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 Doctoral

Efectos del envejecimiento y la neurodegeneración sobre la plasticidad neuronal en el hipocampo

Morgenstern, Nicolás A.

2011

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

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

Cita tipo APA:
Morgenstern, Nicolás A.. (2011). Efectos del envejecimiento y la neurodegeneración sobre la plasticidad neuronal en el hipocampo. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Morgenstern, Nicolás A.. "Efectos del envejecimiento y la neurodegeneración sobre la plasticidad neuronal en el hipocampo". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

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. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

EFECTOS DEL ENVEJECIMIENTO Y LA NEURODEGENERACIÓN SOBRE LA PLASTICIDAD NEURONAL EN EL HIPOCAMPO

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área **CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Nicolás A. Morgenstern

Director de tesis: Dr. Alejandro F. Schinder

Consejero de estudios: Dra. Lidia Szczupak

Lugar de trabajo: Fundación Instituto Leloir

Buenos Aires, 2011

Efectos del envejecimiento y la neurodegeneración sobre la plasticidad neuronal en el hipocampo

A medida que envejece, el cerebro de los mamíferos sufre modificaciones bioquímicas, estructurales y funcionales que disminuyen la plasticidad de sus circuitos. Estos cambios han sido propuestos como responsables del déficit cognitivo y del aumento en la incidencia de las enfermedades neurodegenerativas que se presentan con la edad.

El giro dentado del hipocampo cuenta con una forma de plasticidad singular dada por la producción de nuevas neuronas granulares a lo largo de toda la vida. Mediante transducción retroviral con proteínas reporteras y/o transgenes relacionados con la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer se logró utilizar a estas neuronas como vehículo para monitorear los efectos del envejecimiento normal y patológico sobre la plasticidad neuronal.

Utilizando inmunofluorescencia y microscopía confocal en ratones *wild type* envejecidos y en transgénicos modelando la enfermedad de Alzheimer pudimos observar que, aunque el número de neuronas generadas disminuye a lo largo de la vida, estas no se ven afectadas en su migración ni en la densidad de los contactos sinápticos aferentes que desarrollan durante el envejecimiento normal o patológico.

Por otro lado, combinando registros electrofisiológicos con análisis morfológico encontramos que la expresión autónoma de célula de diferentes variedades de la proteína precursora de amiloide (APP) altera transitoriamente la forma en que estas neuronas se conectan al circuito del giro dentado. Llamativamente, este efecto parecería no estar mediado por el péptido β amiloide, sino por algún dominio contenido en el extremo C-terminal de APP.

En conjunto estos resultados estarían indicando que a pesar de la diversidad de los cambios que se presentan en el cerebro durante el envejecimiento y la neurodegeneración, las neuronas granulares que se desarrollan en el giro dentado bajo tales circunstancias pueden incorporarse anatómica y funcionalmente al circuito. Sin embargo, la dinámica con que se da esta integración se ve afectada por la sobreexpresión de APP en forma autónoma de célula. Alteraciones sutiles como esta podrían subyacer a las manifestaciones cognitivas iniciales encontradas en la enfermedad de Alzheimer.

Palabras clave: neurogénesis adulta, enfermedad de Alzheimer, péptido β amiloide, sinapsis, electrofisiología.

Effects of ageing and neurodegeneration on neuronal plasticity in the hippocampus

Biochemical, structural and functional changes occurs to the mammalian brain as it ages. These modifications are thought to contribute to the decrease in the plasticity of neuronal circuits. This latter situation has been proposed to underlie the cognitive decline and the increase of neurodegenerative disorders found during ageing.

A particular form of plasticity is found in the dentate gyrus of the hippocampus where the continuous addition of new granular neurons takes place through all life. Using retroviral transduction of fluorescent proteins and/or transgenes related to Alzheimer's disease these neurons were experimentally used as probes to study the effects of normal and pathological ageing on neuronal plasticity.

Immunofluoresce labeling and confocal microscopy of wild type aged mice and transgenic models of Alzheimer´s disease showed a strong reduction in the number of newly generated neurons during life. However, nor migration neither afferent synaptic connectivity was affected during ageing or neurodegeneration.

Electrophysiological recordings and morphological analyses revealed that cell autonomous expression of different forms of amyloid precursor protein (APP) affect the way that these neurons integrate to the circuit of the dentate gyrus. Notably, this effect seems to be mediated by a domain in the C-terminal region of APP rather than by Aβ peptide itself.

Altogether these observations should be indicating that despite the diversity in the changes found in the brain during ageing and neurodegeneration, newly-born neurons are able to functionally and anatomically incorporate to the circuit. However, the timing of this integration was found to be affected by the cell autonomous overexpression of APP. This kind of subtle alterations would be underlying the early cognitive decline found in Alzheimer's disease.

Keywords: adult neurogenesis, Alzheimer's disease, amyloid β peptide, synapse, electrophysiology.

AGRADECIMIENTOS

A Ale Schinder, por mi formación, por su sencillez y por haberle dado a un desorientado estudiante de medicina la oportunidad de encontrar su norte.

A los miembros de ayer y de hoy del laboratorio 103 / 307 por su aporte científico, humano y gastronómico:

- Diego Laplagne, Sole Espósito y, especialmente, Vero Piatti por guiarme en mis primeros pasos en el mundo de la ciencia.

- Gabi Lombardi y Dami Giacomini, porque cada una en su momento remó a mi lado para que el proyecto avanzara.

- Lucas Mongiat, por su paciencia inagotable para ayudar y enseñar.

- Maru Veggetti, por la ayuda incondicional; Georgi Davies, por ser mi copiloto en el *setup*; Anto Marín-Burgin por la crítica constructiva y los eventos sociales; Marie Trinchero por su acidez y Belu Pardi por las diferencias.

A mi comité de seguimiento: Vanesa Gottifredi, Gustavo Murer y Marcelo Rubinstein por aportar generosamente su tiempo y conocimiento a esta tesis.

A Eduardo Castaño por su ayuda a lo largo del proyecto.

A Lidia Szczupak por sus consejos.

A Fred Gage, Roberto Malinow y Gopal Thinakaran por los plásmidos.

A Peter Kalivas, Haowei Shen y Alejandra Pacchioni por la ayuda desinteresada.

Al Instituto Leloir, la FCEN, la SAN, la ANPCyT, el CONICET, la IBRO y la AHAF por su contribución a mi formación.

A Rochi por estar, una vez más, de principio a fin en otra etapa de la vida que recorremos juntos.

A mis padres, por la libertad que siempre me dieron para elegir y por enseñarme que nada es más importante que hacer lo que uno disfruta.

A Mich, por las risas compartidas.

A los amigos, en especial a los caballeros de los jueves, quienes semana tras semana me recuerdan que un experimento fallido no es tan grave.

A quienes no llegaron y sé que les hubiera encantado estar.

Este es un trabajo acerca del envejecimiento.

Quiero dedicárselo a mi abuelo Luis, por ser un gran ejemplo.

No del envejecimiento, sí del trabajo.

AGRADECIMIENTOS 4

INTRODUCCIÓN 10

El Hipocampo 10

Anatomía e Histología 10
El circuito del hipocampo 12
Conexiones excitatorias 12
Conexiones inhibitorias 13
Función del hipocampo y su relación con el proceso de memoria 14
Plasticidad neuronal en el hipocampo 15
Plasticidad estructural 15
Plasticidad sináptica 16
Neurogénesis adulta 17
El hipocampo durante el envejecimiento 20
Consecuencias funcionales del envejecimiento del giro dentado 22
Relación del hipocampo con la enfermedad de Alzheimer 23

La enfermedad de Alzheimer 25

Manifestaciones clínicas 25
Histopatología 26
Etiología y factores de riesgo 27
APP: procesamiento y función 27
Formas esporádicas y familiares de la enfermedad 29
Modelos animales de la enfermedad de Alzheimer 30

HIPÓTESIS, PREGUNTAS Y OBJETIVOS. 31

MATERIALES y MÉTODOS 33

Animales 33
Preparación de los retrovirus 33
Vectores retrovirales 34
Clonado del vector viral CAG-APPwt-IRES-GFP 34
Cirugía estereotáxica 34
Anestesia y analgesia 36
Perfusión y cortes histológicos 36
Inmunofluorescencia 36
Tratamiento con BrdU 37
Microscopía confocal 38
Obtención de imágenes de espinas dendríticas de alta resolución 38
Análisis de la densidad de espinas dendríticas 39
Análisis morfológicos 40
Infección retroviral simple y doble 40
Microscopía de fluorescencia y análisis de la distribución de las neuronas en la GCL. 42
Análisis estadísticos 42
Electrofisiología 43
Setup 43
Preparación de rebanadas agudas 43
Protocolos y Análisis 44

RESULTADOS 46

Parte 1 - Distribución de las neuronas en la capa granular a lo largo de la vida. 46

Introducción 46
Objetivos y diseño experimental 47
La marcación retroviral de NPCs como herramienta para estudiar distintas cohortes neuronales del giro dentado. 49
Distribución de las neuronas granulares nacidas en distintas etapas del desarrollo y adulto en la GCL 52
Visualización simultanea de dos poblaciones en el mismo giro dentado 54
Persistencia de neuronas nuevas en animales envejecidos 56
Conclusiones 56

Parte 2 – Efectos del envejecimiento y la neurodegeneración sobre la neurogénesis 58

Introducción 58
Objetivos y diseño experimental 59
Disminución de la neurogénesis durante el envejecimiento 60
Estudio de la complejidad morfológica de las DGCs en el cerebro envejecido 62
Efectos del ejercicio voluntario 67
Conclusiones parciales 69
Envejecimiento patológico 70
El ratón transgénico 2576 como modelo de la AD 71
Objetivos y diseño experimental 72
Neurogenésis adulta en el Tg2576 adulto joven 73
Efectos del envejecimiento sobre la neurogénesis y la sinaptogénesis en AD 74
Conclusiones 77

Parte 3 - Efectos de APP sobre el desarrollo y la integración neuronal. 79

Introducción 79
Objetivos y diseño experimental 80
Diseño y testeo de vectores retrovirales para la sobreexpresión de APP 82
¿Por qué usar retrovirus para la expresión de APP o sus variantes? 82
Elección del sistema de coexpresión de dos proteínas no fusionadas. 82
Elección de los promotores utilizados 83
Variantes de APP de interés 83
Pruebas de expresión in vitro 86
Pruebas de expresión in vivo 88
Detección del péptido β amiloide in vivo 89
Efectos de la sobreexpresión de variantes de APP en neuronas generadas en el hipocampo postnatal. 91
Evaluación de la conectividad 92
Conectividad de las neuronas de 21 días expresando β-CTF 95
Propiedades intrínsecas de las neuronas de 21 días expresando β-CTF 100
Efectos de la sobreexpresión de β-CTF en neuronas de 35 días 103
Efectos de la sobreexpresión de β-CTF en neuronas de 21 días nacidas en el giro dentado de ratones de 4 meses. 105
Características morfológicas de las neuronas expresando β-CTF a los 21 días. 108
Conectividad y desarrollo de las neuronas expresando otras variantes de APP 111
Efectos de la sobreexpresión de APPwt 111
Efectos de la sobreexpresión de mutantes de APP 115
Conectividad y desarrollo de las neuronas expresando α-CTF 118
Conclusiones 122

DISCUSIÓN 124

Las neuronas granulares tienen un patrón de organización en la GCL sostenido en el tiempo 124
Las neuronas granulares son capaces de conectarse al circuito del hipocampo durante el envejecimiento y en un modelo transgénico de AD 125
La sobreexpresión de APP afecta la sinaptogénesis en el hipocampo 128
Consideraciones metodológicas 128
Los efectos de APP sobre la sinaptogénesis serían independientes de Aβ 129
Perspectivas futuras 134

ABREVIATURAS 136

BIBLIOGRAFÍA 137

PUBLICACIONES 154

INTRODUCCIÓN

El Hipocampo

Anatomía e histología

Ubicada en el lóbulo temporal medio del cerebro, la formación hipocampal ha sido sujeto de múltiples investigaciones debido a que es una estructura de organización relativamente simple y laminar. Está compuesta por diferentes regiones en las que recibe información multisensorial proveniente de múltiples áreas de la corteza. La amplia variedad de los *inputs* que recibe le permite asociar y comparar.

Anatómicamente se divide en regiones denominadas subículo, pre y parasubículo, corteza entorrinal (EC), giro dentado (DG) e hipocampo propiamente dicho, subdividido en tres áreas llamadas CA1, CA2 y CA3 (figura 1-1).

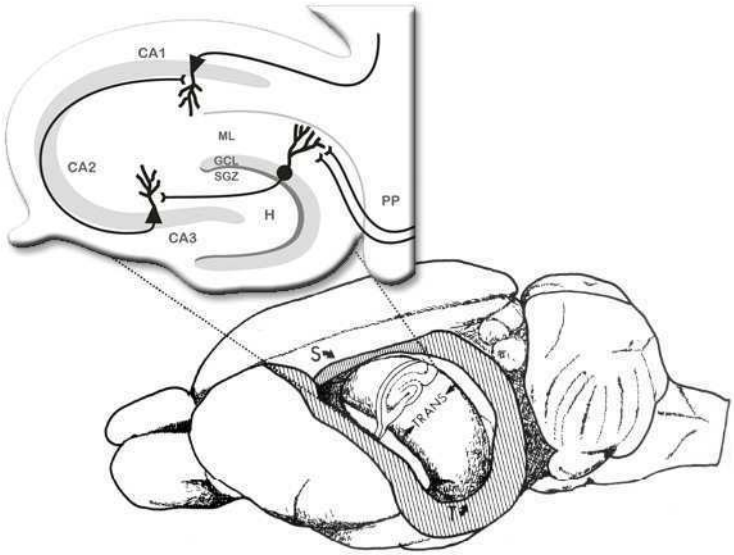


Figura 1-1. Anatomía del hipocampo. Esquema mostrando la localización del hipocampo en el cerebro de rata tras la remoción de la corteza izquierda. En el detalle superior se muestra una sección

transversal en la que se indican las diferentes partes del hipocampo, del giro dentado y los componentes del circuito trisináptico. S: polo septal, T: polo temporal, PP: vía perforante, H: hilus, ML: capa molecular, GCL: capa granular, SGZ: zona subgranular. (Modificado de Johnston, D. And Amaral, 1998).

De especial interés para este trabajo es la organización del giro dentado. Presenta una estructura trilaminar con forma de “V” o “C”. Las tres capas que lo constituyen se denominan: capa molecular (ML), capa de neuronas granulares (GCL) y hilus (figura 1-1).

La capa molecular esta formada por axones aferentes a las neuronas granulares provenientes de la corteza entorrinal, el hilus y el hipocampo contralateral. En sus dos tercios superficiales se encuentran las principales conexiones extrínsecas que recibe el giro dentado. Este conjunto de fibras se origina en la capa II (y en menor medida de las capas V y VI) de la corteza entorrinal y es conocida como la vía perforante (PP). Estas aferencias dan lugar a contactos sinápticos glutamatérgicos sobre las espinas dendríticas de las neuronas granulares (Nafstad, 1967; Hjorth-Simonsen & Jeune, 1972). Un porcentaje menor de contactos ocurre sobre interneuronas GABAérgicas. Tanto con fines anatómicos como funcionales, la vía perforante puede ser dividida en un segmento medial (MPP) y uno lateral (LPP) dado que sus axones provienen topológicamente de la corteza entorrinal medial y lateral.

Por debajo de la capa molecular se encuentran las neuronas principales del giro dentado (DGCs), cuyos somas forman la capa de células granulares (GCL). Constituida por neuronas pequeñas y altamente compactas su ancho varía entre 5 y 10 células a lo largo del hipocampo. Puede dividirse anatómicamente en dos ramas que se unen en un vértice y, según su relación con las neuronas de CA3, se denominan rama supra o infrapiramidal.

En el ratón hay unas 300.000 neuronas granulares en cada GCL. Cada una tiene un tamaño aproximado de 10 µm por 18 µm (Claiborne, 1990) y un árbol

dendrítico cónico con espinas que se extiende a través de la capa molecular. Los axones de las neuronas granulares carecen de mielina y se conocen como fibras musgosas (*mossy fibers*). Tienen una gran variedad de colaterales que inervan células en el hilus pero su blanco final de proyección son las grandes espinas dendríticas (*thorny spines*) de las neuronas piramidales de CA3. Las *mossy fibers* nunca inervan la ML en condiciones normales, pero pueden verse colaterales en condiciones patológicas como la epilepsia (Behr, 1998; Finnerty, 2001; Nadler, 2003).

El interior del espacio que queda delimitado por la GCL define al hilus. Por allí proyectan las *mossy fibers* en su trayecto hacia CA3. Una célula granular puede generar un axón ramificado de hasta 2300 µm en el hilus. Cada ramificación puede tener entre 160 y 200 terminales presinápticos que contactan mayoritariamente interneuronas inhibitorias (Acsády, 1998). Entre las células blanco de estas fibras colaterales se encuentran las células en cesto (*basket cells*) y las células musgosas (*mossy cells*) (Ribak, 1985). Las *basket cells* son las interneuronas inhibitorias mas abundantes del giro dentado y se ubican en el límite entre la capa granular y el hilus. Las *mossy cells* son interneuronas excitatorias del hilus. Sus axones forman la vía de asociación/comisural y tienen como principal blanco sináptico a las propias neuronas granulares (ipsi y contralaterales) sobre las cuales hacen sinapsis en el tercio interno de la capa molecular.

El circuito del hipocampo

Conexiones excitatorias

A diferencia de otras zonas corticales en las cuales las conexiones son bidireccionales, en el hipocampo la información recorre un camino de un solo sentido, es decir que la vía no es recíproca (figura 1-2). La mayor parte de la información que arriba al hipocampo lo hace a través de la corteza entorrinal. En este contacto inicia lo que clásicamente se conoce como el circuito trisináptico (Andersen, 1971) formado por las conexiones unidireccionales

EC→DG; DG→CA3; CA3→CA1. Desde aquí la información vuelve a la corteza entorrinal y al subículo donde luego se proyectará hacia zonas corticales y subcorticales, respectivamente. Sin embargo, existen también conexiones directas desde la corteza entorrinal hacia CA1, CA3 y el subículo (figura 1-2). Por lo tanto limitar el estudio del hipocampo al circuito trisináptico implica una simplificación del problema.

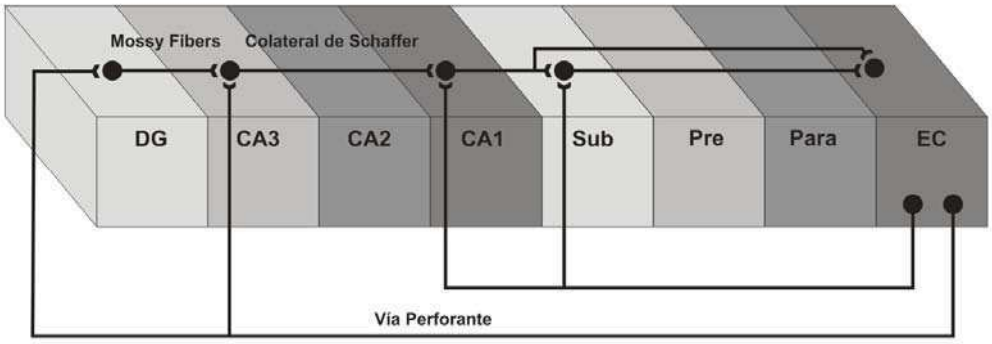


Figura 1-2. Conexiones del hipocampo. Esquema ilustrando las principales conexiones excitatorias intrínsecas del hipocampo. DG: giro dentado, Sub: subículo, Pre: presubículo, Para: parasubículo, EC: corteza entorrinal. (Reproducido de Amaral, 2007).

Conexiones inhibitorias

Dentro del hipocampo existen interneuronas inhibitorias que contactan a las neuronas principales. Por ejemplo, una *basket cell* puede contactar hasta 10.000 células granulares. Las interneuronas axo-axónicas o *chandelier* se especializan en inhibir el segmento inicial del axón de las células granulares. Así, se forma una compleja red de interneuronas inhibitorias que cumple un rol muy importante en la modulación de la actividad de las neuronas principales (Sik, 1997).

Función del hipocampo y su relación con el proceso de memoria

La mayoría de los estudios e hipótesis acerca de la función del hipocampo lo vinculan directamente con el proceso mnésico. Esta idea surgió de las primeras investigaciones en humanos que por causas accidentales presentaron lesiones en el hipocampo, y en general en otras áreas cerebrales. Estudios más sistemáticos en pacientes con lesiones acotadas y en modelos animales coinciden en que el hipocampo es necesario para algunos tipos específicos de memoria (Milner, 1972; Frisk & Milner, 1990).

Actualmente existen dos grandes teorías acerca del rol del hipocampo sobre la memoria. Una postula a esta estructura como la encargada de formar las memorias de los eventos que suceden a diario (memoria declarativa), otorgándole también un rol a la hora de evocar estos recuerdos (Squire, 1992; Squire 2004). Otra lo vincula con la memoria espacial y la formación de mapas necesarios para reconocer y recorrer distintos ambientes (O'Keefe, 1978).

La teoría de la memoria declarativa define al hipocampo como una estructura vinculada con la memoria de hechos y eventos del pasado y que pueden ser concientemente evocados. Considera que el hipocampo es parte de un sistema de memoria más abarcativo existente en el lóbulo temporal medio, el cual opera en conjunto a la hora de adquirir nuevas memorias. El rol del hipocampo esta temporalmente limitado, es decir que su función es imprescindible para la adquisición pero, después de un lapso, estas memorias se reorganizan de forma de poder ser evocadas sin que medie su actividad (Squire, 2004).

La teoría conocida como de “mapa cognitivo” se fundamenta en el hallazgo de las llamadas “*place cells*”. Estas son neuronas que presentan cambios en su tasa de disparo cuando el animal se encuentra en determinada ubicación espacial (O'Keefe, 1971). Dado que estas neuronas se distribuyen en todo el hipocampo, se ha postulado que en conjunto pueden formar mapas del espacio en el que se encuentra un sujeto.

En humanos se teoriza que mientras que el hipocampo derecho conservaría la función espacial, el izquierdo habría adquirido propiedades temporales y lingüísticas. Ambos hipocampos en conjunto mediarían la memoria episódica.

Plasticidad neuronal en el hipocampo

El hipocampo es una estructura altamente plástica. Lejos de la antigua concepción de las conexiones estáticas del cerebro existen hoy numerosos reportes demostrando la capacidad de esta estructura de reorganizarse cuando es dañada, pero también en condiciones fisiológicas (Bruel-Jungerman, 2007). Estos cambios pueden verse morfológicamente a nivel de retracciones o extensiones dendríticas así como también en la formación y eliminación de contactos sinápticos (Bourne & Harris, 2008). Existen también formas de plasticidad solamente evidenciables a nivel funcional y que se traducen en cambios en la eficacia de la neurotransmisión. Otra propiedad que aporta plasticidad al circuito del hipocampo, en particular en el giro dentado, es la adición continua de nuevas neuronas. Este fenómeno, se manifiesta a lo largo de toda la vida con el agregado de miles de neuronas nuevas cada día (Cameron & McKay, 2001).

Plasticidad estructural

Existe una variedad de factores involucrados en el remodelado de los circuitos hipocampales. Se ha demostrado que las hormonas esteroideas pueden afectar la complejidad de las neuronas del hipocampo. En ratas, el aumento en los niveles circulantes de estrógenos ováricos correlaciona con un mayor del número de espinas dendríticas en las neuronas piramidales de CA1 (Woolley, 1992). Otros estímulos que regulan la conectividad neuronal pueden provenir de las experiencias vividas. Ha sido demostrado que el *stress* crónico producido por la exposición repetida a un paradigma de confinamiento induce retracciones en las dendritas de las neuronas

piramidales de CA3 en ratas machos adultos (McEwen, 1999). Probablemente este sea el resultado de un aumento en los niveles de glucocorticoides adrenales circulantes los cuales han mostrado efectos similares tras su administración crónica (Watanabe, 1992).

La complejidad del ambiente en que un animal de laboratorio es criado también tiene consecuencias sobre la forma en que sus neuronas se conectan (Rosenzweig, 1962). Estudios que comparan animales criados en un ambiente enriquecido con condiciones estándar de alojamiento, demuestran que el enriquecimiento ambiental aumenta el tamaño del árbol dendrítico de neuronas granulares (Juraska, 1985; Faherty, 2003), el número de espinas dendríticas en neuronas piramidales de CA1 (Moser, 1994) y el número de contactos sinápticos tanto en CA3 como en el giro dentado (Altschuler, 1979; Briones et al., 2005). Animales expuestos a ambiente enriquecido mejoran su desempeño en paradigmas de aprendizaje dependientes del hipocampo (van Praag, 2000). Otro importante modulador de la complejidad neuronal del hipocampo es el ejercicio físico. Eadie reportó un aumento en el número de espinas dendríticas de las neuronas granulares en roedores con acceso a una ruedita para correr (Eadie, 2005). Estos mismos efectos fueron encontrados por Faherty en animales criados en un ambiente enriquecido (Faherty, 2003). Resta explorar si los diferentes estímulos que modulan la plasticidad comparten o no un mecanismo común a la hora de reestructurar las conexiones.

Plasticidad sináptica

La plasticidad sináptica es la capacidad de modificar la eficacia de la transmisión sináptica ante determinados estímulos. Puede ser clasificada como de corto o de largo término. Como ejemplo de la primera, Mc Naughton describió que si se aplica un par de estímulos a la vía perforante con un intervalo de entre 200 y 300 ms mientras se registra la actividad eléctrica en la capa molecular del giro dentado, se produce una respuesta postsináptica mayor ante el segundo estímulo (McNaughton, 1980; McNaughton, 1982).

Este fenómeno es denominado facilitación por pulso pareado (PPF). Si el intervalo es del orden de unos segundos, se obtiene depresión (PPD). Este mecanismo de plasticidad se mantiene por segundos tras su inducción.

El mejor ejemplo de plasticidad a largo plazo en el hipocampo es la potenciación de largo término (LTP). Es un proceso por el cual aquellas sinapsis glutamatérgicas sometidas a estímulos repetitivos de alta frecuencia potencian su respuesta de forma sostenida en el tiempo (Bliss & Collingridge, 1993). Hacia mediados de los 80 Bliss y colaboradores (Bliss & Collingridge, 1993) propusieron a LTP como un mecanismo celular de almacenamiento de memoria. Los argumentos en favor de esta idea son algunas características que comparten LTP y el proceso de aprendizaje: ambos requieren tiempos similares para su inducción y cursan con un periodo de labilidad, por ejemplo, ante inhibidores de la síntesis proteica. Son específicos de *input*, es decir que sólo se inducen en aquellos contactos estimulados o zonas del cerebro relacionadas con un tipo de aprendizaje en particular y son persistentes en el tiempo de forma coherente. En contraposición, existe un proceso en el cual se produce depresión de largo termino (LTD). LTP y LTD en conjunto son hoy consideradas parte del mecanismo celular que subyace al aprendizaje y la memoria.

Neurogénesis adulta

Si bien la neurogénesis adulta fue inicialmente descripta en la década del 60 (Altman, 1962; Altman 1963; Altman, 1969; Altman & Das, 1965) su aceptación general no fue sino hasta la última década del siglo pasado. El descubrimiento de las células madre neurales, la incorporación de marcadores neuronales más específicos y la aplicación de técnicas de biología molecular han contribuido a que la neurogénesis adulta sea hoy un proceso con una sólida base experimental (van Praag et al., 2002; Espósito et al., 2005).

La neurogénesis adulta ocurre fisiológicamente a lo largo de toda la vida de los mamíferos y es un fenómeno altamente conservado desde invertebrados hasta humanos (Eriksson et al., 1998). En los mamíferos, la neurogénesis adulta se ha descripto en detalle en dos regiones del cerebro. Por un lado las paredes de los ventrículos laterales dan lugar a la proliferación de células progenitoras que tras migrar y madurar se incorporan al circuito del bulbo olfatorio como interneuronas inhibitorias (Lledo, 2004). Por otro lado, y de mayor interés a los fines de esta tesis, se generan neuronas excitatorias en el giro dentado del hipocampo (Altman & Das, 1965; Espósito et al., 2005; Laplagne et al., 2008).

Existe una zona entre la capa de células granulares y el hilus denominada zona subgranular (SGZ). La misma contiene células progenitoras neurales (NPCs) cuya potencialidad se extiende tanto a la generación de glía como de neuronas. La progenie de estos NPCs se diferencia en un 80% a neuronas granulares que al cabo de un tiempo se integran al circuito preexistente. Es decir que migran y extienden sus procesos dendríticos contactando aferentes en la capa molecular, al tiempo que prolongan sus axones contactando neuronas GABAérgicas y glutamatérgicas en el hilus y CA3.

En nuestro laboratorio hemos descripto la secuencia de desarrollo que siguen las NPCs para la formación de neuronas maduras en el hipocampo (Espósito et al., 2005). La marcación con retrovirus ha permitido la visualización detallada de las neuronas nuevas a la vez que permite identificarlas para realizar registros electrofisiológicos (van Praag et al., 2002; Ming & Song, 2005). Se ha demostrado que el fenotipo neuronal se determina dentro de los primeros días tras la división celular. Estas incipientes neuronas muestran potenciales de acción pequeños y resistencia de membrana elevada. Expresan marcadores neuronales tempranos (doublecortin, DCX) y se localizan todavía en la capa subgranular. No poseen aferencias sinápticas pero sí muestran activación tónica de receptores de $GABA_A$ (Espósito et al., 2005; Ge et al., 2006) Al cabo de una semana, migran hacia el tercio más interno de la capa granular. Su morfología muestra un árbol dendrítico inmaduro y sin espinas que se extiende hasta la capa molecular. Reciben sus

primeras aferencias sinápticas dendríticas mediadas por receptores $GABA_A$. En este contexto, este neurotransmisor típicamente inhibitorio se comporta como excitatorio debido a la alta concentración de cloro intracelular que presentan las neuronas jóvenes (Ambrogini et al., 2004; Espósito et al., 2005; Ge et al., 2006). A las tres semanas de edad las neuronas granulares nuevas son capaces de disparar potenciales de acción repetitivos y exhiben árboles dendríticos que alcanzan la capa molecular media. El análisis detallado de su morfología muestra la aparición de espinas dendríticas. Consistentemente, mediante electrofisiología se evidencian aferentes glutamatérgicos (Espósito et al., 2005). A las cuatro semanas poseen ya la morfología característica de neuronas granulares maduras, de las cuales se vuelven prácticamente indistinguibles. El árbol dendrítico alcanza la región más externa de la capa molecular, la densidad de espinas llega a su nivel máximo, cercano a 2 espinas/µm. La última conexión que se establece en las neuronas nuevas son los contactos GABAérgicos perisomáticos responsables del control del *output* neuronal (Espósito et al., 2005). Los blancos postsinápticos de las células granulares nuevas son semejantes a los de las neuronas nacidas durante el desarrollo. Establecen contactos sinápticos funcionales que liberan glutamato como neurotransmisor tanto sobre neuronas piramidales de CA3 como sobre interneuronas inhibitorias y *mossy cells* del hilus (Laplagne et al., 2008).

Diferentes situaciones fisiológicas o patológicas tienen influencia sobre la generación e integración de las nuevas neuronas. Se ha demostrado que tanto el aprendizaje de tareas dependientes del hipocampo (Gould, 1999; Olariu, 2005) como el ejercicio físico (van Praag, 1999[a]; van Praag, 1999[b]) y el ambiente enriquecido (Kempermann, 1997) favorecen la adición de neuronas al circuito. Contrariamente, situaciones como el stress (Tanapat & Gould, 2001) y el envejecimiento (Kuhn, 1996) llevan a una disminución en la producción de neuronas granulares. Se piensa que en ambas situaciones los glucocorticoides actuarían como un regulador negativo ya que la administración exógena de corticosterona inhibe la proliferación de las NPCs (Gould, 1992; Cameron & Gould, 1994). Además, se ha demostrado que la disminución de los glucocorticoides circulantes dada por la adrenalectomía

aumenta la proliferación en la zona subgranular en ratas adultos jóvenes y reestablece los niveles de proliferación del adulto joven en ratas envejecidas (Cameron, 1999; Montaron et al., 2006). Por otro lado, situaciones patológicas como la actividad epileptiforme en la cual la actividad global del circuito se encuentra aumentada tiene como consecuencia un incremento en el número de neuronas granulares generadas y alteraciones en la forma en que estas migran y se integran al giro dentado (Jessberger et al., 2007).

El hipocampo durante el envejecimiento

Los procesos patológicos que afectan al hipocampo se ven favorecidos con el paso del tiempo. El estudio del envejecimiento normal resulta necesario para comprender aquellos cambios que llevan al aumento de las patologías. Se ha demostrado tanto en humanos (Cabeza, 2005) como en roedores (Geinisman, 1986; Driscoll et al., 2006) que la función del hipocampo se ve afectada con la edad y que el proceso de memoria se vuelve vulnerable con el envejecimiento (Landfield, 1988; Rosenzweig, 2003; Driscoll, 2005; Burke, 2006).

El envejecimiento acarrea cambios sutiles en las estructuras anatómicas y en las propiedades de las neuronas, lo cual podría contribuir a la falla cognitiva. Las neuronas granulares del giro dentado sufren una serie de modificaciones con el paso del tiempo que podrían estar subyaciendo este proceso. En esta sección se detallan algunos efectos del envejecimiento sobre las neuronas granulares del giro dentado.

Las primeras ideas de por qué las funciones cognitivas decaen con la edad fueron atribuidas a una disminución global en el número de neuronas. Hoy se sabe que esto no es así y se piensa más en la perdida de contactos sinápticos que en la muerte neuronal. La primera demostración en este sentido surgió cuando en 1976 Geinisman y Bondareff reportaron que el número de neuronas granulares no disminuye en ratas envejecidas. Sin embargo, estos autores encontraron una disminución de un tercio en la

cantidad de contactos sinápticos que estas neuronas reciben de la corteza entorrinal medial en las ratas con alteraciones mnésicas (Bondareff & Geinisman, 1976). Estas observaciones parecen hacerse extensivas también al hipocampo propiamente dicho y a la corteza entorrinal.

Existen también evidencias de desconexión electrofisiológicas entre la corteza entorrinal y el giro dentado como consecuencia del envejecimiento. Los animales jóvenes tienen un mayor número de axones contactando neuronas granulares. Esto es consistente con observaciones anatómicas que muestran menos contactos sinápticos en ratas viejas (Geinisman, 1979). Paradójicamente, se encontró que en las ratas envejecidas se evocaban potenciales postsinápticos mayores. Posteriormente se explicó que esto se daría por un aumento compensatorio en el tamaño del cuanto, dado por un mayor numero de receptores postsinápticos (Barnes & McNaughton, 1980). Este ejemplo ilustra cómo junto con las alteraciones dadas por envejecimiento aparecen asociados cambios compensatorios con el objeto de mantener cierto nivel de homeostasis.

Las neuronas granulares envejecidas conservan la mayoría de sus propiedades biofísicas a lo largo de toda la vida en roedores (Barnes, 1994). Sin embargo, algunos parámetros sufren alteraciones con el tiempo. El umbral de disparo del potencial de acción disminuye cuando se estimula ortodrómicamente neuronas envejecidas (Barnes & McNaughton, 1980). Esto no se observa cuando la estimulación es mediante la inyección de corriente directa sobre una neurona. Así, surgió la idea de que existiría un mayor acoplamiento eléctrico entre las neuronas granulares viejas, lo que permitiría a la corriente fluir desde las células que logran disparar a las que no alcanzan el umbral (Barnes, 1987). Esta disminución generalizada en el umbral de disparo parece ser otra adaptación compensatoria para contrarrestar la perdida de *inputs* que se observa en esta edad (Bondareff & Geinisman, 1976) y así poder mantener constante la probabilidad de disparo.

Si bien la neurogénesis adulta continúa durante toda la vida de los individuos (Rao, 2005), la generación de neuronas granulares nuevas por la

proliferación de las NPCs muestra una marcada disminución en la edad media de la vida (Kuhn, 1996; Rao, 2005). Esta disminución en el número de neuronas que se incorporan al circuito del giro dentado podría contribuir al déficit cognitivo asociado al envejecimiento.

Consecuencias funcionales del envejecimiento del giro dentado

Dado que el giro dentado es la compuerta de entrada al circuito trisináptico, se ha propuesto que actuaría como filtro de la información que llega al hipocampo. Se ha visto que este filtro podría dejar de actuar correctamente en ratas envejecidas (Patrylo, 2007). Alteraciones en los principales sistemas de neurotransmisión en el giro dentado causadas por el envejecimiento podrían verse traducidas en fallas en su función, es decir que podrían expresarse como alteraciones en el aprendizaje espacial y en la memoria. En el sistema GABAérgico, el envejecimiento se acompaña de la disminución de la enzima ácido glutámico descarboxilasa (GAD) (Shetty, 1998) y de los niveles de GABA extracelular (Almaguer-Melian et al., 2005). Además se han encontrado niveles aumentados de GABA transaminasa (Hwang et al., 2004) y una disminución en el número de neuronas GAD positivas (Shetty & Turner, 1998). Todos estos cambios llevan a una situación de menor producción y mayor degradación de GABA. En conjunto, esto produce una disminución en la inervación GABAérgica global del giro dentado envejecido. De este modo, se ve comprometida la forma en que las neuronas granulares se activan y sincronizan y en consecuencia la manera en que el circuito responde a sus aferencias.

El otro sistema afectado es el excitatorio glutamatérgico. En el cerebro adulto, la pérdida de conexiones entre la vía perforante y el giro dentado resulta en el compromiso de la función cognitiva y un aumento de la actividad epileptiforme (Steward, 1982; Kelley & Steward, 1996). Se ha demostrado que si esta desconexión es unilateral, la pérdida de los contactos sinápticos no es definitiva. En estos casos, fibras de la vía temporodentada (provenientes de la corteza entorrinal contralateral) reemplazan a los

terminales presinápticos perdidos (Steward, 1982; Reeves, 1987). Ante esta reconexión, el déficit cognitivo revierte. También se han visto reorganizaciones involucrando a las *mossy fibers* y a las vías de asociación/comisural (formada principalmente por los axones de las *mossy cells*) (Lynch, 1976; Steward, 1982; Reeves, 1987). Durante el envejecimiento la pérdida de aferentes se presenta en forma bilateral. Así, se suprime la posibilidad de ser revertida por fibras contralaterales. En estas condiciones, la reorganización de las *mossy fibers* o de fibras de asociación/comisurales se ve favorecida. Se crean entonces nuevos circuitos excitatorios recurrentes que irán en detrimento de la función del giro dentado, como ha sido sugerido en ciertos modelos de epilepsia (Behr, 1998; Finnerty, 2001; Nadler, 2003).

En conclusión, la alteración funcional del giro dentado envejecido parecería ser consecuencia de la menor llegada de información desde la corteza entorrinal y del desbalance en sus sistemas de neurotransmisión intrínsecos. Estos cambios podrían subyacer a las alteraciones en la memoria y la orientación espacial que se encuentran en el envejecimiento.

Relación del hipocampo con la enfermedad de Alzheimer

Existen situaciones patológicas que se presentan con la edad y que afectan principalmente al hipocampo. Una de las más prevalentes es la enfermedad de Alzheimer (AD). Sus síntomas iniciales se solapan con los que se presentan durante el envejecimiento haciendo difícil diferenciarlos. La resonancia magnética nuclear del cerebro de pacientes con AD muestra atrofia del hipocampo, evidenciada por una marcada disminución en su volumen. El estudio de portadores de formas familiares de la AD en su fase presintomática ha demostrado que esta alteración es detectable incluso en personas en etapas iniciales de la enfermedad (Convit et al., 1997; Jack et al., 1998).

Además de los cambios en las imágenes cerebrales, las clásicas lesiones histopatológicas encontradas en autopsias de pacientes con AD (placas

amiloideas y ovillos neurofibrilares) se corresponderían con estadios muy avanzados de la patología. Por lo tanto cambios sutiles al inicio de la AD serían responsables de las manifestaciones tempranas. Actualmente resulta difícil estudiar estas alteraciones en pacientes vivos. Una posibilidad es que, de forma similar a lo que sucede en el envejecimiento, estos cambios iniciales lleven a la desconexión entre la corteza y el hipocampo. Es decir que la entrada de información al circuito se vería afectada por la pérdida de la sinapsis EC-GD, dando los primeros síntomas de amnesia (Hyman, 1984).

En 1988 surgió el primer reporte relacionando la AD con la perdida sináptica en el hipocampo usando microscopía electrónica (Bertoni-Freddari, 1988). Estudios posteriores en humanos utilizaron el marcador sináptico *synaptophysin* para mostrar disminuciones variables (entre el 30 y el 70%, según el estadio de la AD) en el número de terminales sinápticos encontrados en los 2/3 externos de la capa molecular (Masliah et al., 1994). Estas evidencias en favor de la desconexión sináptica entre la corteza entorrinal y el giro dentado son similares a las encontradas por Geinisman en animales envejecidos (Bondareff & Geinisman, 1976).

Dado que las sinapsis excitatorias terminan sobre espinas dendríticas, el estudio de estas estructuras también es relevante como indicador de conectividad. Se han observado disminuciones cercanas al 40% en el número de espinas en cerebros con AD (Einstein, 1994). La magnitud del cambio tiene relación directa con la proximidad a las placas amiloideas. Dada las similitudes entre las alteraciones anatómicas y funcionales del hipocampo envejecido y las manifestaciones de la AD expuestas, queda claro que resulta imposible estudiar unas sin remitirse a las otras.

La enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer es una enfermedad progresiva del sistema nervioso central. Afecta principalmente a adultos mayores de 65 años y es más frecuente en el sexo femenino. Su prevalencia aumenta significativamente con la edad, es de 1 en 2000 para menores de 60 años mientras que asciende a 1 en 200 al superar dicha edad. Lo padecen el 20% de los mayores de 80 años y el 50% de los mayores de 90. Es la principal causa de demencia en el adulto el mundo occidental y representa un gasto millonario en salud. Se estima que 5 millones de personas lo padecen en Estados Unidos mientras que unas 400.000 estarían afectadas en el Reino Unido. Inicialmente descripta por Alois Alzheimer en 1907 (Stelzmann, 1995), ha sido sujeta a investigaciones por más de cien años. Sin embargo sus aspectos fundamentales siguen sin comprenderse.

