2003. Successful recollection of remote autobiographical memories by amnesic patients with medial temporal lobe lesions. *Neuron*, 38, 135-144.
- Becker, S. 2005. A computational principle for hippocampal learning and neurogenesis. *Hippocampus*, 15, 722-738.
- Beiko, J., Candusso, L. y Cain, D. P. 1997. The effect of nonspatial water maze pretraining in rats subjected to serotonin depletion and muscarinic receptor antagonism: a detailed behavioural assessment of spatial performance. *Behavioural Brain Research*, 88, 201-211.

- Ben-Zion, Z., Fine, N. B., Keynan, N. J., Admon, R., Green, N., Halevi, M., Fonzo, G. A., Achituv, M., Merin, O. y Sharon, H. 2018a. Cognitive flexibility predicts PTSD symptoms: observational and interventional studies. *Front Psychiatry*, 9, 477.
- Ben-Zion, Z., Fine, N. B., Keynan, N. J., Admon, R., Green, N., Halevi, M., Fonzo, G. A., Achituv, M., Merin, O., Sharon, H., Halpern, P., Liberzon, I., Etkin, A., Hendler, T. y Shalev, A. Y. 2018b. Cognitive Flexibility Predicts PTSD Symptoms: Observational and Interventional Studies. *Front Psychiatry*, 9, 477.
- Bernard, C. y Wheal, H. V. 1994. Model of local connectivity patterns in CA3 and CA1 areas of the hippocampus. *Hippocampus*, 4, 497-529.
- Biebl, M., Cooper, C. M., Winkler, J. y Kuhn, H. G. J. N. L. 2000. Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain. *Neuroscience letters*, 291, 17-20.
- Blaabjerg, M. y Zimmer, J. J. P. I. B. R. 2007. The dentate mossy fibers: structural organization, development and plasticity. *J Progress in brain research*, 163, 85-803.
- Boldrini, M., Santiago, A. N., Hen, R., Dwork, A. J., Rosoklija, G. B., Tamir, H., Arango, V. y John Mann, J. 2013. Hippocampal granule neuron number and dentate gyrus volume in antidepressant-treated and untreated major depression. *Neuropsychopharmacology*, 38, 1068-77.
- Boldrini, M., Underwood, M. D., Hen, R., Rosoklija, G. B., Dwork, A. J., John Mann, J. y Arango, V. 2009. Antidepressants increase neural progenitor cells in the human hippocampus. *Neuropsychopharmacology*, 34, 2376-2389.
- Boulougouris, V., Dalley, J. W. y Robbins, T. W. 2007. Effects of orbitofrontal, infralimbic and prelimbic cortical lesions on serial spatial reversal learning in the rat. *Behavioural Brain Research*, 179, 219-228.

- Brandt, M. D., Jessberger, S., Steiner, B., Kronenberg, G., Reuter, K., Bick-Sander, A., Von Der Behrens, W. y Kempermann, G. 2003. Transient calretinin expression defines early postmitotic step of neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis of mice. *J Molecular Cellular Neuroscience*, 24, 603-613.
- Brandt, M. D., Maass, A., Kempermann, G. y Storch, A. 2010. Physical exercise increases Notch activity, proliferation and cell cycle exit of type-3 progenitor cells in adult hippocampal neurogenesis. *European Journal of Neuroscience*, 32, 1256-1264.
- Brown, J. P., Couillard-Després, S., Cooper-Kuhn, C. M., Winkler, J., Aigner, L. y Kuhn, H. G. 2003. Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *J Comp Neurol*, 467, 1-10.
- Bruel-Jungerman, E., Rampon, C. y Laroche, S. 2007. Adult hippocampal neurogenesis, synaptic plasticity and memory: facts and hypotheses. *Rev Neurosci*, 18, 93.
- Bruel-Jungerman, E., Laroche, S. y Rampon, C. 2005. New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment. *Eur J Neurosci*, 21, 513-521.
- Carola, V., D'olimpio, F., Brunamonti, E., Bevilacqua, A., Renzi, P. y Mangia, F. 2004. Anxiety-related behaviour in C57BL/6 <--> BALB/c chimeric mice. *Behav Brain Res*, 150, 25-32.
- Cipriani, S., Ferrer, I., Aronica, E., Kovacs, G. G., Verney, C., Nardelli, J., Khung, S., Delezoide, A.-L., Milenkovic, I., Rasika, S., Manivet, P., Benifla, J.-L., Deriot, N., Gressens, P. y Adle-Biassette, H. 2018. Hippocampal Radial Glial Subtypes and Their Neurogenic Potential in Human Fetuses and Healthy and Alzheimer's Disease Adults. *Cerebral Cortex*, 28, 2458-2478.

