Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis de Grado

Neurogénesis en relación a envejecimiento y a la capacidad mnésica en el cangrejo Chasmagnathus granulata

Peszano, Valeria N.

2005

Este documento forma parte de las colecciones digitales de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en bibliotecadigital.exactas.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

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

Cita tipo APA:
Peszano, Valeria N.. (2005). Neurogénesis en relación a envejecimiento y a la capacidad mnésica en el cangrejo Chasmagnathus granulata. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
https://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO001196_Peszano

Cita tipo Chicago:
Peszano, Valeria N.. "Neurogénesis en relación a envejecimiento y a la capacidad mnésica en el cangrejo Chasmagnathus granulata". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2005. https://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO001196_Peszano

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. **Contacto:** bibliotecadigital.exactas.uba.ar
Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA Y BIOLOGIA MOLECULAR Y CELULAR

NEUROGENESIS EN RELACION A ENVEJECIMIENTO Y A LA CAPACIDAD MNESICA EN EL CANGREJO *Chasmagnathus granulata*.

AUTOR: VALERIA N. PESZANO

DIRECTOR: ALEJANDRO DELORENZI PhD

LUGAR DE TRABAJO: LABORATORIO DE NEUROBILOGIA DE LA MEMORIA. DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA Y BIOLOGIA MOLECULAR Y CELULAR

TESIS PARA OPTAR POR EL TITULO DE LICENCIADA EN CIENCIAS BIOLOGICAS
NOVIEMBRE 2005

Resumen

Desde un comienzo el estudio de la proliferación celular y diferenciación de las neuronas ha sido estudiado, mayormente durante el desarrollo del sistema nervioso central (SNC). Recientemente la investigación en este campo se ha desplazado al estudio de la neurogénesis en individuos adultos (neurogénesis secundaria), reconociéndosela como parte de la fisiología del SNC, tanto en vertebrados como en invertebrados. Una coincidencia sugestiva es que la neurogénesis secundaria en el SNC tiene lugar en núcleos de integración de información involucrados en distintos procesos cognitivos (hipocampo, *mushroom bodies,* etc.). Se ha observado que la neurogénesis secundaria es regulada por muchos factores, entre ellos la edad, la que demostró ser un modulador negativo de este proceso. En crustáceos se ha descrito neurogénesis secundaria en el cuerpo hemielipsoide, área de importancia para la integración de información olfatoria, visual y mecanosensorial. El cuerpo hemielipsoide es filogenéticamente análogo a los *mushroom modies* de insectos. Este trabajo es la primera evidencia de la ocurrencia de neurogénesis secundaria en el SNC del cangrejo *Chasmagnathus granulatus.* Nuestro laboratorio ha estudiado extensivamente la memoria contexto señal de este animal, y una de sus características es que la capacidad mnésica disminuye con la edad. Conjuntas, estas evidencias, nos llevaron a evaluar una posible relación entre la neurogénesis secundaria y los procesos cognitivos. El objetivo de este trabajo es encontrar una correlación entre la tasa de neurogénesis con la que los animales llegan de su ambiente natural, su edad y su capacidad mnésica individual. La tasa de neurogénesis en *Chasmagnathus*, al igual que en mamíferos, disminuye con el envejecimiento. Este resultado se correlaciona indirectamente con la disminución de la capacidad mnésica producida por la edad, sin embargo, no hemos encontrado una asociación directa entre el nivel de retención en el paradigma de memoria y la tasa de neurogénesis.

Índice

Introducción

1. Introducción general 1
2. La neurogénesis 2
   2.1 Vertebrados mamíferos 3
   2.2 Otros vertebrados 5
   2.3 Artrópodos 6
      2.3 a Insectos 6
      2.3 b Crustáceos 7
         -breve descripción del SNC de crustáceos decapodos 7
         -particularidades del SNC de *Chasmagnathus granulata* 9
         -neurogénesis en crustáceos 10
3. Identidad de la neurogénesis 12
4. Neurogénesis y memoria 14
   4.1 La evidencia 15
5. El cangrejo *Chasmagnathus sp* 18
   5.1 *Chasmagnathus granulata*: neurogénesis y memoria 20
6. Hipótesis y objetivos 21

Materiales y métodos 22

Resultados 31

Discusión 45

Bibliografía 51

Introducción

1. Introducción general

Desde siempre se ha puesto interés en los fenómenos que regulan la proliferación celular y diferenciación de las neuronas durante el desarrollo del SNC, pero hasta hace muy poco tiempo, la proliferación neuronal estaba considerada como un evento exclusivo del desarrollo. En la década del 60´ por primera vez Joseph Altman (Altman 1962) observó proliferación celular en un cerebro adulto de rata, y sugirió que podría tratarse de Neurogénesis, es decir, generación de neuronas nuevas en el adulto. Hoy en día es claro que la neurogénesis secundaria es un proceso que ocurre naturalmente en al menos algunas áreas del cerebro adulto.

A lo largo de los últimos años, la Neurogénesis secundaria ha sido objeto de estudio desde distintos aspectos. Sin embargo, la relevancia fisiológica de la incorporación de neuronas nuevas en un cerebro adulto aún no se ha dilucidado ¿Cual es el rol de la neurogénesis secundaria?, ¿Cómo es que se insertan exitosamente al circuito preexistente?, ¿Existe una función especifica a la cual estas neuronas están destinadas?

Las hipótesis acerca de la posible función fisiológica de la neurogénesis secundaria, se encuentra acotada precisamente a las funciones de las áreas del SNC que presentan este fenómeno.

Numerosos estudios en animales de diferente origen evolutivo que incluyen, mamíferos, vertebrados no mamíferos (anfibios, peces, reptiles, aves), numerosas especies de insectos, y crustáceos, han demostrado que la neurogénesis se mantiene activa durante toda la vida de un individuo. En la mayoría de estas taxa, la proliferación neuronal ocurre característicamente en regiones que están involucradas en integración de información sensorial (Nottebohm 2002a, Shors et al 2002, Cayre et al 2002, Schmidt & Hazsch 1999, Lledo & Gheusi 2003) En particular, la incorporación de neuronas nuevas en la

viva adulta en áreas indiscutidamente involucradas por lo menos en algunos tipos de memoria asociativa, ha llevado a intentar incluir a la neurogénesis secundaria, como un factor relevante en la fisiología de los procesos cognitivos. Lo que muchos autores se preguntan, es si la proliferación neuronal en el cerebro adulto, se trata de un remanente en la evolución o si efectivamente estamos ante un mecanismo no descrito de plasticidad y relevante en la fisiología del SNC (Schaffer y Gage, 2004)

2. La neurogénesis

La Neurogénesis secundaria se define como generación y supervivencia de neuronas en el cerebro adulto. La proliferación celular en el SNC de animales adultos, ha sido estudiada desde sus comienzos con marcadores de proliferación celular (Altman 1962). Sin embargo, fue en 1977 cuando Kaplan y Hinds, combinando autoradiografía y microscopia electrónica, confirmaron que las células marcadas durante la mitosis, adquirían morfología de neuronas. En los 90´, técnicas mas avanzadas permitieron la aceptación generalizada de la existencia de Neurogénesis secundaria.

La técnica mas ampliamente utilizada para diversas taxa ha sido la técnica de incorporación in vivo de 5-bromo-2´-deoxyuridina (BrdU) (marcador de proliferación celular no radioactivo).

La BrdU, es una base nitrogenada análoga a la timina, de modo que se incorpora al ADN de las células en la fase S de la mitosis. Ha sido descrito que una vez ingresada al organismo, esta droga esta disponible de una a dos horas, y luego es metabolizada (Prickaerts et al 2003) de modo que solo las células que estén replicando su ADN en el momento de la aplicación, incorporaran BrdU.

Dado que la BrdU no es un marcador de proliferación celular, sino un marcador de síntesis del ADN, con el objetivo de descartar la posibilidad de que en algunos casos las células no fueran neuroblastos, sino que fueran neuronas que estuvieran reparando su ADN y/o entrando en apoptosis (Rakic 2002),

empezaron a utilizarse marcadores del ciclo celular, que son generalmente proteínas que se expresan para llevar a cabo la mitosis (Kuan et al 2004). Este tipo de análisis permitió corroborar que la técnica de marcación con BrdU efectivamente evidencia células en proliferación.

Una de las ventajas de esta técnica es que las células marcadas durante la fase S tienen un tiempo de supervivencia muy alto, y la posición de los somas marcados a distintos tiempos, también nos da información de la dinámica de diferenciación y supervivencia (Schmidt 2001) Una estrategia, mayoritariamente utilizada en artrópodos, es tener un seguimiento de los somas BrdU+ hasta que estos adquieran posición y características morfológicas de neuronas maduras (Cameron et al 1993, Cayre et al 2000).

Hasta hoy, la gran mayoría de los trabajos sobre neurogénesis se han basado en la marcación de células mitóticas (BrdU+). Para la identificación de estas células, se han utilizado marcadores de distintos tipos neuronales: (b-tubullin III (neurona inmadura), NSE (*neuron-specific alongase*), nestin (células gliales), neuN y calbindin (neuronas maduras), GFAP (astrocitos), etc.) (Rakic 2002, Doetsch 2003) que descartan la posibilidad de estar marcando otro tipo de células en división, por ejemplo, células producto de angiogénesis. Este tipo de pericia permite además conocer el fenotipo histológico de las células que proliferaron, y especular acerca del patrón temporal de expresión de marcadores, que siguen las células en su maduración.

Recientemente, el desarrollo de técnicas de infección con retrovirus, que permite la visualización del crecimiento y migración de las células nuevas mediante la expresión de marcadores específicos tales como el *Green Flourescense Protein* (GFP) ha permitido tener un seguimiento mucho mas preciso del destino de las jóvenes neuronas (Scotto 2002, van Praag 2002)

2.1 Vertebrados mamíferos

La neurogénesis en mamíferos, esta acotada a dos áreas germinales del cerebro adulto (Rakic 2002). Este fenómeno tiene lugar en la zona subventricular, que dará origen a neuronas perinucleares y neuronas granulares del bulbo olfatorio (Lledo y Gheusi 2003) y el giro dentado del hipocampo. El hipocampo ha demostrado estar fuertemente comprometida en algunos tipos de memoria (Eichenbaum 1997)

En el giro dentado, los neuroblastos están localizados en la zona subgranular del giro dentado. Si bien no se ha observado una migración importante, estos neuroblastos se sumergen en la capa de células granulares, se diferencian y dan origen a astrocitos, oligodendrocitos y a neuronas granulares locales. Éstas últimas, que son más del 80 % de la producción, extienden sus dendritas hacia la zona subgranular y sus axones hacia la capa CA3 (Markakis y Gage, 1999) A medida que maduran, estas células adquieren características farmacológicas y electrofisiológicas propias de las neuronas granulares maduras (van Praag et al, 2002) y se insertan en el circuito preexistente (Liu et al 2003, Schmidt-Hieber et al 2004) Sin embargo, aun no se ha demostrado que estas células desarrollen sinapsis funcionales ó sinteticen y liberen neurotransmisores (Shinder y Gage 2004).

Diversos agentes neuroendocrinos son capaces de modificar la generación y supervivencia de las neuronas nuevas, modulando la dinámica de este proceso (Doetsch 2003) Muchos factores que regulan positiva y negativamente la proliferación neuronal en el hipocampo han sido identificados. "Células madre" de hipocampo han podido ser cultivadas *in vitro* en presencia de factores de crecimiento tales como *epidermal growth factor* (EGF) o *basic fibroblast gowth factor* (bFGF) (Gage 2000), se ha visto que *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) promueve su supervivencia y diferenciación de las células madre (Larsson et. al. 2002). *In vivo*, se ha visto que la neurogénesis tanto en el giro dentado como en la zona subgranular, es fuertemente afectada

por factores hormonales. En el giro dentado en particular, se ha visto que el estrógeno aumenta la tasa de proliferación, y se cree que este aumento esta mediado por serotonina. El aumento de esteroides adrenales circulantes, tales como los glucocorticoides, se ha correlacionado con una disminución en la tasa de neurogénesis (Lennington et al 2003, Zhao et al., 2003).

La actividad física, modula la dinámica hormonal, y no ha sido sorprendente encontrar que la actividad física voluntaria, incrementa notablemente la tasa basal de neurogénesis en el hipocampo. Se ha propuesto que este aumento este mediado por el aumento de *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) que se ha visto, induce proliferación neuronal *in vivo* (van Praga et al 1999) A su vez, el ejercicio produce un mejoramiento en la *performance* de aprendizaje (Rhodes 2003) La estimulación sensorial de los animales a través de su exposición a ambientes enriquecidos, favorece la proliferación celular, y paralelamente mejora el rendimiento de los animales en un aprendizaje dependiente de hipocampo (Kempermann et al 1997a); Se ha visto además que factores que modifican negativamente la capacidad mnésica como experiencias aversivas, ambientes de baja estimulación o el propio envejecimiento(Kuhn et al 1996), disminuyen notablemente la tasa de neurogénesis basal (Lemaire et al 2000, Scharff, 2000)

2.2 Otros vertebrados

También en algunos vertebrados no mamíferos se ha evidenciado que la proliferación neuronal se manifiesta durante toda la vida. En lagartijas, se ha encontrado que en la corteza medial cerebral, área análoga al giro dentado de mamíferos, existe una persistente neurogénesis durante la adultez. En muchos peces, se ha evidenciado neurogénesis basal asociada a la retina durante toda la vida de los individuos (Hitchcock et al 1992)

En algunas especies de pájaros que manifiestan comportamiento plástico con una marcada capacidad de aprendizaje (aprenden un canto nuevo todos los

años) durante la adultez, neuronas nuevas son incorporadas estacionalmente en áreas especializados tanto en la adquisición como en el almacenamiento del canto aprendido (Nottebohm 2002) y estas neuronas nuevas parecen ser necesarias para algunos componentes del canto aprendido cada año (Nottebohm 1981) Si bien las áreas donde se manifiesta este fenómeno en aves no ha sido descrito análogas a las áreas neurogénicas de mamíferos, no es discutido que la neurogénesis en esta taxa es un proceso fundamental en procesos cognitivos.

2.3 Artrópodos

2.3 a Insectos

En las especies de insectos en las cuales se observo proliferación neuronal en el adulto, se ha descrito neurogénesis en el mayor centro de asociación del SNC, la *Corpora Pedunculata.* Esta estructura ha sido comparado analógicamente con el hipocampo de mamíferos por la similitud de las funciones cognitivas en las cuales ésta está involucrada (Straufeld 1998). No se ha visto en ninguna de las especies de insectos estudiadas, neurogénesis en el lóbulo antenal, que resultaría ser análogo funcionalmente al lóbulo olfatorio en mamíferos.

La *Corpora Pedunculata*, esta formada, básicamente por las células de Kenyon y por neuropilos en donde estas interneuronas, sinaptan, tanto con vías eferentes de información olfativa, visual y táctil (Li y Straufeld 1997); como con vías aferentes motoras. Hay fuertes evidencias de que ésta región del cerebro de los insectos adultos está sometida a cambios morfológicos plásticos y existen numerosos trabajos, que han demostrado que son parte esencial en aprendizajes olfatorios, espaciales y contextuales (Liu et al 1999, Cayre et al 2002)

Existen muchos factores que regulan la neurogénesis para estas taxa (Cayre 2002). En algunos insectos, el enriquecimiento del medio ambiente

modula la neurogénesis. La tasa de división celular esta regulada por los ritmos circadianos y circanuales (Goergen et al 2002) La calidad e intensidad de estimulación olfatoria, modula positivamente la proliferación celular en la *corpora pedunculata*, que está mediada por la actividad NO sintetasa de las interneuronas circundantes (Cayre et al 2005). Experimentos de privación unilateral de estrada sensorial, ha demostrado que la proliferación puede ser inhibida ipsilateralmente por falta de *imput* (Scotto-Lomassese 2002). En grillos adultos se ha visto que los niveles de Hormona Juvenil (JH) regulan la neurogénesis mediando la biosíntesis de poliaminas (Cayre et al 2003) y se ha corroborado *in vitro* el efecto directo de la JH, asi como factores de crecimiento que regulan la neurogénesis en vertebrados (Malaterre et al 2003)

Si bien se ha observado en grillos (Cayre et al, 2000) que las células nuevas, migran desde el centro de proliferación (CP) hacia el interior del neuropilo, toman posición de células de Kenyon maduras y no son distinguibles de estas, en muchas otras especies filogenéticamente cercanas no se ha encontrado que el fenómeno de neurogénesis exista. Algunos autores han sugerido que un criterio más homogéneo para explicar la presencia de neurogénesis en adultos, podría ser el comportamiento complejo (Bieber & Fuldner, 1979). Sin embargo, estos mismos destacan que en insectos eusociales, la neurogénesis en adultos esta ausente y proponen que quizás la ausencia de neurogénesis en la *corpora pedunculata* de algunas especies, podría deberse simplemente a que éstas utilizan el crecimiento o la sinaptogénesis como medio de plasticidad (Cayre 2002).