Manifestaciones clínicas

Las manifestaciones clínicas más salientes de la enfermedad de Alzheimer se remiten a las funciones cognitivas. Inicialmente se presenta como pequeñas e insidiosas alteraciones en la memoria autobiográfica, dificultad para evocar los nombres familiares y desorientaciones espaciales. Con el transcurso de la enfermedad se van sumando deficiencias en la atención, el lenguaje, la orientación visuo-espacial, el pensamiento abstracto y el juicio. Todas estas complicaciones se extienden progresivamente hasta imposibilitar la vida cotidiana y afectar la independencia de las personas que lo padecen. En ocasiones son concurrentes otros síntomas psiquiátricos o neurológicos que terminan por inhabilitar completamente a las personas. Puede extenderse por aproximadamente 10 años. Finalmente, la muerte se da por patologías asociadas y no por la misma AD.

Histopatología

El examen histopatológico post-mortem es en la actualidad el único diagnostico certero de la enfermedad. Las lesiones que en el mismo se encuentran son características de esta patología y permiten diferenciarla de otras demencias. Existen dos tipos de alteraciones celulares que definen a la AD. Las placas seniles son acumulaciones proteicas extracelulares que se distribuyen a lo largo del parénquima cerebral afectado. No afectan a todo el cerebro de la misma manera. Conforme avanza la enfermedad las lesiones pueden encontrarse en sucesivas regiones anatómicas siguiendo una secuencia muy estereotipada, progresando desde la corteza entorrinal al hipocampo y más tarde extendiendose hacia otras áreas corticales (Braak & Braak, 1991). Entre las zonas más afectadas se encuentran la neocorteza y otras estructuras del sistema límbico (amígdala y cortezas asociadas). Estas placas están formadas en su mayoría por la agregación de un péptido extracelular de 40-42 aminoácidos. Este es conocido como péptido β amiloide (Aβ) y se cree que es el desencadenante de una cascada de eventos que deriva en la AD (Selkoe, 2002; LaFerla & Oddo, 2005). Debido a su presencia en las placas también se las denomina placas amiloideas. En el giro dentado las placas se ubican en el tercio medio de la capa molecular, dentro de la zona correspondiente a la vía perforante media (Crain & Burger, 1988).

Otra lesión que típicamente se encuentra en autopsias de pacientes con AD son los ovillos neurofibilares, depósitos intracelulares formados por el agregado de la proteína tau. Esta proteína normalmente forma parte de las proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) y es parte constitutiva de los axones. Se ha sugerido que cuando tau se hiperfosforila se reorganiza de manera que forma acumulaciones intracelulares (LaFerla & Oddo, 2005).

Junto a estas dos lesiones específicas suele hallarse un estado de astrogliosis generalizado y una pérdida difusa de sinapsis. La conexión entre la corteza entorrinal y el giro dentado es la primera en verse afectada en la enfermedad de Alzheimer. Se ven cambios en los 2/3 externos de la capa molecular (Walker, 2007) entre los cuales se presenta un aumento de la

marcación con acetilcolinesterasa como innervación compensatoria de los axones perdidos por la denervación aferente del giro dentado (Walker, 2007). La zona donde terminan las *mossy fibers* se mantiene indemne a la formación de placas, incluso en los estadios más avanzados de AD (Walker, 2007). En etapas tardías puede encontrarse también una disminución en el número de somas neuronales.

Etiología y factores de riesgo

Aunque la causa de la AD se ignora, existe un consenso extendido que postula al péptido β amiloide como un efector necesario para desencadenar las manifestaciones de la patología. La vejez es el principal factor que aumenta el riesgo de contraer AD. Existe otro importante factor predictivo, el alelo ε4 de la apolipoproteína E (ApoE), codificado en el cromosoma 19. Aunque se desconoce si realmente juega un rol en la patología o simplemente se encuentra asociado a otro gen en el mismo cromosoma, los portadores de este alelo multiplican su riesgo de desarrollar la forma esporádica de la AD.

APP: procesamiento y función

El péptido β amiloide proviene del procesamiento sucesivo de una proteína conocida como APP (proteína precursora de amiloide). APP es una proteína de un solo dominio transmembrana codificada en el cromosoma 21. El gen fue descubierto gracias a que en el síndrome de Down, dado por la trisomía de este cromosoma, se presenta una patología similar al AD pero de inicio precoz, cercano a los 30 años. La función de APP se desconoce pero se lo ha visto implicado en procesos de promoción del crecimiento neuronal y mecanismos de señalización y adhesión celular (Breen, 1991; Milward et al., 1992; De Strooper, 2000; Thinakaran, 2008). APP se expresa tanto en las

neuronas granulares del giro dentado como en las piramidales del hipocampo (McNamara et al., 1998).

El procesamiento de APP requiere de dos enzimas fundamentales para la liberación de Aβ (Thinakaran, 2008). En primer lugar debe ser cortado por β-secretasa para liberar los fragmentos $APP^{s\beta}$ y β-CTF (figura 1-3). Este último posteriormente es procesado por el complejo enzimático γ-secretasa, formado por cuatro proteínas de las cuales presenilina posee la actividad catalítica. Tras este procesamiento se libera el péptido β amiloide y el fragmento γ-CTF (figura 1-3). Paralelamente, APP puede ser procesado por una vía alternativa y no amiloideogénica, en la cual además de γ-secretasa interviene la enzima α-secrteasa cuyo sitio de corte se ubica dentro de la secuencia de Aβ. Por lo tanto si APP es procesado por esta vía no se producirá el péptido amiloidogenico (figura 1-3).

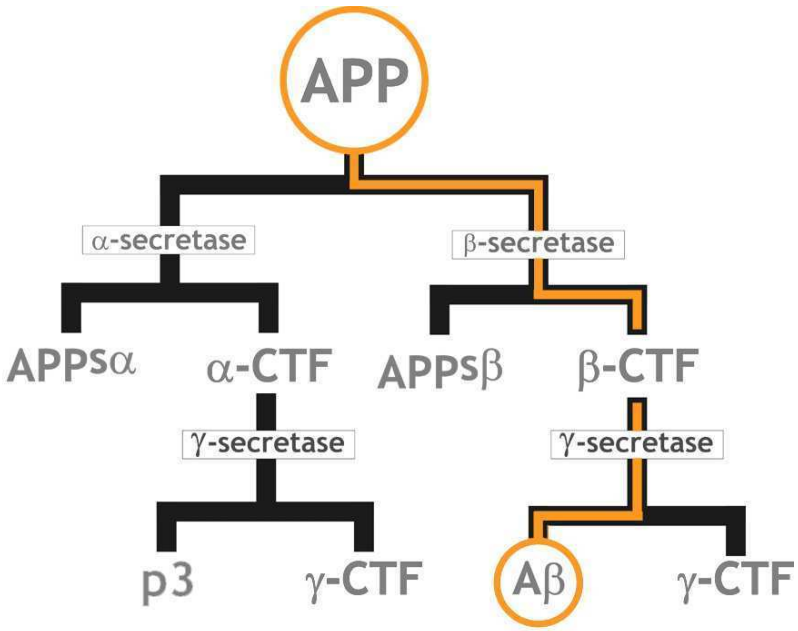


Figura 1-3. Procesamiento de APP. La vía amiloideogénica permite que tras el corte sucesivo por β y γ-secretasa se libere el péptido β amiloide (derecha). El procesamiento no amilideogénico requiere de la acción inicial de α-secretasa (izquierda).

Formas esporádicas y familiares de la enfermedad

La AD no tiene una causa claramente identificada. Esto es cierto para más del 95% de los casos en los que el inicio se da en la vejez, denominados “esporádicos”. En contraposición, existen otras variedades de la enfermedad conocidas como “formas autosómicas dominantes” en las cuales se han descripto mutaciones puntuales que provocan AD (Price & Sisodia, 1998). Clínicamente se manifiestan en edades más tempranas y por eso son de mayor agresividad. Las mutaciones descriptas para estas formas familiares involucran alteraciones en el gen de APP o en las enzimas que lo procesan y terminan por aumentar la producción de péptido β amiloide o bien su facilidad para agregar. Entre las formas mejor descriptas se encuentran las mutaciones conocidas como *Swedish* (APPswe), *Iowa, Florida y London* (figura 1-4, Goate et al., 1991; Mullan et al., 1992; Eckman et al., 1997; Grabowski, 2001)

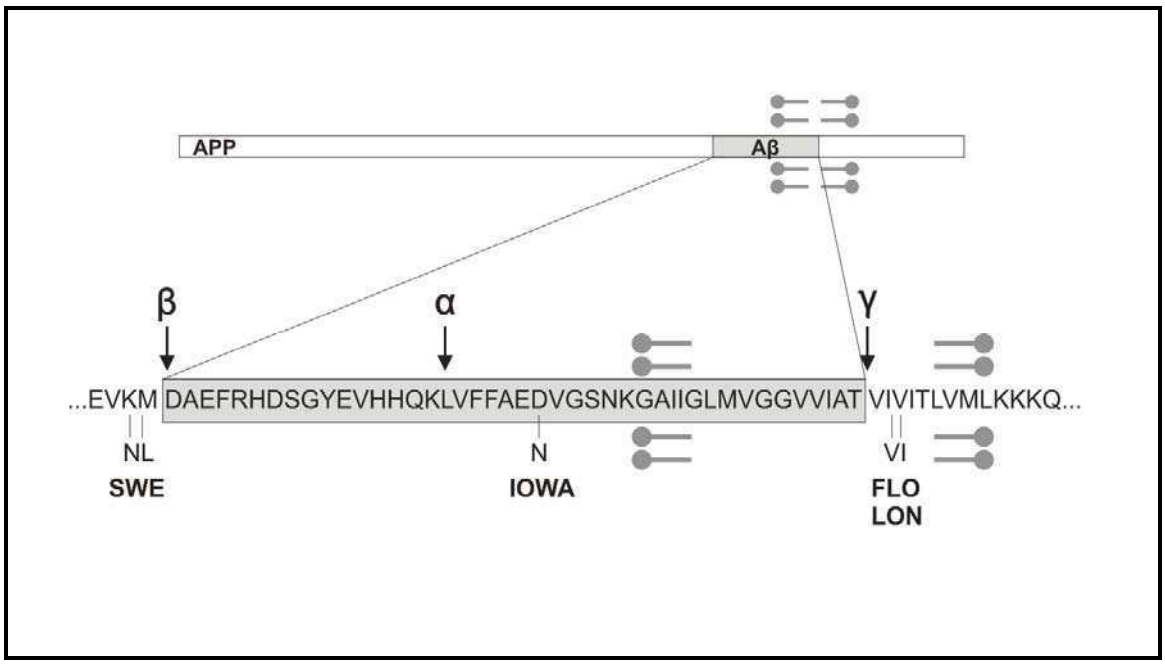


Figura 1-4. APP: sitios de corte y mutaciones. Esquema mostrando la secuencia aminoacídica de APP en la región de Aβ. Con flechas se señala el sitio de corte de cada una de las enzimas que intervienen en su procesamiento. Con líneas verticales se marcan los aminoácidos

mutados en cada una de las formas familiares de la enfermedad. SWE: swedish, FLO: Florida, LON: London. (Modificado de Selkoe, 1995)

Modelos animales de la enfermedad de Alzheimer

Debido a los obstáculos que se encuentran para estudiar la progresión de la enfermedad en el cerebro humano, se han utilizado diferentes modelos animales para intentar reproducir los aspectos patológicos de la AD y caracterizar sus bases celulares y moleculares. *C. elegans* y *Drosophila* han contribuido a entender algunos de los fenómenos que se presentan pero los modelos más ampliamente utilizados han sido los ratones transgénicos. En la mayoría de los casos sobreexpresan el gen humano de APP y se observan acumulaciones de Aβ que dependen de la edad (Games et al., 1995; Hsiao et al., 1996). La sobreexpresión de Aβ necesaria para que aparezcan manifestaciones patológicas y cognitivas está condicionada por la cepa utilizada (Hsiao, 1998). Concentraciones 4 o 5 veces más altas que la endógena y alteraciones en la relación entre el péptido Aβ de 40 y el de 42 aminoácidos producido, llevan al desarrollo de placas (Mucke et al., 2000). De forma similar a lo que sucede en AD, las placas se encuentran rodeadas por astrocitos, microglia activada y dendritas distróficas. Ningún modelo de sobreexpresión de Aβ ha mostrado espontáneamente patología de tau (Games et al., 1995; Hsiao et al., 1996; Hsia, 1999).

Para aumentar la agresividad y acelerar la patología se han creado ratones transgénicos expresando variantes de APP que portan mutaciones relacionadas con formas familiares de AD y formas mutantes de las enzimas que lo procesan. Se ha insertado el gen de APPswe y de tau hiperfosforilado (P301L) en una línea de ratones que expresan una variante de presenilina hiperactiva para estudiar las interacciones entre las diferentes alteraciones patológicas (Oddo et al., 2003). Si bien estos modelos reproducen algunas características de la enfermedad, todavía no se ha encontrado uno que desarrolle todas las alteraciones encontradas en pacientes humanos.

HIPÓTESIS, PREGUNTAS Y OBJETIVOS.

La hipótesis central de esta tesis postula que la plasticidad de los circuitos neuronales decrece con el envejecimiento y en particular durante los procesos neurodegenerativos.

La neurogénesis adulta representa un fenómeno de plasticidad que requiere de la proliferación, migración y diferenciación de células progenitoras neurales con el consecuente establecimiento de su polaridad, morfogénesis y sinatpogénesis.

Dado que todos estos eventos tienen lugar en el cerebro adulto, nos propusimos utilizar este fenómeno para explorar los cambios que ocurren durante el envejecimiento y en un modelo de la enfermedad de Alzheimer, con el fin de detectar alteraciones que contribuyan a entender ambos procesos.

El primer objetivo de esta tesis fue caracterizar la neurogénesis durante el envejecimiento para investigar si los cambios que se presentan durante este proceso tienen un efecto sobre las nuevas neuronas. Se intentó develar si la arquitectura del giro dentado se ve afectada por la edad; si las neuronas generadas en el cerebro envejecido son diferentes a las nacidas en el adulto joven, y si tienen la misma capacidad de integrarse al circuito preexistente. Para evaluar si el patrón de migración de estas neuronas se ve afectado con la edad, estudiamos la forma en que se éstas distribuyen en la capa granular durante el desarrollo, la vida adulta y el envejecimiento. Para conocer la magnitud en que se afecta la producción de neuronas nuevas y su integración al circuito, se cuantificó el proceso de neurogénesis a lo largo de la vida y se estudió la morfología que estas neuronas desarrollaron.

El segundo objetivo de esta tesis fue investigar cómo se afecta la plasticidad neuronal durante la neurodegeneración. Aunque la enfermedad de Alzheimer fue descripta hace más de cien años su causa y mecanismo patogénico siguen siendo desconocidos. El péptido β amiloide ha sido propuesto como

un efector necesario para la patología pero se desconoce si este afecta a la formación o eliminación de contactos sinápticos, si es el único producto tóxico de APP y si sus efectos son presinápticos o postsinápticos. Tampoco ha sido clarificado si su acción se ve potenciada por el envejecimiento y si este actúa de forma intracelular o extracelular.

Para intentar contestar estos interrogantes, caracterizamos la neurogénesis adulta en modelos de la enfermedad de Alzheimer. Testeamos la hipótesis de que el péptido β amiloide impide la formación y/o eliminación de contactos sinápticos. Mediante la utilización de distintas estrategias se apuntó a caracterizar efectos autónomos de célula de la sobreexpresión de APP sobre el desarrollo neuronal y la sinaptogénesis. Si bien la hipótesis central en el campo de la enfermedad de Alzheimer apunta a un rol deletéreo de Aβ, este proyecto se planteó dando lugar a la posibilidad de que otros dominios de APP puedan afectar la plasticidad neuronal.

MATERIALES y MÉTODOS

Animales

Todos los animales utilizados en esta tesis fueron criados en el bioterio del Instituto Leloir. Fueron alojados en grupos de entre 5 y 10 animales del mismo sexo en jaulas de acrílico transparentes con tapas metálicas de reja y con acceso al agua y alimento balanceado (Gilardoni) *ad libitum.* Los animales transgénicos 2576 fueron comercialmente obtenidos de Taconic Farms Inc. Para los experimentos de la parte 1 de los resultados se utilizaron ratones de la cepa C57BL/6 a la edad de 7 y 42 días y hembras preñadas en estadio E15,5. Se utilizaron indistintamente machos y hembras. Los animales inyectados en P42 contaron con una ruedita para correr desde tres días antes de la operación. Para los experimentos la parte 2 de los resultados se utilizaron hembras de la cepa C57BL/6 de 2, 4, 6 y 10 meses. Los experimentos en ratones 2576 fueron realizados mayoritariamente en hembras de 2, 5 y 10 meses de edad. Para los experimentos la parte 3 de los resultados se utilizaron exclusivamente hembras C57BL/6 en P21-26, 2 meses y 4 meses. Excepto cuando se realizo el punto de 35 días post inyección, todos los animales utilizados en los experimentos de electrofisiología de ese capitulo fueron sacrificados 21 días tras la infección (rango 19-22 días), dado que en los animales de 4 meses se presupone un proceso de neurogénesis más lento el rango utilizado fue 20-23 días post inyección.

Preparación de los retrovirus

Un vector viral no replicativo basado en el virus Moloney de la leucemia murina fue usado para expresar tanto las proteínas reporteras como los transgenes de interés. Las partículas virales fueron ensambladas usando tres plásmidos diferentes conteniendo la cápside (CMV-vsvg), las proteínas virales (CMV-gag/pol) y los transgenes de interés y/o reporteros. Los plásmidos fueron transfectados en células 293T usando PEI o Lipofectamina 2000 (Invitrogen). El sobrenadante conteniendo partículas virales fue

recolectado 48 hs después de la transfección y concentrado en dos rondas de ultracentrifugación.

Vectores retrovirales

Los insertos de APPwt-IRES-GFP, APPmv-IRES-GFP y β-CTF-IRES-GFP fueron gentilmente cedidos por R. Malinow (UCSD). APP3mut fue gentilmente cedido por el G. Thinakaran (Univ. of Chicago). Las construcciones expresando GFP o RFP fueron cedidas por el laboratorio del Dr. Gage (UCSD, USA) o bien subclonadas previamente en nuestro laboratorio. Todas las modificaciones posteriores y los subclonados en el vector retroviral MoMLV (excepto la que se detalla a continuación) fueron realizadas en nuestro laboratorio por Gabriela Lombardi y Damiana Giacomini.

Clonado del vector viral CAG-APPwt-IRES-GFP

Partiendo del vector pSinRepV portando del inserto APPwt-IRES-GFP (gentilmente cedido por el Dr Malinow, UCSD) se procedió a la escisión del mismo con las enzimas de restricción *ClaI* y *NotI*. Luego se purifico el fragmento de interés y se lo subclonó en un vector *Bluescript SKPS.* Se utilizaron las enzimas *Sfi* y *Pme* para extraer el fragmento de *Bluescript* a la vez que se las usaron para linealizar el plásmido retroviral. Se las ligó formándose así el plásmido necesario para la producción del retrovirus. El mismo expresa la secuencia APPwt-IRES-GFP bajo el promotor CAG. Todos los pasos intermedios, así como la construcción final fueron verificados por patrones de restricción y también por secuenciación con *primers* específicos.

Cirugía estereotáxica

La inyección del retrovirus fue realizada en animales anestesiados mediante cirugía estereotáxica en el giro dentado derecho utilizando un microcapilar de vidrio estirado y calibrado (Drummond Scientific). Se inyectó entre 1 y 1,5 µl de virus a razón de 0.1-0.2 µl/min. Para ratones C57BL/6 adultos jóvenes se

utilizaron las coordenadas: anteroposterior, -2 mm desde el bregma; lateral, 1.5 mm; ventral, 1.9 mm. Las coordenadas debieron ser corregidas al variar tanto la edad como la cepa de los animales. Para los C57BL/6 inyectados en P21-26 se utilizaron dos coordenadas diferentes en función del peso de los mismos. Para los animales pesando hasta 13,5 g se utilizaron las coordenadas: anteroposterior, -1,5 mm desde el bregma; lateral, 1,5 mm; ventral, 2 mm mientras que para aquellos entre 13,5 y 15 g se utilizó: anteroposterior, -1,9 mm desde el bregma; lateral, 1,7 mm; ventral, 2 mm. En el caso de los ratones Tg 2576 las coordenadas fueron las mismas en todas las edades utilizadas: anteroposterior, -1,5 mm desde el bregma; lateral, 1,5 mm; ventral, 1,9 mm. La puesta a punto de los diferentes sitios de inyección fue realizada en el contexto de esta tesis y se logró mediante la inyección de colorantes visibles bajo el microscopio óptico e inmediato sacrificio y corte en vibrátomo de los cerebros con el fin de observar y corregir el sitio en donde se observó la marcación. Como regla general, todo procedimiento quirúrgico y su posterior recuperación se realizó sobre una manta térmica con el fin de prevenir la posible hipotermia inducida durante la anestesia.

Las inyecciones en P7 e *In utero* fueron realizadas por Soledad Esposito y Diego Laplagne. Para los P7 se usaron las coordenadas anteroposterior, -1,5 mm desde el bregma; lateral, 1,5 mm; ventral, 1.5 mm. Las inyecciones en embriones se realizaron en hembras con edad gestacional conocida cuando los embriones alcanzaron E15,5. Cada madre fue anestesiada con Nembutal 10% por vía intraperitoneal. Una incisión longitudinal en el peritoneo inferior permitió la exposición del útero grávido intacto sin afectar su irrigación ni lesionar a los embriones. Una mezcla de virus CAG-GFP con 3% del colorante *fast green* en relación 5:1 fue inyectada en el ventrículo lateral de cada embrión mediante un microcapilar de vidrio insertado a través de la pared uterina. La difusión del colorante confirmo la correcta ubicación de la inyección. El útero fue devuelto a la cavidad abdominal y las madres suturadas. Tras la recuperación total fueron devueltas a la colonia.

Anestesia y analgesia

A lo largo de esta tesis se presentaron situaciones que requirieron el uso de diferentes tipos de anestésicos. En los animales C57BL/6 adultos usados en la parte 1 y 2 de los resultados se utilizó la mezcla de 100 µg ketamina / 10 µg xilazina en 10 µl de solución salina/g. En el caso de los animales en P7 la única manera de anestesiarlos de forma segura fue poniéndolos sobre hielo durante 4 minutos. En los animales de la cepa 2576 se utilizó isofluorano (0,5-1% en un flujo de oxigeno de 1 l/min). Posteriormente se introdujo el uso de avertina (0,5 mg/g i.p.) la cual fue útil tanto para los C57BL/6 en P21-26 y en 4 meses como para los 2576 de todas las edades, con lo cual se eligió esta como la alternativa definitiva.

Perfusión y cortes histológicos

Tras anestesia se procedió a la perfusión transcardíaca con paraformaldehído 4% con el objetivo de fijar el tejido nervioso. Una vez extraídos los cerebros, se los post-fijó durante una noche en paraformaldehído 4% a 4℃ y posteriormente se los transfirió a una solución de sacarosa al 30% en la cual se los almacenó hasta el momento del corte. Utilizando un microtomo de deslizamiento (Leica SM2000R) se realizaron secciones coronales de 40 o 60 µm a lo largo de todo el hipocampo. Aquellos cerebros que debieron ser almacenados por periodos mayores a las dos semanas fueron congelados en isopentano 100% y posteriormente cortados en secciones de 40 µm en un crióstato (Leica). Las secciones resultantes de ambas formas de corte fueron almacenadas según el orden anteroposterior a -20℃ en grupos de 3 o 4 en placas *multiwell* conteniendo una solución crióprotectora.

Inmunofluorescencia

Las secciones fueron inmunomarcadas con anticuerpos primarios contra BrdU (rata; 1:200; Boehringer Manheim), GFP (pollo; 1:100; Invitrogen y policlonal de conejo conjugado con Alexa Fluor 594; 1:500; Invitrogen), NeuN

(monoclonal de ratón; 1:50; provisto por F. Gage), RFP (policlonal de conejo; 1:200; Chemicon), APP/Aβ 6E10 (monoclonal de ratón; 1:300/1:500, Covance), c-MYC (policlonal de conejo; IHQ 1:100, Sigma), CTM1 (1:100/1:300; provisto por G. Thinakaran). Los anticuerpos secundarios usados fueron: burro anti-pollo Cy2, burro anti-rata Cy3, burro anti-conejo Cy3, burro anti-ratón Cy5 (1:250; Jackson ImmunoResearch).

Para el revelado de anticuerpos biotinilados se utilizó el complejo avidina biotina peroxidasa (ABC Elite, Vector Laboratories), seguido de 3,3'-diaminobenzidina tetracloridro (Vector Laboratories Kit).

Los anticuerpos fueron aplicados utilizando una solución de TBS con 3% de suero de burro (Sigma) y 0,25% de Triton X-100. Después del inmunmoarcado las secciones fueron lavadas seis veces en TBS; se incluyó DAPI en una concentración de 1:1000 en el tercero de estos lavados. Las secciones fueron montadas utilizando PVA-DABCO como medio de montado y almacenadas durante 7 días a 4℃ para su secado d efinitivo.
Las inmunofluorescencias de la parte 1 de los resultados mostrando una población embrional o postnatal (GFP) coexistiendo con las neuronas generadas en la adultez (RFP en magenta) fueron realizadas sobre secciones de 400 µm de espesor previa permeabilizacion del tejido con metanol puro. Estas últimas fueron cortadas con un vibratomo y fijadas durante una noche en paraformaldehido 4% a 4℃.

Tratamiento con BrdU

Después del destete (P21), los animales recibieron una inyección diaria de BrdU (Sigma) 50 mg/kg por 5 días. Cuatro semanas después de la ultima inyección fueron anestesiados con ketamina+xilazina y perfundidos. Los cerebros fueron cortados en secciones de 40 µm en crióstato. Una sección de cada seis a lo largo del hipocampo fue estudiada mediante inmunomarcación y microscopia confocal. El fenotipo neuronal fue establecido mediante la morfología y en aquellas neuronas GFP+/BrdU+ corroborado por la marcación con NeuN.

Microscopía confocal

Las imágenes fueron adquiridas utilizando un microscopio confocal Zeiss Pascal o Zeiss LSM 510 Meta. Todas las imágenes mostradas son reconstrucciones tridimensionales de múltiples planos confocales obtenidos con un pinhole de 1 µm. En el ejemplo de colocalización de la figura BrdU/NeuN/GFP la imagen corresponde a un único plano confocal. Las imágenes de neuronas completas se obtuvieron utilizando un objetivo de 40x con una magnificación digital de entre 0,7 y 2. 20-40 planos confocales adquiridos con una resolución de 512 x 512 o 1024 x 1024 pixeles y 1 µm de espesor se proyectaron para realizar reconstrucciones tridimensionales de las mismas.

Obtención de imágenes de espinas dendríticas de alta resolución

Para obtener imágenes con la resolución necesaria para distinguir las espinas dendríticas, se eligió la neurona de interés mediante visualización directa, cuidando que la relación señal/fondo fuera la mejor posible y se obtuvo una galería de imágenes en Z. Esta fue adquirida con un objetivo de 63x (Zeiss Plan-Apochromat 63x/1,4 Oil Dic ∞/0.17 420728-9900) y con baja resolución (512 x 512) ya que sólo se utilizó para realizar la reconstrucción tridimensional y elegir la dendrita a estudiar. Se buscó el plano Z en el que se distinguía el sector medio del fragmento de interés y se eligió en el menú lateral la opción "*Crop*", lo cual hizo aparecer la ventana de selección de la región de interés (ROI). Se eligió en el menu "*Mode*" la opción de resolución de 2048 x 2048 y se ajustó la ROI a la dendrita (siempre deformándola y nunca proporcionalmente). Se seleccionó un recuadro de entre 50 y 100 µm de largo y del ancho más acotado posible. Se verificó que contemplara todo el proceso de interés recorriendo el eje Z. Seguidamente se ajustó la intensidad de fluorescencia y se delimitó el primer y el último plano en Z con un intervalo de 0,1 µm. Para ajustar la intensidad de fluorescencia se uso la opción "*range indicator*" de la herramienta de "*palette*". Esta permitió ver en rojo los sectores saturados mientras que en azul mostró las zonas sin señal.

Se buscó que el fondo fuera casi completamente azul, mientras que la dendrita y las cabezas de las espinas más grandes estuvieran rojas. En dendritas con muy buena relación señal/ruido, los parámetros aproximados que se utilizaron fueron: ganancia 600-700; umbral -0,25; potencia del láser 20%. El *pinhole* se uso siempre en 1.

El resto de los parámetros se ajustaron en el menú "*Mode*". Se seleccionó 12 bits, escaneado en forma lineal y en una sola dirección, el método en "*mean*" y el número de pasadas en 4. El *Zoom* no se modificó ya que hubiera alterado lo elegido con la herramienta "*Crop*". Finalmente se eligió la máxima velocidad de escaneado buscando un *pixel time* cercano a 1 segundo. Una vez obtenida una colección de entre 100 y 200 planos Z, se realizó la reconstrucción tridimensional de la misma en modo transparente, prestando especial atención al efecto de volumen que se obtuvo variando los diferentes parámetros del menú.

Análisis de la densidad de espinas dendríticas

Imágenes de alta resolución (500-1000 pixeles/μm^2) fueron usadas para este análisis. Utilizando el programa LSM 5 Image Browser (Zeiss) se trazó manualmente el recorrido de la dendrita y se obtuvo la longitud del fragmento de interés. Se contabilizó el número de espinas, considerando que cada proyección perpendicular al eje de la dendrita representaba a una espina. La interpretación visual de la morfología de estas proyecciones fue utilizada para determinar el número de espinas representadas en los casos en que fuera mayor a uno. Debido a una buena relación señal/ruido fue posible incluir en el análisis las cabezas de aquellas espinas que no mostraron continuidad con la dendrita debido al ancho limitado de su cuello. De la división del número de espinas cuantificadas por el largo del fragmento se obtuvo la densidad de espinas expresada en espinas/μm (figura 2-1).

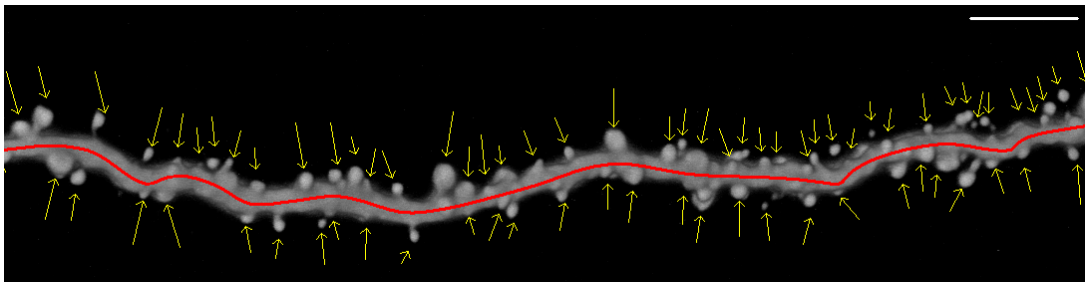


Figura 2-1. Análisis de la densidad de espinas. Las espinas dendríticas fueron identificadas y marcadas manualmente (flechas amarillas). La longitud del fragmento analizado fue obtenida automáticamente al trazar su eje (línea roja). La barra de calibración representa 10 µm.

Análisis morfológicos

Los análisis morfológicos de las características neuronales (longitud total del árbol dendrítico, área del soma, etc.) fueron realizados utilizando el programa LSM 5 Image Browser (Zeiss). Para esto se trazó manualmente el soma y las dendritas de cada neurona en particular sobre la imagen original. Para determinar que todos los procesos medidos pertenecieran a la neurona en cuestión, se utilizo la reconstrucción tridimensional en 360° y la imagen original con todos los planos que la componían. Para considerar que un proceso pertenecía a una neurona debió mostrar continuidad desde el cuerpo neuronal. El largo dendrítico total se calculó sumando la longitud de todos los procesos medidos individualmente. El área del soma se obtuvo automáticamente trazando el perímetro de los mismos.

Infección retroviral simple y doble

La infección con retrovirus que solamente expresan GFP permitieron la visualización de las neuronas nuevas gracias a que los promotores utilizados para su expresión mostraron niveles elevados y sostenidos. Sin embargo, las neuronas infectadas con las construcciones retrovirales portando APP o alguna de sus variantes mostraron niveles insuficientes de GFP para estudiar su morfología en detalle. Para sortear este problema, se mezcló en la misma

inyección estereotáxica un retrovirus portando únicamente RFP (en una relación APP-GFP/RFP de 2:1). De esta forma se generaron tres poblaciones de neuronas marcadas. Unas verdes infectadas con el retrovirus con APP; otras rojas, solamente infectadas con el virus RFP y una tercera población infectada con ambos virus (amarillas, figura 2-2). De esta manera y mediante la inmunmomarcación contra GFP y RFP para amplificar ambas señales se pudo estudiar en detalle la morfología (utilizando la marca de RFP) en aquellas neuronas expresando APP o sus variantes (corroborado por expresión somática de GFP). Las inmunofluorescencias para la doble marcación GFP y RFP fueron realizadas usando anticuerpos anti RFP (policlonal de conejo; 1:200; Chemicon) y anti GFP (pollo; 1:200; Invitrogen). Los anticuerpos secundarios usados fueron burro anti-pollo Cy2 (1:500) y burro anti-conejo Cy3 (1:500; Jackson ImmunoResearch).

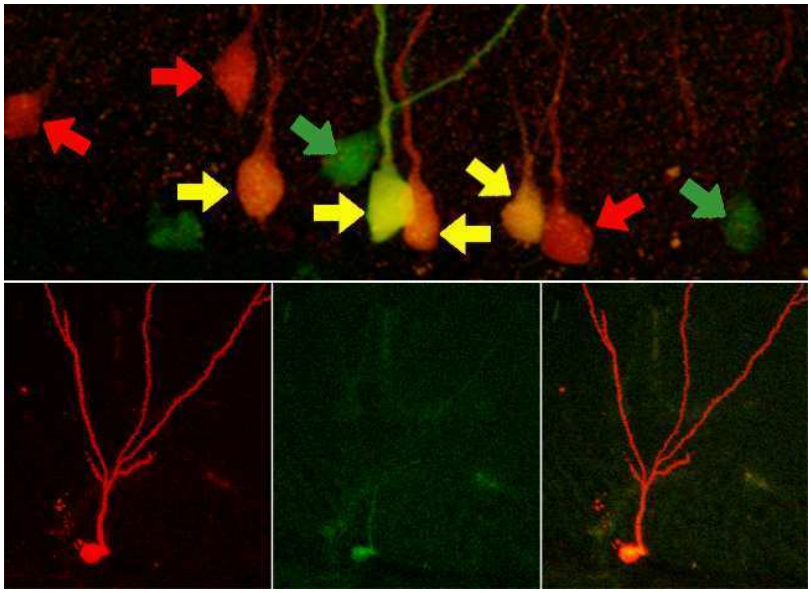


Figura 2-2. Doble infección retroviral. La co-marcación con RFP fue necesaria para el análisis morfológico de las neuronas expresando APP y GFP. En el panel superior se muestran las tres poblaciones generadas: RFP (flechas rojas), APP-GFP (flechas verdes) y RFP+APP-GFP (flechas amarillas). En los paneles inferiores se muestra un ejemplo de una neurona infectada con ambas construcciones en el canal rojo, el canal verde y la superposición de ambos.

Microscopía de fluorescencia y análisis de la distribución de las neuronas granulares en la GCL.

La distribución de las neuronas granulares estudiadas en la parte 1 de los resultados se realizó mediante microscopía de fluorescencia convencional utilizando un microscopio invertido (Zeiss Axiovert 135M). Se obtuvieron imágenes con un objetivo de 20x de secciones de hipocampo previamente infectadas con GFP (E15, P7 o P42) y teñidas con DAPI. Utilizando Adobe Photoshop se obtuvieron reconstrucciones digitales de secciones completas del giro dentado presentando más de 25 células GFP+, la identidad neuronal de estas fue confirmada por su morfología. Se dividió la capa granular en tercios y se asignó a cada soma GFP+ un sector de pertenencia. Se cuantifico la distribución de las neuronas granulares en cada tercio de la GCL (figura 2-3).

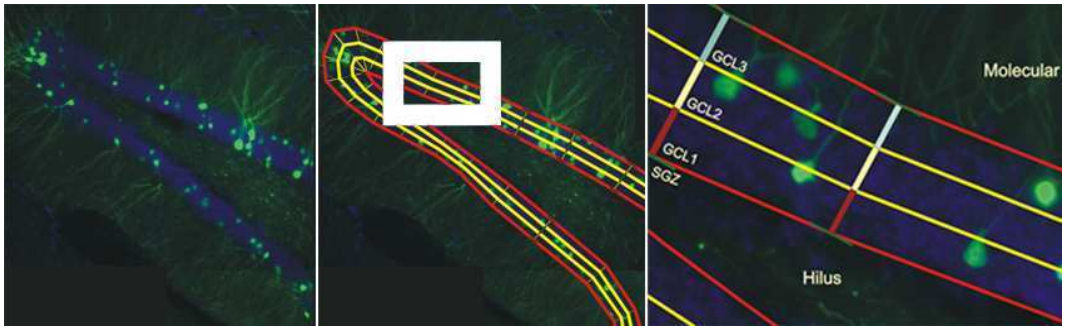


Figura 2-3. Análisis de distribución neuronal en la GCL. Utilizando la marcación con DAPI en las imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia se trazaron los limites de la capa granular (líneas rojas). La división proporcional de la misma (líneas amarillas) delimitó los tercios interno (GCL1), medio (GCL2) y externo (GCL3). Se cuantificó el número de somas GFP+ contenidos en cada división.

Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando T-test y ANOVA de una vía seguidos por *post hoc* test de Tukey o Bonferroni en el caso de las

comparaciones múltiples entre todos los grupos o bien usando el test de Dunnett para comparar diferentes grupos contra el control. En los pies de figura se detallan los *n* y *p* correspondientes.

Electrofisiología

Setup

Los registros fueron obtenidos usando un amplificador Axopatch 200B (Molecular Devices), digitalizados (Digidata 1322A; Molecular Devices), y adquiridos entre 10 y 50 kHz en una PC usando el programa p-Clamp 9 (Axon CNS, Molecular Devices). El setup se completa con un microscopio Leica DM LFS y una cámara CCD Hammamatsu ORCA-ER.

Preparación de rebanadas agudas

Tras la anestesia profunda con ketamina+xilazina se sacrificó a los animales por decapitación. Los cerebros fueron colocados en una solución semicongelada conteniendo (mM): 110 colina-Cl, 2,5 KCl, 2,0 NaH_2PO_4, 25 $NaHCO_3$, 0,5 $CaCl_2$, 7 $MgCl_2$, 20 dextrosa, 1,3 Na-ascorbato, 3,1 Na-pyruvato, 4 kynurenico. El hemisferio derecho fue cortado horizontalmente con un vibratomo (Leica VT 1200S, velocidad 0,07 mm/s; amplitud 1,20 mm) en secciones de 400 µm de espesor. Estas fueron mantenidas en una cámara sumergida en líquido cefalorraquídeo artificial (LCRA) conteniendo (mM): 125 NaCl, 2,5 KCl, 2,3 NaH_2PO_4, 25 $NaHCO_3$, 2 $CaCl_2$, 1,3 $MgCl_2$, 1,3 Na-ascorbato, 3,1 Na-pyruvato y 10 dextrosa. Las rebanadas fueron burbujeadas con 95% O2/ 5% CO2 (315 mOsm) y mantenidas a 30℃ durante una hora para su recuperación. Los registros fueron realizados en LCRA a temperatura ambiente usando microelectrodos (5–8 MΩ) estirados de vidrio de borosilicato (KG-33, King Precision). El LCRA fue suplementado con 100 µM de picrotoxina para bloquear la neurotransmisión GABAérgica.

Los microelectrodos de registro fueron llenados una solución interna incluyendo (mM): 120 K-gluconato, 10 Hepes, 0,1 EGTA, 4 $MgCl_2$, 5 NaCl, 20 KCl, 4 Tris-ATP, 0,3 Tris-GTP, 10 fosfocreatina y Alexa Fluor 488 o 594 (10 µg/ml; Invitrogen), a pH 7,3 y 290 mOsm. Todos los productos químicos utilizados fueron comercialmente obtenidos de Sigma.

Protocolos y Análisis

Para el diseño de los protocolos y la adquisición de los datos se utilizó el programa p-Clamp 9.0. Para el análisis de los registros obtenidos en *voltage-clamp* se realizaron las mediciones que se detallan a continuación. Las propiedades pasivas fueron calculadas aplicando un escalón de corriente hiperpolarizante de 10 mV. La resistencia de membrana (Rinput) fue medida como la diferencia entre la línea de base y el estado estacionario de la deflexión. La capacitancia de membrana fue obtenida midiendo el área bajo la corriente capacitiva. La estimulación extracelular de la vía perforante fue realizada cada 30 s y con intensidades entre 20 y 600 µA por 50 µs usando electrodos concéntricos bipolares o monopolares (Frederick Haer Company) y un estimulador Iso-Flex (A.M.P.I.). El electrodo de estimulación fue ubicado en el tercio medio de la capa molecular anti u ortodromicamente alejado del soma de la neurona a registrar. La amplitud máxima de las corrientes postsinápticas evocadas (EPSCs y plasticidad por pulso pareado) fueron medidos del promedio de 4 repeticiones para cada estimulo utilizando el programa Clampfit. Las corrientes postsinápticas espontáneas (sEPSCs) fueron filtradas a 2 kHz durante el registro y filtradas digitalmente a 1 kHz. La detección de los eventos se hizo posteriormente utilizando el programa Mini Analysis software (Synaptosoft [http://www.synaptosoft.com/MiniAnalysis/]). Los parámetros utilizados para la detección fueron: amplitud 2,5 pA; área umbral: 10; todos los eventos fueron validados manualmente y los artefactos descartados por inspección visual. La corriente umbral para el disparo de potenciales de acción fue estudiada mediante escalones sucesivos de 5 pA hasta encontrar la primer espiga. Las corrientes voltaje dependientes de sodio y potasio fueron medidas tras un protocolo de *leak substraction* midiendo el pico rápido de la deflexión negativa y el estado estacionario de la

deflexión positiva, respectivamente. En todos los registros de *voltage-clamp* se fijó la membrana a -60 mV. El análisis de los registros obtenidos en *current-clamp* para evaluar la capacidad de disparar potenciales de acción fue realizado cuantificando manualmente el número de espigas evocadas para cada escalón de corriente inyectado.

