UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Efectos de la estimulación audiovisual gamma en la plasticidad de células granulares nacidas en el hipocampo envejecido

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas

Lic. Magalí Herrero

Director de Tesis: Dr. Alejandro F. Schinder

Directora Adjunta de Tesis: Dra. Mariela F. Trinchero

Consejera de Estudios: Dra. Lidia Szczupak

Lugar de Trabajo: Laboratorio de Plasticidad Neuronal, Fundación Instituto Leloir

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 2025

Efectos de la estimulación audiovisual gamma en la plasticidad de células granulares nacidas en el hipocampo envejecido

El giro dentado del hipocampo adulto posee un reconocido mecanismo de plasticidad que consiste en la generación e integración de células granulares funcionales en el circuito preexistente. Durante el envejecimiento, la maduración de estas neuronas se ralentiza. Ciertos estímulos fisiológicos que activan circuitos locales, como el ejercicio físico o el enriquecimiento ambiental, pueden contrarrestar este efecto acelerando la maduración e integración de estas células. Recientemente, se ha demostrado que la estimulación multisensorial gamma no invasiva a 40 Hz reduce los niveles de péptido beta amiloide y mejora el rendimiento de la memoria en varios modelos murinos de la enfermedad de Alzheimer. También se ha reportado que esta estimulación potencia la actividad oscilatoria hipocampal en la misma frecuencia. No obstante, aún se desconocen los mecanismos que transducen estos estímulos en cambios celulares y de circuito. En este trabajo planteamos la hipótesis de que la estimulación gamma genera cambios plásticos dependientes de actividad que pueden ser detectados por neuronas nacidas en el hipocampo envejecido y contribuir a la mejora previamente reportada en tareas de memoria. Utilizando pulsos de luz y sonido, estudiamos el impacto de los estímulos a 40 Hz en el desarrollo de neuronas nacidas en el giro dentado de ratones de mediana edad. Los resultados obtenidos sugieren que esta estimulación promueve la neurogénesis, acelera el crecimiento e integración de las neuronas nuevas en el circuito y mejora la memoria de reconocimiento a través de mecanismos que involucran la señalización por neurotrofinas. En conjunto, estos hallazgos revelan que estímulos audiovisuales en frecuencia gamma potencian la remodelación de los circuitos hipocampales activando mecanismos que estimulan la maduración e integración de nuevas células granulares en el cerebro sano envejecido.

Palabras claves: Envejecimiento, neurogénesis adulta, desarrollo neuronal, plasticidad neuronal, estimulación gamma, actividad neuronal, neurotrofinas.

Effects of gamma audiovisual stimulation on the plasticity of granule cells born in the aged hippocampus

The adult hippocampal dentate gyrus holds a well-established plasticity mechanism that involves the generation and integration of functional granule cells into the preexisting circuit. During aging, the maturation of these neurons slows down. Certain physiological stimuli that activate local circuits, such as physical exercise or environmental enrichment, can counteract this effect by accelerating the maturation and integration of these cells. Recently, it has been shown that non-invasive multisensory gamma stimulation at 40 Hz reduces beta-amyloid peptide levels and improves memory performance in several mouse models of Alzheimer's disease. This stimulation has also been reported to enhance hippocampal oscillatory activity at the same frequency. However, the mechanisms that transduce these stimuli into cellular and circuit changes remain unknown. In this study, we hypothesize that gamma stimulation induces activity-dependent plastic changes that can be detected by newborn neurons in the aging hippocampus and may contribute to previously reported improvements in memory tasks. Using light and sound pulses, we investigated the impact of 40 Hz stimulation on the development of newly generated neurons in the dentate gyrus of middle-aged mice. Our results suggest that this stimulation promotes neurogenesis, accelerates the growth and integration of new neurons into the circuit, and enhances recognition memory through mechanisms involving neurotrophin signaling. Overall, these findings reveal that audiovisual gamma-frequency stimulation enhances hippocampal circuit remodeling by activating mechanisms that promote the maturation and integration of newly generated granule cells in the aging healthy brain.

Key words: Aging, adult neurogenesis, neuronal development, neuronal plasticity, gamma stimulation, neuronal activity, neurotrophins.

«Así afirmamos y negamos, así convencemos y somos convencidos, así argumentamos, deducimos y concluimos, discurriendo impávidos por la superficie de conceptos sobre los cuales sólo tenemos ideas muy vagas, y, pese a la falsa seguridad que en general aparentamos mientras vamos tanteando el camino en medio de la cerrazón verbal, mejor o peor nos vamos entendiendo, y, a veces, hasta encontrando.»

El hombre duplicado

JOSÉ SARAMAGO

A mi familia

Agradecimientos

A mi director de tesis, **Alejandro Schinder**, por su actitud crítica y sincera, por cada conversación y consejo, que no solo fortalecieron mi crecimiento profesional, sino también personal. En especial, por haberme apoyado en uno de los momentos más difíciles de este camino.

A mi co-directora, **Mariela Trinchero**, con la que levanté gran parte de los datos de esta tesis. Por su paciencia y compromiso a lo largo de estos años, y por hacer de este camino una experiencia enriquecedora.

A **mis compañeros de laboratorio**, a quienes tengo el privilegio de llamar amigos. Cada día compartido con ustedes fue un regalo. Gracias por estar siempre dispuestos a escucharme, aconsejarme y brindarme un abrazo cuando más lo necesitaba. No lo hubiera logrado sin ustedes. Los voy a extrañar muchísimo. No quiero dejar de agradecerles en particular:

A **Viole,** porque nadie me va a hacer reír como vos y por enseñarme a pararme firme frente a lo que venga. TKM amicha.

A **Andre**, por tu inmensa paciencia y comprensión, por ser un lugar seguro al que pude acudir siempre. Te admiro profundamente.

A **Soldi**, por enseñarme a tomarme las cosas con más calma, y por ser lo más grande que hay.

A **Meli**, por todo tu cariño, tus matecitos y tus despistes que me siempre me alegran el día. Te adoro.

A **Odri**, mi querida, por cuidarme y regalonearme desde el primer día. Tu amistad me ayudó a crecer inmensamente y te estaré siempre agradecida.

A **Nati**, por tus teorías conspirativas, tu drama y humor. Gracias por ser una excelente profe.

A **Juanchi**, por tu bondad y ternura, y porque a pesar de no haber compartido mucho tiempo, ya tenes un lugarcito en mi corazón.

A **Sato**, por tus chistes y por estar siempre dispuesto a ayudarme a terminar mi comida.

A **Vero**, por tu sensibilidad y alegría. Por escucharme y consolarme. Sos una persona hermosa.

A **Damy**, por compartir el doble sentido y el amor por los gatitos. Por responderme todas las dudas y ser una gran consejera.

A **Juliancito**, mi compañero de experimentos. Gracias por las charlas catárticas, por escucharme sin juzgarme y por recordarme que siempre vale la pena buscar lo que realmente nos gusta.

A los ex integrantes del lab: **Pau, Aye, Lu, Cris, Agos**, por el cariño y los años compartidos.

Al laboratorio de **Emilio Kropff**, por la discusión de resultados y todos los momentos compartidos: **Yanni, Sabri, Mati, Facu, Kari, Mica, Tiago.**

Al laboratorio de **Guillermo Lanuza**: **Jose**, **Cate**, y en especial a **Car**, por ser mi compañera de escritura y de crisis, pero por sobre todo, mi amiga. Sin tu ayuda no hubiera logrado terminar de escribir ni presentar la tesis.

A la gente maravillosa de la Fundación Instituto Leloir: Bioterio, Mantenimiento, Recepción, Droguero y Biblioteca, por ser el sostén de todo el trabajo que se realiza día a día en FIL. En especial a **Silvana**, **Lorena** y **Jorgito**, que se ganaron un lugar en mi corazón.

A los **animales** que dieron su vida en nombre de la ciencia y de esta tesis, con el profundo respeto que merecen.

A los integrantes de mi comité de seguimiento de tesis, por sus aportes: **Abel Carcagno**, **Laura Morelli** y **Julio Caramelo**.

A dos grandes profesionales, **Rosana Bacman** y **Laura Caride**.

Y como el orden de los factores no altera el producto, quiero dar mis mayores agradecimientos:

A **mi familia**, por ser mi refugio en los momentos más difíciles y mi hinchada en los más hermosos. Porque con amor y paciencia me acompañaron a lo largo de este camino, celebrando mis logros como propios y recordándome siempre que lo más importante es ser feliz. Gracias por estar, por creer en mí y por hacer de este camino uno lleno de amor.

A **Tomi**, mi compañero de aventuras. Conocerte fue de lo más hermoso que me pasó en este camino. Gracias por ser mi lugar seguro incluso a la distancia. Por tu paciencia, tus consejos, y por creer en mí siempre, especialmente en este último tiempo. Por reavivar y compartir conmigo el amor por la lectura. Por corregir mis borradores y figuras de esta tesis, dándome sugerencias con un criterio impecable. Por todo esto y mucho más, gracias. No veo la hora de empezar esta nueva aventura juntos en la otra orilla.

Índice

1. Introducción 13
1.1. El hipocampo 13
1.1.1. Localización y estructura 13
1.1.2. Composición celular 14
1.1.3. Circuito 16
1.1.4. Función 17
1.2. Neurogénesis en el giro dentado adulto 18
1.2.1. Desarrollo morfológico y funcional de CGs nacidas en el hipocampo adulto 20
1.2.2. Rol funcional de la neurogénesis en el hipocampo adulto 24
1.3. Envejecimiento 25
1.3.1. Neurogénesis y envejecimiento 27
1.4. Regulación de la tasa de maduración de las CGs nuevas 31
1.5. Oscilaciones 33
1.5.1. Oscilaciones gamma 34
2. Hipótesis y objetivos 37
2.1. Hipótesis 37
2.2. Objetivos 38
2.2.1. Objetivo general 38
2.2.2. Objetivos específicos 38
3. Materiales y métodos 39
3.1. Animales 39
3.2. Marcado neuronal por BrdU 40
3.3. Producción de vectores retrovirales 40
3.4. Cirugía estereotáxica 41
3.5. Estimulación 41

3.5.1. Protocolo de estimulación visual 41
3.5.2. Protocolo de estimulación auditiva 42
3.5.3. Protocolo de estimulación audiovisual 42
3.6. Electrofisiología in vivo 43
3.6.1. Drives 43
3.6.2. Cirugía 44
3.6.3. Bajada de tetrodos 44
3.6.4. Registros 45
3.6.5. Análisis del potencial local de campo 45
3.6.6. Perfusión y obtención de imágenes 45
3.7. Perfusión 46
3.8. Inmunofluorescencia 46
3.9. Disecciones de hipocampo e hibridación in situ de ARN 47
3.10. Microscopía y análisis de imágenes 49
3.11. Electrofisiología ex vivo 50
3.11.1. Preparación de cortes agudos de hipocampo 50
3.11.2. Registros 50
3.12. Pruebas conductuales 51
3.12.1. Open field. 51
3.12.2. Reconocimiento de objeto novedoso (NOR). 52
3.13. Análisis estadístico 53
4. Resultados 54
4.1. La estimulación visual gamma aumenta la componente de 40 Hz en el potencial de campo del giro dentado. 54
4.2. La estimulación audiovisual a 40 Hz potencia la remodelación estructural de nuevas CGs en el hipocampo envejecido. 56
4.2.1. Modulación de estructuras postsinápticas por AuViS. 58
4.2.2. Modulación de estructuras presinápticas por AuViS. 60

4.2.3. Los efectos de la estimulación audiovisual son exclusivos de 40 Hz. .. 62

4.3. La estimulación audiovisual a 40 Hz no acelera la maduración de CGs nacidas en animales jóvenes. 64

4.4. Efectos diferenciales de la estimulación visual o auditiva a 40 Hz sobre el desarrollo estructural de nuevas CGs. 66

4.4.1. Estimulación visual 67

4.4.2. Estimulación auditiva 70

4.5. La estimulación audiovisual a 40 Hz impulsa la integración funcional de las CGs nacidas en animales envejecidos. 72

4.5.1. Efectos de AuViS sobre las propiedades electrofisiológicas de CGs de 17 días. 72

4.5.2. Efectos de AuViS sobre las propiedades electrofisiológicas de CGs de 24 días. 74

4.6. Rol de la vía de señalización de neurotrofinas en los efectos de la estimulación audiovisual a 40 Hz. 78

4.7. Efectos de AuViS en la proliferación celular y la neurogénesis en el cerebro envejecido. 81

4.8. Efectos de AuViS en el comportamiento de animales de mediana edad. ... 83

5. Discusión 87

6. Bibliografía.....102

Abreviaturas

2M: 2 meses

8M: 8 meses

11M: 11 meses

Arc: Proteína asociada al citoesqueleto relacionada con la actividad

AuS: Estimulación auditiva

AuViS: Estimulación audiovisual

Aβ: Péptido beta amiloide

BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro

BFM: Botones de fibra musgosa

BrdU: Bromodeoxiuridina

CGL: Capa granular

CGs: Células granulares del giro dentado

EA: Enfermedad de Alzheimer

GFP: Proteína fluorescente verde

LFP: Potencial de campo local

LTP: Potenciación a largo plazo

NOR: Reconocimiento de objeto novedoso

PSD: Densidad espectral de potencia

PV: Parvalbúmina

RGL: Células madre neurales

RV: Retrovirus

sEPSCs: Corrientes excitatorias postsinápticas espontáneas

Tom: tdTomato.

ViS: Estimulación visual

ZSG: Zona subgranular

ZSV: Zona subventricular

1. Introducción

1.1. El hipocampo

1.1.1. Localización y estructura

El hipocampo es una estructura cerebral perteneciente al sistema límbico situada en el lóbulo temporal medial. Es bilateral, con un hipocampo por hemisferio, y se localiza junto a la amígdala, por debajo de la corteza.

Estructuralmente presenta una organización tridimensional compleja, caracterizada por un eje longitudinal que se curva en forma de "C" (Figura 1A). En roedores, este eje se conoce como septo-temporal y se extiende desde el septum (dorso-rostral) hasta el lóbulo temporal (ventro-caudal). El eje ortogonal a este es llamado transversal (Amaral and Witter, 1989) (Figura 1B).

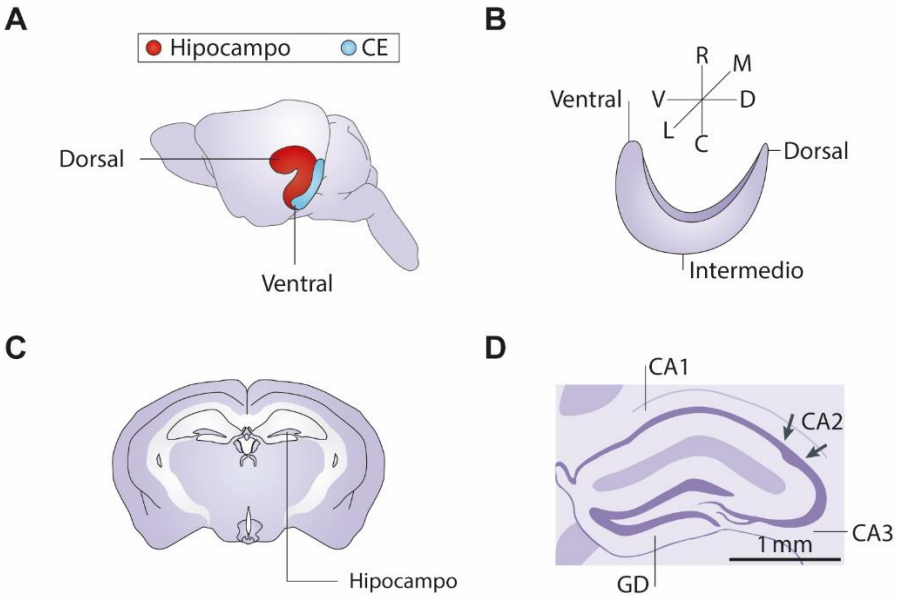

Figura 1. **Localización y estructura hipocampal en el cerebro de ratón. (A)** Ubicación del hipocampo (rojo) y la corteza entorrinal (CE; azul). **(B)** Ilustración esquemática de la orientación del eje longitudinal del hipocampo. Este eje se conoce como ventrodorsal en roedores. **(C, D)** Ilustración de una sección coronal del hipocampo. C caudal; D, dorsal; GD, giro dentado; L, lateral; M, medial; R, rostral; V ventral. (Los paneles A, B y D fueron adaptados de Strange et al., 2014. El panel C fue adaptado de Cryan et al., 2005).

Junto con el giro dentado, el complejo subicular (subículo, presubículo y parasubículo) y la corteza entorrinal, conforman la llamada formación hipocampal. Sin

embargo, en esta tesis el término “hipocampo” se utilizará para referirse al conjunto de las subregiones *cornu ammonis* (CA3, CA2 y CA1) y giro dentado (Figura 1C,D).

Las regiones dorsal y ventral del hipocampo integran información proveniente de zonas anatómicamente distantes (Dolorfo and Amaral, 1998a, b). El polo septal recibe proyecciones neocorticales y está asociado al rol del hipocampo en la navegación espacial, mientras que el temporal recibe aferencias de núcleos subcorticales, como la amígdala, y está vinculado al procesamiento de información emocional (Fanselow and Dong, 2010; Strange et al., 2014).

1.1.2. Composición celular

En ratones, la región del *Cornu Amonnis* se divide en 3 regiones (CA1, CA2 y CA3), caracterizadas principalmente por su localización anatómica y variaciones en el tamaño y la compactación de sus neuronas principales: las células piramidales (Andersen, 2007). Estás células glutamatérgicas se localizan en el llamado *stratum pyramidale* y poseen dendritas tanto apicales como basales. En cuanto a su localización, y tomando como referencia al giro dentado, CA3 es la región más próxima y CA1 la más distal (Figura 2).

El giro dentado presenta una estructura organizada en tres capas. La capa granular está formada por neuronas glutamatérgicas densamente empaquetadas denominadas células granulares (CGs). Estas neuronas extienden sus árboles dendríticos hacia la capa más externa, llamada capa molecular, donde establecen contactos con los axones provenientes de la corteza entorrinal e interneuronas locales (Treves et al., 2008). La capa molecular comprende 3 subcapas: interna, medial y externa, con axones de diferente procedencia que proporcionan estímulos específicos a cada porción del árbol dendrítico de las CGs (Forster et al., 2006). El giro dentado se estructura en forma de “V”, con una rama llamada suprapiramidal ubicada entre CA3 y CA1, y otra infrapiramidal por debajo de CA3 (Amaral et al., 2007). Estas encierran a la capa polimórfica o *hilus*, donde se localizan interneuronas y células musgosas, y a través de la cual las CGs extienden sus axones (fibras musgosas) hacia CA3 (Scharfman and Myers, 2013) (Figura 2).

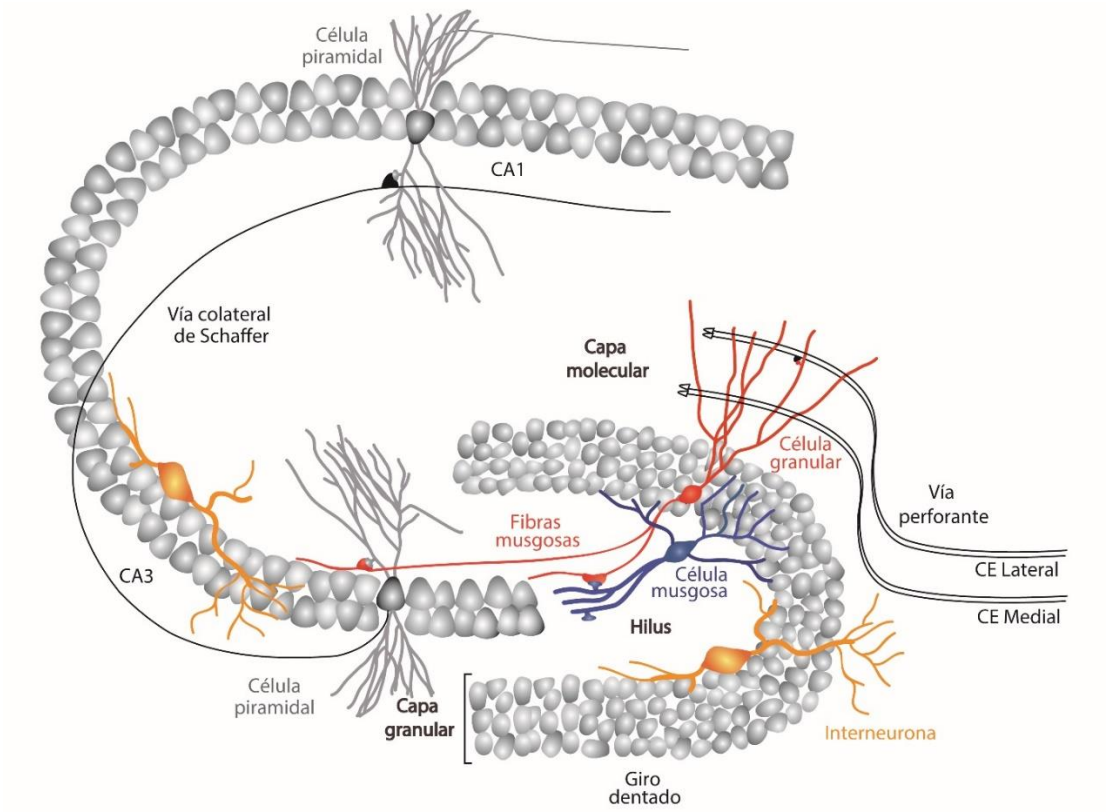

Figura 2. Composición celular del hipocampo. Representación esquemática transversal del hipocampo murino en donde se encuentran las células principales del GD, CA3 y CA1, que componen el circuito trisináptico. Las interneuronas ubicadas en la capa molecular y el *hilus* participan modulando la actividad del circuito local. (Adaptado de Toni and Schinder, 2015).

Existen a su vez redes de neuronas inhibitorias con una amplia diversidad celular. Las interneuronas se clasifican por su función, morfología, localización y marcadores moleculares, y su actividad modula el disparo de las células principales (Kullmann, 2011; Tzilivaki et al., 2023). En el hipocampo, las interneuronas "*basket*" representan la población mayoritaria. Se localizan en la superficie basal de la capa granular y su nombre se debe al patrón con forma de canasta que forman sus terminales sinápticos alrededor de las CGs, a las que contactan principalmente en el soma y segmento inicial del axón en el *hilus* y en sus dendritas proximales en la capa molecular (Sik et al., 1997; Struble et al., 1978). Dentro de esta categoría se encuentran las interneuronas que expresan la proteína de unión a calcio parvalbúmina (PV), caracterizadas por su disparo rápido y su capacidad para sincronizar redes neuronales mediante la generación de oscilaciones gamma, esenciales para la codificación temporal y el procesamiento de la información (Espinoza et al., 2018; Groisman et al., 2020; Kepecs and Fishell, 2014; Kullmann, 2011; Pala and Petersen, 2015).

1.1.3. Circuito

Todas las subcapas del hipocampo se encuentran estrechamente interconectadas a través del circuito trisináptico, compuesto por sinapsis excitatorias y mayormente unidireccionales (Andersen, 2007; Andersen et al., 1971) (Figura 3).

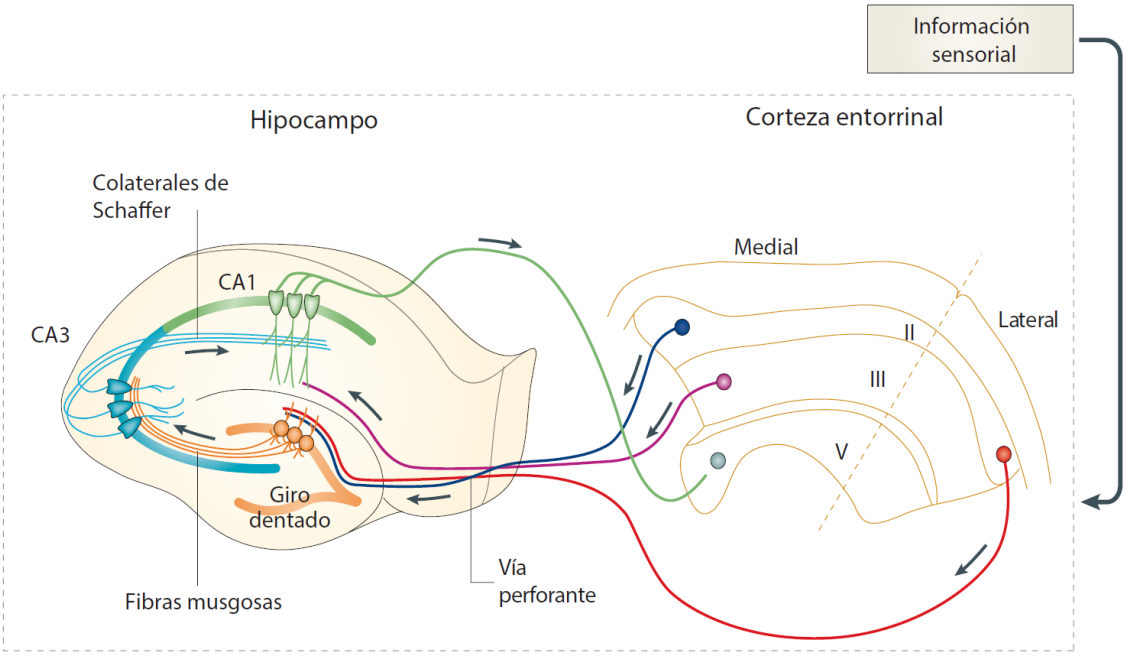

Figura 3. Circuito trisináptico en el hipocampo murino. Ilustración representativa de la conectividad trisináptica excitatoria entre la corteza entorrinal y el hipocampo (giro dentado, CA3 y CA1). La corteza entorrinal proyecta axones desde la capa II hacia el giro dentado a través de la vía perforante medial y lateral, y axones de la capa III hacia CA1. (Adaptado de Neves et al., 2008).

El circuito comienza en la corteza entorrinal, que recibe información sensorial neocortical y la envía hacia el giro dentado a través de proyecciones de células de la capa II y III, constituyendo la llamada vía perforante. Esta aferencia se divide en dos ramas: la vía perforante medial, originada en la región medial de la corteza entorrinal, y la vía perforante lateral, proveniente de la región lateral (Ramón y Cajal, 1893). Las fibras de la capa II provenientes de la vía lateral inervan las dendritas de las CGs que se localizan en el tercio más externo de la capa molecular, y las originadas en el área medial, las que se encuentran el tercio medio. Por otro lado, la capa III envía proyecciones que impactan directamente sobre CA1 (Deng et al., 2010; Neves et al., 2008). Las CGs a su vez proyectan axones desmielinizados, conocidos como fibras

musgosas, a través del *hilus* hacia CA3, constituyendo la segunda sinapsis del circuito (Amaral and Dent, 1981). En esta región contactan a las células piramidales, que envían axones llamados colaterales de Schaffer hacia CA1, formando la tercera sinapsis al inervar las dendritas de las células piramidales de esta región (Spruston and McBain, 2006). Finalmente, estas células proyectan sus axones hacia el subículo y las capas profundas de la corteza entorrinal, cerrando el lazo del circuito trisináptico y completando el flujo de información dentro de la formación hipocampal. La red local de interneuronas GABAérgicas provee inhibición de tipo *feedback* y *feedforward* para controlar la actividad de las CGs y células piramidales, respectivamente. Por ejemplo, si bien los axones de la vía perforante contactan y activan directamente a las CGs, también reclutan inhibición *feedforward* activando a las interneuronas PV^+ (Kraushaar and Jonas, 2000). Esta inhibición establece un alto umbral de activación, lo que contribuye a la baja actividad característica del giro dentado, donde solo el 2,5% de la población total de CGs se encuentra activo (Piatti et al., 2013).

1.1.4. Función

Los trabajos pioneros realizados por Scoville y Milner con el paciente Henry Molaison (H.M.) proporcionaron las primeras evidencias sobre la función del hipocampo en humanos (Scoville and Milner, 1957). H.M. sufría episodios epilépticos severos resistentes a anticonvulsivantes, por lo que fue sometido a una cirugía de remoción bilateral de 8 cm del lóbulo temporal medial, incluyendo el hipocampo y la amígdala. Aunque la intervención redujo sus crisis, dejó como secuelas una amnesia anterógrada severa (incapacidad de generar memorias nuevas) y una amnesia retrógrada parcial, mientras que su inteligencia, memoria de trabajo y aprendizaje motor permanecieron intactos (Scoville and Milner, 2000). Este trabajo destacó por primera vez el rol esencial del hipocampo en la codificación, consolidación y evocación de memorias declarativas o explícitas, aquellas asociadas al recuerdo de eventos, lugares, personas y objetos (Squire and Wixted, 2011).

Otra de las funciones atribuidas al hipocampo es la codificación de mapas espaciales. A partir de experimentos en los que se implantaron multielectrodos en el hipocampo de ratas, O'Keefe y colaboradores encontraron neuronas piramidales de CA1 que aumentaban su frecuencia de disparo cuando los animales atravesaban una

región específica del espacio, y las llamaron células de lugar o *place cells* (O'Keefe, 1976; O'Keefe and Dostrovsky, 1971). Posteriormente se reportaron los hallazgos de células de grilla, de dirección de la cabeza y de borde en la corteza entorrinal, respaldando la hipótesis de que el hipocampo está involucrado en la representación espacial, integrando información sobre la posición, orientación y límites del entorno, respectivamente (Moser et al., 2008; Solstad et al., 2008).

El giro dentado es la puerta de entrada de información al hipocampo. Su papel principal radica en procesar y transformar la información entrante, facilitando funciones esenciales como la separación de patrones, que permite distinguir entre experiencias similares; la detección de novedad, que asegura que eventos nuevos sean codificados adecuadamente; y la vinculación de información sensorial, clave para formar representaciones coherentes del entorno (Borzello et al., 2023). Una característica distintiva del giro dentado es que constituye una de las pocas regiones del cerebro adulto donde se generan nuevas neuronas a lo largo de la vida. Este proceso no sólo promueve la flexibilidad en la representación de patrones, sino que también es esencial para la integración de experiencias nuevas y contribuye significativamente a las funciones generales del circuito hipocampal (Kempermann, 2022).

1.2. Neurogénesis en el giro dentado adulto

La generación de neuronas nuevas en el cerebro adulto, conocida como neurogénesis adulta, es uno de los fenómenos más interesantes de plasticidad cerebral. Este proceso se ha reportado en diversas especies, incluyendo aves (Barnea and Nottebohm, 1994), reptiles (Lopez-Garcia, 1993), artrópodos (Sandeman et al., 2011; Sullivan et al., 2007), roedores (Altman and Das, 1965) y primates, incluyendo humanos (Eriksson et al., 1998; Moreno-Jiménez et al., 2019; Spalding et al., 2013; Zhou et al., 2022).

En roedores se han identificado dos nichos neurogénicos principales donde se generan neuronas nuevas a partir de progenitores neurales: la zona subventricular (ZSV), ubicada en los ventrículos laterales, y la zona subgranular (ZSG) del giro dentado del hipocampo (Gage, 2000) (Figura 4).

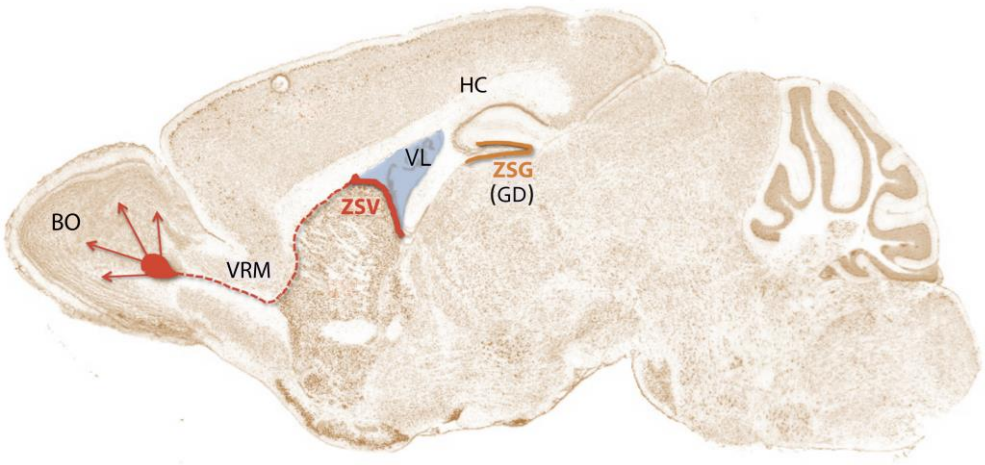

Figura 4. Nichos neurogénicos en el cerebro murino. Esquema que muestra una vista sagital del cerebro de ratón exponiendo los principales nichos neurogénicos. Debajo de los ventrículos laterales (VL) se encuentra la zona subventricular (ZSV), donde se generan neuronas inmaduras que migran por la vía rostral migratoria (VRM) hacia el bulbo olfatorio (BO) en donde se integran. En la zona subgranular (ZSG) del giro dentado (GD) del hipocampo (HC) los progenitores neurales generan CGs que se integrarán al circuito. (Adaptado de Bátiz et al., 2016).

En estos nichos, células madre neurales permanecen quiescentes hasta que señales específicas desencadenan su activación y proliferación. En la ZSV producen neuronas inmaduras que migran a través de la vía rostral migratoria hacia el bulbo olfatorio, donde se integran como interneuronas (Gheusi et al., 2013; Lepousez et al., 2013). Por otro lado, en la ZSG las células madre neurales (similares a la glía radial) pueden dividirse para autorenovarse y dar lugar a progenitores neurales. Estos últimos proliferan y dan lugar a neuroblastos, que se diferencian a neuronas granulares para finalmente madurar e integrarse a la red neuronal preexistente (Kempermann et al., 2015).

El avance en técnicas como el uso de retrovirus y la expresión génica inducida ha permitido caracterizar el desarrollo de las nuevas CGs de manera precisa gracias a su capacidad para marcar poblaciones de neuronas nacidas en un intervalo restringido de tiempo (Enikolopov et al., 2015; Enikolopov and Overstreet-Wadiche, 2008; Yang et al., 2015). Además, herramientas como la microscopía confocal y la electrofisiología han facilitado el análisis de las propiedades morfofuncionales de estas neuronas y su integración en los circuitos preexistentes (Ambrogini et al., 2004; Espósito et al., 2005; Ge et al., 2006; Mongiat et al., 2009; Piatti et al., 2006; Zhao et al., 2006).

1.2.1. Desarrollo morfológico y funcional de CGs nacidas en el hipocampo adulto

A diferencia de lo que ocurre en el desarrollo embrionario, donde la neurogénesis es rápida y contribuye a poblar el cerebro, la maduración de neuronas nuevas en el adulto es más lenta y ocurre en un circuito ya establecido (Duan et al., 2008; Overstreet-Wadiche et al., 2006a). No obstante, se ha demostrado que las CGs nacidas en el adulto siguen un proceso de desarrollo que recapitula las etapas observadas en el periodo perinatal y, una vez alcanzada su madurez, son funcional y morfológicamente indistinguibles de las nacidas en el desarrollo (Laplagne et al., 2006; Laplagne et al., 2007). En ratones adultos, estas neuronas requieren aproximadamente 8 semanas para completar su maduración, y durante este proceso es posible identificar cambios en su morfología, identidad molecular, propiedades eléctricas y conexiones sinápticas (Laplagne et al., 2006; Piatti et al., 2006; Temprana et al., 2015).

Las células madre neurales de la zona subgranular tienen una morfología radial, con un proceso apical que se extiende a través de la capa granular y se ramifica en la capa molecular. Suelen denominarse RGL (*radial glia like cells*) o células de tipo 1 y expresan marcadores como Nestin, Sox2 y proteína ácida fibrilar glial (GFAP). Las RGL rara vez se dividen, pero cuando lo hacen, se autorrenuevan y dan lugar a células progenitoras intermedias (Bonaguidi et al., 2012). Estas células también se localizan en la zona subgranular, tienen procesos cortos y proliferan rápidamente dando lugar a neuroblastos que ya están comprometidos con el linaje neuronal. Finalmente, los neuroblastos se diferencian y dan lugar a CGs, que al madurar extienden dendritas hacia la capa molecular y un axón hacia la región CA3, donde establecen contactos sinápticos, integrándose al circuito hipocampal (Toni and Schinder, 2015) (Figura 5).

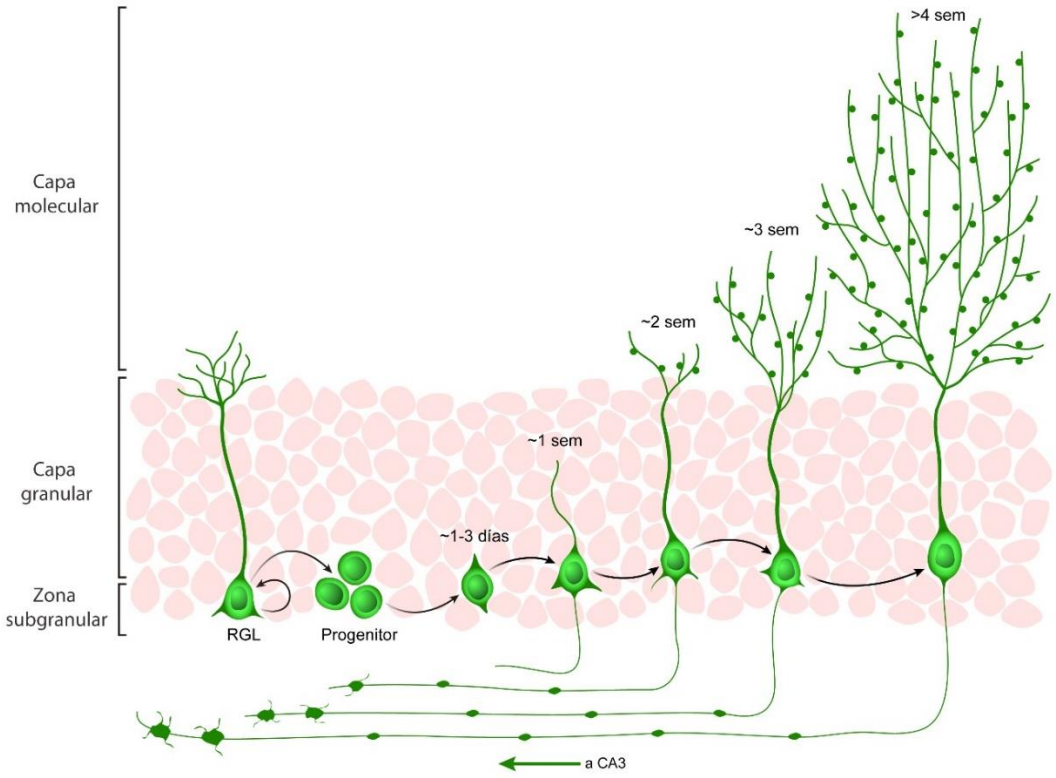

Figura 5. Desarrollo morfológico de CGs nacidas en el hipocampo adulto. Representación esquemática de etapas en la maduración de neuronas nuevas en el adulto. Progenitores neurales ubicados en la zona subgranular dan lugar a CGs que migran a través de la capa granular, extendiendo sus árboles dendríticos hacia la capa molecular y conectándose con sus aferencias a través de espinas dendríticas. Sus axones se extienden progresivamente a través del *hilus,* donde establecen conexiones mediante botones *en passant*, y se orientan hacia CA3, donde contactan *targets* postsinápticos mediante terminales complejos (botones) y sus filopodios. (Adaptado de Aimone et al., 2014).