- Cisler, J. M., Wolitzky-Taylor, K. B., Adams, T. G., Jr., Babson, K. A., Badour, C. L. y Willems, J. L. 2011. The emotional Stroop task and posttraumatic stress disorder: a meta-analysis. *Clin Psychol Rev*, 31, 817-28.
- Corkin, S. Lasting consequences of bilateral medial temporal lobectomy: Clinical course and experimental findings in HM. *Seminars in Neurology*, 1984. 249-259.
- Corkin, S., Amaral, D. G., González, R. G., Johnson, K. A. y Hyman, B. T. 1997. HM's medial temporal lobe lesion: findings from magnetic resonance imaging. *J Neurosci*, 17, 3964-3979.
- Craske, M. G. y Mystkowski, J. L. 2006. Exposure Therapy and Extinction: Clinical Studies. *Fear and learning: From basic processes to clinical implications* American Psychological Association.
- Crone, E. A., Richard Ridderinkhof, K., Worm, M., Somsen, R. J. y Van Der Molen, M. W. 2004. Switching between spatial stimulus–response mappings: a developmental study of cognitive flexibility. *Developmental science*, 7, 443-455.
- Cui, Z., Wang, H., Tan, Y., Zaia, K. A., Zhang, S. y Tsien, J. Z. 2004. Inducible and reversible NR1 knockout reveals crucial role of the NMDA receptor in preserving remote memories in the brain. *Neuron*, 41, 781-93.
- Da Cunha, C., Wietzikoski, S., Wietzikoski, E. C., Silva, M. H., Chandler, J., Jr., Ferro, M. M., Andreatini, R. y Canteras, N. S. 2007. Pre-training to find a hidden platform in the Morris water maze can compensate for a deficit to find a cued platform in a rat model of Parkinson's disease. *Neurobiol Learn Mem*, 87, 451-63.
- Decarolis, N. A., Mechanic, M., Petrik, D., Carlton, A., Ables, J. L., Malhotra, S., Bachoo, R., Götz, M., Lagace, D. C. y Eisch, A. J. 2013. In vivo contribution of nestin-and

- GLAST-lineage cells to adult hippocampal neurogenesis. *Hippocampus*, 23, 708-719.
- Demeyer, I., De Lissnyder, E., Koster, E. H. y De Raedt, R. 2012. Rumination mediates the relationship between impaired cognitive control for emotional information and depressive symptoms: A prospective study in remitted depressed adults. *Behav Res Ther*, 50, 292-7.
- Dennis, C., Suh, L., Rodriguez, M., Kril, J. y Sutherland, G. 2016. Human adult neurogenesis across the ages: an immunohistochemical study. *Neuropathology applied neurobiology*, 42, 621-638.
- Deveney, C. M. y Deldin, P. J. 2006. A preliminary investigation of cognitive flexibility for emotional information in major depressive disorder and non-psychiatric controls. *Emotion*, 6, 429-437.
- Dudai, Y. 2004. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annu Rev Psychol*, 55, 51-86.
- Dupret, D., Fabre, A., Dobrossy, M. D., Panatier, A., Rodriguez, J. J., Lamarque, S., Lemaire, V., Oliet, S. H., Piazza, P. V. y Abrous, D. N. 2007. Spatial learning depends on both the addition and removal of new hippocampal neurons. *PLoS Biol*, 5, e214.
- Durand, G. M., Kovalchuk, Y. y Konnerth, A. 1996. Long-term potentiation and functional synapse induction in developing hippocampus. *Nature*, 381, 71-75.
- Epp, J. R., Silva Mera, R., Köhler, S., Josselyn, S. A. y Frankland, P. W. 2016. Neurogenesis-mediated forgetting minimizes proactive interference. *Nat Commun*, 7, 10838.

- Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, A.-M., Nordborg, C., Peterson, D. A. y Gage, F. H. 1998. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med*, 4, 1313-1317.
- Ernst, A., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Perl, S., Tisdale, J., Possnert, G., Druid, H. y Frisé, J. 2014. Neurogenesis in the striatum of the adult human brain. *Cell*, 156, 1072-1083.
- Espósito, M. S., Piatti, V. C., Laplagne, D. A., Morgenstern, N. A., Ferrari, C. C., Pitossi, F. J. y Schinder, A. F. 2005. Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. *J Neurosci*, 25, 10074-10086.
- Filippov, V., Kronenberg, G., Pivneva, T., Reuter, K., Steiner, B., Wang, L.-P., Yamaguchi, M., Kettenmann, H. y Kempermann, G. 2003. Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes. *J Molecular Cellular Neuroscience*, 23, 373-382.
- Fogwe, L. A., Reddy, V. y Mesfin, F. B. 2021. Neuroanatomy, Hippocampus. *StatPearls* [Online].
- Frankland, P. W. y Bontempi, B. 2005. The organization of recent and remote memories. *Nat Rev Neurosci*, 6, 119-30.
- Frotscher, M., Drakew, A. y Heimrich, B. 2000. Role of afferent innervation and neuronal activity in dendritic development and spine maturation of fascia dentata granule cells. *Cerebral Cortex*, 10, 946-951.
- Fusco, G. y Minelli, A. 2010. Phenotypic plasticity in development and evolution: facts and concepts. *Phil. Trans. R. Soc.*, 365, 547-556.