Para estandarizar experimentos realizados en rodajas diferentes se normalizó la intensidad del estímulo midiendo la proporción de células granulares activadas (*population spike*). Se utilizó un microelectrodo con ClNa 3 M para registrar en el área cercana a la neurona de interés el potencial extracelular evocado por estímulos crecientes (escalones de 20 pA cada 15 segundos). El análisis simultáneo permitió medir la amplitud del *population spike* reflejado en el primer pico de la respuesta. Así se realizó una curva de calibración que relaciona el estímulo de corriente con la proporción de axones activados en la vía estimulada, alcanzando el nivel máximo de saturación (100% del estímulo). Para los experimentos de conectividad se utilizaron estímulos del 100, 75, 50 y 25% del total.

El criterio para incluir a las células en el análisis fue 1) que la vía de estimulación utilizada muestre un popSpike > 1,5 mV; 2) tener corrientes de *leak* menores a 50 pA; 3) tener resistencia de acceso menor a 45 MΩ (típicamente fue menor a 25 MΩ); 4) marcado de la neurona de interés con el Alexa fluor correspondiente (594 para neuronas GFP+ o 488 para neuronas RFP+).

RESULTADOS

Parte 1 - Distribución de las neuronas en la capa granular a lo largo de la vida.

Introducción

El estudio del desarrollo del giro dentado se remonta a los años ‘60 cuando los grupos de Angevine y Altman (Angevine, 1965; Altman & Das, 1965) utilizando timidina tiritada describieron la forma en que se genera esta estructura en los roedores. La capa granular comienza a desarrollase hacia el final de la embriogénesis, pero mas del 80% de las neuronas granulares son generadas durante la vida postnatal temprana (Altman & Bayer, 1990). Así, la morfogénesis del giro dentado no concluye con la gestación sino que se extiende a la etapa postnatal temprana (primer mes de vida en roedores) y luego la neurogénesis continúa durante toda la vida del individuo.

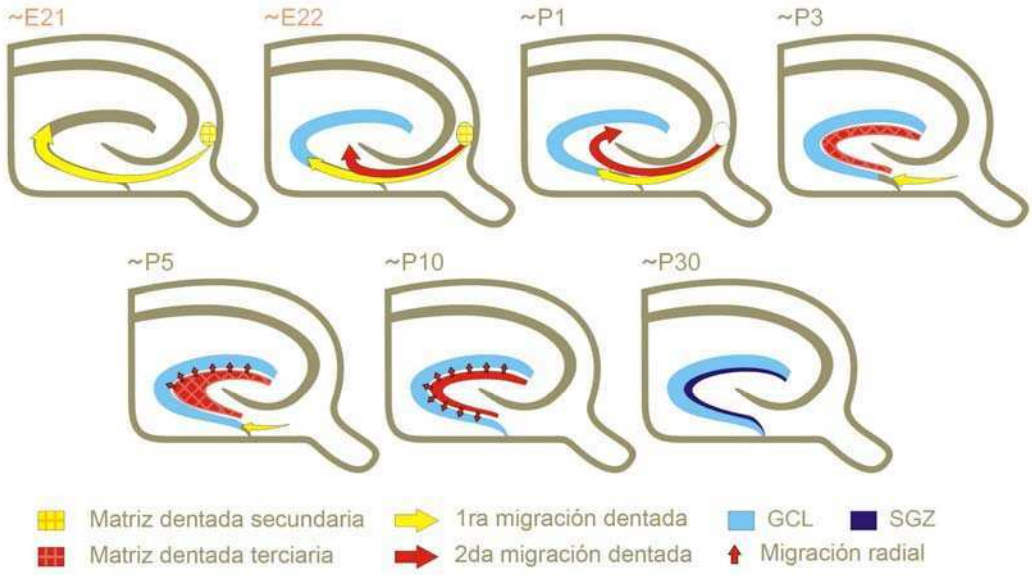


Figura 3-1. Desarrollo del giro dentado. En ratas y ratones las NPCs de la matriz dentada secundaria migran para formar el giro dentado externo (E21-P5, amarillo). Una segunda migración dentada da lugar a la formación de la matriz terciaria (E22-P10, rojo) desde la cual se producirá la migración radial de NPCs hacia los estratos internos de la

GCL. Cerca de P30 la proliferación celular se limita al SGZ, donde se generarán neuronas nuevas durante toda la vida. E: embrional, P: postnatal, GCL: capa granular, SGZ: zona subgranular.

Tanto en ratones como en ratas, la formación del giro dentado comienza con la migración de las células progenitoras neurales desde el neuroepitelio primario para generar la matriz dentada secundaria. Desde aquí, cerca de E20 se produce la primera migración de progenitores hacia lo que será la estructura externa de la capa granular (figura 3-1, E21). Los progenitores se posicionan primero en el extremo más lejano de la rama suprapiramidal, desde donde la capa granular progresa hasta completarse. Así, se genera un gradiente espacial en la edad de las neuronas granulares dado por la forma en que las células progenitoras se mueven hacia su posición final. Esta primera oleada neurogénica aporta solamente un 20% de las células granulares totales del giro dentado (Piatti, 2006).

Durante la primera semana de vida se produce una segunda migración cuyo destino es la matriz dentada terciaria, ubicada en el lugar que posteriormente ocupará del hilus (figura 3-1, E22-P1). Entre P5 y P10 los progenitores migran desde aquí radialmente para generar el 80% restante de las neuronas granulares. Estas darán origen a las capas internas de la GCL. Después del día 20 posnatal, las células proliferativas se restringen a la zona subgranular, siendo esta la fuente principal de neuronas granulares durante la vida adulta (figura 3-1, P30).

Objetivos y diseño experimental

Debido a que en la morfogénesis del giro dentado participan poblaciones neuronales de origen embrionario, postnatal y adulto, resulta importante saber si la capa granular del giro dentado adulto refleja de alguna manera esta segregación temporal o si, por el contrario, con el tiempo se vuelve homogénea debido a la continua producción de neuronas nuevas.

Para contestar este interrogante diseñamos un experimento que permitió identificar las poblaciones neuronales provenientes de las distintas oleadas de progenitores que tienen lugar durante el desarrollo del giro dentado e investigar la forma en que se distribuyen en la capa granular. La transducción de proteínas fluorescentes mediante la infección retroviral permite visualizar en detalle las células infectadas. Debido a que la integración del genoma viral al ADN celular es sólo posible cuando la membrana del núcleo se fracciona durante la mitosis, el tropismo retroviral se limita a aquellas células que se encuentran en la fase de división (Lewis & Emerman, 1994). Así, la inyección de retrovirus en el giro dentado permite marcar las NPCs y poder estudiar su progenie. Esta técnica, además, es útil para conocer con precisión la edad de las neuronas marcadas. Debido a que la infectividad de los retrovirus decae pocas horas después de ser inyectados, se puede estimar el tiempo que transcurre desde la división celular hasta el momento en que se sacrifica al animal para su estudio.

En distintos grupos de ratones C57BL/6 se realizó la inyección de un retrovirus expresando GFP para marcar las tres oleadas proliferativas por separado. Para la neurogénesis embrional se inyectó un grupo de forma intracerebroventricular en el día quince de gestación (E15). Para marcar la neurogénesis posnatal temprana, otro grupo fue inyectado estereotáxicamente en el giro dentado del hipocampo de ratones de 7 días de edad (P7) y para la neurogénesis adulta un tercer grupo de ratones recibió una inyección en el giro dentado entre la sexta y séptima semana de vida (P42).

Se estudió la forma en que las neuronas marcadas se distribuyen en la capa granular tras un periodo mayor a seis semanas (figura 3-3 A). Se considero que dicho lapso sería suficiente para que las neuronas granulares recién generadas alcancen su maduración completa y su ubicación definitiva en la GCL.

La marcación retroviral de NPCs como herramienta para estudiar distintas cohortes neuronales del giro dentado.

Antes de poder alcanzar este objetivo fue necesario comprobar si una población de progenitores que se divide durante la transducción retroviral e incorpora el marcador fluorescente podría continuar dividiéndose más tarde. De ser así, la población marcada por transducción retroviral no representaría una única cohorte neuronal sino que podría contener un continuo de neuronas generadas en diferentes momentos del desarrollo. Para ello se inyectó un retrovirus que expresa GFP en el giro dentado de ratones el día postnatal 7 (P7). Dos semanas más tarde se les administró una inyección intraperitoneal diaria de 50 mg/kg de BrdU durante 5 días (figura 3-2 A). De esta manera, las células marcadas con GFP que continuaran dividiéndose dos semanas más tarde incorporarían también BrdU. Los cerebros fueron analizados luego de cuatro semanas, momento en que todas las células marcadas con GFP y BrdU habrían alcanzado el estado de neurona madura (Espósito et al., 2005).

Los animales fueron anestesiados y perfundidos, y los cerebros cortados en secciones de 40 µm. Las secciones fueron sometidas a inmunofluorescencia para detectar GFP (verde) y BrdU (rojo). Se utilizó además un anticuerpo contra NeuN, un factor de transcripción nuclear presente en muchas poblaciones neuronales, para marcar los núcleos, permitiendo visualizar la capa granular y neuronas adyacentes (azul, figura 3-2). Se analizó entonces la proporción de neuronas GFP+ que además fueron marcadas con BrdU.

La transducción retroviral de GFP en células en división permitió observar en gran medida la morfología de las neuronas nuevas y de esta forma distinguirlas de otros tipos celulares. Presentaron características típicas de neuronas granulares maduras con un soma redondo y regular localizado en los estratos más internos de la GCL. Mostraron dendritas principales apicales que llegaron hasta la capa molecular donde se ramificaron y extendieron hasta alcanzar la fisura del hipocampo. En algunos casos se observó también el segmento inicial del axón. Contrariamente, la marcación de neuronas

nuevas con BrdU sólo posibilitó la visualización del núcleo celular limitando su utilidad a estudios cuantitativos. Se comprobó que los núcleos BrdU+ correspondieran a neuronas evaluando la colocalización con NeuN.

A pesar de la gran cantidad de células marcadas con GFP o BrdU, el porcentaje de neuronas que incorporaron ambos marcadores no superó el 2%. Por lo tanto, podemos concluir que aquellas células marcadas con GFP representaron una cohorte neuronal generada en P7, y no continuaron dividiéndose posteriormente. Estos datos indicarían que podemos utilizar esta metodología para marcar poblaciones discretas de neuronas granulares generadas en diversos estadios peri y postnatales.

El 2% de neuronas que se marcaron con ambas técnicas podría estar determinado por una pequeña población de células madre neurales de división lenta que fueron infectadas al momento de la inyección del retrovirus y posteriormente reingresaron al ciclo celular en el momento de la inyección de BrdU como “progenitores de amplificación transitoria” los cuales finalmente se diferenciaron a neuronas granulares. Dado que el lapso entre las dos marcaciones fue de dos semanas resultaría improbable que en ambos casos se hubieran marcado los mismos progenitores de amplificación ya que estos no continuarían dividiéndose por tanto tiempo. Tampoco parecen haberse marcado las células madre neurales con ambas herramientas ya que, si este fuera el caso, se hubieran encontrado neuronas GFP+ y BrdU+ inmaduras debido al menor tiempo que hubieran tenido para diferenciarse.

Llama la atención el hecho de que una única inyección de retrovirus en P7 haya conseguido marcar un número de células similar al de 5 inyecciones de BrdU entre P21 y P25. A pesar de ser administrado por vía sistémica, BrdU tiene una eficiencia de marcación superior a la de los retrovirus. Por lo tanto, esta similitud en el número de células GFP+ y BrdU+ podría deberse a una diferencia en la proliferación de las NPCs. Como se ve en la figura 3-1, la infección retroviral coincidió con el momento de máxima proliferación y migración radial desde la matriz dentada terciaria hacia la GCL. Por su parte,

la inyección de BrdU fue realizada cuando las NPCs comenzaron a verse restringidas a la SGZ. Por lo tanto, parecería existir una disminución de la proliferación de las NPCs dada por una reducción en su número más que por una menor tasa de proliferación de las mismas. Esto tendría como resultado final una menor producción de neuronas lo cual explicaría la similitud encontrada con técnicas de eficiencia tan diferente.

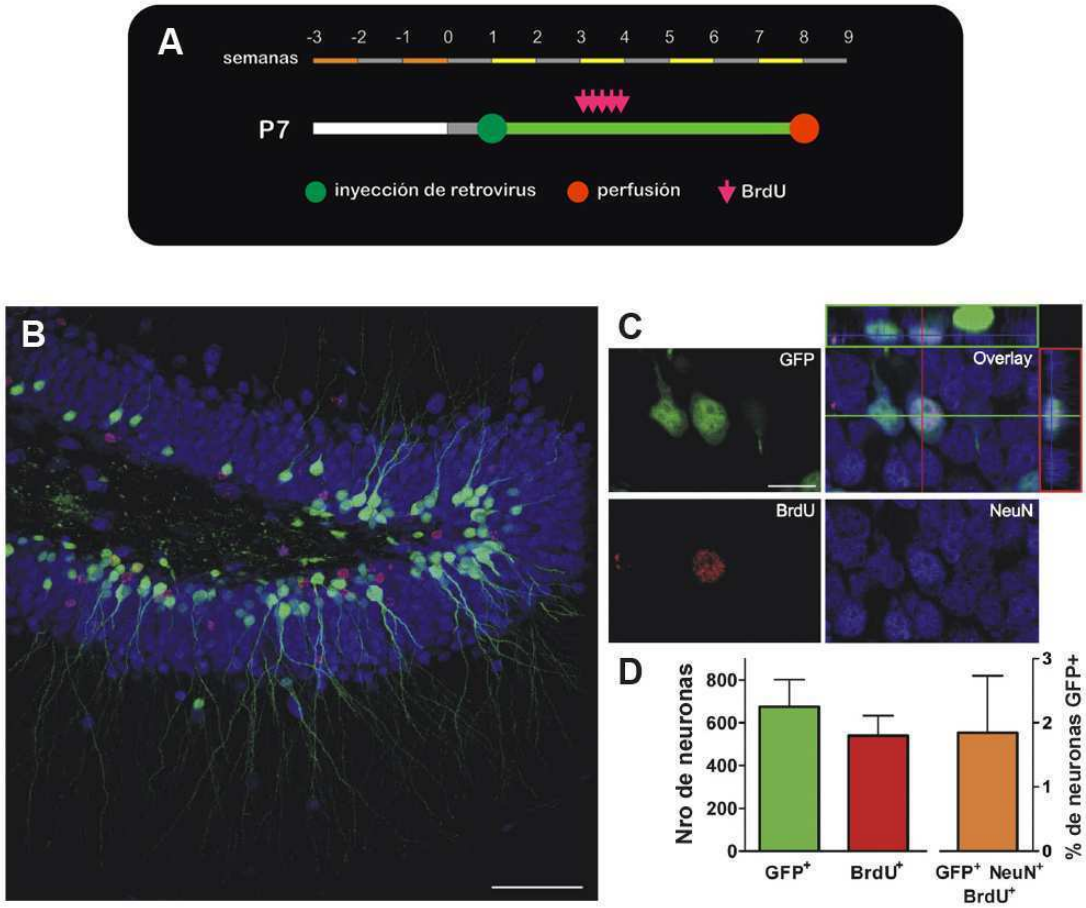


Figura 3-2. Las neuronas generadas en P7 no continúan dividiéndose. A, Se infectaron NPCs en el giro dentado de ratones de 7 días de edad y luego de dos semanas se les administraron 5 dosis de BrdU. Cuatro semanas más tarde se fijaron los animales y estudiaron los cerebros. B, reconstrucción de 16 planos confocales mostrando el giro dentado de un ratón de ocho semanas. En el mismo se pueden ver neuronas granulares nacidas en P7 marcadas con GFP (verde) y núcleos celulares que incorporaron BrdU entre P21 y P25 (rojo). La capa granular fue marcada con NeuN (azul). C, ejemplo de un infrecuente

caso de colocalización de GFP, BrdU y NeuN en un mismo plano confocal en los canales verde, rojo y azul, respectivamente. Se muestra también la superposición de los mismos (*overlay*) junto con las proyecciones ortogonales en los planos x-z (arriba) y y-z (derecha). D, Número de células GFP+ o BrdU+ por ratón (izquierda) y porcentaje de células GFP+ expresando BrdU (derecha). Los datos son la media ± el error estándar de la media (SEM) (n=3 ratones). La barra de calibración corresponde a 50 µm en B y 10 µm en C.

Distribución de las neuronas granulares nacidas en distintas etapas del desarrollo y adulto en la GCL

Para estudiar de qué manera de distribuyen las células granulares generadas en los distintos estadios se realizaron marcaciones retrovirales con GFP en el giro dentado de ratones en E15, P7 y P42. Tras un lapso mayor a seis semanas, los animales fueron perfundidos y los cerebros cortados en secciones de 40 µm. Las secciones fueron teñidas con DAPI para la visualización de la GCL. Mediante microscopía de fluorescencia convencional se obtuvieron reconstrucciones del giro dentado y se contabilizó el número de somas neuronales GFP+ en los tercios interno, medio o externo de la GCL (figura 3-3 A).

La figura 3-3 muestra ejemplos de secciones de los cerebros analizados obtenidos mediante microscopía confocal. En las imágenes se observa que en los animales inyectados en E15 los cuerpos neuronales se distribuyen uniformemente en los tres tercios de la GCL (figura 3-3 B y C). Por el contrario, las neuronas generadas durante la vida postnatal temprana se ubicaron en los estratos interno y medio (figura 3-3 D y E). En cambio, las neuronas nacidas en la adultez se distribuyeron principalmente en la capa interna de la GCL (figura 3-3 F y G).

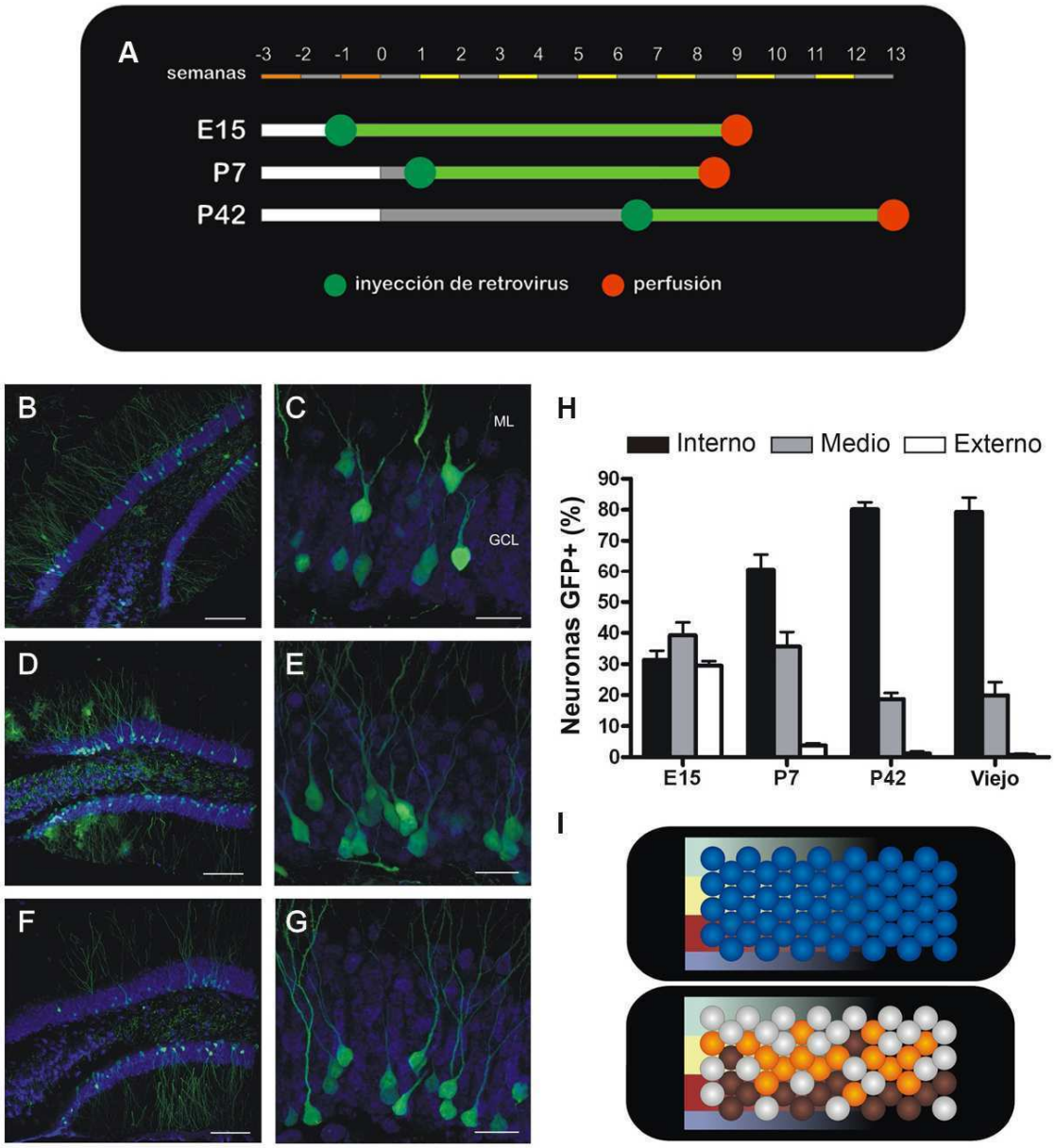


Figura 3-3. Distribución en la GCL de las DGCs generadas en distintos momentos del de desarrollo. A, se marcaron con retrovirus tres poblaciones de NPCs correspondientes a la neurogénesis embrional, postnatal temprana y adulta. Más de seis semanas después se prefundieron los animales para su análisis. B-G Imágenes confocales de secciones transversales del giro dentado adulto mostrando la distribución de las neuronas GFP+ (verde) marcadas en E15 (B y C), P7 (D y E) o adulto (F y G). Las imágenes son reconstrucciones de 16-20 planos confocales obtenidas con una magnificación de 20x o 40x. La GCL fue inmunomarcada con el marcador neuronal NeuN (azul). H, cuantificación de la distribución de las neuronas granulares nacidas a diferentes edades, normalizado al numero total de células GFP+ en la

GCL. Los datos son la media ± SEM [n=775 células de 3 ratones inyectados en E15 y contados 10 semanas más tarde; 691 células de 3 ratones inyectados en P7 y contados 7 semanas después; 537 células de 3 ratones inyectados en P42 y contados 6 semanas después y 227 células de 3 ratones inyectados en P42 y contados 7-15 meses más tarde (Viejo)]. GCL: capa granular, ML: capa molecular. Las barras de calibración son de 100 µm en B, D, F y de 20 µm en C, E, G. I, esquema que ilustra la forma en que se distribuyen las DGCs nacidas en diferentes momentos en la GCL (blanco: E15, anaranjado: P7, marrón: adulto/viejo) y que no lo hacen homogéneamente (azul) como se creía anteriormente.

La cuantificación de este experimento demuestra que la capa granular no es homogénea en cuanto a la composición de las neuronas granulares, sino que muestra una organización estratificada donde las capas más externas están conformadas por neuronas generadas durante el desarrollo y las capas más internas tienen una fuerte contribución de las neuronas generadas en el animal adulto (figura 3-3 H).

Visualización simultanea de dos poblaciones en el mismo giro dentado

Para observar la coexistencia de las poblaciones neuronales generadas durante el desarrollo con la neurogénesis adulta, se utilizó además del virus que expresa GFP, un virus expresando RFP. La realización de dos cirugías sucesivas en un mismo animal hizo posible la marcación de dos poblaciones neuronales en el giro dentado.

Un grupo de ratones se inyectó en E15 con un virus expresando GFP y en P42 con RFP. Otro grupo fue infectado con un virus expresando GFP en P7 y con RFP en P42. Los animales fueron sacrificados a las 13 semanas de edad y los cerebros cortados en secciones que fueron marcadas con anticuerpos contra GFP (verde), RFP (magenta) y NeuN o DAPI (azul).

En la figura 3-4 A se ve cómo las neuronas marcadas en E15 se distribuyen homogéneamente en la GCL mientras que las nacidas en el adulto se limitan al tercio interno. En la figura 3-4 B se observa como la población marcada en P7 ocupa los dos tercios internos de la GCL mientras que las nacidas en P42 quedan ubicadas en el estrato mas interno.

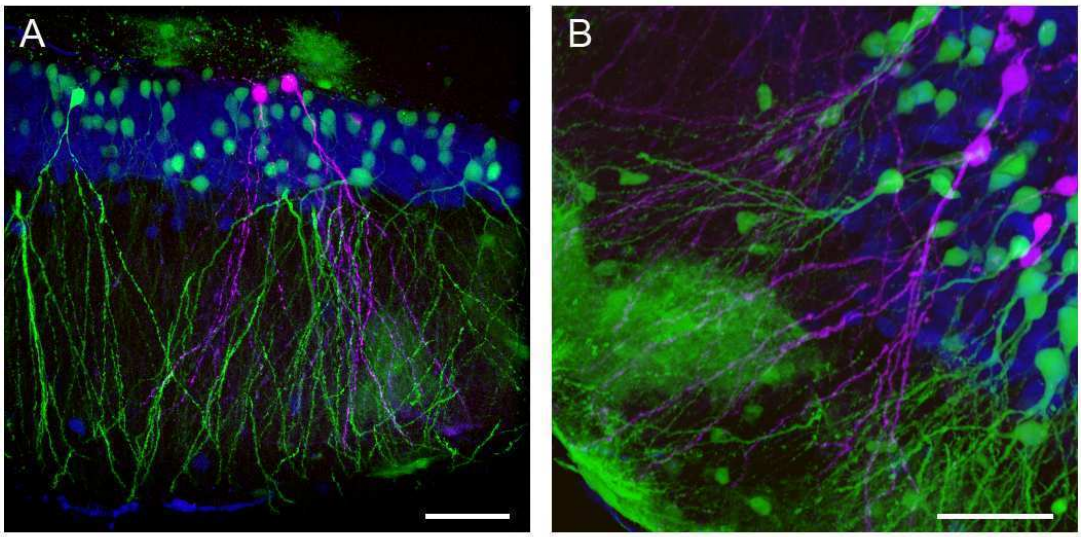


Figura 3-4. Doble marcación retroviral. A, imágenes confocales de neuronas granulares nacidas durante el desarrollo embrionario (E15) marcadas con GFP (verde) coexisten en la misma sección con neuronas granulares nacidas en el adulto, expresando RFP (magenta). B, Doble marcación retroviral de neuronas nacidas en P7 (GFP, verde) y en el adulto (RFP, magenta). Las imágenes son proyecciones de 43 (A) y 60 (B) planos confocales obtenidos de cerebros de 13 semanas de edad. Las barras de calibración representan 50 µm.

De esta forma se pudo mostrar en una misma imagen cómo diferentes poblaciones neuronales se ubican en estratos particulares de la GCL. La ausencia de neuronas marcadas con ambas proteínas fluorescentes es consistente con los resultados obtenidos del experimento de BrdU. Si se hubieran encontrado neuronas coexpresando GFP y RFP podría pensarse que las células que proliferaron durante el desarrollo vuelven a dividirse durante la vida adulta.

Persistencia de neuronas nuevas en animales envejecidos

El patrón de distribución en la GCL de las distintas cohortes neuronales podría deberse a una diferencia en la tasa de migración de estas o bien a diferentes requerimientos de tiempo para alcanzar su posición definitiva. Podría ser que las neuronas generadas en el hipocampo adulto llegaran a las capas más externas de la GCL luego de un período de migración más prolongado. Para investigar esta posibilidad se marcó una cohorte de neuronas generadas en P42 y se monitoreó su distribución en la GCL luego de 7 a 15 meses en animales con libre acceso a una ruedita para correr. Notablemente, encontramos que la distribución de estas neuronas granulares fue muy similar a aquella observada tras intervalos más cortos (figura 3-3 H, viejo). Estos resultados indican que el tiempo de migración no es un factor limitante que determine la localización de las neuronas generadas en el hipocampo adulto en el tercio interno de la GCL.

Conclusiones

En este capítulo mostramos que la GCL adulta no es una capa celular homogénea. Vimos que la misma se encuentra compartimentalizada en estratos concéntricos diferentes en cuanto al origen de las neuronas que los componen. Estos resultados además indican que la localización de cada neurona en la GCL esta condicionada por el momento en que fue generada y no por el nivel de desarrollo o maduración que hubiese alcanzado. Esta organización celular podría deberse a que la capa granular que es altamente compacta. Por lo tanto, para las neuronas que progresivamente se suman al giro dentado resultaría más económico ubicar su soma en los estratos más próximos a la SGZ y extender su dendrita principal a través de la GCL para alcanzar la capa molecular. De esta forma, las neuronas granulares nuevas contactarían sus aferentes sin tener que migrar entre la gran densidad de neuronas que componen la GCL.

Sin embargo, nuestros experimentos se limitaron a observaciones anatómicas sin estudiar las características funcionales de las diferentes poblaciones neuronales. Si cada cohorte neuronal actuara en conjunto cumpliendo un rol diferente en la funcionalidad del giro dentado, su proximidad física podría ser necesaria para permitir, por ejemplo, el acoplamiento eléctrico entre neuronas generadas en momentos similares.

Nuestros experimentos alcanzaron a neuronas de hasta 15 meses, por lo que no es posible descartar que en etapas posteriores esta organización se vea alterada. Sería interesante conocer si las neuronas nacidas en el contexto del cerebro envejecido alteran o no su patrón de migración.

Parte 2 – Efectos del envejecimiento y la neurodegeneración sobre la neurogénesis adulta

Introducción

El envejecimiento se caracteriza por la disminución de las funciones cognitivas, sensoriales y motoras en consonancia con cambios moleculares, celulares y estructurales (Mattson & Magnus, 2006). Alteraciones en diferentes mecanismos de plasticidad neuronal han sido propuestos como responsables de este deterioro (Burke & Barnes, 2006). Como ya se ha dicho, el hipocampo no escapa a los efectos del tiempo. La disminución en el número de contactos sinápticos que reciben las neuronas granulares del giro dentado inducida por el envejecimiento se acompaña de una menor plasticidad sináptica, reflejada en un aumento del umbral necesario para inducir LTP y una facilitación para producir LTD (Burke & Barnes, 2006). La neurogénesis en el giro dentado también se encuentra afectada en el envejecimiento. El número de neuronas nuevas que se generan disminuye abruptamente con la edad debido a que los NPCs reducen su tasa de proliferación (Kuhn, 1996; McDonald, 2005; Rao, 2005), disminuyen en número (Olariu & Cameron, 2007) y cambian su diferenciación hacia destinos no neuronales (Kempermann, 1998; van Praag, 2005). Esta disminución de la neurogénesis ha sido propuesta como una de las causas del deterioro cognitivo que se observa durante el envejecimiento (Bizon, 2003; Drapeau et al., 2003; Kempermann, 2004). Es más, estímulos que promueven de la neurogénesis como el ejercicio aeróbico o el enriquecimiento ambiental mejoran el desempeño de animales senescentes en paradigmas de aprendizaje espacial como el laberinto acuático de Morris. Esto indicaría que la neurogénesis adulta se encuentra relacionada con el deterioro cognitivo asociado a la edad (Kempermann, 1998; van Praag, 2005). A pesar de que existen múltiples evidencias de que la neurogénesis decae con la edad, poco se sabe de las características que presentan las neuronas generadas en el giro dentado envejecido.

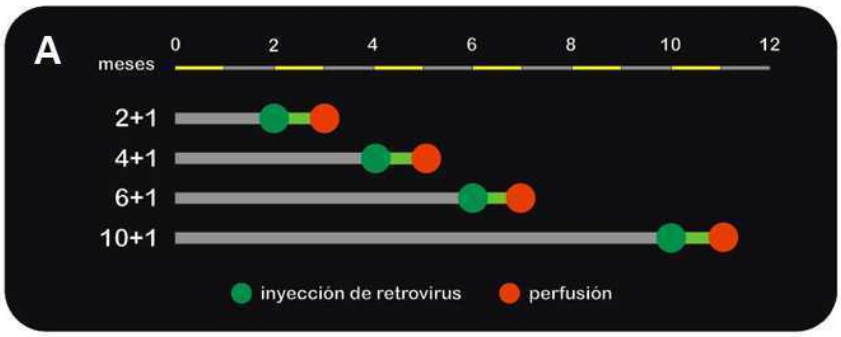
Objetivos y diseño experimental

Los cambios que el envejecimiento produce en el cerebro han sido vinculados con los déficits cognitivos asociados a la vejez. Estudiar de qué manera la plasticidad neuronal se ve afectada en distintos momentos de la vida resulta relevante para comprender mejor los procesos que subyacen a estas alteraciones. En este capítulo se estudió la neurogénesis porque la misma engloba múltiples procesos que contribuyen a la plasticidad de los circuitos cerebrales y que podrían verse afectados a lo largo de la vida. La producción de nuevas neuronas requiere de la proliferación, migración, formación de dendritas y sinapsis por parte de los progenitores neurales. Si alguno de estos procesos se afectara por el envejecimiento, podría manifestarse como alteraciones en la neurogénesis adulta. Experimentos previos realizados con BrdU han demostrado que la cantidad de neuronas que se generan disminuye a medida que el cerebro envejece (Kuhn, 1996; Kempermann, 1998; McDonald, 2005; van Praag, 2005; Rao, 2005). Hemos visto que la transducción de GFP mediante la infección retroviral permite el estudio detallado de las neuronas nuevas (van Praag et al., 2002; Ming & Song, 2005). Por lo tanto decidimos utilizar inmunofluorescencia y microscopía confocal para testear si esta herramienta resultaba útil también para cuantificar la disminución en la proliferación de los NPCs descripta durante el envejecimiento.

Las espinas dendríticas representan el correlato morfológico de los contactos glutamatérgicos que reciben las neuronas granulares. Basados en que la transducción retroviral de GFP posibilita su visualización detallada, se utilizó inmunofluorescencia y microscopía confocal para evaluar el proceso de sinaptogénesis estudiando la densidad de espinas que adquieren las neuronas maduras en el giro dentado envejecido.

Disminución de la neurogénesis durante el envejecimiento

Para validar que mediante la marcación retroviral también es posible observar la caída de la neurogénesis previamente descripta con BrdU, realizamos un experimento que nos permitió estudiar la dinámica que sigue la neurogénesis durante el envejecimiento. Cuatro grupos experimentales fueron unilateralmente inyectados con retrovirus en el giro dentado a diferentes edades (2, 4, 6 y 10 meses, figura 4-1 A). Un mes más tarde fueron perfundidos y sus cerebros cortados en secciones de 40 µm. Estas secciones fueron marcadas por inmunofluorescencia con un anticuerpo contra NeuN para delimitar la capa granular y otro contra GFP para mejorar su señal. Tomando una de cada 3 o cada 6 secciones cuantificamos el número de neuronas encontradas en cada caso (figura 4-1 B).



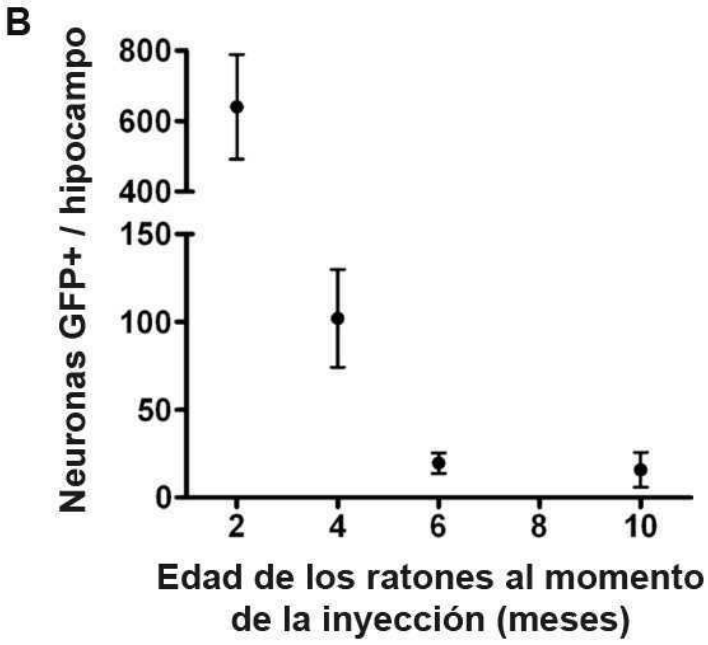


Figura 4-1. Disminución de la neurogénesis con el envejecimiento. A, se realizaron inyecciones de retrovirus en ratones de 2, 4, 6 y 10 meses. Se perfundieron los animales un mes más tarde. B, una de cada 3 o 6 secciones fue usada para contar células GFP+ con el objetivo de estimar en número total de células por hipocampo. Los puntos representan la media ± SEM obtenido de 7, 5, 7 y 4 ratones de 2, 4, 6 y 10 meses respectivamente. El número total de neuronas marcadas fue significativamente diferente a los 2 meses respecto del resto de los grupos (ANOVA con $P< 0.0001$, seguido de un post hoc test de Tukey).

Si bien en todos los puntos de tiempo estudiados se encontraron células GFP+, el número de neuronas encontradas disminuyó abruptamente con la edad. Entre los puntos de 2 y 10 meses se observó una disminución de aproximadamente 40 veces. Este descenso fue más marcado que el que se observó con BrdU (Kuhn, 1996; Kempermann, 1998; McDonald, 2005; van Praag, 2005; Rao, 2005). La diferencia podría estar dada por la menor eficiencia que tiene el retrovirus para marcar células granulares nuevas (van Praag, 2005) o bien estar vinculada a la respuesta inflamatoria que produce su inoculación. El cerebro a medida que envejece se vuelve más susceptible a la inflamación y esto hace que los NPCs aumenten su diferenciación hacia glía. Si el menor número de neuronas encontrado durante el envejecimiento se debiera solamente a un aumento en la proporción de NPCs que se diferencian a glía como respuesta a la cirugía, la disminución de neuronas debería acompañarse de un marcado aumento en la cantidad de células gliales en animales envejecidos, lo cual no parece estar sucediendo.

Este experimento demuestra que el hipocampo de ratón sufre cambios considerables durante el periodo estudiado lo cual se ve reflejado en una menor producción de neuronas nuevas. Esto podría deberse a una menor tasa de proliferación o bien a una disminución en el número de los progenitores determinado por un aumento de su muerte. Sin embargo, si los cambios dados por el envejecimiento estuvieran interfiriendo con alguno de los procesos necesarios para la neurogénesis, las neuronas podrían quedar

arrestadas durante su desarrollo. En el adulto joven, entre la 2 y 4 semana tras la inyección, un alto porcentaje de las neuronas nuevas mueren por apoptosis probablemente como una forma de eliminar a las neuronas que no se conectan correctamente al circuito. Podría suceder que en el cerebro envejecido, la capacidad de las neuronas para integrase se vea afectada llevando a un mayor número de estas a la muerte programada. El resultado final sería un menor número de neuronas nuevas en el cerebro envejecido.

Sin embargo, en este experimento nos limitamos a estudiar las consecuencias del envejecimiento sobre la neurogénesis sin detenernos en comprender cuales son los cambios subyacentes. Estos podrían estar dados por disminuciones fisiológicas en los niveles de factores tróficos como BDNF, pero también podrían ser consecuencia de cambios en la actividad física o del pobre nivel de novedad que presenta el ambiente en el que viven estos animales toda su vida.

Estudio de la complejidad morfológica de las DGCs en el cerebro envejecido

En trabajos anteriores del laboratorio hemos demostrado que las neuronas nacidas en el hipocampo de ratones adultos jóvenes alcanzan grados de conectividad y función similares a los de las neuronas nacidas durante el desarrollo (Laplagne et al., 2006; Laplagne et al., 2007). En este contexto es importante determinar si las neuronas nacidas en animales envejecidos también pueden desarrollarse hasta alcanzar características similares a las de las neuronas nacidas en animales jóvenes, o si por el contrario, se ven limitadas en su desarrollo por los cambios producidos por la edad. En el giro dentado adulto, una neurona tarda entre 6 y 8 semanas en alcanzar su máximo grado de madurez (Espósito et al., 2005; Laplagne et al., 2006; Piatti, 2006; Zhao, 2006).

Teniendo esto en consideración, se inyectaron animales con retrovirus en distintos momentos de la vida y tras un periodo variable se estudió a las

neuronas nuevas del giro dentado (figura 4-2 A). Se marcaron neuronas nacidas en animales de 2 meses y se observaron 2 meses más tarde. Tanto la morfología general de su árbol dendrítico y de su axón como su localización en la capa granular mostraron características típicas de neuronas granulares maduras (figura 4-2, B). Propiedades similares se encontraron en neuronas inyectadas en animales de la misma edad pero analizadas 10 meses más tarde, en un animal de 1 año de vida (figura 4-2, C), indicando que las neuronas granulares nuevas pueden sobrevivir y mantener su estructura básica por periodos prolongados.