Se ha reportado que la mayoría de CGs nuevas sufren apoptosis en los primeros días de desarrollo (1-4 días), durante la transición de progenitores intermedios a neuroblastos y son eliminadas mediante fagocitosis por la microglía presente en el nicho (Sierra et al., 2010). En una fase posterior de selección por apoptosis entre 1 y 3 semanas después del nacimiento de las nuevas CGs, la supervivencia neuronal depende de la actividad y la integración de las mismas en el circuito (Kempermann et al., 2003; Tashiro et al., 2006).

1.2.1.1. Desarrollo de las conexiones aferentes

Durante las primeras dos semanas de desarrollo, las nuevas CGs migran activamente desde la ZSG hacia la capa granular. A lo largo de este proceso, sus dendritas

apicales crecen extendiéndose hacia la capa molecular y sus procesos basales se proyectan hacia el *hilus* (Espósito et al., 2005; Sun et al., 2013; Zhao et al., 2006) (Figura 5). Durante este periodo las CGs reciben exclusivamente conexiones aferentes dendríticas provenientes de interneuronas residentes del *hilus* que liberan el neurotransmisor ácido gamma-aminobutírico (GABA). Debido a la alta concentración de Cl^- intracelular en las CGs, las respuestas GABAérgicas son despolarizantes (Chancey et al., 2013; Ge et al., 2006; Karten et al., 2006; Overstreet Wadiche et al., 2005).

Luego de la segunda semana las CGs dejan de migrar y comienzan a generar espinas dendríticas (Tashiro et al., 2006). A las 3 semanas el neurotransmisor GABA se vuelve hiperpolarizante, las CGs ya reciben *inputs* glutamatérgicos y disparan potenciales de acción más maduros (Chancey et al., 2013; Mongiat et al., 2009; Tozuka et al., 2005).

El desarrollo morfológico de estas neuronas finaliza hacia la cuarta semana, momento en el que se observa una mayor densidad de sinapsis glutamatérgicas sin cambios en la inhibición GABAérgica. Este aumento temporario del balance excitación/inhibición las convierte en neuronas altamente activables, y con una menor especificidad de *input* en comparación con neuronas maduras (Ge et al., 2007; Marin-Burgin et al., 2012) (Figura 5). Finalmente, hacia la octava semana reciben inhibición GABAérgica perisomática, lo que disminuye su excitabilidad y completa su maduración funcional (Freund and Katona, 2007). Sin embargo, la integración de las nuevas CGs no tiene consecuencias funcionales hasta la formación de los primeros contactos con blancos postsinápticos al final de la segunda semana de desarrollo.

1.2.1.2. Desarrollo de las conexiones eferentes

La integración funcional en el circuito del giro dentado no depende únicamente del establecimiento de conexiones aferentes para integrar información, sino también de la transmisión de esa información hacia *targets* postsinápticos. Se ha estudiado extensivamente que las nuevas CGs proyectan sus axones a través del *hilus* hacia CA3, donde contactan blancos postsinápticos mediante estructuras especializadas (Faulkner et al., 2008; Restivo et al., 2015; Sun et al., 2013; Toni et al., 2008; Zhao et al., 2006). Se pueden diferenciar tres tipos de terminales presinápticos: terminales

grandes llamados botones de fibra musgosa (BFM) de alrededor de (4-10 µm), extensiones filopodiales de estos terminales (0.5–2.0 µm), y pequeñas varicosidades *en passant* (0.5–2.0 µm) (Acsady et al., 1998; Amaral and Dent, 1981).

Durante la segunda semana del desarrollo, los axones de las CGs atraviesan el *hilus* y alcanzan el área más proximal de CA3, donde las varicosidades *en passant* contactan interneuronas GABAérgicas en estas dos áreas (Restivo et al., 2015). Alrededor de la tercera semana las fibras musgosas llegan a la región más distal de CA3, donde continúan contactando interneuronas. Finalmente, alcanzan un *plateau* en su crecimiento durante la cuarta semana, momento en el que los BFM se contactan con neuronas piramidales a través de estructuras dendríticas complejas llamadas excresencias espinosas, ubicadas en el estrato lúcido de CA3 (Restivo et al., 2015; Sun et al., 2013; Toni et al., 2008; Zhao et al., 2006). A su vez, cada extensión filopodial presente en el botón presináptico contacta una interneurona en esta región, reclutando inhibición *feedforward* para mantener el equilibrio entre excitación e inhibición de neuronas piramidales (Acsady et al., 1998; Danzer et al., 2010; Meltzer et al., 2005; Torborg et al., 2010) (Figura 6). Los terminales sinápticos continúan aumentando en número y tamaño, llegando a un *plateau* de maduración luego de las 8 semanas, similar a lo reportado en el desarrollo de *conexiones* dendríticas (Sun et al., 2013).

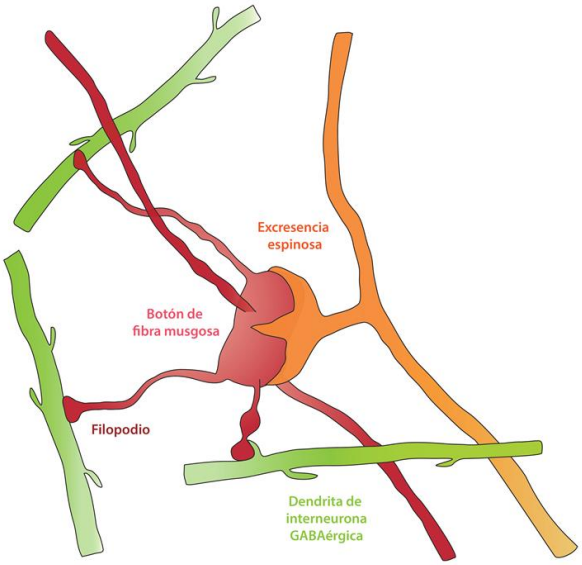

Figura 6. Sinapsis de botones de fibras musgosas en CA3. Esquema de un BFM con sus respectivos filopodios. El botón contacta neuronas piramidales de CA3, mientras que sus extensiones filopodiales reclutan inhibición *feedforward* de interneuronas GABAérgicas. (Adaptado de Acsády et al., 1998).

En particular, las conexiones de los filopodios con interneuronas de CA3 presentan un pico máximo alrededor de las 4 semanas de edad (Restivo et al., 2015), y luego se establecen en un valor de 2 filopodios por botón, sugiriendo que las CGs nuevas reclutan más inhibición *feedforward* de manera transitoria durante este periodo.

A su vez, experimentos realizados con optogenética demostraron que los contactos que establecen las neuronas nuevas con sus blancos postsinápticos son glutamatérgicos y funcionales. Al estimular las nuevas CGs y registrar las corrientes postsinápticas en neuronas piramidales de CA3 se observaron dos componentes, uno glutamatérgico proveniente de los BFM (monosináptico) y uno GABAérgico resultante de la inhibición *feedforward* reclutada a través de las extensiones filopodiales de estos botones (disináptico) (Toni et al., 2008).

1.2.2. Rol funcional de la neurogénesis en el hipocampo adulto

A pesar de que la neurogénesis adulta lleva décadas siendo investigada, el significado fisiológico de este proceso en el cerebro de mamíferos adultos continúa siendo un gran interrogante (Aimone et al., 2006; Doetsch and Hen, 2005; Kempermann, 2022; Kempermann et al., 2004; Kitabatake et al., 2007; Toda et al., 2019)

Si bien las propiedades funcionales de las CGs nuevas una vez maduras son indistinguibles de aquellas presentes en neuronas generadas en el desarrollo, alrededor de la cuarta semana de maduración exhiben mayor excitabilidad intrínseca, menor inhibición GABAérgica y por ende un aumento en la plasticidad sináptica (Ge et al., 2007; Marin-Burgin et al., 2012; Snyder et al., 2001; Wang et al., 2000). Estas propiedades les confieren la capacidad de procesar información de manera diferencial, contribuyendo de manera única al circuito hipocampal.

Una hipótesis ampliamente aceptada en el campo sostiene que las CGs nuevas desempeñan un papel clave en la separación de patrones, proceso en el que ensambles neuronales que codifican información espacial o contextual similar generan respuestas de salida completamente diferentes (Aimone et al., 2011; Sahay et al., 2011b). Las primeras evidencias experimentales que asociaron al giro dentado con este rol provienen de estudios donde manipularon la tasa neurogénica utilizando

diferentes técnicas. Por ejemplo, la inhibición de la neurogénesis mediante irradiación perjudica la capacidad de realizar tareas de aprendizaje espacial dependientes de hipocampo en ratas (Madsen et al., 2003). De manera consistente, estudios posteriores mostraron que una reducción en el número de neuronas nuevas disminuye el desempeño en tareas de discriminación espacial fina (Bonafina et al., 2019; Clelland et al., 2009), mientras que aumentar la neurogénesis mejora significativamente esta capacidad (Creer et al., 2010; Nakashiba et al., 2012; Sahay et al., 2011a). Estos hallazgos respaldan la hipótesis de que las CGs son necesarias para discriminar patrones con un alto grado de similitud.

Además, las neuronas nuevas han sido asociadas con el aprendizaje y la memoria dependientes del hipocampo (Marin-Burgin and Schinder, 2012). Por ejemplo, ratones transgénicos portadores de una proteína pro-apoptótica dirigida a CGs nuevas presentaron dificultades en tareas de aprendizaje espacial con alta demanda cognitiva (Dupret et al., 2008). Por otro lado, una tasa neurogénica elevada ha demostrado mejorar el desempeño de los animales en paradigmas de memoria espacial (Marin-Burgin and Schinder, 2012; Seib et al., 2013), mientras que una neurogénesis reducida afecta la retención y la evocación de memorias espaciales tanto a corto como a largo plazo (Lepousez et al., 2015). Actualmente, la mayoría de los trabajos respaldan el rol de las neuronas nuevas en funciones cognitivas dependientes del giro dentado y en memorias dependientes de hipocampo (Anacker and Hen, 2017; Borzello et al., 2023; Kempermann, 2022). En concordancia con estos hallazgos, alteraciones en este proceso correlacionan con las disfunciones cognitivas que suelen presentarse en pacientes con desordenes psiquiátricos (esquizofrenia, depresión, ansiedad y estrés post-traumático) y en el envejecimiento, donde se ha reportado una disminución en la tasa neurogénica (Drew et al., 2013; Kang et al., 2016; Moreno-Jiménez et al., 2019; Toda et al., 2019).

1.3. Envejecimiento

El envejecimiento es un proceso multifacético que afecta la integridad fisiológica de células, tejidos y órganos, lo que deteriora gradualmente la calidad de vida (Guarente, 2014; Lopez-Otin et al., 2013). Más aún, la edad avanzada constituye el principal factor de riesgo para enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de

Alzheimer (EA) y el Parkinson, ambas caracterizadas por la pérdida progresiva de poblaciones neuronales (Irwin et al., 2013; Mattson, 2012).

Durante el envejecimiento fisiológico se observa una disminución del volumen cerebral y, en consecuencia, un incremento del volumen ventricular (Scahill et al., 2003). A su vez, las neuronas presentan una reducción en el número de sinapsis, proteínas asociadas y receptores de neurotransmisores, provocando alteraciones en la comunicación neuronal y la plasticidad (Burke and Barnes, 2006, 2010; Fan et al., 2017). Paralelamente, la disminución de la densidad vascular y el aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica comprometen el suministro de energía, factores neurogénicos (como IGF-1 y VEGF) y el metabolismo de residuos, lo que agrava aún más el daño neuronal (Black et al., 1989; Jiang-Xie et al., 2024 ; Sonntag et al., 1997b).

El hipocampo es particularmente vulnerable al envejecimiento (Bartsch and Wulff, 2015; Raz et al., 2004). Diversos trabajos han reportado una pérdida significativa de conexiones en el circuito hipocampal de animales envejecidos. En particular, se ha observado una disminución de las sinapsis axoespinosas establecidas entre las CGs y los axones provenientes de la lámina II de la corteza entorrinal, reflejada en una reducción del volumen de materia blanca en la vía perforante (Geinisman et al., 1992; Yassa et al., 2010). Estas alteraciones estructurales junto con problemas funcionales, como la reducción en la potenciación a largo plazo (LTP), mecanismo crítico para la formación de la memoria, se han correlacionado con déficits en tareas de memoria espacial (Deupree et al., 1993; Gage et al., 1984; Norris et al., 1996). Además, se ha hipotetizado que estos cambios en la conectividad podrían afectar la función de circuitos dentro del hipocampo en tareas como la separación de patrones (Burke and Barnes, 2010; Burke et al., 2010).

El envejecimiento también provoca una disminución en los niveles de neurotransmisores y factores neurotróficos hipocampales, lo que repercute negativamente en la plasticidad sináptica y, en consecuencia, la memoria. El factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) es el factor de crecimiento más abundante y cumple un rol fundamental en el desarrollo, la supervivencia y la plasticidad neuronal (Wang et al., 2015; Waterhouse et al., 2012). Se ha reportado una disminución de BDNF en el cerebro envejecido, asociada a una reducción del volumen hipocampal,

una disminución de la LTP y la pérdida de sinapsis (Duzel et al., 2016; Erickson et al., 2010; Rex et al., 2006; Schaaf et al., 2001).

Por otro lado, al igual que en otros órganos, la inflamación local es una característica común del envejecimiento cerebral. En el hipocampo envejecido la microglía adopta un perfil activado y proinflamatorio, generando niveles elevados de neuroinflamación basal y daño tisular debido a la producción de especies reactivas de oxígeno y la liberación de citoquinas proinflamatorias, como la interleucina 1β (IL-1β), la IL-6 y el factor de necrosis tumoral α (TNF-α) (Long et al., 1998; Mouton et al., 2002; Udeochu et al., 2016). Todo esto genera un entorno profinflamatorio en el nicho donde se desarrollan las nuevas CGs.

1.3.1. Neurogénesis y envejecimiento

La neurogénesis adulta se encuentra sustentada por un microambiente específico conocido como el nicho neurogénico. Este incluye a los progenitores neurales, los astrocitos, la microglía, la neurovasculatura y la matriz extracelular, y su función es proporcionar el soporte y las señales necesarias para mantener y regular la proliferación y diferenciación de los precursores neuronales (Kempermann, 2015; Mercier et al., 2002; Palmer et al., 2000; Seki, 2003). Durante el envejecimiento el nicho sufre cambios que afectan su homeostasis y convierten a la edad avanzada en uno de los principales moduladores negativos de la neurogénesis adulta (Kempermann et al., 2002; Morgenstern et al., 2008; Terreros-Roncal et al., 2021).

La generación de neuronas nuevas disminuye significativamente con la edad en mamíferos, incluyendo los humanos (Goncalves et al., 2016b; Kuhn et al., 1996; Kuipers et al., 2015; Moreno-Jiménez et al., 2019). Esta reducción se atribuye, en primer lugar, a una menor cantidad, tasa de proliferación y actividad de las RGL (Kuhn et al., 1996; Rao et al., 2005; Terreros-Roncal et al., 2021), como también a una reducción en el número de progenitores intermedios (Olariu et al., 2007; Wu et al., 2023).

En el hipocampo envejecido, las RGL presentan alteraciones en la proteostasis, inflamación crónica y un aumento en la proporción de células en estado

quiescente (Babcock et al., 2021; Kalamakis et al., 2019; Kempermann, 2015; Negredo et al., 2020; Toda et al., 2019). A pesar de su baja tasa de proliferación, las RGL activas presentan una capacidad proliferativa comparable a la de animales jóvenes. Sin embargo, durante el envejecimiento exhiben una reducción en las divisiones asimétricas, lo que favorece la gliogénesis en detrimento de la neurogénesis (Encinas et al., 2011; Wu et al., 2023).

Por otro lado, aunque las poblaciones de neuronas preexistentes se mantienen constantes, la supervivencia de las neuronas nuevas disminuye con la edad (Bondolfi et al., 2004; Heine et al., 2004; Kuhn et al., 1996). En animales envejecidos, esta disminución se relaciona principalmente con una mayor apoptosis de progenitores intermedios durante la primera oleada apoptótica (Wu et al., 2023). Además, una reducción en la actividad GABAérgica y colinérgica podría afectar la sobrevida a edades neuronales más avanzadas, dado que son neurotransmisores clave para la supervivencia e integración de neuronas inmaduras (Itou et al., 2011; Rao et al., 2006; Seib and Martin-Villalba, 2015).

El envejecimiento se encuentra estrechamente relacionado con procesos inflamatorios y disfunción microglial. En condiciones normales, la microglía promueve la neurogénesis mediante la producción de factores de crecimiento y la eliminación de células apoptóticas (Sierra et al., 2010). Sin embargo, su capacidad fagocítica disminuye con la edad (Marschallinger et al., 2020; Pluvinage et al., 2019), y su estado de activación crónica fomenta la secreción de citoquinas proinflamatorias que afectan negativamente la proliferación de RGL y modifican la tasa de diferenciación neuronal, favoreciendo la astrogénesis (Araki et al., 2021; Sato, 2015).

La vasculatura también experimenta cambios relacionados con la edad, como una menor proliferación de células endoteliales (Wang et al., 2004). Estas células producen VEGF, un regulador importante de la neurogénesis adulta, cuya concentración disminuye con la edad en el hipocampo (Cao et al., 2004; Greenberg and Jin, 2004). Además, la barrera hematoencefálica pierde integridad en regiones como el giro dentado y CA1, lo que hace al nicho neurogénico más vulnerable a la entrada de proteínas que podrían producir respuestas inflamatorias (Karakatsani et al., 2023; Montagne et al., 2015; Popescu et al., 2009).

Además de la disminución en la tasa neurogénica, se ha reportado que la tasa de maduración de las neuronas que nacen en este contexto se ve afectada en animales envejecidos (Trinchero et al., 2017; Trinchero et al., 2019a). Se observó que el desarrollo morfológico de las CGs nuevas se encuentra enlentecido en ratones de mediana edad en comparación con ratones jóvenes (Figura 7).

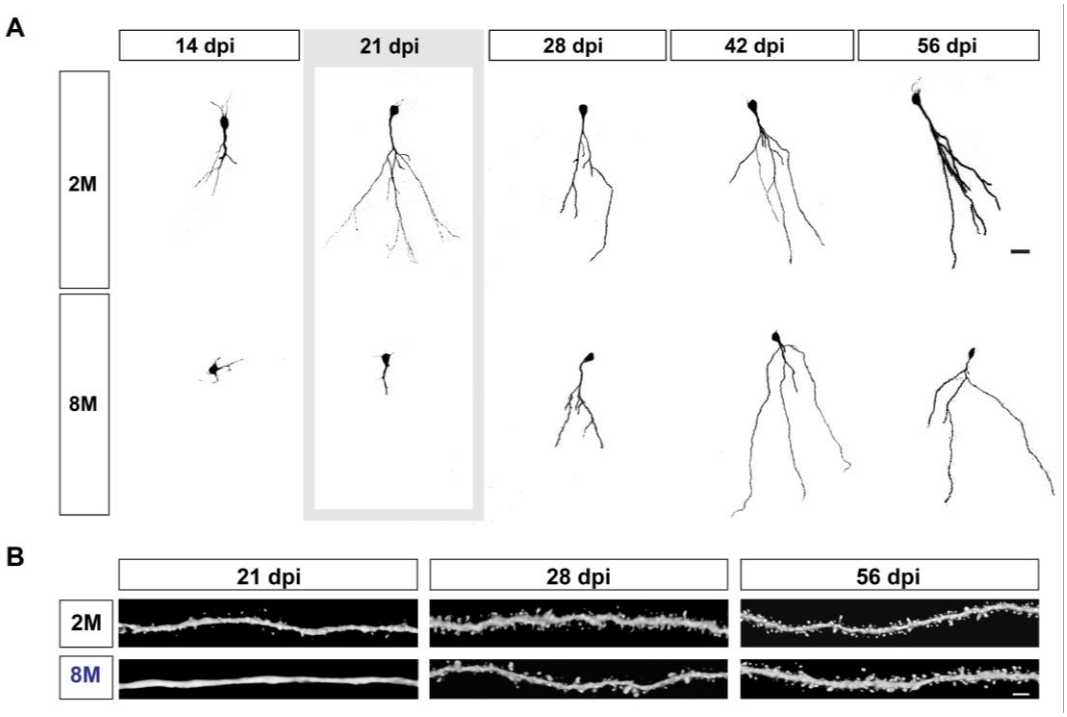

Figura 7. Efecto del envejecimiento en el desarrollo de conexiones aferentes en células granulares nuevas. Imágenes representativas obtenidas por microscopía confocal de CGs nuevas de ratones de 2 meses (2M, jóvenes) y 8 meses (8M, mediana edad), en diferentes estadios de su desarrollo. (A) En un nicho envejecido el proceso de maduración de las neuronas nuevas se encuentra enlentecido. A 21 días de desarrollo la diferencia morfológica entre edades es máxima. (B) El proceso de maduración de las espinas dendríticas (correlato morfológico de sinapsis glutamatérgicas) también se encuentra enlentecido en el envejecimiento. (Adaptado de Trinchero et al., 2017).

En ratones jóvenes adultos, las CGs en desarrollo alcanzan su máxima longitud de árbol dendrítico y su mayor densidad de espinas alrededor de las 3 semanas de edad. En contraste, las CGs de la misma edad en ratones de 8 meses presentan dendritas incipientes, carecen de espinas y permanecen desconectadas del circuito. Sin embargo, a pesar de este retraso en su desarrollo, las neuronas en estos ratones alcanzan un tamaño comparable al de ratones jóvenes hacia las 6 semanas (Figura 7).

Estudios previos de nuestro laboratorio caracterizaron el desarrollo de los terminales presinápticos de las CGs nuevas en animales envejecidos y reportaron que también presenta un retraso significativo en comparación con animales jóvenes, lo que podría impactar su integración funcional en el circuito (Trinchero et al., 2019a) (Figura 8).

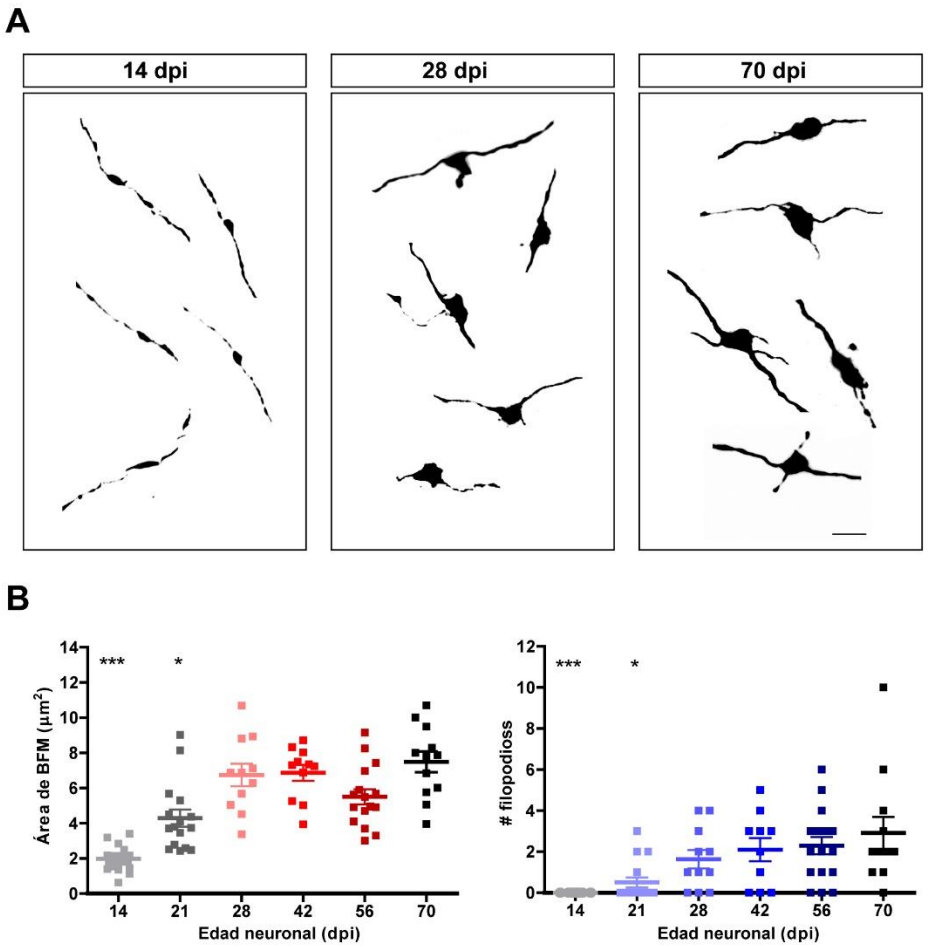

Figura 8. Desarrollo de conexiones eferentes en células granulares nacidas en el hipocampo envejecido. (A) Imágenes representativas obtenidas por microscopía confocal de BFM provenientes de CGs nuevas en ratones de 8 meses en diferentes estadios de su desarrollo. (B) Cuantificación del área y número de filopodios de los BFM para cada edad. (Adaptado de Trinchero et al., 2019).

Los BFM de 4 semanas de edad en ratones de 8M presentan un área de 7 µm² y solo dos filopodios, evidenciando poca conectividad GABAérgica (Trinchero et al., 2019a). En contraste, botones de la misma edad en animales jóvenes adultos alcanzan un tamaño de 9 µm² en promedio, acompañados de un pico en el número de filopodios, lo que refleja una máxima conectividad GABAérgica que disminuye hasta llegar a un *plateau* con el desarrollo (Restivo et al., 2015).

Además, registros electrofisiológicos han revelado que CGs nacidas en animales envejecidos sufren un retraso tanto en la maduración de propiedades intrínsecas (resistencia de entrada, umbral y cantidad de disparos de potenciales de acción) como en la aferencia sináptica glutamatérgica (Trinchero et al., 2019a).

Con el envejecimiento, la disponibilidad de factores neurotróficos y de crecimiento disminuye (Lee et al., 2012; Shetty et al., 2005). Esto se debe tanto a la disminución de la producción local por los astrocitos del hipocampo como a niveles sistémicos más bajos de dichos factores (Palmer and Ousman, 2018; Shetty et al., 2005; Sonntag et al., 1997a). Estos niveles se asocian también con una disminución en la actividad eléctrica del giro dentado, correlacionada con el desarrollo neuronal enlentecido y la menor liberación de neurotrofinas en el hipocampo envejecido (Park and Poo, 2013; Schinder and Poo, 2000; Trinchero et al., 2017). El BDNF, clave en la supervivencia, diferenciación e integración neuronal (Chan et al., 2008; Greenberg et al., 2009) muestra niveles reducidos con la edad, afectando negativamente el desarrollo de CGs nuevas (Bergami et al., 2008; Reichardt, 2006). No obstante, el ejercicio físico puede aumentar sus niveles, restaurando la plasticidad sináptica, incrementando la neurogénesis y mejorando el aprendizaje en ratones de mediana edad (Marlatt et al., 2012; Trinchero et al., 2017).

Todos estos cambios en la cantidad y calidad de las neuronas nuevas impactan directamente en la función cognitiva. La disminución de la neurogénesis en el envejecimiento está asociada con un peor desempeño en tareas de aprendizaje y memoria (Gage and Temple, 2013; McAvoy et al., 2016) y en humanos se ha vinculado al deterioro cognitivo y a enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer (Moreno-Jiménez et al., 2019; Tobin et al., 2019).

1.4. Regulación de la tasa de maduración de las CGs nuevas

El proceso neurogénico puede ser regulado por factores extrínsecos e intrínsecos (Aimone et al., 2014; Kempermann, 2015). Entre estos últimos, el principal modulador del desarrollo de las nuevas CGs es la actividad eléctrica del circuito local (Overstreet-Wadiche et al., 2006b; Piatti et al., 2011). Se ha observado que la velocidad de maduración de las CGs es mayor en el polo septal del hipocampo, donde hay una

mayor actividad del giro dentado en comparación con el polo temporal. En este último, la actividad es menor y el desarrollo neuronal es más lento (Piatti et al., 2011; Snyder et al., 2012).

Uno de los primeros indicios de una modulación positiva de la neurogénesis adulta por un estímulo extrínseco se obtuvo al exponer ratones a un ambiente enriquecido (Kempermann et al., 1998a; Kempermann et al., 1997). Este estímulo consiste en una jaula más grande con objetos como tubos, ruedas, juguetes y mayor cantidad de individuos, con el objetivo de mejorar el bienestar cognitivo y fisiológico de los animales mediante la estimulación sensorial, social y motora. En roedores, el enriquecimiento ambiental se ha asociado a un número significativamente mayor de nuevas CGs en el giro dentado (Kempermann, 2019; Kempermann et al., 1998a; Kempermann et al., 2002; Kempermann et al., 1998b) junto con efectos positivos a largo plazo en el aprendizaje y la memoria (Kempermann et al., 1997). Incluso se observó un aumento de la neurogénesis y una disminución de la carga de placas de Aβ en modelos animales de la enfermedad de Alzheimer (J Rodriguez et al., 2011; Ziegler-Waldkirch et al., 2018).

Sin embargo, el ambiente enriquecido utilizado en estos estudios consistía en una combinación de estímulos sociales, aprendizaje y actividad física. Al separar los distintos elementos que lo comprendían, se demostró que el ejercicio físico *per se* aumenta la proliferación de precursores neuronales, la maduración neuronal y la plasticidad sináptica, así como la memoria espacial en ratones adultos (Vivar et al., 2013). También se demostró que aumenta la actividad en el polo temporal y acelera la maduración de las CGs nacidas en esta región (Piatti et al., 2011). Estos efectos se mantienen en animales envejecidos (van Praag et al., 2005). Ratones de 8M expuestos a 3 semanas de ejercicio voluntario aumentan significativamente el crecimiento del árbol dendrítico y la integración de CGs nuevas con las aferencias provenientes de la corteza entorrinal en el polo septal (Trinchero et al., 2017). Trabajos realizados en modelos murinos de Alzheimer, reportaron una disminución de las características propias de la patología, como los niveles y acumulación de Aβ, como también mejoras en la cognición y un aumento de la neurogénesis adulta mediados por el ejercicio físico (J Rodriguez et al., 2011).

Por otro lado, el enriquecimiento ambiental sin ejercicio físico también aumenta la tasa neurogénica, aunque el mecanismo subyacente no es un incremento en la proliferación, sino un aumento de la sobrevida neuronal (Baroncelli et al., 2010; Moreno-Jimenez et al., 2019). Los animales expuestos a este tratamiento mostraron mejoras en la memoria espacial, de trabajo, de reconocimiento y de miedo (Birch et al., 2013; Clemenson and Stark, 2015). Tanto en animales jóvenes como envejecidos, la exploración de un ambiente enriquecido durante 3 semanas acelera significativamente la maduración morfofuncional de las nuevas CGs (Alvarez et al., 2016; Trinchero et al., 2017). Trabajos previos demostraron que este estímulo comportamental activa CGs maduras de la capa granular del giro dentado, que a su vez activan interneuronas PV^+ que al liberar GABA despolarizan CGs nuevas, promoviendo su desarrollo (Alvarez et al., 2016).

Diversos estudios han revelado diferentes mecanismos subyacentes a la regulación de la neurogénesis mediante estos estímulos. El ejercicio físico y la actividad motora asociada al enriquecimiento ambiental provocan cambios drásticos en la vasculatura, aumentando el flujo sanguíneo y la permeabilidad de la barrera hematoencefálica. Debido a este aumento en la permeabilidad, las hormonas circulantes y los factores de crecimiento, como el VEGF, el GDNF y el BDNF, llegan más fácilmente al hipocampo y, en última instancia, promueven la neurogénesis hipocampal (Aimone et al., 2014; Grońska-Pęski et al., 2021; Olson et al., 2006).

Es claro entonces que estímulos que incrementan la actividad del circuito local del hipocampo impactan directamente en la generación, maduración e integración de las CGs nacidas durante la adultez y el envejecimiento.

1.5. Oscilaciones

A principios del siglo XX, el psiquiatra alemán Hans Berger (1929) descubrió que la actividad eléctrica de las neuronas puede registrarse a partir de electrodos colocados sobre el cuero cabelludo. Esta técnica no invasiva, conocida como electroencefalografía (EEG), reveló que la actividad cerebral se presenta en forma de fluctuaciones rítmicas y sincrónicas que reflejan la actividad sináptica de grandes poblaciones neuronales (Buzsáki et al., 2012).

Investigaciones posteriores utilizando EEG junto con otras técnicas no invasivas como la magnetoencefalografía, y registros invasivos de potencial de campo local (LFP), han demostrado que la actividad neuronal oscila en rangos de frecuencia específicos, designados con letras griegas (Biasiucci et al., 2019; Lopes da Silva, 2013). Estas dinámicas oscilatorias permiten la coordinación de la actividad neuronal de poblaciones locales, como también en regiones distales del cerebro (Buzsáki et al., 1992). Estudios previos han demostrado que estas ondas pueden viajar a través de regiones corticales, sincronizándolas y aumentando la comunicación entre ellas (Baghdadi et al., 2023). De hecho, la comunicación a través de la coherencia es una teoría ampliamente aceptada que explica como la sincronización de fase de las oscilaciones cerebrales facilita la comunicación y la transmisión de la información entre diferentes regiones cerebrales (Fries, 2015). Este tipo de comunicación es clave para diferentes procesos conductuales y cognitivos que comprometen regiones cerebrales y oscilaciones concretas. Por ejemplo, las oscilaciones theta (4-8 Hz) se han relacionado con la memoria episódica y la navegación espacial, las oscilaciones alfa (8-14 Hz) con el procesamiento sensorial y la atención, las beta (15-30 Hz) con la memoria de trabajo y la toma de decisiones perceptivas, y las gamma (25-100 Hz) con el procesamiento sensorial, la cognición, la memoria y la atención (Ibarra-Lecue et al., 2022).

Las alteraciones de las oscilaciones cerebrales pueden perjudicar considerablemente procesos cognitivos como la memoria, la atención y la percepción, que dependen de la coordinación de la actividad neuronal en distintas regiones del cerebro. Por lo tanto, anomalías de estos ritmos se han asociado a diversos trastornos neurológicos y psiquiátricos (Mably and Colgin, 2018).

1.5.1. Oscilaciones gamma

Las oscilaciones gamma presentes en el hipocampo se asocian principalmente a funciones relacionadas con la codificación y la evocación de la memoria (Buzsáki, 2015; Carr et al., 2012; Colgin, 2016). De hecho, el deterioro cognitivo y los déficits en la memoria asociados al envejecimiento y a enfermedades neurodegenerativas como la EA, donde el hipocampo es la estructura más afectada, se han correlacionado

con alteraciones en la actividad de estas oscilaciones (Guan et al., 2022; Mably and Colgin, 2018; Murty et al., 2020). Se ha reportado que estos cambios ocurren en etapas tempranas de la EA, con alteraciones en la corteza entorrinal (Klein et al., 2016) y una reducción de la actividad gamma lenta (25-50 Hz) en el área CA1 del hipocampo, lo que puede contribuir a la disfunción de la memoria (Goutagny et al., 2013; Mably et al., 2017). Estos cambios se han observado incluso antes de la formación de placas amiloides, lo que sugiere que las alteraciones en las oscilaciones gamma podrían representar un biomarcador temprano de esta patología (Goutagny et al., 2013; Mably and Colgin, 2018).

Durante la última década, la estimulación sensorial en frecuencia gamma (~40 Hz) ha surgido como una terapia no invasiva para el tratamiento de la EA (Blanco-Duque et al., 2024). Un trabajo pionero observó que la estimulación optogenética de interneuronas PV+ (pero no neuronas glutamatérgicas) a 40 Hz promueve un aumento de la potencia de gamma en el LFP de CA1, una disminución en los niveles del péptido beta amiloide (Aβ) y una mayor activación y colocalización de la microglía con las placas de Aβ (Iaccarino et al., 2016). A su vez, encontraron que la estimulación visual a 40 Hz, pero no a otras frecuencias (20, 80 o aleatoria), potencia la actividad gamma, mejora las respuestas inflamatorias y reduce los niveles de Aβ en la corteza visual de ratones 5XFAD y APP/PS1 (modelos de EA) luego de una hora de exposición (Iaccarino et al., 2016). Esta reducción del péptido se atribuyó a una modificación de la microglía en respuesta al tratamiento, presentando un estado activado con mayor capacidad fagocítica (Iaccarino et al., 2016). Utilizando otro modelo de neurodegeneración (CK-p25) Adaikkan y col. observaron que los animales expuestos a una estimulación visual a 40 Hz por 42 días presentaban una mejor performance en el Morris Water Maze, una prueba que evalúa el aprendizaje y la memoria espacial dependientes del hipocampo (Adaikkan et al., 2019).

Otros estudios utilizando los modelos de EA 5XFAD y P301S encontraron que la estimulación auditiva a 40 Hz induce efectos comparables en la corteza auditiva y el hipocampo, presentando además mejoras en la memoria espacial y una reducción de la acumulación de Aβ y la fosforilación de Tau en estas regiones (Martorell et al., 2019). Más aún, trabajos posteriores mostraron que, al realizar una estimulación visual y auditiva conjunta, los efectos neuroprotectores se extienden a otras regiones del cerebro, como la corteza prefrontal medial y la neocorteza, sugiriendo un efecto sinérgico de estas modalidades de estimulación (Martorell et al., 2019). Estudios

recientes han contribuido a la comprensión de los efectos de este tratamiento, mostrando que la depuración de Aβ podría estar mediada por un aumento en la actividad del sistema glinfático (Murdock et al., 2024). La seguridad, accesibilidad y simplicidad de este tratamiento ha impulsado la realización de ensayos clínicos para evaluar su eficacia en diversas patologías (Blanco-Duque et al., 2024). Sin embargo, gran parte de los mecanismos subyacentes son aún desconocidos.

Dado que la estimulación audiovisual a 40 Hz aumenta la actividad eléctrica en diversas áreas cerebrales y promueve mejoras cognitivas, planteamos la posibilidad de que pueda desempeñar un papel clave en la plasticidad cerebral general. La neurogénesis en el hipocampo envejecido es altamente sensible a la actividad neuronal, lo que la convierte en un modelo óptimo para explorar los efectos de esta terapia sobre la plasticidad. En esta tesis se abordará el estudio de los efectos de la estimulación audiovisual a 40 Hz sobre las neuronas nacidas en animales de mediana edad.