De cualquier modo, La *Corpora pedunculata* esta sometida a constante remodelamiento durante toda la vida de los insectos (Cayre et al, 2002) y el agregado de neuronas nuevas en al menos algunas especies, probablemente refleje un tipo de plasticidad.

2.3 b Crustáceos

Breve descripción del SNC de crustáceos decapados

En artrópodos el sistema nervioso se clasifica tradicionalmente según su origen embriológico en: protocerebro, deutocerebro y tritocerebro. Estas estructuras embrionarias son las que originan el sistema nervioso del animal adulto. En los crustáceos decápodos el protocerebro se divide en protocerebro lateral y medial, el primero da lugar a parte del lóbulo óptico y el segundo a parte del ganglio supraesofágico; el deutocerebro y parte del tritocerebro dan origen al resto del ganglio supraesofágico; el ganglio toráxico, en cambio, se origina totalmente a partir del tritocerebro (Beron de Astrada 2005)

Cada uno de estos tres centros nerviosos está compuesto por un conjunto de neuropilos que se conectan entre sí a través de tractos. En cada neuropilo los cuerpos neuronales se encuentran agrupados en la periferia del mismo, y se han dado a llamar clusters neuronales.

El Ganglio Toráxico esta localizado ventralmente sobre la región medial del cefalotórax del animal. Este ganglio posee glándulas neuroendocrinas y neuropilos que constituyen centros de regulación visceral y centros motores del animal y cumple principalmente funciones vegetativas y motoras (Sandeman 1993).

El Ganglio Supraesofágico esta localizado ventralmente en la región anterior del cefalotórax del animal y es el principal centro de integración en el sistema nervioso central de crustáceos. En cuanto al procesamiento de información sensorial algunos de los neuropilos mejor descriptos son: el lóbulo olfatorio que recibe aferencias directas de los quimiorreceptores de la antena I; el neuropilo lateral de la antena I que recibe aferencias primarias mecanosensoriales, propioceptivas y olfatorias y el lóbulo accesorio que recibe aferencias del lóbulo olfatorio y aferencias del sistema visual (Fig. 1) (Beron de Astrada 2005)

Por ultimo, el Protocerebro Lateral en crustáceos esta conformado por un par de ganglios, Los Lóbulos Ópticos (LO), que se localizan el los pedúnculos oculares.

Este ganglio esta compuesto por una serie de neuropilos protocerebrales entre los cuales se encuentran los dos neuropilos asociados al Cuerpo Hemielipsoide (CH) y una serie de neuropilos asociados a la Médula Terminal (MT).

Los LO, además de contener el Protocerebro Lateral, están compuestos por 3 estaciones de procesamiento de la información visual, estas son la Lamina, la Medula Externa y la Lóbula (Sandeman 1995). Inicialmente se le habían adjudicado a estas estructuras, funciones puramente visuales, pero trabajos posteriores demostraron que se trata de un importante centro de integración y procesamiento visual (Tomsic et al 2003)

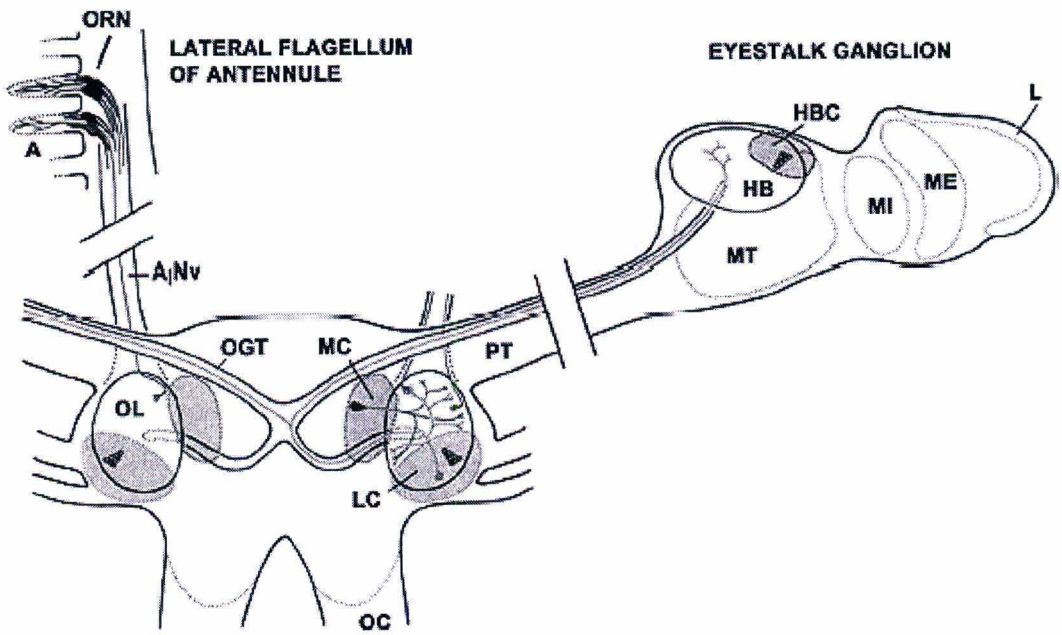

Fig. 1 Esquema del ganglio supresofagico y lóbulos opticos en *Carcinus maenas*. Al igual que *Chasmagnathus sp* este animal carece de lóbulos antenales, y a diferencia de *Chasmagnathus sp* a simple vista se identifica el Cuerpo Hemielipsoide. LC: cluster lateral, MC: cluster medial, OL: lóbulo olfatorio, PT: tracto protocerebral, MT: medula terminal, HB: cuerpo hemielipsoide, HBC: cluster asociado al cuerpo hemielipsoide, MI: medula interna, ME: medula externa, L: lamina.

Particularidades del SNC de *Chasmagnathus granulata*

Dentro de crustáceos decápodos, existe un grupo (*eureptantia*) que se caracteriza por la aparición de los Lóbulos Accesorios (LA); Dentro de este, existe otro grupo al cual se le atribuido una disminución en el tamaño de sus LA (*mensura: brachiura*). En particular en *Chasmagnathus granulathus*, que pertenece a este ultimo, los LA son difícilmente distinguibles si es que están presentes (Sandeman & Scholtz 1995).

Se ha observado que la MT de este crustáceo, consta de un numero fijo de neuropilos flanqueados por clusters neuronales asociados. Los dos neuropilos asociados al CH, a diferencia de otros crustáceos decápodos, no se diferencian como estructura independiente de la MT a simple vista, sin embargo pueden distinguirse junto a su cluster asociado en algunos tipos de tinciones (Starker comunicación personal).

Neurogénesis en Crustáceos

Al igual que en insectos y vertebrados, existe neurogénesis durante toda la vida del animal, y ha sido sugerido como un mecanismo mas de plasticidad estructural debido a la analogía de las estructuras donde se la ha encontrado (Schmidt y Harzsch, 1999).

En todos los crustáceos adultos hasta hoy estudiados con la técnica de BrdU se ha evidenciado actividad mitótica en los clusters somáticos de neuronas asociados a la vía de información olfativa (Hansen, 2004)

Si bien no se ha demostrado que estas células se diferencien a neuronas, se han hecho tinciones de doble marcación con marcadores neuronales que demuestran que no se trata de células apoptóticas ni de angiogénesis del tejido circundante (Schmidt 2001) Como se ha descrito anteriormente, los somas de las células neuronales se localizan en clusters específicos, cosa que no ocurre con la glia, que se encuentra diseminada en los neuropilos (Schmidt & Harzsch 1999) Se ha visto que las células generadas en clusters particulares, son

pequeñas y esféricas, características propias de neuronas en crustáceos (Sandeman et al 1992).

En las especies de crustáceos que presentan neurogénesis, células nuevas se generan llamativamente en 3 áreas discretas y claramente localizadas:

(1) Se ha observado proliferación celular en un centro de proliferación en el cluster Lateral (cluster L; cluster 10 en nomenclatura en Sandeman 1992) Este cluster neuronal es uno de los dos clusters asociados al lóbulo olfatório (LOlf), que comprende los cuerpos somáticos de neuronas de proyección que sinaptan en el LOlf, que resulta ser la primera estación de integración de la vía olfatoria para la mayoría de los crustáceos decápodos (Hansen, 2004). Estas neuronas extiendes sus proyecciones ipsi- y contralateral hacia el Cuerpo Hemielipsoide (CH) en los lóbulos Opticos (LO)

(2) Se ha encontrado que solo Spiny Lobster (*Panulirus argus*) que pertenece a un grupo dentro de eureptantia (*Palinuridae*) que tiene LA claramente localizables presenta robusta proliferación celular en un marcado centro de proliferación en el cluster asociado al LA (9/11 (Schmidt 1999; nomenclatura en Sandeman 1992), y se han demostrado características neuronales de estas células (Schmidt 2001) El cluster 9/11 comprende los cuerpos somáticos de interneuronas que sinaptan al LA y que conectan con el LOlf en muchos casos (Sandeman 2001)

(3) Se ha encontrado proliferación en el cluster que esta asociado a los neuropilos del CH (cluster CH) solo en cangrejos verdaderos (*brachiura*) y en cangrejos ermitaños (*anomura*). El CH en estos animales es el segundo centro de integración de la vía olfatoria (Schmidt, 1997[a], 1998, 1999) y resulta ser el área blanco de las neuronas de proyección de los lóbulos olfatorios que tienen sus somas en el cluster L.

Además de la detección de células mitóticas, en dos especies, el cangrejo *Carcinus maenas* (*brachiura*) y la langosta *Cherax destructor* (*Parastacidae*)

se ha demostrado que el numero de neuronas que constituyen los clusters que presentan proliferación celular, aumenta en numero a lo largo de la vida del individuo, y la amputación, que resulta un evento común en la vida en estos animales, induce un aumento en la proliferación neuronal en los clusters asociados a las áreas de integración de las entradas sensoriales depletadas. (Schmidt 1997, Sandeman et al 1998)

Con bases puramente morfológicas y filogenéticas, el CH ha sido propuesto como estructura homologa a la *Corpora pedunculata* y las células que lo inervan, cuyos cuerpos somáticos yacen en el cluster CH, homologas a las Células de Kenyon (Sandeman 1992) El CH parece ser un centro de integración multimodal importante en crustáceos (Strausfeld et al 1998) si bien no han sido estudiadas en detalle sus funciones y características (Schmidt 1997, Schmidt 1999)

En el cangrejo *Chasmagnathus sp* se han encontrado, mediante la técnica de *Calcium Imaging*, células electrofisiológicamente análogas a las "parasol-cells" en alguna zona de la MT que no pudo ser identificada como un neuropilo del CH (Delorenzi, comunicación personal), sin embargo, estas neuronas características del CH en otros crustáceos (McKinzie 2003).

3. Identidad de la neurogénesis

La identidad de los neuroblastos así como el linaje de las neuronas nuevas, en el cerebro adulto ha sido mejor caracterizado en mamíferos. Si bien se ha avanzado mucho en la maduración de estas neuronas, todavía no es claro cuantos pasos hay entre los neuroblastos y la neurona madura funcionando (Cayre et al 2002).

Durante el desarrollo se distinguen dos linajes de células nerviosas: las neuroepiteliales que darán origen a las neuronas estrictamente hablando, y las células gliales radiales, que pueden diferenciarse en oligodendrocitos y en astrocitos. Tanto en la zona subventricular como en el hipocampo, los neuroblastos que darán origen a neuronas tienen características fenotípicas de células gliales, mas precisamente las células madre de las áreas germinales son astrocitos que se dividen para generar neuroblastos, que darán origen a neuronas (Doetch 2003).

En la zona subventricular, que es donde se han descrito los fenómenos que apoyan la hipótesis de un origen glial de la neurogénesis (Doetch et al 1999), se a observado que los astrocitos ($GFAP^+$ $Dlx2^-$ PSA_NCAM$^-$), que forman una monocapa adyacente a las células ependimales multiciliadas que limitan con el ventrículo lateral, se dividen para dar origen a los neuroblastos ($GFAP^-$ $Dlx2^+$ PSA-NCAM$^+$) mediante células transitorias ($GFAP^-$ $Dlx2^+$ PSA-NCAM$^-$). Estas células transitorias, junto con los astrocitos, son las responsables de la formación del túnel por el que los neuroblastos (aun siguen dividiéndose) migran hacia su destino final en el bulbo olfatorio (Doetch 2003). En el giro dentado, donde no se observa una migración extensa, los neuroblastos que también poseen fenotipo de astrocito ($GFAP^+$ PSA$^-$), se dividen para dar origen a precursores neurales ($GFAP^-$ PSA$^+$) que se diferenciaran en neuronas granulares ($GFAP^-$ PSA$^+$) (Doetch 2003). La identidad glial de las células madre no solo se ha determinado por su expresión de GFAP sino que se ha observado que estos "astrocitos-neuroblastos" poseen características ultra-estructurales de células de la glia (Seri et al 2001, Peters et al 1991) En vertebrados no mamíferos, si bien existen diferencias, los neuroblastos también han evidenciado un fenotipo glial (Doetsch 2003).

Se ha visto que el uso de factores de crecimiento como *epidermal growth factor* (EGF) o *basic fibroblast gowth factor* (bFGF) y *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) no solo promueve la neurogénesis de células madre de áreas neurogénicas, sino que son capaces de inducir la proliferación

de células de otras áreas del cerebro adulto tales como corteza, cuerpo estriado o septum (Reynolds & Weiss 1992). La capacidad de proliferación de las células nerviosas esta acotada a áreas especificas, y esta exclusividad, seguramente este dada por las características del medio que las rodea, siendo capaz de modular su supervivencia y diferenciación

Aun hay mucho por aprender respecto a los factores que determinan el patrón de división, y regulan su diferenciación (Larsson et al 2002) pero muchos trabajos basados en la creación de ratones transgénicos o mutantes, para lograr la sobre-expresión de algunos factores o la abolición de otros, se están acercando a dilucidar estos enigmas (Doetsch 2003).

Durante el desarrollo del SNC, la expresión de factores neurotróficos ejercen una protección de las neuronas en diferenciación de la muerte celular programada, de modo que una regulación muy fina entre proliferación y apoptosis seria la responsable de la correcta citoarquitectura y funcionalidad de las conexiones en formación (de la Rosa & de Pablo 2000).

En adultos se ha visto que en condiciones "normales", del total de neuronas generadas a tiempo cero, el 50 % entrara en apoptosis, antes del mes de vida. En ratas jóvenes se producen 9000 células nuevas por día en el giro dentado del hipocampo, de las cuales el 50% co-marcan con marcadores específicos neuronales entre el 5to y 12mo día post mitosis. Asumiendo que la mitad de estas células no sobrevivirá, de todos modos el total de células generadas en el hipocampo a lo largo de un mes puede llagar a ser el 6 % de la población original Considerando que el hipocampo no crece *ad infinitud,* es que surge el concepto de *turn-over* o reemplazo de las células hipocampales. La pregunta es ¿cuales son los factores limitantes que determinan la supervivencia o muerte de las neuronas jóvenes, y que determina la muerte de las granulares maduras? ¿Cuales son los factores que regulan la neurogénesis?

En crustáceos adultos, se ha descrito parte de la dinámica de la neurogénesis mediante experimentos de *pulse-chase*, que dan evidencia indirecta de la tasa de reclutamiento y diferenciación de las neuronas nuevas.

También se sabe que factores externos como la manipulación de la estimulación sensorial, el enriquecimiento del medio ambiente o cambios hormonales modulan este proceso, pero poco se sabe de sus mecanismos (Schmidt, 2001; Harszch, 2001; Beltz, 2003).

4. Neurogénesis y memoria

La neurogénesis en un cerebro adulto, es un fenómeno que se ha evidenciado en muchos animales de distinto origen evolutivo y es un fenómeno que aparece en áreas relevantes en integración de la información sensorial y procesamiento. No es sorprendente que esta "coincidencia", haya llevado a establecer una unión funcional entre la Neurogénesis y los procesos cognitivos.

Tanto la formación hipocampal en mamíferos, como los *corpora pedunculata* en insectos, son regiones que se conocen fundamentales en procesos de aprendizaje espacial y contextual (Cayre 2002, Davis 1993, Strausfeld et al. 1998) Algunos autores sugieren que en mamíferos, muchas regiones del cerebro adulto no necesitarían neurogénesis para su funcionamiento normal y que el hipocampo y el bulbo olfatório serian áreas exclusivas, donde el reclutamiento de neuronas nuevas, ya sea por agregado de neuronas al circuito o por reemplazo de células preexistentes seria necesario para realizar sus funciones normalmente (Shinder y Gage 2004) Si esta hipótesis es correcta, ¿Es la neurogénesis un fenómeno indispensable para el funcionamiento óptimo de estas regiones?