- Garthe, A., Behr, J. y Kempermann, G. 2009. Adult-Generated Hippocampal Neurons Allow the Flexible Use of Spatially Precise Learning Strategies. *PLoS One*, 4, e5464.
- Garthe, A., Roeder, I. y Kempermann, G. 2016. Mice in an enriched environment learn more flexibly because of adult hippocampal neurogenesis. *Hippocampus*, 26, 261-271.
- Ge, S., Goh, E. L., Sailor, K. A., Kitabatake, Y., Ming, G.-L. y Song, H. 2006. GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature*, 439, 589-593.
- Ghalambor, C. K., Angeloni, L. M. y Carroll, S. P. 2010. Behavior as phenotypic plasticity. *Evolutionary behavioral ecology*, 90-107.
- Gould, E., Reeves, A. J., Fallah, M., Tanapat, P., Gross, C. G. y Fuchs, E. 1999. Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96, 5263-5267.
- Guskjolen, A., Josselyn, S. A. y Frankland, P. W. 2017. Age-dependent changes in spatial memory retention and flexibility in mice. *Neurobiol Learn Mem*, 143, 59-66.
- Guskjolen, A., Kenney, J. W., De La Parra, J., Yeung, B.-R. A., Josselyn, S. A. y Frankland, P. W. 2018. Recovery of “lost” infant memories in mice. *Curr Biol*, 28, 2283-2290. e3.
- Harrison, F. E., Hosseini, A. H. y McDonald, M. P. 2009. Endogenous anxiety and stress responses in water maze and Barnes maze spatial memory tasks. *Behavioural Brain Research*, 198, 247-251.
- Hashimoto, Y., Nasrallah, K., Jensen, K. R., Chavez, A. E., Carrera, D. y Castillo, P. E. 2017. LTP at Hilar Mossy Cell-Dentate Granule Cell Synapses Modulates Dentate Gyrus Output by Increasing Excitation/Inhibition Balance. *Neuron*, 95, 928-943 e3.

- Hastings, N. B. y Gould, E. 1999. Rapid extension of axons into the CA3 region by adult-generated granule cells. *J Comp Neurol*, 413, 146-154.
- Holt, W. y Maren, S. 1999. Muscimol inactivation of the dorsal hippocampus impairs contextual retrieval of fear memory. *J Neurosci*, 19, 9054-9062.
- Horesh, D., Sapir, T., Francis, F., Grayer Wolf, S., Caspi, M., Elbaum, M., Chelly, J. y Reiner, O. J. H. M. G. 1999. Doublecortin, a stabilizer of microtubules. *Hum Mol Genet*, 8, 1599-1610.
- Huang, Y., Coupland, N. J., Lebel, R. M., Carter, R., Seres, P., Wilman, A. H. y Malykhin, N. V. 2013. Structural changes in hippocampal subfields in major depressive disorder: a high-field magnetic resonance imaging study. *Biol Psychiatry*, 74, 62-8.
- Huang, Y., Zhou, W. y Zhang, Y. 2012. Bright lighting conditions during testing increase thigmotaxis and impair water maze performance in BALB/c mice. *Behavioural Brain Research*, 226, 26-31.
- Irie, F. y Yamaguchi, Y. 2009. Eph Receptor Signaling and Spine Morphology. In: SQUIRE, L. R. (ed.) *Encyclopedia of Neuroscience*. Oxford: Academic Press.
- Jacobs, L. F. 1996. The economy of winter: phenotypic plasticity in behavior and brain structure. *Biol Bull*, 191, 92-100.
- Jarrard, L. E. 2002. Use of excitotoxins to lesion the hippocampus: update. *Hippocampus*, 12, 405-414.
- Jessberger, S. y Kempermann, G. 2003. Adult-born hippocampal neurons mature into activity-dependent responsiveness. *Eur J Neurosci*, 18, 2707-2712.
- Jones, S. P., Rahimi, O., O'boyle, M. P., Diaz, D. L. y Claiborne, B. J. 2003. Maturation of granule cell dendrites after mossy fiber arrival in hippocampal field CA3. *Hippocampus*, 13, 413-427.