2. Hipótesis y objetivos

2.1. Hipótesis

Durante el envejecimiento fisiológico, la proliferación de progenitores neurales, la diferenciación a linaje neuronal y la supervivencia de las neuronas nuevas sufre una marcada disminución (Burke and Barnes, 2010; Kempermann et al., 1998b; Kuhn et al., 1996; Morgenstern et al., 2008). A su vez, las neuronas que se generan presentan un desarrollo morfofuncional enlentecido (Trinchero et al., 2017).

La actividad hipocampal se encuentra altamente relacionada con la velocidad de maduración de las nuevas CGs. Estímulos fisiológicos que activan el hipocampo, como el ejercicio voluntario o el enriquecimiento ambiental, aceleran la maduración neuronal tanto en ratones jóvenes de dos meses como en ratones envejecidos de ocho meses (Alvarez et al., 2016; Bergami et al., 2015; Trinchero et al., 2017).

La estimulación sensorial en frecuencia gamma (~40 Hz) ha surgido recientemente como una terapia no invasiva para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, donde el hipocampo es la estructura más afectada (Blanco-Duque et al., 2024). Estudios realizados en modelos murinos de esta patología reportaron una disminución en los niveles de Aβ en diferentes regiones cerebrales, incluyendo el hipocampo; un aumento en la activación de la microglía y su potencial fagocítico; y un mejor rendimiento cognitivo de los animales tratados en tareas de aprendizaje y memoria espacial (Adaikkan et al., 2019; Iaccarino et al., 2016; Martorell et al., 2019). Más aún, se observó un aumento en la actividad eléctrica de las regiones estudiadas en respuesta a la estimulación (Adaikkan et al., 2019).

Este tratamiento posee un potencial aún no estudiado para promover la remodelación de circuitos a través de cambios plásticos dependientes de actividad, que podrían incluso subyacer a las mejoras observadas en el rendimiento cognitivo. Dado que la neurogénesis en el hipocampo envejecido ha mostrado ser particularmente sensible a la actividad, cabe preguntarse si las CGs nuevas podrían actuar como sensores para estudiar los efectos de este tratamiento sobre la plasticidad hipocampal. Proponemos como hipótesis de trabajo:

La estimulación sensorial a 40 Hz genera cambios plásticos dependientes de actividad detectables por CGs nacidas en el hipocampo envejecido

2.2. Objetivos

2.2.1. Objetivo general

Investigar los efectos de la estimulación sensorial a 40 Hz en las CGs nacidas en animales envejecidos.

2.2.2. Objetivos específicos

1. Estudiar el impacto de la estimulación sensorial a 40 Hz en la actividad eléctrica del giro dentado en animales envejecidos sanos.

2. Analizar los efectos de la estimulación audiovisual a 40 Hz en la maduración e integración de las neuronas nacidas en ratones de 2 y 8M.

3. Interrogar los efectos individuales de las modalidades sensoriales auditiva y visual sobre el desarrollo de neuronas nacidas en animales de mediana edad.

4. Evaluar posibles mecanismos subyacentes a la estimulación sensorial gamma activados por estímulos fisiológicos previamente estudiados.

5. Evaluar el rendimiento cognitivo de animales envejecidos sanos expuestos a la estimulación audiovisual a 40 Hz en tareas de memoria.

3. Materiales y métodos

3.1. Animales

Para realizar esta tesis se utilizaron ratones C57BL/6 *wild type* de 2, 8 y 11 meses (2M, 8M y 11M) y ratones genéticamente modificados de 8M de ambos sexos, alojados en jaulas grupales de 4-5 animales con agua y comida *ad libitum*. Teniendo en cuenta las distintas etapas en la vida de un ratón, se consideraron ratones jóvenes a aquellos de 2M y ratones de mediana edad a aquellos de 8M y 11M. Se seleccionaron animales de mediana edad debido a que a edades más avanzadas la tasa neurogénica disminuye considerablemente, dificultando el estudio de las nuevas CGs (Morgenstern et al., 2008; Trinchero et al., 2017).

Los animales transgénicos fueron generados cruzando ratones Ascl1^{CreERT2} (Ascl1$^{tm1(Cre/ERT2)Jejo}$/J) (Kim et al., 2007) con CAG^{floxStoptdTomato} (Ai14) [B6;129S6-Gt(ROSA)26Sor$^{tm14(CAG–tdTomato)Hze}$/J], una línea reportera condicional (Madisen et al., 2010), para generar ratones Ascl1^{CreERT2};CAG^{floxStopTomato}. El gen Ascl1 (Achaete-Scute Family BHLH Transcription Factor 1) es un factor de transcripción clave en la diferenciación neuronal, expresado principalmente en progenitores comprometidos con el linaje neuronal (Kim et al., 2011). En este transgénico, el gen endógeno de Ascl1 es reemplazado en uno de sus alelos (salvo su promotor y regiones regulatorias) por la secuencia codificante para una proteína de fusión, conformada por la recombinasa Cre y una versión mutante del receptor de estrógenos humano (ERT2). Este receptor no se une a su ligando natural en concentraciones fisiológicas, pero es activado por ligandos sintéticos como el tamoxifeno. La proteína Cre-ERT2 se expresa únicamente en los progenitores Ascl1^{+} y permanece en el citoplasma hasta que se une al tamoxifeno, lo que permite su translocación al núcleo. El locus Rosa26 es un sitio ubicuo utilizado ampliamente para la inserción y expresión de genes de interés. En este locus, los animales Ascl1^{CreERT2};CAG^{floxStopTomato} poseen un promotor constitutivo fuerte (CAG) seguido por una secuencia Stop (flanqueada por sitios loxP) río arriba de la secuencia codificante para la proteína fluorescente roja *tdTomato* (Tom). La inyección de tamoxifeno permite el ingreso de la Cre-ERT2 al núcleo y la recombinación inducida por esta enzima elimina los sitios loxP y permite la expresión de Tom a lo largo de todo el desarrollo neuronal (Yang et al., 2015). Este transgénico ofrece la ventaja de marcar un mayor número de neuronas, lo que resulta

útil para experimentos de electrofisiología en los que, debido a la complejidad de la técnica, se requieren más unidades de análisis. Todas las líneas genéticamente modificadas se mantuvieron en la cepa C57Bl6/J.

El ejercicio voluntario modula la tasa neurogénica mediante el aumento en la proliferación de células progenitoras neurales (Marlatt et al., 2012; van Praag et al., 1999; van Praag et al., 2005). Tres días antes de la inyección con tamoxifeno, BrdU o retrovirus, los ratones fueron provistos de una rueda cada dos animales para maximizar el número de células marcadas.

Todos los animales utilizados en este trabajo fueron criados y mantenidos en el bioterio de la Fundación Instituto Leloir en conjunto con el personal de esta área. Se respetaron los protocolos experimentales aprobados por el Comité Institucional del Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) del Instituto Leloir, y las reglas Internacionales para la Investigación Biomédica involucrando animales de laboratorio.

3.2. Marcado neuronal por BrdU

Para evaluar los efectos de AuViS en la proliferación celular, se utilizaron ratones C57BL/6 salvajes de 11M. Los animales fueron expuestos a AuViS a una frecuencia de 40 Hz durante un mes o mantenidos en condiciones de control. Posteriormente, se les administró una solución de bromodeoxiuridina (BrdU, Sigma-Aldrich) disuelta en NaCl 0.9%, a una dosis de 50µg/g por vía intraperitoneal. Las inyecciones se realizaron dos veces al día, con un intervalo de 8 horas, durante tres días consecutivos para marcar las células en división. Los animales fueron sacrificados al día 21, considerando el día de la primera inyección como día 0 del inicio del desarrollo neuronal.

3.3. Producción de vectores retrovirales

Se utilizó un vector retroviral no replicativo derivado del *Moloney murine leukemia virus* (MMLV), codificante para la proteína fluorescente verde (GFP) bajo un promotor constitutivo fuerte (CAG). Este vector sólo es capaz de integrarse al genoma de células en división, ya que únicamente puede ingresar al núcleo cuando la membrana

nuclear se fragmenta durante la mitosis debido a su tamaño (Laplagne et al., 2006; Lewis and Emerman, 1994; van Praag et al., 2002). De esta manera, sólo se transducen progenitores que se encuentran proliferando al momento de la inyección del virus y su progenie queda marcada indeleblemente. Esta herramienta permite estudiar la morfología de neuronas nuevas a diferentes tiempos post inyección retroviral.

3.4. Cirugía estereotáxica

Para marcar cohortes neuronales nuevas en animales salvajes, se inyectó un RV-GFP en el giro dentado del hipocampo derecho mediante una cirugía estereotáxica. Para la intervención, los ratones fueron anestesiados por vía intraperitoneal con una mezcla de 150 µg de ketamina y 15 µg de xilacina en 10 µl de solución salina por gramo de peso corporal. Una vez anestesiado, cada animal se colocó en el aparato estereotáxico (Stoelting), donde se inmovilizó su cráneo y bajo lupa se marcaron las coordenadas para realizar la inyección. Las coordenadas fueron tomadas desde el Bregma según lo indicado por el atlas del cerebro de ratón (Paxinos and Franklin, 2001): -2 mm antero-posterior, -1.5 mm lateral, -1.9 mm ventral. En la coordenada marcada se desgastó el hueso craneal con un torno y se levantó la capa ósea restante realizando un troquelado con una aguja fina, logrando no dañar la corteza ni retirar la duramadre. Se administró 1 µl (2M) o 1.5 µl (8M) de virus durante 10 minutos mediante un microcapilar calibrado (Drummond Scientific, Broomall, PA) estirado con calor utilizando un puller. Luego de la inyección, la piel de la cabeza del animal se cerró utilizando un adhesivo ultrarrápido con base de cianoacrilato (“La Gotita”). En todos los casos se monitoreó la recuperación adecuada de los animales luego de la cirugía.

3.5. Estimulación

3.5.1. Protocolo de estimulación visual

Para realizar la estimulación visual, se utilizaron LEDs blancos con una combinación de longitudes de onda visibles (390-700 nm) y una temperatura de color correlacionada (CCT) de 4000 K, a intensidades entre 100 y 480 lux. Luego de la

inyección estereotáxica los animales del grupo tratado fueron trasladados a la sala de estimulación y colocados en una jaula estándar con tres lados cubiertos con plástico negro y un lado transparente orientado hacia una tira de LEDs. Esta configuración se utilizó para garantizar que los LEDs fueran la principal fuente de luz y para separar visualmente a los animales (Figura 9). Los ratones fueron expuestos a una de dos condiciones de estimulación: estimulación de 8 Hz o 40 Hz (ciclo de trabajo del 50 %) durante 4 horas/día durante 17 días. El estímulo consistió en 4 horas de estimulación separadas por 2,5 horas de oscuridad y se repitió todas las noches a la misma hora (de 20:00 a 7:30), durante el periodo de mayor actividad de los animales. Los niveles de intensidad de luz se establecieron en ~480 lux en el lado más cercano a los LEDs para todos los experimentos, como se reportó anteriormente (Singer et al., 2018). Los animales del grupo control se mantuvieron en un rack de jaulas estándar.

3.5.2. Protocolo de estimulación auditiva

Los animales del grupo tratado fueron estimulados en la misma sala y colocados en el mismo tipo de jaula utilizada para la estimulación visual. Para este protocolo, los LEDs se desconectaron y se colocaron dos altavoces (Genius, SP-HF500A) entre las jaulas (Figura 9). Los animales fueron expuestos a tonos (10 kHz, 1 ms, 60 dB) a 40 Hz 4 horas/día durante 17 días (Singer et al., 2018).

3.5.3. Protocolo de estimulación audiovisual

Los animales fueron colocados en el mismo tipo de jaula preparada para la estimulación y expuestos a los trenes de estímulos visuales y auditivos de forma simultánea. Se realizó una de dos estimulaciones: 40 Hz (AuViS) o Aleatoria (ciclo de trabajo del 50% a intervalos aleatorios), 4 horas/día durante 17 días. Para evaluar la expresión de *Arc*, un *immediate early gene* regulado por actividad, los animales fueron expuestos a AuViS durante una ventana aguda de 2 horas y sacrificados 1 hora después (Figura 13). En los experimentos con registros electrofisiológicos los ratones fueron expuestos a AuViS 4 horas/día durante 17 o 24 días (Figuras 24 y 25). Para evaluar los efectos de AuViS en CGs nacidas en animales jóvenes, ratones de 2M fueron expuestos a 4 horas/día de AuViS durante 7, 14 o 21 días (Figura 18). Por

último, para evaluar los efectos de este tratamiento en la proliferación y diferenciación celular, ratones de 11M fueron expuestos a AuViS durante 1 mes antes de la administración de BrdU o 1 mes antes y 21 días después de la inyección (Figura 30).

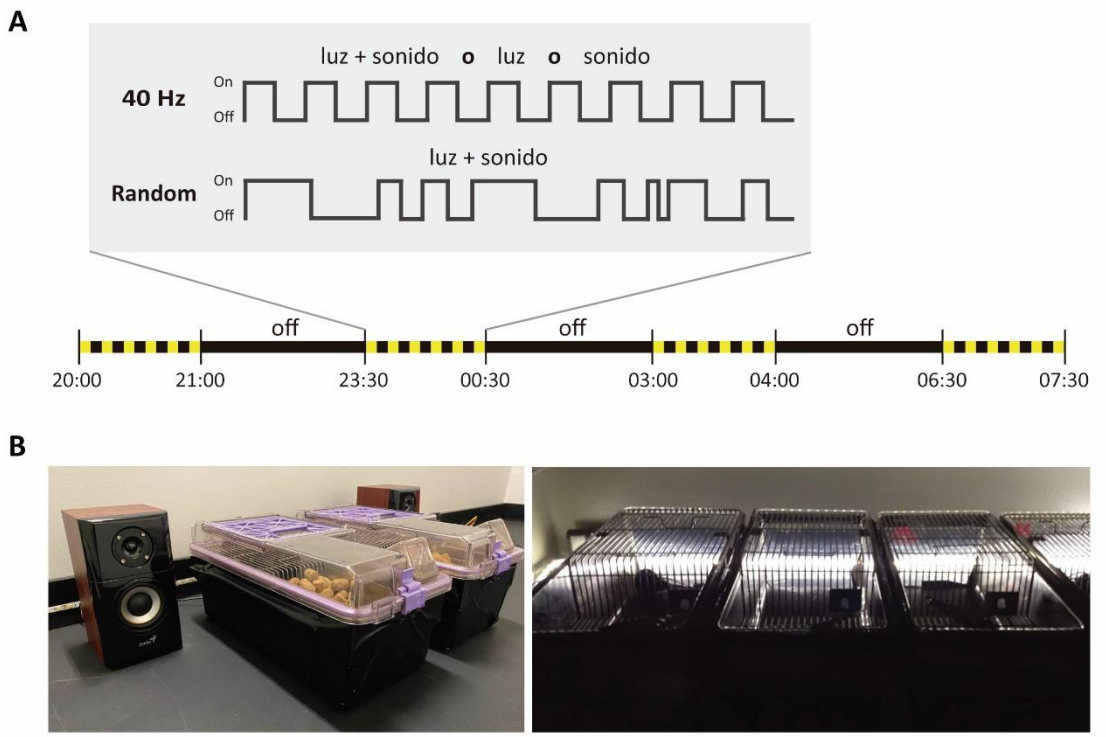

Figura 9. Protocolo y sala de estimulación. (A) Representación esquemática de los patrones de estimulación a 40 Hz y Aleatoria. Los estímulos consisten en luces intermitentes sincrónicas (4000 K, ciclo de trabajo del 50%, 480 lux) y tonos (10 kHz, 1 ms, 60 dB), suministrados en cuatro intervalos de 1 hora separados por 2,5 horas de oscuridad y repetidos diariamente durante los periodos indicados. (B) El setup de estimulación está compuesto por tiras de luces LED montadas a lo largo de una pared y dos altavoces colocados a la izquierda y derecha de las jaulas. El lado transparente de la jaula se orienta hacia las luces LED. Un Arduino (no se muestra) regula los estímulos de luz y sonido.

3.6. Electrofisiología in vivo

3.6.1. Drives

Los tetrodos (~25-µm de diámetro) fueron construidos a partir de cuatro hebras de alambre de tungsteno (99,95% de tungsteno, 12,5 µm de diámetro, California Fine Wire Company, USA), unidos entre sí por la torsión y fusión de su aislamiento con aire caliente (aproximadamente 110°C). Se cargaron cinco tetrodos, se pegaron en un conjunto anidado de tubos de acero inoxidable y se montaron en el *microdrive*

(Axona Limited, UK). Los tetrodos salieron del microdrive a través de una cánula guía en una disposición aproximadamente rectangular (espaciado aproximado 400 µm) y cada tetrodo se podía mover independientemente a través de un tornillo de accionamiento (160 µm por vuelta). Cada tetrodo se cortó plano y su punta fue chapada en oro (solución de chapado en oro, Neuralynx, MT, USA) para reducir la impedancia de 1 KHz de los cables individuales a 0.2-0.4 MOhm (Nano Z, White Matter, WA, USA).

3.6.2. Cirugía

Las cirugías para implantar los drives crónicamente se realizaron bajo anestesia (150 µg de ketamina/15 µg de xilazina en 10 µl de solución salina/g). Se hizo una abertura circular (aproximadamente 1 mm de diámetro) en el cráneo, por encima del hipocampo dorsal derecho. El centro de la craneotomía se encontró a 1,5 mm laterales a la línea media y 2 mm posteriores al bregma. Después, se insertaron 7 tornillos de joyería en los agujeros perforados en el cráneo alrededor de la craneotomía. Después de la extracción de la duramadre, las puntas del tetrodo se bajaron 1 mm por debajo de la superficie del cerebro. La craneotomía se rellenó con un gel transparente biocompatible Neuroseal obtenido combinando partes iguales de alginato de sodio al 0,5 % y cloruro de calcio al 10 %, ambos previamente disueltos en agua destilada y almacenados por separado. El cráneo, los tornillos y la base de los opto-microdrives fueron entonces cubiertos con acrílico auto-cristal (cemento dental). Después de la cirugía, los animales se recuperaron durante 3-5 días.

3.6.3. Bajada de tetrodos

Durante un período de 2 a 3 semanas después de la recuperación de la cirugía, los tetrodos se bajaron progresivamente hacia sus subcampos target en el hipocampo. Los *dentate spikes* y la actividad de las células granulares, visualizadas con Cheetah (Neuralynx, Inc., MT, USA), fueron las principales guías para posicionar los electrodos en la capa granular del giro dentado.

3.6.4. Registros

Los ratones se conectaron al cable de registro y fueron colocados en una jaula con una malla de alambre alrededor para asegurar que la luz pasara a la vez que servía como jaula de Faraday. Los LEDs se distribuyeron alrededor de la jaula por fuera de la malla y se prendieron según la condición deseada a través de una placa Arduino que controla la entrada de energía a los LEDs a través de un transistor MOSFET.

3.6.5. Análisis del potencial local de campo

Todos los análisis se realizaron utilizando scripts de MATLAB. Los componentes de la *wavelet* se obtuvieron utilizando las *wavelets* de Morlet (sigma: 5, bound: 3.5). Las densidades espectrales de potencia (PSD) se obtuvieron utilizando la función pwelch().

Para comparar la PSD a 40 Hz entre dos sesiones de 5 minutos, ambas sesiones se dividieron en ventanas no superpuestas de 10 segundos y se obtuvo la PSD a 40 Hz para cada ventana. La distribución de las PSD para ambos grupos de ventanas se comparó utilizando una prueba de Mann-Whitney.

3.6.6. Perfusión y obtención de imágenes

Los electrodos no se movieron al finalizar los registros. Los animales fueron inyectados intraperitonealmente con anestesia compuesta por ketamina y xilazina, para luego realizarles una perfusión intracardíaca con 100 ml de solución salina heparinizada y, posteriormente, con 100 ml de paraformaldehído al 4 %. Tres horas después de la perfusión, los tetrodos se retiraron y el cerebro se almacenó en paraformaldehído al 4% durante la noche. Al día siguiente, el cerebro se colocó en una solución de sacarosa al 30% hasta que precipitó (aproximadamente 48 horas). Se realizaron cortes coronales (40 µm) con un micrótomo (Leica, Alemania) y las secciones del hipocampo dorsal se montaron en portaobjetos de vidrio. Tras un secado de unos 20 minutos, se cubrieron con un medio de montaje PVA-DABCO y un cubreobjetos. Se utilizó el microscopio de fluorescencia Zeiss Axio Examiner.D1 para obtener imágenes digitalizadas.

3.7. Perfusión

Para la obtención de los cerebros, los animales fueron anestesiados por vía intraperitoneal con una mezcla de 150 µg de ketamina y 15 µg de xilacina por gramo de peso corporal. Luego de constatar la ausencia de reflejos visibles, se realizó una perfusión cardiaca a través del ventrículo izquierdo durante 20 minutos a un flujo de 6 ml/min. Durante los primeros 5 minutos se infundieron 50 ml de solución fisiológica con heparina (2.5 U/ml) con el propósito de limpiar los capilares sanguíneos. Luego, durante los 15 minutos restantes, se infundieron 100 ml de parafolmaldehído (PFA) 4% en buffer fosfato (PB) 0.1 M (pH 7.2) para fijar los tejidos. Al finalizar la perfusión, los cerebros extraídos y mantenidos en PFA a 4°C hasta el día siguiente. Posteriormente fueron transferidos a una solución de sacarosa al 30% con PB 0.1 para su deshidratación, y se mantuvieron a 4°C hasta que descendieron al fondo del recipiente. Se obtuvieron secciones coronales de 60 µm utilizando un micrótomo de deslizamiento Leica y las rodajas obtenidas se mantuvieron a -20°C en solución criopreservadora (3 volúmenes de glicerol, 3 volúmenes de etilenglicol y 4 volúmenes de PB 0.2 M) hasta el momento de realizar las inmunofluorescencias.

3.8. Inmunofluorescencia

Para visualizar las neuronas marcadas se realizaron tinciones en secciones coronales de 60 µm provenientes del polo septal del hipocampo. Se utilizó la técnica de *free-floating* en rodajas libres en solución, donde se incubaron con anticuerpos en una solución de bloqueo (solución salina tris-tamponada (TBS) con 3% de suero de burro y 0,25% de Tritón X-100). Se realizó una inmunofluorescencia de marcaje simple o doble utilizando los siguientes anticuerpos primarios: GFP (policlonal de conejo; 1:500; Invitrogen), GFP (policlonal de pollo; 1:500; Aves), Arc (policlonal de conejo; 1:500; Synaptic Systems), NeuN (ratón monoclonal; 1:50; proveniente del laboratorio de F.H. Gage, Salk Institute for Biological Studies, La Jolla, CA), S100β (conejo monoclonal; 1:500; abcam), BrdU (rata monoclonal; 1: 250; Abcam), RFP (conejo policlonal; 1:500; Rockland Immunochemicals) y RFP (cabra policlonal; 1:500; Rockland Immunochemicals). Se utilizaron los siguientes anticuerpos secundarios

correspondientes: burro anti-conejo Cy3, burro anti-conejo Cy5, burro anti-ratón Cy5, burro anti-cabra Cy3 y burro anti-pollo Cy2 (1:250; Jackson ImmunoResearch Laboratories). Para la detección de BrdU, el ADN se desnaturalizó con 50% de formamida en un buffer SSC 2X a 65 °C durante 1 hora, se lavó dos veces en SSC 2X durante 10 min, se incubó en HCl 2N a 37 °C durante 30 min y se lavó en ácido bórico 0,1 M, pH 8,5, durante 10 min. Luego se siguieron los pasos del protocolo estándar. En el análisis se incluyeron solo las CGs del giro dentado septal correspondientes a secciones localizadas entre -0,96 y -2,30 mm desde el bregma, según el atlas de cerebro de ratón (Paxinos and Franklin, 2001).

3.9. Disecciones de hipocampo e hibridación in situ de ARN

Para el experimento de la figura 29 los animales fueron expuestos a ejercicio voluntario o AuViS durante 17 días. Luego fueron anestesiados como se detalló y los cerebros fueron colocados en una solución salina de Earl (EBSS, en mM: 117 NaCl, 5,4 KCl, 1 NaH2PO4, 26 NaHCO3, 5.6 glucosa, 1.8 CaCl2.2H2O y 0.8 MgSO4) helada, suplementada con trehalosa 5% v/v y ácido kinurénico (0.8 mM) (Hagihara et al., 2009). La solución de disección se equilibró en 95%O_2/5%CO_2 antes de su uso. En primer lugar, se cortaron y descartaron las regiones cerebrales posteriores al lambda, un punto de referencia anatómico utilizado para delimitar estructuras en la superficie dorsal del cerebro, alineado con la intersección de las suturas lambdoidea y sagital en el cráneo. Posteriormente, el cerebro fue cortado a lo largo de la fisura longitudinal y se colocó un hemisferio en solución de disección para trabajar sobre el restante. Se posicionó el hemisferio a disectar sobre la parte lateral bajo la lupa, y tras retirar el diencéfalo, el tejido se inmovilizó en una placa de Petri con agarosa exponiendo la cara medial del hipocampo (Figura 10A,B). Para su aislamiento, se utilizó una aguja de 25G con el bisel hacia arriba, deslizándola a lo largo de los límites del eje septotemporal del hipocampo (Figura 10C). Una vez aislado, el tejido se embebió en un bloque de OCT y se congeló sobre hielo seco para luego almacenarlo a -80 °C. Posteriormente, se recuperó el hemisferio restante de la solución de disección y se procedió a realizar el mismo procedimiento. Para realizar la hibridación *in situ*, se obtuvieron secciones de 14 µm de espesor en un criostato (Figura 10D,F).

Las secciones se colocaron en un portaobjetos y fueron almacenadas durante 1 h a -20 °C para luego colocarse a -80 °C hasta su uso.

La hibridación fluorescente multiplex de ARN *in situ* se realizó utilizando el RNAscope Fluorescent Multiplex Reagent Kit (Advanced Cell Diagnostics), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En síntesis, las secciones montadas se descongelaron y se fijaron en PFA 4%. Luego se deshidrataron mediante incubaciones secuenciales con etanol, seguidas por 10 min de blanqueo con H_2O_2, y 30 min de tratamiento con proteasa IV. Se utilizó la sonda de hibridación (Advanced Cell Diagnostics, N° de catálogo): 424821-C2 (*Bdnf*). Se realizó una incubación durante 2 h a 40 °C, seguida de los pasos de amplificación según el protocolo. Se utilizó DAPI para contratinción y el tejido se montó con gerbatol para evitar el fotoblanqueo de los fluoróforos (Figura 10G).

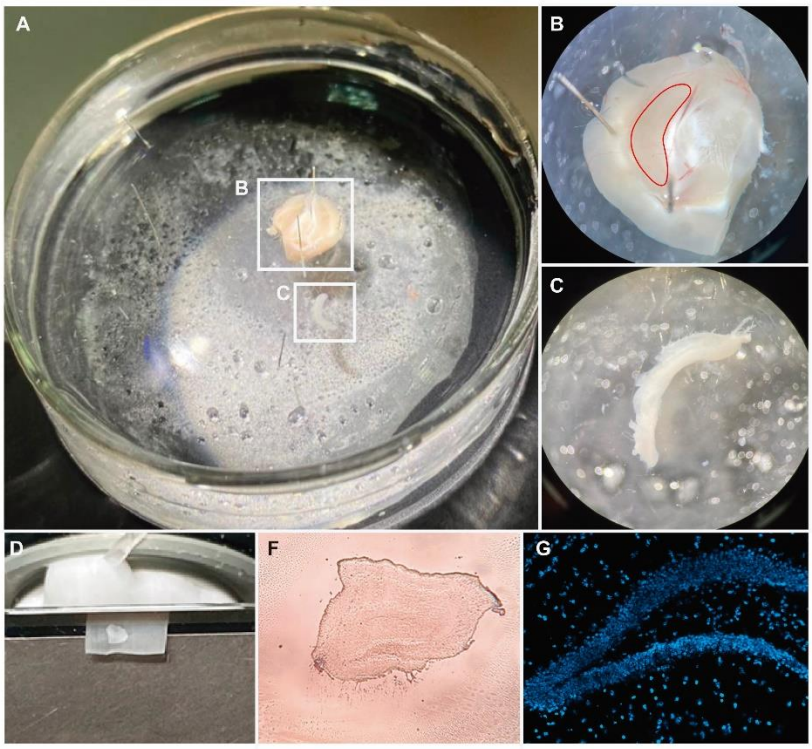

Figura 10. Disección de hipocampo murino. (A) Vista lateral de la cara medial del hipocampo en un hemisferio cerebral. (B) En rojo se encuentra delimitada la región de corte para aislar el hipocampo. (C) Hipocampo disectado. (D) Corte transversal en crióstato del hipocampo embebido en OCT. (F) Verificación de la disección a través de lupa. (G) Verificación de la disección a través de tinción con DAPI.

3.10. Microscopía y análisis de imágenes

Las imágenes analizadas en este trabajo fueron obtenidas con los microscopios confocales Zeiss LSM 510 Meta y Zeiss LSM 880 (Zeiss, Jena, Germany) y el microscopio de fluorescencia Axio Examiner.D1 (Zeiss, Germany).

Para el análisis de la expresión de Arc se adquirieron imágenes en el microscopio de fluorescencia y se evaluó la colocalización con NeuN en Z stacks utilizando múltiples planos para cada célula. Luego se calculó la proporción de células NeuN/Arc$^+$ en las diferentes subcapas de la capa granular relativizando la densidad de células Arc$^+$ a la de células NeuN$^+$ (en µm) de toda la capa. Por último, se graficó la expresión de Arc cada 100 neuronas granulares dividiendo la capa en 4 secciones: ZSG, CGL1, CGL2 y CGL3 (Espósito et al., 2005).

Para la cuantificación de la longitud de árbol dendrítico se tomaron imágenes en planos ópticos de 1 µm (40X, objetivo de inmersión en aceite, NA 1.3) a partir de secciones de 60 µm de espesor. Se obtuvieron Z stacks de 35-50 cortes ópticos, unidad airy = 1, a intervalos de 0,8 µm (Trinchero et al., 2017). Los árboles dendríticos se analizaron a partir de proyecciones de neuronas marcadas con GFP a partir de los Z stacks en un plano único utilizando el programa LSM Image Browser.

Para el análisis de los BFM en la región de CA3 se obtuvieron imágenes con un intervalo de 0.4 µm (63X, objetivo de inmersión en aceite, NA 1.4) y un zoom digital de 6. El área y el número de extensiones filopodiales de los botones fueron analizados utilizando proyecciones de los Z stacks en un plano único. Sólo se cuantificaron botones que cumplían con los siguientes criterios: (i) el diámetro del botón era 3 veces más grande que el diámetro del axón, (ii) el botón estaba conectado a la fibra musgosa en al menos un extremo (Toni et al., 2008). Las extensiones filopodiales se identificaron como protrusiones de los botones (1 µm < longitud < 20 µm; (Acsady et al., 1998)) y fueron cuantificadas por separado para cada botón.

En los análisis fueron incluidas únicamente las células marcadas con GFP que se localizaban en la zona subgranular y en la capa granular. Todo el análisis de imágenes se realizó utilizando el software Zeiss LSM Image Browser.

Para los experimentos de RNAscope, se adquirieron imágenes de cortes de hipocampo de 14 µm de grosor en un microscopio confocal Zeiss LSM 880 (Zeiss,

Jena, Germany). La cuantificación del área de puntos se realizó en ImageJ/Fiji aplicando el umbral de Otsu sugerido por el fabricante (Advanced cell diagnostics).

Todos los grupos experimentales fueron desconocidos para el operador a la hora de analizar las muestras.

3.11. Electrofisiología ex vivo

3.11.1. Preparación de cortes agudos de hipocampo

Ratones Ascl1^{CreERT2};CAG^{floxStopTomato} de 8M fueron inducidos con tamoxifeno por vía intraperitoneal una vez al día durante 3 días (dosis de 120 mg/kg). Luego fueron anestesiados y se prepararon rodajas transversales a 17 y 24 días post inducción (Alvarez et al., 2016; Trinchero et al., 2017). Brevemente, los cerebros fueron removidos y colocados en una solución fría de composición (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^+-piruvato y 4 ácido kinurénico. Se prepararon rodajas coronales de 400 µm de espesor del polo septal conteniendo ambos hipocampos utilizando un vibrátomo Leica VT1200S, y fueron transferidas a una cámara conteniendo una solución de líquido cefalorraquídeo artificial (ACSF) de composición (mM): 125 NaCl, 2.5 KCl, 2 NaH_2PO_4, 25 $NaHCO_3$, 2 $CaCl_2$, 1.3 $MgCl_2$, 1.3 Na^+-ascorbato, 3.1 Na^+-piruvato y 10 dextrosa (315 mOsm). Las rodajas fueron burbujeadas con carbógeno (95% de 0_2/5% CO_2) y se mantuvieron a 30°C durante 1 hora antes del inicio del experimento. Para los registros se utilizó un sistema de perfusión de ACSF burbujeada con carbógeno a temperatura ambiente para mantener el tejido. A su vez, se utilizó un microscopio de contraste de interferencia diferencial (DIC) Olympus BX61WI acoplado a una cámara digital para observar las rodajas.

3.11.2. Registros

Para los registros en configuración *whole-cell* se utilizaron microelectrodos (6-9 MΩ) estirados de vidrio de borosilicato (KG-33, King Precision) llenos con (en mM): 150 K-gluconato, 1 NaCl, 4 $MgCl_2$, 0.1 EGTA, 10 HEPES, 4 ATP-Tris, 0.3 GTP-Tris, y 10 fosfocreatina. El criterio para elegir las células a analizar fue la confirmación visual de Tom en la pipeta, la sujeción del soma marcado a la pipeta cuando se ejerció la

succión y la corriente de fuga absoluta <100 pA al potencial de membrana seleccionado. Las corrientes postsinápticas excitatorias espontáneas (sEPSCs) fueron registradas en configuración *voltage clamp* a -70 mV. La resistencia de entrada fue determinada mediante la aplicación de pulsos de voltaje de 10 mV en configuración *voltage clamp* y los disparos fueron evocados mediante la inyección de pulsos de corriente (10 pA) en configuración *current clamp* luego de llevar el potencial de membrana a -70 mV. Todos los registros fueron realizados a temperatura ambiente (23±2ºC) y obtenidos mediante el amplificador Multiclamp700B (Molecular Devices), digitalizados mediante una tarjeta Digidata 1440A (Molecular Devices) y adquiridos a 10 kHz en una computadora personal. La detección y el análisis de los sEPSCs se realizó con un paquete de software específico.

3.12. Pruebas conductuales

Se utilizaron ratones de 8M alojados en jaulas de dos individuos. El grupo tratado con AuViS se colocó en las jaulas preparadas para tal fin y se mantuvo en la sala de estimulación durante todo el experimento. Previo a los test se realizó una habituación de los animales al operador mediante una manipulación diaria. Todos los tests conductuales se realizaron durante el ciclo de luz y se llevaron a cabo en una sala de comportamiento con luz ambiente tenue. Los animales se aclimataron a la sala al menos 30 minutos antes del test. Se utilizó una caja cuadrada de plástico de 40x40 cm con paredes opacas blancas. Todos los objetos utilizados se limpiaron con etanol al 10% entre pruebas y con etanol al 70% al inicio y final del día. Las pruebas fueron grabadas con una cámara modelo V-U0040 Logitech Co. (adquisición a 90 FPS y 4096x2160 píxeles). Los videos obtenidos se analizaron posteriormente usando el software de comportamiento ANY-maze (v.7.09 Stoelting Co., Wood Dale, IL, EE.UU.).

3.12.1. Open field

Para evaluar el comportamiento exploratorio, la locomoción y la ansiedad en los animales expuestos a la estimulación audiovisual a 40 Hz, se realizó un test de campo abierto u *open field.* Se utilizó una arena cuadrada (40x40 cm con paredes opacas

blancas) donde se consideró el centro como un área de 20 cm² donde se reguló la iluminación para que fuera de 300 lux. La duración del test fue de 10 minutos y se cuantificó la distancia recorrida y el tiempo en el centro y la periferia.

3.12.2. Reconocimiento de objeto novedoso (NOR)

Para la prueba de reconocimiento de objetos nuevos (NOR, por sus siglas en inglés), se utilizaron objetos con forma de torre o columna armados a partir de bloques Lego o huevos Kinder fijados a la plataforma en una posición específica con masilla adhesiva blanca (Figura 11A). Antes de realizar el test, se realizó una calibración de preferencia para estos objetos, y no se observaron diferencias en el tiempo de exploración en ninguno de ellos (datos no mostrados).

Este test consta de tres fases: habituación, entrenamiento y prueba (Figura 11B). En la primera fase (día 1), el animal se colocó en el centro del campo durante 10 minutos para familiarizarse con el mismo, y luego se retiró y se devolvió a su jaula. Al día siguiente, en la etapa de entrenamiento, se colocaron dos objetos idénticos en dos esquinas contrarias de la arena y se permitió que el animal explorara ambos objetos libremente durante 10 minutos. Tras 24 horas se realizó la fase de prueba, en la cual uno de los objetos se reemplazó por otro nuevo, y se permitió que el animal explorara durante 10 minutos (Leger et al., 2013). En la fase de entrenamiento y de test, los animales fueron colocados en una esquina sin objetos al comenzar.

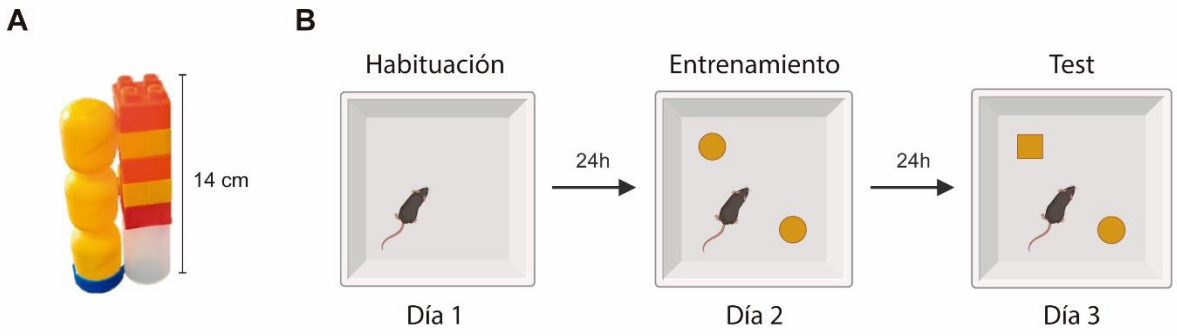

Figura 11. Test de NOR. (A) Objetos utilizados para el test. Los animales no demostraron preferencia por ninguno en las pruebas de calibración. (B) Esquema de las fases del test. En el día uno, el animal se habitúa a la arena y no se colocan objetos. Durante el entrenamiento dos objetos iguales se colocan en dos esquinas contrarias de la arena para que el animal los reconozca. El día del test, uno de los objetos es cambiado por otro nuevo.