En artrópodos adultos, al igual que en mamíferos, se ha descrito muchos factores de los cuales dependen la generación, reclutamiento y supervivencia de las neuronas nuevas, pero aun no se han encontrado evidencias contundentes acerca de su rol como evento natural de la fisiología del SNC (Beltz & Sandeman 2003; Gage 2000; Harzsch 2001; Kempermann 2002; Nottebohm 2002a; Prickaerts 2004; Rakic 2002; Schaffer 2004)

4.1 La evidencia

La neurogénesis en las diferentes taxa, ocurre en áreas involucradas ó asociadas a al menos algunos tipos de aprendizajes, y seria ilógico pensar que este proceso, que es tan costoso para el organismo, no tiene una funcionalidad.

En los últimos años, numerosos grupos de trabajo han puesto su interés en el fenómeno de la persistente neurogénesis en el hipocampo y en la *Corpora pedunculata*, focalizando en el rol fundamental que cumplen éstas áreas del cerebro en la adquisición de memorias asociativas.

Muchos investigadores han intentado demostrar que el fenómeno de neurogénesis en el hipocampo esta asociado, en cierto modo, a memoria y aprendizaje. Algunos autores sugieren que la neurogénesis seria un proceso fundamental para adquisición del condicionamiento en algunos paradigmas de aprendizaje dependientes de hipocampo (*trace-conditionning*) y apoyan la hipótesis de que la proliferación neuronal de un animal, tendría influencia en la *performance* en alguno, pero no todos los tipos de memoria dependiente de Hipocampo (Shors, 2001) No obstante, otros autores discuten otras posibilidades: se propone que el evento de adquisición de experiencia, frenaría la proliferación celular, para reclutar las nuevas neuronas ya nacidas (Ambrogini 2004) Un trabajo reciente prueba que el evento de adquisición específicamente de *trace memories*, en el paradigma de *eye-blinking*, aumenta el número de células nuevas que sobreviven al periodo critico de una semana post mitosis, momento en el cual el 80 % desencadena apoptosis (Leuner 2004) y proponen que la performance de aprendizaje de un animal no seria indicativo de proliferación, sino de supervivencia de neuronas nuevas.

Con el fin de demostrar la importancia de las neuronas nuevas sobre la plasticidad sináptica del hipocampo, se ha demostrado que cortes de hipocampo de ratas irradiadas específicamente en este área, de modo de suprimir la neurogénesis, perdían la capacidad de generar LTP (Snyder 2001) fenómeno

que podían lograr en condiciones normales (Wang et al 2000). Experimentos electrofisiológicos han evidenciado que las neuronas nuevas, son distintas a las células granulares maduras. Se ha descrito a GABA como un neurotransmisor exitatorio y poseen, probablemente, canales de calcio de bajo umbral, entre otras, características que se han encontrado durante el desarrollo del SNC en neuronas inmaduras. Se ha probado con marcación de neuronas inmaduras, que estas representan aproximadamente el 10 % del volumen total del hipocampo, y esta proporción, probablemente, repercute en la circuiteria de este área (Doesth & Ren 2005). Amen de la cantidad de información con la que contamos al respecto, no ha resultado tan simple identificar a las neuronas nuevas como componentes del circuito, ni tratar de adjudicarle funciones cognitivas.

Experimentos en ratas, donde impiden la neurogénesis por dos semanas con agentes antimicóticos, reflejan una posterior disminución de la capacidad mnésica en un paradigma de evitamiento pasivo, pero no para otros paradigmas (Shors, 2002) Sin embargo, recientemente se ha demostrado que el paradigma de evitamiento pasivo induce una disminución de la proliferación celular inmediatamente luego del entrenamiento, y se especula con el posible rol de los glucocorticoides liberados ante la experiencia aversiva (Pham 2005) Este resultado podría invalidar al paradigma de evitamiento pasivo como parámetro para correlacionar neurogénesis con memoria.

Ha sido descrito que ratas viejas que tienen un alto *performance* en el paradigma de aprendizaje espacial *water maze* poseen una tasa considerablemente mayor de neurogénesis que sus congéneres que no poseen esta habilidad (Drapeau et.al. 2003) Esta información no esta indicando que las neuronas nuevas estén siendo involucradas en el aprendizaje, pero la tasa de proliferación neuronal daría un estimativo de la dinámica y la capacidad de su hipocampo envejecido. Sin embargo otros autores no apoyan esta hipótesis. Existe un trabajo en el cual, ratas en edad avanzada no demuestran una

correlación entre tasa de neurogénesis y capacidad mnésica en aprendizaje espacial (Merrill, 2003)

Muchos diseños experimentales se han llevado a cabo con el fin de encontrar una causalidad entre capacidad mnésica y neurogénesis, pero los resultados son controversiales. La pregunta que nos hacemos acerca de la función de las neuronas nuevas en el hipocampo esta estrechamente ligada a una pregunta fundamental que es la función del hipocampo en general, por que si bien es la estructura del cerebro que mejor ha sido estudiada, aun no hay consenso acerca de su rol. El hipocampo es clásicamente un cuello de botella para la información, pero esta claro que no es el "disco rígido" del cerebro: a pesar de tener una no discutida capacidad de almacenamiento, éste es transciende, y el hipocampo pareciera ser el encargado de preparar las memorias de largo término que serán almacenadas en áreas corticales (Kempermann 2002) A pesar de las teorías que se desprenden sin duda de la experimentación, aun no sabemos que pasa con la información que pasa indefectiblemente por el hipocampo. Tampoco sabemos cuales son los mecanismos que utiliza éste para manejar constantemente tanto volumen de información. La neurogénesis hipocampal ocurre exactamente en el giro dentado, que es el *narrow-spot* del circuito, sin embargo, no ha sido probado que la memoria se almacene a este nivel. Ha resultado difícil diseñar un experimento en el cual se demuestre una correlación clara entre neurogénesis y memoria, sobre todo por que ésta parece ser bidireccional, es decir, la neurogénesis correlaciona con la experiencia, pero ésta afecta a la proliferación neuronal (Kempermann et al 1997) Sin mencionar todos los factores no manejables que están modulándola en el momento de la experimentación.

En insectos muy pocos trabajos han sido llevados a cabo con el fin de encontrarle una función cognitiva a la neurogénesis. Se ha demostrado que la supresión de la neurogénesis en grillos por irradiación del cerebro, provoca un déficit en aprendizaje olfativo pero no en uno puramente visual; sin embargo

otros tipos de comportamientos se vieron afectados en estos animales irradiados (Scotto-Lamassese, 2003)

Debido a la cantidad de trabajos contradictorios que se han publicado en este ultimo tiempo, el papel de la neurogénesis todavía es un tema en debate, pero no hay duda, que el hecho de que la neurogénesis esta acotada a zonas tan importantes en Aprendizaje y Memoria nos oriente a la búsqueda de una asociación con esta. Si bien existen muchos modelos de artrópodos en donde la neurogénesis asociada al aprendizaje esta siendo estudiada, aun no hay evidencias acerca del rol de la neurogénesis en procesos de memoria para este taxón.

La neurogénesis en crustáceos de encuentra en áreas conservadas y si bien no esta determinada la función fisiológica de éstas, se ha propuesto una analogía filogenética con insectos, de modo que no seria sorprendente encontrar que este proceso en crustáceos esta asociada, de alguna manera, a procesos de aprendizaje.

5. El cangrejo *Chasmagnathus granulatus*

En nuestro laboratorio se ha desarrollado un modelo de memoria en el cangrejo *Chasmagnathus granulata*, el cual se encuentra ampliamente caracterizado tanto a nivel mecanístico como comportamental (Maldonado, 1997; Maldonado, 2002) Este paradigma, está basado en la respuesta de escape provocada por la presentación de un estímulo visual de peligro (EVP) que corresponde a un rectángulo opaco que pasa horizontalmente sobre el cangrejo durante 9 segundos. Quince presentaciones del EVP, separadas por intervalos de 3 minutos, provocan una abrupta caída en la intensidad del escape. El decremento persiste por un largo tiempo (al menos por siete días) y no puede ser explicado por fatiga motora ni adaptación sensorial (Brunner y Maldonado, 1988) Se consideró inicialmente un caso más de habituación, pero resultados posteriores demostraron que se trataba de un aprendizaje asociativo mediado

por un asociación del estímulo (EVP) con el contexto (Tomsic et al. 1993; Tomsic et al. 1998) de ahí que se la denomine memoria contexto-señal (MCS) El entrenamiento no sólo provoca una caída en la intensidad de la respuesta de escape, sino la aparición de otro tipo de respuesta defensiva (el congelamiento ó *freezing*) que va aumentando en intensidad y duración a lo largo de los 15 ensayos (Pereyra et al 1998)

Cuando se procede a la sesión de evaluación, es decir a una nueva presentación del EVP después de un intervalo que puede ir de 24 horas a 7 días, el cangrejo despliega nuevamente la respuesta de congelamiento. Por ello, se considera que el congelamiento es la respuesta aprendida como MCS

Los estudios acerca de los mecanismos que sirven a la MCS mostraron que esta memoria es sensible a la cicloheximida tanto como a actinomicina-D (Hermitte et al. 1999; Pedreira et al. 1995; Pedreira et al. 1996) facilitada por angiotensinas (Delorenzi et al., 1996; Delorenzi et al., 2000) selectivamente regulada por un mecanismo colinérgico muscarínico (Berón de Astrada y Maldonado, 1999); mediada por la vía cAMP, PKA (Romano et al., 1996a; Romano et al., 1996b; Locatelli et al., 2000), por el factor de transcripción NF-κB (Freudenthal et al 1998; Freudenthal y Romano 2000; Merlo et al 2002) y por receptores glutamatérgicos de tipo NMDA-like glutamatergic (Troncoso y Maldonado, 2002)

5.1 Chasmagnathus: Neurogénesis y memoria

La MCS generada en el cangrejo Chasmagnathus, se trata de una asociación de dos estímulos no relacionados. En vertebrados se ha probado que este tipo de memoria requiere de la activación del hipocampo para poder evidenciarse. En Chasmagnathus se han probado muchos de los mecanismos que subyacen la formación de la MCS, pero aun no se ha encontrado el sustrato mnésico.

La neurogénesis se ha descrito en muchas especies de artrópodos, pero no se la ha descrito en un crustáceo que sea modelo de aprendizaje asociativo y genere una memoria a largo término. *Chasmagnathus granulatus* resulta ser el modelo ideal para el estudio de la neurogénesis asociada a memoria en un invertebrado.

Utilizando el paradigma de Memoria Contexto Señal se ha demostrado que la capacidad mnésica de *Chasmagnathus sp.* evaluada como el nivel de retención en el paradigma de MCS decrece con la edad (Tomsic, 1996); la caída en la intensidad del escape que medimos como memoria, se basa en una media poblacional, de modo que en una población hay animales que demuestran retención, pero otros que no. El "déficit mnésico" que observamos en un grupo de animales viejos se debe a un fenómeno que incrementa el número de cangrejos con baja retención, sin embargo dentro del grupo de animales viejos, con una media de capacidad mnésica reducida, aparecen individuos con nivel de retención alto; lo mismo sucede en animales jóvenes, donde si bien la media demuestra retención, hay animales que no. Ya se ha demostrado que en mamíferos la tasa basal de neurogénesis decrece con la edad (Kuhn et al 1996) y lo mismo sucede con la capacidad mnésica, que se deteriora con el envejecimiento.

En vertebrados se ha visto que la capacidad mnésica individual de ratas envejecidas se correlaciona con su tasa basal de neurogénesis (Drapeau et.al. 2003). Esta afirmación no es absoluta debido a que existen resultados que la contradicen, el hecho de que en crustáceos ocurriese algo similar, apoyaría la hipótesis que propone a la tasa de neurogénesis como un indicador de la dinámica de las áreas donde se encuentra (Drapeau et.al. 2003).

6. Hipótesis y objetivos

La incorporación de neuronas nuevas durante la adultez en áreas involucradas en procesos de memoria, le conferiría un incremento en la

plasticidad neuronal a todo el circuito. Así, una capacidad mnésica superior debería observarse en animales que presenten una alta tasa de neurogénesis.

Nuestra Hipótesis es que la variación en la capacidad mnésica entre animales de una misma población estaría asociada, en particular, a su tasa de Neurogénesis y que en el decremento poblacional de la capacidad mnésica debida al envejecimiento, podrían distinguirse individuos que no representan a la media poblacional, es decir, jóvenes que no aprenden y viejos que si lo hacen, y que correlacionan su capacidad mnésica con su tasa de neurogénesis individual.

El objetivo general de este trabajo, es encontrar una correlación entre la capacidad mnésica individual con la que los animales llegan de su entorno natural, su edad y su tasa basal de neurogénesis. Los objetivos especificos que se desprenden son los siguientes:

- Corroborar que la capacidad mnésica de los animales disminuye con la edad.
- Verificar efectivamente neurogénesis en el cerebro de *Chasmagnathus granulata* y determinar su autenticidad y localización
- Encontrar una correlación entre el número de células en división, edad y capacidad mnésica individual.
- Identificar posibles factores que modulen la proliferación neuronal.

Materiales y Métodos

Animales

Los animales utilizados son cangrejos de estuario de la especie *Chasmagnathus granulata*, machos adultos de tres edades diferentes. La edad es estimada por el diámetro del caparazón. Los animales están clasificados en jóvenes de 2.0 a 2.4 cm., intermedios de 2.6 a 3.0 cm. y viejos de 3.1 a 3.4 cm.

La captura se realiza en las rías de agua salobre de San Clemente del Tuyu, Provincia de Buenos Aires, Argentina. El traslado de los animales al laboratorio ocurre el mismo día de la recolección y los animales son colocados en agua de su ambiente natural que se mantiene a una salinidad media anual de entre 12‰ y 14‰, y son transportados en recipientes especialmente diseñados para ese fin. La recolección se realiza durante todo el año con un intervalo de 15 a 20 días.

Los experimentos son llevados a cabo dentro de la primera semana del arribo, excepto aclaración especifica. Cada animal es utilizado en un único experimento y cada experimento se realizo con animales de una misma captura.

Durante la permanencia en el laboratorio, los animales son alojados en recipientes plásticos rectangulares (35 x 48 x 27 cm.) con una profundidad de 0.5 cm. de agua salada y una densidad de 20 animales por recipiente (salvo aclaración previa). El agua salada tanto para el mantenimiento como en los experimentos, se prepara con sal marina para acuarios hw. Marinex (Winex-Alemania), salinidad de 12‰ y pH 7.4-7.6. El agua, durante la estadía de los animales, es renovada día por medio. Los animales son mantenidos en un ciclo de luz oscuridad de 14L: 10O (de 8.00 a 21.00) y la temperatura de todas las habitaciones es mantenida en un rango de 19°–22° C° con una humedad relativa de 90±10 %.

Dispositivo experimental

Para estudiar la memoria contexto señal, se utiliza un dispositivo automático que permite trabajar con 40 animales en forma simultánea.

La unidad experimental utilizada es el actómetro (Fig. 1) donde los animales son alojados individualmente. Consiste en un recipiente plástico cóncavo, con paredes curvas y piso circular plano, cubierto por 0.5 cm. de agua salada, es iluminado con una lámpara de 10 W ubicada a 30 cm. por encima del animal.

El estimulo consiste en el desplazamiento horizontal de una pantalla opaca rectangular a 15 cm. por encima del cangrejo (25 cm. x 7.5 cm.) movida por un motor sobre un eje en uno de sus extremos. La trayectoria que recorre la pantalla es desde la posición de reposo hasta cubrir 90° y luego regresar a la posición de reposo. Cada uno de estos ciclos dura 2.5 seg.