- Josselyn, S. A. y Tonegawa, S. 2020. Memory engrams: Recalling the past and imagining the future. *Hippocampus*, 367, 4325.
- Kaplan, M. S. y Hinds, J. W. 1977. Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science*, 197, 1092-4.
- Kemp, T. S. y Kemp, T. 2005. *The origin and evolution of mammals*, Oxford University Press on Demand.
- Kempermann, G., Gast, D., Kronenberg, G., Yamaguchi, M. y Gage, F. H. 2003. Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *J Development*, 130, 391-399.
- Kitamura, T., Ogawa, S. K., Roy, D. S., Okuyama, T., Morrissey, M. D., Smith, L. M., Redondo, R. L. y Tonegawa, S. 2017. Engrams and circuits crucial for systems consolidation of a memory. *Science*, 356, 73-78.
- Kitamura, T., Saitoh, Y., Takashima, N., Murayama, A., Niibori, Y., Ageta, H., Sekiguchi, M., Sugiyama, H. y Inokuchi, K. 2009. Adult Neurogenesis Modulates the Hippocampus-Dependent Period of Associative Fear Memory. *Cell*, 139, 814-827.
- Knoth, R., Singec, I., Ditter, M., Pantazis, G., Capetian, P., Meyer, R. P., Horvat, V., Volk, B. y Kempermann, G. 2010. Murine features of neurogenesis in the human hippocampus across the lifespan from 0 to 100 years. *PLoS One*, 5, e8809.
- Knowles, W. D. 1992. Normal anatomy and neurophysiology of the hippocampal formation. *J Clin Neurophysiol*, 9, 253-263.
- Knowles, W. D. y Schwartzkroin, P. A. 1981. Local circuit synaptic interactions in hippocampal brain slices. *J Neurosci*, 1, 318-322.
- Koehl, M. y Abrous, D. N. 2011. A new chapter in the field of memory: adult hippocampal neurogenesis. *Eur J Neurosci*, 33, 1101-1114.

- Kronenberg, G., Reuter, K., Steiner, B., Brandt, M. D., Jessberger, S., Yamaguchi, M. y Kempermann, G. 2003. Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli. *J Comp Neurol*, 467, 455-463.
- Kuhn, H. G., Biebl, M., Wilhelm, D., Li, M., Friedlander, R. M. y Winkler, J. 2005. Increased generation of granule cells in adult Bcl-2-overexpressing mice: a role for cell death during continued hippocampal neurogenesis. *Eur J Neurosci*, 22, 1907-1915.
- Lechner, H. A., Squire, L. R. y Byrne, J. H. 1999. 100 years of consolidation—remembering Müller and Pilzecker. *Learn Mem*, 6, 77-87.
- Levy-Gigi, E., Szabó, C., Kelemen, O. y Kéri, S. 2013. Association Among Clinical Response, Hippocampal Volume, and FKBP5 Gene Expression in Individuals with Posttraumatic Stress Disorder Receiving Cognitive Behavioral Therapy. *Biol Psychiatry*, 74, 793-800.
- Lin, H. y Schagat, T. 1997. Neuroblasts: a model for the asymmetric division of stem cells. *Trends Genet*, 13, 33-39.
- Lucassen, P. J., Stumpel, M. W., Wang, Q. y Aronica, E. 2010. Decreased numbers of progenitor cells but no response to antidepressant drugs in the hippocampus of elderly depressed patients. *Neuropharmacology*, 58, 940-9.
- Maren, S. 1999. Neurotoxic or electrolytic lesions of the ventral subiculum produce deficits in the acquisition and expression of Pavlovian fear conditioning in rats. *Behav Neurosci*, 113, 283-90.
- Markakis, E. A. y 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-Canabal, A., Lopez-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. *Sci Rep*, 9, 2939.
- Martinez-Canabal, A., Wheeler, A. L., Sarkis, D., Lerch, J. P., Lu, W. Y., Buckwalter, M. S., Wyss-Coray, T., Josselyn, S. A. y Frankland, P. W. 2013. Chronic over-expression of TGFbeta1 alters hippocampal structure and causes learning deficits. *Hippocampus*, 23, 1198-211.
- Mateus-Pinheiro, A., Pinto, L., Bessa, J. M., Morais, M., Alves, N. D., Monteiro, S., Patrício, P., Almeida, O. F. X. y Sousa, N. 2013. Sustained remission from depressive-like behavior depends on hippocampal neurogenesis. *Translational psychiatry*, 3, e210-e210.
- Meshi, D., Drew, M. R., Saxe, M., Ansorge, M. S., David, D., Santarelli, L., Malapani, C., Moore, H. y Hen, R. 2006. Hippocampal neurogenesis is not required for behavioral effects of environmental enrichment. *Nature Neuroscience*, 9, 729-731.
- Michl, L. C., Mclaughlin, K. A., Shepherd, K. y Nolen-Hoeksema, S. 2013. Rumination as a mechanism linking stressful life events to symptoms of depression and anxiety: longitudinal evidence in early adolescents and adults. *J Abnorm Psychol*, 122, 339-52.
- Miller, M. W. y Nowakowski, R. S. 1988. Use of bromodeoxyuridine-immunohistochemistry to examine the proliferation, migration and time of origin of cells in the central nervous system. *Brain Res*, 457, 44-52.
- Milner, B., Corkin, S. y Teuber, H.-L. 1968. Further analysis of the hippocampal amnesic syndrome: 14-year follow-up study of HM. *Neuropsychologia*, 6, 215-234.