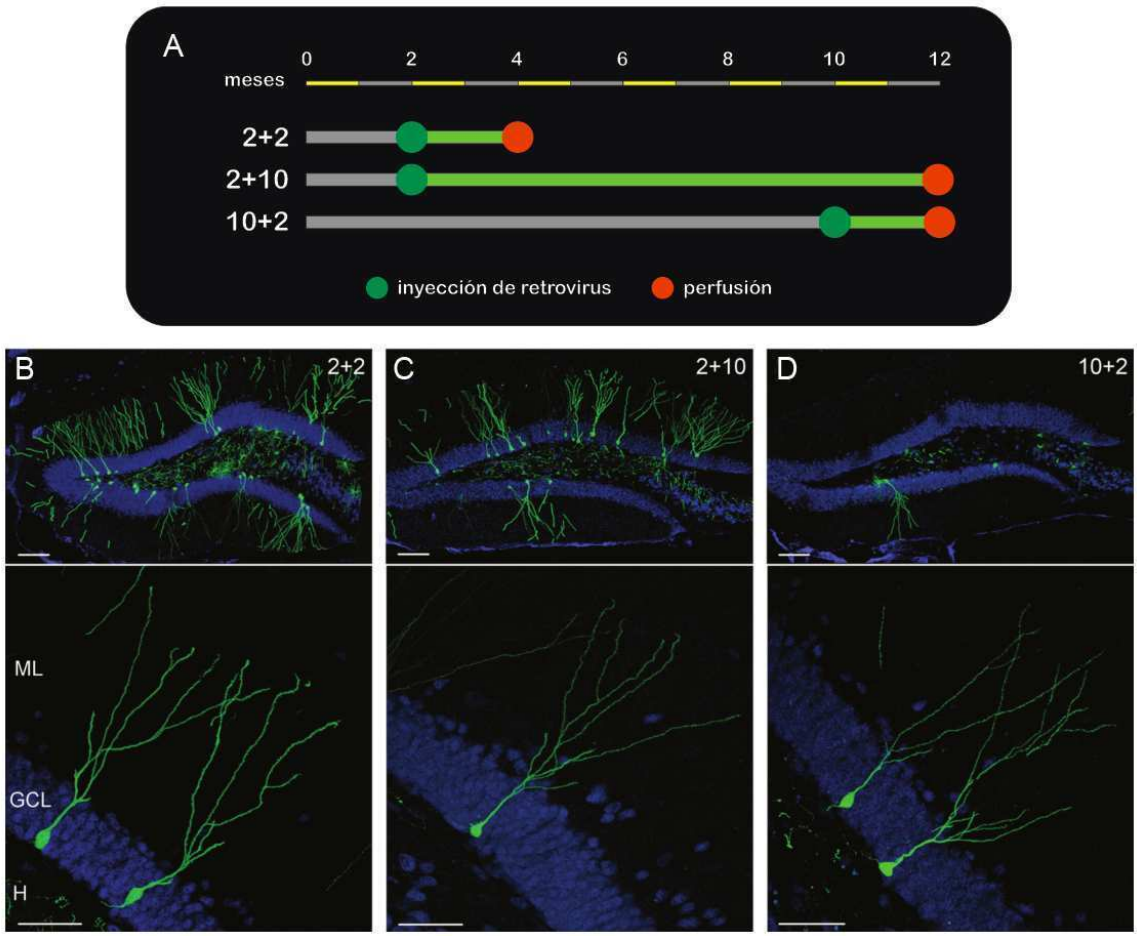


Figura 4-2. Morfología de las neuronas nacidas en el cerebro joven y envejecido. A, Dos grupos de ratones fueron inyectados a los 2 meses de vida. Uno de los grupos fue perfundido tras 2 meses (2+2), el otro tras 10 meses (2+10). Un tercer grupo de NPCs fue marcado en ratones 10 meses de vida y estudiado 2 meses más tarde (10+2). B-D,

ejemplos de imágenes confocales mostrando una vista panorámica del giro dentado de los diferentes grupos experimentales (paneles superiores) y una magnificación para observar con mayor detalle la morfología neuronal (paneles inferiores). Se muestran neuronas granulares GFP+ (verde) en el contexto de la capa granular marcada con NeuN (azul). Los ejemplos son representativos de 15-20 secciones por ratón (grupo 2+2, n=4; grupo 2+10, n=4; grupo 10+2, n=3). Barras de calibración 100 µm en paneles superiores, 50 µm en paneles inferiores. H: hilus, GCL: capa granular, ML: capa molecular.

Con el fin de obtener un parámetro cuantitativo de la complejidad que exhiben estas neuronas, se estudio la densidad de espinas dendríticas. Estas estructuras son un correlato morfológico de los contactos excitatorios que las neuronas reciben. Además, este parámetro puede ser medido con precisión y repetibilidad, a la vez que carece de posibles errores artefactuales como el largo total del árbol dendrítico que puede verse afectado por el corte de las secciones. En ambos grupos (2+2 y 2+10) se encontró una densidad de aproximadamente 2.3 espinas/µm, sugiriendo que las neuronas nacidas en un animal adulto joven conservan la misma densidad de aferentes sinápticos excitatorios por lo menos por 10 meses (figura 4-3 A, B y D).

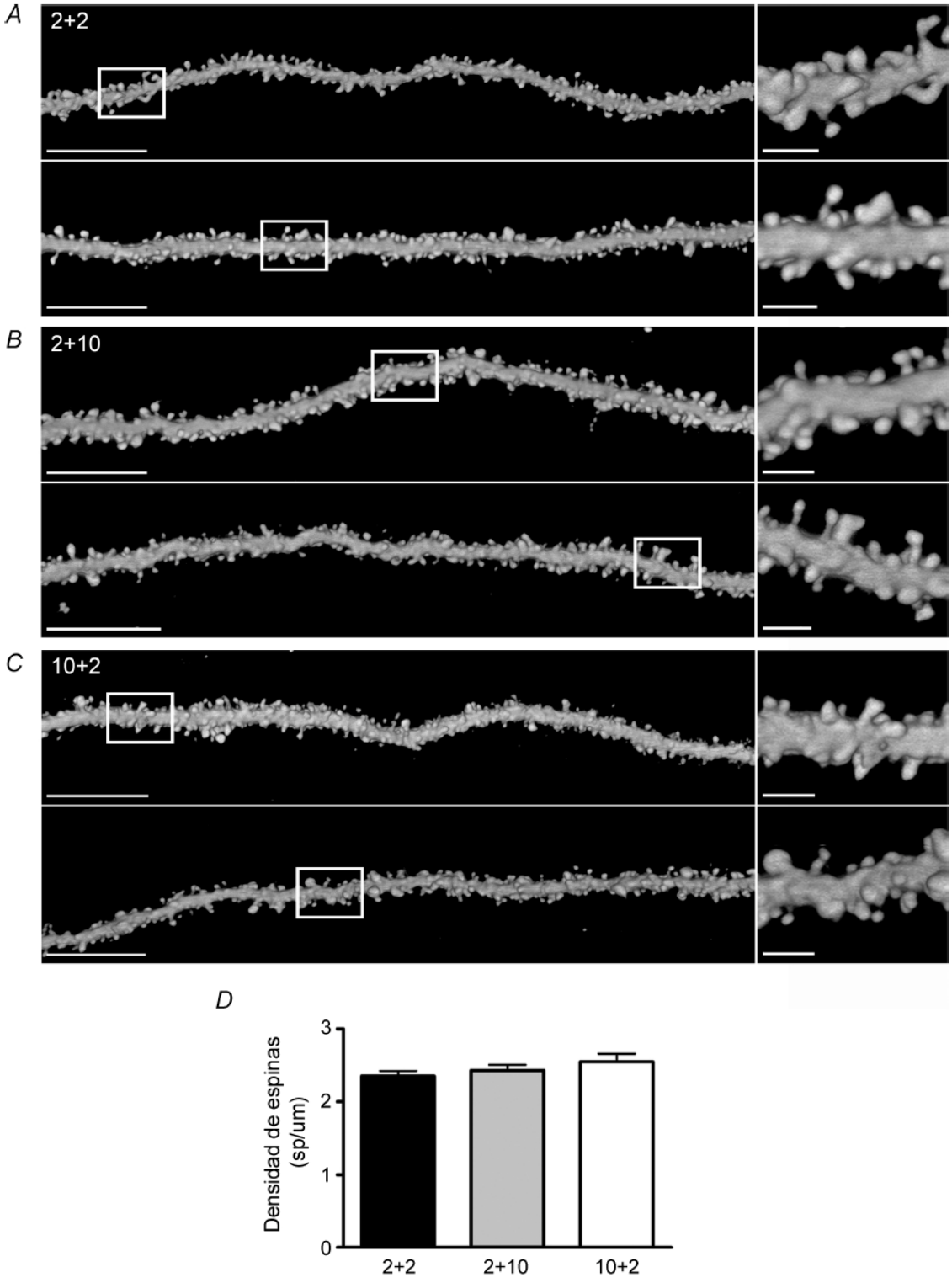


Figura 4-3. Espinas dendríticas de las neuronas nacidas en el cerebro joven y envejecido. A-C, imágenes representativas de fragmentos dendríticos con espinas de neuronas granulares nuevas pertenecientes a los diferentes grupos experimentales; grupo 2+2 (A), 2+10 (B) y 10+2 (C). Los paneles de la derecha son magnificaciones

correspondientes al sector recuadrado en las imágenes de la izquierda. Las barras de calibración son de 10 µm (izquierda) y 2 µm (derecha). D, la medición de la densidad de espinas dendríticas no mostró diferencias entre los grupos estudiados (ANOVA, P=0,28). La cuantificación fue realizada en un largo dendrítico total de 1583 µm de 22 neuronas (grupo 2+2), 1497 µm de 20 neuronas (grupo 2+10) y 1333 µm de 19 neuronas (grupo 10+2).

Durante este tiempo, el giro dentado sufre cambios progresivos que se ven reflejados en alteraciones cognitivas y de aprendizaje, a nivel de la plasticidad sináptica y también en la neurogénesis adulta (figura 4-1). Es importante entonces determinar si una neurona nacida en este contexto es capaz de desarrollarse, madurar y conectarse normalmente o si los cambios dados por el envejecimiento afectan el grado de complejidad que las mismas pueden alcanzar. Para contestar esta pregunta, un tercer grupo de progenitores neurales fue marcado en el hipocampo de ratones de 10 meses de edad y tras 2 meses su progenie fue analizada (figura 4-2 A, grupo 10+2). Sorprendentemente, las neuronas nacidas en esta condición mostraron una morfología general comparable con las neuronas nacidas en cerebros más jóvenes (figura 4-2 C). Tampoco en estas condiciones, la densidad de espinas dendríticas alcanzada mostró diferencias respecto a los otros grupos (figura 4-3 C y D).

De acuerdo con nuestros datos, la reducción en el número de contactos sinápticos descripta con el envejecimiento en la rata (Geinisman, 1992) no parecería afectar a aquellas sinapsis formadas sobre las neuronas granulares nuevas, al menos en ratones de 1 año de edad. Sería entonces razonable pensar que esta observación afecta sólo a las células nacidas durante el desarrollo o bien que este efecto se iniciaría más tarde en la vida del animal. Sin embargo, esto no necesariamente implica que la conectividad desarrollada en los tres grupos experimentales sea cualitativamente igual. Experimentos que clasifiquen a las espinas por su morfología, que evalúen su motilidad o que exploren su funcionalidad serían necesarios para descartar diferencias no encontradas con nuestra aproximación.

Efectos del ejercicio voluntario

El ejercicio voluntario, como correr en una ruedita, aumenta el número de neuronas nuevas generadas tanto en el cerebro adulto joven como en el envejecido (van Praag, 1999; van Praag, 2005; Zhao, 2006). Además, el ejercicio mejora la performance en algunos paradigmas comportamentales a la vez que retrasa la progresión de ciertas enfermedades neurodegenerativas (van Praag, 1999; Lazarov et al., 2005; García et al., 2011). Dadas estas observaciones surge la posibilidad de que el cerebro de un animal que corre sea un ambiente más propicio para la plasticidad y el desarrollo de nuevas neuronas.

Para ver si el ejercicio tiene efectos a largo plazo sobre las neuronas que se desarrollan en el hipocampo adulto, se analizaron células granulares nacidas en un animal de 2 meses de edad. Estos ratones dispusieron de rueditas para ejercicio voluntario, lo cual aumenta su nivel de actividad respecto de los animales sedentarios analizado previamente. 7 meses más tarde fueron perfundidos, momento en el cual la disminución en la neurogénesis se hace más marcada (figura 4-1). Mientras que el número de neuronas se vio aumentado, la morfología básica, el patrón de migración y el grado de complejidad alcanzado por estas no mostró alteraciones evidentes respecto a los grupos estudiados anteriormente (figura 4-4). La densidad de espinas dendríticas alcanzó los 2.26 ± 0.07 espinas/µm, similar al número reportado para los animales que no corrieron (figura 4-3 D).

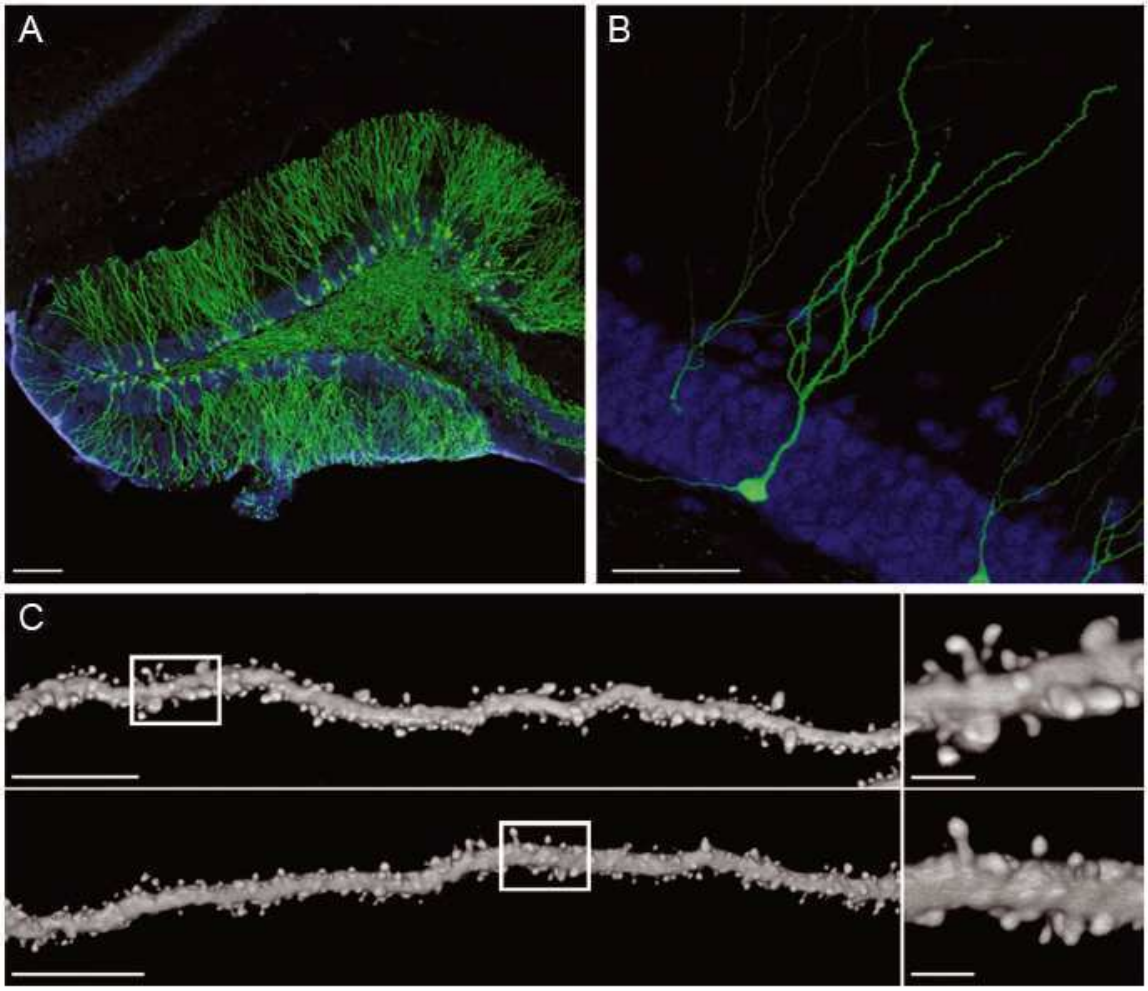


Figura 4-4. Neurogénesis durante el ejercicio voluntario. A-B, ejemplos de imágenes confocales mostrando panorámicamente (A) o en detalle (B) las neuronas granulares generadas en el cerebro adulto durante el ejercicio voluntario. Se observan neuronas GFP+ (verde) en el contexto de la GCL marcada con un anticuerpo contra NeuN (azul). Estas imágenes son representativas de 15-20 secciones analizadas para cada uno de los 4 ratones con libre acceso a una ruedita perfundidos 7 meses tras la infección retroviral. Las barras de calibración son de 100 µm (izquierda) y 50 µm (derecha). C, ejemplos de fragmentos dendríticos con espinas pertenecientes a neuronas granulares del grupo sometido al ejercicio físico. Las magnificaciones de la derecha pertenecen a las zonas recuadradas en la izquierda. El análisis fue realizado sobre un largo dendrítico total de 1777 µm correspondiente a 25 neuronas. Las barras de calibración son de 10 µm (izquierda) y 2 µm (derecha).

Estos resultados son consistentes con aquellos que sugieren que si bien el ejercicio aumenta la producción de neuronas y podría acelerar la maduración neuronal, el *plateau* que alcanzan las neuronas en animales sedentarios o con acceso la ruedita es similar (Zhao, 2006).

Conclusiones parciales

En esta parte del trabajo hemos observado una llamativa similitud en la morfología de las neuronas granulares nacidas en situaciones muy diferentes. Estudiamos condiciones que disminuyen (envejecimiento) y otras que aumentan (ejercicio) el número de neuronas nuevas generadas y que también se sabe son capaces de modular comportamientos, plasticidad sináptica y neurodegeneración. El envejecimiento disminuye sustancialmente la proliferación y diferenciación neuronal de los NPCs (Kuhn, 1996), pero sin embargo aquellas neuronas que se generan alcanzan un alto grado de complejidad con una densidad de contactos glutamatérgicos aferentes comparable al de las neuronas nacidas en ratones adultos jóvenes. Nuestros hallazgos sugieren que las neuronas granulares nacidas en el adulto que sobreviven son menos sensibles que los NPCs a los cambios en el ambiente que acompañan al envejecimiento. Es decir que tanto las neuronas nacidas en la juventud como las que nacen en la vejez, completan su maduración e integración al circuito de forma similar a pesar de las diferencias en el ambiente que las rodea, el cual ha probado afectar la proliferación y diferenciación de las NPCs (Kuhn, 1996). Sin embargo, este estudio se limitó al análisis morfológico de las nuevas neuronas con lo cual no es posible descartar diferencias en la funcionalidad de estos contactos o en la forma en que estas neuronas procesan la información. Estudios electrofisiológicos y la caracterización de su *output* contribuirían a entender si las neuronas nacidas a lo largo de la vida son similares también en estos aspectos.

Por otro lado aquí sólo observamos la madurez que alcanzaron estas neuronas sin detenernos a estudiar la dinámica con que lo hicieron. Cabe la posibilidad de que, debido a las alteraciones propias de la edad, la secuencia

temporal del desarrollo sea diferente a la descripta para el animal joven. Esto podría tener consecuencias en la funcionalidad del giro dentado y manifestarse con alteraciones cognitivas.

Finalmente, nuestros estudios se limitaron a los primeros 12 meses de vida de animales que pueden vivir aproximadamente 2 años. Es decir que tanto la producción como la integración neuronal podría mostrar alteraciones morfológicas o funcionales en etapas ulteriores.

Envejecimiento patológico

A medida que la expectativa de vida se incrementa, las enfermedades neurodegenerativas son cada vez más frecuentes. De forma similar a lo que ocurre con el envejecimiento, la enfermedad de Alzheimer afecta marcadamente al hipocampo y se manifiesta con problemas de memoria (Selkoe, 2002). Dado que el límite entre ambas circunstancias es difuso, es lógico pensar que la disminución de la plasticidad del cerebro que se produce con el envejecimiento juega un rol en la patogénesis de esta y otras enfermedades.

Aunque se sabe que condiciones que alteran la neurogénesis adulta pueden también afectar el aprendizaje y la memoria (van Praag, 1999; Drapeau, 2007), el rol de la neurogénesis adulta y las NPCs en el cerebro normal y patológico sigue siendo tema de debate. Alteraciones (fisiológicas o patológicas) en la neurogénesis podrían contribuir a un “mal funcionamiento” del sistema nervioso debido a la pérdida de este mecanismo de plasticidad con el envejecimiento.

El comportamiento y potencial de las NPCs en condiciones fisiológicas y patológicas debe ser correctamente entendido para comprender su rol en la neurodegeneración y antes de pensar en terapias regenerativas en las cuales las NPCs endógenas o transplantadas deben diferenciarse e integrarse

correctamente para poder así ser usadas en forma segura y funcionalmente relevante.

Todo esto hace que resulte necesario entender si el entorno patológico generado en el hipocampo por enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, condiciona o no la producción de nuevas neuronas y la forma en que estas se integran al circuito preexistente.

El ratón transgénico 2576 como modelo de la AD

Una aproximación útil para el estudio de patologías humanas son los modelos animales. Con el fin de estudiar la enfermedad de Alzheimer, se ha creado un ratón transgénico (Tg2576) al cual se le ha insertado el gen humano de APP bajo el promotor de la proteína priónica de hámster (Hsiao et al., 1996). En este modelo el gen presenta la mutación *Swedish* de la forma familiar de la enfermedad dada por la doble sustitución KM670/671NL en el sitio de corte de β-secretasa. Esto hace que la afinidad de esta enzima por APP aumente llevando a un incremento en la producción de péptido β amiloide (Mullan et al., 1992).

Estudios previos sobre este modelo revelan que el mismo expresa altas concentraciones de Aβ en forma dependiente del tiempo y se observan déficits cognitivos antes de la aparición de placas amiloideas (Kawarabayashi et al., 2001; Westerman et al., 2002). Ratones de entre 11 y 13 meses muestran un incremento de Aβ de 14 veces respecto a los de 2 a 8 meses (Hsiao et al., 1996; Kawarabayashi et al., 2001). Este incremento está asociado con el depósito de placas en la corteza temporal, frontal y entorrinal, el hipocampo, el subículo y cerebelo (Hsiao et al., 1996). A los 9-10 meses muestran alteraciones en la performance en diferentes paradigmas de memoria (laberinto en “Y” y laberinto acuático de Morris) (Hsiao et al., 1996; Westerman et al., 2002).

Objetivos y diseño experimental

El objetivo de esta sección fue estudiar el grado de desarrollo que alcanzaron las neuronas granulares generadas en el giro dentado de ratones 2576. Utilizando la marcación retroviral con GFP se analizó la morfología general y la densidad de espinas dendríticas que desarrollaron las neuronas generadas en el giro dentado de ratones heterocigotas (APP+/-) u homocigotas (APP+/+) y sus hermanos no transgénicos (APP -/-) utilizados como control.

Para poder comparar el proceso de neurogénesis y sinaptogénesis en el envejecimiento patológico con el envejecimiento fisiológico, en esta serie de experimentos se reprodujeron los grupos de la sección anterior (2+2, 2+10 y 10+2, figura 4-5). Con la intención de evaluar el posible efecto de Aβ soluble sobre las sinapsis se sumó un grupo de animales inyectados a los 5 meses y estudiados 2 meses más tarde (figura 4-5, 5+2). A esta edad es posible encontrar déficits cognitivos en ausencia de placas amiloideas consolidadas.

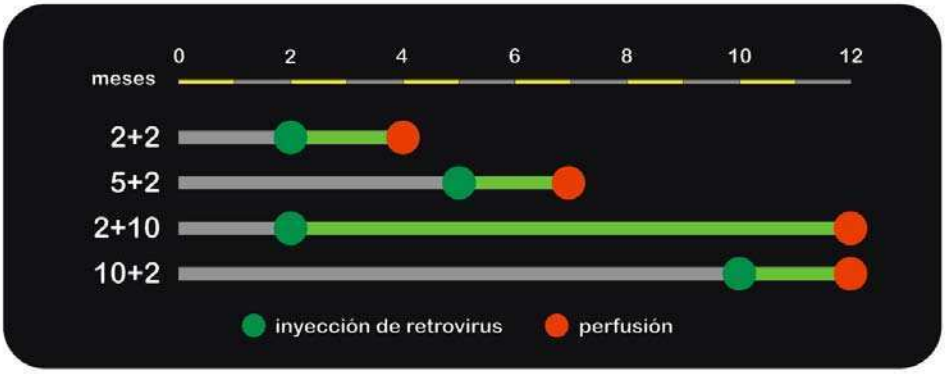


Figura 4-5. Diseño experimental. Tres grupos de ratones transgénicos y sus respectivos controles fueron inyectados a los 2, 5 y 10 meses de vida. Se prefundieron 2 meses más tarde dando los grupos 2+2, 5+2 y 10+2. Un cuarto grupo fue inyectado a los 10 meses de vida y estudiado 2 meses más tarde (10+2).

Neurogenésis adulta en el Tg2576 adulto joven

En primer lugar se estudió el grupo de 2+2 para observar las características generales de la neurogénesis en esta cepa. Dos meses tras la marcación retroviral, los animales inyectados a los dos meses de vida fueron anestesiados y perfundidos. Los cerebros fueros removidos y cortados en secciones de 40 µm. Mediante inmunofluorescencia se tiñeron las secciones con un anticuerpo contra GFP para amplificar su señal. Utilizando microscopía confocal se obtuvieron imágenes del giro dentado inyectado en búsqueda de células granulares marcadas. Aunque no fueron cuantificadas, se encontraron neuronas transducidas tanto en ratones expresando APPswe como en controles, indicando que la neurogénesis adulta es un fenómeno que también está presente en esta cepa y que la misma no se ve suprimida por la expresión ubicua del transgén.

Se analizó la morfología de estas células con el fin de observar si existió alguna alteración en la complejidad de las neuronas nacidas en el adulto joven. En ninguno de los parámetros observados (área del soma, largo del árbol dendrítico y largo de la dendrita principal) se encontraron diferencias entre animales APPswe+ y controles (figura 4-6). Los parámetros medidos en las neuronas de los Tg2576 se encontraron dentro de lo esperado para neuronas de iguales características en C57BL/6 (Espósito et al., 2005; Zhao, 2006). Estos resultados indicarían que la complejidad morfológica que alcanzan las neuronas nuevas no se ve afectada por la sobreexpresión de APP, al menos en animales jóvenes.

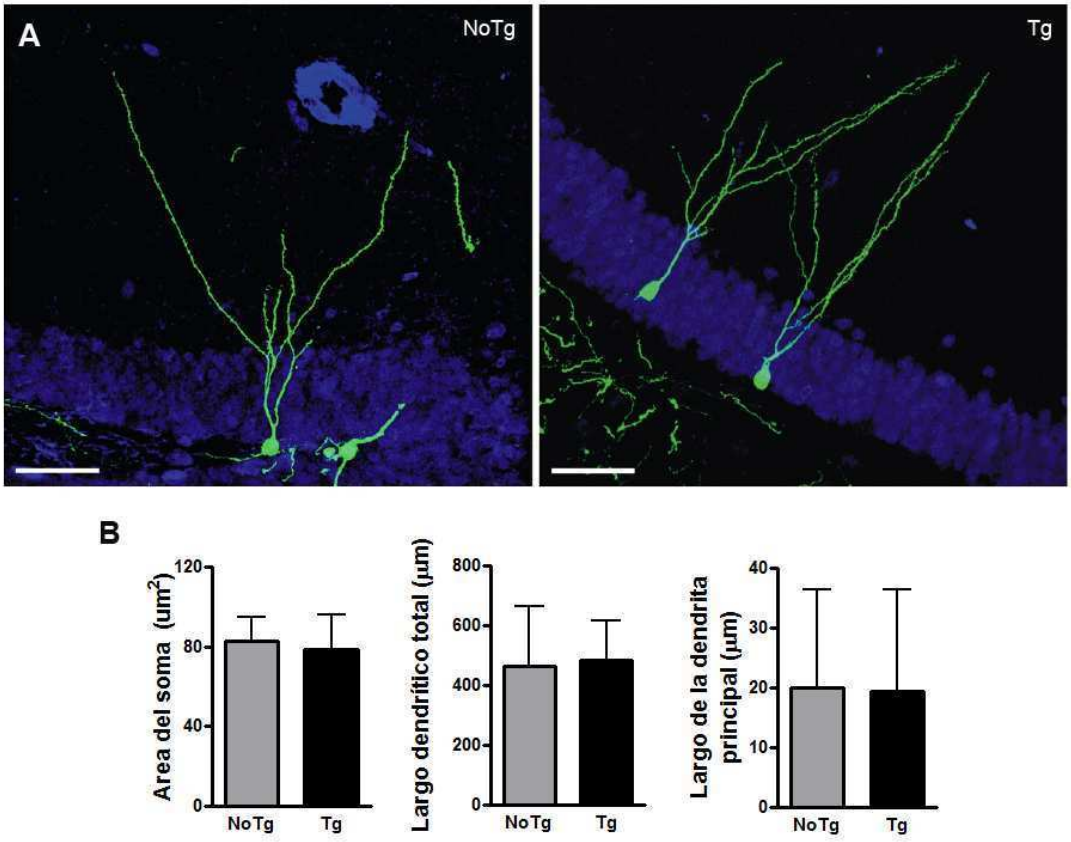


Figura 4-6. Neurogénesis en el Tg 2576 joven. A, ejemplos de imágenes confocales de las neuronas granulares generadas en el cerebro del grupo 2+2 de ratones 2576 control (NoTg) y transgénico (Tg). Se observan neuronas GFP+ (verde) en la GCL inmunomarcada con NeuN (azul). Las barras de calibración son de 50 µm. B, análisis morfológico del grupo 2+2. No se encontraron diferencias cuando se analizó el área del soma (NoTg n=13 neuronas, Tg n=11 neuronas; T-test, P= 0,5353), el largo dendrítico total (NoTg n=11 neuronas, Tg n=13 neuronas; T-test, P= 0,7459), ni el largo de la dendrita principal (NoTg n=11 neuronas, Tg n=11 neuronas; T-test, P= 0,9301).

Efectos del envejecimiento sobre la neurogénesis y la sinaptogénesis en un modelo de AD

El aspecto general de las neuronas en cuanto a árbol dendrítico, proyecciones axonales y localización en la GCL no mostró alteraciones evidentes a ninguna de las edades estudiadas (figura 4-7). Para el análisis de la sinaptogénesis, se adquirieron imágenes confocales de fragmentos

dendríticos pertenecientes a la capa molecular media de neuronas marcadas con GFP. Se cuantificó la cantidad de espinas presentes y se obtuvo la densidad de las mismas al dividir su número por la longitud del fragmento registrado. Ninguno de los grupos mostró diferencias significativas entre la densidad de espinas encontrada en los ratones APPswe+ y controles (figura 4-7). Se observó una ligera disminución del número de espinas presente en los grupos de animales de 1 año de edad en comparación con los otros grupos (figura 4-8). Estos resultados sugieren que las neuronas granulares nuevas no son susceptibles a los efectos tóxicos de Aβ, al menos en las edades estudiadas. Los resultados arrojados fueron en gran manera similares a los observados en ratones C57BL/6, excepto por la disminución de la densidad de espinas con la edad, lo que probablemente se deba a diferencias en el *background* genético de los animales 2576.

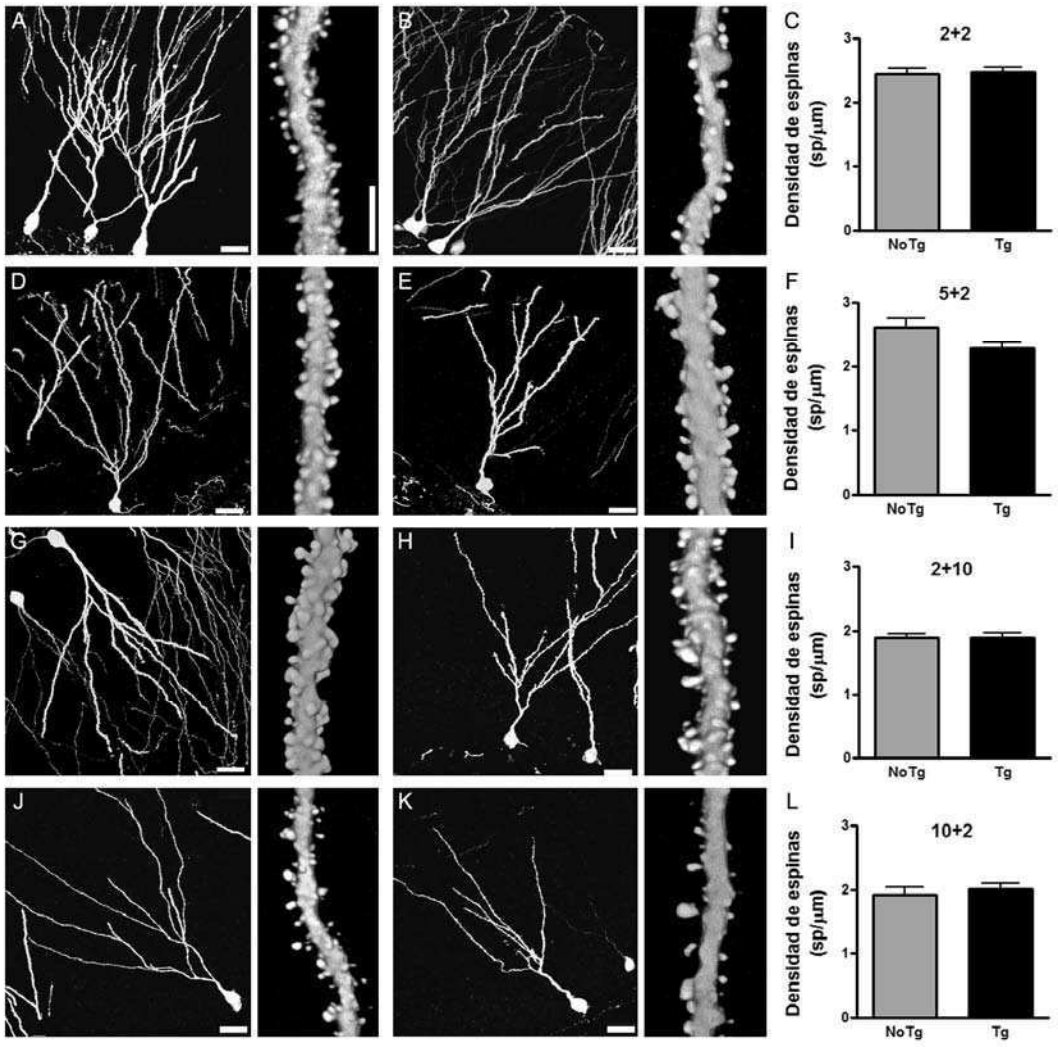


Figura 4-7. Neurogénesis en el Tg 2576 durante el envejecimiento. Principales características morfológicas de las neuronas marcadas en cada uno de los grupos experimentales: 2+2 (A-C), 5+2 (D-F), 2+10 (G-I) y 10+2 (J-L). Para cada panel de imágenes confocales, a la izquierda se muestra un ejemplo de neuronas granulares generadas en el cerebro de ratones 2576 control (A, D, G, J) o transgénico (B, E, H, K). A la derecha se ven ejemplos de fragmentos dendríticos con espinas correspondientes al mismo grupo. Las barras de calibración son de 20 µm (paneles izquierdos) y 10 µm (paneles derechos). C, F, I, L; análisis de la densidad de espinas dendríticas para cada uno de los grupos indicados. No se encontraron diferencias entre controles y transgénicos en 2+2 (NoTg n=22 neuronas, Tg n=22 neuronas; T-test, P=0,7599), 5+2 (NoTg n=13 neuronas, Tg n=12 neuronas; T-test, P=0,0799), 2+10 (NoTg n=29 neuronas, Tg n=18 neuronas; T-test, P=0,9253) ni 10+2 (NoTg n=16 neuronas, Tg n=19 neuronas; T-test, P=0,5545). Estos experimentos fueron realizados junto con Gabriela Lombardi.

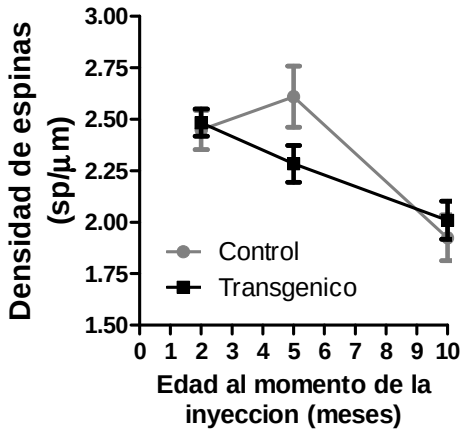


Figura 4-8. Espinas dendríticas durante el envejecimiento. Se muestran las fluctuaciones de la densidad de espinas en animales transgénicos y controles.

Conclusiones

De los datos presentados podemos concluir que, de manera similar a lo que sucede durante el envejecimiento fisiológico, las neuronas nacidas en el giro dentado de animales modelando la enfermedad de Alzheimer alcanzan una complejidad y un grado de aferencias glutamatérgicas comparable con las controles en todas las etapas de la vida estudiadas. De esta manera y como conclusión más general podemos decir que las células granulares nacidas en el hipocampo adulto cuentan con un programa de desarrollo que presenta cierta insensibilidad por los estímulos externos que se dan durante el envejecimiento fisiológico o patológico, ejemplificado con la enfermedad de Alzheimer. Se puede inferir así, que mas allá de la limitación en número que impone la disminución de proliferación de los NPCs en el tiempo, las células determinadas a convertirse en neuronas tienen altas chances de lograrlo y de parecerse unas a otras tanto en un cerebro sano como en uno enfermo.

Sin embargo, es importante tener presente que en este análisis se utilizó a la densidad de espinas dendríticas como único indicador de la complejidad alcanzada por las neuronas nuevas. Aunque es cierto que estas representan la conectividad excitatoria aferente que las neuronas granulares desarrollan, existen otros parámetros que podrían haberse visto afectados y no fueron estudiados. Alteraciones funcionales que afecten la conectividad o la forma en que estas neuronas procesan la información no podrían ser detectadas utilizando microscopía y sólo se harían evidentes realizando registros electrofisiológicos. Además, alteraciones en otros sistemas de neurotransmisión como el GABAérgico, colinérgico o dopaminérgico podrían verse alterados sin afectar directamente la densidad de espinas dendríticas. De hecho, existen reportes de alteraciones en la conectividad GABAérgica que reciben las neuronas nuevas durante su desarrollo en otros modelos de AD (Li et al., 2009; Sun et al., 2009). Estos trabajos sugieren que diferentes eventos patológicos presentes en AD convergen en un desbalance de la innervación GABAérgica que las neuronas nuevas reciben lo cual afecta la forma en que estas se desarrollan y conectan. Sin embargo, hay que recordar que tanto esos modelos como el Tg 2576 han sido artificialmente creados y

en ningún caso recapitulan totalmente las alteraciones encontradas en pacientes. De hecho, la falta de control sobre la posición del genoma en la que se inserta el transgén junto con el uso de diferentes *backgrounds* genéticos para la creación de modelos transgénicos puede llevar al desarrollo de nuevas alteraciones ausentes en la patología humana.

Finalmente, y debido a que en estos experimentos nos focalizamos en la búsqueda de alteraciones sutiles y tempranas que permitan explicar los síntomas iniciales de AD, es posible que en las edades estudiadas los cambios todavía nos sean perceptibles pero que en animales más viejos se hagan evidentes. Futuros experimentos contestaran si a edades más avanzadas (16+2) la situación continúa de esta manera o si finalmente las neuronas granulares nuevas se tornan vulnerables.

Parte 3 - Efectos de APP sobre el desarrollo y la integración neuronal.

Introducción

En los últimos años se ha hecho evidente que, tanto en humanos como en modelos animales transgénicos de la enfermedad de Alzheimer, las modificaciones sinápticas y los déficits cognitivos preceden a la aparición de placas amiloideas, ovillos neurofibrilares y a la muerte neuronal (Lambert et al., 1998; Hsia, 1999; Mucke et al., 2000; Oddo et al., 2003; Selkoe, 2004; LaFerla & Oddo, 2005). De hecho, hace décadas que existen antecedentes de patologías en las que alteraciones a nivel de las espinas dendríticas se traducen como déficits cognitivos y retardo mental (Purpura, 2007). Esta falla temprana en las sinapsis parecería ser consecuencia de niveles intracelulares aumentados del péptido Aβ tanto en su forma soluble como oligomérica (Oddo et al., 2003; Selkoe, 2004; LaFerla & Oddo, 2005; Jacobsen et al., 2006). Existen evidencias de que este aumento tiene correlación con la alteración en la transmisión sináptica (Mucke et al., 2000), potenciación de largo termino (LTP) (Oddo et al., 2003) y función cognitiva (LaFerla & Oddo, 2005; Jacobsen et al., 2006) que se encuentra en los modelos animales de la enfermedad. El rol de Aβ en la patogénesis temprana de la AD ha sido propuesto debido al hallazgo de los siguientes efectos agudos. Por un lado, la administración intracerebral de Aβ induce una rápida disminución en LTP y déficit cognitivo (Jacobsen et al., 2006). La aplicación de Aβ reduce también el LTP en rodajas agudas de hipocampo (Shankar et al., 2008). Finalmente, se vio que la sobreexpresión de formas mutantes de APP y Aβ induce disfunción sináptica en cultivo de rodajas de hipocampo (Billings, 2005).

Aunque la enfermedad de Alzheimer fue descripta hace más de cien años, su causa y mecanismo patogénico continúan sin ser esclarecidos. Se desconoce cuál es el sitio de acción de Aβ, si actúa a nivel intra o extracelular o si su efecto tóxico es pre o postsináptico.