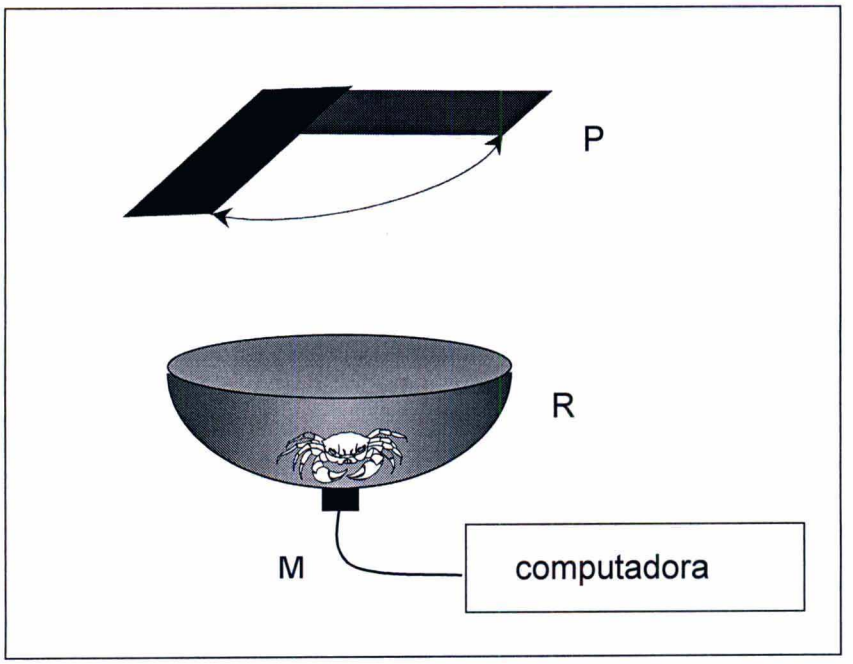

Fig 1: el actometro. P: pantalla. Se muestra el recorrido de 1 ciclo. R: recipiente donde se coloca al animal. Debajo de este se encuentra un micrófono (M) que se conecta a una computadora.

El pasaje de la pantalla provoca en el animal una respuesta de escape y consecuentemente vibraciones en el recipiente; estas vibraciones son detectadas por micrófonos colocados en la base del recipiente, que las traducen a una señal eléctrica proporcional. Estas señales son amplificadas, integradas sobre el tiempo de registro y finalmente traducidas a una escala numérica arbitraria, que depende de la ganancia del amplificador, antes de ser procesada por la computadora.

El ensayo consiste en dos pasajes de la pantalla, es decir un tiempo de integración de vibraciones de dos ciclos (5 seg.) Este diseño tiene dos propósitos: (1) la obtención de una respuesta conspicua mediante la acumulación de vibraciones del actometro y (2) el aumento de la probabilidad de que la pantalla ingrese en el campo visual del animal por lugares diferentes, garantizando así la estimulación similar para cada individuo independientemente de la ubicación del mismo en el actometro.

Cada actómetro esta separado del otro por un panel de madera que los aísla entre si. Un programa permite modificar el intervalo entre estímulos, su secuencia y duración.

Comportamiento

El protocolo comportamental consta de dos etapas, sesión de entrenamiento y sesión de evaluación, separadas por 24 ó 48 horas (dependiendo del experimento) Durante el intervalo entre el entrenamiento y evaluación, los animales son colocados individualmente en recipientes cilíndricos con 0.5 cm. de agua salada en oscuridad, dentro de cajoneras destinadas a este fin.

Tanto el entrenamiento como la evaluación se realizaron por la mañana en todos los experimentos.

Entrenamiento espaciado fuerte: Tiene una duración de 45 min. Consta de 15 ensayos con un intervalo entre ensayos de 171 seg. Cada ensayo tiene una duración de 9 seg., es decir que esta compuesto por el pasaje de la sombra dos veces (2.5 seg cada una) y un intervalo entre estos de 4 seg. Este protocolo es capaz de generar una memoria de largo término en la media de los animales.

Entrenamiento continuo: Consta de un tiempo de estimulación aproximado al tiempo empleado en un entrenamiento fuerte (43.5 min.) Esta compuesto por 506 ensayos continuos de una duración de 5 seg. Dado que este entrenamiento no tiene intervalo intra-ensayos, ni intervalo entre ensayos, esto asegura que el tiempo de registro de las vibraciones sea el mismo en ambos entrenamientos – en el entrenamiento espaciado, el tiempo de registro es de 2.5 + 2.5 seg. por ensayo.

Este protocolo de entrenamiento genera una caída abrupta de la respuesta de los animales en el entrenamiento (memoria de corto término), pero éstos no demuestran retención en la sesión de evaluación.

Grupos experimentales

En la sesión de entrenamiento, los cangrejos están distribuidos en pares de grupos, cada par consiste en un grupo entrenado (TR) y un grupo control (CT). El TR es entrenado de acuerdo al protocolo previsto, mientras que el CT permanece el tiempo del entrenamiento en los actómetros sin recibir estimulación (control pasivo)

Durante la sesión de evaluación (Día 2 ó Día 3), ambos grupos son estimulados con un ensayo.

La memoria de largo término, es definida operacionalmente como la diferencia significativa entre el grupo TR y el grupo CT en el nivel de respuesta en la sesión de evaluación. Para ponderar la memoria de largo termino, tanto en este, como en otros paradigmas, se focaliza el análisis en la diferencia entre el nivel de respuesta de los grupos en la sesión de evaluación y no en la diferencia entre el entrenamiento y la evaluación de un único grupo (Rescorla,

1988). Esta forma de análisis es especialmente justificada para nuestro modelo, considerando resultados anteriores que demuestran que la retención de la MCS es independiente del nivel de respuesta en el entrenamiento (Tomsic, 1991).

Particularmente, definimos memoria individual como la diferencia significativa entre la actividad de un animal que fue entrenado, con la media del grupo control pasivo, medida durante la sesión de evaluación.

Memoria individual: Dado que queremos analizar el nivel de retención individual y la magnitud de la respuesta es medida en el mismo aparato en animales de diferente peso, estandarizamos los datos con un Índice de Retención Individual (IRI) (Tomsic, 1996) El IRI esta definido como IRI=(a-b/a+b)*100, donde a es la respuesta media del grupo control y b es la respuesta individual. Los IRI son comparados en el ensayo de evaluación.

Análisis comportamental

Generalidades

La respuesta de escape (Maldonado, 1997) consiste en el movimiento del cangrejo tratando de dejar atrás a la sombra pasante. Dada la marcada concavidad del recipiente, estos movimientos quedas limitados al piso plano del mismo. Puntualizamos dos características importantes de esta respuesta: (1) comienza inmediatamente después de la entrada del estimulo al campo visual del animal, precedida por lo general de un pequeño salto y tiene prioridad sobre la actividad previa del animal, ya sea exploratoria o de reposo (Korn, 1996); (2) el escape es una respuesta direccional, es decir, el cangrejo tiende a correr en dirección opuesta al movimiento de la pantalla.

Antes de ser colocados en los actómetros, cada animal es sometido a una prueba de selección, el cangrejo es dado vuelta sobre su región dorsal, y solo se

lo utiliza en el experimento si este se incorpora rápidamente. El fundamente para esta selección es que los animales con reacción lenta suelen presentar baja reactividad ante una gran diversidad de estímulos, junto con otros síntomas de deterioro.

Actividad exploratoria

Tanto el entrenamiento como la evaluación, están precedidas por un periodo de adaptación de 10 minutos, dentro del cual se mide la actividad exploratoria espontánea de los animales en los actómetros. Esto permite tener un registro de la actividad de los animales previa al pasaje de la sombra, y de este modo detectar si algún individuo debe ser descartado por su baja reactividad. En ningún caso se utilizaron animales entrenados que tuvieran actividad exploratoria espontánea por debajo de la media del grupo al que correspondía.

Entrenamiento

En todos los casos se analizo y se verifico, para todos los animales entrenados, una caída paulatina de la respuesta en el caso de entrenamiento espaciado, y una caída abrupta de la respuesta para el entrenamiento continuo (memoria de corto termino). Esto nos permite tener un criterio homogéneo respecto de los animales en el momento de hacer la selección individual. Para el control pasivo se analizó la actividad exploratoria durante el entrenamiento para detectar animales hiperactivos o poco reactivos (comparado con la actividad exploratoria previa) para su posible descarte en la sesión de evaluación.

Evaluación

La sesión de evaluación es analizada con el IRI, sin embargo, el control pasivo es analizado exhaustivamente para descartar animales hiperactivos o poco reactivos (sumado al comportamiento en el entrenamiento) y así hacer

más representativa la media. Los animales entrenados son seleccionados solo si tuvieron el entrenamiento y la actividad exploratoria ya pautada.

Los animales naïve

Los animales naïve seleccionados para el análisis fueron aquellos que presentaban una reacción rápida en la prueba de selección.

Procedimiento de inyección

La marcación *in vivo* de las células en fase S del ciclo celular, se realiza con el marcador de proliferación no radioactivo 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU), una base nitrogenada análoga a la Timina. Inyectamos a los animales una concentración aproximada de 5 mgr. de BrdU por 100 gr. de peso corporal (Schmidt, 1999) en su máxima dilución acuosa en solución salina de cangrejo (5 mgr/ml).

La inyección se realiza a través del lado derecho de la membrana cefalotoraxica-abdominal, con una penetración controlada de la aguja según tamaño del animal (ver tabla), se asegura de esta forma que la solución sea liberada en el centro del saco pericardico. Debido a que los cangrejos no poseen barrera hematoencefálica (Abbot, 1970), se asume que de este modo, la droga llega mas fácilmente al sistema nervioso central.

El volumen inyectado es aproximadamente el 1 % del peso (considerando la densidad de una solución acuosa) de modo que esta se realiza durante un lapso de 5 minutos en todos los casos.

Animales	Peso promedio (gr)	Volumen inyectado (μl)
jóvenes	10 ± 0.4	100
Intermedios	16 ± 0.5	150
Viejos	20 ± 0.4	200

Inmunohistoquímica

Los animales son anestesiados por inmersión en agua salada con hielo durante 10 minutos, luego, los lóbulos ópticos son extraídos de los pedúnculos y los ganglios supraesofágicos son extraídos del cuerpo. A ambos órganos se les retira cuidadosamente la membrana encefálica.

Protocolo de marcación:

Día 1: Los órganos son Sometidos a una fijación doble: (1) Fijador Bodian # 2 (90 ml alcohol etilico 80 %, 5 ml de acido acetico glacial, 5 ml de formaldehido) durante 4-5 horas a 4° C. Luego se re-hidrata el tejido en una sucesión (10 minutos cada una) de soluciones de alcoholes estilicos (OH) de 70% OH, 50% OH y 0% OH en Buffer Fofato 10mM pH 7.4 (PBS). Este proceso se realiza a temperatura ambiente y en agitación. Luego se incuba a 4° C en Fijador Paraformaldehido 4 % durante toda la noche (14 a 20 horas)

Día 2: Terminada la fijación, el tejido se lava en PBS, se realiza una deshidratación progresiva de 10 minutos en cada solución (50% OH, 70% OH, 90% OH, 96% OH, 100% OH, Xilol) y una re-hidratación igual inversa) a temperatura ambiente y en agitación. Esta deshidratación y rehidratacion esta destinado a disolver las membranas plasmáticas y a la consecuente exposición del ADN a los anticuerpos.

El tejido es incubado toda la noche en solución de bloqueo (PBS, 1% detergente triton 100, 2% suero normal de cabra, 5% leche descremada Sbelty) en agitación a 4° C.

Día 3: Pasamos directamente el tejido al anticuerpo primario (PBS 1% detergente triton 100, 2% suero normal de cabra, 1:100 IgG2a anti-BrdU de raton) incubamos 72 horas en agitación a 4° C.

Día 6: Sobre el tejido realizamos 5 lavados de 20´ cada uno en PBS-1% triton e incubamos en anticuerpo secundario por 24 hs. a 4° C (PBS 1%

detergente triton 100, 2% suero normal de cabra, 1:1000 IgG de conejo Conjugado con Alexa 488 Anti-Fc de IgG de raton).

Día 7: Realizamos 5 lavados de 30´ cada uno en PBS-1% triton, en agitación y oscuridad a temperatura ambiente. El tejido queda PBS-1% triton toda la noche a 4°C en agitación.

Día 8: Para realizar el montado transciende de los tejidos, se realiza una deshidratación (50% OH, 70% OH, 90% OH, 96% OH, 100% OH) de 20´ en cada solución y se monta el preparado en Metilsalicilato, en portaobjetos de 5 x 2.5 cm. Cubietos con cubreobjetos de 2.5 x 2.5 cm.

Número de núcleos marcados: para determinar en numero de células que incorporaron BrdU, se adquirieron las imágenes en 1 Microscopio Confocal, laser de gas de Argon, un dicroico de 570 y filtro de emisión 510 nm pasa banda. El análisis de las imágenes se realiza en Fluoview directamente en la computadora adosada al equipo, que permite obtener información acerca de las distancias y magnitudes en tamaño e intensidad de la señal, datos relevantes en la identificación y caracterización de las células marcadas.

Análisis de los datos

Los resultados son analizados usando ANOVA general de dos factores para las cuatro categorías o el coeficiente de Fisher en el caso de comparaciones planeadas *a priori* entre grupos. Para realizar análisis de correlación, utilizamos el coeficiente de Pearson.

Resultados

Neurogénesis en *Chasmagnathus granulatus*

Logrando poner a punto el protocolo de Fijación e Inmunohistoquímica, encontramos proliferación celular en el cerebro de en *Chasmagnathus granulathus.* Evidenciamos células marcadas con BrdU en dos áreas claramente distinguibles, que se condicen con dos de las áreas en donde otros autores han descrito neurogénesis en crustáceos:

- En el Ganglio supraesofágico, mas específicamente el cluster lateral (Cluster L) asociado al lóbulo olfatorio (Cluster 10 según Sandeman 1992) En todos los casos encontramos que las células marcadas se encontraban en un área acotada que se ha dado a llamar Centro de Proliferación (CP) (Fig. 1) por otros autores.

- En del lóbulo óptico encontramos proliferación celular en el cluster asociado al cuerpo hemielipsoide (Cluster L) en la médula terminal del protocerebro lateral de *Chasmagnathus sp.* Este cluster también muestra claramente un CP donde encontramos los núcleos marcados (Fig. 2) Encontramos también proliferación celular en la lamina del LO del protocerebro de *Chasmagnathus sp.* (Fig. 3) Estos núcleos marcados son característicamente dispersos en la zona apical de la lamina y de un tamaño 2 veces menor al tamaño de los somas en los clusters ya nombrados, características ya descritas en crustáceos para células gliales, motivo por el cual, pensamos que se trata de nuevas células de este tipo.

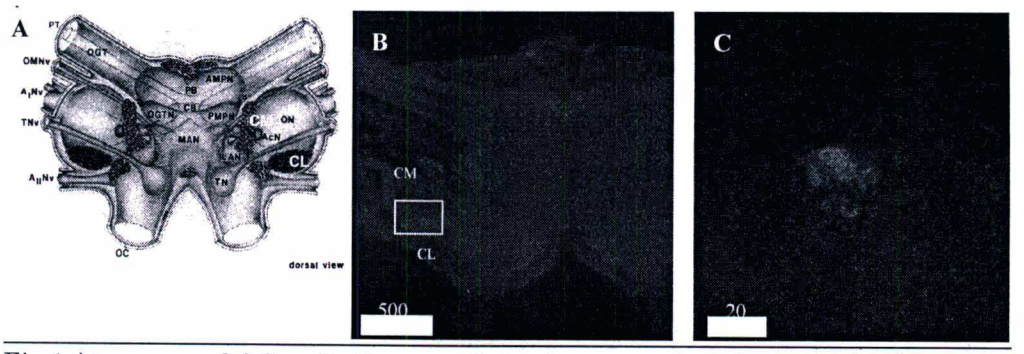

Fig 1 A: esquema del Ganglio Supraesofágico de un crustáceo decapado donde se destaca el Lóbulo Olfatorio (LO) y los clusters asociados cluster medial (CM) y cluster lateral (CL) B: Foto del ganglio en *Chasmagnathus sp* donde se destaca el centro de proliferación en el CL. C: ampliación del CL donde se observan los somas BrdU+. Escala en micrometros.

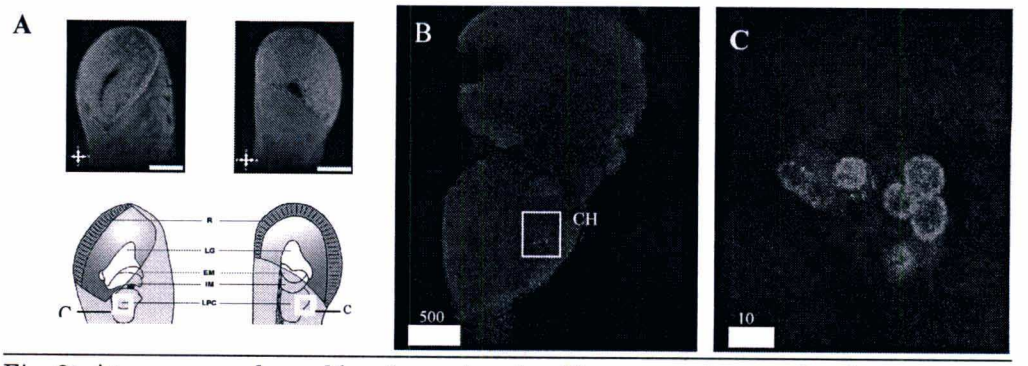

Fig 2: A: esquema de pedúnculo ocular de *Chasmagnathus sp* donde se destaca la posición del Cuerpo Hemielipsoide en la medula terminal. B: Foto del Lóbulo óptico de *Chasmagnathus sp* donde se observan los clusters que conforman la medula externa, medula interna y medula terminal. Se destaca el centro de proliferación en el cluster CH. C: ampliación del centro de proliferación del cluster CH donde se observan los somas BrdU+. Escala en micrometros.