- Miyashita, T. y Rockland, K. S. 2007. GABAergic projections from the hippocampus to the retrosplenial cortex in the rat. *Eur J Neurosci*, 26, 1193-1204.
- Moreno-Jiménez, E. P., Flor-García, M., Terreros-Roncal, J., Rábano, A., Cafini, F., Pallas-Bazarra, N., Ávila, J. y Llorens-Martín, M. 2019. Adult hippocampal neurogenesis is abundant in neurologically healthy subjects and drops sharply in patients with Alzheimer's disease. *Nat Med*, 25, 554-560.
- Moreno-Jiménez, E. P., Terreros-Roncal, J., Flor-García, M., Rábano, A. y Llorens-Martín, M. 2021. Evidences for Adult Hippocampal Neurogenesis in Humans. *J Neurosci*, 41, 2541-2553.
- Morris, R. 1989. Synaptic plasticity and learning: selective impairment of learning rats and blockade of long-term potentiation in vivo by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP5. *Journal of Neuroscience*, 9, 3040-3057.
- Moustafa, A. A. 2013. Increased hippocampal volume and gene expression following cognitive behavioral therapy in PTSD. *Front Hum Neurosci*, 7, 747.
- Murphy, F. C., Michael, A. y Sahakian, B. J. 2012. Emotion modulates cognitive flexibility in patients with major depression. *Psychol Med*, 42, 1373-82.
- Murphy, T. H., Worley, P. F. y Baraban, J. M. 1991. L-type voltage-sensitive calcium channels mediate synaptic activation of immediate early genes. *Neuron*, 7, 625-35.
- Naber, P. A., Lopes Da Silva, F. H. y Witter, M. P. 2001. Reciprocal connections between the entorhinal cortex and hippocampal fields CA1 and the subiculum are in register with the projections from CA1 to the subiculum. *Hippocampus*, 11, 99-104.

- Oomen, C. A., Bekinschtein, P., Kent, B. A., Saksida, L. M. y Bussey, T. J. 2014. Adult hippocampal neurogenesis and its role in cognition. *J Wiley Interdisciplinary Reviews: Cognitive Science*, 5, 573-587.
- Owji, S. y Shoja, M. M. 2020. The History of Discovery of Adult Neurogenesis. *Clin Anat*, 33, 41-55.
- Paredes, M. F., Sorrells, S. F., Cebrian-Silla, A., Sandoval, K., Qi, D., Kelley, K. W., James, D., Mayer, S., Chang, J. y Auguste, K. I. 2018. Does adult neurogenesis persist in the human hippocampus? *Cell Stem Cell*, 23, 780-781.
- Patzke, N., Spocter, M. A., Karlsson, K. Æ., Bertelsen, M. F., Haagensen, M., Chawana, R., Streicher, S., Kaswera, C., Gilissen, E., Alagaili, A. N., Mohammed, O. B., Reep, R. L., Bennett, N. C., Siegel, J. M., Ihunwo, A. O. y Manger, P. R. 2015a. In contrast to many other mammals, cetaceans have relatively small hippocampi that appear to lack adult neurogenesis. *Brain Structure and Function*, 220, 361-383.
- Patzke, N., Spocter, M. A., Karlsson, K. a. E., Bertelsen, M. F., Haagensen, M., Chawana, R., Streicher, S., Kaswera, C., Gilissen, E., Alagaili, A. N., Mohammed, O. B., Reep, R. L., Bennett, N. C., Siegel, J. M., Ihunwo, A. O. y Manger, P. R. 2015b. In contrast to many other mammals, cetaceans have relatively small hippocampi that appear to lack adult neurogenesis. *Brain Struct Funct*, 220, 361-83.
- Paxinos, G. y Franklin, K. B. 2019. *Paxinos and Franklin's the mouse brain in stereotaxic coordinates*, Academic press.
- Perera, T. D., Coplan, J. D., Lisanby, S. H., Lipira, C. M., Arif, M., Carpio, C., Spitzer, G., Santarelli, L., Scharf, B., Hen, R., Rosoklija, G., Sackeim, H. A. y Dwork, A. J. 2007. Antidepressant-induced neurogenesis in the hippocampus of adult nonhuman primates. *J Neurosci*, 27, 4894-4901.