Los parámetros evaluados fueron la distancia total recorrida, el tiempo de exploración de cada objeto y el índice de discriminación calculado con la siguiente ecuación:

$$\%\ \boldsymbol{discriminación} = \frac{\boldsymbol{tiempo\ de\ exploración\ en\ la\ zona\ del\ objeto\ nuevo}}{\boldsymbol{tiempo\ de\ exploración\ total}} \times \mathbf{100}$$

El tiempo de exploración se calculó manualmente usando el software ANY-maze como la duración de la interacción del hocico del animal con el objeto dentro de un rango de 1 cm² alrededor del mismo. No se consideraron como tiempo de exploración las instancias en las que el animal trepó sobre el objeto o se acercó al mismo con partes del cuerpo distintas a la cabeza.

3.13. Análisis estadístico

Para el análisis de los datos presentados en esta tesis se utilizó el software GraphPad Prism© 8. La estadística utilizada en cada experimento se encuentra en las leyendas de las figuras y en el texto. A menos que se especifique lo contrario, los datos se presentan como media ± SEM. La normalidad se evaluó mediante los test de Shapiro-Wilk, D'Agostino-Pearson y Kolmogorov-Smirnov, con $p < 0.05$. Cuando los datos cumplieron las pruebas de normalidad, se utilizó un test de t no apareado con corrección de Welch o un ANOVA seguido de un test de Bonferroni. En los casos que no cumplían la normalidad, se utilizaron pruebas no paramétricas como se indica a continuación: Mann-Whitney para comparaciones entre dos grupos y Kruskal-Wallis para comparaciones múltiples. Todas las pruebas estadísticas tuvieron un intervalo de confianza del 95%.

4. Resultados

El hipocampo envejecido presenta una disminución en la producción de neuronas nuevas, junto con un retraso en su desarrollo e integración (Kempermann, 2015; Kuhn et al., 1996; Morgenstern et al., 2008). No obstante, estímulos fisiológicos que aumentan la actividad del hipocampo, como el ejercicio físico voluntario y el enriquecimiento ambiental, poseen la capacidad de acelerar estos procesos (Kempermann et al., 2010; Piatti et al., 2011; Trinchero et al., 2017).

La estimulación sensorial a 40 Hz ha demostrado la capacidad de activar diferentes estructuras cerebrales en modelos murinos de Alzheimer. A su vez, la exposición a tan solo 7 días de dicha estimulación ha resultado en la disminución de placas de Aβ y, por consiguiente la prevención de la muerte neuronal reportada en estos modelos. Esto correlacionó con mejoras en paradigmas de aprendizaje y memoria (Adaikkan et al., 2019; Adaikkan and Tsai, 2020; Iaccarino et al., 2016; Martorell et al., 2019). Sin embargo, los mecanismos plásticos dependientes de actividad necesarios para remodelar circuitos y mejorar los déficits cognitivos característicos del envejecimiento y la EA continúan sin ser estudiados.

Dado que se ha demostrado que el desarrollo de neuronas nacidas en el hipocampo adulto y envejecido está altamente favorecido por la actividad (Alvarez et al., 2016; Piatti et al., 2011; Trinchero et al., 2017; Trinchero et al., 2019a; Trinchero et al., 2019b), el objetivo de este trabajo es utilizar la neurogénesis en animales envejecidos como un sensor para interrogar los efectos de la estimulación sensorial gamma en la plasticidad hipocampal.

4.1. La estimulación visual gamma aumenta la componente de 40 Hz en el potencial de campo del giro dentado

En primer lugar, se evaluó si la estimulación visual (ViS) a 40 Hz puede modular la actividad local en el hipocampo de animales de mediana edad. Para ello, en colaboración con Matías Mugnaini y Emilio Kropff, ratones de 8M fueron implantados con tetrodos dirigidos hacia la capa granular y se realizaron registros de campo (*local field potential* o *LFP*) en ventanas de 5 minutos. En cada registro, los animales fueron

expuestos a ViS a 40 Hz u oscuridad (Ctrl) mientras exploraban libremente una arena (Figura 12A,B).

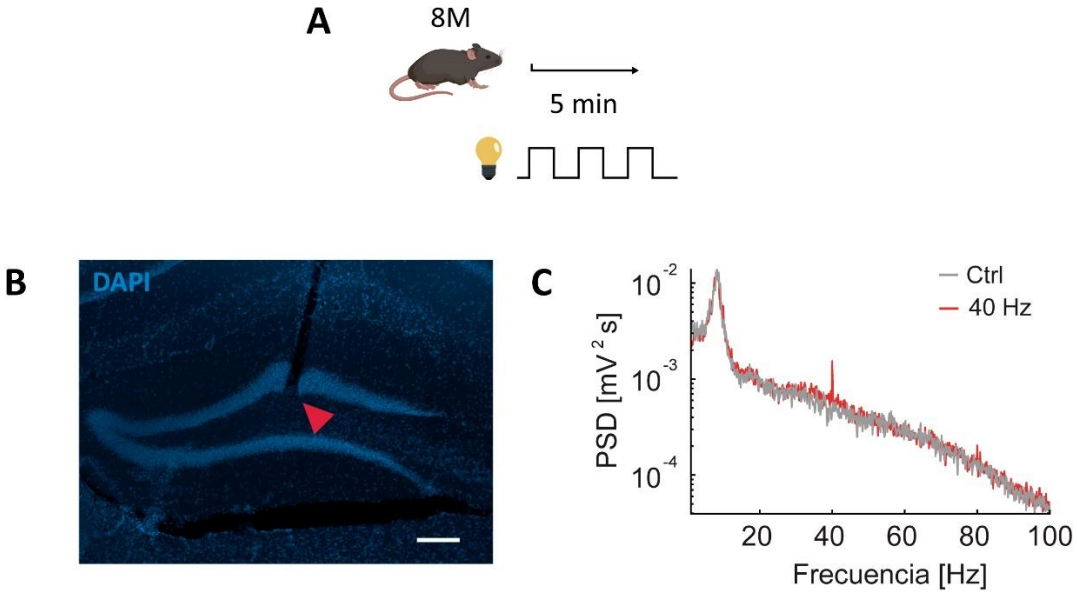

Figura 12. La estimulación visual a 40 Hz modula el potencial de campo local del giro dentado. (A) Diseño experimental. Animales de 8M fueron expuestos a 5 minutos de estimulación visual a 40 Hz u oscuridad. (B) Trazo correspondiente a un tetrodo ubicado en la capa granular, visualizado luego de realizar una tinción nuclear con DAPI (flecha roja: punta del tetrodo). Escala, 50 µm. (C) Densidad espectral de potencia correspondiente a 5 minutos de estimulación (rojo) o luz apagada (gris). Los registros fueron realizados por Matías Mugnaini y Emilio Kropff.

Una vez obtenido el registro de campo, se analizó la señal calculando su densidad espectral de potencia (*power spectral density* o *PSD*). Esta medida permite cuantificar la potencia de las distintas frecuencias que componen el registro. Al estimular al animal con ViS a 40 Hz, el LFP del giro dentado presentó un notable aumento en la potencia de su componente de 40 Hz, evidenciado por un pico en su PSD. Sin embargo, esta modulación no fue observada cuando el animal se mantuvo en oscuridad (Figura 12C).

En línea con trabajos previos que demostraron que ViS a 40 Hz incrementa la PSD de esta frecuencia en la corteza visual, corteza prefrontal y la región CA1 del hipocampo en modelos murinos de EA (Adaikkan et al., 2019; Iaccarino et al., 2016), este resultado muestra que este estímulo también aumenta la potencia de gamma en el giro dentado de animales sanos envejecidos.

Otros trabajos reportaron un efecto similar utilizando pulsos de sonido a 40 Hz en animales con EA, observando un aumento significativo de la potencia de gamma en la corteza auditiva pero no en la región CA1 del hipocampo (Martorell et al., 2019). Estos resultados, coherentes con registros del giro dentado no incluidos en esta tesis, confirman que la estimulación auditiva no induce modificaciones locales en esta región. Sin embargo, Martorell y colaboradores observaron que la combinación de estímulos visuales y auditivos a 40 Hz promueve efectos sinérgicos superiores a los obtenidos con cada modalidad por separado en modelos de EA. Esta interacción favoreció el reclutamiento de microglía activada alrededor de placas amiloides, logrando una notable reducción de la patología incluso en regiones corticales no afectadas previamente (Martorell et al., 2019).

Es por esto que nos propusimos evaluar el impacto de este tratamiento combinado (luz y sonido a 40 Hz) en la actividad del giro dentado en el hipocampo envejecido.

4.2. La estimulación audiovisual a 40 Hz potencia el remodelado estructural de nuevas CGs en el hipocampo envejecido

El siguiente objetivo de esta tesis fue evaluar si la estimulación audiovisual (AuViS) a 40 Hz afecta la actividad neuronal del giro dentado en animales de mediana edad. Para ello se evaluó la expresión de la proteína Arc (*activity related cytoskeleton associated protein*), codificada por uno de los genes de expresión temprana inmediata inducidos por actividad neuronal (Korb and Finkbeiner, 2011), en el giro dentado de ratones de 8M sometidos a 2 horas de AuViS a 40 Hz (Figura 13A). Teniendo en cuenta que las CGs nuevas migran y se establecen sólo en las capas más internas de la capa granular (CGL) durante su desarrollo, se realizaron subdivisiones para cuantificar la actividad de cada subcapa: ZSG, capa granular 1 (CGL1), capa granular 2 (CGL2) y capa granular 3 (CGL3) (Figura 13B). Se cuantificó la actividad neuronal evaluando la densidad de células Arc/NeuN^{+} en imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia (Figura 13C).

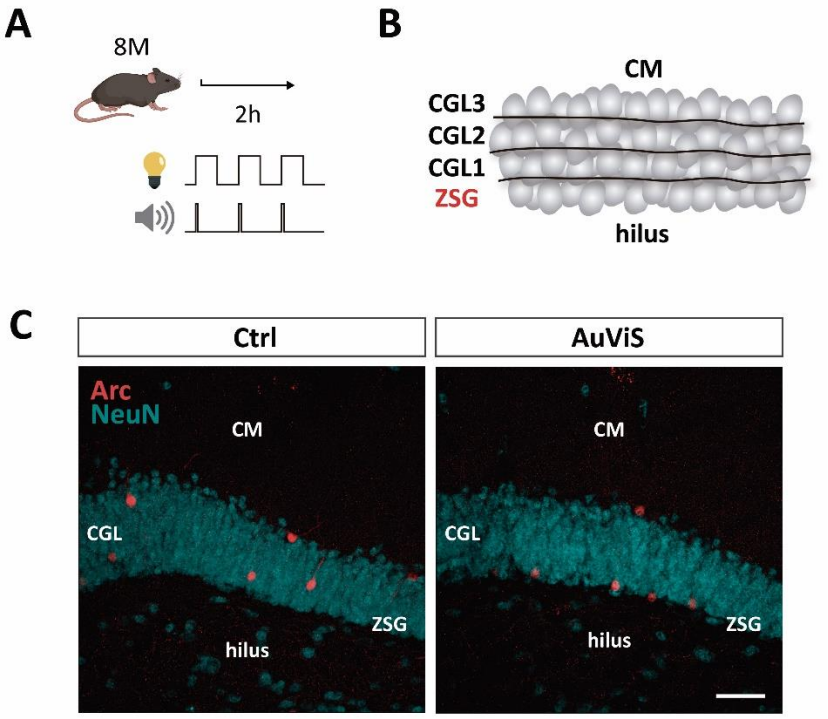

Figura 13. Diseño experimental. (A) Los ratones fueron expuestos a 2 horas de estimulación audiovisual a 40 Hz. (B) Diagrama esquemático que representa las subdivisiones de la capa granular. (C) Imágenes representativas de la expresión de Arc (rojo) en la capa granular (CGL) marcada con NeuN (azul) CM: capa molecular, ZSG: zona subgranular. Barra de escala, 50 µm.

Dado que las subcapas de la capa granular contienen CGs en diversos estados de maduración, resultó interesante estudiar su actividad por separado. Al cuantificar la densidad de Arc en las subcapas, se observó un incremento del doble de células Arc/NeuN$^+$ restringido a la zona subgranular de los animales estimulados, sin cambios en otras áreas de la capa granular con respecto a los controles (Figura 14A). A su vez, se pudo comprobar que esta activación preferencial de la ZSG es exclusiva de la estimulación a 40 Hz, al no observar cambios significativos al estimular con una frecuencia aleatoria (Figura 14B).

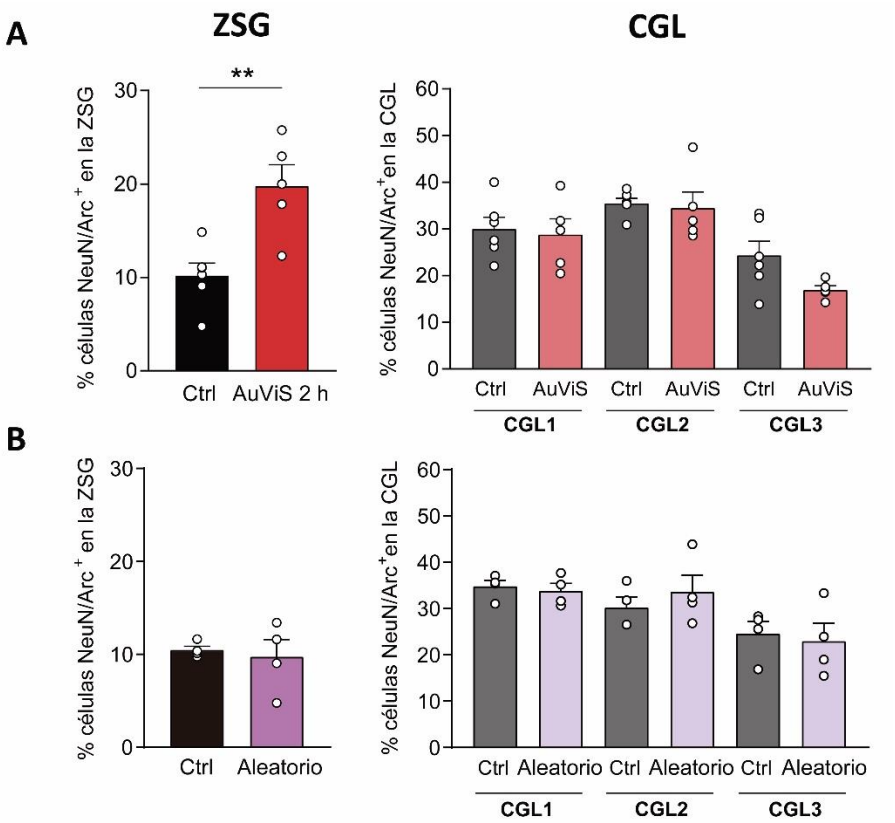

Figura 14. La estimulación audiovisual a 40 Hz activa preferentemente la zona subgranular del giro dentado de ratones envejecidos. (A) Cuantificación de la expresión de Arc en la ZSG y la CG de animales estimulados con AuViS. (**) denota $p < 0.01$ tras la prueba de Mann-Whitney. Tamaño de la muestra (secciones/ratones): 4/6 (Ctrl) y 4/5 (AuViS). (B) Cuantificación de la expresión de Arc en la ZSG y la CG de animales estimulados con una frecuencia azarosa (Aleatorio) manteniendo el 50% del ciclo de luz. Tamaño de la muestra (secciones/ratones): 4/4 (Ctrl) y 4/4 (Aleatorio). Las barras horizontales indican la media ± SEM. Los análisis fueron realizados en conjunto con Juan Segundo Serrangeli.

Este resultado sugiere que AuViS a 40 Hz recluta preferentemente neuronas en la zona donde se localizan los progenitores neurales y las neuronas inmaduras durante su desarrollo (Espósito et al., 2005).

4.2.1. Modulación de estructuras postsinápticas por AuViS

La actividad hipocampal cumple un rol clave en la maduración neuronal. Anteriormente se observó que AuViS a 40 Hz activa preferentemente células ubicadas en las capas más internas del giro dentado, donde se localizan las nuevas CGs en las primeras etapas de su desarrollo. Teniendo en cuenta esto, es menester preguntarse si el incremento en la actividad del giro dentado promovido por este tratamiento afecta el desarrollo estructural de las células nacidas en este nicho.

Para responder esta pregunta, ratones de 8M fueron inyectados en el giro dentado derecho con un retrovirus que expresa la proteína fluorescente verde GFP (RV-GFP) para marcar una nueva cohorte neuronal (Ver métodos). Un grupo de animales fue estimulado 4 horas por noche con AuViS a 40 Hz, mientras que otro grupo fue dejado en condiciones control de oscuridad (Ctrl). Todos los animales fueron sacrificados a los 17 días post inyección del virus (dpi) para analizar la morfología de las neuronas marcadas (Figura 15A).

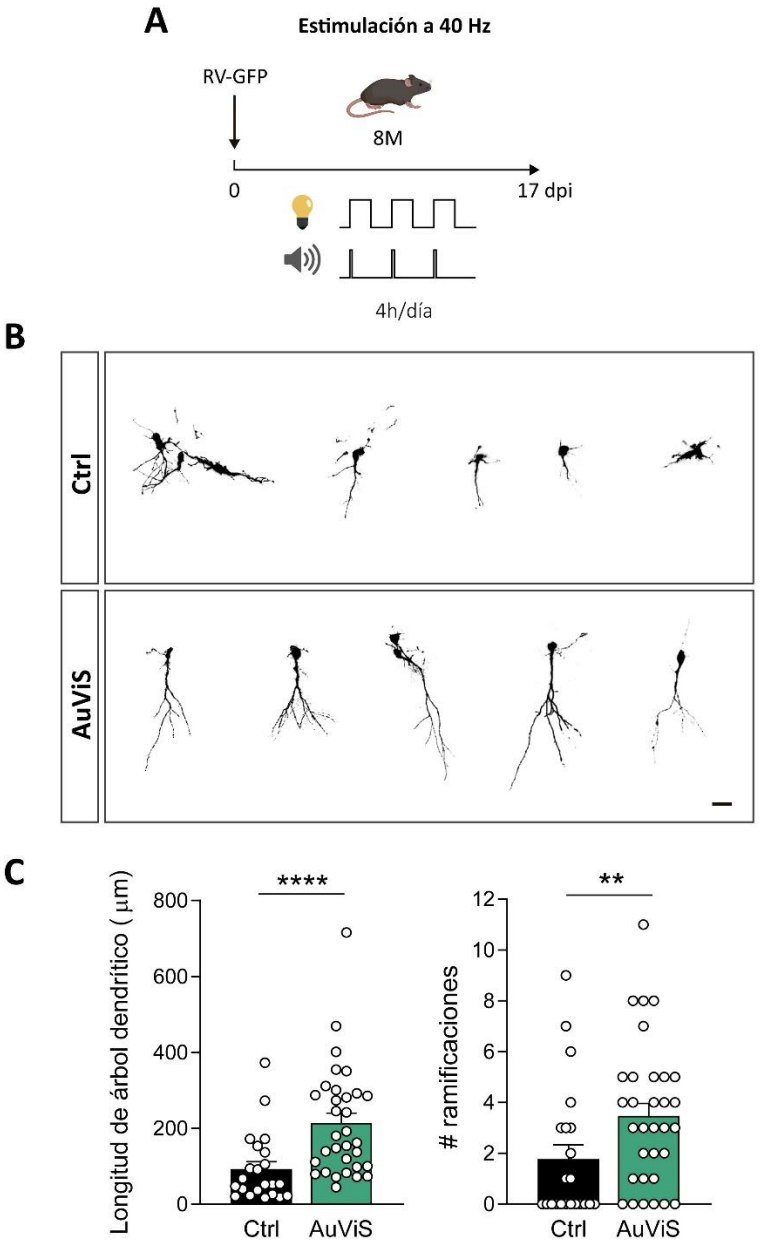

Figura 15. La estimulación audiovisual gamma acelera el desarrollo del árbol dendrítico en neuronas nacidas en animales envejecidos. (A) Diseño experimental. Ratones de 8M fueron inyectados con un RV-GFP para marcar neuronas nuevas. Los animales fueron expuestos a una estimulación audiovisual a 40 Hz 4 horas/día durante 17 días. (B) Imágenes confocales representativas

de CGs GFP$^+$ de 17 dpi correspondientes a los grupos control (panel superior) y estimulado (panel inferior). Las neuronas individuales se recortaron a partir de las imágenes originales. Escala, 20 µm. (C) Análisis de la complejidad del árbol dendrítico (longitud y ramificaciones) para ambos grupos. (**) y (****) indican $p < 0.01$ y $p < 0.0001$ tras la prueba de Mann-Whitney. Tamaño de las muestras (neuronas/ratones): 22/3 (Ctrl) y 32/4 (AuViS). Las barras horizontales indican la media ± SEM.

La morfología de las neuronas GFP$^+$ se estudió a partir de imágenes obtenidas con microscopía confocal (Figura 15B). Neuronas de 17 días nacidas en animales del grupo control presentaron un árbol dendrítico de 93 ± 19 µm de longitud, con dos ramificaciones en promedio y una morfología inmadura. Contaban con procesos incipientes y en algunos casos paralelos a la capa granular. Al no adentrarse en la capa molecular se podría deducir que estas CGs no son lo suficientemente maduras para recibir información proveniente de la corteza. Por el contrario, neuronas nacidas en ratones estimulados con AuViS presentaron una morfología más desarrollada, con un árbol dendrítico de 214 ± 26 µm y 4 ramificaciones en promedio, incrementándose al doble la longitud y complejidad de esta estructura en comparación con los animales control (Figura 15C). Estas células comenzaron a extender sus procesos a través de la parte interna de la capa molecular, lo que sugiere una mayor inervación por parte de axones aferentes desde la corteza entorrinal e integración al circuito preexistente (Espósito et al., 2005; Toni and Schinder, 2015).

Estos resultados demuestran que el tratamiento con AuViS a 40 Hz aumenta la actividad del giro dentado, acelerando el desarrollo morfológico de nuevas CGs en ratones envejecidos, tal como se reportó previamente para estímulos como el ejercicio físico voluntario y el enriquecimiento ambiental.

4.2.2. Modulación de estructuras presinápticas por AuViS

Para completar su desarrollo morfológico, las nuevas CGs también deben proyectar sus axones hacia CA3, región donde establecen sinapsis glutamatérgicas excitatorias con neuronas piramidales a través de los BFM. Estos botones poseen a su vez filopodios que contactan interneuronas GABAérgicas, reclutando inhibición *feedforward* sobre las células piramidales (Acsady et al., 1998; Sun et al., 2013; Toni et al., 2008). A medida que la neurona madura, el área y el número de extensiones filopodiales de estas estructuras aumenta en tamaño y número respectivamente

(Restivo et al., 2015). Teniendo en cuenta esto, se decidió evaluar si AuViS promueve también la aceleración del desarrollo de las conexiones eferentes de las nuevas CGs en el hipocampo envejecido.

Se analizó la morfología de los BFM de las células GFP^+ de 17 días nacidas en animales de ambos grupos (Figura 16). El área y el número de extensiones filopodiales fueron medidas a partir de proyecciones de imágenes obtenidas por microscopía confocal (Ver materiales y métodos; Figura 16A). Los botones de neuronas del grupo control presentaron una morfología inmadura, con un área pequeña (3 μm^2) de forma ovalada y ausencia de extensiones filopodiales. Por el contrario, AuViS promovió un aumento del doble en el área de los BFM del grupo tratado y la presencia de al menos 1 filopodio en promedio, ambas características de una estructura presináptica más madura (Figura 16B).

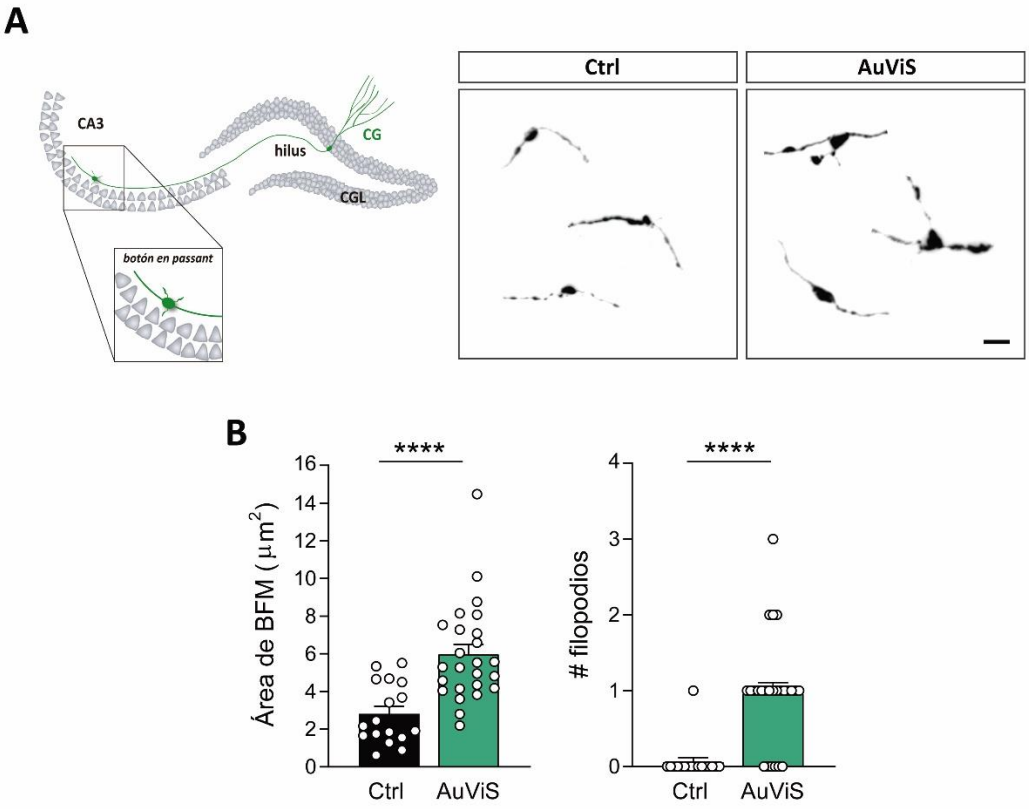

Figura 16. La estimulación audiovisual gamma acelera el desarrollo de estructuras presinápticas en neuronas nacidas en animales envejecidos. (A) Se analizó la morfología de los terminales presinápticos de las CGs en CA3 para ambos grupos. Se muestran imágenes representativas de los mismos en el panel de la derecha. Escala, 5 µm. (B) Área y número de extensiones de los botones de neuronas GFP^+ de 17 días. Tamaño de las muestras (neuronas/ratón): 17/3 (Ctrl) y 25/4 (AuViS). (****) indica $p < 0.0001$ tras la prueba de Mann-Whitney. Las barras horizontales indican la media ± SEM.

Estos resultados confirman que la exposición a AuViS a 40 Hz también promueve la maduración de las estructuras presinápticas de CGs nacidas en el hipocampo envejecido. El aumento del área y del número de filopodios en el grupo estimulado sugiere que estas células son capaces de contactar células piramidales y de reclutar *feedback* inhibitorio a través de interneuronas en CA3, respectivamente (Acsady et al., 1998; Toni et al., 2008).

En conjunto, los datos mostrados hasta este momento indican que la estimulación audiovisual gamma promueve el crecimiento dendrítico y la maduración morfológica de estructuras presinápticas, sugiriendo una mayor conectividad de las CGs nuevas con aferencias y eferencias en el circuito preexistente.

4.2.3. Los efectos de la estimulación audiovisual son exclusivos de 40 Hz

Hasta el momento, el tratamiento con AuViS demostró cambios plásticos significativos en la estructura de las nuevas CGs. Sin embargo, es necesario descartar que estos efectos se deban únicamente a la estimulación visual y auditiva. Para evaluar esta posibilidad, una nueva camada de animales de 8M fueron inyectados con un RV-GFP y expuestos a una estimulación audiovisual con una frecuencia azarosa (Aleatorio) durante 17 días (Ver métodos, Figura 17A).

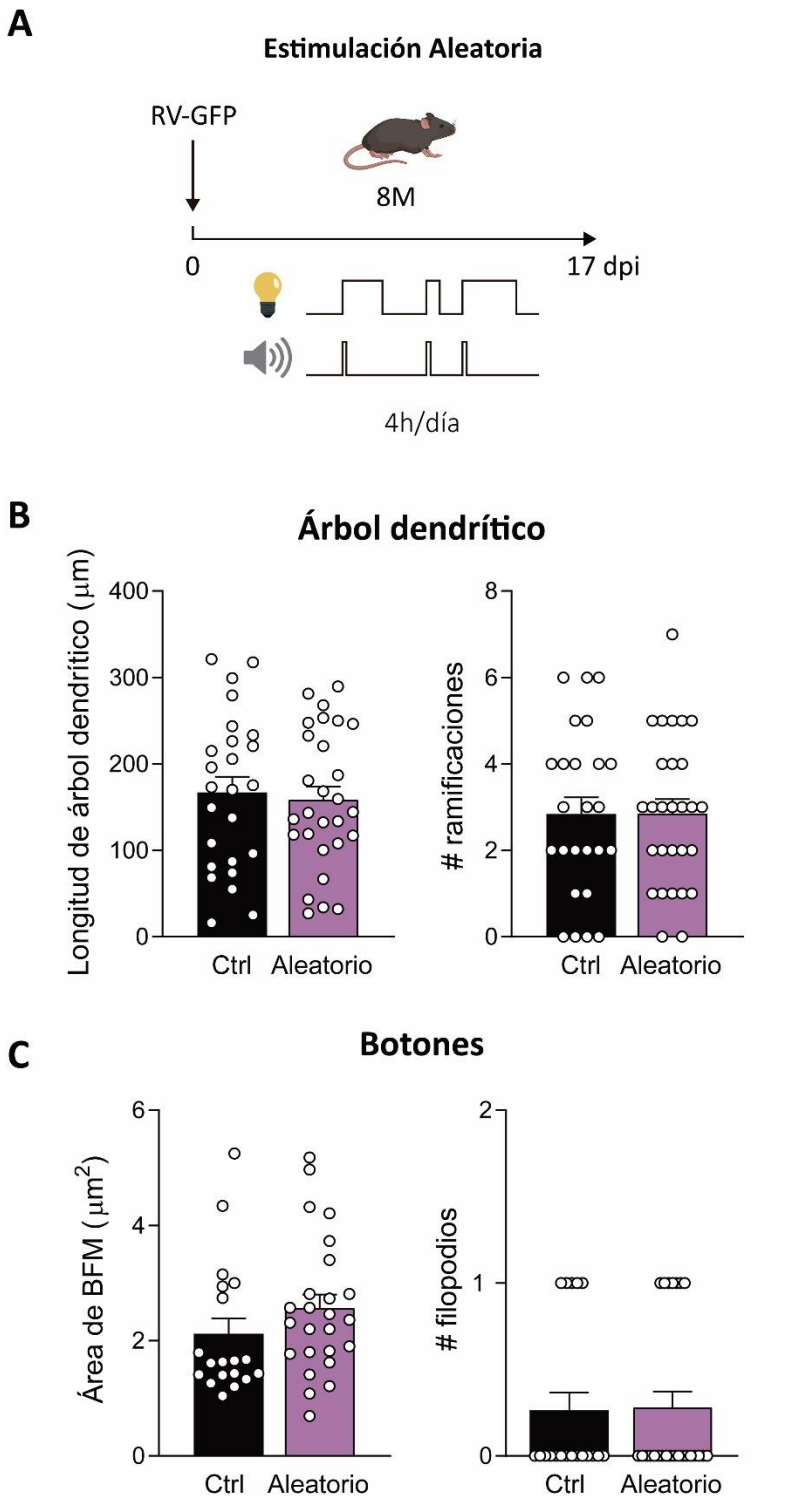

Figura 17. La estimulación audiovisual aleatoria no genera cambios en el desarrollo estructural de neuronas nacidas en animales envejecidos. (A) Diseño experimental. Ratones de 8M fueron inyectados con un RV-GFP en el giro dentado derecho para marcar neuronas nuevas. Los animales fueron expuestos a una estimulación audiovisual aleatoria (se mantuvo un 50% del ciclo de trabajo, con intervalos aleatorios) 4h/día durante 17 días. (B) Análisis de la complejidad del árbol dendrítico (longitud y ramificaciones) de nuevas CGs GFP$^+$ de 17 dpi correspondientes a los grupos control y Aleatorio. Tamaño de las muestras (neuronas/ratones): 25/4 (Ctrl) y 28/4 (Aleatorio). (C) Área y número de extensiones de los botones de neuronas GFP$^+$ de 17 días. Tamaño de las muestras

(neuronas/ratones): 19/4 (Ctrl) y 25/4 (Aleatorio). Las barras horizontales indican la media ± SEM. Parte del análisis fue realizado en conjunto con Odra Santander.

Se adquirieron imágenes mediante microscopía confocal y, de la misma manera que en los experimentos presentados anteriormente, se analizaron los parámetros morfológicos de las estructuras aferentes y eferentes de las neuronas GFP^+ para ambos grupos. Este análisis reveló que la estimulación en frecuencia aleatoria no promueve modificaciones en la estructura del árbol dendrítico, ni en los parámetros morfológicos de los BFM (Figura 17B,C).

Estos resultados confirman que los efectos de AuViS en el desarrollo de las nuevas CGs son consecuencia de la actividad inducida específicamente por la estimulación en el rango gamma.

4.3. La estimulación audiovisual a 40 Hz no acelera la maduración de CGs nacidas en animales jóvenes

Trabajos previos del laboratorio han reportado que la neurogénesis adulta en animales jóvenes es susceptible a modulación por estímulos fisiológicos que incrementan la actividad del giro dentado (Alvarez et al., 2016; Piatti et al., 2011). Sin embargo, las oscilaciones gamma, disminuidas en animales envejecidos, permanecen intactas en animales jóvenes (Nakazono et al., 2018). Teniendo en cuenta esto, nos preguntamos si AuViS a 40 Hz puede promover cambios estructurales en neuronas nacidas en animales jóvenes o si, por el contrario, sus efectos se limitan al envejecimiento, donde podrían estar relacionados con la recuperación de las oscilaciones gamma. Para abordar esta pregunta, animales de 2M fueron inyectados con un RV-GFP y expuestos a AuViS a 40 Hz durante 7, 14 o 21 días (Figura 18A).

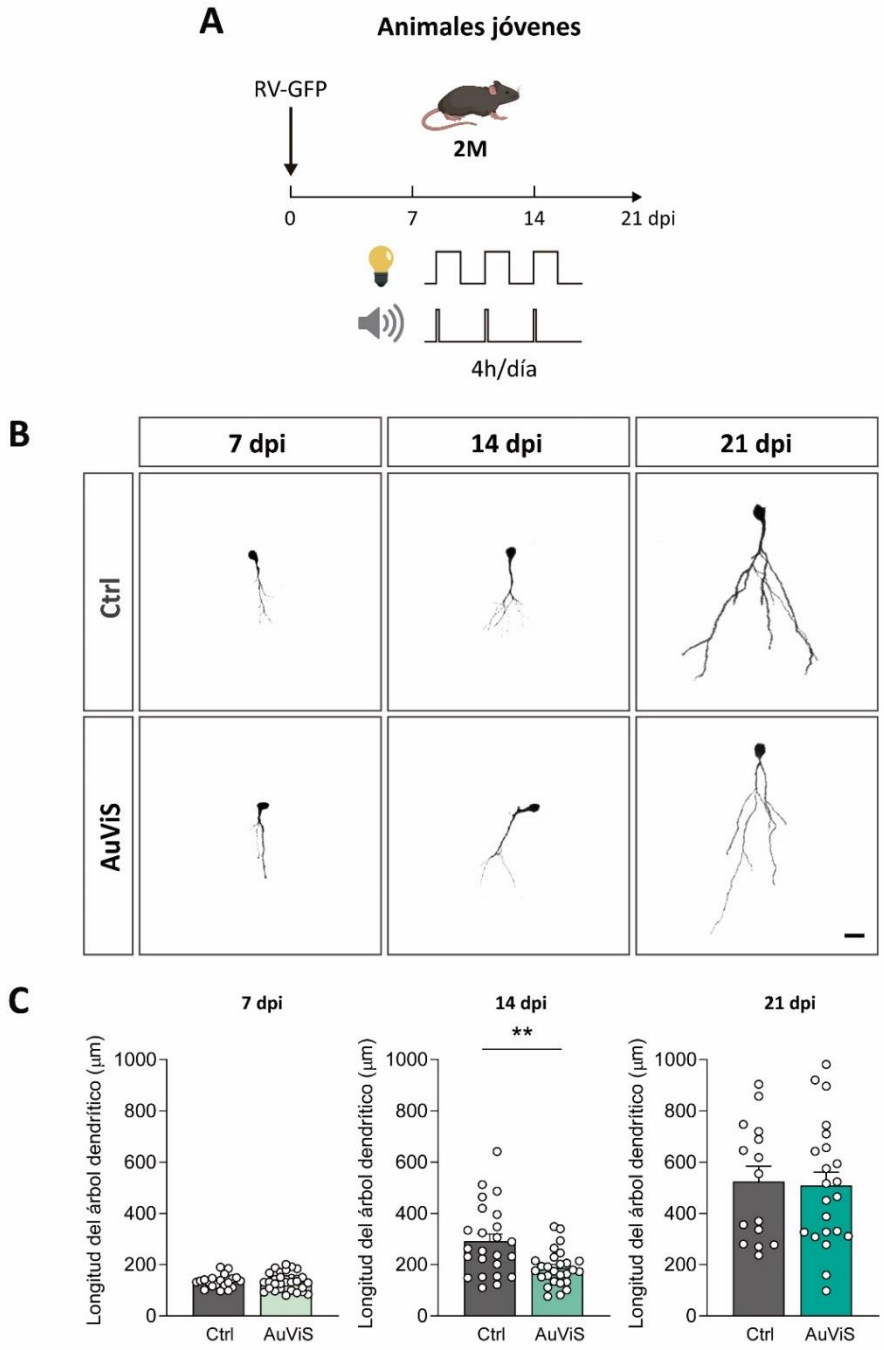

Figura 18. AuViS no acelera el desarrollo de CGs en ratones jóvenes. (A) Diseño experimental. Ratones de 2M fueron inyectados con un RV-GFP y expuestos a AuViS a 40 Hz 4 horas/día durante 7, 14 o 21 días. (B) Imágenes representativas de CGs a diferentes edades obtenidas para el grupo control (Ctrl) y estimulado (AuViS). Las neuronas individuales se recortaron a partir de las imágenes originales. Escala, 20 µm. (C) Análisis de la complejidad del árbol dendrítico (longitud y ramificaciones). (**) indica $p < 0.01$ tras un test de t. Tamaños de muestra (neuronas/ratones) para 7 dpi: 20/3 (Ctrl) y 31/4 (AuViS); 14 dpi: 24/4 (Ctrl) y 27/4 (AuViS); 21 dpi: 15/3 (Ctrl) y 22/4 (AuViS). Las barras horizontales indican la media ± SEM. Parte del análisis se realizó en conjunto con Agostina Miranda (14 dpi) y Julián Pandiella (7 dpi).