Objetivos y diseño experimental

El remodelado sináptico y de los circuitos neuronales es un proceso fundamental para las funciones del cerebro de los mamíferos. El entendimiento de su dinámica en la corteza y el hipocampo es crítico para comprender las bases celulares que subyacen a las alteraciones cognitivas. Los circuitos corticales del cerebro adulto son remodelados continuamente de forma dependiente de la actividad lo cual modifica las conexiones entre neuronas pre y post sinápticas (Chklovskii, 2004; Segal, 2005; Holtmaat, 2006; Knott, 2006) Este remodelado implica dos tipos de modificaciones. Por un lado cambios funcionales que regulan la eficacia en la transmisión entre sinapsis preestablecidas, por ejemplo LTP y LTD. Por otro lado, cambios estructurales dados por la formación o eliminación de contactos sinápticos y que modifican el conexionado entre neuronas. Estas dos formas de plasticidad están estrechamente relacionadas dado que la depresión sináptica puede determinar la eliminación de contactos mientras que la potenciación puede inducir la formación de nuevas sinapsis. Estos fenómenos fueron inicialmente descriptos para sinapsis formadas sobre espinas dendríticas, sobre las cuales se dan la mayoría de los contactos excitatorios. El modelo actual propone que este remodelado estructural tiene un rol fundamental en las modificaciones de los circuitos corticales determinadas por las experiencias (Chklovskii, 2004; Holtmaat, 2006; Knott, 2006; Harvey & Svoboda, 2007).

Basados en esto, proponemos que cambios sutiles en la dinámica del remodelado de los circuitos corticales subyacen a los déficits cognitivos tempranos encontrados tanto en pacientes con AD como en modelos animales de la enfermedad. En este contexto la disminución de la densidad de contactos sinápticos en el hipocampo y en la corteza que caracteriza a AD estaría dada por alguna de las siguientes posibilidades: 1) Aβ desencadena la muerte neuronal y se produce una eliminación de contactos sinápticos debido a la perdida neuronal; 2) Aβ afecta a las sinapsis presentes haciéndolas disfuncionales lo cual acelera su eliminación (Hsieh et al., 2006); 3) la formación de sinapsis se ve impedida por Aβ.

En este capítulo nos propusimos testear la hipótesis de que Aβ impide la sinaptogénesis. La interacción entre Aβ y la sinaptogénesis no ha sido estudiada previamente *in vivo* probablemente debido a la dificultad para identificar sinapsis en formación en el cerebro adulto. En este contexto, la neurogénesis del hipocampo ofrece una herramienta de extrema utilidad para el estudio de la formación de sinapsis en las estructuras corticales. Durante este proceso una neurona joven sin contactos aferentes se transforma en una neurona granular madura e integrada al circuito. La marcación retroviral permite que, a medida que el desarrollo se completa, la sinaptogénesis pueda ser monitoreada mediante electrofisiología en rodajas agudas de cerebro y microscopía confocal en secciones fijadas (Espósito et al., 2005; Zhao, 2006). La transducción con retrovirus permite además la expresión de otras proteínas de interés junto con proteínas reporteras. Para testear la hipótesis de que Aβ afecta la sinaptogénesis, utilizamos vectores retrovirales para que las nuevas neuronas expresen simultáneamente distintas variantes de APP y el reportero fluorescente GFP. De esta manera utilizamos al proceso de neurogénesis como vehículo para estudiar los efectos de la sobreexpresión de Aβ sobre la sinaptogénesis en neuronas de ratones *wild type*.

Alrededor del día posnatal 21, los NPCs generan neuronas que se desarrollan e integran al circuito del hipocampo de forma similar a lo que sucede en el adulto pero en mucho mayor cantidad. Por este motivo, gran parte de los experimentos descriptos a continuación se realizaron en animales en la etapa postnatal y no adulta. Se infectaron NPCs del giro dentado con retrovirus expresando APP (o alguna de sus variantes) y/o GFP en hembras C57BL/6 de entre los 21 y 26 días de edad. Dado que la sinaptogénesis excitatoria en neuronas granulares nacidas en el adulto comienza entre 2 y 3 semanas después de la división celular (Zhao, 2006) se estudió el grado de maduración e integración funcional que alcanzaron las neuronas infectadas tras 21 días. Se efectuaron registros electrofisiológicos para monitorear la función e integración al circuito de estas neuronas, tanto en ratones jóvenes como en animales de envejecidos para investigar si la

edad modula los efectos producidos por APP. Los estudios se completaron con el análisis la morfología neuronal mediante microscopía confocal.

Diseño y testeo de vectores retrovirales para la sobreexpresión de APP

¿Por qué usar retrovirus para la expresión de APP o sus variantes?

Muchos de los modelos actuales para el estudio de la enfermedad de Alzheimer se basan en la generación de grandes cantidades de péptido β amiloide utilizando animales transgénicos que lo producen de forma ubicua en el cerebro y no distinguen el tipo celular que lo expresa. Se genera así un entorno que sobreexpresa Aβ y permite estudiar los efectos globales de su producción, pero en el cual se dificulta investigar sus efectos específicos sobre procesos individuales más sutiles como la formación de sinapsis.

La generación de retrovirus sobreexpresando APP presenta ventajas como la posibilidad estudiar en detalle la forma en que Aβ afecta morfológica y funcionalmente a neuronas individuales que se desarrollan e integran al circuito del hipocampo *wild type*. Esta estrategia además permite distinguir los posibles efectos de la acumulación del péptido β amiloide en forma autónoma de célula de los efectos ejercidos por su difusión hacia células vecinas que no lo estén produciendo.

Elección del sistema de coexpresión de dos proteínas no fusionadas.

Para sobreexpresar APP y un reportero fluorescente se utilizaron dos estrategias que permiten expresar dos proteínas bajo un mismo promotor:

- La secuencia IRES (secuencia interna de reconocimiento ribosomal) funciona como un sitio de iniciación de la traducción y permite que se generen dos transcriptos a partir de una sola secuencia río abajo del promotor (Ngoi, 2004).

- La secuencia peptídica autocatalítica 2A, que permite generar dos proteínas separadas a partir de un único polipéptido que se corta durante la traducción (Trichas, 2008).

Ambos métodos fueron utilizados en diferentes construcciones retrovirales.

Elección de los promotores utilizados

Una de las principales limitaciones del sistema de expresión retroviral es la limitada capacidad en el tamaño del inserto que soportan, en el MoMLV no debe superar los 6 kb. Tamaños mayores dificultan la encapsidación del virus y reducen el titulo viral. Para minimizar este problema se intentó reducir el tamaño del promotor utilizado. Se testeó el promotor CAG [combinación del Citomegalovirus *early enhancer* y el promotor de la β actina de pollo (Alexopoulou, 2008) el cual es un promotor fuerte y de expresión sostenida pero cuyo largo de 1,7 kb compromete el ensamblado. Paralelamente, se probó el promotor PGK (fososfoglicerato kinasa de levadura), el cual tiene una longitud de 0,6 kb.

Variantes de APP de interés

Los efectos de Aβ sobre la sinaptogénesis podrían estar condicionados por la concentración de péptido generado en cada neurona. Para investigar esto se diseñaron construcciones virales utilizando variantes de APP con capacidades diferentes para producir Aβ. Esto permitió evaluar si mayores niveles de péptido correlacionan con efectos más marcados y evaluar si variantes de APP que no producen Aβ carecen de efectos. Hemos generado vectores virales que codifican para los siguientes transgenes (figura 5-1):

- **APPwt**: APP695 humano *wild type.* Existen evidencias de que induce una falla aguda en la transmisión sináptica de neuronas

sobreexpresándolo mediante un virus Sindbis en cultivos organotípicos de hipocampo (Kamenetz et al., 2003).

- **β-CTF**: es el fragmento de APP que contiene al péptido β amiloide tras ser cortado por β-secretasa. Induce depresión sináptica rápidamente cuando es sobreexpresado en neuronas de hipocampo en cultivos organotípicos (Kamenetz et al., 2003).

- **APP 3mut**: es una variante de APP en la cual, se han introducido tres mutaciones pertenecientes a formas familiares de la enfermedad conocidas como *Swedish*, *Florida* y *London* para que produzca mayores niveles de Aβ (Goate et al., 1991; Mullan et al., 1992; Eckman et al., 1997)

- **APP 4mut**: es una variante de APP que además de las mutaciones familiares que lleva APP 3mut posee una cuarta mutación denominada *Iowa* la cual aumenta la probabilidad de formar agregados de Aβ (Grabowski, 2001).

- **α-CTF**: es el fragmento de APP que queda anclado a la membrana tras el corte de la vía no amiloidogénica por α-secretasa (figura 1-3, Vetrivel & Thinakaran, 2006).

- **APPmv**: (APP_{M596V}) es una forma de APP que no puede ser procesada por β-secretasa, es decir que no es amiloidogénica. (Kamenetz et al., 2003)

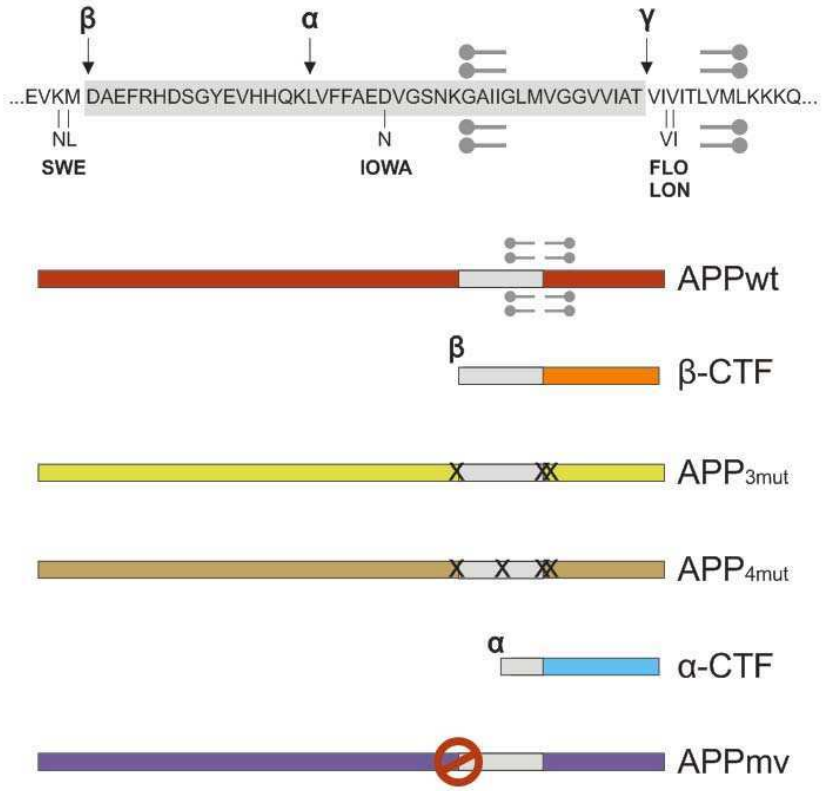


Figura 5-1. Variantes de APP utilizadas. Diferentes variantes de APP fueron generadas para estudiar su efecto sobre las neuronas que lo sobreexpresan. APPwt es la forma neuronal humana de 695 aminoacidos; β-CTF es el fragmento C-terminal que queda tras el corte por β-secretasa; APP 3mut y 4mut poseen mutaciones que afectan su procesamiento de forma que aumentan la producción de Aβ; α-CTF es el fragmento C-terminal que queda tras el corte por α-secretasa; APPmv presenta una mutación que impide su procesamiento por la vía amiloideogénica.

De la combinación de estos transgenes con los diferentes promotores y sistemas de coexpresión se generaron los retrovirus que ilustra la figura 5-2. APPwt y APPmv están marcados con un *myc-tag* para su inmunodetección. Todas las modificaciones y los subclonados en el vector retroviral MoMLV (excepto la que en los métodos de esta tesis se detalla) y sus testeos *in vitro* fueron realizados en nuestro laboratorio por Gabriela Lombardi y Damiana Giacomini.

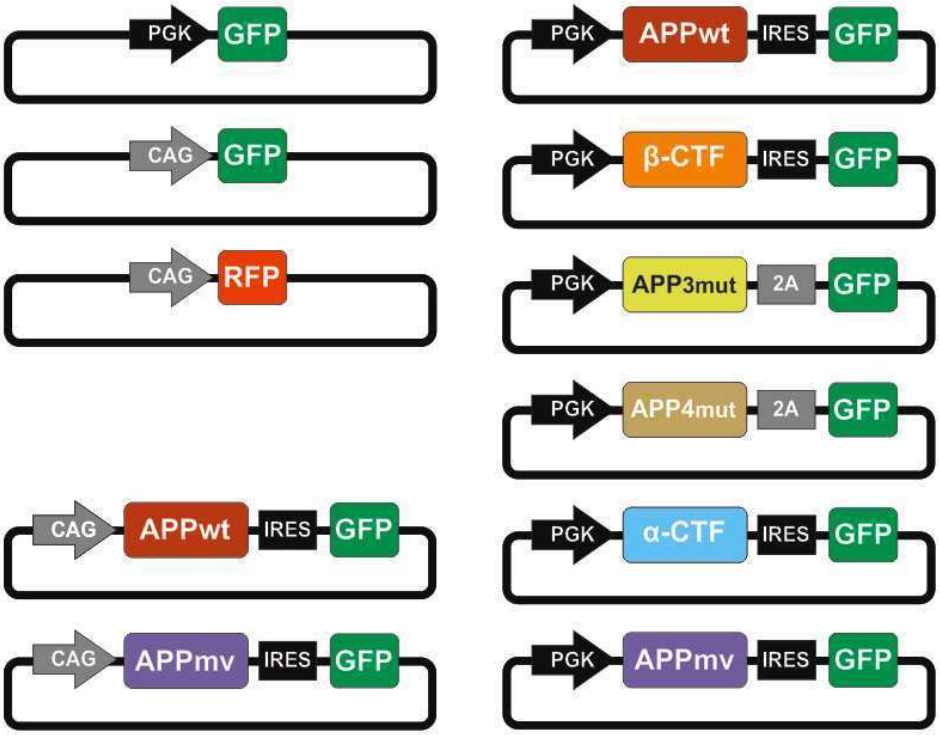


Figura 5-2. Vectores retrovirales. De la combinación de las diferentes variantes de APP con los promotores CAG o PGK y los dos diferentes sistemas de coexpresión (IRES o 2A) surgieron las construcciones retrovirales que aquí se exponen. Se muestran además construcciones que solamente expresan proteínas reporteras (GFP o RFP) y que fueron utilizadas como virus control.

Pruebas de expresión in vitro

Para determinar si el transgén y la proteína reportera podían detectarse tras la expresión transitoria *in vitro*, células HEK 293 fueron transfectadas con la construcción PGK-APPwt-IRES-GFP o PGK-APPmv-IRES-GFP. La expresión de APP y GFP fue evaluada mediante we*stern blot* de células lisadas a las 48 hs utilizando anticuerpos anti-*myc* y GFP (figura 5-3, calles 1-4). La expresión de APP fue detectada en las células transfectadas con ambas construcciones amiloideogénicas. En estas mismas células se detectó también la presencia de GFP. En las células transfectadas con la

construcción control se detectó expresión GFP pero no de APP. Estos resultados indican que los plásmidos utilizados para la generación de partículas virales son capaces de codificar para ambos transgenes.

Para evaluar la infectividad de partículas virales ensambladas, células HEK 293 fueron infectadas con los retrovirus portando PGK-APPwt-IRES-GFP o PGK-GFP. La figura figura 5-3 B muestra imágenes a una magnificación de 20X de la inmunomarcación con DAB de células 293T utilizando un anticuerpo anti-*myc* (A y B) o GFP (C y D) 48 hs luego de la infección. La proporción de células expresando APP o GFP fue cualitativamente similar, sugiriendo que ambos transgenes se expresan en las células infectadas con estos virus. Sin embargo, la densidad de células detectadas con la construcción que solamente expresa GFP fue notablemente mayor, indicando que el título viral estaría reducido en las construcciones que portan APP, probablemente debido al mayor tamaño del inserto. Mediciones posteriores del título viral dieron resultados consistentes con esta idea ya que es típicamente de 10^8 partículas por mililitro para los virus que expresan GFP y oscila entre 10^5 y 10^6 partículas por mililitro para los que expresan APP y GFP. Esto explicaría que las construcciones que expresan APP arrojen un menor número de células transducidas *in vivo* que las que expresan sólo GFP.

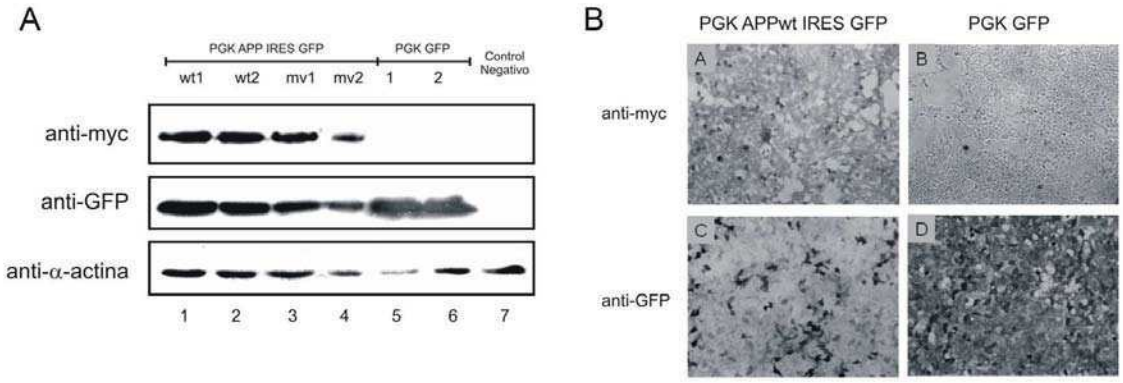


Figura 5-3. Pruebas de expresión de APP y GFP *in vitro*. A, *Western blot* de células HEK 293T transfectadas con el vector PGK-APPwt-IRES-

GFP (calles 1 y 2), PGK-APPmv-IRES-GFP (calles 3 y 4) o PGK-GFP (calles 5 y 6). Las muestras se evaluaron por duplicado. Lisados de células no transfectadas fueron usadas como control negativo (calle 7). α-actina se uso como control de carga. B, detección de la expresión de APP o GFP con anticuerpos contra *myc-tag* o GFP y revelado con inmunocitoquímica con DAB de células 293T infectadas con los retrovirus PGK-APPwt-IRES-GFP (A,C) o PGK-GFP (B,D) por 48 hs. Estos testeos fueron realizados por Gabriela Lombardi.

Pruebas de expresión in vivo

Las siguientes construcciones retrovirales fueron inyectadas en el giro dentado del hipocampo adulto para probar su capacidad de infectar NPCs *in vivo* (todas ellas con IRES-GFP como gen reportero): PGK-APPwt, CAG-APPwt, PGK-APPmv y CAG-APPmv. En todos los casos los retrovirus fueron inyectados en el giro dentado de hembras C57BL/6 adultos jóvenes (6-7 semanas) y la progenie de las NPCs infectadas analizada a las 4 semanas, momento en que las neuronas normales ya habrían desarrollado sus conexiones aferentes GABAérgicas y glutamatérgicas. La figura 5-4 muestra ejemplos de secciones de cerebros fijados teñidas por inmunofluorescencia con anticuerpos contra NeuN (azul) y GFP (rojo). Todas las construcciones probadas mostraron neuronas expresando GFP en el hipocampo adulto. De estas observaciones concluimos que: 1) APP y sus variantes pueden ser expresados mediante infección retroviral de progenitores neurales *in vivo*; 2) es posible obtener una población de neuronas expresando los dos trangenes, aunque la presencia de APP debería ser evaluada antes de caracterizarlas; 3) las construcciones que portan APPwt o APPmv no inducen la muerte neuronal masiva, lo cual habría impedido continuar con el trabajo; 4) el promotor PGK permite niveles de expresión similares a los de CAG, a la vez que aumenta la densidad de neuronas marcadas. Sin embargo, una de las limitaciones con la que nos encontramos fue el bajo nivel de expresión de GFP, lo cual dificultó el análisis morfológico detallado. Es probable que esto se deba a que la secuencia de GFP se ubicó río abajo del IRES, el cual

podría mostrar niveles de expresión menores respecto del gen ubicado más proximal al promotor.

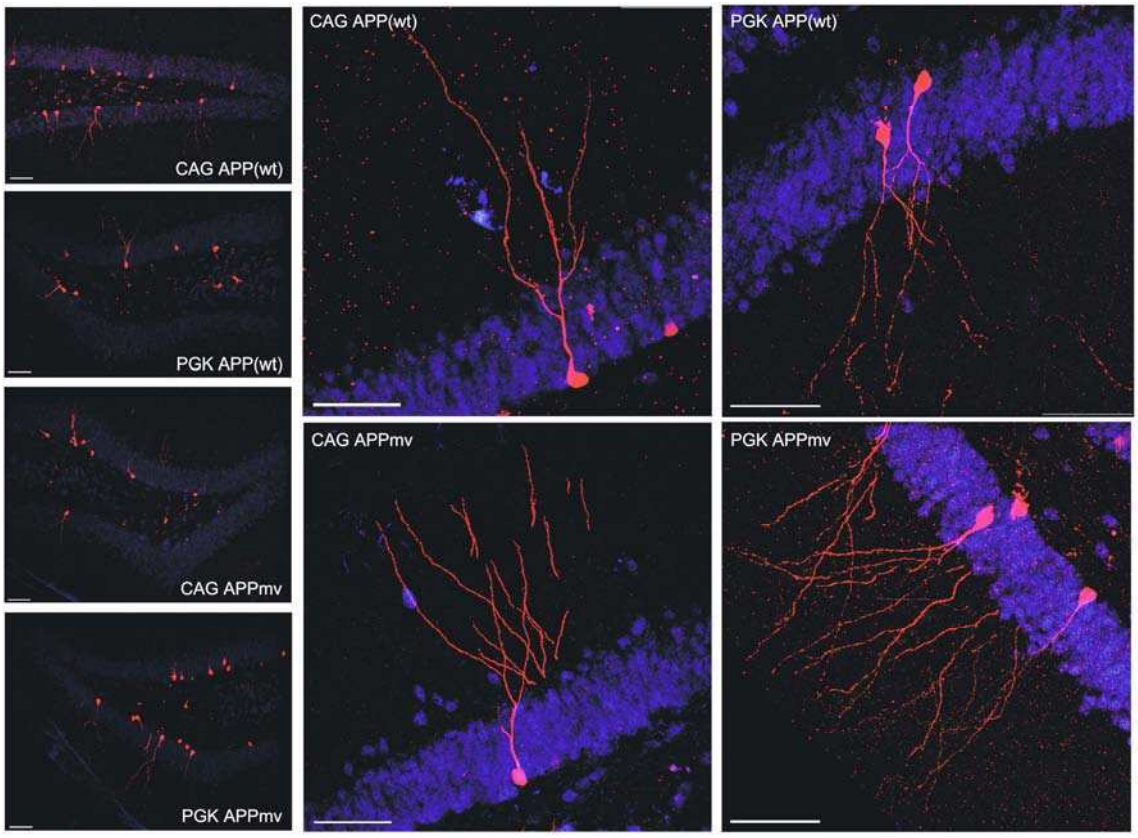


Figura 5-4. Expresión retroviral de GFP y APP *in vivo.* Secciones transversales del giro dentado de ratones C57BL/6 inyectados a las 6-7 semanas de edad y fijados 28 días después. Se muestran neuronas GFP+ infectadas con las construcciones expresando APPwt o APPmv bajo el promotor CAG o PGK. La capa granular fue inmunomarcada con NeuN (azul) y la marca de GFP con anti-GFP (rojo). Las imágenes son reconstrucciones de 25-40 planos confocales obtenidas con un objetivo de 20x o 40x. Las barras de calibración son de 100 µm (paneles izquierdos) o 50 µm (paneles derechos).

Detección del péptido β amiloide in vivo

Antes de estudiar los efectos de la sobreexpresión de APP sobre las neuronas nuevas, intentamos determinar si los niveles de Aβ en el giro dentado se incrementaban por la transducción retroviral de APP en unas

pocas neuronas granulares. Sin embargo, no había trabajos previos que indicaran que la detección de Aβ a tan bajos niveles fuese posible, y a pesar de las diferentes estrategias utilizadas tampoco pudimos lograrlo.

La primera aproximación fue mediante la inmunomarcación de secciones de cerebros de ratones de 6-7 semanas inyectados con APP y fijados 4 u 8 semanas más tarde. Se utilizaron diversos anticuerpos primarios y secundarios, así como distintas manipulaciones para aumentar la exposición de antígeno. El anticuerpo 6E10 esta ampliamente aceptado para la detección de APP y Aβ humanos (Billings, 2005). Se probaron dos lotes diferentes de 6E10 en combinación con anticuerpos secundarios con fluoróforos o con biotina-streptoavidina-DAB y se realizó microscopía para su detección, pero no pudo detectarse señal en ninguno de los casos. Los tratamientos previos utilizando ácido fórmico en distintas concentraciones (70, 90 o 100%) o citrato de Na^+ a 80℃ tampoco mejoraron la detección.

Como la construcción de APPwt se contiene un *myc-tag*, se utilizaron anticuerpos mono y policlonales para detectar APP-myc, así como el anticuerpo *CTM1* dirigido contra la secuencia de unión entre APPwt y *myc*, pero tampoco fue posible detectar señal. Finalmente, realizamos un ensayo de alta sensibilidad y especificidad como es el ELISA para la detección de Aβ. Para esto se inyectaron dos grupos de hembras C57BL/6 de 21-26 días. Un grupo fue infectado con virus control portando solamente RFP, el otro se inyectó con β-CTF-IRES-GFP. Se sacrificaron los animales 35 días más tarde y se cortaron los cerebros en secciones de 500 µm de espesor en un vibrátomo. Se aisló bajo lupa la capa granular, la capa molecular y el hilus de las secciones más dorsales, las cuales tenían más posibilidades de contener neuronas transducidas. Así, se buscó diluir lo menos posible la población de neuronas expresando Aβ con tejido no transducido. Posteriormente se lisaron y homogeneizaron las secciones y se procedió a la detección con el kit de ELISA. Como control complementario se utilizó el hipocampo de ratones transgénicos 2576. Los resultados obtenidos con este método también fueron negativos (figura 5-5).

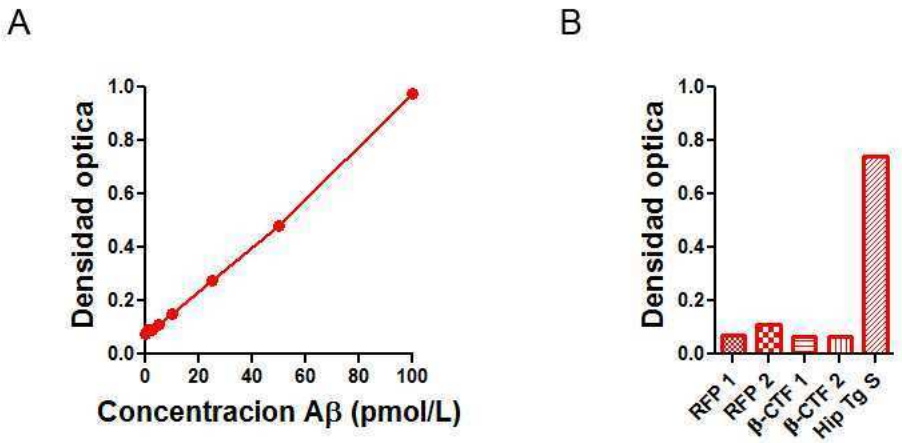


Figura 5-5. ELISA para la detección de péptido β amiloide. A, curva standard de calibración. B, El ensayo no mostró diferencias en la concentración de Aβ entre los hipocampos de ratones infectados con β-CTF (β-CTF 1, β-CTF 2) o RFP (RFP 1 o RFP 2). Como control positivo se utilizó el hipocampo de Tg2576 (Hip Tg S).

Dada la baja cantidad neuronas expresando APP estos resultados negativos no son del todo inesperados. Sin embargo, la evidencia de expresión de APP y GFP *in vitro* y de GFP *in vivo*, sugerirían que Aβ se está produciendo pero a niveles por debajo del limite de detección del ELISA. El estudio de la sinaptogenésis y el desarrollo de neuronas transducidas con variantes de APP con diferentes capacidades de producción de Aβ ayudará a develar si Aβ se está expresando y cuál sería su rol.

Efectos de la sobreexpresión de variantes de APP en neuronas generadas en el hipocampo postnatal.

Habiendo realizado los testeos necesarios para conocer las ventajas y limitaciones de las construcciones retrovirales generadas, investigamos los efectos que la transducción de APP ejerce sobre las neuronas de 21 días nacidas en el hipocampo postnatal (figura 5-6). Utilizando registros electrofisiológicos en la modalidad *whole cell patch clamp* fue posible estudiar

el proceso de sinaptogénesis. Complementariamente, se estudió el grado de desarrollo que alcanzaron las neuronas analizando sus propiedades intrínsecas. De esta manera se pudo investigar si Aβ produce un efecto sobre la formación de sinapsis y si también tiene consecuencias sobre el desarrollo neuronal en forma global.

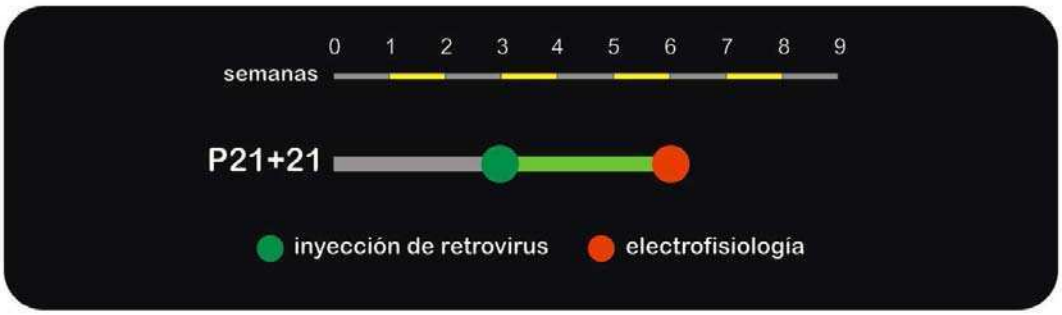


Figura 5-6. Diseño experimental. Se marcaron con retrovirus expresando APP y/o GFP las NPCs del giro dentado en hembras C57BL/6 de 21 días. Tres semanas después se realizaron registros electrofisiológicos de la progenie neuronal transducida.

Evaluación de la conectividad

Las neuronas nacidas en el giro dentado desarrollan un grado de conectividad aferente y eferente que les permite integrarse al circuito preexistente y procesar información relevante para el funcionamiento del hipocampo (Esposito et al., 2005; Laplagne et al., 2008). La actividad sináptica de las neuronas transducidas se evaluó de dos maneras diferentes. Por un lado, registrando las corrientes postsinápticas que se evocaron (EPSCs) cuando mediante un electrodo de estimulación se despolarizaron los axones de la vía perforante que hacen sinapsis sobre las neuronas granulares. Esta vía es excitatoria y por lo tanto, en presencia de antagonistas GABAérgicos, que bloquearon la inhibición, se pudo concluir que las corrientes evocadas fueron dadas por la liberación de glutamato sobre las neuronas de interés (figura 5-7). Además, dado que todos los experimentos fueron realizados con un *Vholding* de -60 mV, y a este

potencial los receptores NMDA se encontraban bloqueados por magnesio, se pudo inferir que toda respuesta observada fue mediada por receptores AMPA. La facilitación por pulso pareado es un fenómeno de plasticidad de corto plazo y tiene su explicación en modificaciones presinápticas, por lo tanto también fue evaluada en la búsqueda de entender si los resultados observados fueron de origen pre o postsinápticos.

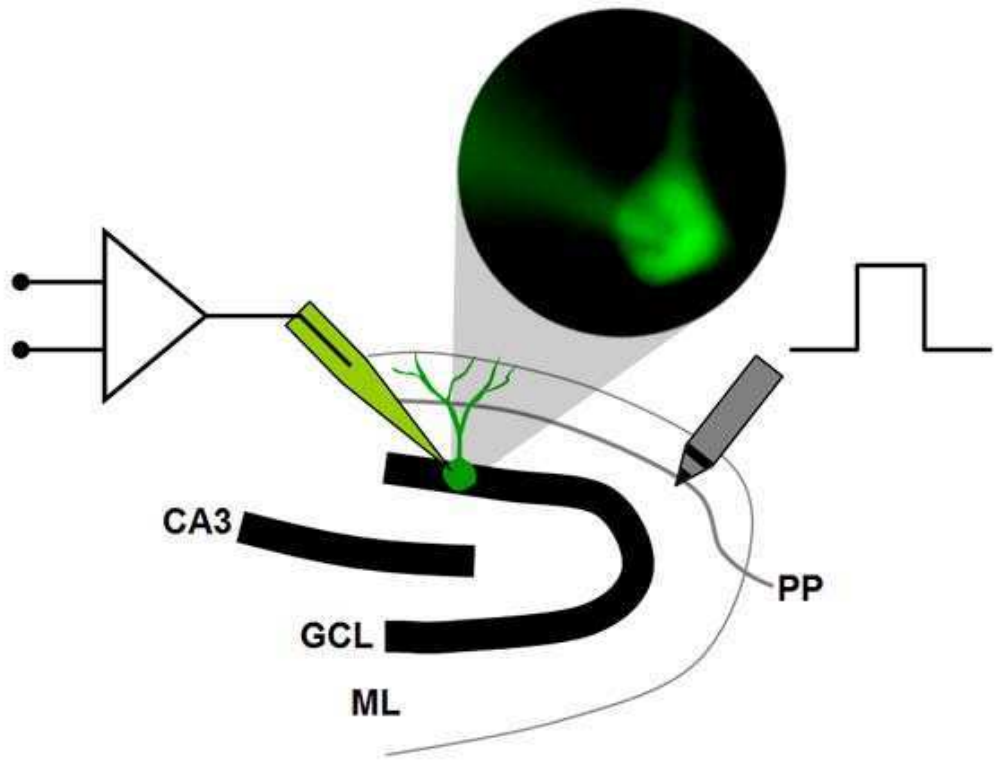


Figura 5-7. Estudio de la conectividad utilizando *patch clamp*. Esquema mostrando la forma en que fueron realizados los registros electrofisiológicos de las corrientes excitatorias postsinápticas en rodajas agudas de hipocampo. La estimulación fue realizada sobre la vía perforante a la vez que se registro en modo *whole cell* las corrientes evocadas sobre neuronas expresando APP o controles a -60 mV. Todos los experimentos fueron realizados en presencia de PTX (100 μM) para bloquear la inhibición mediada por $GABA_A$. La magnificación muestra una imagen digital de una neurona GFP+ y la pipeta de registro durante un experimento. PP: vía perforante, GCL: capa granular, ML: capa molecular.

Para normalizar la intensidad de estimulación en experimentos realizados en diferentes secciones de hipocampo se calibró el estímulo realizando registros de campo en la capa granular mientras se estimulaba la vía perforante con intensidades crecientes de a 20 µA. De esta forma se determinó la intensidad del estímulo que evocaba la máxima respuesta poblacional cuando se observó la saturación de la respuesta de campo. Se asumió que el estímulo que recluta la máxima población neuronal es el mismo que también recluta la totalidad de los axones alcanzados por el electrodo de estimulación. Este estímulo fue considerado como el 100% (figura 5-8). Esta medición del disparo conjunto de una población de neuronas se conoce como "*population spike*" (popSpike) y sirve además para evaluar el estado de la rodaja. Cuanto mayor es el número de neuronas que disparan, mejor es el estado en que se encuentra la sección. Los experimentos de conectividad se realizaron estimulando el 25, 50, 75 y 100% del popSpike. Los experimentos de plasticidad por pulso pareado se realizaron con estímulos del 50%.

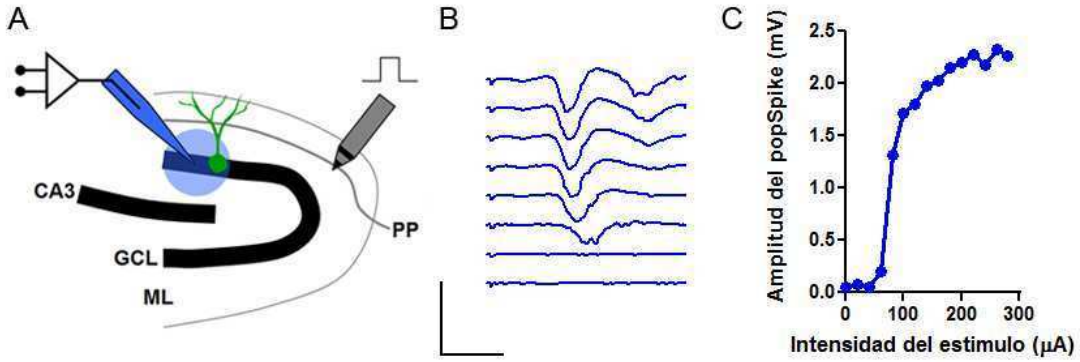


Figura 5-8. Calibración de los estímulos utilizando el *population spike*. A, esquema mostrando la forma en que fueron realizados los registros electrofisiológicos de campo. PP: vía perforante, GCL: capa granular, ML: capa molecular. B, trazos ejemplificando la forma en que aumenta la amplitud del popSpike a medida que crece la intensidad del estimulo. Las barras de calibración en D son de 5 ms y 5 mV. C, Curva *in/out* ilustrando la magnitud de la despolarización de campo en función de los estímulos crecientes hasta alcanzar la saturación.

Otra forma de estudiar la conectividad glutamatérgica fue mediante la evaluación de las corrientes excitatorias postsinápticas espontáneas (eEPSCs). La frecuencia de eventos espontáneos está determinada por la cantidad de sinapsis activas y la probabilidad de liberación del terminal presináptico. Además de la frecuencia, la amplitud de estos eventos refleja la cantidad de neurotransmisor que contiene cada vesícula individual liberada, esto también es susceptible de modificarse según la conectividad que haya desarrollado una neurona.

Conectividad de las neuronas de 21 días expresando β-CTF

Evidencias experimentales previas sugieren que el procesamiento de APP por β-secretasa depende de la actividad neuronal (Cirrito et al., 2005). Si las neuronas que se desarrollan en el hipocampo adulto fueran incapaces de sensar esta actividad, no se generaría péptido β amiloide. Por tal motivo, iniciamos el estudio utilizando la construcción que sobreexpresa β-CTF, lo cual incrementaría la producción de Aβ ya que requiere de un único paso dado por la acción de γ-secretasa.

La inyección del virus portando β-CTF mostró neuronas transducidas en el giro dentado posnatal. La cantidad de neuronas fue mayor que la hallada con otras construcciones que sobreexpresan APP, probablemente porque el menor tamaño del inserto permitió mejorar el titulo viral. De todos modos, el número de neuronas encontradas estuvo muy por debajo del encontrado en los cerebros inyectados con virus control (expresando únicamente GFP o RFP).

La estimulación de la vía perforante mostró corrientes postsinápticas evocadas (EPSCs) de amplitud creciente ante estímulos del 25, 50, 75 y 100% del popSpike. La cinética de las mismas presentó un tiempo de crecimiento rápido y un tiempo de decaimiento más lento. La medición del pico arrojó una amplitud máxima promediando los 183 ± 20 pA (figura 5-9 A), cercano al valor obtenido en neuronas de 21 días nacidas en el adulto

(Mongiat, 2009) . Como ya se describió anteriormente en nuestro y otros laboratorios estas respuestas son glutamatérgicas y están mediadas por receptores de tipo AMPA.

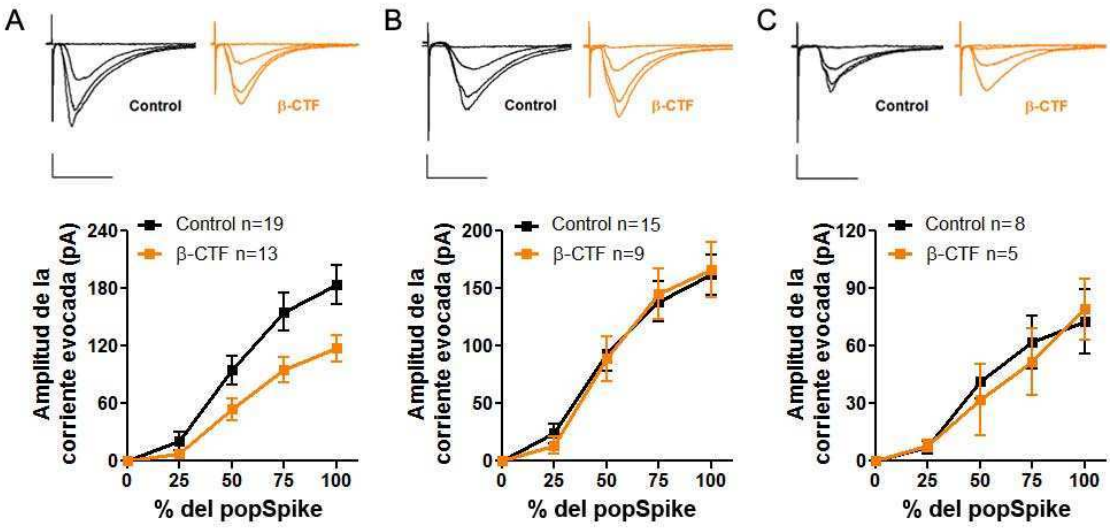


Figura 5-9. Conectividad de las neuronas expresando β-CTF. *Paneles superiores*, trazos ejemplificando las corrientes postsinápticas evocadas en neuronas de P21+21 (A), P21+35 (B) y 4m+21 (C) en presencia de PTX y a un potencial de membrana de -60 mV. Cada trazo es el promedio de 4 repeticiones en respuesta a estímulos del 25, 50, 75 y 100% del popSpike. Las barras de calibración representan 20 ms y 50 pA. *Paneles inferiores*, cuantificación de la amplitud máxima de las corrientes postsinápticas evocadas en neuronas de P21+21 (A), P21+35 (B) y 4m+21 (C) expresando β-CTF y controles ante la estimulación del 25, 50, 75 y 100% del popSpike .