- Phillips, R. G. y Ledoux, J. E. 1994. Lesions of the dorsal hippocampal formation interfere with background but not foreground contextual fear conditioning. *Learn Mem*, 1, 34-44.
- Plümpe, T., Ehninger, D., Steiner, B., Klempin, F., Jessberger, S., Brandt, M., Römer, B., Rodriguez, G. R., Kronenberg, G. y 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.
- Ragozzino, M. E., Detrick, S. y Kesner, R. P. 1999a. Involvement of the prelimbic-infralimbic areas of the rodent prefrontal cortex in behavioral flexibility for place and response learning. *The Journal of neuroscience*, 19, 4585-4594.
- Ragozzino, M. E., Kim, J., Hassert, D., Minniti, N. y Kiang, C. 2003. The contribution of the rat prelimbic-infralimbic areas to different forms of task switching. *Behav Neurosci*, 117, 1054-65.
- Ragozzino, M. E., Wilcox, C., Raso, M. y Kesner, R. P. 1999b. Involvement of rodent prefrontal cortex subregions in strategy switching. *Behav Neurosci*, 113, 32-41.
- Rangel, L., Alexander, A., Aimone, J., Wiles, J., Gage, F., Chiba, A. y Quinn, L. 2014. Temporally selective contextual encoding in the dentate gyrus of the hippocampus. *Nat Commun*, 5, 1-9.
- Raponi, E., Agenes, F., Delphin, C., Assard, N., Baudier, J., Legraverend, C. y Deloulme, J. C. 2007. S100B expression defines a state in which GFAP-expressing cells lose their neural stem cell potential and acquire a more mature developmental stage. *Glia*, 55, 165-177.

- Remondes, M. y Schuman, E. M. 2004. Role for a cortical input to hippocampal area CA1 in the consolidation of a long-term memory. *Nature*, 431, 699-703.
- Rescorla, R. A. 2004. Spontaneous recovery. *Learn Mem*, 11, 501-9.
- Ridderinkhof, K. R., Ullsperger, M., Crone, E. A. y Nieuwenhuis, S. 2004. The role of the medial frontal cortex in cognitive control. *Science*, 306, 443-7.
- Robert, V., Cassim, S., Chevaleyre, V. y Piskorowski, R. A. 2018. Hippocampal area CA2: properties and contribution to hippocampal function. *Cell Tissue Res*, 373, 525-540.
- Sahay, A., Scobie, K. N., Hill, A. S., O'carroll, C. M., Kheirbek, M. A., Burghardt, N. S., Fenton, A. A., Dranovsky, A. y Hen, R. 2011. Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. *Nature*, 472, 466-70.
- Santarelli, L., Saxe, M., Gross, C., Surget, A., Battaglia, F., Dulawa, S., Weisstaub, N., Lee, J., Duman, R., Arancio, O., Belzung, C. y Hen, R. 2003. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science*, 301, 805-9.
- Saxe, M. D., Battaglia, F., Wang, J.-W., Malleret, G., David, D. J., Monckton, J. E., Garcia, A. D. R., Sofroniew, M. V., Kandel, E. R. y Santarelli, L. 2006. Ablation of hippocampal neurogenesis impairs contextual fear conditioning and synaptic plasticity in the dentate gyrus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 17501-17506.
- Scharfman, H. E. 2007. The CA3 "backprojection" to the dentate gyrus. *Progress in brain research*, 163, 627-637.
- Schmaal, L., Veltman, D. J., Van Erp, T. G., Sämann, P. G., Frodl, T., Jahanshad, N., Loehrer, E., Tiemeier, H., Hofman, A., Niessen, W. J., Vernooij, M. W., Ikram, M. A., Wittfeld, K., Grabe, H. J., Block, A., Hegenscheid, K., Völzke, H., Hoehn, D., Czisch, M., Lagopoulos, J., Hatton, S. N., Hickie, I. B., Goya-Maldonado, R.,

- Krämer, B., Gruber, O., Couvy-Duchesne, B., Rentería, M. E., Strike, L. T., Mills, N. T., De Zubicaray, G. I., McMahon, K. L., Medland, S. E., Martin, N. G., Gillespie, N. A., Wright, M. J., Hall, G. B., Macqueen, G. M., Frey, E. M., Carballedo, A., Van Velzen, L. S., Van Tol, M. J., Van Der Wee, N. J., Veer, I. M., Walter, H., Schnell, K., Schramm, E., Normann, C., Schoepf, D., Konrad, C., Zurovski, B., Nickson, T., McIntosh, A. M., Papmeyer, M., Whalley, H. C., Sussmann, J. E., Godlewska, B. R., Cowen, P. J., Fischer, F. H., Rose, M., Penninx, B. W., Thompson, P. M. y Hibar, D. P. 2016. Subcortical brain alterations in major depressive disorder: findings from the ENIGMA Major Depressive Disorder working group. *Mol Psychiatry*, 21, 806-12.
- Schmolck, H., Kensinger, E. A., Corkin, S. y Squire, L. R. 2002. Semantic knowledge in patient HM and other patients with bilateral medial and lateral temporal lobe lesions. *Hippocampus*, 12, 520-533.
- Scoville, W. B. y Milner, B. 1957. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 20, 11.
- Seri, B., García-Verdugo, J. M., Mcewen, B. S. y Alvarez-Buylla, A. 2001. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci*, 21, 7153-7160.
- Shimizu, E., Tang, Y. P., Rampon, C. y Tsien, J. Z. 2000. NMDA receptor-dependent synaptic reinforcement as a crucial process for memory consolidation. *Science*, 290, 1170-4.
- Shors, T. J., Townsend, D. A., Zhao, M., Kozorovitskiy, Y. y Gould, E. 2002. Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning. *Hippocampus*, 12, 578-84.
- Simons, J. S. y Spiers, H. J. 2003. Prefrontal and medial temporal lobe interactions in long-term memory. *Nat Rev Neurosci*, 4, 637-648.