Se cuantificó la longitud del árbol dendrítico de las CGs GFP^+ nacidas a los diferentes intervalos post inyección. No se observaron cambios en el desarrollo neuronal tras 7 o 21 días de estimulación (Figura 18B). Sin embargo, las neuronas nacidas en el grupo estimulado durante dos semanas presentaron árboles dendríticos considerablemente más pequeños en comparación con el grupo control (Figura 18C).

Se ha demostrado que las CGs nacidas en adultos poseen un mecanismo homeostático de poda frente al crecimiento de sus dendritas durante las primeras semanas de desarrollo, el cual se intensifica frente a un crecimiento excesivo en respuesta a la actividad (Goncalves et al., 2016a). Teniendo en cuenta esto, la reducción en la longitud del árbol dendrítico observada a los 14 días con AuViS podría deberse a una compensación del crecimiento dendrítico mediante una poda homeostática. Dado que a edades más avanzadas no se observa esta disminución, se puede concluir que la estimulación con AuViS no promueve cambios a largo plazo en el desarrollo estructural de CGs nacidas en animales jóvenes.

4.4. Efectos diferenciales de la estimulación visual o auditiva a 40 Hz sobre el desarrollo estructural de nuevas CGs

Trabajos previos realizados en modelos murinos de la enfermedad de Alzheimer han mostrado que la estimulación visual a 40 Hz reduce los niveles de Aβ en la corteza visual y mejora la capacidad fagocítica de la microglía frente a este péptido (Iaccarino et al., 2016). Por otro lado, la estimulación auditiva (AuS) a 40 Hz disminuye los niveles de Tau hiperfosforilada y promueve la activación de astrocitos y microglía tanto en la corteza auditiva como en el hipocampo, además de mejorar la memoria espacial y de reconocimiento (Martorell et al., 2019). También se observó que, al combinar ambas modalidades sensoriales, los efectos positivos se potencian. La estimulación multisensorial genera respuestas únicas, como el agrupamiento de la microglía y una reducción más amplia de las placas de Aβ en diversas regiones corticales, incluidas la corteza prefrontal medial y la neocorteza (Martorell et al., 2019). Sin embargo, aún se desconoce si estos efectos son sinérgicos o aditivos.

Los resultados presentados anteriormente destacan el gran potencial que posee la estimulación multisensorial a 40 Hz para modular el desarrollo de estructuras pre y

postsinápticas en neuronas nacidas en el hipocampo envejecido. No obstante, aún se desconoce de qué manera contribuye cada modalidad sensorial a los efectos observados. Teniendo en cuenta esto, decidimos evaluar los efectos diferenciales de ViS y AuS sobre las CGs nacidas en animales envejecidos.

4.4.1. Estimulación visual

Para evaluar la contribución especifica de ViS, animales de 8M fueron inyectados con un RV-GFP para marcar una cohorte neuronal y un grupo fue expuesto a ViS durante 17 días mientras que otro se mantuvo en condiciones control (Figura 19A).

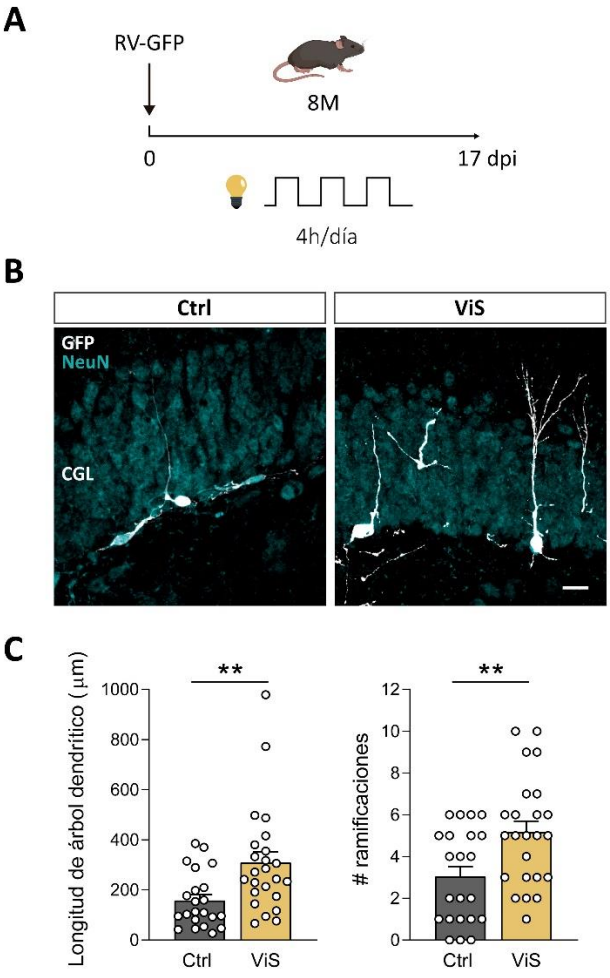

Figura 19. La estimulación visual a 40 Hz acelera el desarrollo del árbol dendrítico en neuronas nacidas en animales envejecidos. (A) Diseño experimental. Ratones de 8M fueron inyectados con un RV-GFP y expuestos a ViS a 40 Hz 4 horas/día durante 17 días. (B) Imágenes representativas de CGs de 17 dpi expresando GFP (blanco). La capa granular (CGL) se encuentra marcada con NeuN (azul). Escala, 20 µm. (C) Análisis de la complejidad del árbol dendrítico (longitud y ramificaciones). (**) indica $p < 0.01$ tras la prueba de Mann-Whitney. Tamaño de las muestras (neuronas/ratones): 22/4 (Ctrl) y 24/4 (ViS). Las barras horizontales indican la media ± SEM.

Utilizando microscopía confocal, se analizaron los parámetros morfológicos del árbol dendrítico (longitud y número de ramificaciones) de las neuronas GFP$^+$ para ambos grupos (Figura 19B). El árbol dendrítico de neuronas nacidas en animales control presentó una morfología inmadura, con 158 ± 24 µm de longitud, dos ramificaciones y procesos paralelos a la capa granular. No obstante, las neuronas nacidas en animales expuestos a ViS presentaron un aumento del doble en la longitud y ramificaciones de su árbol, contando con 310 ± 43 µm y cuatro ramificaciones en promedio (Figura 19C). Para comprobar que estos efectos eran dependientes de la frecuencia de estimulación, se realizó un experimento similar utilizando una estimulación visual a 8 Hz (Figura 20A).

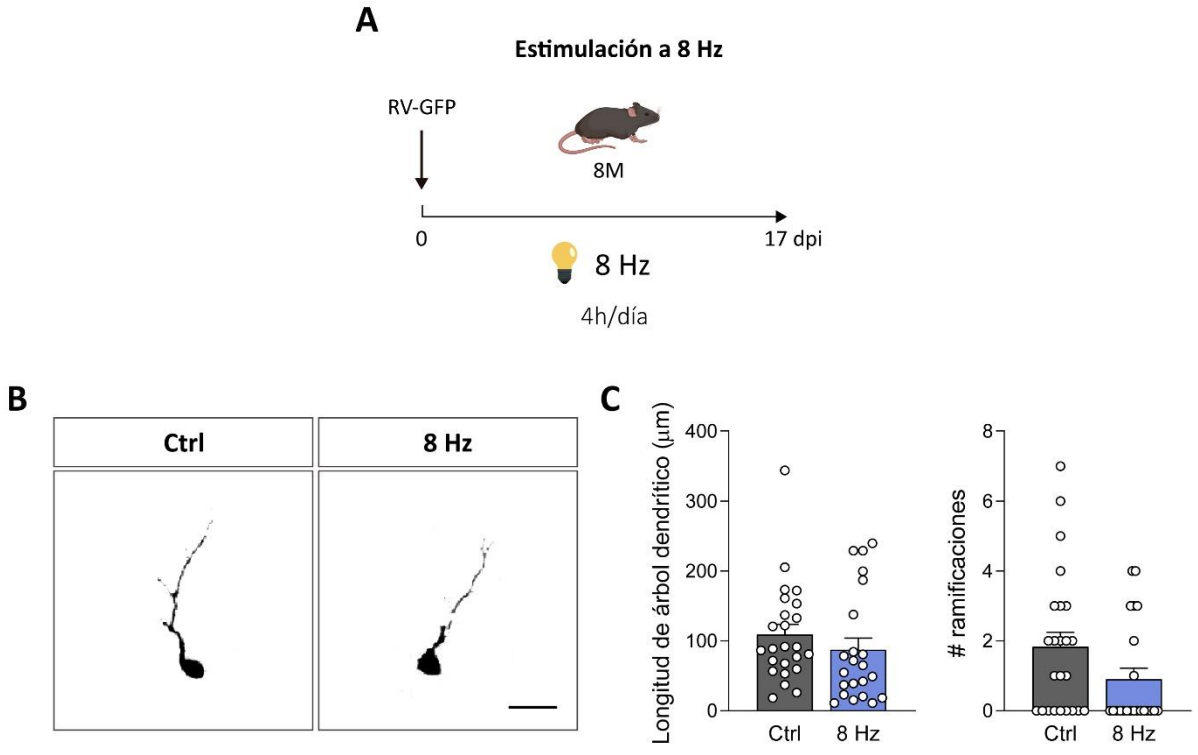

Figura 20. La estimulación visual a 8 Hz no influye en el desarrollo de las CGs nacidas en animales envejecidos. (A) La inyección de RV-GFP fue seguida por 17 días de AuViS a 8 Hz. (B) Imágenes representativas de microscopía confocal de CGs GFP$^+$ a 17 dpi. Las neuronas individuales han sido recortadas de las imágenes originales. Barra de escala, 20 µm. (D) Mediciones dendríticas. Tamaños de muestra (neuronas/ratones): 24/3 (Ctrl) y 22/3 (8 Hz). Las barras indican media ± SEM.

Se estudió la morfología de las CGs GFP$^+$, las cuales no presentaron cambios en la complejidad de su árbol dendrítico frente al tratamiento (Figura 20B,C). Estos resultados muestran que, así como AuViS, ViS a 40 Hz (pero no a 8 Hz) promueve

cambios significativos en la longitud y complejidad del árbol dendrítico de neuronas nacidas en animales envejecidos

Por el contrario, al observar la estructura de los terminales presinápticas de las células expuestas a ViS a 40 Hz, no se encontraron diferencias significativas en el área o el número de filopodios de los botones pertenecientes a ambos grupos (Figura 21A,B).

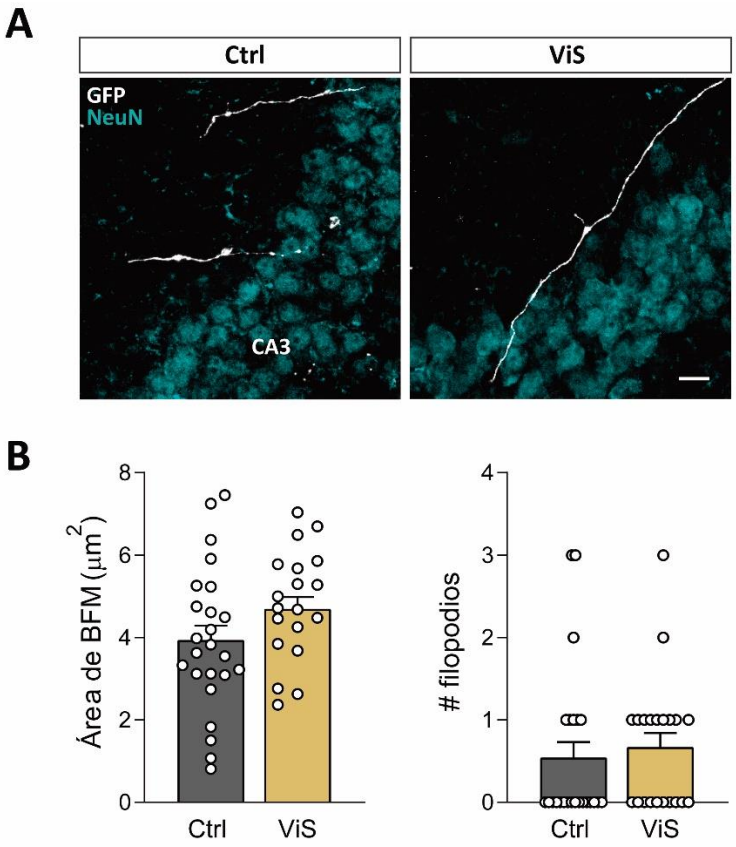

Figura 21. La estimulación visual en frecuencia gamma no genera cambios en el desarrollo de estructuras presinápticas de neuronas nacidas en animales envejecidos. (A) Imágenes representativas de BFM expresando GFP (blanco) en CA3 para ambos grupos. La zona de CA3 se encuentra marcada con NeuN (azul). Escala, 20 μm. (B) Área y número de extensiones de los botones de neuronas GFP⁺ de 17 días. Tamaño de las muestras (neuronas/ratones): 24/4 (Ctrl) and 19/4 (ViS). Las barras horizontales indican la media ± SEM.

Los resultados obtenidos hasta el momento sugieren que la estimulación visual a 40 Hz modula selectivamente el desarrollo de las estructuras dendríticas sin afectar las propiedades de los terminales de las CGs en CA3.

4.4.2. Estimulación auditiva

Para estudiar la contribución de AuS a los efectos de la estimulación gamma en neuronas nacidas en animales envejecidos, ratones de 8M fueron inyectados con un RV-GFP y un grupo fue estimulado con pulsos de sonido de 10 kHz a 40 Hz durante 17 días mientras que otro se mantuvo en condiciones control (Figura 22A).

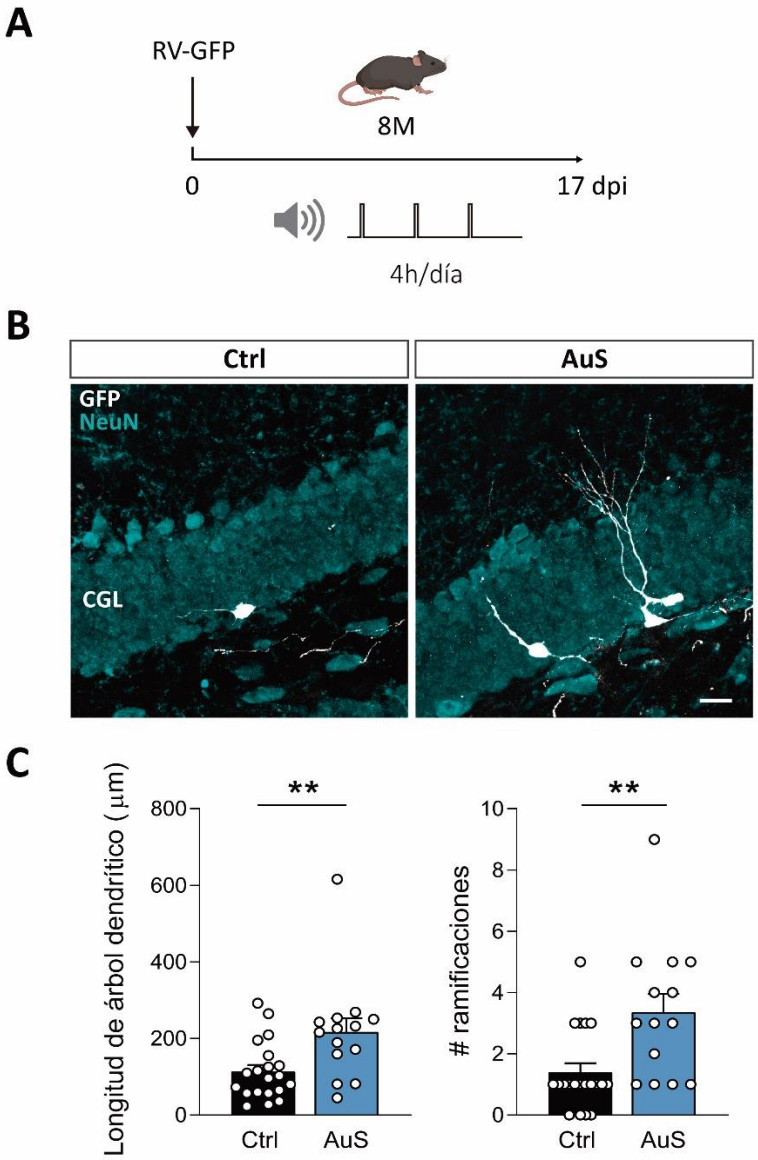

Figura 22. La estimulación auditiva en frecuencia gamma acelera el desarrollo del árbol dendrítico en neuronas nacidas en animales envejecidos. (A) Diseño experimental. Ratones de 8M fueron inyectados con un RV-GFP para marcar una nueva cohorte neuronal y expuestos a AuS a 40 Hz 4 horas/día durante 17 días. (B) Imágenes representativas de CGs de 17 dpi expresando GFP (blanco) tomadas de un grupo control (Ctrl) y uno estimulado (AuS). La capa granular (CGL) se encuentra marcada con NeuN (azul). Escala, 20 µm. (C) Análisis de la complejidad del árbol dendrítico (longitud y ramificaciones) para ambos grupos. (**) indica $p < 0.01$ tras la prueba de Mann-Whitney. Tamaño de las muestras (neuronas/ratones): 20/3 (Ctrl) y 14/3 (AuS). Las barras horizontales indican la media ± SEM.

Se analizó la morfología del árbol dendrítico de las CGs GFP$^+$ mediante microscopía confocal y, de la misma forma que con ViS, se observó que AuS promovió un aumento significativo en la longitud y complejidad del árbol dendrítico de las nuevas CGs, sugiriendo una aceleración en la conectividad con aferencias de la corteza (Figura 22B,C).

Dado que ViS no ejerció ninguna modulación sobre el desarrollo de terminales presinápticos, planteamos la hipótesis de que AuS podría ser responsable de las modificaciones observadas en estas estructuras tras la estimulación con AuViS. Sin embargo, AuS no promovió cambios en el área o el número de filopodios de los BFM del grupo estimulado (Figura 23A,B).

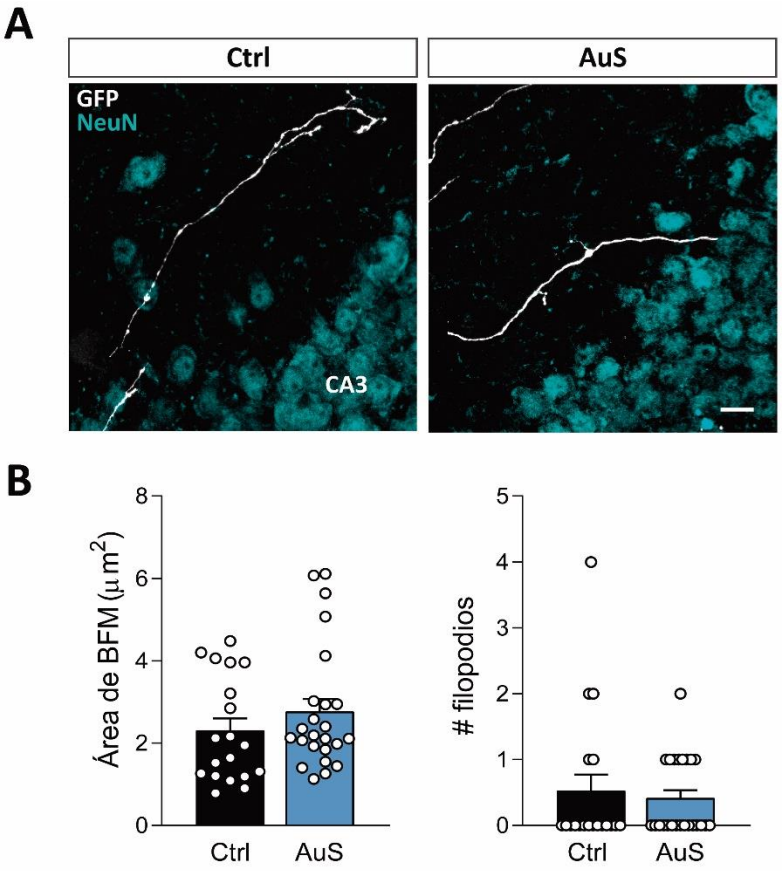

Figura 23. La estimulación auditiva en frecuencia gamma no genera cambios en el desarrollo de estructuras presinápticas de neuronas nacidas en animales envejecidos. (A) Imágenes representativas de BFM expresando GFP (blanco) en CA3 para ambos grupos. La zona de CA3 se encuentra marcada con NeuN (azul). Escala, 20 µm. (B) Área y número de extensiones de los botones de neuronas GFP+ de 17 días. Tamaño de las muestras (neuronas/ratones): 19/3 (Ctrl) and 24/3 (AuS). Las barras horizontales indican la media ± SEM.

Los resultados expuestos anteriormente indican que los *inputs* visuales y auditivos a 40 Hz sólo aceleran el desarrollo del árbol dendrítico en las nuevas CGs, sugiriendo que los efectos observados en el desarrollo de las estructuras presinápticas de las nuevas CGs con AuViS dependen del efecto sinérgico ejercido por la estimulación multisensorial a 40 Hz. Esta sinergia resulta fundamental, ya que permite el establecimiento de nuevas conexiones con células piramidales e interneuronas en CA3, promoviendo la integración funcional de estas neuronas en el circuito.

4.5. La estimulación audiovisual a 40 Hz impulsa la integración funcional de las CGs nacidas en animales envejecidos

Los resultados presentados hasta el momento mostraron que animales envejecidos expuestos a AuViS a 40 Hz presentan nuevas CGs con una acelerada maduración morfológica tanto en sus estructuras presinápticas como postsinápticas. Sin embargo, esto no implica necesariamente que estas células sean funcionales y estén integradas al circuito. Para completar su integración, las nuevas CGs deben madurar tanto sus conexiones con aferencias de la corteza y con blancos postsinápticos en CA3, como también sus propiedades eléctricas intrínsecas para poder procesar y enviar información.

4.5.1. Efectos de AuViS sobre las propiedades electrofisiológicas de CGs de 17 días

Para investigar si AuViS promueve el desarrollo funcional de las CGs, ratones transgénicos Ascl1^{CreERT2};CAG^{floxStopTom} de 8M recibieron tamoxifeno por vía intraperitoneal para marcar neuronas nuevas mediante la expresión de la proteína fluorescente Tomato (Ver métodos). Un grupo de animales fue expuesto a AuViS a 40 Hz durante 17 días mientras otro se mantuvo en condiciones control. Se realizaron rodajas agudas de hipocampo para llevar a cabo registros electrofisiológicos en las CGs Tom^{+} de ambos grupos (Figura 24A).

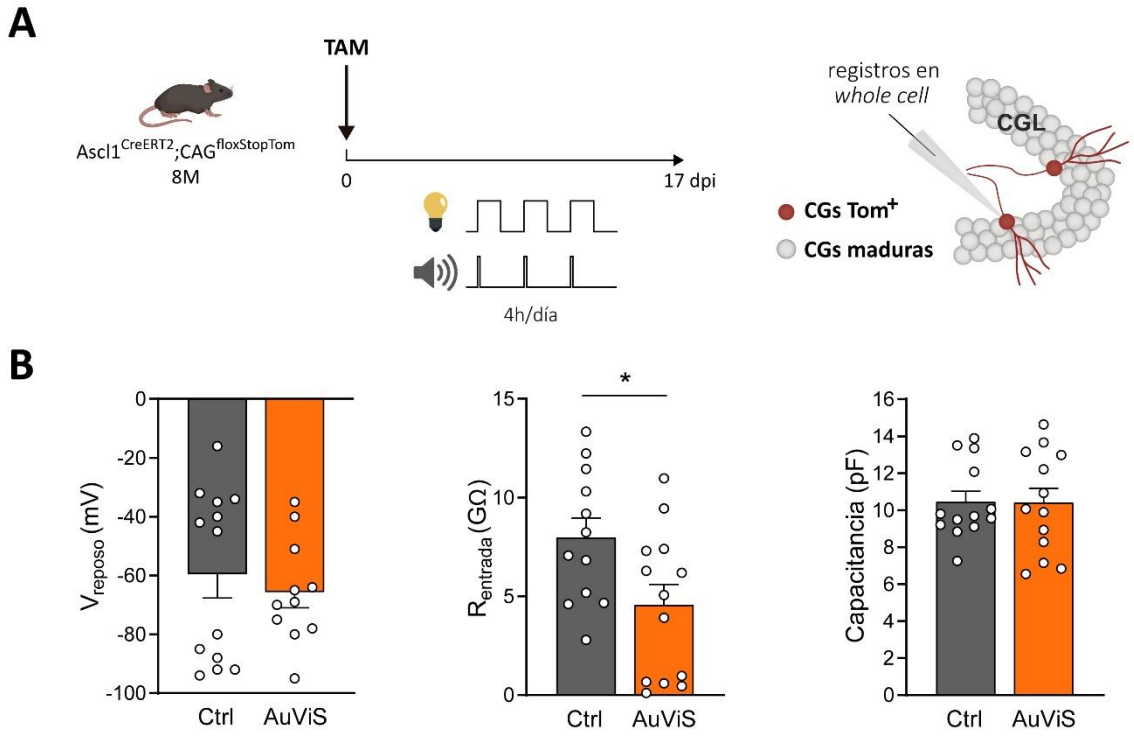

Figura 24. La estimulación audiovisual gamma acelera la maduración de propiedades pasivas de membrana en neuronas nacidas en animales envejecidos. (A) Diseño experimental. Ratones Ascl1^{CreERT2};CAG^{floxStopTom} de 8M recibieron tamoxifeno para marcar neuronas nuevas. Se prepararon rodajas agudas de hipocampo 17 días después del tratamiento con AuViS o de condiciones control para evaluar las propiedades intrínsecas y la conectividad mediante registros en *whole-cell* de CGs Tom$^+$. (B) Potencial de reposo, resistencia de entrada y capacitancia de CGs Tom$^+$ de ratones expuestos a una estimulación audiovisual a 40 Hz 4h/día durante 17 días o de ratones sin estimulación (Ctrl). Tamaño de las muestras (neuronas/ratones): 12/3 (Ctrl) and 13/2 (AuViS). (*) indica $p < 0.05$ tras la prueba de Mann-Whitney. Las barras horizontales indican la media ± SEM. Los registros y el análisis se realizaron en conjunto con Mariela Trinchero.

Una de las propiedades que varía a lo largo del desarrollo de las CGs es el potencial de reposo de la membrana (V_{reposo}), volviéndose más hiperpolarizado a medida que la neurona madura. Este cambio se debe, en parte, a la expresión progresiva de canales rectificadores internos de potasio (Kir), los cuales permiten la salida de K^+ y contribuyen a regular la excitabilidad de las CGs (Mongiat et al., 2009). Las neuronas nacidas en los animales expuestos a AuViS no mostraron diferencias en su V_{reposo} con respecto a las células del grupo control. Sin embargo, sí se observó una menor resistencia al paso de corriente por la membrana ($R_{entrada}$) en el grupo AuViS, lo cual es compatible con la expresión de una mayor cantidad de canales iónicos (Ambrogini et al., 2004; Piatti et al., 2006). La capacitancia de la membrana se define como la capacidad para almacenar carga eléctrica, y es directamente

proporcional a la cantidad de membrana celular que posea la neurona. Este valor tampoco sufrió cambios con la estimulación a 40 Hz, lo que sugiere que las CGs de animales estimulados presentan más canales en la membrana sin aumentar su volumen (Figura 24B).

Cabe destacar que, en esta etapa del desarrollo, ni las CGs del grupo control ni las del grupo AuViS dispararon potenciales de acción en respuesta a inyecciones de corriente, lo que limitó el estudio comparativo de propiedades como la excitabilidad o la conectividad. Por este motivo, se decidió registrar CGs a una edad más avanzada.

4.5.2. Efectos de AuViS sobre las propiedades electrofisiológicas de CGs de 24 días

Para este experimento se utilizó el mismo protocolo de la sección anterior, con la salvedad de que los animales fueron expuestos a AuViS durante 24 días. Se registraron las células Tom$^+$ en ambos grupos (Figura 25A).

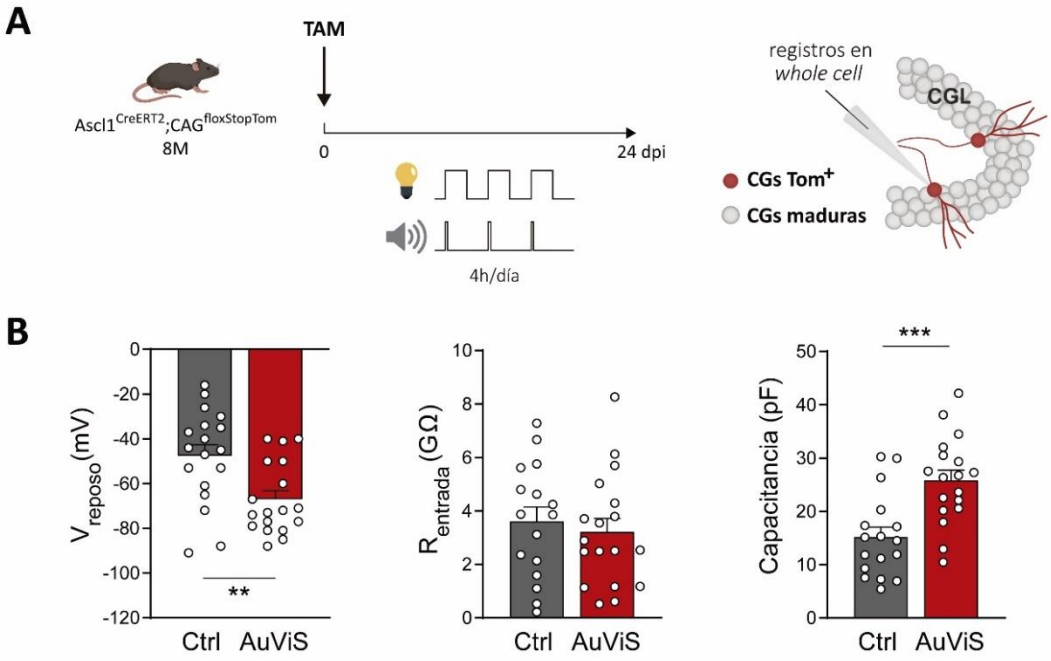

Figura 25. La estimulación audiovisual gamma acelera la maduración de propiedades pasivas de membrana en neuronas nacidas en animales envejecidos. (A) Diseño experimental. Ratones Ascl1^{CreERT2};CAG^{floxStopTom} de 8M recibieron tamoxifeno para marcar neuronas nuevas y fueron expuestos a AuViS a 40 Hz. Se prepararon rodajas de hipocampo 24 días después de la inyección para evaluar las propiedades intrínsecas y la conectividad mediante registros en *whole-cell* de CGs Tom$^+$. (B) Potencial de reposo, resistencia de entrada y capacitancia de CGs Tom$^+$ de ratones expuestos a una estimulación audiovisual a 40 Hz 4h/día durante 24 días o de ratones sin estimulación

(Ctrl). Tamaño de las muestras (neuronas/ratones): 17/3 (Ctrl) y 18/4 (AuViS). (**) y (***) indican $p < 0.01$ y $p < 0.001$ tras la prueba de Mann-Whitney. Los registros y el análisis se realizaron en conjunto con Mariela Trinchero.

En este caso, las neuronas de los animales expuestos a AuViS presentaron un potencial de reposo más hiperpolarizado, sin cambios en la cantidad de canales ($R_{entrada}$). Por otro lado, la capacitancia fue mayor en las neuronas del grupo estimulado con AuViS, lo que sugiere una mayor superficie de membrana (Figura 25B).

Con el objetivo de analizar la capacidad de estas células de disparar potenciales de acción, se utilizó la configuración *current clamp* para inyectar pulsos crecientes de corriente de 10 pA y se observaron las respuestas evocadas (Figura 26A). Se analizó el umbral de corriente necesaria para provocar el primer potencial de acción (I_{umbral}), donde células de ambos grupos no presentaron diferencias (Figura 26B). Corroborando lo observado en los trazos del panel A, la cuantificación de la cantidad máxima de potenciales de acción disparados por una célula fue 4 veces mayor en las neuronas del grupo AuViS, presentando un incremento significativo en comparación con el grupo control (Figura 26C). Al analizar en detalle la cantidad de disparos de potenciales de acción en respuesta a un pulso particular de corriente, se observó que a partir de los 30 pA las neuronas del grupo AuViS presentan una mayor cantidad de respuestas en promedio que las del grupo control (Figura 26D).

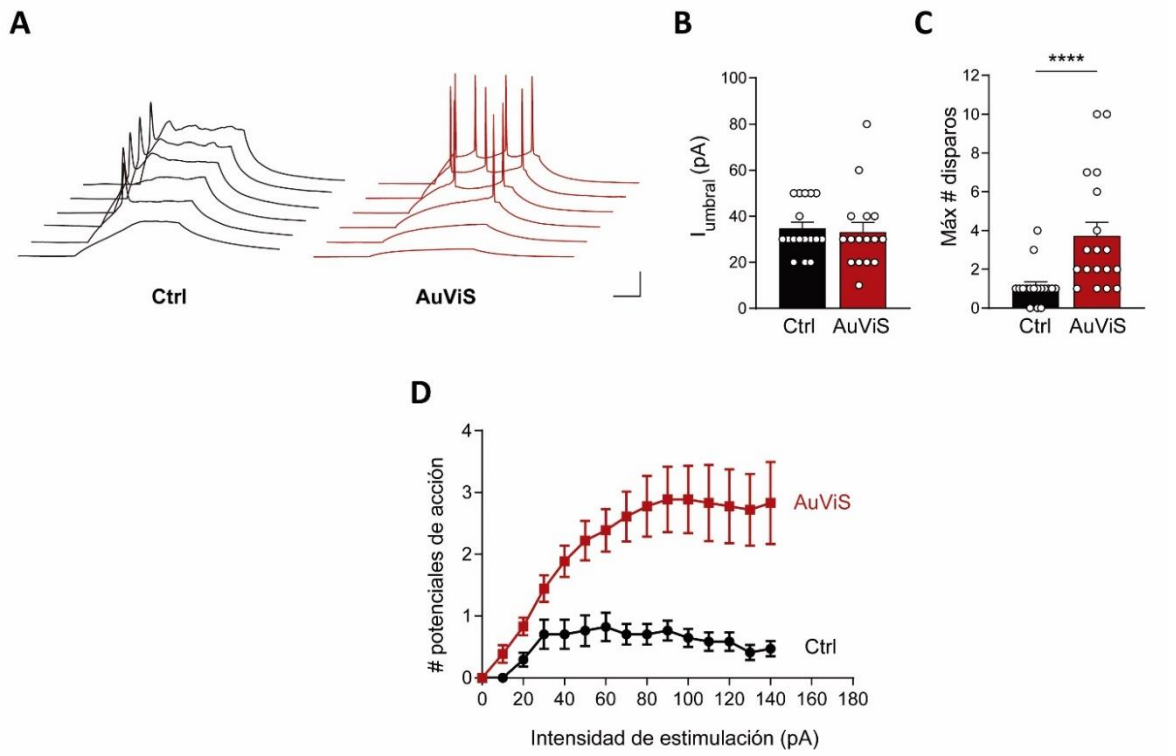

Figura 26. La estimulación audiovisual gamma acelera la maduración de la excitabilidad de neuronas nacidas en animales envejecidos. (A) Registros representativos en configuración *whole cell current-clamp* para pulsos crecientes de corriente en CGs de 24 dpi del grupo Control (negro) y AuViS (rojo). Escala: 25 mV, 50 ms. (B) Umbral de corriente para provocar el primer potencial de acción. (C) Número máximo de potenciales de acción provocados por una despolarización escalonada. Tamaño de las muestras (neuronas/ratones): 17/3 (Ctrl) y 18/4 (AuViS). (****) indica $p < 0.0001$ tras la prueba de Mann-Whitney. (D) Número de potenciales de acción provocados por pulsos de corriente despolarizantes y de amplitud creciente (pulsos de 10 pA). El potencial de reposo se mantuvo a -70 mV. Tamaño de las muestras (neuronas/ratones): 15/3 (Ctrl) y 15/4 (AuViS). Los datos representan la media ± SEM. Los registros y el análisis se realizaron en conjunto con Mariela Trinchero.

Por último, se estudió si AuViS promueve la integración sináptica de las nuevas CGs. Se utilizó la configuración *voltage clamp* para analizar las corrientes postinápticas excitatorias espontáneas (sEPSCs). Los eventos presentes en estos registros son consecuencia de la unión de neurotransmisores a los receptores de la neurona postsináptica registrada y la posterior apertura de canales iónicos. El flujo de iones a través de estos canales modifica la corriente basal de membrana como se observa en los trazos representativos (Figura 27A).

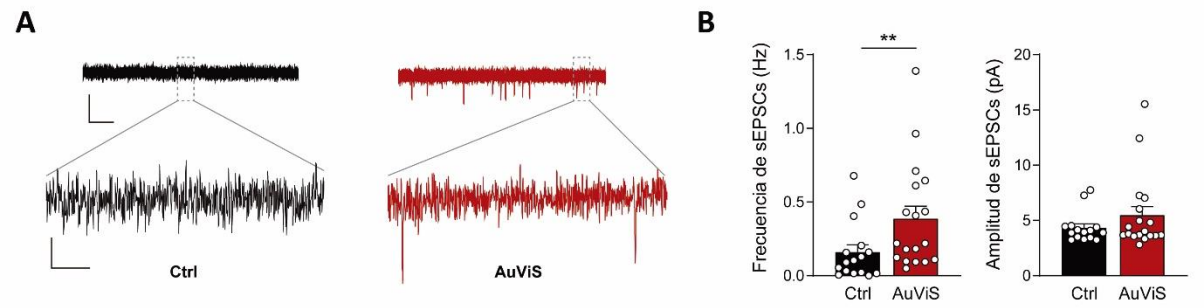

Figura 27. La estimulación audiovisual gamma acelera la maduración de *inputs* glutamatérgicos de neuronas nacidas en animales envejecidos. (A) Trazos representativos de sEPSCs en configuración *whole cell voltage-clamp*, registrados a -70 mV y correspondientes a CGs Tom^+ de los grupos Ctrl (negro) y AuViS (rojo). En el trazo expandido (abajo) se observan eventos individuales. Escalas: 10 pA, 1 s (arriba); 1 pA, 25 ms (abajo). (B) Frecuencia y amplitud de sEPSCs medidos durante 120 s. (**) indica $p < 0.01$ tras la prueba de Mann-Whitney. Tamaño de las muestras (neuronas/ratones): 16/3 (Ctrl) y 18/4 (AuViS). Las barras horizontales indican la media ± SEM. Los registros y el análisis se realizaron en conjunto con Mariela Trinchero.