En las neuronas granulares normales la plasticidad por pulso pareado varía cuando los estímulos dados alcanzan diferentes axones de la vía perforante. Mientras que el estímulo pareado de la vía perforante medial induce depresión, la estimulación de la vía perforante lateral produce facilitación. En las neuronas control, un par de estímulos con intensidad del 50% del popSpike separado por 50 ms produjo facilitación, evidenciada en un aumento del 37% en el segundo pico (figura 5-10 A y B). Esto indicaría que a pesar de que el electrodo de estimulación fue ubicado en el tercio medio de la

capa molecular, la despolarización habría alcanzando en mayor medida a la vía perforante lateral.

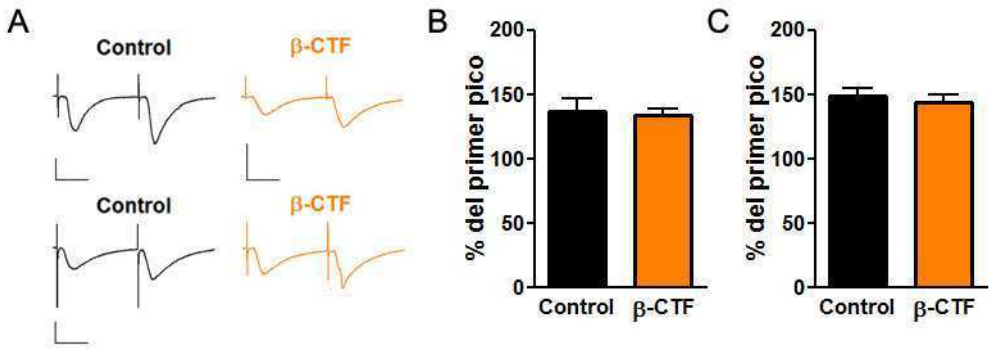


Figura 5-10. **Plasticidad por pulsos pareados de las neuronas expresando β-CTF**. A, ejemplos de trazos mostrando la plasticidad por pulso pareado dada por un estímulo del 50% del popSpike seguido por otro estímulo de la misma intensidad 50 ms después en neuronas control y β-CTF de P21+21 (panel superior) y P21+35 (panel inferior) a -60 mV. Cada trazo es el promedio de 4-5 repeticiones. Las barras de calibración representan 20 ms, 50 pA. B, la cuantificación de la plasticidad por pulso pareado no muestra diferencias entre los grupos en P21+21 (control n=16, β-CTF n=13, ANOVA de una vía seguido de un post hoc Test de Dunnett P>0,05) ni en P21+35 (control n=14, β-CTF n=9, T-test P=0,5904). Cada vez que se usó el test de Dunnet fue porque, aunque se muestren en gráficos separados, las diferentes condiciones se compararon con un mismo grupo control.

El monitoreo de la conectividad alcanzada en neuronas control de 21 días midiendo los de eventos espontáneos mostró una frecuencia promedio de 0.85 ± 0.13 Hz y una amplitud media de 7.18 ± 0.42 pA (figura 5-11). Si bien estos valores se aproximan a los descriptos para neuronas jóvenes de edad similar, pequeñas diferencias podrían estar dadas porque mientras que en los reportes previos se estudió la neurogénesis adulta (Mongiat, 2009), en este caso los progenitores neurales fueron infectados en el hipocampo postnatal.

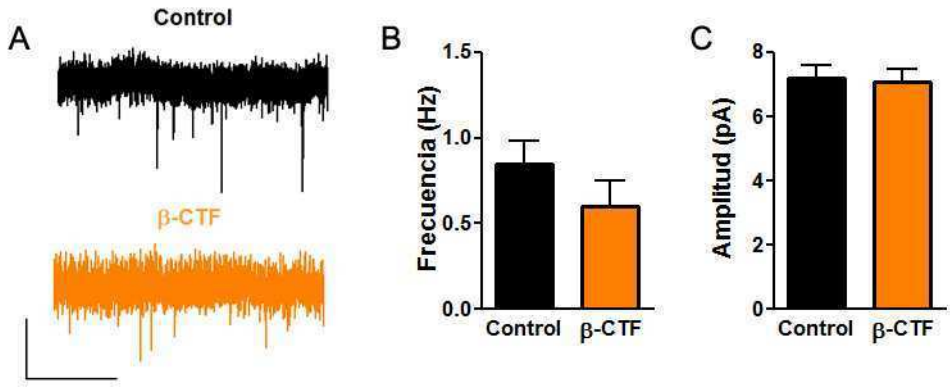


Figura 5-11. Actividad postsinápticos espontánea de las neuronas expresando β-CTF en P21+21. A, ejemplos de trazos registrando las corrientes excitatorias postsinápticos espontáneas en neuronas β-CTF o control a -60 mV. Las barras de calibración representan 5 s y 10 pA. B y C, ni la frecuencia (B, T-test P=0,2304) ni la amplitud (C, T-test P=0,8677) de los eventos excitatorios postsinápticos espontáneos muestra diferencias significativas entre neuronas controles y β-CTF (control n=17, β-CTF n=12).

Cuando se estudió la conectividad aferente que desarrollaron las neuronas expresando β-CTF se encontró que todas las intensidades de estímulo evocaron corrientes excitatorias postsinápticas de cinética similar pero de amplitud menor que las neuronas control (figura 5-9 A). La corriente máxima evocada media fue de 117 ± 14 pA, llamativamente menor que la encontrada para neuronas expresando sólo GFP o RFP. Estos hallazgos indican que la producción de Aβ (o quizás algún otro fragmento liberado por el procesamiento de APP contenido dentro de la secuencia de β-CTF) afecta la forma en que las neuronas granulares se conectan al circuito del giro dentado. En este contexto es importante entender si este fenómeno se está produciendo sobre las mismas neuronas que lo expresan o bien si esta afectando a las células vecinas.

La plasticidad por pulso pareado de las neuronas transducidas con β-CTF mostró una facilitación del 33.5 % similar a la encontrada en neuronas control (figura 5-10 A y B). Esto último indicaría que en este caso también la despolarización alcanzó a la vía perforante lateral y que sus terminales no se

encontrarón afectados. Dado que la plasticidad por pulso pareado es un fenómeno presináptico, este resultado sugeriría que la diferencia encontrada en las corrientes evocadas estaría dada por una modificación de la postsinapsis más que por una alteración en los mecanismos de liberación de los terminales de la vía perforante. De esta manera parece ser que el efecto encontrado afectaría a la propia neurona que sobreexpresa Aβ y no a las neuronas presinápticas cercanas. Sin embargo, con estos resultados no es posible saber si otras neuronas granulares vecinas no están siendo también afectadas por la producción de Aβ.

La actividad espontánea de las neuronas expresando β-CTF no mostró diferencias en la amplitud de las corrientes evocadas (figura 5-11 C). Sin embargo, la frecuencia de los eventos mostró una ligera disminución, aunque no de manera significativa (figura 5-11 B). Estos resultados hacen pensar que la alteración en la amplitud de las EPSCs estaría dada por una disminución del número de los contactos sinápticos más que por modificaciones en la eficacia de la neurotransmisión en cada uno de ellos.

Los hallazgos hasta aquí descriptos en la conectividad de las neuronas nacidas en el hipocampo posnatal expresando β-CTF plantean tres posibilidades:

1- Los efectos de β-CTF se restringen a la sinaptogénesis y las demás propiedades de estas neuronas se desarrollan normalmente.

2- β-CTF afecta la sinaptogénesis llevando a que las demás propiedades de estas neuronas no se desarrollen normalmente.

3- La sobreexpresión de β-CTF afecta el desarrollo neuronal global con la consiguiente disminución de la formación de sinapsis.

Para intentar comprender cuál de los posibles escenarios es el que enfrentamos fue necesario estudiar el grado de desarrollo alcanzado por las neuronas a través de la medición de sus propiedades intrínsecas.

Propiedades intrínsecas de las neuronas de 21 días expresando β-CTF

Las propiedades eléctricas intrínsecas reflejan el grado de madurez que alcanza una neurona en su desarrollo (Bischofberger, 2004; Ambrogini et al., 2004; Espósito et al., 2005). La membrana celular actúa como un dieléctrico que puede separar cargas, por lo que se comporta como un capacitor. De esta manera, la capacitancia de membrana (Cm) aumenta junto con el tamaño de la membrana plasmática. Otra propiedad que permite evaluar el grado de madurez de una neurona es la resistencia de membrana (Rinput). A medida que una neurona madura, incorpora canales iónicos lo cual disminuye su resistencia. Por otra parte, la excitabilidad neuronal que depende de la densidad de canales de Na^+ y K^+ dependientes de voltaje también aumenta conforme maduran las neuronas.

En la modalidad *whole cell* de la técnica de *patch clamp* la respuesta a un escalón de corriente hiperpolarizante de 10 mV se utilizó para medir las propiedades intrínsecas de las neuronas registradas (tabla 5-1, P21+21). A los 21 días las neuronas control mostraron valores dentro de los límites esperados para neuronas de esta edad.

Otros protocolos permiten estudiar las corrientes a través de la membrana y cómo éstas se modifican variando el potencial de membrana de las neuronas. Esto cambia la fuerza impulsora y la permeabilidad a los iones haciendo que a potenciales hiperpolarizados las corrientes sean entrantes y con una importante componente de Na^+ y a voltajes muy despolarizados las corrientes sean salientes y predominantemente mediadas por K^+. El máximo pico entrante representa a la máxima corriente de Na^+, la cual aumenta conforme maduran las neuronas. En las neuronas control esta corriente fue de -5.99 ± 0.68 nA (tabla 5-1).

		Rinput (GΩ)	Cm (pF)	Vm (mV)	Máxima I Na^+ (nA)
P21+21	Control	1,81 ± 0,26 (20)	44,33 ± 3,75 (20)	-56,80 ± 2,58 (20)	-5,99 ± 0,68 (14)
	β-CTF	2,04 ± 0,31 (14)	36,76 ± 3,56 (14)	-60,14 ± 3,53 (14)	-4,93 ± 0,79 (14)
P21+35	Control	1,20 ± 0,10 (17)	61,58 ± 2,58 (17)	-68,94 ± 2,19 (17)	-6,88 ± 0,51 (17)
	β-CTF	1,10 ± 0,10 (10)	55,88 ± 1,48 (10)	-67,00 ± 3,18 (10)	-7,96 ± 0,44 (10)
4m+21	Control	4,59 ± 2,05 (8)	40,16 ± 5,14 (8)	-45,88 ± 5,68 (8)	-5,59 ± 1,08 (8)
	β-CTF	1,99 ± 0,68 (6)	41,91 ± 5,93 (6)	-49,83 ± 6,23 (6)	-5,73 ± 1,01 (6)

Tabla 5-1. Propiedades intrínsecas de las neuronas expresando β-CTF. En P21+21 no se observaron diferencias estadísticamente significativas en resistencia de input (P>0,05; ANOVA de una vía seguido de un post hoc Test de Dunnett) capacitancia de membrana (P>0,05), potencial de reposo (P>0,05) ni corrientes de sodio (P>0,05). En P21+35 no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la resistencia de input (P=0,5235; T-test), capacitancia de membrana (P=0,1330), potencial de reposo (P=0,6155) ni corrientes de sodio (P=0,1736). En 4m+21 no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la resistencia de input (P=0,3117), capacitancia de membrana (P=0,8271), potencial de reposo (P=0,6497) ni corrientes de sodio (P=0,9299).

La capacidad de las neuronas nuevas para disparar potenciales de acción repetitivos con acomodación por frecuencia también indica el grado de desarrollo que las mismas alcanzaron. Las neuronas control de 21 días mostraron un *plateau* de entre 4 y 5 de potenciales de acción evocados ante la inyección creciente de corriente (figura 5-12).

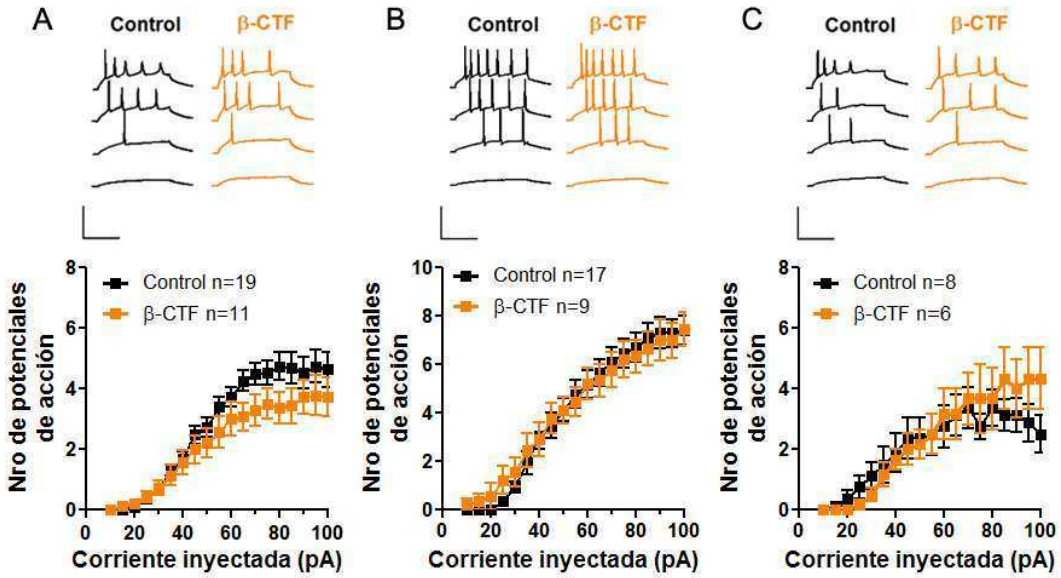


Figura 5-12. Excitabilidad de las neuronas expresando β-CTF. *Paneles superiores*, trazos ejemplificando los potenciales de acción repetitivos en neuronas de P21+21 (A), P21+35 (B) y 4m+21 (C) Las barras de calibración representan 100 ms y 100 mV. *Paneles inferiores*, cuantificación del número de espigas evocadas en neuronas de P21+21 (A), P21+35 (B) y 4m+21 (C) expresando β-CTF y controles ante la inyección creciente de corriente.

Todos estos resultados indican que a los 21 días las propiedades pasivas son similares en las neuronas control nacidas en el giro dentado postnatal y en el adulto (Mongiat, 2009). Ya que esta edad representa la mitad del tiempo que le lleva a una neurona alcanzar su madurez en el hipocampo adulto podemos sugerir que el desarrollo neuronal en el hipocampo posnatal tiene una dinámica temporal comparable con la del adulto joven.

Cuando se estudiaron las propiedades pasivas de las neuronas expresando β-CTF no se detectaron diferencias significativas en ningún parámetro (tabla 5-1). Sin embargo, en general se encontraron tendencias muy leves hacia un fenotipo neuronal menos desarrollado. La resistencia de membrana se mostró aumentada respecto al control, lo que junto con una disminución en la capacitancia de membrana sugiere que el tamaño de las neuronas que producen Aβ es menor que en las controles. La misma tendencia se vio en una menor amplitud en las corrientes de Na^+ junto con un número menor de potenciales de acción dados por la inyección de corriente (figura 5-12 A).

En conjunto, la disminución encontrada en la conectividad que alcanzan las neuronas de 21 días expresando β-CTF con la tendencia hacia propiedades intrínsecas menos maduras muestran que la expresión de forma autónoma de célula de Aβ produce una alteración en la forma en que las neuronas nuevas se desarrollan e incorporan al circuito. De esta manera el escenario parecería ser aquel en el que la conectividad y el desarrollo neuronal se dan de forma independiente debido a que el proceso de sinaptogénesis se ve afectado en una magnitud mucho mayor que el desarrollo general. A partir de

esto, podría interpretarse que la forma en que las neuronas nuevas se integran al circuito se afecta primero y como consecuencia se produce una leve disminución en su desarrollo general.

Efectos de la sobreexpresión de β-CTF en neuronas de 35 días

A partir de estos resultados se plantea la posibilidad de que este efecto podría llevar a la muerte neuronal, a la formación de conexiones aberrantes o, alternativamente, podría revertirse y continuar con un desarrollo neuronal normal. Para buscar respuesta a este interrogante se repitieron los experimentos mencionados pero en esta oportunidad se estudiaron neuronas de 35 días, momento en el que la sinaptogénesis glutamatérgica se encuentra próxima a alcanzar su *plateau* (Zhao, 2006).

Si la expresión de β-CTF desencadenara en la muerte neuronal, a los 35 días podríamos no encontrar neuronas marcadas. De no ser así, y la expresión de β-CTF produjera la distrofia de las neuronas, las mismas nunca alcanzarían a desarrollarse ni integrarse plenamente lo cual debería verse reflejado en sus propiedades de conectividad e intrínsecas a los 35 días. Contrariamente, si el efecto encontrado no representara un obstáculo definitivo en la neurogénesis, 35 días tras la infección estas neuronas podrían haber superado un posible efecto transiente de β-CTF y encontrarse conectadas y desarrolladas normalmente.

Al estudiar las neuronas control de 35 días encontramos que las corrientes presentan cinéticas y valores máximos similares a los encontrados en los controles de 21 días (figura 5-9 B). La máxima amplitud promedió los 162 ± 17 pA. Llamativamente, estos valores no son mayores a los obtenidos a 21 días a pesar de la diferencia en el tiempo de desarrollo. Esto se explicaría porque en el hipocampo adulto la amplitud máxima de las corrientes evocadas aumenta cualitativamente en algún momento posterior a los 35 días (Mongiat, 2009). Este marcado aumento en la amplitud de las respuestas puede estar condicionado por algún evento limitante del

desarrollo neuronal el cual parece no haberse alcanzado antes de los 35 días en el giro dentado postnatal.

Sorprendentemente, la estimulación creciente de la vía perforante produjo en las neuronas de 35 días expresando β-CTF corrientes similares a las evocadas en las neuronas control en todas las intensidades (figura 5-9 B). Esto estaría indicando que las neuronas transducidas con β-CTF atraviesan un estadío transiente a los 21 días en el cual la sinaptogénesis es menos eficiente para luego integrarse normalmente al circuito.

Consistentemente, la plasticidad por pulso pareado en las neuronas de 35 días resultó en una facilitación del 49 % para las controles y del 44 % para las neuronas expresando β-CTF (figura 5-10 C), indicando que la respuesta observada en las corrientes evocadas no esta dada por un aumento compensatorio en la probabilidad de liberación de los terminales presinápticos individuales.

Para completar la caracterización del fenotipo neuronal alcanzado a los 35 días se estudiaron las propiedades intrínsecas de estas neuronas (tabla 5-1, P21+35). Las neuronas control se mostraron más desarrolladas que las neuronas de 21 días en todas sus características. La resistencia de membrana disminuyó a 1.20 ± 0.10 GΩ, la capacitancia de membrana ascendió a 61.58 ± 2.58 pF, el potencial de reposo alcanzó los -68.94 ± 2.19 mV y las corrientes de Na^+ máximas llegaron a -6.88 ± 0.51 nA. Por otro lado, las neuronas control de 35 días alcanzaron un *plateau* cercano a 7 potenciales de acción repetitivos evocados por la inyección creciente de corriente (figura 5-12 B).

Cuando se estudiaron las neuronas portando β-CTF a los 35 días no se detectaron diferencias significativas en ninguna de sus propiedades intrínsecas respecto de las neuronas control (tabla 5-1 y figura 5-12 B). Esto estaría indicando que el desarrollo neuronal global también se recupera al nivel normal para los 35 días.

Los hallazgos en la conectividad y el desarrollo encontrados en las neuronas de 35 días sugieren que la expresión de β-CTF no afecta de manera definitiva la forma en que procesan la información y se integran al circuito del giro dentado. Sin embargo, no fue posible descartar que la expresión del transgén no haya disminuido entre los 21 y 35 días, en cuyo caso estaríamos subestimando los efectos producidos. Sin embargo, esto parece poco probable debido a que la fluorescencia encontrada, producto de la expresión de GFP no se ve disminuida. Y como ha sido dicho anteriormente, los niveles de expresión de los genes río abajo del IRES muy probablemente sean menores a los de los genes ubicados a continuación del promotor.

En conclusión, podemos decir que la expresión autónoma de célula de una construcción amiloideogénica produce un retraso en la incorporación funcional de las nuevas neuronas al giro dentado. Esto se ve evidenciado por la disminución en la sinaptogénesis a los 21 días y su posterior recuperación a los 35. De esta manera podríamos proponer que la elevación de los niveles de Aβ es responsable por el efecto encontrado sobre la formación de sinapsis. Procesos sutiles como este podrían tener consecuencias sobre el funcionamiento del giro dentado y del hipocampo en general. Así, pequeñas alteraciones a nivel de las sinapsis podrían manifestarse clínicamente como los déficits cognitivos que se presentan durante el inicio de la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, con estos experimentos no es posible descartar aún si las neuronas que estudiamos a los 35 días no conforman una subpoblación capaz de escapar a los efectos de β-CTF, lo cual sesgaría nuestro análisis.

Efectos de la sobreexpresión de β-CTF en neuronas de 21 días nacidas en el giro dentado de ratones de 4 meses.

Los resultados anteriores fueron obtenidos en el cerebro postnatal, cuyo entorno difiere notablemente del que se encuentra en AD. A continuación, intentamos reproducir los efectos encontrados en un cerebro adulto. Si los cambios que se dan con el envejecimiento afectan la incidencia de AD, es posible que también modulen los efectos aquí encontrados. Se ha visto

anteriormente que la neurogénesis disminuye marcadamente con la edad. Dada la baja eficiencia para transducir NPCs de los retrovirus portando APP, no fue posible trabajar en edades más avanzadas por la dificultad para encontrar neuronas marcadas (figura 4-1). Por estos motivos se realizaron los experimentos en hembras C57BL/6 de 4 meses de edad, momento en el cual existe una disminución en la neurogénesis que refleja cambios del ambiente, a la vez que el número de neuronas marcadas permite su estudio.

Las neuronas control nacidas a los 4 meses y estudiadas 21 días más tarde mostraron corrientes evocadas con amplitudes llamativamente menores que las neuronas de la misma edad nacidas en el cerebro joven (figura 5-9 C). La máxima amplitud evocada fue de 73 ± 17 pA. Esta situación puede explicarse porque a medida que envejece, el tejido nervioso se vuelve menos resistente a la manipulación que implica la preparación de las rodajas para registros electrofisiológicos. En este contexto, los axones aferentes podrían verse dañados y estímulos de magnitudes comparables resultar en corrientes menores. Otra explicación posible, y no excluyente, se basa en que los cambios que se dan en el envejecimiento y que llevan a una menor producción de neuronas, podrían demorar el tiempo de desarrollo de las nuevas neuronas. Así, a los 21 días una neurona en el cerebro de 4 meses se encontraría menos conectada que una neurona de la misma edad nacida en el hipocampo postnatal. Sea cual fuera el escenario, afectaría en igual medida a las neuronas control y a las β-CTF, por lo tanto la comparación entre ambas no pierde validez. En estas condiciones las neuronas expresando β-CTF mostraron corrientes postsinápticas evocadas similares a las encontradas en neuronas controles, lo cual estaría indicando que la producción de Aβ en este contexto no produce un efecto. Dado que es posible que la escala temporal con la que ocurren los procesos en el cerebro de 4 meses sea diferente a la del cerebro postnatal, el retraso inducido por β-CTF en el cerebro joven podría verse enmascarado por el retraso global dado por el envejecimiento.

Las propiedades intrínsecas de las neuronas control nacidas a los 4 meses mostraron características inmaduras similares a las de las neuronas nacidas

en el cerebro posnatal (tabla 5-1, 4m+21). Sin embargo, la resistencia de membrana mostró un marcado aumento a los 4 meses, aunque no fue significativo. Esta diferencia parece deberse a que la combinación del alto error en las mediciones del Rinput con el bajo número de neuronas incluidas en estos experimentos, por la disminución en su producción con la edad, resultan en una gran variabilidad de los datos. Cuando se compararon las neuronas control con las que expresaron β-CTF no se encontraron diferencias en la capacitancia de membrana, el potencial de reposo, las amplitudes de las corrientes de Na^+ ni en la capacidad para disparar potenciales de acción repetitivos (figura 5-12 C). El hecho de que las propiedades intrínsecas de ambos grupos de neuronas no se encuentren menos desarrolladas sugiere que la sinaptogénesis durante el envejecimiento es más sensible a los cambios del entorno que el desarrollo neuronal general y/o a que la diferencia en las corrientes evocadas entre postnatales y adultos esta dada por menor la calidad de los axones estimulados.

En resumen, en el hipocampo de 4 meses no se detectaron diferencias en ninguno de los parámetros estudiados entre las neuronas control y β-CTF de 21 días. Esto podría deberse a que en este contexto, el retraso encontrado en el cerebro postnatal se diera en otro momento debido a que la dinámica temporal del desarrollo neuronal parecería ser diferente. Sin embargo es posible que los cambios que se presentan a los 4 meses no sean lo suficientemente drásticos como para favorecer la acción de Aβ de manera similar a lo que ocurre realmente en la neurodegeneración. El estudio detallado de cómo la secuencia de desarrollo neuronal es modulada a medida que el animal envejece y el uso de animales más viejos quizás encuentre respuesta a si existe una agudización de los efectos producidos por la sobreexpresión de Aβ con el envejecimiento.

Características morfológicas de las neuronas expresando β-CTF a los 21 días.

Los resultados obtenidos utilizando electrofisiología sugieren que las neuronas nacidas en el hipocampo postnatal expresando β-CTF sufren un retraso en su desarrollo y sinaptogénesis que se hace evidente a los 21 días. Alcanzados los 35 días, estas alteraciones desaparecen y las neuronas nuevas produciendo Aβ logran conectarse de forma similar a las neuronas control.

Los efectos de Aβ sobre la conectividad parecen afectar a las sinapsis formadas sobre las nuevas neuronas en cantidad y no en calidad. De esta manera las disminución en la amplitud de las corrientes excitatorias evocadas en neuronas expresando β-CTF se explicaría porque las mismas reciben menos aferentes de la vía perforante.

La disminución del número de sinapsis excitatorias a los 21 días podría reflejarse morfológicamente en una de las siguientes situaciones:

1- Neuronas con igual longitud del árbol dendrítico que las controles pero con menor densidad de espinas.

2- Neuronas con menor longitud del árbol dendrítico con densidad de espinas igual a las controles.

3- Neuronas con reducción en el largo del árbol dendrítico y menor densidad de espinas

En todos los casos el número de contactos sinápticos netos se vería disminuido, lo cual podría subyacer al fenotipo neuronal descripto electrofisiológicamente.

Para investigar cuál de estas situaciones es la que tiene lugar en las neuronas de 21 días nacidas en el cerebro posnatal, inyectamos retrovirus

expresando β-CTF y control en dos grupos de hembras C57BL/6 en P21-26 (figura 5-13 A). Tres semanas más tarde se prefundieron los animales y los cerebros se congelaron y cortaron en secciones de 60 μm para analizarlos utilizando inmunofluorescencia y microscopía confocal. Se cuantificó la densidad de espinas dendríticas y el largo dendrítico total. En neuronas controles las espinas alcanzaron las 0.98 ± 0.06 espinas/μm y el árbol dendrítico arrojó un total de 630 ± 50 μm, valores dentro de lo esperable para neuronas de 21 días nacidas en el cerebro adulto joven (Zhao, 2006). Las neuronas expresando β-CTF no mostraron diferencias en la densidad de espinas alcanzada (figura 5-13 B y C). La comparación de la longitud del árbol dendrítico mostró una disminución significativa respecto al grupo control (figura 5-13 D y E). Sin embargo, el análisis de este parámetro se ve limitado porque el espesor de las secciones utilizadas resulta en el corte de las dendritas. Por lo tanto, al haber menos neuronas transducidas en el hipocampo de los ratones infectados con β-CTF, podría suceder que se incluyeran en el análisis más neuronas con dendritas cortadas que en el control. Así, este resultado se vería sesgado. Aunque esto no fue del todo descartado, la disminución encontrada en el largo dendrítico tiene una magnitud del 38% notablemente comparable con la disminución del 36% encontrada en la máxima EPSC evocada en estas neuronas, lo cual hace probable que este resultado no se deba a un artefacto.

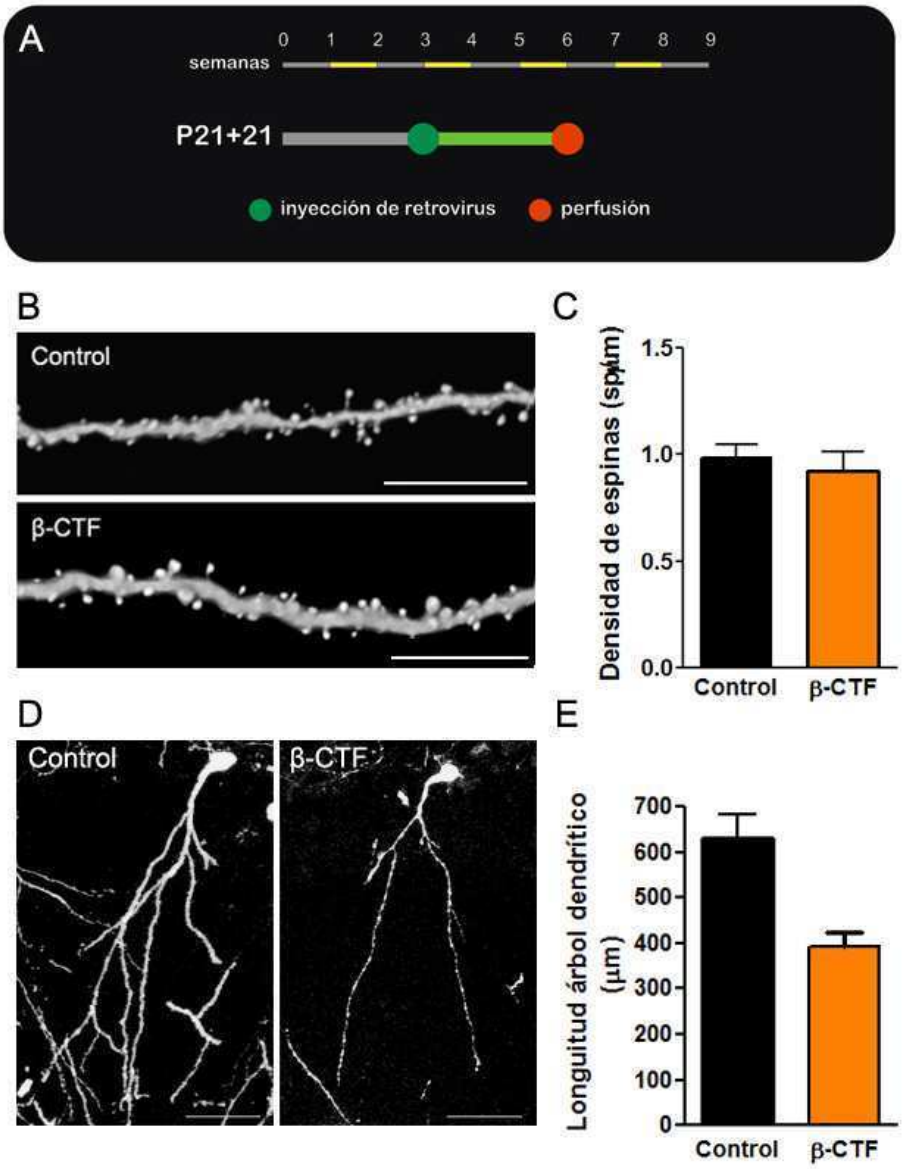


Figura 5-13. Estudio morfológico de las neuronas expresando β-CTF de P21+21. A, diseño experimental. B, imágenes representativas de dendritas ubicadas en el tercio medio de la capa molecular que pertenecen a neuronas granulares de 21 días de edad expresando RFP (control) o β-CTF. Las barras de calibración son de 10 µm. C, la densidad de espinas dendríticas no mostró diferencias significativas entre ambos grupos (control n=14, β-CTF n=17, T-test, P=0,5722). D, imágenes ejemplificando la longitud dendrítica alcanzada en cada uno de los grupos experimentales. Las barras de calibración son de 30 µm. E, la cuantificación de la longitud total del árbol dendrítico de neuronas de P21+21 difiere significativamente entre control y β-CTF (control n=15, β-CTF n=15, T-test P=0,0006).

Estos resultados indican que el retraso funcional encontrado en las neuronas de 21 días nacidas en el hipocampo posnatal expresando β-CTF tiene su correlato morfológico en una disminución de la longitud total del árbol dendrítico. Este acortamiento explicaría que, a igual densidad de espinas dendríticas, las neuronas que expresan β-CTF reciban un número menor de sinapsis excitatorias, lo cual produce corrientes postsinápticas de menor amplitud.

Conectividad y desarrollo de las neuronas expresando otras variantes de APP

Efectos de la sobreexpresión de APPwt

Hasta aquí hemos encontrado diferencias en la conectividad y el desarrollo que alcanzan las neuronas nuevas produciendo Aβ a partir de β-CTF. Sin embargo, tanto en la patología humana como en la mayoría de los modelos animales de AD, el péptido β amiloide proviene del procesamiento de APP. Para evaluar si las neuronas nacidas en el hipocampo posnatal se ven afectadas por la sobreexpresión de APP, un nuevo grupo de hembras C57BL/6 de 21-26 días de edad fue inyectado utilizando una construcción retroviral que contiene APPwt. Las neuronas transducidas fueron estudiadas mediante electrofisiología para evaluar su grado de conectividad y desarrollo al cabo de 21 días.

En las neuronas expresando APPwt la estimulación de la vía perforante evocó EPSCs crecientes. La amplitud de las corrientes evocadas se vio disminuida respecto de las neuronas control, mayoritariamente en los valores de estimulación más altos (figura 5-14).

La estimulación pareada de la vía perforante indujo en las neuronas expresando APPwt una facilitación del 29%, similar a lo que sucede en neuronas control (figura 5-14 C). Esto estaría indicando que, al igual que en

las neuronas expresando β-CTF, el efecto producido por APPwt tiene lugar sobre la misma neurona que genera Aβ y que no afecta los terminales presinápticos que las contactan.

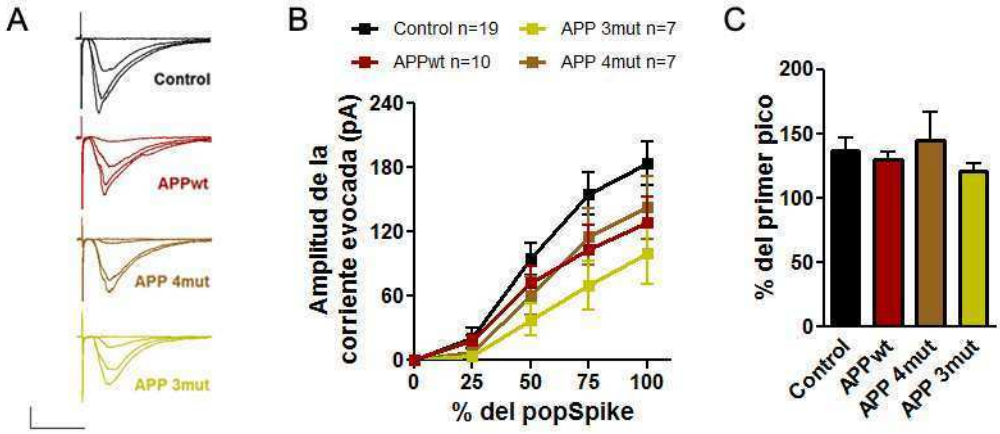


Figura 5-14 Conectividad de las neuronas expresando APP o sus mutantes. A, trazos ejemplificando las corrientes postsinápticas evocadas en neuronas de P21+21 en presencia de PTX y a un potencial de membrana de -60 mV. Cada trazo es el promedio de 4 repeticiones en respuesta a estímulos del 25, 50, 75 y 100% del popSpike. Las barras de calibración representan 20 ms y 50 pA. B, cuantificación de la amplitud máxima de las corrientes postsinápticas evocadas en neuronas expresando APPwt, APP 4mut, APP 3mut y controles. C, la cuantificación de la plasticidad por pulso pareado no muestra diferencias entre los grupos (control n=16, APPwt n=8, APP 4mut n=5, APP 3mut n=4, ANOVA de una vía P=0,7270).

El estudio de las propiedades intrínsecas de las neuronas expresando APPwt no mostró diferencias significativas con las neuronas control (tabla 5-2). Sin embargo, la capacitancia de membrana se mostró algo menor en neuronas APPwt.

	Rinput (GΩ)	Cm (pF)	Vm (mV)	Máxima I Na^+ (nA)
Control	1,81 ± 0,26 (20)	44,33 ± 3,75 (20)	-56,80 ± 2,58 (20)	-5,99 ± 0,68 (14)
APPwt	2,01 ± 0,22 (11)	33,12 ± 3,03 (11)	-56,55 ± 1,73 (11)	-6,43 ± 0,66 (11)
APP 4mut	4,62 ± 1,62 (7)	40,22 ± 4,63 (7)	-37,86 ± 3,10 (7)	-4,87 ± 0,90 (7)
APP 3mut	2,57 ± 0,29 (7)	36,84 ± 3,15 (7)	-36,00 ± 2,26 (7)	-4,89 ± 0,66 (7)

Tabla 5-2. Propiedades intrínsecas de las neuronas expresando APPwt, APP 4mut y APP 3mut. El Rinput de APP 4mut muestra una diferencia significativa respecto al control y a APPwt (ANOVA de una vía seguido de un post hoc Test de Bonferroni P<0,05), la capacitancia de membrana es similar en los cuatro casos (P=0,1788), el potencial de reposo de APP 4mut y de APP 3mut es significativamente diferente del control y de APPwt (ANOVA de una vía seguido de un post hoc Test de Bonferroni P<0,05). APPwt y control así como APP 3mut y APP 4mut no difieren entre ellos (P>0,05), finalmente las corrientes de Na^+ de los cuatro grupos son similares (ANOVA de una vía P=0,3849).

La expresión de APPwt produjo importantes cambios sobre la capacidad de las nuevas neuronas para disparar potenciales de acción repetitivos con acomodación por frecuencia. El número de espigas evocadas fue mayor en las neuronas expresando APPwt que en las neuronas control y β-CTF, alcanzando un *plateau* superior a los 6 potenciales de acción. Esta capacidad aumentada para disparar repetidamente sugiere un grado de desarrollo mayor que sus controles, lo cual no es consistente con las demás propiedades intrínsecas estudiadas.

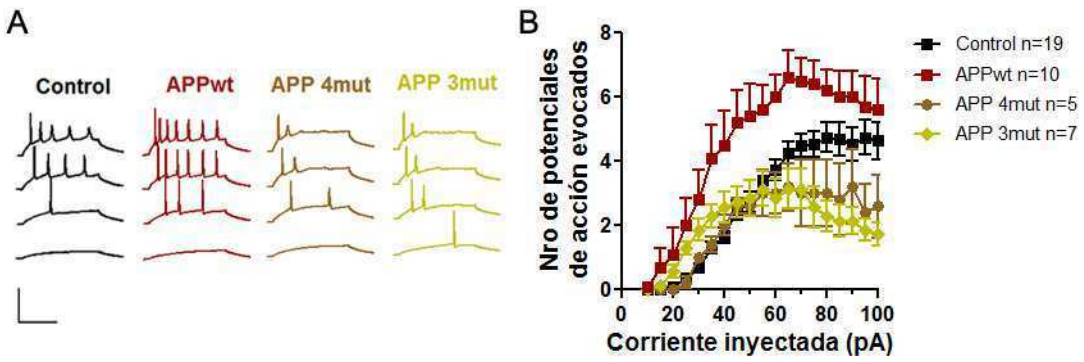


Figura 5-15. Excitabilidad de las neuronas expresando APP o sus mutantes. A, trazos ejemplificando los potenciales de acción repetitivos evocados en neuronas de P21+21. Las barras de calibración representan 100 ms y 100 mV. B, cuantificación del número de espigas evocadas en neuronas expresando APPwt, APP 4mut, APP 3mut y controles ante la inyección creciente de corriente.

Propiedades del potencial de acción como el umbral de disparo o el pico y el área de la *afterhyperpolarization* podrían determinar estas diferencias. Cambios en las características propias de la membrana como el *tau* o la despolarización subumbral se manifestarían en un aumento del número de potenciales de acción evocados. De la misma manera, la forma en que se activan las corrientes de Na^+ y K^+ podrían explicar la diferencia encontrada. Todos estos parámetros fueron evaluados (figura 5-16) y en ninguno de ellos se encontraron diferencias significativas. Sin embargo, la leve hiperpolarización del potencial de umbral junto con el ligero incremento del área del *afterhyperpolarization* podrían subyacer parte del aumento en la excitabilidad neuronal producido por APPwt.

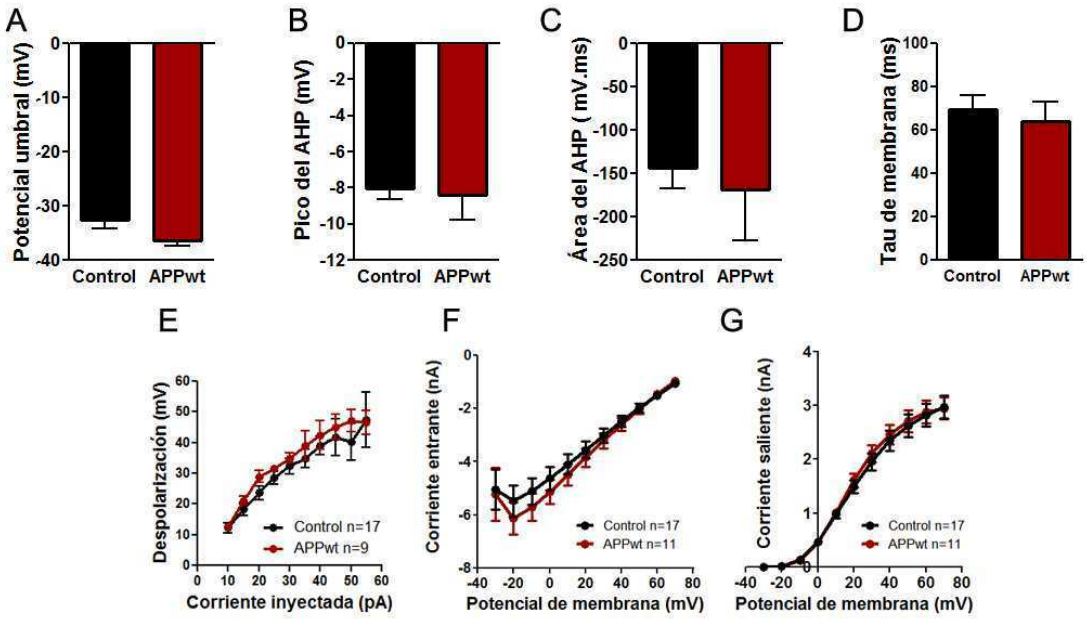


Figura 5-16. Propiedades del potencial de acción. No se encontraron diferencias significativas que expliquen el mayor número de espigas

evocadas en neuronas expresando APPwt respecto a los controles al investigar su potencial umbral (A), pico (B) y área (C) de la *afterhyperpolarization*, *tau* de membrana (D), despolarización subumbral (E) y activación de la corriente de Na^+ (F) y K^+ (G).