- Siwak-Tapp, C. T., Head, E., Muggenburg, B. A., Milgram, N. W. y Cotman, C. W. J. N. O. L. 2007. Neurogenesis decreases with age in the canine hippocampus and correlates with cognitive function. *Neurobiol Learn Mem*, 88, 249-259.
- Snyder, J., Hong, N., McDonald, R. y Wojtowicz, J. 2005. A Role for Adult Neurogenesis in Spatial Long-Term Memory. *Neuroscience*, 130, 833.
- Somogyi, P., Freund, T. F., Hodgson, A. J., Somogyi, J., Beroukas, D. y Chubb, I. W. 1985. Identified axo-axonic cells are immunoreactive for GABA in the hippocampus visual cortex of the cat. *J Brain research*, 332, 143-149.
- Sorrells, S. F., Paredes, M. F., Cebrian-Silla, A., Sandoval, K., Qi, D., Kelley, K. W., James, D., Mayer, S., Chang, J. y Auguste, K. I. 2018. Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults. *Nature*, 555, 377-381.
- Sotres-Bayon, F. y Quirk, G. J. 2010. Prefrontal control of fear: more than just extinction. *Curr Opin Neurobiol*, 20, 231-235.
- Spalding, Kirsty l., Bergmann, O., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Huttner, Hagen b., Boström, E., Westerlund, I., Vial, C., Buchholz, Bruce a., Possnert, G., Mash, Deborah c., Druid, H. y Frisén, J. 2013. Dynamics of Hippocampal Neurogenesis in Adult Humans. *Cell*, 153, 1219-1227.
- Stahnisch, F. W. y Nitsch, R. 2002. Santiago Ramón y Cajal's concept of neuronal plasticity: the ambiguity lives on. *Trends in Neurosciences*, 25, 589-591.
- Steiner, B., Klempin, F., Wang, L., Kott, M., Kettenmann, H. y Kempermann, G. 2006. Type-2 cells as link between glial and neuronal lineage in adult hippocampal neurogenesis. *Glia*, 54, 805-814.

- Steinvorth, S., Levine, B. y Corkin, S. 2005. Medial temporal lobe structures are needed to re-experience remote autobiographical memories: evidence from HM and WR. *Neuropsychologia*, 43, 479-496.
- Stone, S. S., Teixeira, C. M., Zaslavsky, K., Wheeler, A. L., Martinez-Canabal, A., Wang, A. H., Sakaguchi, M., Lozano, A. M. y Frankland, P. W. 2011. Functional convergence of developmentally and adult-generated granule cells in dentate gyrus circuits supporting hippocampus-dependent memory. *Hippocampus*, 21, 1348-1362.
- Sutherland, R. J., Wishaw, I. Q. y Kolb, B. 1983. A behavioural analysis of spatial localization following electrolytic, kainate-or colchicine-induced damage to the hippocampal formation in the rat. *Behav Brain Res*, 7, 133-153.
- Tashiro, A., Makino, H. y Gage, F. H. 2007. Experience-specific functional modification of the dentate gyrus through adult neurogenesis: a critical period during an immature stage. *J Neurosci*, 27, 3252-3259.
- Teixeira, C. M., Pomedli, S. R., Maei, H. R., Kee, N. y Frankland, P. W. 2006. Involvement of the Anterior Cingulate Cortex in the Expression of Remote Spatial Memory. *J Neurosci*, 26, 7555-7564.
- Tierney, P. L., Dégenétais, E., Thierry, A.-M., Glowinski, J. y Gioanni, Y. 2004. Influence of the hippocampus on interneurons of the rat prefrontal cortex. *J Neurosci*, 20, 514-524.
- Tilson, H. A., Rogers, B. C., Grimes, L., Harry, G. J., Peterson, N. J., Hong, J. y Dyer, R. 1987. Time-dependent neurobiological effects of colchicine administered directly into the hippocampus of rats. *Brain Res*, 408, 163-172.