Se observó que las células del grupo tratado presentaron un aumento significativo en la frecuencia de sEPSCs con respecto al grupo control. Este resultado indica que las CGs del grupo AuViS presentan una mayor conectividad con aferencias de la corteza entorrinal, fuente principal de información somatosensorial del hipocampo. Por otro lado, la amplitud de estos eventos es indicadora de mayor cantidad de receptores en la membrana y, en concordancia con los valores de $R_{entrada}$ mostrados previamente, esta característica no presenta diferencias entre ambos grupos (Figura 27B).

Los resultados obtenidos en esta sección muestran que la estimulación audiovisual a 40 Hz acelera el desarrollo de la conectividad glutamatérgica de estas células mediante un aumento en el número de sinapsis, pero no en su fuerza.

En conjunto, los resultados presentados hasta el momento refuerzan la hipótesis de que AuViS acelera la maduración y la integración funcional de las neuronas nuevas nacidas en ratones envejecidos, induciendo cambios plásticos en el nicho que podrían contribuir a las mejoras observadas en tareas asociadas con el aprendizaje y la memoria en modelos animales de EA.

4.6. Rol de la vía de señalización de neurotrofinas en los efectos de la estimulación audiovisual a 40 Hz

Trabajos previos de nuestro laboratorio han mostrado que la modulación dependiente de actividad promovida por el ejercicio físico esta mediada por neurotrofinas (Trinchero et al., 2017). Debido a que AuViS aumenta la actividad del giro dentado, nos preguntamos si los efectos promovidos por esta estimulación podrían deberse a un incremento de las vías de señalización de neurotrofinas en respuesta a la actividad (Kuczewski et al., 2008; Matsuda et al., 2009; Trinchero et al., 2017). Para poner a prueba esta hipótesis, se decidió estudiar si una regulación negativa de estas vías afecta la respuesta de las nuevas CGs a la estimulación con AuViS.

Ratones de 8M fueron inyectados en su giro dentado derecho con un retrovirus diseñado para sobreexpresar Lrig1 (un regulador negativo del receptor de neurotrofinas TrkB (Alsina et al., 2016) y expuestos a AuViS durante 17 días (AuViS + oeLrig1). Un trabajo previo del laboratorio demostró que la inyección de oeLrig1 en animales control de 8M no genera cambios significativos con respecto a los controles inyectados con RV-GFP, por lo que no se realizó este control (Trinchero et al., 2017). Los animales Control y AuViS fueron inyectados con un RV-GFP como se describió previamente (Figura 28A).

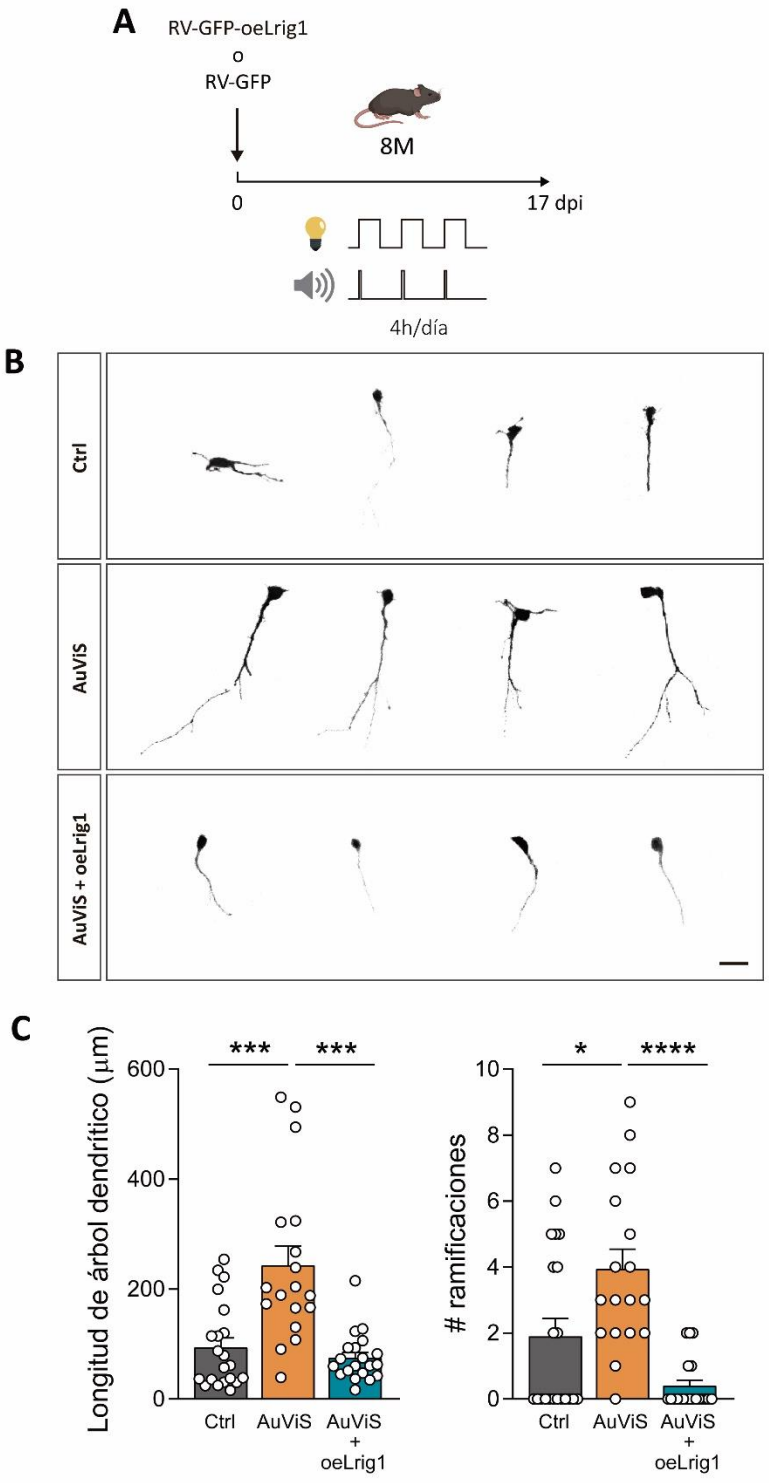

Figura 28. El bloqueo de la señalización de neurotrofinas mediante la sobreexpresión de Lrig1 inhibe los efectos de AuViS en las neuronas nacidas en animales envejecidos. (A) Diseño experimental. Ratones de 8M fueron inyectados con un RV-GFP-oeLrig1 o RV-GFP (Ctrl) para marcar neuronas nuevas. Los animales fueron alojados en jaulas control o expuestos a AuViS durante 17 días. (B) Imágenes confocales representativas de nuevas CGs GFP^+ de 17 dpi correspondientes a los diferentes grupos. Las neuronas individuales se recortaron a partir de las imágenes originales. Escala, 20 µm. (C) Análisis de la complejidad del árbol dendrítico (longitud y ramificaciones) para los diferentes grupos. (*) y (***) indican $p < 0.05$ y $p < 0.001$ tras la prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba post hoc de Dunn. Tamaño de las muestras (neuronas/ratones): 21/3 (Ctrl), 18/3 (AuViS) y 20/3 (AuViS + oeLrig1). Las barras horizontales indican la media ± SEM.

Las células GFP^+ fueron analizadas mediante microscopía confocal 17 días después de la inyección (Figura 28B). En concordancia con resultados anteriores, las nuevas CGs de los animales expuestos a AuViS presentaron un incremento del doble en la longitud y complejidad de su árbol dendrítico (Figura 28C). No obstante, la sobreexpresión de Lrig1 en las nuevas CGs bloqueó por completo la modulación positiva ejercida por AuViS sobre su crecimiento dendrítico (Figura 28C). Estos resultados destacan el importante rol que cumple la vía de señalización de neurotrofinas en los efectos promovidos por AuViS.

Estudios previos han demostrado que el factor neurotrófico BDNF tiene un rol crucial en la plasticidad pre y postsináptica (Gärtner et al., 2006; Xu et al., 2000). Su síntesis y secreción dependen de la actividad neuronal (Chen et al., 2003; Kuczewski et al., 2008) y se ha demostrado que el ejercicio físico aumenta los niveles de ARN mensajero en el hipocampo (Neeper et al., 1996).

Dado que los resultados presentados anteriormente indican que la vía de señalización de neurotrofinas está involucrada en los efectos de AuViS, se evaluó si un incremento en los niveles de ARN mensajero de BDNF podría estar contribuyendo a los efectos ejercidos por este tratamiento. Para ello, animales de 8M fueron expuestos a 17 días de AuViS a 40 Hz (Figura 29A). Como control negativo se utilizó un grupo sin exposición y como control positivo un grupo de ratones expuestos a ejercicio físico voluntario (Run). Posteriormente se analizó el nivel de expresión del mensajero de *BDNF* mediante hibridación *in situ* inmunofluorescente (RNAscope) (Figura 29B).

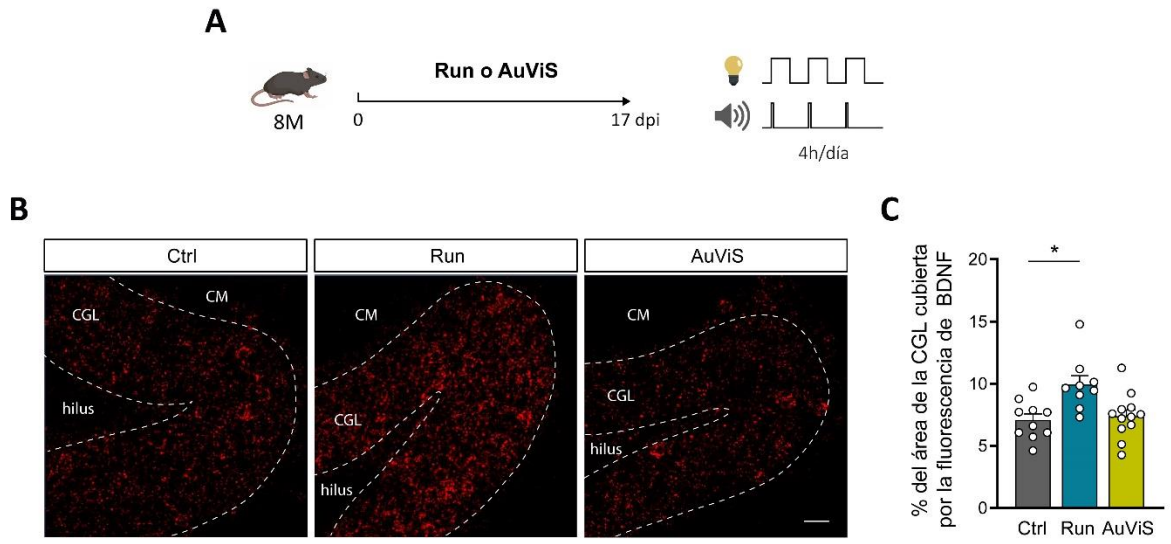

Figura 29. AuViS no aumenta la transcripción de BDNF en la capa granular. (A) Diseño experimental. Ratones de 8M fueron alojados en jaulas control o expuestos a AuViS o Run durante 17 días. (B) Hibridación in situ revelando la expresión de BDNF (rojo) en la capa granular. Barra de escala, 50 µm. Las líneas discontinuas delimitan la capa granular. (C) Área de la capa granular que presenta fluorescencia de BDNF en ratones control, Run y AuViS. Tamaño de las muestras (secciones/ratones): 10/3 (Ctrl); 9/3 3 (Run); 12/3 (AuViS). (*) indica $p < 0.05$ tras la prueba de ANOVA con un post test de Tukey. Las barras horizontales indican la media ± SEM.

El ejercicio físico, como se había reportado previamente, resultó en un marcado aumento de la transcripción de *BDNF* (Figura 29C). Por el contrario, 17 días de AuViS no lograron promover un aumento significativo en los niveles de expresión de este factor (Figura 29C).

Este resultado sugiere que podría existir otro mecanismo que facilite la señalización de la vía de neurotrofinas en respuesta a AuViS, independiente de un aumento en la expresión de BDNF.

4.7. Efectos de AuViS en la proliferación celular y la neurogénesis en el cerebro envejecido

Los resultados mostrados previamente resaltan los beneficios que ejerce AuViS a 40 Hz durante el desarrollo de las neuronas que nacen en un nicho envejecido. Sin embargo, aún se desconoce qué ocurre con los progenitores que se encuentran en las subcapas internas de la capa granular, donde se observó un aumento de la actividad en respuesta a la estimulación (Figura 14).

Para responder esta pregunta, utilizamos ratones de 11M, donde la tasa neurogénica es aún más baja que en animales de 8M (Kempermann et al., 1998b; Morgenstern et al., 2008). Para evaluar los efectos de AuViS sobre la proliferación y el destino celular de los progenitores, los animales fueron expuestos a AuViS durante 1 mes previo (AuViS 1M) o 1 mes y 3 semanas (AuViS 1M + 21d) posteriores a una inyección con BrdU para marcar progenitores en división (Figura 30A).

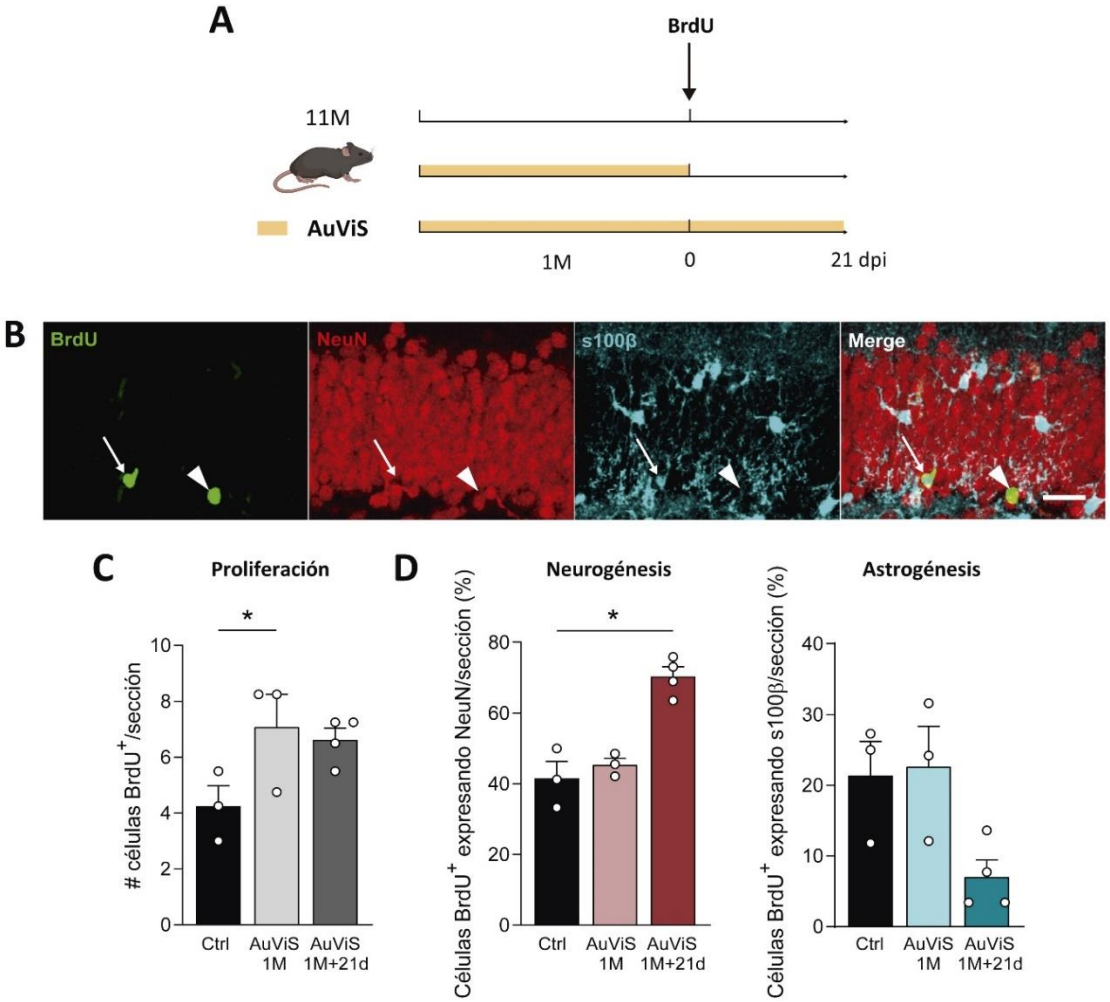

Figura 30. AuViS aumenta la proliferación celular y la neurogénesis en el cerebro envejecido. (A) Diseño experimental. Ratones de 11M fueron expuestos a AuViS a 40 Hz durante un mes (1M) o un mes y 21 días después de una inyección con BrdU para marcar células progenitoras en división. (B) Imágenes representativas que muestran células $BrdU^+$ (verde) de 21 días de edad, ya sean neuronas ($NeuN^+$: rojo, cabeza de flecha) o atrocitos ($s100\beta^+$: azul, flecha). Barra de escala, 30 µm. (C) Número total de células $BrdU^+$ por sección para las tres condiciones. (D) Porcentaje de células $BrdU^+$ que expresan NeuN (izquierda) o s100β (derecha) indicando neurogénesis o astrogénesis respectivamente. (*) denota $p < 0.05$ tras la prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba post-hoc de Dunn para comparaciones múltiples. N=3, 3 y 4 ratones para Ctrl, AuViS 1M y AuViS 1M+21d respectivamente. Las barras horizontales indican la media ± SEM. La toma de imágenes y el análisis fueron realizadas por Andrea Aguilar Arredondo.

El número de células positivas para BrdU se cuantificó 21 días luego de la inyección en todos los grupos. Se observó un aumento significativo en el número de células $BrdU^+$ de animales con un mes de estimulación con AuViS previo a la inyección, lo que indica una mayor proliferación de progenitores neurales en el nicho estimulado (Figura 30C). Los progenitores pueden dar lugar a diferentes tipos celulares, como neuronas, astrocitos u oligodendrocitos (Kim et al., 2007; Parras et al., 2004). Dado que sólo una fracción ínfima da lugar a este último tipo celular, se realizó una triple inmunofluorescencia para BrdU, el marcador neuronal NeuN y el marcador de astrocitos s100β para evaluar la fracción de células que adquirieron estos perfiles (Figura 30B). La estimulación con AuViS durante el mes previo al marcado de los progenitores no modificó el destino celular de los mismos en el grupo AuViS + 1M. Sin embargo, el tratamiento con AuViS posterior a la inyección de BrdU aumentó significativamente la diferenciación neuronal a expensas de la producción de astrocitos (Figura 30D).

Estos hallazgos demuestran que la estimulación crónica con AuViS promueve el remodelado de circuitos en el cerebro envejecido a través de la neurogénesis.

4.8. Efectos de AuViS en el comportamiento de animales de mediana edad

Los resultados obtenidos hasta el momento demuestran que la estimulación multisensorial con AuViS acelera el desarrollo estructural y funcional de nuevas CGs nacidas en el hipocampo adulto. Dado que el hipocampo juega un papel crucial en procesos como la memoria espacial y la formación de memorias episódicas, nos preguntamos si estos cambios sinápticos se reflejan en mejoras en tareas cognitivas dependientes de esta región.

El envejecimiento se asocia a un deterioro en el rendimiento de la memoria de reconocimiento, que consiste en la capacidad de discriminar entre estímulos familiares y novedosos (Belblidia et al., 2018; Burke et al., 2010). Para evaluar los efectos de AuViS sobre la cognición, se utilizó el test de NOR. Este test se basa en la tendencia natural de los roedores a explorar objetos nuevos y en la cantidad de tiempo

que pasan explorando los objetos presentados, y permite establecer inferencias sobre la memoria (Leger et al., 2013) (Ver métodos).

Animales de 8M fueron expuestos a AuViS a 40 Hz durante 17 días. Al finalizar este periodo se realizó un test de campo abierto (*open field)* (Figura 31A). Esta prueba se utiliza para analizar la actividad locomotora y comportamientos asociados con la ansiedad (Kraeuter et al., 2019) (Ver métodos). En este caso, se realizó antes del NOR para descartar posibles alteraciones en la locomoción que pudieran influir en la exploración de los objetos y, por lo tanto, en la posterior interpretación del desempeño cognitivo.

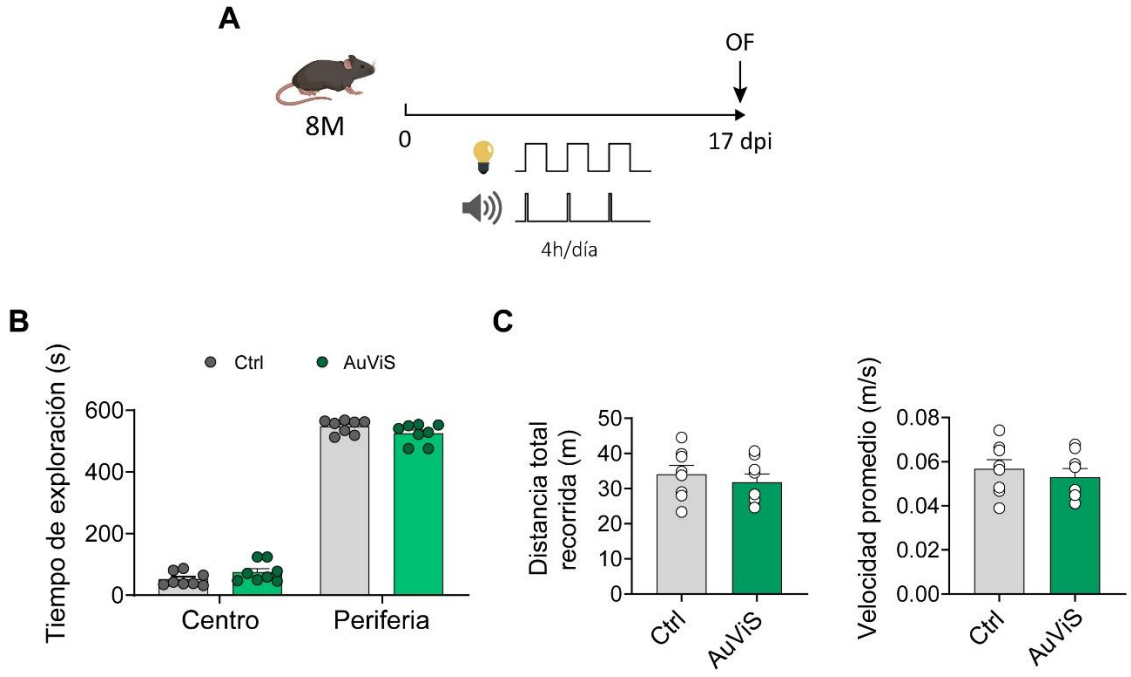

Figura 31. AuViS no modifica la actividad locomotora ni el comportamiento asociado a la ansiedad en animales de mediana edad. (A) Diseño experimental. Ratones de 8M fueron expuestos a AuViS a 40 Hz durante 17 días y luego sometidos a un *open field* (OF). (B) Tiempo de exploración en un *open field*. Se permitió que los animales exploraran la arena durante 10 minutos y se evaluó el tiempo que permanecieron explorando el centro y la periferia. (C) Distancia total recorrida medida en metros y velocidad promedio de los animales. Tamaño de las muestras (ratones): 7 (8M Ctrl); 8 (8M AuViS). Las barras horizontales indican la media ± SEM. Los experimentos y el análisis fueron realizados en conjunto con Odra Santander.

Los animales pertenecientes al grupo estimulado no mostraron diferencias significativas en el tiempo dedicado a explorar el centro o la periferia en comparación con los controles (Figura 31B). Asimismo, no se observaron diferencias en la distancia total recorrida ni en la velocidad promedio (Figura 31C), lo que sugiere que la

estimulación multisensorial a 40 Hz no afecta de manera significativa los valores basales de actividad locomotora ni los niveles de ansiedad en animales de mediana edad.

Posteriormente, se llevó a cabo el test de NOR para evaluar la memoria de reconocimiento (Figura 32A).

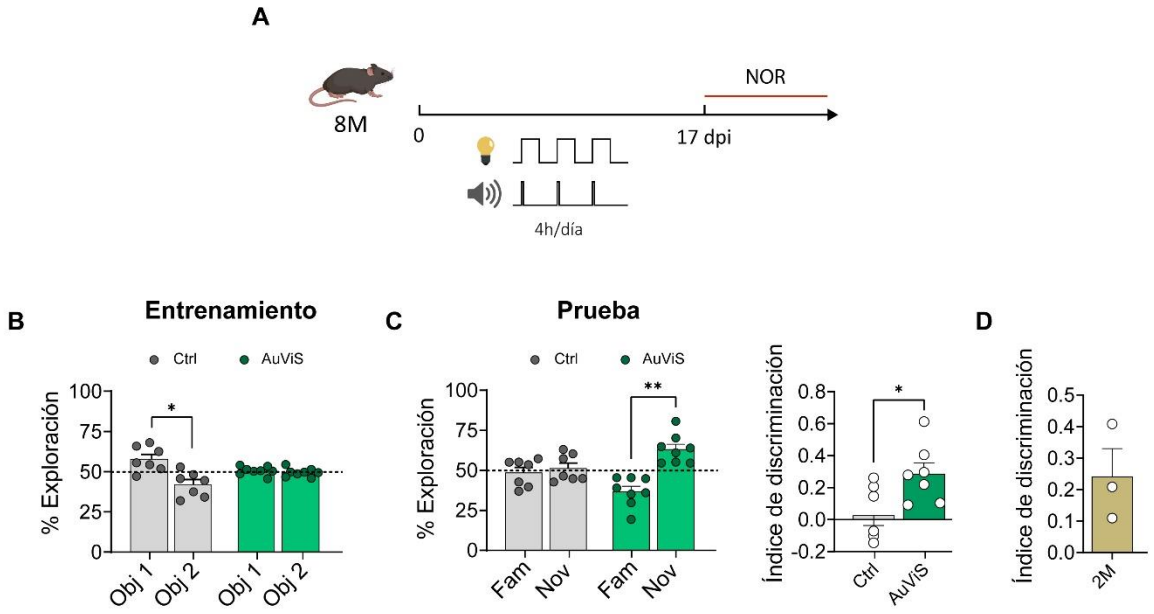

Figura 32. AuViS mejora el rendimiento de ratones envejecidos en la memoria de reconocimiento de objetos. (A) Diseño experimental. Ratones de 8M fueron expuestos a AuViS a 40 Hz durante 17 días. Al día 18 se realizó el entrenamiento según el protocolo y el último día se llevó a cabo el test. (B) Entrenamiento. Porcentaje del tiempo total del test ocupado en la exploración de los dos objetos iguales para ambos grupos. (C) Prueba. Panel izquierdo: Porcentaje del tiempo total del test ocupado en la exploración del objeto familiar y el novedoso para cada grupo experimental en el NOR. Fam: Objeto Familiar. Nov: Objeto Novedoso. Panel derecho: Índice de discriminación. (D) Índice de discriminación para el NOR realizado con animales jóvenes (2M) sin estimulación. (*) denota $p < 0.05$ tras un test de t no pareado en C. (*) y (**) denotan $p < 0.05$ y $p < 0.01$ tras un ANOVA de dos factores en B y C. Tamaño de las muestras (ratones): 7 (8M Ctrl); 8 (8M AuViS); 3 (2 M Ctrl). Las barras horizontales indican la media ± SEM. Los experimentos y el análisis fueron realizados en conjunto con Odra Santander.

En el día de entrenamiento, donde se presentaron dos objetos idénticos, se observó que los animales pertenecientes al grupo control exploraron durante más tiempo uno objeto, mientras que los animales expuestos a AuViS exploraron ambos por igual (Figura 32B). Estudios previos han mostrado resultados similares en esta fase, atribuidos al uso de hembras en lugar de machos (Frick and Gresack, 2003).

Teniendo en cuenta que en este experimento se utilizaron 6 hembras y 2 machos, es probable que la preferencia observada en los controles sea debido al sexo del animal. Sin embargo, el grupo AuViS estaba compuesto por la misma distribución de sexos, lo cual sugiere que la estimulación podría corregir el sesgo en el entrenamiento presentado por hembras de mediana edad (Figura 32B).

El día de la prueba se observó que los animales envejecidos del grupo control no presentaron una preferencia significativa por ninguno de los objetos, lo que sugiere que no lograron reconocer cuál era el objeto familiar y cuál el novedoso (Figura 32C). En contraste, el grupo de animales envejecidos sometidos a la estimulación con AuViS mostró un aumento significativo en el porcentaje de exploración del objeto novedoso, lo que refleja una mejora cognitiva en términos de la memoria de reconocimiento (Figura 32C). Este resultado se torna más evidente al analizar el índice de discriminación, donde valores positivos indican la capacidad de distinguir entre ambos objetos, mientras que valores negativos reflejan dificultades en esta distinción (Figura 32C). Al comparar este índice con resultados previos obtenidos en animales jóvenes, se observó que los animales envejecidos expuestos a AuViS presentan un comportamiento similar a los animales de 2M (Figura 32D).

Los resultados presentados a lo largo de esta tesis destacan el potencial de la estimulación multisensorial a 40 Hz para fomentar la neurogénesis en el cerebro envejecido. Sus efectos abarcan múltiples niveles, desde el incremento de la población de progenitores en proliferación, su diferenciación a neuronas, así como la aceleración de su desarrollo y su integración en el circuito local, impactando directamente en la cognición de los animales.

5. Discusión

Comprender los mecanismos subyacentes a la senescencia cerebral es fundamental, ya que el envejecimiento representa el principal factor de riesgo para la degeneración del sistema nervioso. En este contexto, las oscilaciones cerebrales en frecuencia gamma han surgido como un actor clave en el mantenimiento de la función cognitiva, particularmente en el envejecimiento y las enfermedades neurodegenerativas, como la EA (Buzsáki, 2015; Carr et al., 2012; Cole and Voytek, 2017; Fries, 2005; Gonzalez-Perez et al., 2019; Grent-'t-Jong et al., 2018). De hecho, las alteraciones de estas oscilaciones se han relacionado con la disfunción sináptica y el deterioro cognitivo presentes en estas condiciones (Guan et al., 2022; Iaccarino et al., 2016; Mably and Colgin, 2018; Yamamoto et al., 2014). La literatura sugiere que 40 Hz es la frecuencia *target* más relevante (Etter et al., 2019; Iaccarino et al., 2016; Jones et al., 2019), ya que se ha reportado que la disrupción de las oscilaciones gamma y su modulación en la EA involucran principalmente la actividad a 40 Hz en comparación con otras frecuencias (Jafari et al., 2020; Llinas and Ribary, 1993). Un trabajo reciente demostró que la oscilación gamma endógena y la oscilación inducida por la estimulación sensorial a 40 Hz son fenómenos neurofisiológicos espacialmente distintos en la corteza visual (Duecker et al., 2021). A pesar de esto, trabajos previos han demostrado que la estimulación multisensorial no invasiva a 40 Hz puede restaurar las oscilaciones gamma y promover la eliminación de Aβ en la corteza visual, auditiva, el hipocampo y la corteza prefrontal, como también mejorar la memoria en modelos murinos de la EA (Adaikkan et al., 2019; Huang et al., 2023; Iaccarino et al., 2016; Martorell et al., 2019; Shen et al., 2022). Estos efectos terapéuticos han sido validados en diversos modelos de enfermedades neurológicas, aunque con algunas excepciones atribuibles a variaciones metodológicas (Soula et al., 2023), lo que resalta la necesidad de continuar evaluando la viabilidad de este tratamiento en diferentes modelos y condiciones. Un aspecto de los efectos generales de este tratamiento aún inexplorado es la plasticidad dependiente de la actividad necesaria para revertir el impacto del envejecimiento y la EA en el rendimiento de la memoria. En esta tesis, estudiamos los efectos de la estimulación multisensorial a 40 Hz sobre el desarrollo y la conectividad de las neuronas recién nacidas en el hipocampo de animales de mediana edad, aprovechando la capacidad de la neurogénesis adulta para responder a estímulos que incrementan la actividad de la red local.

Modulación de la actividad hipocampal por la estimulación sensorial gamma

Diversos estudios han mostrado cómo patrones de estímulos sensoriales pueden modular oscilaciones en el rango gamma en diversas regiones corticales, tanto en humanos como en modelos animales (Gray and Singer, 1989; Herrmann, 2001; Pastor et al., 2003; Rager and Singer, 1998). En particular, la estimulación visual a 40 Hz aumenta la potencia de las oscilaciones gamma en múltiples áreas, incluyendo la corteza visual primaria, la corteza prefrontal y la región de CA1 del hipocampo (Adaikkan et al., 2019; Chan et al., 2022; Iaccarino et al., 2016). En concordancia con estos trabajos, nuestros registros de potencial de campo *in vivo* revelaron que la estimulación visual gamma promueve un aumento de la componente de 40 Hz en la actividad local del giro dentado en animales de mediana edad (Figura 10). Dado que el hipocampo no recibe aferencia directa desde la retina (Martersteck et al., 2017), estos efectos deben ser mediados por circuitos de regiones cerebrales que son regulados directamente por la estimulación con luz. Trabajos recientes demostraron que la exposición a una luz brillante activa un circuito visual que conecta al núcleo reuniens, una región talámica clave en la comunicación entre regiones corticales que reciben información sensorial, y el hipocampo (Huang et al., 2021). En este circuito, células ganglionares de la retina inervan células excitatorias del núcleo geniculado lateral, un centro de procesamiento primario de la información visual, las cuales a su vez activan neuronas excitatorias en el núcleo reuniens. Una exposición de 3 semanas a luz brillante incrementó las oscilaciones gamma en CA1, efecto que se replicó al estimular optogenéticamente a las neuronas del núcleo reuniens y fue bloqueado al inactivarlas (Huang et al., 2021). Una hipótesis planteada por este trabajo sugiere que, dado que los inputs de la corteza entorrinal medial están implicados en la generación de las oscilaciones gamma hipocampales (Colgin and Moser, 2010; Yamamoto et al., 2014), y que las neuronas del núcleo reuniens pueden proyectar hacia la corteza entorrinal medial, el tratamiento con luz podría regular las oscilaciones gamma hipocampales por esta vía (Figura 33) (Huang et al., 2021).

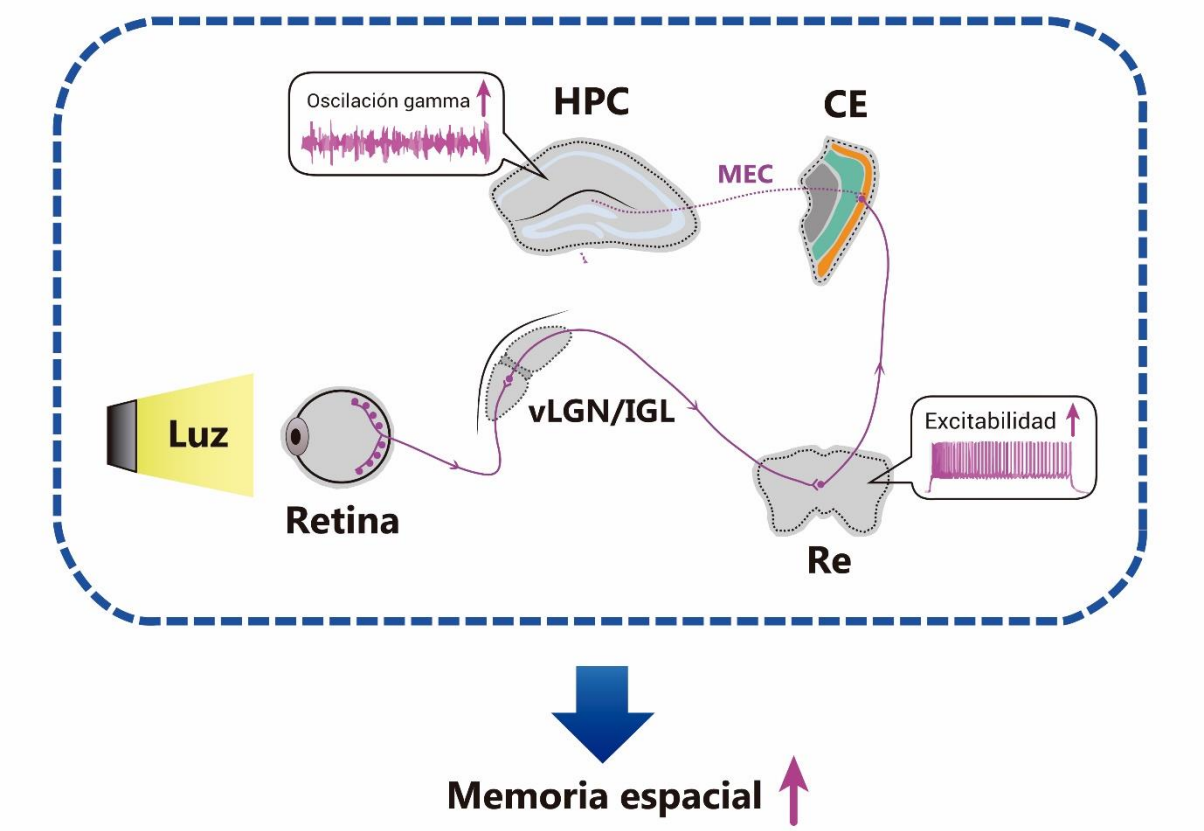

Figura 33. Un circuito visual subcortical relacionado con el núcleo reuniens media los efectos del tratamiento con luz en la memoria espacial. Esquema que muestra cómo un estímulo lumínico activa un subconjunto de células ganglionares de la retina, las cuales inervan neuronas en el núcleo geniculado ventral lateral talámico (vLGN/IGL). A su vez, neuronas de esta región contactan y activan neuronas del núcleo reuniens (Re), el cual inerva a la corteza entorrinal medial (MEC) y esta al hipocampo (HPC), promoviendo el aumento de las oscilaciones gamma hipocampales. La activación específica de cualquiera de estas células es suficiente para promover mejoras en la memoria espacial. Adaptado de Huang et al., 2021.