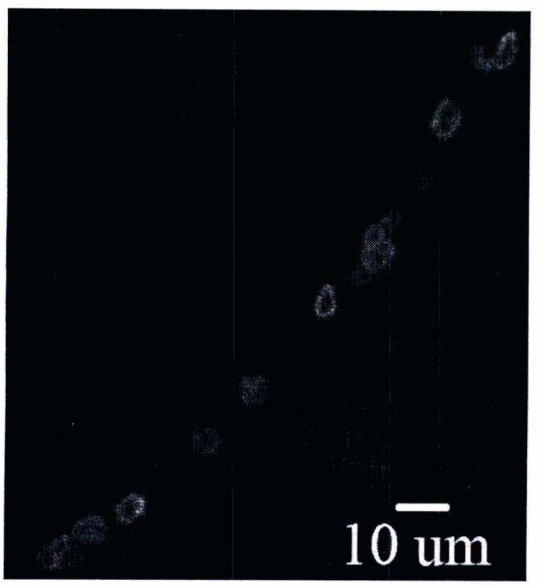

Fig 3: Somas BrdU+ en la lamina de *Chasmagnathus granulata*. A diferencia de los somas marcados en los clusters, estas son mas aplanadas y pequeñas, y tienen una dispocicon perpendicular a la organización columnar de la lamina y la medula externa e interna.

En todos los experimentos que se detallan a continuación se consideraron los siguientes criterios

- Se analizan por separado los clusters L y CH. En todos los casos se suman los valores de los clusters L izquierdo y derecho, y de los clusters CH izquierdo y derecho.
- Con el fin de confirmar que el método de marcación y/o immunodetección halla sido exitoso en cada animal, solo se consideraran aquellos que muestren núcleos de glía con marca en la lamina. Esta eliminación fue menor al 10 % de los sujetos.

Experimento 1: 2 factores

(Buenos aprendedores y malos aprendedores - jóvenes y viejos)

Con el objetivo de poner a prueba la hipótesis de la existencia de una correlación entre la capacidad mnésica y la edad de los animales y su tasa basal de neurogénesis, realizamos el experimento de dos factores para comparar cuatro grupos de animales entre si.

Diseño experimental

Utilizamos un entrenamiento espaciado fuerte (Día 1) para dos grupos de animales, jóvenes y viejos. El intervalo entre la sesión de entrenamiento y evaluación es de 48 hs. Elegimos evaluar la memoria con ese intervalo por que demuestra mayor diferencia en la retención entre edades (Tomsic 1996) Ambos grupos de animales son categorizados por su nivel de retención según su respuesta en la sesión de evaluación en animales aprendedores (con IRI mayor a 75 %) y animales no aprendedores (con IRI menor a 20 %)

Luego de la sesión de evaluación (Día 3) los animales son guardados nuevamente en los recipientes del día 2. Entre 3 y 5 horas después (tiempo de análisis de las respuestas comportamentales como IRI) los animales

Alejandro
Volcatas
Volcatia

seleccionados son inyectados con BrdU y guardados individualmente en el recinto de manutención.

Los animales seleccionados: 6 animales jóvenes, 3 de ellos con IRI mayor a 75 % (jóvenes aprendedores) y 3 con IRI menor a 20 % (jóvenes no aprendedores) y 6 animales viejos, 3 de ellos con IRI mayor a 75 % (viejos aprendedores) y 3 con IRI menor a 20 % (viejos no aprendedores)

La Hora de inyeccion fue entre las 15 y 18 hs. De 20 a 24 horas después, los animales son sacrificados y sometidos al tratamiento histológico.

Resultados

Veinte animales de cada edad fueron sometidos a entrenamiento fuerte y fueron evaluados 48 hs. después con su respectivo grupo control mediante el cálculo del IRI individual. Claramente se vio una diferencia en el nivel de retención entre los animales jóvenes y viejos comparando el promedio de los IRI individuales para cada edad (Fig. 4)

Realizando un gráfico de frecuencia de animales con IRI individual, podemos observar que los animales jóvenes tienen en promedio mejor retención que los animales viejos, sin embargo, dentro de las dos edades encontramos animales que aprenden y no, respectivamente (Fig 5)

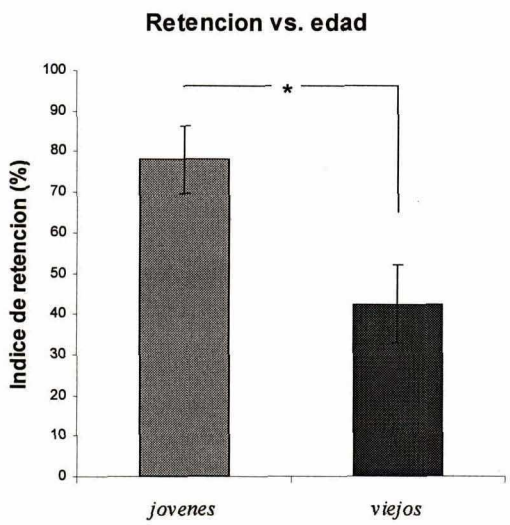

Fig 4: Índice de retención relativizado a partir del nivel de respuesta animales entrenados vs. animales no entrenados en el paradigma que genera MCS en *Chasmagnathus sp* para animales de edades diferentes. t-student: $p < 0.005$

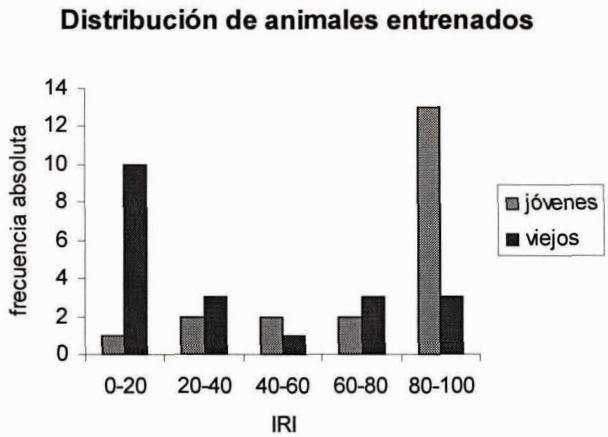

Fig 5: distribución de frecuencia de animales con los rangos de IRI especificados. Los animales jóvenes tienen mejor retención que los viejos

Seleccionamos animales jóvenes y viejos que tuvieran IRI buscados (aprendedores y no aprendedores), y observamos la tasa de neurogénesis que evidenciaban el día de la evaluación con un periodo de 24 hs. de exposición a la BrdU (Fig. 6) Dado que la desviación de los datos era demasiado alta, decidimos repetir el experimento. En este segundo experimento, la desviación fue aproximadamente igual al anterior.

En términos prácticos resulta imposible realizar un experimento con una muestra de mayor tamaño, por lo cual decidimos repetir el experimento a lo largo de un año y, si la desviación dentro de la media era aproximadamente la misma, sumar los datos. Los datos no muestran diferencias significativas entre épocas (Fig. 7) de modo que juntamos los datos de 6 experimentos en un único gráfico (Fig.8).

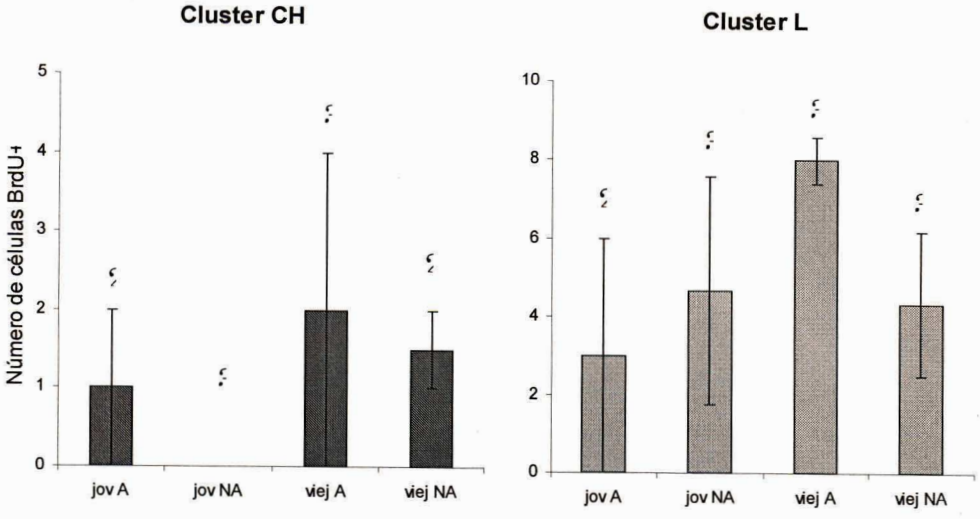

Fig 6:Número de células BrdU+ para las cuatro categorías de animales seleccionados. Se grafica la suma de los cluster der. e izq. para cada uno. Se especifica en cada barra el n de cada grupo.

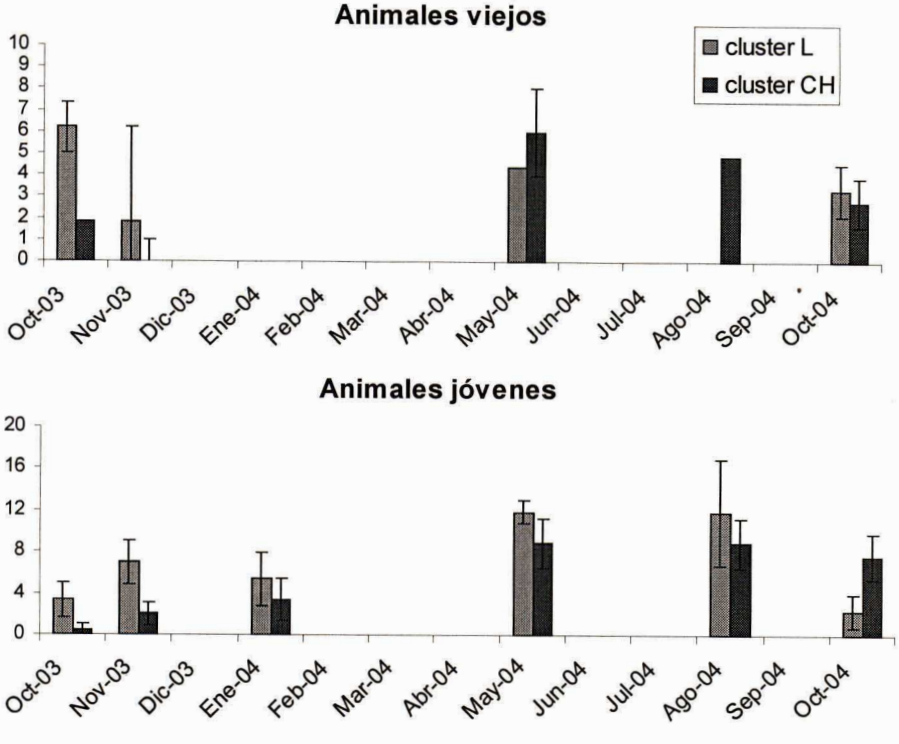

Fig 7: En las ordenadas el numero de células BrdU+. En absisas el mes y año del experimento.

La variación estándar dentro de los grupos experimentales no mostraban normalidad, de modo que normalizamos los datos según: $X' = \log_{10} X*100$ para que cumplieran los requisitos de la estadística paramétrica y así fueran analizables con ANOVA. En todos los gráficos las ordenadas corresponden a los valores reales. El número de células marcadas para cada grupo refleja la suma del número de células del lado izquierdo y el derecho para cada animal.

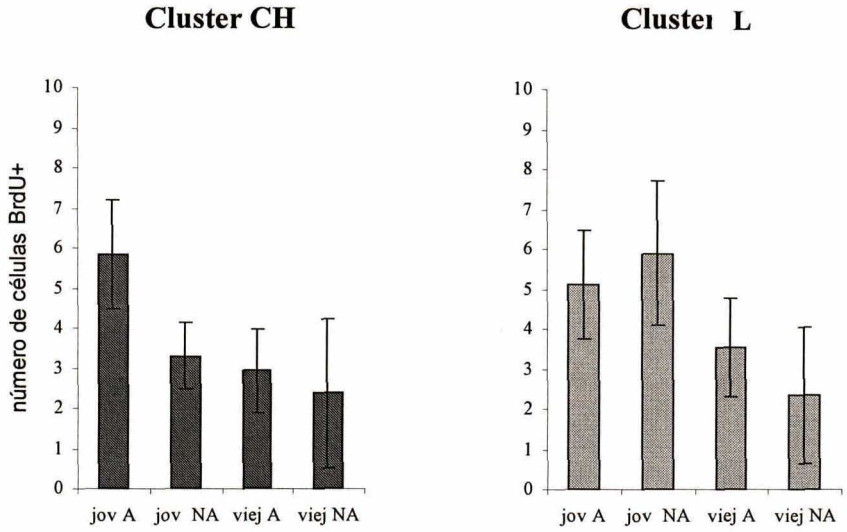

Fig 8: número de células BrdU+ como la suma del lado izquierdo y derecho en cada area. Se comparan entre si las cuatro categorías de animales: jóvenes aprendedores (jov A), jóvenes no aprendedores (jov NA), viejos aprendedores (viej A), viejos no aprendedores (viej NA) Ninguna de las comparaciones muestra una diferencia significativa. p>0.05.

Realizamos la comparación entre los cuatro grupos para uno y otro cluster (L y CH). En el cluster L, animales jóvenes aprendedores (n:16), jóvenes no aprendedores (n:18) y animales viejos aprendedores (n:12) y viejos no aprendedores (n:10) En el cluster CH, animales jóvenes aprendedores (n:17), jóvenes no aprendedores (n:14), y animales viejos aprendedores (n:15), y viejos no aprendedores (n:9) (MANOVA general cluster 10 p: 0.96; cluster CH p: 0.65) No encontramos diferencias significativas en ninguna de las comparaciones particulares.

También realizamos la correlación entre el IRI y el número de células marcadas en ambas áreas (Fig.9) para poder analizar los datos en más detalles. Si bien se observa a simple vista una tendencia, esta no es significativa. Este

análisis nos demostró que en el total de los datos, aproximadamente el 40% de los animales no tienen células marcadas en los clusters neuronales (Fig 10).

A raíz de estos resultados, decidimos realizar nuevamente las comparaciones descartando los animales con total ausencia de marca en estos clusters, pero que tuvieran evidencia de proliferación celular en la lamina: Realizamos nuevamente la comparación entre los cuatro grupos para el cluster L -Animales jóvenes aprendedores (jovA n:13) y jóvenes no aprendedores (jovNA n:8) y animales viejos aprendedores (viejA n: 9) y viejos no aprendedores (viejNA n:8) y el cluster CH -Animales jóvenes aprendedores (jovA n:12) y jóvenes no aprendedores (jovNA n:5) y animales viejos aprendedores (viejA n: 7) y viejos no aprendedores (viejNA n:7) para las dos áreas (MANOVA general cluster L p: 0.51; cluster CH p: 0.14) (Fig. 12)

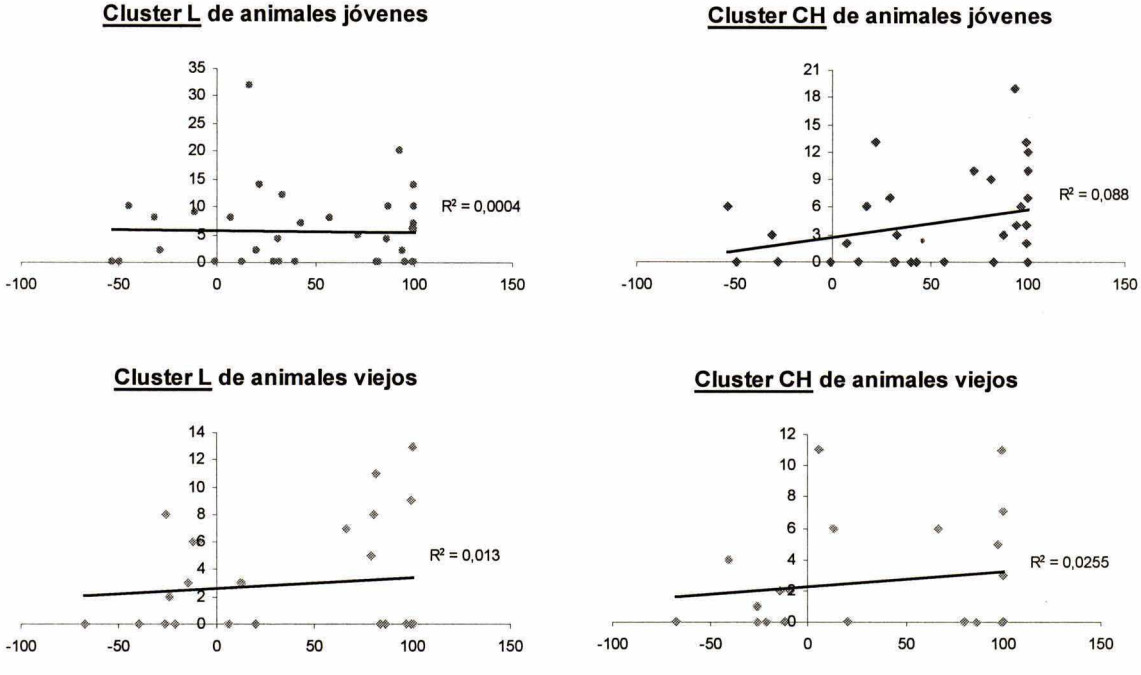

Fig 9: Correlaciones entre el índice de retención (IRI) en ábsidas y el número de células BrdU+ en ordenadas. Se muestra individualmente la suma del número de células de derecha e izquierda para cada cluster, en cada grupo de animales por edad. En ninguno de los casos la correlación medida con el coeficiente de Pearson dio significativa. p> 0.05.