- Tobin, M. K., Musaraca, K., Disouky, A., Shetti, A., Bheri, A., Honer, W. G., Kim, N., Dawe, R. J., Bennett, D. A. y Arfanakis, K. 2019. Human hippocampal neurogenesis persists in aged adults and Alzheimer's disease patients. *Cell Stem Cell*, 24, 974-982. e3.
- Toni, N., Teng, E. M., Bushong, E. A., Aimone, J. B., Zhao, C., Consiglio, A., Van Praag, H., Martone, M. E., Ellisman, M. H. y Gage, F. H. 2007. Synapse formation on neurons born in the adult hippocampus. *Nat Neurosci*, 10, 727-34.
- Tulving, E. 1995. Organization of memory: quo vadis? In: PRESS., T. M. (ed.) *The cognitive neurosciences*
- Tulving, E. y Markowitsch, H. J. 1998. Episodic and declarative memory: role of the hippocampus. *Hippocampus*, 8, 198-204.
- Van Groen, T. y Wyss, J. M. 1990. Extrinsic projections from area CA1 of the rat hippocampus: olfactory, cortical, subcortical, and bilateral hippocampal formation projections. *J Comp Neurol*, 302, 515-528.
- Van Praag, H., Christie, B. R., Sejnowski, T. J. y Gage, F. H. 1999a. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 13427-31.
- Van Praag, H., Kempermann, G. y Gage, F. H. 1999b. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci*, 2, 266-70.
- Van Praag, H., Shubert, T., Zhao, C. y Gage, F. H. 2005. Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *J Neurosci*, 25, 8680-5.
- Videbech, P. y Ravnkilde, B. 2004. Hippocampal volume and depression: a meta-analysis of MRI studies. *Am J Psychiatry*, 161, 1957-1966.

- Villarreal, G., Hamilton, D. A., Petropoulos, H., Driscoll, I., Rowland, L. M., Griego, J. A., Kodituwakku, P. W., Hart, B. L., Escalona, R. y Brooks, W. M. 2002. Reduced hippocampal volume and total white matter volume in posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry*, 52, 119-125.
- Vorhees, C. V. y Williams, M. T. J. N. P. 2006. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. 1, 848-858.
- Walsh, T. J., Schulz, D. W., Tilson, H. A. y Schmechel, D. E. 1986. Cocaine-induced granule cell loss in rat hippocampus: selective behavioral and histological alterations. *Brain Res*, 398, 23-36.
- Wang, X., Gao, F., Zhu, J., Guo, E., Song, X., Wang, S. y Zhan, R. Z. 2014. Immunofluorescently labeling glutamic acid decarboxylase 65 coupled with confocal imaging for identifying GABAergic somata in the rat dentate gyrus-A comparison with labeling glutamic acid decarboxylase 67. *J Chem Neuroanat*, 61-62, 51-63.
- Wang, Z., Neylan, T. C., Mueller, S. G., Lenoci, M., Truran, D., Marmar, C. R., Weiner, M. W. y Schuff, N. 2010. Magnetic resonance imaging of hippocampal subfields in posttraumatic stress disorder. *Arch Gen Psychiatry*, 67, 296-303.
- Warburton, E., Morgan, A., Baird, A. L., Muir, J. L. y Aggleton, J. P. J. B. N. 1999. Does pretraining spare the spatial deficit associated with anterior thalamic damage in rats? 113, 956.
- Weisz, V. I. y Argibay, P. F. 2012. Neurogenesis interferes with the retrieval of remote memories: forgetting in neurocomputational terms. *Cognition*, 125, 13-25.
- West-Eberhard, M. J. 2003. *Developmental plasticity and evolution*, Oxford University Press.

- Wheeler, A. L., Teixeira, C. M., Wang, A. H., Xiong, X., Kovacevic, N., Lerch, J. P., McIntosh, A. R., Parkinson, J. y Frankland, P. W. 2013. Identification of a functional connectome for long-term fear memory in mice. *PLoS computational biology*, 9, e1002853-e1002853.
- Winocur, G., Wojtowicz, J. M., Sekeres, M., Snyder, J. S. y Wang, S. 2006. Inhibition of neurogenesis interferes with hippocampus-dependent memory function. *Hippocampus*, 16, 296-304.
- Wiskott, L., Rasch, M. J. y Kempermann, G. 2006. A functional hypothesis for adult hippocampal neurogenesis: avoidance of catastrophic interference in the dentate gyrus. *Hippocampus*, 16, 329-343.
- Witter, M. P. 2010. Connectivity of the hippocampus. *Hippocampal microcircuits*. Springer.
- Witter, M. P. y Amaral, D. G. 1991. Entorhinal cortex of the monkey: V. Projections to the dentate gyrus, hippocampus, and subicular complex. *J Comp Neurol*, 307, 437-459.
- Xavier, G. F., Oliveira-Filho, F. J. y Santos, A. M. 1999. Dentate gyrus-selective colchicine lesion and disruption of performance in spatial tasks: Difficulties in “place strategy” because of a lack of flexibility in the use of environmental cues? *Hippocampus*, 9, 668-681.
- Young, D., Lawlor, P. A., Leone, P., Dragunow, M. y During, M. J. 1999. Environmental enrichment inhibits spontaneous apoptosis, prevents seizures and is neuroprotective. *Nat Med*, 5, 448-53.
- Zhao, C., Teng, E. M., Summers, R. G., Ming, G.-L. y Gage, F. H. 2006. Distinct Morphological Stages of Dentate Granule Neuron Maturation in the Adult Mouse Hippocampus. *J Neurosci*, 26, 3-11.