Previamente se describió que la estimulación visual a 40 Hz aumenta la actividad neuronal en diversas áreas más allá de la corteza visual (Adaikkan et al., 2019). Nuestros hallazgos indican que AuViS a 40 Hz (pero no una frecuencia aleatoria) activa preferentemente la ZSG el giro dentado (Figura 14). Esta región, el nicho neurogénico donde residen las RGL, presenta una elevada vascularización y, de hecho, estas células contactan directamente los vasos, lo que les permite un acceso constante tanto a oxígeno y nutrientes, como a moléculas señalizadoras que regulan su quiescencia, proliferación, autorrenovación y diferenciación (Karakatsani et al., 2023; Palmer et al., 2000; Sun et al., 2015). El impacto de la estimulación gamma sobre el sistema vascular ha sido descripto en diversos trabajos (Blanco-Duque et al., 2024). La estimulación auditiva a 40 Hz aumenta el diámetro de los

vasos sanguíneos en la corteza auditiva y el hipocampo de ratones 5XFAD, efecto que persiste al menos 24 horas post-estimulación (Martorell et al., 2019). A su vez, estudios realizados en humanos demostraron también que tanto la estimulación visual como auditiva a 40 Hz pueden modular el flujo sanguíneo cerebral (Pastor et al., 2002; Pastor et al., 2003; Sprugnoli et al., 2021). Además del sistema vascular, el cerebro cuenta con el sistema glinfático, encargado de la eliminación de desechos mediante el flujo del líquido cefalorraquídeo a través del espacio perivascular (Hablitz and Nedergaard, 2021; Jessen et al., 2015). Dentro de sus funciones se encuentra la depuración de metabolitos tóxicos, como la Aβ y la tau, por lo que su disfunción ha sido asociada con el envejecimiento y la EA (Nedergaard and Goldman, 2020). Recientemente, se demostró que la estimulación audiovisual gamma favorece la eliminación de Aβ en la corteza de animales 5XFAD mediante el aumento de la actividad del sistema glinfático, efecto que se revierte tras su inhibición (Murdock et al., 2024).

Teniendo en cuenta el alto grado de vascularización que presenta la ZSG, la activación del sistema glinfático y el aumento en el flujo sanguíneo promovidos por la estimulación a 40 Hz podrían contribuir no solo a la eliminación de residuos, sino también a una mejor distribución de glucosa, lípidos, aminoácidos y neurotransmisores. Esto a su vez, podría favorecer un entorno óptimo para la activación, proliferación y diferenciación de neuronas nuevas en la ZSG (Hablitz and Nedergaard, 2021; Jessen et al., 2015).

Cambios estructurales y funcionales de las nuevas CGs en respuesta a AuViS

Trabajos previos del laboratorio han demostrado que estímulos que aumentan la actividad de la capa granular impactan directamente el desarrollo morfológico de las nuevas CGs (Alvarez et al., 2016; Piatti et al., 2011; Trinchero et al., 2017; Trinchero et al., 2019a). En este trabajo de tesis observamos que AuViS a 40 Hz acelera el desarrollo dendrítico y axonal de CGs de 17 días de edad de forma específica en animales de 8 meses (Figura 15). Estas CGs presentaron un árbol semejante al de neuronas de entre 3 y 4 semanas, con un incremento del doble en la longitud del mismo con respecto al control (Trinchero et al., 2017). Por otro lado, sus terminales presinápticos presentaron una morfología más madura que los controles, al punto de

ser comparables a los correspondientes a una neurona de 4 semanas de edad (Trinchero et al., 2019a) (Figura 15). Esta aceleración podría atribuirse a diferentes mecanismos. El enriquecimiento ambiental, por ejemplo, promueve la activación de CGs maduras en la capa granular, las cuales activan interneuronas PV^+ que finalmente despolarizan a las nuevas CGs y promueven su maduración (Alvarez et al., 2016). El rol que cumplen las interneuronas PV^+ en la generación de las oscilaciones gamma ha sido ampliamente discutido en la literatura (Bartos et al., 2007; Buzsáki and Wang, 2012; Cardin et al., 2009; Colgin, 2016; Colgin and Moser, 2010; Guan et al., 2022; Hadler et al., 2024; Manippa et al., 2022; Rivolta et al., 2015; Sohal et al., 2009; Verret et al., 2012). La primera evidencia de esta contribución fue la correlación encontrada entre sus disparos y la fase de las oscilaciones gamma en registros de campo en el hipocampo de ratas *in vivo* (Buzsáki and Vanderwolf, 1983). Los primeros trabajos utilizando la estimulación gamma como tratamiento en modelos de EA observaron que la estimulación optogenética de interneuronas PV+ (pero no neuronas glutamatérgicas) a 40 Hz promueve un aumento de la potencia de gamma en el LFP de CA1, una disminución en los niveles de Aβ y una mayor activación y colocalización de la microglía con las placas amiloides (Iaccarino et al., 2016). Por otro lado, el tratamiento con una dosis baja de picrotoxina, un antagonista del receptor $GABA_A$, anuló por completo los efectos de la estimulación visual a 40 Hz, sugiriendo que la neurotransmisión GABAérgica es fundamental para este tratamiento (Iaccarino et al., 2016). El neurotransmisor GABA presenta un perfil despolarizante durante la primera etapa de maduración neuronal, que se mantiene hasta luego de la segunda semana de desarrollo (Chancey et al., 2013; Tozuka et al., 2005). Un trabajo previo del laboratorio demostró que el enriquecimiento ambiental promueve la activación de CGs maduras en la capa granular, las cuales activan interneuronas PV^+ que, al liberar GABA, despolarizan a las nuevas CGs y promueven su maduración (Alvarez et al., 2016). Teniendo en cuenta todo lo expuesto, es probable que la aceleración en la maduración neuronal en respuesta a AuViS se deba a una activación de las PV^+ y, en consecuencia, de las nuevas CGs en desarrollo. Para abordar esta pregunta se podría realizar un experimento donde se silencien las interneuronas PV^+ durante la exposición a AuViS y se evalúe el desarrollo de las CGs. Para ello, se podría utilizar un virus adenoasociado (AAV) para expresar el receptor sintético acoplado a proteína G hM4Di en ratones que expresan la recombinasa CRE bajo el promotor de PV (PV-Cre), para bloquear la liberación de GABA desde las interneuronas PV^+ del giro

dentado tras la administración del agonista sintético CNO (Alvarez et al., 2016; Stachniak et al., 2014). Luego de una exposición a AuViS durante 17 días en presencia o ausencia de CNO se evaluaría si los efectos de la estimulación en el desarrollo de las CGs desaparecen en el grupo en el cual las interneuronas PV^+ están silenciadas. Esto podría determinar si la activación de las PV^+ es necesaria para los efectos mediados por AuViS.

Un estudio realizado por Goncalves y col, analizó el desarrollo de nuevas CGs en animales adultos de forma continua durante varias semanas para rastrear el destino de las dendritas individuales *in vivo* (Goncalves et al., 2016a). Este trabajo demostró que las CGs nacidas en el adulto experimentan un crecimiento seguido de una poda a lo largo de su desarrollo. Más aún, las CGs nacidas en animales expuestos a un ambiente enriquecido presentaron un mayor crecimiento seguido de una poda más exhaustiva en comparación con animales control. Este trabajo describió un mecanismo homeostático de poda dendrítica durante el desarrollo que controla la ramificación de las CGs, y se exacerba frente al crecimiento dependiente de actividad (Goncalves et al., 2016a). En nuestro trabajo, observamos una disminución en la longitud del árbol dendrítico en CGs de animales de 2M luego de 14 días de AuViS (Figura 18). Este efecto es llamativo, ya que sería contrario a lo observado en animales envejecidos. Esta modulación negativa podría deberse a la poda homeostática descripta previamente. Por otro lado, no se observaron cambios en respuesta a AuViS en las CGs de 7 y 21 días en animales de 2M. Dado que los efectos observados en el envejecimiento y en modelos de EA se atribuyen principalmente a la recuperación de alteraciones en las oscilaciones gamma, este resultado podría explicarse por la estabilidad de estas oscilaciones a edades tempranas, lo que sugiere que AuViS no produce un efecto positivo cuando el componente gamma está intacto (Murty et al., 2020).

Contribución de modalidades sensoriales a los efectos de AuViS

Se ha demostrado que la exposición a la luz promueve efectos beneficiosos en la función cognitiva en diferentes especies, incluyendo los humanos (Fernandez et al., 2018; Huang et al., 2021; Iaccarino et al., 2016). Como se expuso anteriormente, trabajos previos describieron un circuito visual que conecta al núcleo reuniens con el

hipocampo fomentando su comunicación, la cual es crítica para el procesamiento de información espacial (Huang et al., 2021). En concordancia, la estimulación lumínica a 40 Hz ha demostrado ser un tratamiento beneficioso para el aprendizaje y la memoria espacial en diversos modelos (Adaikkan et al., 2019; Huang et al., 2021; Iaccarino et al., 2016). Además de sus efectos sobre la cognición, la estimulación visual en frecuencia gamma ha mostrado efectos neuroprotectores en modelos murinos de neurodegeneración. En particular, se ha observado una reducción significativa en la pérdida neuronal en V1, CA1, la corteza somatosensorial y la corteza cingulada en modelos de EA, así como una disminución en los niveles de Aβ en sangre, lo que sugiere un rol de la microglía en la limpieza de placas (Adaikkan et al., 2019; Iaccarino et al., 2016). Asimismo, este tipo de estimulación también ha demostrado atenuar la pérdida de neuronas excitatorias en CA1 en modelos de ictus isquémico, donde normalmente se observa un aumento en marcadores de degeneración neuronal en esta área los días posteriores al evento isquémico, indicando muerte neuronal. Sin embargo, no se detectaron marcadores de degeneración en CA1 a los 14 días post estimulación (Zheng et al., 2020).

La vía auditiva contribuye a la memoria espacial activando los circuitos del hipocampo a través de múltiples conexiones, incluyendo proyecciones desde la corteza auditiva a la corteza entorrinal y vías subcorticales que involucran el tálamo y la amígdala (Billig et al., 2022). Estudios realizados en humanos investigaron la respuesta del cerebro a estímulos sonoros mediante la prueba de potenciales evocados auditivos, que evalúa la función del sistema auditivo desde el oído hasta el cerebro utilizando electrodos. Este trabajo demostró que trenes de estímulos a 40 Hz generan una respuesta cerebral estable y sincrónica en la corteza auditiva, con una amplitud máxima específica de la frecuencia gamma (Galambos et al., 1981). Asimismo, la estimulación auditiva a 40 Hz ha demostrado mejorar la memoria espacial y de reconocimiento en modelos de EA, junto con una disminución en los niveles de Aβ en sangre y en la fosforilación de Tau (Martorell et al., 2019). Por lo tanto, la luz y el sonido tienen la capacidad de remodelar circuitos neuronales resultando en una mejora en la cognición. Debido a las diferentes vías por las que estos estímulos alcanzan regiones más profundas del cerebro y a los cambios observados en modelos de EA con ambas modalidades de estimulación (Martorell et al., 2019), decidimos abordar la contribución de cada estímulo por separado. La

estimulación visual promovió un crecimiento dendrítico específico de la frecuencia, ya que a 8 Hz no produjo ningún efecto (Figuras 19 y 20). Otros estudios también habían probado frecuencias adicionales (20 y 80 Hz) sin encontrar un impacto significativo (Iaccarino et al., 2016). La estimulación auditiva a 40 Hz desencadenó cambios similares a los de la estimulación visual (Figura 22). Sin embargo, estos estímulos administrados individualmente no indujeron cambios en área o el número de filpodios de los terminales presinápticos, que conectan a las CGs con las células piramidales y con las interneuronas GABAérgicas en CA3, respectivamente (Figuras 21 y 23). Estudios anteriores habían demostrado que la estimulación auditiva y visual combinada producía una reducción más marcada de los niveles de Aβ en múltiples regiones corticales, más allá de las cortezas sensoriales (Martorell et al., 2019). Nuestros resultados están de acuerdo con el concepto de efectos más fuertes cuando se combinan estos estímulos, ya que la luz y el sonido juntos aceleraron tanto el crecimiento dendrítico como el desarrollo de los terminales presinápticos de las CGs. La sinergia observada en la estimulación audiovisual surge probablemente de la activación simultánea de múltiples vías neuronales, mejorando la sincronización gamma en toda la red, lo que fortalece la conectividad interregional (Adaikkan et al., 2019; Colgin and Moser, 2010). En línea con esto, se ha propuesto que la integración de señales sensoriales de diferentes modalidades no depende únicamente de interacciones anatómicas directas entre áreas corticales asociadas, sino que también involucra la sincronización de oscilaciones gamma. Estudios en humanos han demostrado que la estimulación transcraneal a 40 Hz potencia la integración sensorial al sincronizar oscilaciones gamma corticales durante tareas de asociación visual-táctil (Misselhorn et al., 2019). Teniendo en cuenta esto, es posible que la combinación de estimulación con luz y sonido promueva una mayor sincronización gamma entre la corteza visual y auditiva, lo cual facilita la comunicación entre áreas corticales y potencia la información que llega al hipocampo, impactando directamente la plasticidad estructural de las nuevas CGs.

Integración funcional de nuevas CGs por AuViS

AuViS facilitó la integración de las CGs en los circuitos hipocampales preexistentes, promoviendo la excitabilidad neuronal y la formación de sinapsis funcionales (Figuras

24 y 25). En animales jóvenes, se ha demostrado que estímulos que activan el hipocampo, como el ejercicio físico y el enriquecimiento ambiental, modulan la maduración y funcionalidad de las CGs (Alvarez et al., 2016; Piatti et al., 2011). Estudios realizados en la última década han demostrado que las CGs nacidas en un nicho envejecido no solo son capaces de detectar actividad y responder rápidamente, sino que además muestran respuestas aún mayores que las observadas en animales jóvenes (Trinchero et al., 2017; Trinchero et al., 2019a). En este contexto, el resultado observado en este trabajo resalta la capacidad que poseen las CGs nacidas en el cerebro envejecido para integrarse rápidamente al circuito ante una demanda por actividad, replicando, aunque en menor medida, los efectos previamente descriptos por nuestro laboratorio. Las diferencias en la magnitud de estos efectos podrían deberse a varios factores. En primer lugar, un factor clave es el rol activo o pasivo del animal en estos tratamientos. Mientras que en el ejercicio físico y el enriquecimiento ambiental el animal participa activamente en la experiencia, la estimulación con AuViS es completamente pasiva, lo que podría impactar en la forma en que las CGs perciben y responden al estímulo. Por otro lado, existen diferencias en la duración del tratamiento, ya que AuViS se aplica durante 4 horas por noche, mientras que en paradigmas de ejercicio o enriquecimiento ambiental los animales están expuestos de manera continua durante días o semanas, lo que permite una modulación más sostenida del desarrollo de las CGs (Trinchero et al., 2017; Trinchero et al., 2019a). En este trabajo no se observaron cambios en los niveles del mensajero de BDNF tras la estimulación con AuViS en comparación con el ejercicio físico. Dado que se ha demostrado que tanto el ejercicio físico como el enriquecimiento ambiental aumentan estos niveles en el hipocampo y la corteza prefrontal (Barros et al., 2019; Costa et al., 2023; Neeper et al., 1996), esta diferencia sugiere que la duración de AuViS podría no ser suficiente para elevar los niveles de mensajero de forma constante, lo que podría generar una activación de la vía de neurotrofinas menos robusta, afectando finalmente la maduración neuronal. Finalmente, dado que las hipótesis sobre estas diferencias aún no se han puesto a prueba, se desconoce si AuViS es un estímulo débil per se en comparación con los demás. Si este fuera el caso, un estímulo más débil podría estar asociado con un menor trofismo mediado por GABA, una reducción en la actividad eléctrica local y, en consecuencia, una menor producción de neurotrofinas, factores que explicarían un efecto menor en la modulación observada

con AuViS con respecto a otros estímulos fisiológicos como el ambiente enriquecido y el ejercicio físico.

Por otro lado, los efectos de AuViS en la integración de nuevas CGs en el circuito podrían tener consecuencias funcionales para toda la red. Se ha reportado que los circuitos de la región CA3 se vuelven más excitables con la edad debido a una disminución de la inhibición *feedforward* (Galván et al., 2011; Villanueva-Castillo et al., 2017). Los BFM inervan células piramidales en excrecencias espinosas, y cada filopodio contacta una única interneurona (Acsady et al., 1998). A nivel funcional, se espera que estas estructuras exciten células piramidales y provean inhibición disináptica *feedforward* a través de sus contactos con interneuronas (Bischofberger et al., 2006; Lawrence and McBain, 2003). Un mayor número de neuronas integradas al circuito presentando BFM con más filopodios podría contrarrestar esta hiperexcitabilidad mediante un mayor reclutamiento de inhibición *feedforward*. Las consecuencias funcionales de este fenómeno podrían estudiarse realizando un experimento donde se exciten terminales presinápticos de CGs nuevas y se realicen registros electrofisiológicos en CA3. Para llevarlo a cabo, se podría utilizar un retrovirus que exprese el canal activable por luz *channelrhodopsin* en las nuevas CGs. De esta forma podría evaluarse si efectivamente existe un cambio en el balance excitación/inhibición luego de la exposición a AuViS.

Plasticidad sináptica y mecanismos neurotróficos

Es probable que la disminución de la actividad neuronal, el estrés oxidativo, un nicho inflamatorio y la reducción de la señalización neurotrófica descriptos en el cerebro envejecido contribuyan al desarrollo lento de las CGs (Bishop et al., 2010; Guarente, 2014; Hattiangady et al., 2005; Lee et al., 2000; Verbitsky et al., 2004). La liberación de neurotrofinas a través de mecanismos dependientes de actividad en respuesta a estímulos como el ejercicio voluntario y el enriquecimiento ambiental contribuyen a la restauración de algunos de estos efectos (Liu and Nusslock, 2018; Miranda et al., 2019; Park and Poo, 2013; Trinchero et al., 2017). Intervenciones combinando la estimulación visual a 40 Hz y el ejercicio físico fueron evaluadas en el modelo murino de EA, donde los autores reportaron una mayor reducción de la tau fosforilada y de Aβ en el hipocampo, junto con mejoras en el aprendizaje espacial, la memoria, la

función mitocondrial y la neuroplasticidad, sugiriendo mecanismos complementarios (Park et al., 2020). En nuestro trabajo, encontramos que el bloqueo de la señalización por neurotrofinas inhibe la modulación promovida por AuViS, demostrando el papel crítico de esta vía en los efectos de la estimulación sensorial gamma sobre en el desarrollo de las CGs (Figura 28). Una de las neurotrofinas claves para la supervivencia y diferenciación neuronal es el factor neurotrófico BDNF (Chan et al., 2008; Greenberg et al., 2009; Ji et al., 2010; Waterhouse et al., 2012; Zeng et al., 2011). Este factor se sintetiza y secreta en respuesta a la actividad neuronal y se ha descripto que los niveles de su ARN mensajero aumentan tras realizar ejercicio físico (Chen et al., 2003; Kuczewski et al., 2008; Liu and Nusslock, 2018; Matsuda et al., 2009; Neeper et al., 1996; Piatti et al., 2011). En este trabajo corroboramos este aumento en el ARN mensajero en respuesta a 17 días de ejercicio físico, pero no observamos cambios frente a la exposición a AuViS (Figura 29). Esto sugiere que las vías de señalización de neurotrofinas podrían estar siendo reguladas a otro nivel, como en la expresión del receptor Trkb o mediante modificaciones postraduccionales del BDNF.

Efectos de AuViS sobre el nicho neurogénico

El hipocampo alberga un nicho neurogénico en el que se mantiene una reserva de RGL que dan lugar a CGs durante toda la vida (Bond et al., 2015; Denoth-Lippuner and Jessberger, 2021; Kempermann et al., 2015). La mayoría de las RGL se mantienen en quiescencia, un estado de inactividad donde no proliferan ni se diferencian (Wang et al., 2011). No obstante, pueden salir del estado quiescente y generar nuevas neuronas en respuesta a estímulos fisiológicos como el ejercicio físico (Fabel and Kempermann, 2008). Por el contrario, el estrés, la ansiedad y el envejecimiento reducen su capacidad proliferativa (Ding et al., 2020). Debido a esto y a una disminución en la cantidad de células madre, el número de neuronas nuevas disminuye sustancialmente con la edad (Kempermann et al., 1998b; Kuhn et al., 1996; Kuhn et al., 2018). Manipular las RGL para aumentar la neurogénesis en el hipocampo envejecido podría promover la función cerebral y contrarrestar el deterioro cognitivo asociado a la edad (Berdugo-Vega et al., 2020; Seib et al., 2013). En esta tesis reportamos que AuViS estimula la proliferación de progenitores neurales y su posterior diferenciación a un fenotipo neuronal, amplificando la tasa neurogénica

(Figura 30). Este fenómeno también se ha observado como respuesta a la exposición a estímulos que incrementan la actividad del giro dentado, como el ejercicio físico o el enriquecimiento ambiental, y se encuentra relacionado con la actividad de las interneuronas PV^+ y la liberación de neurotrofinas (Alvarez et al., 2016; Song et al., 2013; Trinchero et al., 2017). El potencial terapéutico que posee la modulación de las RGL ha impulsado numerosas investigaciones en los últimos años para comprender las causas de la disminución de la neurogénesis adulta durante el envejecimiento. Tanto alteraciones en las señales extrínsecas como cambios en los programas moleculares intrínsecos de las RGL han sido identificados como posibles causas de este declive (Kalamakis et al., 2019; Negredo et al., 2020; Villeda et al., 2011). Durante la última década se han identificado alteraciones en la regulación epigenética como un factor clave del envejecimiento en gran cantidad de tejidos y organismos (Zocher and Toda, 2023). Esto resalta la necesidad de investigar en profundidad si la estimulación sensorial gamma modula el perfil transcripcional y epigenético de las RGL, y si los efectos observados en animales de mediana edad pueden asociarse a estos cambios.

Efectos de AuViS sobre el comportamiento de animales de mediana edad

Las oscilaciones gamma corticales e hipocampales desempeñan un papel fundamental en la regulación del flujo de información y la comunicación cerebral, procesos esenciales para la memoria y el aprendizaje (Griffiths et al., 2019; Kim et al., 2016; Tamura et al., 2017). La sincronización gamma entre la corteza entorrinal y el giro dentado ha sido implicada en la adquisición de información y el procesamiento de claves espaciales, mientras que alteraciones en su ritmicidad se han asociado a déficits en la LTP, un mecanismo clave para el aprendizaje y la memoria (Casula et al., 2023; Di Lorenzo et al., 2016; Fernández-Ruiz et al., 2021; Koch et al., 2017; Li et al., 2011). La disminución de la potencia gamma en el hipocampo observada en el envejecimiento fisiológico y la EA sugiere que estas oscilaciones representan un sustrato crítico para el deterioro cognitivo asociado a la edad y la neurodegeneración (Zocher and Toda, 2023). De hecho, un trabajo demostró que la perturbación de estas oscilaciones en ratas impactó directamente el rendimiento de los animales en la

prueba de reconocimiento de objetos nuevos, mientras que otras formas de memoria, incluida la memoria de trabajo y el condicionamiento del miedo, se mantuvieron sin cambios (Lee et al., 2014). La estimulación auditiva a 40 Hz, por otro lado, ha demostrado efectos beneficiosos en la memoria espacial y de reconocimiento en modelos de EA (Martorell et al., 2019). En concordancia, nuestros resultados muestran que AuViS a 40 Hz promueve mejoras en la memoria de reconocimiento en animales sanos de mediana edad (Figura 32). Se seleccionó este paradigma conductual ya que ha sido ampliamente asociado al hipocampo y la neurogénesis adulta (Broadbent et al., 2010; Cohen and Stackman Jr, 2015; Dees and Kesner, 2013; Jessberger et al., 2009; Lafenêtre et al., 2010). A su vez, permite detectar alteraciones en la memoria y la cognición de forma simple, rápida y reproducible, sin incrementar el estrés de los animales y permitiendo evaluar otros parámetros, como la locomoción (Leger et al., 2013). Diversos estudios han señalado que, durante la exploración de objetos, las oscilaciones gamma lentas (30-50 Hz) se sincronizan entre la corteza entorrinal lateral y el giro dentado, facilitando la integración de la información sensorial en la memoria (Fernández-Ruiz et al., 2021). Además, la sincronización gamma entre el giro dentado y CA3, y entre CA3 y CA1, aumenta significativamente durante la exploración de objetos nuevos, sugiriendo que estas oscilaciones participan en la codificación y recuperación de memorias asociativas (Trimper et al., 2017). Un aumento en la potencia de la oscilación gamma durante la exploración de los objetos se asoció con un mejor recuerdo posterior tanto del objeto como de su ubicación (Trimper et al., 2017), lo cual sugiere que la estimulación con AuViS a 40 Hz podría estar promoviendo una mejor adquisición y recuperación de la memoria asociativa en los animales estimulados.

Frick y Gresack (2003) reportaron diferencias en la exploración de objetos en animales de distinto sexo durante el entrenamiento del NOR, mostrando que, mientras los machos no exhiben una preferencia clara por los objetos idénticos, las hembras tienden a distribuir su exploración de manera menos equitativa entre los objetos, focalizando su atención en uno de ellos (Frick and Gresack, 2003). Esta diferencia podría atribuirse, entre otras cosas, a diferencias hormonales entre ambos sexos. Las hormonas ováricas (estrógeno y progesterona) modulan la morfología y la función del hipocampo en ratones adultos (McEwen et al., 1997). Un trabajo realizado con animales CD1, una cepa insensible a los estrógenos en comparación con otras, no

reportó diferencias entre sexos en una tarea similar (Ricceri et al., 2000). A su vez, existen dimorfismos sexuales en varias regiones cerebrales. La corteza, el hipocampo y el septum desempeñan un papel clave la memoria espacial y de reconocimiento de objetos y se han observado marcadas diferencias en la distribución de los receptores de estrógenos de estas áreas (Sandhu et al., 1986).

Estas diferencias podrían explicar los resultados obtenidos en nuestro trabajo durante el entrenamiento del NOR con hembras control (Figura 32). Es posible que, además, las hembras no procesen los objetos de manera homogénea en ausencia de estimulación, sino que su exploración esté influenciada por diferencias en la atención o la motivación exploratoria. En contraste, dado que las oscilaciones gamma se asocian a una mayor atención y memoria, la estimulación con AuViS a 40 Hz podría estar promoviendo una mayor atención en las hembras estimuladas, reduciendo la preferencia por un objeto específico y favoreciendo un patrón de exploración más uniforme (Figura 32).

Perspectivas futuras

En una sociedad donde la esperanza de vida sigue en aumento, la búsqueda de tratamientos preventivos y paliativos para los problemas cognitivos asociados a la edad se vuelve cada vez más relevante. Por su naturaleza no invasiva y su accesibilidad, la estimulación audiovisual gamma tiene un importante potencial terapéutico para el tratamiento de trastornos neurológicos, incluidas condiciones no degenerativas como la epilepsia (Blanpain et al., 2024). De hecho, estudios preliminares ya han demostrado su seguridad y viabilidad en humanos (Blanco-Duque et al., 2024; Cimenser et al., 2021; Chan et al., 2022). No obstante, es imperativo realizar más estudios tanto en modelos murinos como en pacientes para reducir la brecha entre la ciencia básica y la práctica clínica, con el objetivo de desarrollar tratamientos eficaces para enfermedades en constante aumento que aún carecen de una estrategia terapéutica efectiva (Singh et al., 2024). Actualmente, herramientas como la optogenética y otras técnicas aún más avanzadas permiten personalizar la activación de regiones cerebrales y tipos celulares específicos en modelos animales, facilitando la exploración de los efectos de la inducción gamma en estados fisiológicos y patológicos (Sohal, 2016). Los trabajos futuros deberían centrarse en desentrañar

los mecanismos subyacentes a los efectos observados frente a la estimulación gamma, como también en estudiar otras posibles aplicaciones terapéuticas.

Conclusiones

El descubrimiento de que AuViS promueve eficientemente la formación de nuevas conexiones neuronales en un contexto envejecido revela un mecanismo fundamental de plasticidad que podría contribuir al potencial restaurador de AuViS más allá de su papel en la eliminación de Aβ. Dado que el hipocampo está involucrado en aprendizaje y memoria, la integración funcional de nuevas unidades de procesamiento de información a la red podría explicar las mejoras observadas en paradigmas de memoria espacial y de reconocimiento reportadas previamente (Adaikkan et al., 2019; Martorell et al., 2019). Además, estos hallazgos respaldan su potencial terapéutico para la prevención y el tratamiento de déficits cognitivos presentes en el envejecimiento fisiológico, donde las alteraciones en las oscilaciones gamma desempeñan un papel crítico.

6. Bibliografía

Acsady, L., Kamondi, A., Sik, A., Freund, T., Buzsaki, G., 1998. GABAergic cells are the major postsynaptic targets of mossy fibers in the rat hippocampus. J.Neurosci. 18, 3386-3403.

Adaikkan, C., Middleton, S.J., Marco, A., Pao, P.-C., Mathys, H., Kim, D.N.-W., Gao, F., Young, J.Z., Suk, H.-J., Boyden, E.S., McHugh, T.J., Tsai, L.-H., 2019. Gamma Entrainment Binds Higher-Order Brain Regions and Offers Neuroprotection. Neuron 102, 929-943.e928.

Adaikkan, C., Tsai, L.-H., 2020. Gamma Entrainment: Impact on Neurocircuits, Glia, and Therapeutic Opportunities. Trends in Neurosciences 43, 24-41.

Aimone, J.B., Deng, W., Gage, F.H., 2011. Resolving new memories: a critical look at the dentate gyrus, adult neurogenesis, and pattern separation. Neuron 70, 589-596.

Aimone, J.B., Li, Y., Lee, S.W., Clemenson, G.D., Deng, W., Gage, F.H., 2014. Regulation and function of adult neurogenesis: from genes to cognition. Physiological reviews.

Aimone, J.B., Wiles, J., Gage, F.H., 2006. Potential role for adult neurogenesis in the encoding of time in new memories. Nat.Neurosci. 9, 723-727.

Alsina, F.C., Hita, F.J., Fontanet, P.A., Irala, D., Hedman, H., Ledda, F., Paratcha, G., 2016. Lrig1 is a cell-intrinsic modulator of hippocampal dendrite complexity and BDNF signaling. EMBO Rep 17, 601-616.

Altman, J., Das, G.D., 1965. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. J.Comp Neurol. 124, 319-335.

Alvarez, D.D., Giacomini, D., Yang, S.M., Trinchero, M.F., Temprana, S.G., Buttner, K.A., Beltramone, N., Schinder, A.F., 2016. A disynaptic feedback network activated by experience promotes the integration of new granule cells. Science 354, 459-465.

Amaral, D.G., Dent, J.A., 1981. Development of the mossy fibers of the dentate gyrus: I. A light and electron microscopic study of the mossy fibers and their expansions. J.Comp Neurol. 195, 51-86.

Amaral, D.G., Scharfman, H.E., Lavenex, P., 2007. The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). Progress in brain research 163, 3-22.

Amaral, D.G., Witter, M.P., 1989. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. Neuroscience 31, 571-591.

Ambrogini, P., Lattanzi, D., Ciuffoli, S., Agostini, D., Bertini, L., Stocchi, V., Santi, S., Cuppini, R., 2004. Morpho-functional characterization of neuronal cells at

different stages of maturation in granule cell layer of adult rat dentate gyrus. Brain Res. 1017, 21-31.

Anacker, C., Hen, R., 2017. Adult hippocampal neurogenesis and cognitive flexibility - linking memory and mood. Nat Rev Neurosci 18, 335-346.

Andersen, P., 2007. The hippocampus book. Oxford university press.

Andersen, P., Bliss, T.V., Skrede, K.K., 1971. Lamellar organization of hippocampal pathways. Exp Brain Res 13, 222-238.

Araki, T., Ikegaya, Y., Koyama, R., 2021. The effects of microglia-and astrocyte-derived factors on neurogenesis in health and disease. European Journal of Neuroscience 54, 5880-5901.

Babcock, K.R., Page, J.S., Fallon, J.R., Webb, A.E., 2021. Adult hippocampal neurogenesis in aging and Alzheimer's disease. Stem cell reports 16, 681-693.

Baghdadi, G., Kamarajan, C., Hadaeghi, F., 2023. Editorial: role of brain oscillations in neurocognitive control systems. Front. Syst. Neurosci. 17, 1182496.

Barnea, A., Nottebohm, F., 1994. Seasonal recruitment of hippocampal neurons in adult free-ranging black-capped chickadees. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 91, 11217-11221.

Baroncelli, L., Braschi, C., Spolidoro, M., Begenisic, T., Sale, A., Maffei, L., 2010. Nurturing brain plasticity: impact of environmental enrichment. Cell Death Differ 17, 1092-1103.

Barros, W., David, M., Souza, A., Silva, M., Matos, R., 2019. Can the effects of environmental enrichment modulate BDNF expression in hippocampal plasticity? A systematic review of animal studies. Synapse 73, e22103.

Bartos, M., Vida, I., Jonas, P., 2007. Synaptic mechanisms of synchronized gamma oscillations in inhibitory interneuron networks. Nat Rev Neurosci 8, 45-56.

Bartsch, T., Wulff, P., 2015. The hippocampus in aging and disease: From plasticity to vulnerability. Neuroscience 309, 1-16.

Belblidia, H., Leger, M., Abdelmalek, A., Quiedeville, A., Calocer, F., Boulouard, M., Jozet-Alves, C., Freret, T., Schumann-Bard, P., 2018. Characterizing age-related decline of recognition memory and brain activation profile in mice. Experimental Gerontology 106, 222-231.

Berdugo-Vega, G., Arias-Gil, G., López-Fernández, A., Artegiani, B., Wasielewska, J.M., Lee, C.-C., Lippert, M.T., Kempermann, G., Takagaki, K., Calegari, F., 2020. Increasing neurogenesis refines hippocampal activity rejuvenating navigational learning strategies and contextual memory throughout life. Nature communications 11, 135.

Bergami, M., Masserdotti, G., Temprana, S.G., Motori, E., Eriksson, T.M., Gobel, J., Yang, S.M., Conzelmann, K.K., Schinder, A.F., Gotz, M., Berninger, B., 2015. A

critical period for experience-dependent remodeling of adult-born neuron connectivity. Neuron 85, 710-717.

Bergami, M., Rimondini, R., Santi, S., Blum, R., Gotz, M., Canossa, M., 2008. Deletion of TrkB in adult progenitors alters newborn neuron integration into hippocampal circuits and increases anxiety-like behavior. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 105, 15570-15575.

Biasiucci, A., Franceschiello, B., Murray, M.M., 2019. Electroencephalography. Current Biology 29, R80-R85.

Billig, A.J., Lad, M., Sedley, W., Griffiths, T.D., 2022. The hearing hippocampus. Progress in neurobiology 218, 102326.

Birch, A.M., McGarry, N.B., Kelly, Á.M., 2013. Short-term environmental enrichment, in the absence of exercise, improves memory, and increases NGF concentration, early neuronal survival, and synaptogenesis in the dentate gyrus in a time-dependent manner. Hippocampus 23, 437-450.

Bischofberger, J., Engel, D., Frotscher, M., Jonas, P., 2006. Timing and efficacy of transmitter release at mossy fiber synapses in the hippocampal network. Pflugers Archiv : European journal of physiology 453, 361-372.

Bishop, N.A., Lu, T., Yankner, B.A., 2010. Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. Nature 464, 529-535.

Black, J.E., Polinsky, M., Greenough, W.T., 1989. Progressive failure of cerebral angiogenesis supporting neural plasticity in aging rats. Neurobiology of aging 10, 353-358.

Blanco-Duque, C., Chan, D., Kahn, M.C., Murdock, M.H., Tsai, L.H., 2024. Audiovisual gamma stimulation for the treatment of neurodegeneration. Journal of Internal Medicine 295, 146-170.

Blanpain, L.T., Cole, E.R., Chen, E., Park, J.K., Walelign, M.Y., Gross, R.E., Cabaniss, B.T., Willie, J.T., Singer, A.C., 2024. Multisensory flicker modulates widespread brain networks and reduces interictal epileptiform discharges. Nature communications 15, 3156.

Bonafina, A., Trinchero, M.F., Ríos, A.S., Bekinschtein, P., Schinder, A.F., Paratcha, G., Ledda, F., 2019. GDNF and GFRα1 Are Required for Proper Integration of Adult-Born Hippocampal Neurons. Cell Reports 29, 4308-4319.e4304.

Bonaguidi, M.A., Song, J., Ming, G.L., Song, H., 2012. A unifying hypothesis on mammalian neural stem cell properties in the adult hippocampus. Curr Opin Neurobiol.

Bond, A.M., Ming, G.L., Song, H., 2015. Adult Mammalian Neural Stem Cells and Neurogenesis: Five Decades Later. Cell Stem Cell 17, 385-395.

Bondolfi, L., Ermini, F., Long, J.M., Ingram, D.K., Jucker, M., 2004. Impact of age and caloric restriction on neurogenesis in the dentate gyrus of C57BL/6 mice. Neurobiology of aging 25, 333-340.

Borzello, M., Ramirez, S., Treves, A., Lee, I., Scharfman, H., Stark, C., Knierim, J.J., Rangel, L.M., 2023. Assessments of dentate gyrus function: discoveries and debates. Nature Reviews Neuroscience 24, 502-517.

Broadbent, N.J., Gaskin, S., Squire, L.R., Clark, R.E., 2010. Object recognition memory and the rodent hippocampus. Learning & memory 17, 5-11.

Burke, S.N., Barnes, C.A., 2006. Neural plasticity in the ageing brain. Nat.Rev.Neurosci. 7, 30-40.

Burke, S.N., Barnes, C.A., 2010. Senescent synapses and hippocampal circuit dynamics. Trends Neurosci 33, 153-161.

Burke, S.N., Wallace, J.L., Nematollahi, S., Uprety, A.R., Barnes, C.A., 2010. Pattern separation deficits may contribute to age-associated recognition impairments. Behavioral neuroscience 124, 559.

Buzsáki, G., 2015. Hippocampal sharp wave-ripple: A cognitive biomarker for episodic memory and planning. Hippocampus 25, 1073-1188.

Buzsáki, G., Anastassiou, C.A., Koch, C., 2012. The origin of extracellular fields and currents—EEG, ECoG, LFP and spikes. Nature reviews neuroscience 13, 407-420.

Buzsáki, G., Horvath, Z., Urioste, R., Hetke, J., Wise, K., 1992. High-frequency network oscillation in the hippocampus. Science 256, 1025-1027.

Buzsáki, G., Vanderwolf, C.H., 1983. Cellular bases of hippocampal EEG in the behaving rat. Brain research reviews 6, 139-171.

Buzsáki, G., Wang, X.-J., 2012. Mechanisms of gamma oscillations. Annual review of neuroscience 35, 203-225.

Cao, L., Jiao, X., Zuzga, D.S., Liu, Y., Fong, D.M., Young, D., During, M.J., 2004. VEGF links hippocampal activity with neurogenesis, learning and memory. Nature genetics 36, 827-835.

Cardin, J.A., Carlén, M., Meletis, K., Knoblich, U., Zhang, F., Deisseroth, K., Tsai, L.-H., Moore, C.I., 2009. Driving fast-spiking cells induces gamma rhythm and controls sensory responses. Nature 459, 663-667.

Carr, M.F., Karlsson, M.P., Frank, L.M., 2012. Transient slow gamma synchrony underlies hippocampal memory replay. Neuron 75, 700-713.