En el caso del cluster CH los animales jóvenes con mayor capacidad mnésica tienen una mayor tasa de neurogénesis, pero esta diferencia no es significativa respecto a jóvenes no aprendedores (p: 0.096) ni a viejos aprendedores (p: 0.09). En el cluster L no encontramos diferencias entre grupos. Sin embargo es de destacar que pareciera que los animales jóvenes tuvieran mayor número de células que los viejos (p: 0,17), y no hubiera una influencia de la capacidad mnésica en el número de células para este área.

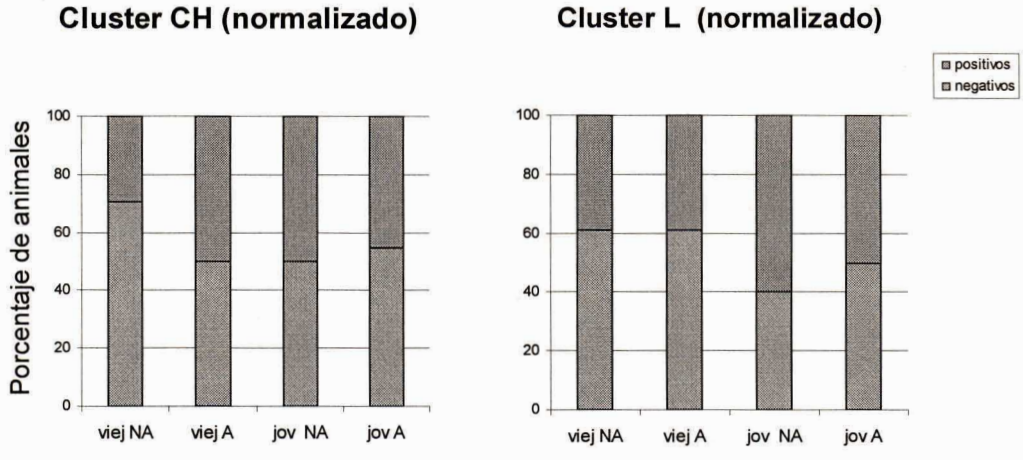

Fig 10: Porcentaje de animales con al menos 1 célula marcada en uno de los lados de cada cluster respectivamente.

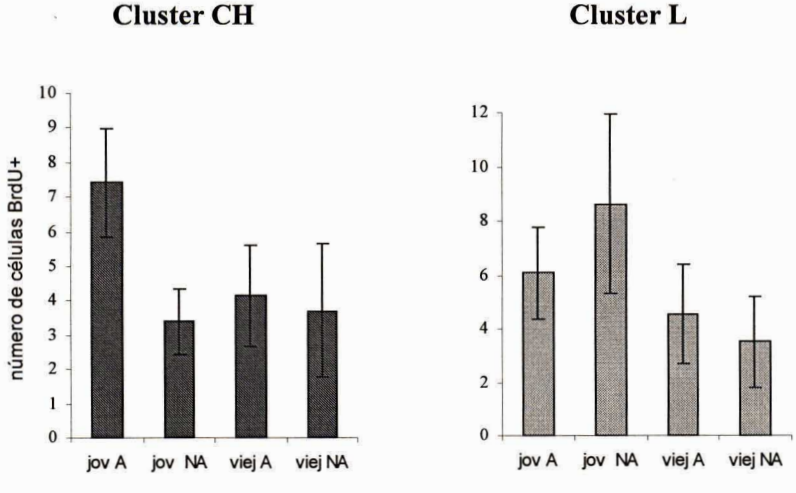

Fig 11: número de células BrdU+ como la suma del lado izquierdo y derecho en cada área. Se comparan entre si las cuatro categorías de animales: jóvenes aprendedores (jov A), jóvenes no aprendedores (jov NA), viejos aprendedores (viej A), viejos no aprendedores (viej NA) Ninguna de las comparaciones muestra una diferencia significativa. p>0.05.

Experimento 2: Stress causado en el laboratorio

Observamos que existía una marcada diferencia en el número de células marcadas que obtuvimos, respecto a otros autores que observaban neurogénesis con la misma técnica (Sandeman 1992, Schmidt 1997[a], 1998, 1999, Schmidt y Harzsch, 1999, Schmidt 2001, Harszch 2001, Beltz 2003, Hansen 2004) En muchos de estos trabajos, el número de células marcadas es de un orden por encima de nuestros datos.

Decidimos evaluar un posible efecto del stress causado por la manutención de los animales en el laboratorio y ver si este efecto disminuía la tasa de neurogénesis en los animales.

Diseño experimental

Animales inyectados a campo: 4 animales jóvenes y 4 animales viejos fueron inyectados en el momento de la captura, entre las 10 y 11 de la mañana, se *mantuvieron* en su ambiente natural con un corral improvisado hasta el momento del empaque. Una vez llegados al laboratorio fueron mantenidos por 2 días en condiciones clásicas excepto la densidad que fue *de 4 animales por recipiente*. A 96 hs. de la inyección los animales fueron sacrificados y sometidos al tratamiento histológico.

Animales inyectados con 8 días de permanencia en el laboratorio: 4 animales jóvenes y 4 animales viejos fueron mantenidos en el laboratorio en condiciones clásicas excepto la densidad que fue *de 4 animales por recipiente* durante 8 días. Al noveno día los animales fueron inyectados con BrdU entre las 10 y 11 de la mañana. 96 hs después los animales fueron sacrificados y sometidos al tratamiento histológico.

Resultados

Los animales recibieron una única inyección como el resto de los experimentos, pero por cuestiones metodológicas no previstas, estuvieron expuestos a la BrdU durante 96 Hs, a diferencia de los experimentos iniciales, en los cuales la exposición a la droga fue de 24 Hs.

Encontramos que el número de células marcadas fue de un orden por arriba y que además no había diferencias provocadas por el posible *stress* del mantenimiento para el cluster L en animales jóvenes (F: 4.14, p>0.05) ni en animales viejos (F: 1.11, p>0.05) y para el cluster CH en animales jóvenes (F: 0.1855, p>0.05) ni en animales viejos (F: 0.22, p>0.05). Los resultados muestran una diferencia significativa en el número de células entre animales jóvenes y viejos en el cluster 10 (Fig. 12) tanto para animales inyectados a campo (F: 4.694, p<0.05) como para animales mantenidos en el laboratorio (F: 6.678, p<0.05). En cambio, no encontramos diferencias en el número de células marcadas en el cluster CH: animales inyectados a campo (F: 0.52, p>0.05) ni animales mantenidos en el laboratorio (F: 0.1, p>0.05)

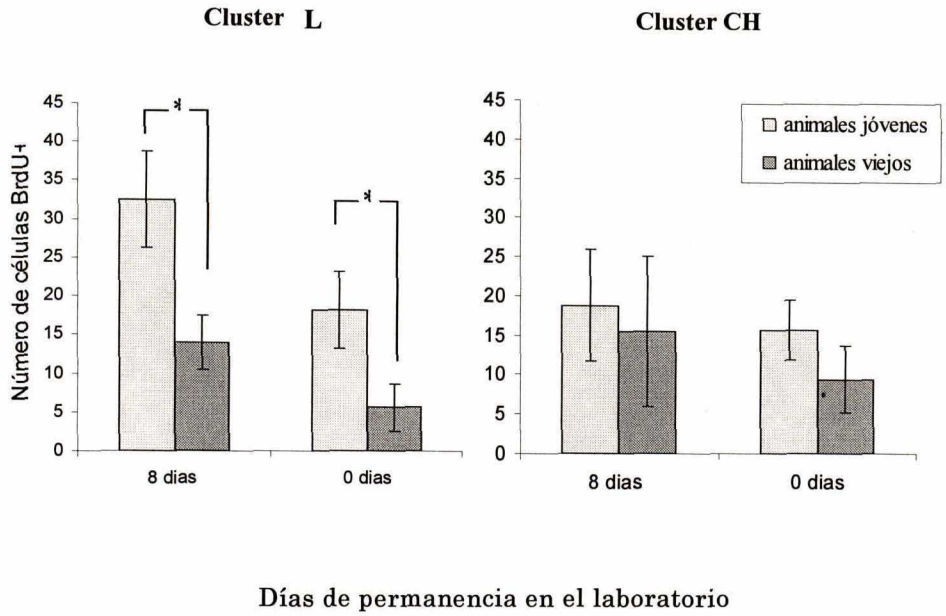

Fig 12: Número de células BrdU+ como la suma del lado izquierdo y derecho en cada área. Las areas se analizan por separado. Se comparan animales con 8 días de permanencia en el laboratorio (8 días) y animales inyectados a campo (0 días) y a su vez, de dos edades diferentes. * p< 0.05.

Experimento 3: 2 factores con 96 hs de exposición a la BrdU

Luego de haber encontrado que con 96 Hs. de exposición a la BrdU se puede observar en los animales 10 veces mas células marcadas, decidimos realizar nuevamente el experimento comportamental y evidenciar las diferencias. Contamos con la posibilidad de que el gran porcentaje de ceros de debiera al tiempo de exposición a la droga o al aislamiento de los animales. Decidimos agregar un control para verificar que efecto de la exposición de los animales a un aprendizaje asociativo no fuera la causa de la disminución de la tasa de neurogénesis como proponen algunos autores (Pham 2005) Por que mas allá de que se pueda observar o no una respuesta reducida como evidencia del aprendizaje (retencion y no retencion), los animales son expuestos a este.

Diseño experimental

Realizamos el mismo protocolo del experimento de 2 factores con 4 modificaciones:

(1) Con el fin de corroborar el efecto de la exposición de los animales a un aprendizaje asociativo, seleccionamos

Animales aprendedores (N=5).

Animales no aprendedores (N=5).

Animales con un entrenamiento continuo que no genera memoria a largo termino (N=7).

(2) Los animales fueron sacrificados 96 hs. después de la inyección.

(3) Los animales, luego de la inyección, fueron identificados individualmente con una marca y mantenidos en grupo (5 ó 7 animales por recipiente dependiendo del grupo)

(4) Los animales utilizados son intermedios

Resultados

Entrenamos animales de tamaño intermedio con un protocolo de 15 ensayos, Luego de la sesión de evaluación, los animales fueron inyectados y puestos en grupo en los recipientes y recintos de manutención. En este caso obtuvimos que, de los 17 animales solo 5 mostraban proliferación celular en al menos un

cluster de los cuatro totales, y solo 2 animales mostraban células marcadas en todos ellos (no se muestra)

Experimento 4: 2 factores con 96 hs. de BrdU y 5 grupos

Dado el desalentador resultado que obtuvimos, decidimos realizar nuevamente el experimento y esta vez evaluar la posibilidad de que el entrenamiento *per se* o solamente la exposición de los animales a un contexto diferente fuera el causante de esta marcada disminución en el número de células marcadas.

Diseño experimental

Mismo protocolo que el experimento 3 pero en este caso los animales seleccionados para el tratamiento histológico fueron:

Animales aprendedores (N=6).

Animales no aprendedores (N=6).

Animales con un entrenamiento continuo (N=6).

Animales control pasivo (N=6).

Animales naïve (N=6).

Luego de la inyección los animales fueron marcados individualmente mantenidos por 96 hs en grupos de 10 animales por recipiente.

El sacrificio y extracción de los ganglios se realizo en tres sesiones sucesivas separados por 2 hs. aproximadamente y los grupos de animales se conformaron azarosamente. El motivo de este cambio fue por la imposibilidad metodológica de hacerlo en simultáneo, dado que cada extracción completa (lóbulos ópticos y ganglio supraesofágico) consume entre 10 y 15 minutos, y el tiempo de la primera fijación que comienza con la extracción no supera las 5 horas.

Resultados

Nuevamente el 50 % de los animales no tenian células BrdU+ en ninguno de los clusters neuronales (Fig. 13) siempre considerando aquellos animales que si tenían proliferación en la lamina. Los resultados no mostraron diferencias

entre grupos (Fig 14). Dado que el n de cada grupo era, el hecho de que el 50 % fueran datos no manejables, fue motivo para que no pudiéramos analizar los datos estadísticamente.

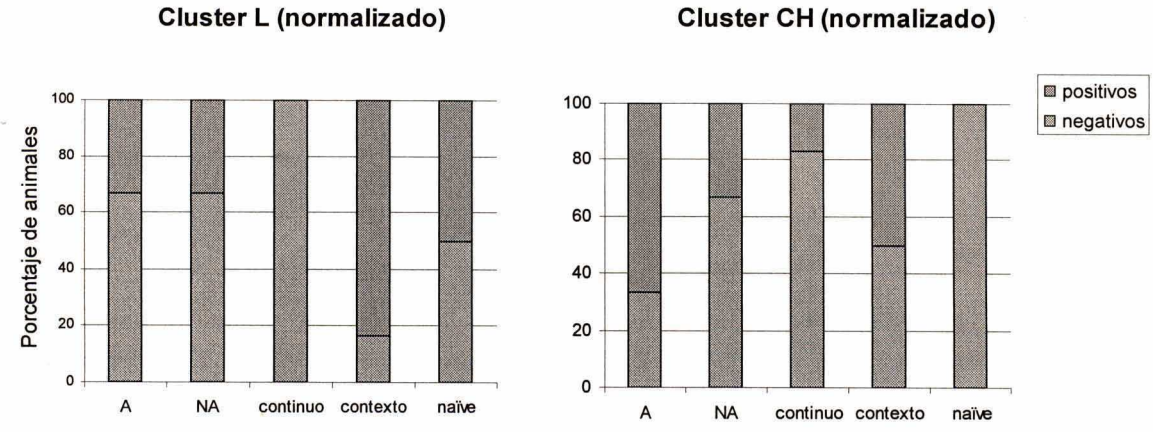

Fig 13: positivos: animales con al menos 1 célula marcada en uno de los lados de cada cluster respectivamente. A: animales aprendedores, NA: animales no aprendedores, continuo: protocolo de entrenamiento que no genera memoria asociativa, contexto: animales expuestos al contexto sin estimulación, naïve: animales que no salieron de su recinto de manutención.

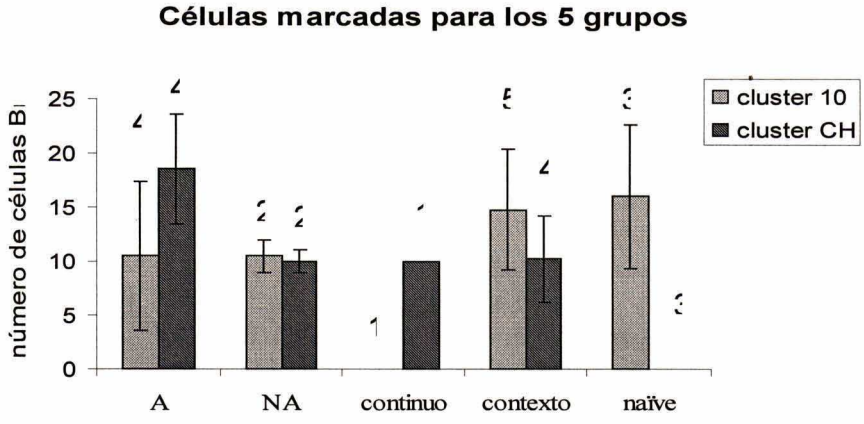

Fig 14: número de células BrdU+ como la suma del lado izquierdo y derecho en cada área. Se comparan entre si las cinco categorías de animales: A: animales aprendedores, NA: animales no aprendedores, continuo: protocolo de entrenamiento que no genera memoria asociativa, contexto: animales expuestos al contexto sin estimulación, naïve: animales que no salieron de su recinto de manutención. Se muestran los n arriba de cada barra. La muestra no fue suficiente para realizar comparaciones estadisticas.