En conjunto, estos hallazgos sugieren que la sobreexpresión de APPwt en las neuronas nacidas en el hipocampo posnatal disminuye la forma en que estas se conectan. El aumento en la capacidad de estas neuronas para disparar potenciales de acción indica que la excitabilidad se encuentra alterada. Dado que a diferencia de β-CTF, APPwt expresa también su extremo N-terminal ($APP^{s\beta}$), resulta lógico pensar que un dominio contenido en este fragmento mediaría estos efectos.

Efectos de la sobreexpresión de mutantes de APP

Es muy probable que la concentración de Aβ producida a partir de β-CTF y APPwt no reproduzca el microambiente presente en los cerebros de pacientes y modelos transgénicos de AD. Si los niveles generados por los retrovirus fueran menores, los efectos reportados podrían ser sólo parte de los que se encuentran realmente en estas situaciones patológicas. Para averiguar si un incremento en la generación de Aβ podría producir nuevos efectos o efectos más marcados sobre las neuronas nuevas, se crearon dos vectores retrovirales expresando formas mutantes de APP provenientes de variantes familiares de AD. Las mutaciones *Florida* (Ile716Val) y *London* (Val717Ile) hacen a APP más susceptible a la acción de γ-secretasa (Goate et al., 1991; Eckman et al., 1997). La mutación *Swedish* (KM670/671NL) incrementa la afinidad de β-secretasa por APP (Mullan et al., 1992) y la mutación *Iowa* (Asp694Asn) aumenta la agregación de Aβ (Grabowski, 2001). De la combinación de estas mutaciones surgieron las nuevas construcciones:

- **APP 3mut**: combina las mutaciones S*wedish*, *Florida* y *London*.

- **APP 4mut**: lleva las mutaciones de APP 3mut más la mutación *Iowa*.

En teoría, la expresión de estas nuevas formas aumentaría los niveles de Aβ producidos por APP. Además, el péptido generado a partir de APP 4mut sería más tóxico debido a su mayor agregación.

Para estudiar los efectos de estas formas de APP sobre la sinaptogénesis y el desarrollo neuronal se infectó un grupo de hembras C57BL/6 de 21-26 días con cada una de las nuevas construcciones. A las tres semanas se realizaron registros electrofisiológicos para monitorear la conectividad alcanzada y el desarrollo de las propiedades intrínsecas de las neuronas nacidas expresando APP 4mut y APP 3mut.

Las respuestas postsinápticas evocadas por la estimulación de la vía perforante mostraron en ambos casos amplitudes menores que las corrientes control (figura 5-14 A y B). Inesperadamente, las corrientes evocadas en las neuronas expresando APP 4mut fueron mayores que las evocadas en neuronas expresando APP 3mut, lo cual sugiere que la mayor agregación dada por la mutación *Iowa* no aumenta su efecto. En ninguno de los casos se encontraron tampoco diferencias en la plasticidad por pulso pareado (figura 5-14 C). Las propiedades intrínsecas mostraron una leve tendencia hacia estadios menos desarrollados (tabla 5-2), excepto para el caso del potencial de reposo que se mostró significativamente despolarizado tanto para APP 4mut como para APP 3mut. Por otro lado, la resistencia de membrana de las neuronas expresando APP 4mut se vio significativamente aumentada respecto al control. La explicación más probable para esto parece encontrarse también la gran variabilidad observada y el bajo número de neuronas estudiadas.

La capacidad de estas neuronas para disparar espigas repetitivas se vio afectada. En ambos casos el *plateau* alcanzado fue cercano a los 3

potenciales de acción (figura 5-15). Esto último llama la atención, debido a que en el caso de APPwt se encontró un efecto opuesto con un aumento en la tasa de disparo. Este efecto fue atribuido a algún dominio presente en el extremo N-terminal de APP, sin embargo, este también se encuentra presente en APP 4mut y APP 3mut. La investigación de esta diferencia requeriría de mayor profundidad y probablemente sea retomada en el futuro.

En conclusión, la expresión de formas mutantes de APP no pareció afectar con mayor agresividad a las neuronas nuevas que las otras construcciones amiloideogénicas. Esto se vio reflejado por la ausencia de nuevas alteraciones y la falta de un aumento significativo en la magnitud de los cambios encontrados (figura 5-17). Dado que la generación de Aβ a partir de APP y sus variantes se ve limitada por el procesamiento de β-secretasa, β-CTF podría ser la construcción que más péptido produce. Las neuronas expresando APPwt y APP 4mut se vieron ligeramente menos afectadas en su sinaptogénesis y desarrollo global que las neuronas expresando β-CTF. Sin embargo, la expresión de APP 3mut mostró corrientes evocadas levemente menores y propiedades intrínsecas similares a β-CTF. En este contexto, podríamos proponer que β-CTF y APP 3mut producen efectos similares debido a que producen niveles comparables de Aβ. Mientras que β-CTF sólo debe ser procesada por γ-secretasa, APP 3mut presenta las mutaciones que facilitan su procesamiento por la vía amiloideogénica. La diferencia entre APP 3mut y APP 4mut estaría dada porque el aumento en la agregación que *Iowa* le proporciona a APP 4mut llevaría a Aβ a formar estructuras oligoméricas de mayor tamaño que podrían ejercer efectos diferentes a los encontrados sobre la sinaptogénesis.

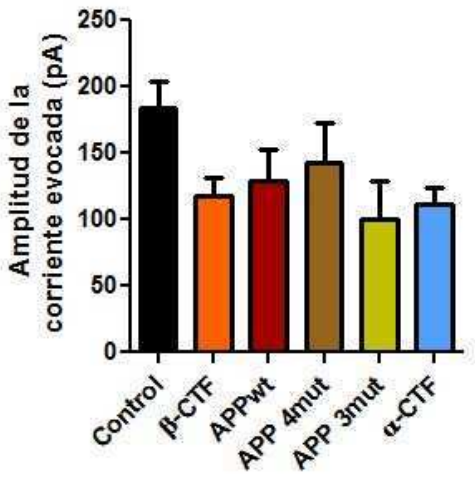


Figura 5-17. Conectividad máxima alcanzada. Amplitud de la corriente media evocada en neuronas expresando cada una de las variantes de APP utilizadas o controles cuando se estimuló con el 100% del popSpike. Las diferencias no son estadisticamente significativas en ninguna de las comparaciones (control n=19, β-CTF n=13, APPwt n=10, APP 4mut n=7, APP 3mut n=7, α-CTF n=8; ANOVA de una vía P=0,0533).

Conectividad y desarrollo de las neuronas expresando α-CTF

En los experimentos anteriores hemos asumido que los efectos encontrados sobre la sinaptogénesis y el desarrollo neuronal fueron mediados por la acción del péptido Aβ. Sin embargo, los testeos *in vivo* realizados no permitieron su detección, probablemente como consecuencia de las bajas concentraciones alcanzadas. Por lo tanto, hasta aquí hemos basado nuestros hallazgos en la "hipótesis amiloidea". La misma propone que la sobreexpresión de APP lleva a un aumento en los niveles de Aβ, el cual produce los eventos neurodegenerativos encontrados en AD. Sin embargo, el procesamiento de APP libera otros fragmentos contenidos en su secuencia cuya actividad fisiológica o patológica no ha sido del todo esclarecida (Vetrivel & Gopal Thinakaran, 2006). Por otro lado, APP puede ser procesado por una vía alternativa e independiente de β-secretasa, la cual no produce Aβ

(Vetrivel & Gopal Thinakaran, 2006). En esta vía no amiloideogénica APP es inicialmente escindido por α-secretasa, cuyo sitio de corte se encuentra dentro de la secuencia de Aβ. Este procesamiento inicial produce dos fragmentos, $APP^{s\alpha}$ y α-CTF. Este último presenta una secuencia idéntica a β-CTF excepto que no posee los 16 aminoácidos iniciales del péptido β amiloide y su posterior procesamiento por γ-secretasa libera un péptido formado por los aminoácidos remanentes (p3) y el fragmento γ-CTF (figura 1-3).

Para investigar si los efectos encontrados a lo largo de este capítulo fueron mediados por Aβ se realizó una nueva construcción retroviral portando α-CTF. Si los efectos encontrados en las neuronas nuevas dependieran de la producción de Aβ, las neuronas transducidas con este vector no deberían sufrir alteraciones ya que no lo producen.

Se inyectó el virus que codifica para α-CTF en el giro dentado de hembras C57BL/6 de 21-26 días de edad y 21 días más tarde se estudiaron las características electrofisiológicas de las neuronas transducidas.

Al estimular los axones aferentes de las neuronas expresando α-CTF se evocaron respuestas postsinápticas menores a las de las neuronas control para todas las intensidades (figura 5-18 A y B). Sorprendentemente, la curva obtenida para estas neuronas arrojó resultados similares a aquella obtenida en neuronas expresando β-CTF (figura 5-9 A y 5-17). Los resultados de plasticidad por pulso pareado no mostraron diferencias significativas respecto al control ni a β-CTF (figura 5-18 C).

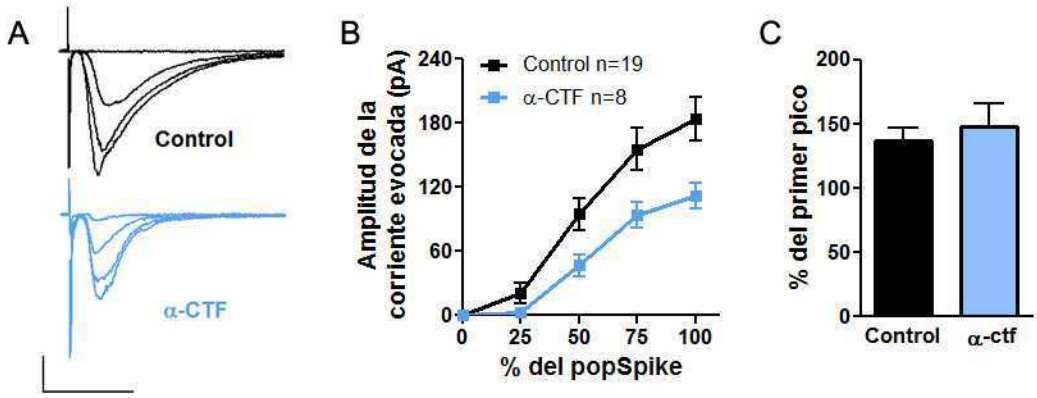


Figura 5-18. Conectividad de las neuronas expresando α-CTF. A, trazos ejemplificando las corrientes postsinápticas evocadas al estimular el 25, 50, 75 y 100% del popSpike en neuronas cuyo potencial de membrana se fijó a -60 mV y en presencia de PTX. Cada trazo es el promedio de 4 repeticiones. Las barras de calibración representan 20 ms y 50 pA. B, cuantificación de la amplitud máxima de las corrientes postsinápticas evocadas en neuronas α-CTF y controles ante la estimulación creciente del popSpike. C, la cuantificación de la plasticidad por pulso pareado no muestra diferencias entre los grupos (control n=16, α-CTF n=7, ANOVA de una vía seguido de un post hoc Test de Dunnett P>0,05).

En conjunto, estos hallazgos en la conectividad alcanzada por las neuronas expresando α-CTF sugieren que el efecto producido estaría mediado por un fragmento compartido entre esta construcción y β-CTF. Las propiedades intrínsecas de las células infectadas con α-CTF mostraron una tendencia similar a β-CTF con características menos desarrollados (tabla 5-3). Esto se vio reflejada en una mayor resistencia de membrana, una menor capacitancia y una menor amplitud de la corriente máxima de Na^+ respecto a las controles. Esta tendencia fue incluso más marcada que en las neuronas expresando β-CTF, llegando en el caso del potencial de reposo a encontrarse significativamente más despolarizado.

	Rinput (GΩ)	Cm (pF)	Vm (mV)	Máxima I Na^+ (nA)
Control	1,81 ± 0,26 (20)	44,33 ± 3,75 (20)	-56,80 ± 2,58 (20)	-5,99 ± 0,68 (14)
α-CTF	2,49 ± 0,17 (8)	35,69 ± 1,53 (8)	-42,25 ± 3,21 (8)	-4,45 ± 0,36 (8)

Tabla 5-3. Propiedades intrínsecas de las neuronas expresando α-CTF. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la resistencia de input (ANOVA de una vía seguido de un post hoc Test de Dunnett P>0,05), capacitancia de membrana (P>0,05) ni corrientes de Na^+ (P>0,05). Se encontró una diferencia estadística en el potencial de reposo respecto al control (P<0,05).

Por ultimo la capacidad para generar potenciales de acción repetitivos con acomodación por frecuencia no difirió significativamente respecto de las neuronas control ni de las que sobreexpresaron β-CTF (figura 5-19).

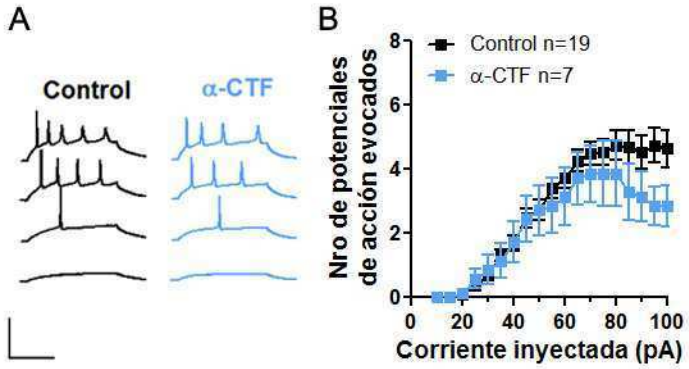


Figura 5-19. Excitabilidad de las neuronas expresando α-CTF. A, trazos ejemplificando los potenciales de acción repetitivos evocados en neuronas de P21+21. Las barras de calibración representan 100 ms y 100 mV. B, cuantificación del número de espigas evocadas en neuronas expresando α-CTF y controles ante la inyección creciente de corriente.

Todos estos resultados sugieren que el efecto producido por las diferentes variantes de APP sobre la conectividad y el desarrollo neuronal sería

independiente de la producción de Aβ y que estaría dado por la expresión de un dominio contenido dentro del fragmento α-CTF, el cual comparten todas las construcciones evaluadas. Sin embargo, con los experimentos realizados no es posible descartar completamente que los efectos encontrados no se deban a la sobreexpresión neuronal de un polipéptido foráneo que se localiza en la membrana plasmática. Experimentos futuros sobreexpresando diferentes dominios de α-CTF u otros fragmentos de APP insensibles al procesamiento por γ-secretasa ayudaran a contestar si los efectos aquí encontrados sobre la neurogénesis en el giro dentado son específicos de APP.

Conclusiones

En esta última parte de la tesis, nos propusimos estudiar la forma en que las neuronas nuevas se desarrollan e integran funcionalmente al circuito del hipocampo en un nuevo modelo de neurodegeneración. Experimentos realizados en neuronas expresando APP indicaron que la dinámica con la que se desarrolla su conectividad aferente glutamatérigica se ve alterada aparentemente en forma autónoma de célula, sin embargo será necesario estudiar qué sucede en neuronas granulares vecinas antes de poder concluir esto. La estimulación de la vía perforante evoca corrientes de menor amplitud en neuronas expresando β-CTF que en las controles cuando tienen 21 días de vida. Consistentemente, las propiedades intrínsecas de estas neuronas mostraron una tendencia hacia la inmadurez. Sin embargo, cuando estas neuronas fueron estudiadas a los 35 días de vida, no se observaron alteraciones, indicando que el efecto final producido es un retraso transitorio en el desarrollo y la sinaptogénesis. Paralelamente, análisis morfológicos permitieron encontrar alteraciones anatómicas subyaciendo los cambios funcionales descriptos. Las neuronas expresando β-CTF mostraron una disminución neta en el número de sinapsis aferentes dadas por un árbol dendrítico más corto con una densidad de espinas normal.

Estos cambios sutiles y transitorios a nivel de la plasticidad neuronal durante el desarrollo podrían afectar también a las neuronas preestablecidas cuando reorganizan sus contactos en el cerebro adulto. Existen evidencias que muestran que tanto durante el envejecimiento como en la AD, las sinapsis entre la vía perforante y las neuronas granulares se afectan tempranamente (Bondareff & Geinisman, 1976; Geinisman, 1979; Masliah, 1994). De esta manera, si los efectos encontrados sobre la sinaptogénesis en neuronas en desarrollo, alcanzaran también la formación de sinapsis en neuronas maduras los efectos aquí encontrados podrían estar subyaciendo los déficits cognitivos iniciales descriptos en AD.

El efecto encontrado fue reproducido con distintas variantes de APP las cuales poseen diferentes capacidades para generar Aβ. A pesar de esto, la magnitud del cambio no fue marcadamente diferente en ningún caso lo cual planteó la posibilidad de que otro subproducto de APP estuviera involucrado.

De esta forma, se evalúo la integración neuronal expresando α-CTF, el cual no posee la secuencia aminoacídica de Aβ. Los efectos encontrados fueron en gran manera similares a los que se vio con las construcciones amiloideogenicas, planteando la posibilidad de que dicho efecto no sea mediado por el péptido β amiloide. Futuros experimentos ayudaran a contestar este interrogante que de confirmarse desafía fuertemente a la hipótesis amiloidea, la cual gobierna este campo de investigación.

DISCUSIÓN

A lo largo de esta tesis hemos estudiado modelos animales para dilucidar la forma en que el envejecimiento y la enfermedad de Alzheimer afectan la plasticidad neuronal del hipocampo. Analizando el proceso de neurogénesis intentamos entender en que grado los cambios que se presentan en estas situaciones pueden afectar la integración neuronal. La neurogénesis adulta es un proceso de plasticidad que involucra la proliferación, migración y diferenciación de células progenitoras neurales. En las condiciones adecuadas, las nuevas neuronas se incorporaran al circuito preexistente. Sin embargo, se ha visto que distintas situaciones patológicas son capaces de afectar su correcta integración.

Las neuronas granulares tienen un patrón de organización en la GCL sostenido en el tiempo.

Existen patologías en las que el proceso de migración neuronal se ve afectado durante el desarrollo del SNC y también en el hipocampo adulto. En la epilepsia se han encontrado neuronas granulares ectópicas ubicadas en el hilus (Parent, 2007). La disminución de la expresión de DISC-1, un gen relacionado con la esquizofrenia, en neuronas granulares nacidas en el adulto hace que las mismas migren más allá de la capa granular, hasta localizarse en la capa molecular (Duan et al., 2007). La lisencefalia es una patología producida por una mutación en el gen de doblecortina que hace que las neuronas sean incapaces de migrar durante el desarrollo del SNC de forma que los sujetos afectados presentan cuadros de retardo mental grave y cerebros sin circunvoluciones (Allen & Walsh, 1999).

Se ha propuesto a también a relina como un represor de la migración neuronal (Frotscher, 2010), ya que su disrupción induce un aumento en la misma. Paralelamente, su deficiencia ha sido sugerida en patologías que presentan alteraciones en la localización neuronal como esquizofrenia y epilepsia.

En este trabajo hemos estudiado la migración de las neuronas granulares nacidas en diferentes momentos de la vida, desde el desarrollo hasta la adultez y cómo la estructura de la GCL se mantiene con el envejecimiento. Describimos que en la capa granular existe una organización celular determinada desde que las primeras células progenitoras dan lugar al giro dentado y que se conserva en la vida adulta. De esta manera, las neuronas generadas se van incorporando al estrato más interno de la capa granular durante toda la vida. Este patrón, el cual se ha visto afectado en las situaciones patológicas mencionadas parece ser robusto respecto del envejecimiento fisiológico, ya que hemos encontrado que en ratones se conserva incluso después de 15 meses. Restaría explorar si las neuronas que se desarrollan en ese contexto, y también en modelos de neurodegeneración, se localizan normalmente para distinguir si las alteraciones en la migración neuronal encontradas en diferentes desórdenes (cuya incidencia aumenta con la edad) son parte de los procesos patológicos o bien un fenómeno inducido por el envejecimiento *per se*.

Las neuronas granulares son capaces de conectarse al circuito del hipocampo durante el envejecimiento y en un modelo transgénico de AD.

Aunque el cerebro humano es capaz de funcionar normalmente durante casi un siglo, el envejecimiento y el aumento de la incidencia de las enfermedades neurodegenerativas plantean situaciones en las cuales el número o la complejidad de las neuronas podrían verse afectados. Ha sido descripto que el envejecimiento del SNC implica cambios morfológicos y de conectividad que alteran su función. Durante este proceso tienen lugar modificaciones estructurales que incluyen la pérdida y la reorganización de las sinapsis, retracciones y prolongaciones de las dendritas y un aumento en la reactividad de las células gliales (Bertoni-Freddari et al., 1996; Morrison & Hof, 1997). La neurogénesis adulta tendría un rol en la función del giro dentado, por lo tanto

es lógico pensar que su disminución vinculada con el envejecimiento y quizás con AD, podría contribuir a una menor plasticidad de los circuitos y manifestarse como alteraciones de memoria.

Si bien previamente se había demostrado que la neurogénesis adulta es un proceso que dura toda la vida y que disminuye en número durante el envejecimiento (Kuhn, 1996), en este trabajo, utilizando la transducción de GFP con retrovirus, combinamos el análisis cuantitativo con el cualitativo para estudiar en qué medida las neuronas que se generan en el cerebro adulto son capaces de integrarse al circuito en diferentes momentos.

Encontramos que la neurogénesis adulta disminuye abruptamente entre el segundo y el cuarto mes de vida. Esta diferencia parecería estar dada por una disminución en la proliferación de las NPCs de la SGZ (Kuhn, 1996), sin embargo no es posible descartar que otros mecanismos como un aumento en la muerte de las neuronas en diferenciación no se encuentren limitando su producción. Cualquiera sea el escenario, posiblemente esté relacionado con los cambios que el envejecimiento produce a nivel celular y que implican daño al ADN y a las proteínas vinculado con un aumento del stress oxidativo, acumulaciones lipídicas y proteicas y alteraciones en la función mitocondrial (Schapira, 1996; Mattson, 1999). Sin embargo, también diversas vías de señalización se ven afectadas durante el envejecimiento, lo cual modifica los niveles ambientales de neurotransmisores y factores de crecimiento que podrían modular a la neurogénesis.

Por otro lado, la disminución en el número de neuronas encontradas en animales de laboratorio envejecidos podría deberse en parte a sus condiciones de vida, las cuales no ofrecen novedades y en las cuales la actividad física se encuentra muy limitada. Podría suceder que en animales salvajes la neurogénesis mostrara una progresión diferente, lo cual puede inferirse del aumento del número de neuronas generadas cuando los sujetos experimentales son criados en condiciones como un ambiente enriquecido o en presencia de una ruedita que les permite realizar ejercicio aeróbico (Kempermann, 1998).

Es en el contexto del cerebro envejecido en el que las enfermedades neurodegenerativas tienen lugar. Esto puede deberse a que ciertos mecanismos compensatorios o de plasticidad, los cuales permiten la reorganización neurítica en el animal joven se encuentran afectados en la vejez. Por ejemplo, la sinaptogénesis y el crecimiento axonal no parecen haber evolucionado para reparar el cerebro, pero ante determinadas claves como algunas lesiones podrían ser reclutados con fines regenerativos.

Si el envejecimiento afectara la capacidad de los axones y las dendritas para reorganizarse, es posible que también modifique el desarrollo y la complejidad alcanzada por las neuronas nuevas. Utilizando la neurogénesis adulta evaluamos el grado de conectividad que desarrollaron las neuronas en el cerebro envejecido y en un modelo de la enfermedad de Alzheimer.

Sorprendentemente, en ninguna de las dos condiciones el número de contactos sinápticos alcanzados por las neuronas nuevas se vio afectado. Sin embargo, nuestros experimentos se limitaron al estudio morfológico de las espinas dendríticas las cuales reflejan únicamente la conectividad excitatoria glutamatérgica que estas reciben de la vía perforante. Es decir que si otro tipo de innervación (GABAérgica, colinérgica, dopaminérgica, etc) se encontrara afectada no podría ser detectada. Además, por haber sido evaluada sólo estructuralmente, cambios sutiles a nivel funcional no reflejados en la morfología neuronal podrían estar escapando a este análisis.

Finalmente, en ambos casos se observó la densidad de espinas dendríticas alcanzada una vez que las neuronas completaron su desarrollo, con lo cual no fue posible saber si se presentaron alteraciones en su dinámica.

Recientemente Sun y colaboradores (Sun et al., 2009) publicaron un artículo en el cual utilizando otro modelo de AD en el que APP genera niveles aumentados de Aβ (ratón J20), pudieron mostrar que las nuevas DGCs del hipocampo adulto inicialmente maduran a una velocidad mayor que las controles. En neuronas de 18 a 21 días, encontraron un aumento en las

corrientes evocadas excitatorias e inhibitorias a la vez que un árbol dendrítico más largo y una densidad de espinas mayor. Sin embargo, en neuronas mayores a 28 días la situación se invirtió y las neuronas pertenecientes a los ratones transgénicos se mostraron menos desarrolladas que las controles tanto en sus características funcionales como morfológicas. Estos autores propusieron que la producción de Aβ en el ratón transgénico induce un aumento en la densidad de aferentes GABAérgicos formados sobre las neuronas nuevas, lo cual lleva a un desbalance entre excitación e inhibición. Si bien estos resultados no son consistentes con los obtenidos por nosotros, en nuestros experimentos nos limitamos al estudio de la densidad de espinas lo cual refleja únicamente la conectividad glutamatérgica desarrollada. Por otro lado, es posible que no hayamos podido evidenciar diferencias entre ratones transgénicos y controles, debido a posibles diferencias en la cepa de transgénicos utilizadas. El ratón J20 presenta actividad eléctrica aberrante que podría afectar tanto a la velocidad como al grado de desarrollo neuronal alcanzado. De esta manera el aumento en la inhibición podría dispararse como un mecanismo compensatorio de la actividad anormal y no necesariamente estar vinculado con la sobreproducción de Aβ. Serán necesarios experimentos en diferentes modelos, incluyendo al Tg2576, antes de poder entender mejor de qué manera la sobreexpresión global de APP afecta a al neurogénesis adulta.

La sobreexpresión de APP afecta la sinaptogénesis en el hipocampo.

Consideraciones metodológicas

La creación de un nuevo modelo de AD resultó útil para el estudio de las nuevas neuronas expresando APP. Sin embargo como todo modelo presenta sus ventajas y limitaciones, las cuales es importante tener presentes en vistas futuros experimentos y de las implicancias de los hallazgos encontrados. Una importante limitación de esta estrategia esta dada por el bajo número de neuronas analizables por cada ratón inoculado. Esto lleva a que en muchos casos no pueda obtenerse más de una unidad experimental

por animal lo cual, además de dificultar la recolección de datos, implica un aumento en el número de individuos sacrificados. Por otro lado, el número de neuronas obtenido depende del momento en la cual los NPCs son infectados. Ya que la producción de neuronas disminuye con la edad, resulta paradójico que un modelo de neurodegeneración sea más eficiente en animales jóvenes que en animales envejecidos. Para este trabajo, debimos limitar el estudio hasta los 4 meses de vida, momento en el que no se encontró un efecto dado por la sobreexpresión de APP, pero si un menor grado de conectividad respecto a las neuronas nacidas en el hipocampo posnatal. Una forma de superar este problema sería incluyendo el ejercicio físico. Esto aumentaría la proliferación de las NPCs y resultaría en un aumento del número de neuronas transducidas. Sin embargo, los resultados obtenidos deberían ser analizados con precaución ya que existen evidencias que sugieren que el ejercicio físico retrasa la progresión de algunas enfermedades neurodegenerativas (Lazarov et al., 2005; García et al., 2011).

Si bien nuestro estudio se limitó a estudiar los efectos que APP ejerció sobre las mismas neuronas que lo sobreexpresaron, una importante ventaja de este sistema es que permite investigar también la forma en que las neuronas vecinas se ven afectadas. Experimentos futuros en los que mediante la inyección retroviral combinada se marque, junto con las neuronas expresando APP-GFP, una población de neuronas vecinas con RFP, permitirán investigar si las neuronas control se ven afectadas por algún producto secretado desde las dendritas o los axones de las neuronas expresando APP.

Los efectos de APP sobre la sinaptogénesis serían independientes de Aβ

La acumulación de proteínas juega un rol fundamental en las alteraciones patológicas encontradas en las autopsias de pacientes con diferentes patologías neurodegenerativas. En AD los agregados se constituyen de Aβ y tau hiperfosforilado. En la enfermedad de Parkinson existen depósitos de α-synucleina mientras que en otras demencias es posible encontrar una

combinación de estas y otras alteraciones. Sin embargo, debido a la dificultad para estudiarlas *in vivo* en el cerebro, todavía no esta claro si estas acumulaciones son realmente los desencadenantes iniciales de los procesos patológicos o si son fenómenos colaterales tardíos. En el contexto de esta tesis fue diseñado un sistema innovador para el estudio de la neurodegeneración *in vivo*. Mediante la transducción con retrovirus se logró la sobreexpresión de APP en las neuronas nacidas en el giro dentado. Esto permitió el estudio de la sinaptogénesis y el desarrollo de neuronas individuales “alteradas” alojadas en un contexto saludable.

Utilizando este modelo encontramos que APP produce un retraso en la integración funcional y estructural de las neuronas nuevas que lo sobreexpresan. Utilizando diferentes construcciones llegamos a la conclusión que α-CTF y β-CTF afectan de manera notablemente similar a la plasticidad neuronal. Este hallazgo pone en duda que Aβ sea el responsable de las alteraciones encontradas y sugiere que estas serían mediadas por algún dominio compartido entre ambos CTFs.

Sin embargo, antes de profundizar sobre estas observaciones resultaría necesario corroborar que los efectos encontrados fueron específicamente inducidos por los derivados de APP. Esto podría lograrse, por ejemplo, sobreexpresando fragmentos de proteínas de transmembrana estructuralmente similares pero no relacionadas con AD los cuales no deberían producir los mismos efectos.

Si bien nuestras hipótesis y resultados fueron inicialmente pensados y contextualizados en el marco de la “hipótesis amiloidea”, los efectos encontrados con α-CTF plantearon una contradicción. Hace más de dos décadas que la investigación en AD se focaliza en los efectos de Aβ, sin embargo existen evidencias de que otros fragmentos de APP tiene un rol en la patología. Se ha encontrado que el domino intracelular de APP (γ-CTF o AICD, figura 1-3) interactúa con más de 20 proteínas dentro de las cuales FE65 parece ser importante. FE65 es una proteína adaptadora que se ha visto implicada en mecanismos regulatorios y de señalización y cuyo patrón

de expresión incluye específicamente a las áreas afectadas por la AD (Bressler et al., 1996). La unión de esta al dominio YENPTY de AICD forma un complejo que tiene funciones en el desarrollo, la plasticidad sináptica y la dinámica del citoesqueleto. Evidencias de esto provienen de una línea de ratones transgénicos (PDAPP) que presenta disminución en el número densidades presinápticas, cambios de comportamiento y alteraciones en la neurotransmisión por la sobreexpresión de un APP mutado que aumentan su procesamiento. Cuando se agregó una sustitución en el AICD todas estas alteraciones fueron revertidas (Galvan et al., 2006). En conjunto, estos hallazgos sugieren que el dominio AICD es relevante para las alteraciones mencionadas.

Por otro lado, ratones triple *knock-out* para APP y sus homólogos ($APLP_1$ y $APLP_2$) o doble *knock-out* para FE65 y su homólogo FE65L1, muestran displasia cortical, indicando que el complejo AICD/FE65 es relevante en el proceso de neurogénesis (Herms et al., 2004; Guénette et al., 2006). De hecho, se ha sugerido que el desarrollo neurítico y la plasticidad sináptica dependiente de AICD involucra a MENA, el homologo mamífero de ENA, una proteína de *Drosophila* (Ermekova et al., 1997). Se ha encontrado a MENA en altas concentraciones en sitios de activo remodelado de actina, como en lamelopodios y conos de crecimiento de neuronas en diferenciación, sugiriendo un rol de esta en desarrollo dendrítico (Sabo, 2003). También en este sentido se ha visto que larvas de moscas transgénicas sobreexpresando APP presentan alteraciones en la plasticidad sináptica y déficits en el transporte axonal en nervios periféricos dependientes del motivo NPTY del AICD (Rusu et al., 2007). Por otro lado, mutaciones en *feh-1*, el ortólogo de FE65 en *C. elegans* muestran fenotipos compatibles con alteraciones en la función sináptica (Zambrano et al., 2002).

Estos resultados en conjunto sugieren que AICD cumple un rol en la formación de las dendritas y en la plasticidad sináptica, procesos que podrían verse afectados durante las etapas iniciales de AD. Podría suceder que la disminución en la expresión de AICD fuera necesaria para completar la sinaptogénesis. Así, aumento en la producción de este fragmento, tanto en la

enfermedad como en nuestro modelo, impediría a las neuronas formar sus sinapsis a la velocidad con que lo hacen normalmente. Esto podría verse reflejado en el retraso encontrado en la incorporación funcional de las neuronas granulares nuevas al circuito del giro dentado. Por otro lado, la generación de niveles aumentados de AICD podría tener como efecto colateral la acumulación extracelular de Aβ, lo cual más allá de tener o no un efecto, podría llevar, a largo plazo, a la formación de placas amiloideas.

Otros efectos producidos por los CTFs podrían estar vinculados con la muerte celular. Esto se ha basado en que la transfección de diferentes líneas celulares con AICD lleva a la apoptosis evidenciada por niveles aumentados de LDH, por el método de TUNEL y por la visualización con Hoescht (Lu et al., 2000; Kinoshita, 2002). Sin embargo, la transfección con variantes en las que se ha delecionado la secuencia NPXY tiene efectos mínimos, sugiriendo un rol esencial de esta secuencia adaptadora.

Un experimento en curso utilizando la doble inoculación de APP-GFP con RFP permitirá obtener un cociente entre las neuronas APP+ y las controles a diferentes edades. De esta manera, próximamente podremos evidenciar si unas disminuyen respecto a las otras y contestar si la expresión de AICD aumenta la muerte neuronal. Paralelamente, esto permitirá investigar si la población de neuronas estudiadas se vio conformada por aquellas células capaces de sobrevivir a un efecto letal de APP, el cual no pudo ser evidenciado aún. Si esto fuera así, los resultados obtenidos previamente deberían ser reinterpretados.

AICD podría actuar también como un regulador de la expresión génica. De hecho, se han encontrado evidencias que muestran que la expresión de GSK3β aumenta por AICD (Aplin, 1996). El incremento de esta kinasa podría contribuir a la hiperfosforilación de tau y así establecer una posible conexión entre los ovillos neurofibrilares y la patología de APP.

Las alteraciones inducidas por AICD no son excluyentes respecto de las que involucran a Aβ. Sin embargo, puede ser que en nuestro modelo, la

concentración de péptido β amiloide alcanzada no sea suficiente para producir un efecto, o bien que se requiera de una mayor acumulación para producirlo. Es posible que esto último no ocurra con la misma facilidad en las neuronas en desarrollo que en las neuronas envejecidas. De esta manera, se podría explicar que no existan diferencias en los efectos producidos por α-CTF y β-CTF aun cuando éste produce Aβ.

Actualmente nos encontramos trabajado en tratar de identificar qué porción de APP subyace a las alteraciones encontradas. Para esto, estamos diseñando nuevas construcciones retrovirales que expresarán diferentes dominios de α-CTF y β-CTF. Aunque el estudio de ambos podría parecer redundante ya que su efecto es similar, no podemos descartar aun que estos no tengan una susceptibilidad diferente al corte por γ-secretasa. Estudios complementarios con intervenciones farmacológicas podrían contribuir al mejor entendimiento de los fenómenos encontrados. El uso de inhibidores de γ-secretasa podría ayudar a contestar si el fragmento involucrado puede actuar a pesar de no ser liberado. Por otro lado inhibidores de IDE, la enzima que degrada AICD, podría hacer que sus niveles aumenten y los efectos se acentúen.

Si bien las alteraciones encontradas en las neuronas expresando APP en este trabajo no son drásticas, una disminución sutil en la forma en que las neuronas corticales reorganizan sus conexiones podría tener consecuencias marcadas sobre las funciones cognitivas. Por ejemplo, si los defectos en la sinaptogénesis afectaran en la misma magnitud a las neuronas preexistentes de todas las áreas afectadas en AD, esto representaría una disminución global de un 20-30% en la cantidad de sinapsis glutamatérgicas del cerebro, lo cual podría representar una pérdida de conectividad muy significativa a nivel de la red neuronal.

La plasticidad sináptica esta dada por cambios en la eficacia de las conexiones y modificaciones en el número de sinapsis entre neuronas. Otro tipo de plasticidad involucra modificaciones estructurales de los axones y dendritas que permiten que las neuronas varíen sus aferencias y eferencias,

lo cual permite la adición de nuevas unidades al circuito. Estas formas de plasticidad no son excluyentes y se cree que en conjunto podrían subyacer al almacenamiento de la memoria (McClelland & Rumelhart, 1985; McClelland & Rogers, 2003). Aunque el cerebro humano consiste de 10^{11} neuronas conectadas a través de 10^{15} sinapsis, en la mayoría de las áreas del cerebro, sólo se da una fracción de los posibles contactos entre neuronas, con lo cual cambios estructurales en los axones y dendritas para reclutar nuevas unidades funcionales podrían aumentar notablemente la capacidad de los circuitos corticales para almacenar información. En este trabajo encontramos que la formación de dendritas y del número de contactos sinápticos en neuronas nacidas en el giro dentado se encuentra retardado por la sobreexpresión de α-CTF y β-CTF. Si en las etapas iniciales del AD, las neuronas sufrieran alteraciones similares, la plasticidad neuronal se vería afectada de forma tal que podría impedir o alterar la reorganización estructural involucrada en procesamiento de información y formación de memoria. De esta manera, su adquisición y almacenamiento podría verse afectada y manifestarse clínicamente como episodios amnésicos.

Perspectivas futuras

Próximamente contaremos con un retrovirus portando el gen de tau fosforilado en combinación con RFP lo cual permitirá estudiar los efectos de éste sobre la neurogénesis. Se ha mostrado que la coinfección con dos retrovirus de una misma NPC es posible (figura 2-2). Por lo tanto, la coinfección de una misma población neuronal con TAU-RFP y APP-GFP permitirá estudiar los efectos dados por esta combinación sobre la plasticidad neuronal.

En el sistema de transducción retroviral, la expresión del transgén es constitutiva y si bien resulta útil para el estudio de procesos vinculados con el desarrollo neuronal, pierde impacto para investigar las consecuencias de la sobreexpresión de proteínas relacionadas con la neuordegeneración sobre neuronas ya maduras. Para mejorar esto en el futuro podrán diseñarse

vectores retrovirales inducibles que permitirán el “encendido” y “apagado” de los genes en diferentes momentos del desarrollo o la vida adulta. Esto ayudará a encontrar periodos críticos durante la neurogénesis y a observar los efectos de la sobreexpresión de APP sobre estructuras preformadas. Alternativamente podrán subclonarse las construcciones ya generadas en vectores lentivirales, los cuales son capaces de integrar su genoma al ADN de las células aunque estas se encuentren fuera del ciclo celular. De esta manera se podrá sobreexpresar APP o sus variantes en neuronas individuales de diferentes edades para estudiar sus consecuencias sobre la plasticidad neuronal.

ABREVIATURAS

EC, corteza entorrinal; DG, giro dentado; DGC; células granulares del giro dentado; ML, capa molecular; GCL, capa de neuronas granulares; PP, vía perforante; MPP, vía perforante medial; LPP, vía perforante lateral; PPF, facilitación por pulso pareado; PPD, depresión por pulso pareado; LTP, potenciación de largo término; LTD, depresión de largo término; SGZ, zona subgranular; NPCs, células progenitoras neurales; GABA, ácido gamma aminobutírico; GAD, ácido glutámico descarboxilasa; AD, enfermedad de Alzheimer; Aβ, péptido β amiloide; APP, proteína precursora de amiloide; Tg, transgénico; GFP, proteína fluorescente verde; RFP, proteína fluorescente roja; SEM, error standard de la media; EPSC, corriente excitatoria postsináptica; eEPSC, corriente excitatoria postsináptica espontánea; PTX, picrotoxina; popSpike, disparo poblacional o *population spike*; CTF, fragmento C-terminal; AICD, dominio intracelular de APP.

BIBLIOGRAFÍA

Acsády, L., Kamondi, A., Sík, A., Freund, T., & Buzsáki, G. (1998). GABAergic cells are the major postsynaptic targets of mossy fibers in the rat hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *18*(9), 3386-403. Retrieved September 1, 2010, from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9547246.

Alexopoulou, A. N., Couchman, J. R., & Whiteford, J. R. (2008). The CMV early enhancer/chicken beta actin (CAG) promoter can be used to drive transgene expression during the differentiation of murine embryonic stem cells into vascular progenitors. *BMC cell biology*, *9*, 2. doi: 10.1186/1471-2121-9-2.