Discusión

En la presente tesis logramos demostrar por primera vez proliferación celular en el cerebro adulto del cangrejo *Chasmagnathus granulata, en* particular hemos encontrado neurogénesis en los cluster L y CH y proliferación de células tipo glia. Mediante la técnica de marcación in vivo con BrdU, se ha encontrado proliferación neuronal en el cluster L en numerosas especies de crustáceos decapodos, sin embargo, solo en algunas se ha visto neurogénesis en el cluster CH y solo *Panulirus argus* ha evidenciado robusta proliferación en el cluster asociado al lóbulo accesorio (cluster 9/11, según Sandeman 1992) (Schmidt 2001, Schmidt & Harzsch 1999). En *Chasmagnathus granulata* los núcleos BrdU+, evidencian las características típicas de células neuronales; son esféricos o levemente elipsoides, similares a las células maduras circundantes y en contraste con las células de la glia que muestran una morfología significativamente más pequeña y aplanada (Schmidt 2001). Estas presuntas neuronas muestran una localización empaquetada (centro de proliferación) adyacente al neuropilo dentro del cluster que las contiene, característica que se ha documentado en el resto de los crustáceos que han demostrado signos de neurogénesis en el individuo adulto.

Si bien no tenemos evidencias acerca de identidad neuronal de estas células, los resultados obtenidos se condicen estrictamente con los datos hasta hoy descritos para neurogénesis en crustáceos. En experimentos de marcación y supervivencia de estas células a tiempo de mas de tres meses, se ha visto que estas células van migrando desde el centro de proliferación hacia la periferia del cluster (Schmidt 1997[a], Hazsch et al 1999), solo en el cluster adyacente al lóbulo accesorio de *Panulirus argus* se ha logrado detectar escasamente doble marcación con BrdU y LTK (Leucotakikinina- marcador neuronal inespecífico de artrópodos) (Schmidt 2001) debido a que es muy difícil encontrar anticuerpos con alta afinidad para proteínas de crustáceos. Quedan pendiente entonces experimentos a tiempos largos de la supervivencia y doble marcación con marcadores neuronales tales como el utilizado por Schmidt (Schmidt 2001)

para verificar que las neuronas nuevas en *Chasmagnathus sp* sobreviven y se posicionan en el cluster.

Hemos logrado verificar los resultados anteriormente publicados (Tomsic et al 1996) que demuestran que existe un déficit en la capacidad mnésica en el cangrejo Chasmagnathus con el envejecimiento. También hemos analizado en detalle este resultado, llegando a la conclusión de que si bien se puede afirmar que animales viejos tienen menor retención poblacional evaluada como MCS, existen animales viejos con igual o incluso mejor retención que la media de sus congéneres de menor edad., y lo mismo sucede en animales jóvenes.

Los resultados de la presente no confirman la hipótesis de una correlación entre la capacidad mnésica de los animales y su tasa basal de neurogénesis. Un análisis de potencia calcula el n necesario en una muestra, para que la desviación sea lo suficientemente pequeña y que las diferencias sean significativas. Nuestro cálculo ha arrojado que seria necesario tetraplicar el n para evidenciar las diferencias. Este tipo de análisis considera que la media no varia, evento que no podemos asegurar, de modo que solo es un estimativo de la variación con la que estamos trabajando. La incógnita que surge a raíz de estos resultados es por que existe una variabilidad tan grande entre animales.

En el cangrejo *Chasmagnathus sp* encontramos desde el principio que con el mismo protocolo de marcación *in vivo*, (es decir, el mismo tiempo de supervivencia y la misma concentración de BrdU) el número de células marcadas a 20 hs de la inyección era aproximadamente la mitad que el encontrado en otros crustáceos donde se trabajo entre 14 y 20 horas de supervivencia (Hansen 2004, Schmidt & Harzsch 1999). El numero de células marcadas con BrdU en los clusters neuronales difiere significativamente entre especies yendo desde menos de 15 en *Sicyonia brevirostris*, hasta mas de 80 en *Panulirus aarhus* utilizando siempre el mismo protocolo (Schmidt & Harzsch 1999). Siendo el número de células que obtuvimos tan bajo (menor a diez) y la desviación tan grande resultaba imposible evidenciar ninguna diferencia.

Los trabajos que se han publicado respecto a edad y neurogénesis que demuestran que esta última disminuye con el envejecimiento, han sido llevados

a cabo con ratas de laboratorio (Kuhn et al 1996), donde se puede determinar con certeza la edad de los individuos. Si bien sabemos que los cangrejos "viejos" son mas viejos que los "jóvenes" no podemos determinar con precisión de la edad. De hecho el tamaño efectivo de estos animales no refleja estrictamente la edad, sino la cantidad de mudas que ha sufrido a lo largo de la vida. Si la tasa de neurogénesis es muy sensible a la edad, esta inexactitud podría estar aumentando la variabilidad entre animales.

Otro factor que no controlamos y podría estar aumentando la variabilidad de los datos es que trabajamos con animales de poblaciones naturales. Si bien la mayoría de los crustáceos con los que se trabaja son capturados de su medio ambiente natural, nunca se ha hecho medición de neurogénesis asociada a *edad* o a *capacidad mnésica.* Se ha visto que tanto la neurogénesis como la capacidad mnésica son sensibles a la calidad del medio ambiente en mamíferos (Kempermann et al 1997, Lu et al 2003) Nosotros desconocemos los parámetros que determinan la calidad del medio ambiente en que viven los animales. Sabemos que muchos crustáceos son territoriales y establecen rangos sociales (Yeh et al 1996) que podrían limitar los recursos disponibles en épocas determinantes como la reproductiva o ante escasez de recurso. En este trabajo, no pudimos discernir si existen diferencias en la tasa de neurogénesis en distintas épocas del año debido al tamaño de la muestra por grupo, pero sabemos que en otros crustáceos se ha visto un efecto de ésta sobre la tasa de neurogénesis (Hansen et al 2004).

Nuestro objetivo fue buscar una correlación entre capacidad mnésica "natural" y tasa "basal" de neurogénesis. Existen muchos factores que desconocemos y que modifican la capacidad mnésica dentro de la población, seguramente estos y muchos otros modulen también la neurogénesis, pero de distintas maneras, no sabemos cuanto y de que manera la neurogénesis es modificada por el estado intrínseco de los animales. En nuestro laboratorio se ha visto que el estado de dominancia tiene un poder predictivo sobre la capacidad mnésica (pedetta & katszer comunicación personal) Quizás factores como este no estén influyendo en la neurogénesis, pero sesguen los datos comportamentales, y probablemente existan otros factores que modulen la

neurogénesis y no se evidencien en la retención de los animales en la evaluación de la MCS. De este modo resultaría improbable encontrar una correlación, mas allá de que exista, si no se tiene control sobre las variables involucradas.

En el total de los animales analizados para los primeros 6 experimentos, el 40% de los animales no tienen células marcadas en los clusters neuronales. Este porcentaje de animales mostraron signos de proliferación glial en el SNC, de modo que la disponibilidad de BrdU no fue el limitante. Considerando entonces que el protocolo de inmunohistoquímica no fallo, los animales no tenían neuroblastos en fase S de mitosis en el momento de la administración de la droga. Se ha documentado que el *stress* disminuye la tasa de neurogénesis. El hecho de la captura y la inmediata exposición de los animales a la novedad (entrenamiento y evaluación) podría haber sido el causante de este resultado.

Nuestros resultados demuestran que no existe un efecto de cautiverio sobre la tasa de neurogénesis, el aumento absoluto del numero de células marcadas a 96 horas se debe a divisiones sucesivas de los neuroblastos marcados en el momento de la administración, debido a que la BrdU esta disponible para ser incorporada al DNA en duplicación solo de 1 a 2 horas post inyección (Prickaerts et al 2003) Habiendo descubierto que con 96 hs. de supervivencia, obteníamos un aumento de un orden en el número de células marcadas decidimos averiguar si con este aumento las diferencias encontradas en los experimentos previos se iban a evidenciar. Los resultados arrojaron nuevamente un 40 % de animales con ausencia de proliferación neuronal, motivo por el cual el n se redujo mucho, y considerando que la variabilidad no disminuyo, las diferencias no fueron estadísticamente analizables.

Una posibilidad planteada ya por Drapeau (Drapeau et al 2003) es que el aprendizaje *per se* fuera un modulador negativo de la proliferación neuronal. Proponen que el aprendizaje promueve el reclutamiento de las neuronas ya divididas, dando prioridad a la supervivencia de estas e impidiendo temporariamente el agregado de nuevas por mitosis. Sin embargo, en animales sometidos a entrenamiento masivo, que no provoca MCS el porcentaje de animales sin marca era el mismo. Ni siquiera la exposición de los animales a

un contexto novedoso (control pasivo) fue el causante de la ausencia de marca dado que animales naïve que no salieron del recinto de manutención, también demostraron este porcentaje de ceros.

Analizando en detalle todos los experimentos surge una diferencia no trivial entre el experimento de stress y los experimentos comportamentales. El experimento de stress fue el único en el cual no obtuvimos ceros y el n fue suficiente para analizar los datos. En todos los experimentos comportamentales, dos días después de su arribo, los animales son entrenados (dia 3), evaluados e inyectados con la droga (dia 5). Los animales del experimento de stress, bien fueron inyectados en su medio natural y mantenidos en relativa tranquilidad por al menos 4 horas, o fueron mantenidos por 8 días en el laboratorio sin recibir estimulación novedosa. Lo que planteamos como posible factor que desencadeno "la inactivación" de la proliferación celular en el día de la inyección, es el tiempo que necesitan permanecer los animales sin recibir estimulación novedosa antes de ser inyectados, para evidenciar efectivamente su tasa basal de neurogénesis. Los animales naïve del experimento de cinco grupos también mostraron un alto porcentaje de ceros, y la única diferencia con los animales de 8 días de permanecía en el laboratorio, fue el numero de días sin estimulación novedosa. De hecho, si bien las diferencias no son significativas, los animales mantenidos en el laboratorio tienen mayor número de células BrdU+ que los animales inyectados en su medio ambiente. No resulta ilógico pensar que los animales en su ambiente natural tengan mayor estimulación novedosa que los mantenidos en cautiverio.

De todos modos se trata de una simple especulación, por que los experimentos no son comparables, en ninguno de los casos.

Los trabajos publicados acerca de memoria asociada a neurogénesis en mamíferos no coinciden en los resultados obtenidos, y se propone que la diferencia entre estos podría estar dada por infinitos factores desde el diseño del paradigma comportamental o la metodología de detección de neurogénesis hasta las condiciones de manutención de los animales, incluso la cepa de roedores utilizada (Shinder & Gage 2004, Drapeau et al 2003, Ambrogini et al

2004). Hay que distinguir entre los posibles efectos del aprendizaje sobre la proliferación neural y la supervivencia de estas células nuevas, algunos trabajos apoyan la idea de que el aprendizaje *per se* no tiene efectos sobre la proliferación pero puede estar incrementando la supervivencia de las células nuevas que aun no están conectadas al circuito (Shors 2004) y no es impensable esta posibilidad, dado que las células nuevas tardan aproximadamente una semana en adquirir propiedades electrofisiológicas y morfológicas de neuronas (van Praag et al 2002) En los trabajos de modulación de la neurogénesis, se ha demostrado que la supervivencia de las neuronas nuevas depende del aprendizaje (Cuppini et al 2003, Shors 2001, Pham et al 2005).

.El único resultado analizable resulta ser entonces el del experimento de *stress*, donde observamos que existe una diferencia significativa en el número de células nuevas en el cluster L entre animales de diferente edad. Podemos concluir entonces que la tasa de neurogénesis en el cluster asociado al Lóbulo Olfatorio disminuye con la edad, pero no ocurre lo mismo en el cluster CH. Quizás no sea la edad el factor relevante en la neurogénesis del Cuerpo Hemielipsoide, y sean otros, como por ejemplo la capacidad plástica en el procesamiento de información, que se refleja en la capacidad mnésica Como se ha mencionado en la introducción, el Cuerpo Hemielipsoide ha sido propuesto como la estructura análoga a los *mushroom bodies* en insectos. Esta estructura esta altamente comprometida en procesos cognitivos, pero los datos acerca de la participación de la neurogénesis en estos procesos es un tema en debate. De hecho, la mayor aproximación que se ha hecho respecto a memoria y neurogénesis en artrópodos fue un trabajo en grillos donde impiden la neurogénesis por irradiación en el cerebro completo, y observan una disminución en la retención respecto a un comportamiento asociado (Scotto-Lamassese, 2003). Existen numerosas especies de insectos con comportamientos complejos a las cuales no se les ha descrito neurogénesis en los *mushroom bodies* (Cayre et al 2002) motivo que imposibilita mas aun especular acerca del rol del agregado de neuronas nuevas al este centro de integración.

Nunca se ha hecho neurogénesis y memoria en crustáceos. Este resultado es la primera evidencia de neurogénesis asociada a capacidad mnésica para esta taxa. Queda pendiente entonces analizar si efectivamente el tiempo entre la evaluación comportamental y la administración de la droga es determinante en la proliferación neuronal y si respetando estos tiempos se puede determinar la verdadera tasa basal de neurogénesis en las distintas áreas.

A. Delorenzi

Abbott J (1970). Absence of blood-brain barrier in a crustacean, *Carcinus Maenas*. Nature, 17: 291-293

Altman J (1962) Are new neurons formed in the brain of adults mammals? Science 135: 1127-1128

Ambrogini P, Orsini L, Mancini C, Ferri P, Ciaroni S & Cuppini R (2004) Learning may reduce neurogenesis in the adult rat dentate gyrus. Neuroscience Letters 359: 13-16

Beltz B & Sandeman D (2003) Regulation of life-long neurogenesis in the decapods crustacean brain. Arthropod Structure & Development. 32: 39-60

Berón de Astrada (2005) Caracterización de interneuronas visuales y su relación con el aprendizaje en el cangrejo Chasmagnathus granulatus. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Berón de Astrada M & Maldonado H. (1999) Two related forms of long-term habituation in the crab *Chasmagnathus* are differentially affected by scopolamine, Pharmacology, Biochemestry and Behavior, 63: 109-118

Bieber M & Fuldner D (1979) Brain groung during the adult stage of a *Holometabolous* insect. Naturwisse. 66: 426-437

Brooks PJ (2002) DNA repair in neural cells: basic science and clinical implications. Mutation research 509: 93-108

Brunner D & Maldonado H (1988) Habituation in the crab *Chasmagnathus granulatus*. J. Comp. Physiol, 152: 687-694.

Cameron HA, Woolley CS, McEwen BS & Gould E (1993) Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. Neuroscience 56: 337-344

Cayre M, Malaterre J, Charpin P, Strambi C & Stranbi A (2000) Fate of neuroblast progeny during postembrionic development of the mushroom bobies in the house cricket *Acheta domesticus*. J. Insect. Physiol. 46:313-319

Cayre M., Malaterre J, Scotto-Lomassese S, Strambi C & Strambi A. (2002) The common proprieties of neurogénesis in the adult brain: from invertebrates to vertebrates. Comparative Biochemistry and Physiology Part B 132: 1-15

Cayre M, Strambi C, Charpin P, Augier R & Strambi A (2003) Specific requirement of putrescine for the mitogenic action of juvenile hormone on adult insect neuroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. 94: 8238-8242

Cayre M, Malaterre J, Scotto-Lomassese S, Holstein GR, Martinelli GP, Forni C, Nicolas S, Aouane A, Strambi C & Strambi A. (2005) A role for nitric oxide in sensory-induced neurogenesis in an adult insect brain. Eur J Neurosci 21(11):2893-2902.