Allen, K. M., & Walsh, C. A. (1999). Genes that regulate neuronal migration in the cerebral cortex. *Epilepsy research*, *36*(2-3), 143-54. Retrieved January 31, 2011, from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10515162.

Almaguer-Melian, W., Cruz-Aguado, R., Riva, C. de la, Kendrick, K. M., Frey, J. U., & Bergado, J. (2005). Effect of LTP-reinforcing paradigms on neurotransmitter release in the dentate gyrus of young and aged rats. *Biochemical and biophysical research communications*, *327*(3), 877-83. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.12.085.

ALTMAN, J. (1962). Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science (New York, N.Y.)*, *135*, 1127-8. Retrieved October 10, 2010, from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13860748.

ALTMAN, J. (1963). Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats. *The Anatomical record*, *145*, 573-91. Retrieved January 26, 2011, from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14012334.

Altman, J. (1969). Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *The Journal of comparative neurology*, *137*(4), 433-57. doi: 10.1002/cne.901370404.

Altman, J., & Bayer, S. a. (1990). Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods. *The Journal of comparative neurology*, *301*(3), 365-81. doi: 10.1002/cne.903010304.

Altman, J., & Das, G. D. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *The Journal of comparative neurology*, *124*(3), 319-35. Retrieved January 26, 2011, from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5861717.

Altschuler, R. A. (1979). Morphometry of the effect of increased experience and training on synaptic density in area CA3 of the rat hippocampus. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*,

27(11), 1548-50. Retrieved January 26, 2011, from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/512348.

Alzheimer, a, Stelzmann, R. a, Schnitzlein, H. N., & Murtagh, F. R. (1995). An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Uber eine eigenartige Erkankung der Hirnrinde". *Clinical anatomy (New York, N.Y.)*, *8*(6), 429-31. doi: 10.1002/ca.980080612.

Ambrogini, P., Lattanzi, D., Ciuffoli, S., Agostini, D., Bertini, L., Stocchi, V., et al. (2004). Morpho-functional characterization of neuronal cells at different stages of maturation in granule cell layer of adult rat dentate gyrus. *Brain research*, *1017*(1-2), 21-31. doi: 10.1016/j.brainres.2004.05.039.

Andersen, P., Bliss, T. V., & Skrede, K. K. (1971). Unit analysis of hippocampal polulation spikes. *Experimental brain research. Experimentelle Hirnforschung. Expérimentation cérébrale*, *13*(2), 208-21. Retrieved January 26, 2011, from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5123965.

Andersen, P., Morris, R., Bliss, T., O´keefe, J., & Amaral, D. G. (2007). *The hippocampus book* (p. 39). Oxford University Press.

Angevine, J. B. (1965). Time of neuron origin in the hippocampal region. An autoradiographic study in the mouse. *Experimental neurology. Supplement*, Suppl 2:1-70. Retrieved March 1, 2011, from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5838955.

Aplin, A. E., Gibb, G. M., Jacobsen, J S, Gallo, J. M., & Anderton, B. H. (1996). In vitro phosphorylation of the cytoplasmic domain of the amyloid precursor protein by glycogen synthase kinase-3beta. *Journal of neurochemistry*, *67*(2), 699-707. Retrieved February 28, 2011, from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8764598.

Barnes, C A. (1994). Normal aging: regionally specific changes in hippocampal synaptic transmission. *Trends in neurosciences*, *17*(1), 13-8. Retrieved January 27, 2011, from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7511843.

Barnes, C A, & McNaughton, B. L. (1980). Physiological compensation for loss of afferent synapses in rat hippocampal granule cells during senescence. *The Journal of physiology*, *309*, 473-85. Retrieved January 27, 2011, from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1274597&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Barnes, C A, Rao, G., & McNaughton, B. L. (1987). Increased electrotonic coupling in aged rat hippocampus: a possible mechanism for cellular excitability changes. *The Journal of comparative neurology*, *259*(4), 549-58. doi: 10.1002/cne.902590405.

Behr, J., Gloveli, T., & Heinemann, U. (1998). The perforant path projection from the medial entorhinal cortex layer III to the subiculum in the rat combined hippocampal-entorhinal cortex slice. *The European journal of neuroscience*,

10(3), 1011-8. Retrieved January 26, 2011, from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9753168.

Bertoni-Freddari, C., Fattoretti, P., Paoloni, R., Caselli, U., Galeazzi, L., & Meier-Ruge, W. (1996). Synaptic structural dynamics and aging. *Gerontology*, *42*(3), 170-80. Retrieved February 28, 2011, from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8796376.

Bertoni-Freddari, C., Meier-Ruge, W., & Ulrich, J. (1988). Quantitative morphology of synaptic plasticity in the aging brain. *Scanning microscopy*, *2*(2), 1027-34. Retrieved March 1, 2011, from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3399843.

Billings, L. M., Oddo, S., Green, K. N., McGaugh, J. L., & LaFerla, F. M. (2005). Intraneuronal Abeta causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron*, *45*(5), 675-88. doi: 10.1016/j.neuron.2005.01.040.

Bizon, J. L., & Gallagher, M. (2003). Production of new cells in the rat dentate gyrus over the lifespan: relation to cognitive decline. *The European journal of neuroscience*, *18*(1), 215-9. Retrieved January 20, 2011, from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12859354.

Bliss, T. V., & Collingridge, G. L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, *361*(6407), 31-9. doi: 10.1038/361031a0.

Bondareff, W., & Geinisman, Y. (1976). Loss of synapses in the dentate gyrus of the senescent rat. *The American journal of anatomy*, *145*(1), 129-36. doi: 10.1002/aja.1001450110.

Bourne, J. N., & Harris, K. M. (2008). Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines. *Annual review of neuroscience*, *31*, 47-67. doi: 10.1146/annurev.neuro.31.060407.125646.

Braak, H., & Braak, E. (1991). Acta H ' pathologica Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathologica*, 239 - 259.

Breen, K. C., Bruce, M., & Anderton, B. H. (1991). Beta amyloid precursor protein mediates neuronal cell-cell and cell-surface adhesion. *Journal of neuroscience research*, *28*(1), 90-100. doi: 10.1002/jnr.490280109.

Bressler, S. L., Gray, M. D., Sopher, B. L., Hu, Q., Hearn, M. G., Pham, D. G., et al. (1996). cDNA cloning and chromosome mapping of the human Fe65 gene: interaction of the conserved cytoplasmic domains of the human beta-amyloid precursor protein and its homologues with the mouse Fe65 protein. *Human molecular genetics*, *5*(10), 1589-98. Retrieved February 28, 2011, from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8894693.

Briones, T. L., Suh, E., Jozsa, L., Rogozinska, M., Woods, J., & Wadowska, M. (2005). Changes in number of synapses and mitochondria in presynaptic

terminals in the dentate gyrus following cerebral ischemia and rehabilitation training. *Brain research*, *1033*(1), 51-7. doi: 10.1016/j.brainres.2004.11.017.

Bruel-Jungerman, E., Davis, S., & Laroche, S. (2007). Brain plasticity mechanisms and memory: a party of four. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*, *13*(5), 492-505. doi: 10.1177/1073858407302725.

Burke, S. N., & Barnes, C. a. (2006). Neural plasticity in the ageing brain. *Nature reviews. Neuroscience*, *7*(1), 30-40. doi: 10.1038/nrn1809.

Cabeza, R. (2005). *Cognitive neuroscience of ageing*. New York: Oxford University Press.

Cameron, H A, & Gould, E. (1994). Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus. *Neuroscience*, *61*(2), 203-9. Retrieved March 2, 2011, from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7969902.

Cameron, H A, & McKay, R. D. (1999). Restoring production of hippocampal neurons in old age. *Nature neuroscience*, *2*(10), 894-7. doi: 10.1038/13197.

Cameron, H. a, & McKay, R. D. (2001). Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *The Journal of comparative neurology*, *435*(4), 406-17. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11406822.

Chklovskii, D. B., Mel, B. W., & Svoboda, K. (2004). Cortical rewiring and information storage. *Nature*, *431*(7010), 782-8. doi: 10.1038/nature03012.

Cirrito, J. R., Yamada, K. a, Finn, M. B., Sloviter, R. S., Bales, K. R., May, P. C., et al. (2005). Synaptic activity regulates interstitial fluid amyloid-beta levels in vivo. *Neuron*, *48*(6), 913-22. doi: 10.1016/j.neuron.2005.10.028.

Citron, M., Teplow, D. B., & Selkoe, D J. (1995). Generation of amyloid beta protein from its precursor is sequence specific. *Neuron*, *14*(3), 661-70. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7695913.

Claiborne, B. J., Amaral, D. G., & Cowan, W. M. (1990). Quantitative, three-dimensional analysis of granule cell dendrites in the rat dentate gyrus. *The Journal of comparative neurology*, *302*(2), 206-19. doi: 10.1002/cne.903020203.

Convit, A., De Leon, M. J., Tarshish, C., De Santi, S., Tsui, W., Rusinek, H., et al. (1997). Specific hippocampal volume reductions in individuals at risk for Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, *18*(2), 131-8. Retrieved March 1, 2011, from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9258889.

Crain, B. J., & Burger, P. C. (1988). The laminar distribution of neuritic plaques in the fascia dentata of patients with Alzheimer's disease. *Acta neuropathologica*, *76*(1), 87-93. Retrieved March 1, 2011, from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3394497.

De Strooper, B., & Annaert, W. (2000). Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *Journal of cell science*, *113 (Pt 1*, 1857-70. Retrieved February 17, 2011, from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10806097.

Drapeau, Elodie, Mayo, W., Aurousseau, Catherine, Le Moal, Michel, Piazza, P.-V., & Abrous, Djoher Nora. (2003). Spatial memory performances of aged rats in the water maze predict levels of hippocampal neurogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(24), 14385-90. doi: 10.1073/pnas.2334169100.

Drapeau, Elodie, Montaron, M.-F., Aguerre, S., & Abrous, Djoher Nora. (2007). Learning-induced survival of new neurons depends on the cognitive status of aged rats. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *27*(22), 6037-44. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1031-07.2007.

Driscoll, I, Howard, S. R., Stone, J. C., Monfils, M. H., Tomanek, B., Brooks, W. M., et al. (2006). The aging hippocampus: a multi-level analysis in the rat. *Neuroscience*, *139*(4), 1173-85. doi: 10.1016/j.neuroscience.2006.01.040.

Driscoll, Ira, & Sutherland, Robert J. (2005). The aging hippocampus: navigating between rat and human experiments. *Reviews in the neurosciences*, *16*(2), 87-121. Retrieved January 27, 2011, from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15957576.

Duan, X., Chang, J. H., Ge, S., Faulkner, R. L., Kim, J. Y., Kitabatake, Y., et al. (2007). Disrupted-In-Schizophrenia 1 regulates integration of newly generated neurons in the adult brain. *Cell*, *130*(6), 1146-58. doi: 10.1016/j.cell.2007.07.010.

Eadie, B. D., Redila, V. A., & Christie, Brian R. (2005). Voluntary exercise alters the cytoarchitecture of the adult dentate gyrus by increasing cellular proliferation, dendritic complexity, and spine density. *The Journal of comparative neurology*, *486*(1), 39-47. doi: 10.1002/cne.20493.

Eckman, C B, Mehta, N. D., Crook, R., Perez-tur, J., Prihar, G., Pfeiffer, E., et al. (1997). A new pathogenic mutation in the APP gene (I716V) increases the relative proportion of A beta 42(43). *Human molecular genetics*, *6*(12), 2087-9. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9328472.

Einstein, G., Buranosky, R., & Crain, B. J. (1994). Dendritic pathology of granule cells in Alzheimer's disease is unrelated to neuritic plaques. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *14*(8), 5077-88. Retrieved March 1, 2011, from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8046469.

Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, A. M., Nordborg, C., Peterson, D. A., et al. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature medicine*, *4*(11), 1313-7. doi: 10.1038/3305.

Ermekova, K. S., Zambrano, N, Linn, H., Minopoli, G., Gertler, F., Russo, T, et al. (1997). The WW domain of neural protein FE65 interacts with proline-rich motifs in Mena, the mammalian homolog of Drosophila enabled. *The Journal of biological chemistry*, *272*(52), 32869-77. Retrieved February 28, 2011, from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9407065.

Espósito, M. S., Piatti, V. C., Laplagne, D. a, Morgenstern, N. a, Ferrari, C. C., Pitossi, F. J., et al. (2005). Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *25*(44), 10074-86. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3114-05.2005.

Faherty, C. J., Kerley, D., & Smeyne, R. J. (2003). A Golgi-Cox morphological analysis of neuronal changes induced by environmental enrichment. *Brain research. Developmental brain research*, *141*(1-2), 55-61. Retrieved January 26, 2011, from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12644248.

Finnerty, G. T., Whittington, M. A., & Jefferys, J. G. (2001). Altered dentate filtering during the transition to seizure in the rat tetanus toxin model of epilepsy. *Journal of neurophysiology*, *86*(6), 2748-53. Retrieved August 16, 2010, from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11731534.

Frisk, V., & Milner, B. (1990). The role of the left hippocampal region in the acquisition and retention of story content. *Neuropsychologia*, *28*(4), 349-59. Retrieved March 2, 2011, from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2111523.

Frotscher, M. (2010). Role for Reelin in stabilizing cortical architecture. *Trends in neurosciences*, *33*(9), 407-14. doi: 10.1016/j.tins.2010.06.001.

Galvan, V., Gorostiza, O. F., Banwait, S., Ataie, M., Logvinova, A. V., Sitaraman, S., et al. (2006). Reversal of Alzheimer ' s-like pathology and behavior in human APP transgenic mice by mutation of Asp664. *PNAS*.

Games, D., Adams, D., Alessandrini, R., Barbour, R., Berthelette, P., Blackwell, C., et al. (1995). Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature*, *373*(6514), 523-7. doi: 10.1038/373523a0.

García, Y., López-Ramos, J. C., Giménez-Llort, L., Revilla, S., Guerra, R., Gruart, A., et al. (2011). Physical Exercise Protects Against Alzheimer's Disease in 3xTg-AD Mice. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. doi: 10.3233/JAD-2011-101635.

Ge, S., Goh, E. L. K., Sailor, K. A., Kitabatake, Y., Ming, G.-li, & Song, H. (2006). GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature*, *439*(7076), 589-93. doi: 10.1038/nature04404.

Geinisman, Y. (1979). Loss of axosomatic synapses in the dentate gyrus of aged rats. *Brain research*, *168*(3), 485-92. Retrieved January 27, 2011, from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/435979.

Geinisman, Y., deToledo-Morrell, L., Morrell, F., Persina, I. S., & Rossi, M. (1992). Age-related loss of axospinous synapses formed by two afferent systems in the rat dentate gyrus as revealed by the unbiased stereological dissector technique. *Hippocampus*, *2*(4), 437-44. doi: 10.1002/hipo.450020411.

Geinisman, Y., Toledo-Morrell, L. de, & Morrell, F. (1986). Loss of perforated synapses in the dentate gyrus: morphological substrate of memory deficit in aged rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *83*(9), 3027-31. Retrieved January 27, 2011, from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=323440&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Goate, A., Chartier-Harlin, M. C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., et al. (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*, *349*(6311), 704-6. doi: 10.1038/349704a0.

Gould, E., Beylin, A., Tanapat, P., Reeves, A., & Shors, T. J. (1999). Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nature neuroscience*, *2*(3), 260-5. doi: 10.1038/6365.

Gould, E., Cameron, H A, Daniels, D. C., Woolley, C. S., & McEwen, B. S. (1992). Adrenal hormones suppress cell division in the adult rat dentate gyrus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *12*(9), 3642-50. Retrieved March 2, 2011, from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1527603.

Grabowski, T. J., Cho, H. S., Vonsattel, J. P., Rebeck, G. W., & Greenberg, S. M. (2001). Novel amyloid precursor protein mutation in an Iowa family with dementia and severe cerebral amyloid angiopathy. *Annals of neurology*, *49*(6), 697-705. Retrieved February 25, 2011, from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11409420.

Guénette, S., Chang, Y., Hiesberger, T., Richardson, J. A., Eckman, Christopher B, Eckman, E. A., et al. (2006). Essential roles for the FE65 amyloid precursor protein-interacting proteins in brain development. *The EMBO journal*, *25*(2), 420-31. doi: 10.1038/sj.emboj.7600926.

Harvey, C. D., & Svoboda, Karel. (2007). Locally dynamic synaptic learning rules in pyramidal neuron dendrites. *Nature*, *450*(7173), 1195-200. doi: 10.1038/nature06416.

Herms, J., Anliker, B., Heber, S., Ring, S., Fuhrmann, M., Kretzschmar, H., et al. (2004). Cortical dysplasia resembling human type 2 lissencephaly in mice lacking all three APP family members. *The EMBO journal*, *23*(20), 4106-15. doi: 10.1038/sj.emboj.7600390.

Hjorth-Simonsen, A., & Jeune, B. (1972). Origin and termination of the hippocampal perforant path in the rat studied by silver impregnation. *The Journal of comparative neurology*, *144*(2), 215-32. doi: 10.1002/cne.901440206.

Holtmaat, A., Wilbrecht, L., Knott, G. W., Welker, E., & Svoboda, Karel. (2006). Experience-dependent and cell-type-specific spine growth in the neocortex. *Nature*, *441*(7096), 979-83. doi: 10.1038/nature04783.

Hsia, a Y. (1999a). Plaque-independent disruption of neural circuits in Alzheimer's disease mouse models. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *96*(6), 3228-3233. doi: 10.1073/pnas.96.6.3228.

Hsia, a Y. (1999b). Plaque-independent disruption of neural circuits in Alzheimer's disease mouse models. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *96*(6), 3228-3233. doi: 10.1073/pnas.96.6.3228.

Hsiao, K. (1998). Transgenic mice expressing Alzheimer amyloid precursor proteins. *Experimental gerontology*, *33*(7-8), 883-9. Retrieved March 1, 2011, from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9951631.

Hsiao, Karen, Chapman, P., Nilsen, S., Eckman, C., Harigaya, Y., Younkin, S., et al. (1996). Amyloid Plaques in Transgenic Mice. *Science*, *274*(October), 7-10.

Hsieh, H., Boehm, J., Sato, C., Iwatsubo, T., Tomita, T., Sisodia, S., et al. (2006). AMPAR removal underlies Abeta-induced synaptic depression and dendritic spine loss. *Neuron*, *52*(5), 831-43. doi: 10.1016/j.neuron.2006.10.035.

Hwang, I. K., Kim, D. W., Yoo, K.-Y., Kim, D. S., Kim, K.-S., Kang, J. H., et al. (2004). Age-related changes of gamma-aminobutyric acid transaminase immunoreactivity in the hippocampus and dentate gyrus of the Mongolian gerbil. *Brain research*, *1017*(1-2), 77-84. doi: 10.1016/j.brainres.2004.05.022.

Hyman, B T, Van Hoesen, G. W., Damasio, A. R., & Barnes, C. L. (1984). Alzheimer's disease: cell-specific pathology isolates the hippocampal formation. *Science (New York, N.Y.)*, *225*(4667), 1168-70. Retrieved March 1, 2011, from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6474172.

Jack, C. R., Petersen, R. C., Xu, Y., O'Brien, P. C., Smith, G. E., Ivnik, R. J., et al. (1998). Rate of medial temporal lobe atrophy in typical aging and Alzheimer's disease. *Neurology*, *51*(4), 993-9. Retrieved March 1, 2011, from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2768817&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Jacobsen, J Steven, Wu, C.-C., Redwine, J. M., Comery, T. a, Arias, R., Bowlby, M., et al. (2006). Early-onset behavioral and synaptic deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(13), 5161-6. doi: 10.1073/pnas.0600948103.

Jessberger, S., Zhao, C., Toni, N., Clemenson, G. D., Li, Y., & Gage, Fred H. (2007). Seizure-associated, aberrant neurogenesis in adult rats characterized with retrovirus-mediated cell labeling. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *27*(35), 9400-7. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2002-07.2007.

Johnston, D. And Amaral, D. G. (1998). Hippocampus. *The Synaptic Organization of the Brain.* (pp. 417-458). New York: Oxford University Press.

Juraska, J. M., Fitch, J. M., Henderson, C., & Rivers, N. (1985). Sex differences in the dendritic branching of dentate granule cells following differential experience. *Brain research*, *333*(1), 73-80. Retrieved January 26, 2011, from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3995290.

Kamenetz, F., Tomita, T., Hsieh, H., Seabrook, G., Borchelt, D., Iwatsubo, T., et al. (2003). APP Processing and Synaptic Function State University of New York at Stony Brook, *37*, 925-937.

Kawarabayashi, T., Younkin, L. H., Saido, T. C., Shoji, M., Ashe, Karen Hsiao, & Younkin, Steven G. (2001). Age-Dependent Changes in Brain , CSF , and Plasma Amyloid Protein in the Tg2576 Transgenic Mouse Model of Alzheimer ' s Disease. *Neurology*, *21*(2), 372-381.

Kelley, M. S., & Steward, O. (1996). The process of reinnervation in the dentate gyrus of adult rats: physiological events at the time of the lesion and during the early postlesion period. *Experimental neurology*, *139*(1), 73-82. doi: 10.1006/exnr.1996.0082.

Kempermann, G, Kuhn, H. G., & Gage, F H. (1997). More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*, *386*(6624), 493-5. doi: 10.1038/386493a0.

Kempermann, G, Kuhn, H. G., & Gage, F H. (1998). Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *18*(9), 3206-12. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9547229.

Kempermann, Gerd, Wiskott, L., & Gage, Fred H. (2004). Functional significance of adult neurogenesis. *Current opinion in neurobiology*, *14*(2), 186-91. doi: 10.1016/j.conb.2004.03.001.

Kinoshita, A., Whelan, C. M., Berezovska, O., & Hyman, Bradley T. (2002). The gamma secretase-generated carboxyl-terminal domain of the amyloid precursor protein induces apoptosis via Tip60 in H4 cells. *The Journal of biological chemistry*, *277*(32), 28530-6. doi: 10.1074/jbc.M203372200.

Knott, G. W., Holtmaat, A., Wilbrecht, L., Welker, E., & Svoboda, Karel. (2006). Spine growth precedes synapse formation in the adult neocortex in vivo. *Nature neuroscience*, *9*(9), 1117-24. doi: 10.1038/nn1747.

Kuhn, H. G., Dickinson-Anson, H., & Gage, F H. (1996). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *16*(6), 2027-33. Retrieved November 8, 2010, from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8604047.

LaFerla, F. M., & Oddo, S. (2005). Alzheimer's disease: Abeta, tau and synaptic dysfunction. *Trends in molecular medicine*, *11*(4), 170-6. doi: 10.1016/j.molmed.2005.02.009.

Lambert, M. P., Barlow, a K., Chromy, B. a, Edwards, C., Freed, R., Liosatos, M., et al. (1998). Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(11), 6448-53. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=27787&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Landfield, P. W. (1988). Hippocampal neurobiological mechanisms of age-related memory dysfunction. *Neurobiology of aging*, *9*(5-6), 571-9. Retrieved January 27, 2011, from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3062468.

Laplagne, D. a, Espósito, M. S., Piatti, V. C., Morgenstern, N. a, Zhao, C., Praag, Henriette van, et al. (2006). Functional convergence of neurons generated in the developing and adult hippocampus. *PLoS biology*, *4*(12), e409. doi: 10.1371/journal.pbio.0040409.

Laplagne, D. a, Kamienkowski, J. E., Espósito, M. S., Piatti, V. C., Zhao, C., Gage, Fred H, et al. (2007). Similar GABAergic inputs in dentate granule cells born during embryonic and adult neurogenesis. *The European journal of neuroscience*, *25*(10), 2973-81. doi: 10.1111/j.1460-9568.2007.05549.x.

Lazarov, O., Robinson, J., Tang, Y.-P., Hairston, I. S., Korade-Mirnics, Z., Lee, V. M.-Y., et al. (2005). Environmental enrichment reduces Abeta levels and amyloid deposition in transgenic mice. *Cell*, *120*(5), 701-13. doi: 10.1016/j.cell.2005.01.015.

Lewis, P. F., & Emerman, M. (1994). Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus. *Journal of virology*, *68*(1), 510-6. Retrieved October 7, 2010, from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=236313&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Li, G., Bien-Ly, N., Andrews-Zwilling, Y., Xu, Q., Bernardo, A., Ring, K., et al. (2009). GABAergic interneuron dysfunction impairs hippocampal neurogenesis in adult apolipoprotein E4 knockin mice. *Cell stem cell*, *5*(6), 634-45. doi: 10.1016/j.stem.2009.10.015.

Lledo, P.-M., Saghatelyan, A., & Lemasson, M. (2004). Inhibitory interneurons in the olfactory bulb: from development to function. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*, *10*(4), 292-303. doi: 10.1177/1073858404263460.

Lu, D. C., Rabizadeh, S., Chandra, S., Shayya, R. F., Ellerby, L. M., Ye, X., et al. (2000). A second cytotoxic proteolytic peptide derived from amyloid beta-protein precursor. *Nature medicine*, *6*(4), 397-404. doi: 10.1038/74656.

Lynch, G., Gall, C., Rose, G., & Cotman, C. (1976). Changes in the distribution of the dentate gyrus associational system following unilateral or bilateral entorhinal lesions in the adult rat. *Brain research*, *110*(1), 57-71. Retrieved January 27, 2011, from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1276951.

Masliah, E., Mallory, M., Hansen, L., DeTeresa, R., Alford, M., & Terry, R. (1994). Synaptic and neuritic alterations during the progression of Alzheimer's disease. *Neuroscience letters*, *174*(1), 67-72. Retrieved September 18, 2010, from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7970158.

Mattson, M P, Pedersen, W. A., Duan, W., Culmsee, C., & Camandola, S. (1999). Cellular and molecular mechanisms underlying perturbed energy metabolism and neuronal degeneration in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *893*, 154-75. Retrieved February 28, 2011, from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10672236.

Mattson, Mark P, & Magnus, T. (2006). Ageing and neuronal vulnerability. *Nature reviews. Neuroscience*, *7*(4), 278-94. doi: 10.1038/nrn1886.

McClelland, J L, & Rumelhart, D. E. (1985). Distributed memory and the representation of general and specific information. *Journal of experimental psychology. General*, *114*(2), 159-97. Retrieved February 28, 2011, from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3159828.

McClelland, James L, & Rogers, T. T. (2003). The parallel distributed processing approach to semantic cognition. *Nature reviews. Neuroscience*, *4*(4), 310-22. doi: 10.1038/nrn1076.

McDonald, H. Y., & Wojtowicz, J. M. (2005). Dynamics of neurogenesis in the dentate gyrus of adult rats. *Neuroscience letters*, *385*(1), 70-5. doi: 10.1016/j.neulet.2005.05.022.

McEwen, B. S. (1999). Stress and hippocampal plasticity. *Annual review of neuroscience*, *22*, 105-22. doi: 10.1146/annurev.neuro.22.1.105.

McNamara, M. J., Ruff, C. T., Wasco, W., Tanzi, R. E., Thinakaran, G, & Hyman, B T. (1998). Immunohistochemical and in situ analysis of amyloid precursor-like protein-1 and amyloid precursor-like protein-2 expression in Alzheimer disease and aged control brains. *Brain research*, *804*(1), 45-51. Retrieved March 1, 2011, from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9729270.

McNaughton, B. L. (1980). Evidence for two physiologically distinct perforant pathways to the fascia dentata. *Brain research*, *199*(1), 1-19. Retrieved January 26, 2011, from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7407615.

McNaughton, B. L. (1982). Long-term synaptic enhancement and short-term potentiation in rat fascia dentata act through different mechanisms. *The Journal of physiology*, *324*, 249-62. Retrieved January 26, 2011, from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1250703&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Milner, B. (1972). Disorders of learning and memory after temporal lobe lesions in man. *Clinical neurosurgery*, *19*, 421-46. Retrieved March 2, 2011, from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4637561.

Milward, E. A., Papadopoulos, R., Fuller, S. J., Moir, R. D., Small, D., Beyreuther, K, et al. (1992). The amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is a mediator of the effects of nerve growth factor on neurite outgrowth. *Neuron*, *9*(1), 129-37. Retrieved March 1, 2011, from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1632967.

Ming, G.-li, & Song, H. (2005). Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annual review of neuroscience*, *28*, 223-50. doi: 10.1146/annurev.neuro.28.051804.101459.

Mongiat, L. a, Espósito, M. S., Lombardi, G., & Schinder, A. F. (2009). Reliable activation of immature neurons in the adult hippocampus. *PloS one*, *4*(4), e5320. doi: 10.1371/journal.pone.0005320.

Montaron, M. F., Drapeau, E, Dupret, D., Kitchener, P., Aurousseau, C, Le Moal, M, et al. (2006). Lifelong corticosterone level determines age-related decline in neurogenesis and memory. *Neurobiology of aging*, *27*(4), 645-54. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2005.02.014.

Morrison, J H, & Hof, P. R. (1997). Life and death of neurons in the aging brain. *Science (New York, N.Y.)*, *278*(5337), 412-9. Retrieved February 21, 2011, from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9334292.

Moser, M. B., Trommald, M., & Andersen, P. (1994). An increase in dendritic spine density on hippocampal CA1 pyramidal cells following spatial learning in adult rats suggests the formation of new synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*(26), 12673-5. Retrieved January 26, 2011, from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=45501&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Mucke, L, Masliah, E., Yu, G. Q., Mallory, M., Rockenstein, E. M., Tatsuno, G., et al. (2000). High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *20*(11), 4050-8. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10818140.

Mullan, M., Crawford, F., Axelman, K., Houlden, H., Lilius, L., Winblad, B., et al. (1992). A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nature genetics*, *1*(5), 345-7. doi: 10.1038/ng0892-345.

Nadler, J. V. (2003). The recurrent mossy fiber pathway of the epileptic brain. *Neurochemical research*, *28*(11), 1649-58. Retrieved January 26, 2011, from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14584819.

Nafstad, P. H. (1967). An electron microscope study on the termination of the perforant path fibres in the hippocampus and the fascia dentata. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie (Vienna, Austria : 1948)*, *76*(4), 532-42. Retrieved January 26, 2011, from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5585500.

Ngoi, S. M., Chien, A. C., & Lee, C. G. L. (2004). Exploiting internal ribosome entry sites in gene therapy vector design. *Current gene therapy*, *4*(1), 15-31. Retrieved February 25, 2011, from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15032611.

Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J. D., Murphy, M. P., Golde, T. E., Kayed, R., et al. (2003). Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and TanglesIntracellular Aβ and Synaptic Dysfunction. *Neuron*, *39*(3), 409-421. doi: 10.1016/S0896-6273(03)00434-3.

Olariu, A., Cleaver, K. M., & Cameron, Heather A. (2007). Decreased neurogenesis in aged rats results from loss of granule cell precursors without lengthening of the cell cycle. *The Journal of comparative neurology*, *501*(4), 659-67. doi: 10.1002/cne.21268.

Olariu, A., Cleaver, K. M., Shore, L. E., Brewer, M. D., & Cameron, Heather A. (2005). A natural form of learning can increase and decrease the survival of new neurons in the dentate gyrus. *Hippocampus*, *15*(6), 750-62. doi: 10.1002/hipo.20097.

O'Keefe, J and Nadel, L. (1978). The hippocampus as a cognitive map (Clarendon.). Oxford, UK.

O'Keefe, J., & Dostrovsky, J. (1971). The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain research*, *34*(1), 171-5. Retrieved January 26, 2011, from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5124915.

Parent, J. M. (2007). Adult neurogenesis in the intact and epileptic dentate gyrus. *Progress in brain research*, *163*, 529-40. doi: 10.1016/S0079-6123(07)63028-3.

Patrylo, P. R., Tyagi, I., Willingham, A. L., Lee, S., & Williamson, A. (2007). Dentate filter function is altered in a proepileptic fashion during aging. *Epilepsia*, *48*(10), 1964-78. doi: 10.1111/j.1528-1167.2007.01139.x.

Piatti, V. C., Espósito, M. S., & Schinder, A. F. (2006). The timing of neuronal development in adult hippocampal neurogenesis. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*, *12*(6), 463-8. doi: 10.1177/1073858406293538.

Praag, H van, Christie, B R, Sejnowski, T. J., & Gage, F H. (1999). Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(23), 13427-31. Retrieved November 12, 2010, from

http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=23964&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Praag, H van, Kempermann, G, & Gage, F H. (1999). Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nature neuroscience*, *2*(3), 266-70. doi: 10.1038/6368.

Praag, H van, Kempermann, G, & Gage, F H. (2000). Neural consequences of environmental enrichment. *Nature reviews. Neuroscience*, *1*(3), 191-8. doi: 10.1038/35044558.

Praag, Henriette van, Schinder, A. F., Christie, Brian R, Toni, N., Palmer, T. D., & Gage, Fred H. (2002). Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature*, *415*(6875), 1030-4. doi: 10.1038/4151030a.

Praag, Henriette van, Shubert, T., Zhao, C., & Gage, Fred H. (2005). Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *25*(38), 8680-5. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1731-05.2005.

Price, D. L., & Sisodia, S S. (1998). Mutant genes in familial Alzheimer's disease and transgenic models. *Annual review of neuroscience*, *21*, 479-505. doi: 10.1146/annurev.neuro.21.1.479.

Purpura, D. P., Series, N., & Dec, N. (2007). Dendritic Spine " Dysgenesis " and Mental Retardation identical in their capacity to stimulate Dendritic Spine " Dysgenesis " and Mental Retardation. *Mental Retardation*, *186*(4169), 1126-1128.

Rao, M. S., Hattiangady, B., Abdel-Rahman, A., Stanley, D. P., & Shetty, Ashok K. (2005). Newly born cells in the ageing dentate gyrus display normal migration, survival and neuronal fate choice but endure retarded early maturation. *The European journal of neuroscience*, *21*(2), 464-76. doi: 10.1111/j.1460-9568.2005.03853.x.

Reeves, T. M., & Smith, D. C. (1987). Reinnervation of the dentate gyrus and recovery of alternation behavior following entorhinal cortex lesions. *Behavioral neuroscience*, *101*(2), 179-86. Retrieved January 27, 2011, from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3580120.

Ribak, C E, Seress, L., & Amaral, D. G. (1985). The development, ultrastructure and synaptic connections of the mossy cells of the dentate gyrus. *Journal of neurocytology*, *14*(5), 835-57. Retrieved January 26, 2011, from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2419523.

Rosenzweig, E. S., & Barnes, Carol A. (2003). Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition. *Progress in neurobiology*, *69*(3), 143-79. Retrieved January 27, 2011, from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12758108.

ROSENZWEIG, M. R., KRECH, D., BENNETT, E. L., & DIAMOND, M. C. (1962). Effects of environmental complexity and training on brain chemistry and anatomy: a replication and extension. *Journal of comparative and physiological psychology*, *55*, 429-37. Retrieved January 26, 2011, from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14494091.

Rusu, P., Jansen, A., Soba, P., Kirsch, J., Löwer, A., Merdes, G., et al. (2007). Axonal accumulation of synaptic markers in APP transgenic Drosophila depends on the NPTY motif and is paralleled by defects in synaptic plasticity. *The European journal of neuroscience*, *25*(4), 1079-86. doi: 10.1111/j.1460-9568.2007.05341.x.

Sabo, S. L., Ikin, A. F., Buxbaum, J. D., & Greengard, P. (2003). The amyloid precursor protein and its regulatory protein, FE65, in growth cones and synapses in vitro and in vivo. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *23*(13), 5407-15. Retrieved February 28, 2011, from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12843239.

Schapira, A. H. (1996). Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurodegeneration. *Current opinion in neurology*, *9*(4), 260-4. Retrieved February 28, 2011, from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8858182.

Schmidt-Hieber, C., Jonas, P., & Bischofberger, J. (2004). Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature*, *429*(6988), 184-7. doi: 10.1038/nature02553.

Segal, M. (2005). Dendritic spines and long-term plasticity. *Nature reviews. Neuroscience*, *6*(4), 277-84. doi: 10.1038/nrn1649.

Selkoe, Dennis J. (2002). Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science (New York, N.Y.)*, *298*(5594), 789-91. doi: 10.1126/science.1074069.

Selkoe, Dennis J. (2004). Cell biology of protein misfolding: the examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Nature cell biology*, *6*(11), 1054-61. doi: 10.1038/ncb1104-1054.

Shankar, G. M., Li, S., Mehta, T. H., Garcia-Munoz, A., Shepardson, N. E., Smith, I., et al. (2008). Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nature medicine*, *14*(8), 837-42. doi: 10.1038/nm1782.

Shetty, A K, & Turner, D. A. (1998). Hippocampal interneurons expressing glutamic acid decarboxylase and calcium-binding proteins decrease with aging in Fischer 344 rats. *The Journal of comparative neurology*, *394*(2), 252-69. Retrieved September 1, 2010, from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9552130.

Sik, A., Penttonen, M., & Buzsáki, G. (1997). Interneurons in the hippocampal dentate gyrus: an in vivo intracellular study. *The European journal of neuroscience*, *9*(3), 573-88. Retrieved March 2, 2011, from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9104599.

Squire, L. R. (2004). Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. *Neurobiology of learning and memory*, *82*(3), 171-7. doi: 10.1016/j.nlm.2004.06.005.

Steward, O. (1982). Assessing the functional significance of lesion-induced neuronal plasticity. *International review of neurobiology*, *23*, 197-254. Retrieved January 27, 2011, from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6749736.

Sun, B., Halabisky, B., Zhou, Y., Palop, J. J., Yu, G., Mucke, Lennart, et al. (2009). Imbalance between GABAergic and Glutamatergic Transmission Impairs Adult Neurogenesis in an Animal Model of Alzheimer's Disease. *Cell stem cell*, *5*(6), 624-33. doi: 10.1016/j.stem.2009.10.003.

Tanapat, P., Hastings, N. B., Rydel, T. A., Galea, L. A., & Gould, E. (2001). Exposure to fox odor inhibits cell proliferation in the hippocampus of adult rats via an adrenal hormone-dependent mechanism. *The Journal of comparative neurology*, *437*(4), 496-504. Retrieved March 2, 2011, from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11503148.

Thinakaran, Gopal, & Koo, Edward H. (2008). Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *The Journal of biological chemistry*, *283*(44), 29615-9. doi: 10.1074/jbc.R800019200.

Thinakaran, Gopal, & Koo, Edward H. (2008). Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *The Journal of biological chemistry*, *283*(44), 29615-9. doi: 10.1074/jbc.R800019200.

Toni, N., Laplagne, D. a, Zhao, C., Lombardi, G., Ribak, Charles E, Gage, Fred H, et al. (2008). Neurons born in the adult dentate gyrus form functional synapses with target cells. *Nature neuroscience*, *11*(8), 901-7. doi: 10.1038/nn.2156.

Trichas, G., Begbie, J., & Srinivas, S. (2008). Use of the viral 2A peptide for bicistronic expression in transgenic mice. *BMC biology*, *6*, 40. doi: 10.1186/1741-7007-6-40.

Vetrivel, K. S., & Thinakaran, Gopal. (2006). Amyloidogenic processing of beta-amyloid precursor protein in intracellular compartments. *Neurology*, *66*(2 Suppl 1), S69-73. doi: 10.1212/01.wnl.0000192107.17175.39.

Wakabayashi, K., Honer, W. G., & Masliah, E. (1994). Synapse alterations in the hippocampal-entorhinal formation in Alzheimer's disease with and without Lewy body disease. *Brain research*, *667*(1), 24-32. Retrieved February 25, 2011, from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7895080.

Walker, M., Chan, D., & Thom, M. (2007). Hippocampus and human disease. *The hippocampus book* (pp. 769-812).

Watanabe, Y., Gould, E., & McEwen, B. S. (1992). Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Brain research*, *588*(2), 341-

5. Retrieved September 3, 2010, from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1393587.

Westerman, M. A., Cooper-blacketer, D., Mariash, A., Kotilinek, L., Kawarabayashi, T., Younkin, L. H., et al. (2002). The Relationship between A ^{N_L} and Memory in the Tg2576 Mouse Model of Alzheimer ' s Disease. *Proteins*, *22*(5), 1858-1867.

Woolley, C. S., & McEwen, B. S. (1992). Estradiol mediates fluctuation in hippocampal synapse density during the estrous cycle in the adult rat. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *12*(7), 2549-54. Retrieved January 26, 2011, from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1613547.

Zambrano, Nicola, Bimonte, M., Arbucci, S., Gianni, D., Russo, Tommaso, & Bazzicalupo, P. (2002). feh-1 and apl-1, the Caenorhabditis elegans orthologues of mammalian Fe65 and beta-amyloid precursor protein genes, are involved in the same pathway that controls nematode pharyngeal pumping. *Journal of cell science*, *115*(Pt 7), 1411-22. Retrieved February 28, 2011, from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11896189.

Zhao, C., Teng, E. M., Summers, R. G., Ming, G.-L., & Gage, Fred H. (2006). Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *26*(1), 3-11. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3648-05.2006.

PUBLICACIONES

Mathews E, **Morgenstern NA**, Piatti VC; Jessberger S, Zhao C, Schinder AF, and Gage FH. A distinctive layering pattern of mouse dentate granule cells is generated by developmental and adult neurogenesis. Journal of Comparative Neurology, 518:4479–4490, 2010.

Schinder AF and **Morgenstern NA**. Adult neurogenesis is altered by GABAergic imbalance in models of Alzheimer's Disease. Cell Stem Cell 5: 573-4, 2009.

Nicolás A. Morgenstern, Gabriela Lombardi and Alejandro F Schinder. Newborn granule cells in the ageing dentate gyrus. Journal of Physiology, 586(16):3751-7, 2008.

Laplagne DA, Espósito MS, Piatti VC, **Morgenstern NA**, Zhao C, van Praag H, Gage F, Schinder AF. Functional convergence of neurons generated in the developing and adult hippocampus. PLoS Biology 4(12): e409, 2006.

Esposito MS, Piatti VC, Laplagne DA, **Morgenstern NA**, Ferrari CC, Pitossi FJ, Schinder AF. Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. Journal of Neuroscience 25:10074-86, 2005.