Chao H, Spencer R, Frankfurt M & McEwen B (1994) The effects of aging and hormonal manipulation on amyloid precursor protein APP695 mRNA expression in the rat hippocampus. Journal Of Neuroendocrinology. 6(5): 517-521

Davis RI. (1993) Mushroom bodies and *Drosophila* learning. Neuron 11: 1-14

de la Rosa E & de Pablo (2000) Cell death in early neural development: beyond the neurotrophy theory TINS 23(10): 454-458

Delorenzi, A., Pedreira, M. E., Romano, A., García, S. I., Pirola, C. J., Nahmod, V. E., Maldonado, H. (1996) Angiotensin II enhances long-term memory in the crab *Chasmagnathus*. Brain Res. Bull. 41: 211-220

Delorenzi A, Dimant B, Frenkel L, Nahmod V, Nässel D & Maldonado H . (2000) High enviromental salinity induces memory enhancement and increases brain angiotensin-like peptides in the crab *Chasmagnathus*. Journal of Experimental Biology, 203: 3369-3379

Doetch F, Caille I, Lim D, Garcia-Verdugo J & Alvarez-Buylla A (1999) Subventricular zone astrocytes are neural ítem cells in the adult mammalian brain. Cell 97: 703-716

Doetsch F (2003) The glial identity of neural stem cells. Nature Neurosciences 6:(11) 1127-1134

Doetsch F& Hen R (2005) Young and excitable: the function of new neurons in the adult mammalian brain. Current Opinion in Neurobiology. 15: 121-128

Drapeau E, et.al. (2003) Spatial memories performances of aged rats in the water maze predict levels of hipocampal neurogenesis. Prod. Nat. Acad. Sci. USA 100: 14385-14390

Eichenbaum H (1997) Declarative memory: insights from cognitive neurobiology. Annu. Rev. Psycol. 48: 547-572

Frankfurt M (1994) Gonadal steroids and neuronal plasticity. Studies in the adult rat hypothalamus. Ann. NY Acad. Sci. 743: 45-59

Freudenthal R., Locatelli F., Hermitte G., Maldonado, H., Delorenzi A. & Romano, A. (1998) Kappa-B like DNA binding activity is enhanced after spaced training that induces long-term memory in the crab *Chasmagnathus*. Neuroscience Letters, 242: 143-146

Freudenthal, R., Romano, A. (2000) Participation of the NF-κB transcription factors in long term memory in the crab *Chasmagnathus*. Brain Res. 885: 274-281

Gage F (2000) Mammalian neural stem cells. Science 287: 1433-1438

Goergen EM, Bagay LA, Rehm K, Benton JL, Beltz BS.(2002)Circadian control of neurogenesis J Neurobiol. 53(1):90-5.

Hansen A y Schmidt M (2004) Influence of season and environment on adult neurogenesis in the central olfactory pathway of the shore crab, *Carcinus maenas*. Brain Research 1025: 85-97

Harzsch S. (2001) From stem cell to Structure: Neurogénesis in the CNS of Decapod Crustaceans. The Crustacean Nervous System, Konrad Wiese, Springer.

Harzsch S, Miller J, Benson J, Beltz B (1999) From embryo to adult: persistent neurogénesis and apoptotic cell death shape the lobster deutocerebrum. Journal Neurociences 19: 3472-3485

Hermitte, G., Pedreira, M.E., Tomsic, D., Maldonado, H. (1999) Context shift and protein synthesis inhibition disrupt long term habituation after spaced, but not massed, training in the crab *Chasmagnathus*, Neurobiology of Learning and Memory, 71: 34-49

Hitchcock P, Lindsey Myhr KJ, Easter SS, Mangione-Smith R & Jones DD (1992) Local regeneration in the retina of the goldfish, J. Neurobiol. 23 187–203

Kaplan MS y Hinds JW (1977) Neurogenesis in the adult rat: electron microscopy analysis of light autoradiograph. Science. 197: 1092-1095

Kempermann, G (2002) Regulation of adult hippocampal neurogenesis – implications for novel theories of major depression. Bipolar disord. 4:17-33

Kempermann G (2002) Why New Neurons? Possible Functions for Adult Hippocampal Neurogénesis. The Journal of Neuroscience 22(3):635-638

Kempermann G, Kuhn H & Gage F (1997) More hipocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. Nature 386: 493-495

Korn H, Faber DS (1996) Escape behavior – brainstem and spinal cord circuity and function. Curr. Opin. Nerobiol., 6: 826-832

Kuan CY, Schloemer AJ, Lu A, Burns KA, Weng WL, Williams MT, Strauss KI, Vorhees CV, Flavell RA, Davis RJ, Sharp FR & Rakic P (2004) Hypoxia-ischemia induces DNA synthesis without cell proliferation in dying neurons in adult rodent brain.. J Neurosci. 24(47):10763-72.

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

Larsson E, Mandel RJ, Klein RL, Muzyczka N, Lindvall O & Kokaia Z (2002) Suppression of insult-induced neurogenesis in the adult rat brain by Brain-Derived Neurotrophic Factor. Experimental Neurology 177: 1-8

Lemaire V, Koehl M, Le Moal M & Abrous DN (2000) Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus. Proccedings of the National Academy of Sciences, USA, 97: 11032-11037

Leuder B, Mendolia-Loffredo S, Kozorovitskiy Y, Samburg D, Gould E & Shors T (2004) Learning enhances the survival of new neurons beyond the time when the hippocampus is required for memory. The Journal of Neuroscience. 23(34): 7477-7481

Lledo PM & Gheusi G (2003) Olfactory processing in a changing brain. Review NeuroReport 14: 1655-1663

Li Y & Straufeld NJ (1997) Morphology and sensory modality of mushroom bodies extrinsic neurons in the brain of the cockroach, *Periplanetea americana* J. Comp. Neurol. 387: 631-650

Liu L, Wolf R, Ernst R & Heisenberg M (1999) Context generalization in *Drosophila* visual learning requires the mushroom bodies. Nature 400: 753-756

Liu S, Wang J, Zhu D, Fu Y, Lukowiak K & Lu YM (2003) Generation of functional inhibitory neurons in the adult rat hippocampus. J. Neurosciences 23:732-736 Schmidt-Hieber et al 2004

Locatelli, F.; Lafourcade, C.; Maldonado, H; y Romano A. (2000) Characterization of cAMP-dependent proteinn kinase isoforms in the brain of the crab *Chasmagnathus*, Journal Of Comparative Physiology, B. 171: 33-40

Lu L, Bao G, Chen H, Xia P, Fan X, Zhang J, Pei G and Maa L.(2003) Modification of hippocampal neurogenesis and neuroplasticity by social environments. Experimental Neurology 183 (2003) 600–609

Malaterre J, Strambi C, Auoane A, Strambi A, Rougon G & Cayre M (2003) Effects of hormones and growth factors on the proliferation of adult cricket neural progenitor cells in vitro. J Neurobiol. 56 (4): 387-397

Maldonado, H., Romano, A., Tomsic, D. (1997) Long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*: a model for behavioral and mechanistic studies of memory. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 30: 813-126

Maldonado, H (2002) Crustaceans as models to investigate memory illustrated by extensive behavioral and physiological studies in *Chasmagnathus*. In: The Crustacean Nervous System, ed: K.Wiese, Springer, Berlin, pp 314-327

Markakis EA y Gage FH (1999) Adult-generated neurons in the dentate gyrus send axonal projections to field CA3 and are surrounded by synaptic vecicles. J. Comp. Neurol. 406: 449-460

McKinzie ME, Benton J, Beltz B, Mellon D (2003) Parasol cells of the Hemiellipsoid body in the crayfish *Procambarus clarkii*: dendriching branching patterns and functional implications. The Journal of Comparative Neurology 462: 168-179

Merlo, E., Freudenthal, R., Romano, A. (2002) The IkappaB kinase inhibitor sulfasalazine impairs long term memory in the crab *Chasmagnathus*. Neuroscience 112(1): 161-172

Merrill D, Karim R, Darriq M, Chiba A & Tuszynski. (2003) Hippocampal cell genesis does not correlate with spatial learning ability in aged rats. J. Comp. Neurol. 28, 459(2) :201-207

Nottebohm F (1981) A brain for all seasons: cyclical anatomical changes in song control nuclei of the canary brain. Science 214(4527): 1368-1370

Nottebohm F (2002a) Why are some neurons replaced in adult brain? J. Neuroscience 22(3): 624-628

Nottebohm F. (2002b) Neuronal replacement in the adult brain. Brain Research Bulletin. 57(6):737-749

Pedreira, M. E., Dimant, B., Tomsic, D., Quesada-Allue, L. A., Maldonado, H. (1995) Cycloheximide inhibits context memory and long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. Pharmacology. Pharmacol. Biochem. Behav. 52: 385-395

Pedreira, M. E., Dimant, B., Maldonado, H. (1996) Inhibitors of protein and RNA synthesis block context memory and long-term memory and long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. Pharmacol. Biochem. Behav. 54: 611-617

Pedreira, ME, Perez-Cuesta L. & Maldonado H. (2002) Reactivation and reconsolidation of long-term memory in the crab *Chasmagnathus*: protein synthesis requirement and

mediation by NMDA-type glutamatergic receptors. Journal of Neuroscience, 32:8305-8311

Pereyra P., de la Iglesia H. & Maldonado H. (1996) Training to testing intervals different from 24 hours impair habituation in the crab *Chasmagnathus*. Physiology and Behavior 59: 19-25

Peters A, Palay S & Webster H (1991) The fine structure of the nervous system: neurons and their supporting cells. (Oxford Univ. Press, New York)

Pham K, Mcewen B, Ledoux J & Nader K (2005) Fear learning transiently impair hipocampal cell proliferation. Nature 130: 17-24

Prickaerts J, Koopmans G, Blokland A & Scheepens A (2004) Learning and adult neurogénesis: Survival with or without proliferation? Neurobiology of Learning and Memory 81: 1-11

Rakic P (2002) Neurogenesis in adult primate neocortex: an evaluation of the evidence. Neurosciences, Nature reviews. 3: 65-71

Reynolds BA & Weiss S (1992) Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. Science 255 1707-1710

Rescorla DA (1988) Pavlovian conditioning: It`s not what you think it is. American Psicologist, 43: 151-160

Rhodes J, van Praag H, Jeffrey S, Girard I, Mitchell G, Garland T Jr. & Gage F (2003) Exercise increases hipocampal neurogénesis to high levels but does not improve spatial learning in mice bred for increased voluntary wheel running. Behavioral Neurosciences 117(5): 1006-1016

Romano, A., Delorenzi, A., Pedreira, M. E., Tomsic, D., Maldonado, H. (1996a) Acute administration of a permeant analog of cAMP and a phosphodiesterase inhibitor improve long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. Behav. Brain Res. 75: 119-125

Romano, A., Locatelli, F., Pedreira, M. E., Maldonado, H. (1996b) Effects of activation and inhibition of cAMP-dependent protein kinase on long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. Behav. Brain Res. 735: 131-140

Sandeman D, Sandeman R, Derby C & Schmidt M. (1992) Morphology of the brain of crayfish, crabs, and spiny lobsters: a common nomenclature for homologous structures. Biol Bull 183: 304-326

Sandeman DC, Scholtz GS y Sandeman RE. (1993) Brain evolution in decapod crustacea. J Exp Zool 265: 112-133

Sandeman D y Scholtz G (1995) Grounds plans, evolutionary changes and homologies in decapod crustacean brains. The Nervous Systems of Invertebrates: An Evolutionary and Comparative Approach. Ed. By O Breidbach & W Kutsch 329-347

Sandeman R & Sandeman D. (1996) Pre- and postembryonic development, growth and turnover of olfactory receptor neurons in crayfish antennules. J Exp Biol 199: 2409-2418

Sandeman R, Clarke D, Sandeman D & Manly M (1998) Growth-related and antennular amputation-induced changes in the olfactory centers of crayfish brain. The journal of neurosciences 18(16): 6195-6206

Schaffer y Gage (2004) Neurogenesis and Neuroadaptation. NeuroMolecular Medicine ISSN 1535-1084 /04 05:1-9

Scharff C. (2000) Chasing fate function of new neurons in adult brains. Current Opinion in Neurobiology 10:774-783

Seri B, Garcia-Verdugo J, McEwen B & Alvarez-Buylla A. (2001) Astrocytes give rice to new neurons in the adult mammalian hippocampus. J. Neurosci. 21: 7153-7160

Shinder AF & Gage FH (2004) A Hypothesis About the Role of Adult Neurogenesis in Hippocampal Function. Physiology 19: 253-261

Schmidt M. (1997a) Continuos neurogénesis in the olfactory brain of adult shore crabs, *Carcinus maenas*. Brain Res 762: 569-582

Schmidt M & Demuth S (1998) Neurogénesis in the central olfactory pathway of adult decapod crustaceans. Annals NY Acad Sci 855: 277-280

Schmidt M & Harzsch S (1999) Comparative analysis of neurogénesis in the central olfactory pathway of adult decapod crustaceans by in vivo BrdU labeling. Biol Bull 196:127-136

Schmidt M (2001) Neuronal differentiation and long-term survival of new generated cells in the olfatory midbrain of the adult spiny lobster, *Panulirus Argus*. JNeurobiol. 48:181-203

Schmidt M. (2001) Adult Neurogénesis in the Central Olfatory Pathway of Decapod Crustaceans. The Crustacean Nervous System, Konrad Wiese, Springer.

Schmidt-Hieber C, Jonas P, & Bischofberger J (2004) Enhanced synaptic plasticity in new generated granule cells of the adult hippocampus. Nature 429:184-187

Scotto-Lomassese S, Strambi C, Aouane A, Strambi A, and Cayre M. (2002) Sensory inputs stimulate progenitor cell proliferation in an adult insect brain. Curr Biol, 12(12): 1001-5.

Scotto-Lamassese S, Strambi C, Strambi A, Aouane A, Augier A, Rougon R & Cayre M. (2003) Suppression of adult neurogénesis impairs olfactory learning and memory in an adult insect. J neuroscience 23(28): 9289-9296

Shors T, Miesegaes G, Beylin A, Zhao M, Rydel T & Gould E (2001) Neurogenesis in the adult is involved I the formation of trace memories. Letters to Nature. Nature 410: 372-376

Shors TJ (2004) Memory traces of trace memories: neurogenesis, synaptogenesis and awareness. TRENDS in neurosciences 27(05): 250-256

Shors T, Townsend D, Zhao M, Kozorovitskiy Y & Gould, E. (2002) Neurogénesis may relate to some but not all types of Hippocampal-depend learning. Hippocampus 12: 578-584

Snyder J, Kee N & Wojtowicz J (2001) Effects of adult neurogénesis on synaptic plasticity in the rat dentate gyrus. J Neuro-Physiol 85: 2423-2431

Strausfeld N, Hansen L, Li Y, Gomez R, Ito K. (1998) Evolution, discovery and interpretation of arthropod mushroom bodies. Learning Memory 5: 11-37

Theodosis DT y Poulain DA (1993) Activity-depend neuronal-glial and synaptic plasticity in the adult mammalian hypothalamus. Neuroscience 57: 501-535

Tomsic D, Massoni V, Maldonado H. (1993) Habituation to a danger stimulus in two semiterrestrial crabs. Ontogenic, ecological and opioid correlates. Journal of Comparative Physiology A 173: 621-633

Tomsic D, Maldonado H, Rakitin A (1991) Morphine and GABA: effects on perception, escape response and long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. Brain Res. Bull., 26: 699-706

Tomsic D, Dimant B, Maldonado H (1996) Age-related deficits of long term memory in the crab Chasmagnathus. J Comp Physiology A 178: 139-146

Tomsic, D., Pedreira, M.E., Hermitte, G., Romano, A.,, Maldonado, H. (1998) Context-US association as a determinant of long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. Animal Learning and Behavior, 26 (2): 196-209

Tomsic D, Berón de Astrada M y Sztarker J. (2003) Identification of individual neurons reflecting short- and long-term visual memory in an arthropod. *J Neurosci*. 23(24): 8539-8546

Troncoso J y Maldonado H. (2002) Two related forms of memory in the crab *Chasmagnathus* are differentially affected by NMDA receptor antagonists. Pharmacology Biochemestry and Behavior, 72: 251-265

van Praag H, Kempermann G & Gage F (1999) Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. Nature Neuroscience 2: 266-270

van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD & Gage FH (2002) Functional neurogenesis in the adult hippocampus. Nature 415(6875): 1030-4

Wang S, Scott B & Wojtowicz J (2000) Heterogeneous properties of dentate gyrus granule neurons in the adult rat. J Neurobiol. 42: 248-257

Yeh SR, Musolf BE, Edwards DH (1996) Neuronal adaptations to changes in the social dominance status of crayfish. J. of Neroscience. 17: 697-708

Zhao X, Schaffer DV, Gage FH (2003) Neurogenesis in the adult brain: understanding its mechanism and regulation. In Gage FH, Byorklund A & Christen Y (Eds.), and in Research and Perspectives in Neurosciences, Foundation IPSEN, Springer-Verlag, Berlin.

A. Dalbenti

V.N. Peszano