Casula, A., Milazzo, B.M., Martino, G., Sergi, A., Lucifora, C., Tomaiuolo, F., Quartarone, A., Nitsche, M.A., Vicario, C.M., 2023. Non-invasive brain stimulation for the modulation of aggressive behavior—A systematic review of randomized sham-controlled studies. Life 13, 1220.

Cimenser, A., Hempel, E., Travers, T., Strozewski, N., Martin, K., Malchano, Z., Hajós, M., 2021. Sensory-evoked 40-Hz gamma oscillation improves sleep and daily living activities in Alzheimer's disease patients. Frontiers in systems neuroscience 15, 746859.

Clelland, C.D., Choi, M., Romberg, C., Clemenson Jr., G.D., Fragniere, A., Tyers, P., Jessberger, S., Saksida, L.M., Barker, R.A., Gage, F.H., Bussey, T.J., 2009. A functional role for adult hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation. Science 325, 210-213.

Clemenson, G.D., Stark, C.E., 2015. Virtual environmental enrichment through video games improves hippocampal-associated memory. Journal of Neuroscience 35, 16116-16125.

Cohen, S.J., Stackman Jr, R.W., 2015. Assessing rodent hippocampal involvement in the novel object recognition task. A review. Behavioural brain research 285, 105-117.

Cole, S.R., Voytek, B., 2017. Brain oscillations and the importance of waveform shape. Trends in cognitive sciences 21, 137-149.

Colgin, L.L., 2016. Rhythms of the hippocampal network. Nature Reviews Neuroscience 17, 239-249.

Colgin, L.L., Moser, E.I., 2010. Gamma oscillations in the hippocampus. Physiology 25, 319-329.

Costa, G.A., Silva, N.K.d.G.T., Marianno, P., Chivers, P., Bailey, A., Camarini, R., 2023. Environmental enrichment increased Bdnf transcripts in the prefrontal cortex: implications for an epigenetically controlled mechanism. Neuroscience 526, 277-289.

Creer, D.J., Romberg, C., Saksida, L.M., van Praag, H., Bussey, T.J., 2010. Running enhances spatial pattern separation in mice. Proc Natl Acad Sci U S A 107, 2367-2372.

Chan, D., Suk, H.-J., Jackson, B.L., Milman, N.P., Stark, D., Klerman, E.B., Kitchener, E., Fernandez Avalos, V.S., de Weck, G., Banerjee, A., Beach, S.D., Blanchard, J., Stearns, C., Boes, A.D., Uitermarkt, B., Gander, P., Howard, M., III, Sternberg, E.J., Nieto-Castanon, A., Anteraper, S., Whitfield-Gabrieli, S., Brown, E.N., Boyden, E.S., Dickerson, B.C., Tsai, L.-H., 2022. Gamma frequency sensory stimulation in mild probable Alzheimer's dementia patients: Results of feasibility and pilot studies. PLOS ONE 17, e0278412.

Chan, J.P., Cordeira, J., Calderon, G.A., Iyer, L.K., Rios, M., 2008. Depletion of central BDNF in mice impedes terminal differentiation of new granule neurons in the adult hippocampus. Mol.Cell Neurosci. 39, 372-383.

Chancey, J.H., Adlaf, E.W., Sapp, M.C., Pugh, P.C., Wadiche, J.I., Overstreet-Wadiche, L.S., 2013. GABA depolarization is required for experience-dependent synapse unsilencing in adult-born neurons. J Neurosci 33, 6614-6622.

Chen, W.G., Chang, Q., Lin, Y., Meissner, A., West, A.E., Griffith, E.C., Jaenisch, R., Greenberg, M.E., 2003. Derepression of BDNF transcription involves calcium-dependent phosphorylation of MeCP2. Science 302, 885-889.

Danzer, S.C., He, X., Loepke, A.W., McNamara, J.O., 2010. Structural plasticity of dentate granule cell mossy fibers during the development of limbic epilepsy. Hippocampus 20, 113-124.

Dees, R.L., Kesner, R.P., 2013. The role of the dorsal dentate gyrus in object and object-context recognition. Neurobiology of learning and memory 106, 112-117.

Deng, W., Aimone, J.B., Gage, F.H., 2010. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? Nature reviews neuroscience 11, 339-350.

Denoth-Lippuner, A., Jessberger, S., 2021. Formation and integration of new neurons in the adult hippocampus. Nature Reviews Neuroscience 22, 223-236.

Deupree, D.L., Bradley, J., Turner, D.A., 1993. Age-related alterations in potentiation in the CA1 region in F344 rats. Neurobiology of aging 14, 249-258.

Di Lorenzo, F., Ponzo, V., Bonnì, S., Motta, C., Negrão Serra, P.C., Bozzali, M., Caltagirone, C., Martorana, A., Koch, G., 2016. Long-term potentiation–like cortical plasticity is disrupted in Alzheimer's disease patients independently from age of onset. Annals of neurology 80, 202-210.

Ding, W.Y., Huang, J., Wang, H., 2020. Waking up quiescent neural stem cells: molecular mechanisms and implications in neurodevelopmental disorders. PLoS genetics 16, e1008653.

Doetsch, F., Hen, R., 2005. Young and excitable: the function of new neurons in the adult mammalian brain. Curr.Opin.Neurobiol. 15, 121-128.

Dolorfo, C.L., Amaral, D.G., 1998a. Entorhinal cortex of the rat: organization of intrinsic connections. J.Comp Neurol. 398, 49-82.

Dolorfo, C.L., Amaral, D.G., 1998b. Entorhinal cortex of the rat: topographic organization of the cells of origin of the perforant path projection to the dentate gyrus. J.Comp Neurol. 398, 25-48.

Drew, L.J., Fusi, S., Hen, R., 2013. Adult neurogenesis in the mammalian hippocampus: why the dentate gyrus? Learn Mem 20, 710-729.

Duan, X., Kang, E., Liu, C.Y., Ming, G.-L., Song, H., 2008. Development of neural stem cell in the adult brain. Current opinion in neurobiology 18, 108-115.

Duecker, K., Gutteling, T.P., Herrmann, C.S., Jensen, O., 2021. No evidence for entrainment: endogenous gamma oscillations and rhythmic flicker responses coexist in visual cortex. Journal of Neuroscience 41, 6684-6698.

Dupret, D., Revest, J.M., Koehl, M., Ichas, F., De Giorgi, F., Costet, P., Abrous, D.N., Piazza, P.V., 2008. Spatial relational memory requires hippocampal adult neurogenesis. PLoS.ONE. 3, e1959.

Duzel, E., van Praag, H., Sendtner, M., 2016. Can physical exercise in old age improve memory and hippocampal function? Brain 139, 662-673.

Encinas, J.M., Michurina, T.V., Peunova, N., Park, J.H., Tordo, J., Peterson, D.A., Fishell, G., Koulakov, A., Enikolopov, G., 2011. Division-coupled astrocytic differentiation and age-related depletion of neural stem cells in the adult hippocampus. Cell Stem Cell 8, 566-579.

Enikolopov, G., Overstreet-Wadiche, L., Ge, S., 2015. Viral and transgenic reporters and genetic analysis of adult neurogenesis. Cold Spring Harbor perspectives in biology 7, a018804-a018804.

Enikolopov, G., Overstreet-Wadiche, L.S., 2008. The use of reporter mouse lines to study adult neurogenesis, in: Gage, F.H., Kempermann, G., Song, H. (Eds.), Adult Neurogenesis. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, pp. 81-100.

Erickson, K.I., Prakash, R.S., Voss, M.W., Chaddock, L., Heo, S., McLaren, M., Pence, B.D., Martin, S.A., Vieira, V.J., Woods, J.A., McAuley, E., Kramer, A.F., 2010. Brain-derived neurotrophic factor is associated with age-related decline in hippocampal volume. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 30, 5368-5375.

Eriksson, P.S., Perfilieva, E., Bjork-Eriksson, T., Alborn, A.M., Nordborg, C., Peterson, D.A., Gage, F.H., 1998. Neurogenesis in the adult human hippocampus. Nat.Med. 4, 1313-1317.

Espinoza, C., Guzman, S.J., Zhang, X., Jonas, P., 2018. Parvalbumin(+) interneurons obey unique connectivity rules and establish a powerful lateral-inhibition microcircuit in dentate gyrus. Nature communications 9, 4605-4605.

Espósito, M.S., Piatti, V.C., Laplagne, D.A., Morgenstern, N.A., Ferrari, C.C., Pitossi, F.J., Schinder, A.F., 2005. Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. J.Neurosci. 25, 10074-10086.

Etter, G., van der Veldt, S., Manseau, F., Zarrinkoub, I., Trillaud-Doppia, E., Williams, S., 2019. Optogenetic gamma stimulation rescues memory impairments in an Alzheimer's disease mouse model. Nature Communications 10, 5322.

Fabel, K., Kempermann, G., 2008. Physical activity and the regulation of neurogenesis in the adult and aging brain. Neuromolecular medicine 10, 59-66.

Fan, X., Wheatley, E.G., Villeda, S.A., 2017. Mechanisms of Hippocampal Aging and the Potential for Rejuvenation. Annu Rev Neurosci.

Fanselow, M.S., Dong, H.W., 2010. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? Neuron 65, 7-19.

Faulkner, R.L., Jang, M.H., Liu, X.B., Duan, X., Sailor, K.A., Kim, J.Y., Ge, S., Jones, E.G., Ming, G.L., Song, H., Cheng, H.J., 2008. Development of hippocampal mossy fiber synaptic outputs by new neurons in the adult brain. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 105, 14157-14162.

Fernández-Ruiz, A., Oliva, A., Soula, M., Rocha-Almeida, F., Nagy, G.A., Martin-Vazquez, G., Buzsáki, G., 2021. Gamma rhythm communication between entorhinal cortex and dentate gyrus neuronal assemblies. Science 372, eabf3119.

Fernandez, D.C., Fogerson, P.M., Ospri, L.L., Thomsen, M.B., Layne, R.M., Severin, D., Zhan, J., Singer, J.H., Kirkwood, A., Zhao, H., 2018. Light affects mood and learning through distinct retina-brain pathways. Cell 175, 71-84. e18.

Forster, E., Zhao, S., Frotscher, M., 2006. Laminating the hippocampus. Nat.Rev.Neurosci. 7, 259-267.

Freund, T.F., Katona, I., 2007. Perisomatic inhibition. Neuron 56, 33-42.

Frick, K.M., Gresack, J.E., 2003. Sex differences in the behavioral response to spatial and object novelty in adult C57BL/6 mice. Behavioral neuroscience 117, 1283.

Fries, P., 2005. A mechanism for cognitive dynamics: neuronal communication through neuronal coherence. Trends in cognitive sciences 9, 474-480.

Fries, P., 2015. Rhythms for Cognition: Communication through Coherence. Neuron 88, 220-235.

Gage, F.H., 2000. Mammalian neural stem cells. Science 287, 1433-1438.

Gage, F.H., Dunnett, S.B., Björklund, A., 1984. Spatial learning and motor deficits in aged rats. Neurobiology of aging 5, 43-48.

Gage, F.H., Temple, S., 2013. Neural stem cells: generating and regenerating the brain. Neuron 80, 588-601.

Galambos, R., Makeig, S., Talmachoff, P.J., 1981. A 40-Hz auditory potential recorded from the human scalp. Proceedings of the national academy of sciences 78, 2643-2647.

Galván, E.J., Cosgrove, K.E., Barrionuevo, G., 2011. Multiple forms of long-term synaptic plasticity at hippocampal mossy fiber synapses on interneurons. Neuropharmacology 60, 740-747.

Gärtner, A., Polnau, D.G., Staiger, V., Sciarretta, C., Minichiello, L., Thoenen, H., Bonhoeffer, T., Korte, M., 2006. Hippocampal long-term potentiation is supported by presynaptic and postsynaptic tyrosine receptor kinase B-mediated phospholipase Cgamma signaling. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 26, 3496-3504.

Ge, S., Goh, E.L., Sailor, K.A., Kitabatake, Y., Ming, G.L., Song, H., 2006. GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. Nature 439, 589-593.

Ge, S., Yang, C.H., Hsu, K.S., Ming, G.L., Song, H., 2007. A critical period for enhanced synaptic plasticity in newly generated neurons of the adult brain. Neuron 54, 559-566.

Geinisman, Y., Toledo-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, 437-444.

Gheusi, G., Lepousez, G., Lledo, P.M., 2013. Adult-born neurons in the olfactory bulb: integration and functional consequences. Curr Top Behav Neurosci 15, 49-72.

Goncalves, J.T., Bloyd, C.W., Shtrahman, M., Johnston, S.T., Schafer, S.T., Parylak, S.L., Tran, T., Chang, T., Gage, F.H., 2016a. In vivo imaging of dendritic pruning in dentate granule cells. Nat Neurosci 19, 788-791.

Goncalves, J.T., Schafer, S.T., Gage, F.H., 2016b. Adult Neurogenesis in the Hippocampus: From Stem Cells to Behavior. Cell 167, 897-914.

Gonzalez-Perez, M., Wakui, E., Thoma, V., Nitsche, M.A., Rivolta, D., 2019. Transcranial alternating current stimulation (tACS) at 40 Hz enhances face and object perception. Neuropsychologia 135, 107237.

Goutagny, R., Gu, N., Cavanagh, C., Jackson, J., Chabot, J.G., Quirion, R., Krantic, S., Williams, S., 2013. Alterations in hippocampal network oscillations and theta–gamma coupling arise before Aβ overproduction in a mouse model of A lzheimer's disease. European Journal of Neuroscience 37, 1896-1902.

Gray, C.M., Singer, W., 1989. Stimulus-specific neuronal oscillations in orientation columns of cat visual cortex. Proceedings of the National Academy of Sciences 86, 1698-1702.

Greenberg, D., Jin, K., 2004. Experiencing VEGF. Nature genetics 36, 792-793.

Greenberg, M.E., Xu, B., Lu, B., Hempstead, B.L., 2009. New insights in the biology of BDNF synthesis and release: implications in CNS function. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 29, 12764-12767.

Grent-'t-Jong, T., Gross, J., Goense, J., Wibral, M., Gajwani, R., Gumley, A.I., Lawrie, S.M., Schwannauer, M., Schultze-Lutter, F., Navarro Schröder, T., 2018. Resting-state gamma-band power alterations in schizophrenia reveal E/I-balance abnormalities across illness-stages. elife 7, e37799.

Griffiths, B.J., Parish, G., Roux, F., Michelmann, S., Van Der Plas, M., Kolibius, L.D., Chelvarajah, R., Rollings, D.T., Sawlani, V., Hamer, H., 2019. Directional coupling of slow and fast hippocampal gamma with neocortical alpha/beta

oscillations in human episodic memory. Proceedings of the National Academy of Sciences 116, 21834-21842.

Groisman, A.I., Yang, S.M., Schinder, A.F., 2020. Differential Coupling of Adult-Born Granule Cells to Parvalbumin and Somatostatin Interneurons. Cell Reports 30, 202-214.e204.

Grońska-Pęski, M., Gonçalves, J.T., Hébert, J.M., 2021. Enriched environment promotes adult hippocampal neurogenesis through FGFRs. Journal of Neuroscience 41, 2899-2910.

Guan, A., Wang, S., Huang, A., Qiu, C., Li, Y., Li, X., Wang, J., Wang, Q., Deng, B., 2022. The role of gamma oscillations in central nervous system diseases: Mechanism and treatment. Frontiers in cellular neuroscience 16, 962957.

Guarente, L., 2014. Aging research-where do we stand and where are we going? Cell 159, 15-19.

Hablitz, L.M., Nedergaard, M., 2021. The glymphatic system: a novel component of fundamental neurobiology. Journal of Neuroscience 41, 7698-7711.

Hadler, M.D., Tzilivaki, A., Schmitz, D., Alle, H., Geiger, J.R., 2024. Gamma oscillation plasticity is mediated via parvalbumin interneurons. Science Advances 10, eadj7427.

Hagihara, H., Toyama, K., Yamasaki, N., Miyakawa, T., 2009. Dissection of hippocampal dentate gyrus from adult mouse. Journal of visualized experiments: JoVE, 1543.

Hattiangady, B., Rao, M.S., Shetty, G.A., Shetty, A.K., 2005. Brain-derived neurotrophic factor, phosphorylated cyclic AMP response element binding protein and neuropeptide Y decline as early as middle age in the dentate gyrus and CA1 and CA3 subfields of the hippocampus. Experimental neurology 195, 353-371.

Heine, V.M., Maslam, S., Joëls, M., Lucassen, P.J., 2004. Prominent decline of newborn cell proliferation, differentiation, and apoptosis in the aging dentate gyrus, in absence of an age-related hypothalamus-pituitary-adrenal axis activation. Neurobiology of aging 25, 361-375.

Herrmann, C.S., 2001. Human EEG responses to 1–100 Hz flicker: resonance phenomena in visual cortex and their potential correlation to cognitive phenomena. Exp Brain Res 137, 346-353.

Huang, F., Huang, Q., Zheng, L., Zhang, W., Yang, Q., Yang, J., Wang, Y., Wang, Z., Li, W., Zeng, L., 2023. Effect of 40 Hz light flicker on behaviors of adult C57BL/6J mice. Brain Research 1814, 148441.

Huang, X., Huang, P., Huang, L., Hu, Z., Liu, X., Shen, J., Xi, Y., Yang, Y., Fu, Y., Tao, Q., 2021. A visual circuit related to the nucleus reuniens for the spatial-memory-promoting effects of light treatment. Neuron 109, 347-362. e347.

Iaccarino, H.F., Singer, A.C., Martorell, A.J., Rudenko, A., Gao, F., Gillingham, T.Z., Mathys, H., Seo, J., Kritskiy, O., Abdurrob, F., Adaikkan, C., Canter, R.G., Rueda, R., Brown, E.N., Boyden, E.S., Tsai, L.-H., 2016. Gamma frequency entrainment attenuates amyloid load and modifies microglia. Nature 540, 230-235.

Ibarra-Lecue, I., Haegens, S., Harris, A.Z., 2022. Breaking down a rhythm: Dissecting the mechanisms underlying task-related neural oscillations. Frontiers in Neural Circuits 16, 846905.

Irwin, D.J., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., 2013. Parkinson's disease dementia: convergence of alpha-synuclein, tau and amyloid-beta pathologies. Nat Rev Neurosci 14, 626-636.

Itou, Y., Nochi, R., Kuribayashi, H., Saito, Y., Hisatsune, T., 2011. Cholinergic activation of hippocampal neural stem cells in aged dentate gyrus. Hippocampus 21, 446-459.

J Rodriguez, J., N Noristani, H., Olabarria, M., Fletcher, J., DD Somerville, T., Y Yeh, C., Verkhratsky, A., 2011. Voluntary running and environmental enrichment restores impaired hippocampal neurogenesis in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. Current Alzheimer Research 8, 707-717.

Jafari, Z., Kolb, B.E., Mohajerani, M.H., 2020. Neural oscillations and brain stimulation in Alzheimer’s disease. Progress in neurobiology 194, 101878.

Jessberger, S., Clark, R.E., Broadbent, N.J., Clemenson Jr., G.D., Consiglio, A., Lie, D.C., Squire, L.R., Gage, F.H., 2009. Dentate gyrus-specific knockdown of adult neurogenesis impairs spatial and object recognition memory in adult rats. Learn Mem 16, 147-154.

Jessen, N.A., Munk, A.S.F., Lundgaard, I., Nedergaard, M., 2015. The glymphatic system: a beginner’s guide. Neurochemical research 40, 2583-2599.

Ji, Y., Lu, Y., Yang, F., Shen, W., Tang, T.T.-T., Feng, L., Duan, S., Lu, B., 2010. Acute and gradual increases in BDNF concentration elicit distinct signaling and functions in neurons. Nature neuroscience 13, 302-309.

Jiang-Xie, L.-F., Drieu, A., Kipnis, J., 2024. Waste clearance shapes aging brain health. Neuron.

Jones, M., McDermott, B., Oliveira, B.L., O’Brien, A., Coogan, D., Lang, M., Moriarty, N., Dowd, E., Quinlan, L., Mc Ginley, B., 2019. Gamma band light stimulation in human case studies: groundwork for potential Alzheimer’s disease treatment. Journal of Alzheimer's Disease 70, 171-185.

Kalamakis, G., Brüne, D., Ravichandran, S., Bolz, J., Fan, W., Ziebell, F., Stiehl, T., Catalá-Martinez, F., Kupke, J., Zhao, S., 2019. Quiescence modulates stem cell maintenance and regenerative capacity in the aging brain. Cell 176, 1407-1419. e1414.

Kang, E., Wen, Z., Song, H., Christian, K.M., Ming, G.L., 2016. Adult Neurogenesis and Psychiatric Disorders. Cold Spring Harb Perspect Biol.

Karakatsani, A., Álvarez-Vergara, M.I., de Almodóvar, C.R., 2023. The vasculature of neurogenic niches: Properties and function. Cells & Development 174, 203841.

Karten, Y.J., Jones, M.A., Jeurling, S.I., Cameron, H.A., 2006. GABAergic signaling in young granule cells in the adult rat and mouse dentate gyrus. Hippocampus 16, 312-320.

Kempermann, G., 2015. Activity Dependency and Aging in the Regulation of Adult Neurogenesis. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 7, a018929.

Kempermann, G., 2019. Environmental enrichment, new neurons and the neurobiology of individuality. Nature Reviews Neuroscience 20, 235-245.

Kempermann, G., 2022. What is adult hippocampal neurogenesis good for? Frontiers in neuroscience 16, 852680.

Kempermann, G., Brandon, E.P., Gage, F.H., 1998a. Environmental stimulation of 129/SvJ mice causes increased cell proliferation and neurogenesis in the adult dentate gyrus. Curr.Biol. 8, 939-942.

Kempermann, G., Fabel, K., Ehninger, D., Babu, H., Leal-Galicia, P., Garthe, A., Wolf, S.A., 2010. Why and how physical activity promotes experience-induced brain plasticity. Front Neurosci 4, 189.

Kempermann, G., Gast, D., Gage, F.H., 2002. Neuroplasticity in old age: Sustained fivefold induction of hippocampal neurogenesis by long-term environmental enrichment. Annals of Neurology 52, 135-143.

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

Kempermann, G., Kuhn, H.G., Gage, F.H., 1997. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. Nature 386, 493-495.

Kempermann, G., Kuhn, H.G., Gage, F.H., 1998b. Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. J.Neurosci. 18, 3206-3212.

Kempermann, G., Song, H., Gage, F.H., 2015. Neurogenesis in the Adult Hippocampus. Cold Spring Harbor perspectives in biology 7, a018812-a018812.

Kempermann, G., Wiskott, L., Gage, F.H., 2004. Functional significance of adult neurogenesis, Current opinion in neurobiology, pp. 186-191.

Kepecs, A., Fishell, G., 2014. Interneuron cell types are fit to function. Nature 505, 318-326.

Kim, E.J., Ables, J.L., Dickel, L.K., Eisch, A.J., Johnson, J.E., 2011. Ascl1 (Mash1) defines cells with long-term neurogenic potential in subgranular and subventricular zones in adult mouse brain. PLoS One 6, e18472.

Kim, E.J., Leung, C.T., Reed, R.R., Johnson, J.E., 2007. In vivo analysis of Ascl1 defined progenitors reveals distinct developmental dynamics during adult neurogenesis and gliogenesis. J Neurosci 27, 12764-12774.

Kim, H., Ährlund-Richter, S., Wang, X., Deisseroth, K., Carlén, M., 2016. Prefrontal parvalbumin neurons in control of attention. Cell 164, 208-218.

Kitabatake, Y., Sailor, K.A., Ming, G.-l., Song, H., 2007. Adult Neurogenesis and Hippocampal Memory Function: New Cells, More Plasticity, New Memories? Neurosurgery Clinics 18, 105-113.

Klein, A.S., Donoso, J.R., Kempter, R., Schmitz, D., Beed, P., 2016. Early cortical changes in gamma oscillations in Alzheimer's disease. Frontiers in systems neuroscience 10, 83.

Koch, G., Di Lorenzo, F., Loizzo, S., Motta, C., Travaglione, S., Baiula, M., Rimondini, R., Ponzo, V., Bonnì, S., Toniolo, S., 2017. CSF tau is associated with impaired cortical plasticity, cognitive decline and astrocyte survival only in APOE4-positive Alzheimer's disease. Scientific Reports 7, 13728.

Korb, E., Finkbeiner, S., 2011. Arc in synaptic plasticity: from gene to behavior. Trends in Neurosciences 34, 591-598.

Kraeuter, A.-K., Guest, P.C., Sarnyai, Z., 2019. The open field test for measuring locomotor activity and anxiety-like behavior. Pre-clinical models: techniques and protocols, 99-103.

Kraushaar, U., Jonas, P., 2000. Efficacy and stability of quantal GABA release at a hippocampal interneuron-principal neuron synapse. J.Neurosci. 20, 5594-5607.

Kuczewski, N., Porcher, C., Ferrand, N., Fiorentino, H., Pellegrino, C., Kolarow, R., Lessmann, V., Medina, I., Gaiarsa, J.L., 2008. Backpropagating action potentials trigger dendritic release of BDNF during spontaneous network activity. J.Neurosci. 28, 7013-7023.

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. J.Neurosci. 16, 2027-2033.

Kuhn, H.G., Toda, T., Gage, F.H., 2018. Adult hippocampal neurogenesis: a coming-of-age story. Journal of Neuroscience 38, 10401-10410.

Kuipers, S.D., Schroeder, J.E., Trentani, A., 2015. Changes in hippocampal neurogenesis throughout early development. Neurobiol Aging 36, 365-379.

Kullmann, D.M., 2011. Interneuron networks in the hippocampus. Current opinion in neurobiology 21, 709-716.

Lafenêtre, P., Leske, O., Ma-Högemeie, Z., Haghikia, A., Bichler, Z., Wahle, P., Heumann, R., 2010. Exercise can rescue recognition memory impairment in a model with reduced adult hippocampal neurogenesis. Frontiers in behavioral neuroscience 3, 790.

Laplagne, D.A., Espósito, M.S., Piatti, V.C., Morgenstern, N.A., Zhao, C., van Praag, H., Gage, F.H., Schinder, A.F., 2006. Functional convergence of neurons generated in the developing and adult hippocampus. PLoS.Biol. 4, e409.

Laplagne, D.A., Kamienkowski, J.E., Espósito, M.S., Piatti, V.C., Zhao, C., Gage, F.H., Schinder, A.F., 2007. Similar GABAergic inputs in dentate granule cells born during embryonic and adult neurogenesis. Eur.J.Neurosci. 25, 2973-2981.

Lawrence, J.J., McBain, C.J., 2003. Interneuron diversity series: containing the detonation--feedforward inhibition in the CA3 hippocampus. Trends Neurosci. 26, 631-640.

Lee, C.K., Weindruch, R., Prolla, T.A., 2000. Gene-expression profile of the ageing brain in mice. Nat Genet 25, 294-297.

Lee, H.S., Ghetti, A., Pinto-Duarte, A., Wang, X., Dziewczapolski, G., Galimi, F., Huitron-Resendiz, S., Piña-Crespo, J.C., Roberts, A.J., Verma, I.M., 2014. Astrocytes contribute to gamma oscillations and recognition memory. Proceedings of the National Academy of Sciences 111, E3343-E3352.

Lee, S.W., Clemenson, G.D., Gage, F.H., 2012. New neurons in an aged brain, Behavioural Brain Research, pp. 497-507.

Leger, M., Quiedeville, A., Bouet, V., Haelewyn, B., Boulouard, M., Schumann-Bard, P., Freret, T., 2013. Object recognition test in mice. Nature protocols 8, 2531-2537.

Lepousez, G., Nissant, A., Lledo, P.-M., 2015. Adult Neurogenesis and the Future of the Rejuvenating Brain Circuits. Neuron 86, 387-401.

Lepousez, G., Valley, M.T., Lledo, P.M., 2013. The impact of adult neurogenesis on olfactory bulb circuits and computations. Annu Rev Physiol 75, 339-363.

Lewis, P.F., Emerman, M., 1994. Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus. Journal of virology 68, 510-516.

Li, S., Jin, M., Koeglsperger, T., Shepardson, N.E., Shankar, G.M., Selkoe, D.J., 2011. Soluble Aβ oligomers inhibit long-term potentiation through a mechanism involving excessive activation of extrasynaptic NR2B-containing NMDA receptors. Journal of Neuroscience 31, 6627-6638.

Liu, P.Z., Nusslock, R., 2018. Exercise-mediated neurogenesis in the hippocampus via BDNF. Frontiers in neuroscience 12, 52.

Long, J.M., Kalehua, A.N., Muth, N.J., Calhoun, M.E., Jucker, M., Hengemihle, J.M., Ingram, D.K., Mouton, P.R., 1998. Stereological analysis of astrocyte and microglia in aging mouse hippocampus. Neurobiology of aging 19, 497-503.

Lopes da Silva, F., 2013. EEG and MEG: Relevance to Neuroscience. Neuron 80, 1112-1128.

Lopez-Garcia, C., 1993. Postnatal neurogenesis and regeneration. Neuronal Cell Death and Repair: Volume 6 6, 237.

Lopez-Otin, C., Blasco, M.A., Partridge, L., Serrano, M., Kroemer, G., 2013. The hallmarks of aging. Cell 153, 1194-1217.

Llinas, R., Ribary, U., 1993. Coherent 40-Hz oscillation characterizes dream state in humans. Proceedings of the National Academy of Sciences 90, 2078-2081.

Mably, A.J., Colgin, L.L., 2018. Gamma oscillations in cognitive disorders. Current opinion in neurobiology 52, 182-187.

Mably, A.J., Gereke, B.J., Jones, D.T., Colgin, L.L., 2017. Impairments in spatial representations and rhythmic coordination of place cells in the 3xTg mouse model of Alzheimer's disease. Hippocampus 27, 378-392.

Madisen, L., Zwingman, T.A., Sunkin, S.M., Oh, S.W., Zariwala, H.A., Gu, H., Ng, L.L., Palmiter, R.D., Hawrylycz, M.J., Jones, A.R., Lein, E.S., Zeng, H., 2010. A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. Nat Neurosci 13, 133-140.

Madsen, T.M., Kristjansen, P.E., Bolwig, T.G., Wortwein, G., 2003. Arrested neuronal proliferation and impaired hippocampal function following fractionated brain irradiation in the adult rat. Neuroscience 119, 635-642.

Manippa, V., Palmisano, A., Filardi, M., Vilella, D., Nitsche, M.A., Rivolta, D., Logroscino, G., 2022. An update on the use of gamma (multi) sensory stimulation for Alzheimer’s disease treatment. Frontiers in Aging Neuroscience 14, 1095081.

Marin-Burgin, A., Mongiat, L.A., Pardi, M.B., Schinder, A.F., 2012. Unique processing during a period of high excitation/inhibition balance in adult-born neurons. Science 335, 1238-1242.

Marin-Burgin, A., Schinder, A.F., 2012. Requirement of adult-born neurons for hippocampus-dependent learning. Behav Brain Res 227, 391-399.

Marlatt, M.W., Potter, M.C., Lucassen, P.J., van Praag, H., 2012. Running throughout middle-age improves memory function, hippocampal neurogenesis, and BDNF levels in female C57BL/6J mice. Dev Neurobiol 72, 943-952.

Marschallinger, J., Iram, T., Zardeneta, M., Lee, S.E., Lehallier, B., Haney, M.S., Pluvinage, J.V., Mathur, V., Hahn, O., Morgens, D.W., 2020. Lipid-droplet-accumulating microglia represent a dysfunctional and proinflammatory state in the aging brain. Nature neuroscience 23, 194-208.

Martersteck, E.M., Hirokawa, K.E., Evarts, M., Bernard, A., Duan, X., Li, Y., Ng, L., Oh, S.W., Ouellette, B., Royall, J.J., 2017. Diverse central projection patterns of retinal ganglion cells. Cell reports 18, 2058-2072.

Martorell, A.J., Paulson, A.L., Suk, H.-J., Abdurrob, F., Drummond, G.T., Guan, W., Young, J.Z., Kim, D.N.-W., Kritskiy, O., Barker, S.J., Mangena, V., Prince, S.M., Brown, E.N., Chung, K., Boyden, E.S., Singer, A.C., Tsai, L.-H., 2019. Multi-sensory Gamma Stimulation Ameliorates Alzheimer's-Associated Pathology and Improves Cognition. Cell 177, 256-271.e222.

Matsuda, N., Lu, H., Fukata, Y., Noritake, J., Gao, H., Mukherjee, S., Nemoto, T., Fukata, M., Poo, M.M., 2009. Differential activity-dependent secretion of brain-derived neurotrophic factor from axon and dendrite. J.Neurosci. 29, 14185-14198.

Mattson, M.P., 2012. Parkinson's disease: don't mess with calcium. The Journal of Clinical Investigation 122, 1195-1198.

McAvoy, K.M., Scobie, K.N., Berger, S., Russo, C., Guo, N., Decharatanachart, P., Vega-Ramirez, H., Miake-Lye, S., Whalen, M., Nelson, M., Bergami, M., Bartsch, D., Hen, R., Berninger, B., Sahay, A., 2016. Modulating Neuronal Competition Dynamics in the Dentate Gyrus to Rejuvenate Aging Memory Circuits. Neuron 91, 1356-1373.

McEwen, B.S., Alves, S.E., Bulloch, K., Weiland, N.G., 1997. Ovarian steroids and the brain: implications for cognition and aging. Neurology 48, 8S-15S.

Meltzer, L.A., Yabaluri, R., Deisseroth, K., 2005. A role for circuit homeostasis in adult neurogenesis. Trends Neurosci. 28, 653-660.

Mercier, F., Kitasako, J.T., Hatton, G.I., 2002. Anatomy of the brain neurogenic zones revisited: fractones and the fibroblast/macrophage network. The Journal of comparative neurology 451, 170-188.

Miranda, M., Morici, J.F., Zanoni, M.B., Bekinschtein, P., 2019. Brain-derived neurotrophic factor: a key molecule for memory in the healthy and the pathological brain. Frontiers in cellular neuroscience 13, 472800.

Misselhorn, J., Schwab, B.C., Schneider, T.R., Engel, A.K., 2019. Synchronization of sensory gamma oscillations promotes multisensory communication. Eneuro 6.

Mongiat, L.A., Espósito, M.S., Lombardi, G., Schinder, A.F., 2009. Reliable activation of immature neurons in the adult hippocampus. PLoS.ONE. 4, e5320.

Montagne, A., Barnes, S.R., Sweeney, M.D., Halliday, M.R., Sagare, A.P., Zhao, Z., Toga, A.W., Jacobs, R.E., Liu, C.Y., Amezcua, L., Harrington, M.G., Chui, H.C., Law, M., Zlokovic, B.V., 2015. Blood-brain barrier breakdown in the aging human hippocampus. Neuron 85, 296-302.

Moreno-Jiménez, E.P., Flor-García, M., Terreros-Roncal, J., Rábano, A., Cafini, F., Pallas-Bazarra, N., Ávila, J., Llorens-Martín, M., 2019. Adult hippocampal

neurogenesis is abundant in neurologically healthy subjects and drops sharply in patients with Alzheimer's disease. Nat Med, in press.

Moreno-Jimenez, E.P., Jurado-Arjona, J., Avila, J., Llorens-Martin, M., 2019. The Social Component of Environmental Enrichment Is a Pro-neurogenic Stimulus in Adult c57BL6 Female Mice. Frontiers in cell and developmental biology 7, 62.

Morgenstern, N.A., Lombardi, G., Schinder, A.F., 2008. Newborn granule cells in the ageing dentate gyrus. J.Physiol 586, 3751-3757.

Moser, E.I., Kropff, E., Moser, M.-B., 2008. Place cells, grid cells, and the brain's spatial representation system. Annual review of neuroscience 31, 69-89.

Mouton, P.R., Long, J.M., Lei, D.-L., Howard, V., Jucker, M., Calhoun, M.E., Ingram, D.K., 2002. Age and gender effects on microglia and astrocyte numbers in brains of mice. Brain research 956, 30-35.

Murdock, M.H., Yang, C.-Y., Sun, N., Pao, P.-C., Blanco-Duque, C., Kahn, M.C., Kim, T., Lavoie, N.S., Victor, M.B., Islam, M.R., 2024. Multisensory gamma stimulation promotes glymphatic clearance of amyloid. Nature 627, 149-156.

Murty, D.V., Manikandan, K., Kumar, W.S., Ramesh, R.G., Purokayastha, S., Javali, M., Rao, N.P., Ray, S., 2020. Gamma oscillations weaken with age in healthy elderly in human EEG. NeuroImage 215, 116826.

Nakashiba, T., Cushman, J.D., Pelkey, K.A., Renaudineau, S., Buhl, D.L., McHugh, T.J., Barrera, V.R., Chittajallu, R., Iwamoto, K.S., McBain, C.J., Fanselow, M.S., Tonegawa, S., 2012. Young Dentate Granule Cells Mediate Pattern Separation, whereas Old Granule Cells Facilitate Pattern Completion. Cell 149, 188-201.

Nakazono, T., Jun, H., Blurton-Jones, M., Green, K.N., Igarashi, K.M., 2018. Gamma oscillations in the entorhinal-hippocampal circuit underlying memory and dementia. Neuroscience research 129, 40-46.

Nedergaard, M., Goldman, S.A., 2020. Glymphatic failure as a final common pathway to dementia. Science 370, 50-56.

Neeper, S.A., Gómez-Pinilla, F., Choi, J., Cotman, C.W., 1996. Physical activity increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain. Brain Research 726, 49-56.

Negredo, P.N., Yeo, R.W., Brunet, A., 2020. Aging and rejuvenation of neural stem cells and their niches. Cell stem cell 27, 202-223.

Neves, G., Cooke, S.F., Bliss, T.V., 2008. Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. Nature reviews neuroscience 9, 65-75.

Norris, C.M., Korol, D.L., Foster, T.C., 1996. Increased susceptibility to induction of long-term depression and long-term potentiation reversal during aging. Journal of Neuroscience 16, 5382-5392.

O'Keefe, J., 1976. Place units in the hippocampus of the freely moving rat. Experimental Neurology 51, 78-109.

O'Keefe, J., Dostrovsky, J., 1971. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. Brain Res. 34, 171-175.

Olariu, A., Cleaver, K.M., Cameron, H.A., 2007. Decreased neurogenesis in aged rats results from loss of granule cell precursors without lengthening of the cell cycle. J.Comp Neurol. 501, 659-667.

Olson, A.K., Eadie, B.D., Ernst, C., Christie, B.R., 2006. Environmental enrichment and voluntary exercise massively increase neurogenesis in the adult hippocampus via dissociable pathways. Hippocampus 16, 250-260.

Overstreet-Wadiche, L.S., Bensen, A.L., Westbrook, G.L., 2006a. Delayed development of adult-generated granule cells in dentate gyrus. J.Neurosci. 26, 2326-2334.

Overstreet-Wadiche, L.S., Bromberg, D.A., Bensen, A.L., Westbrook, G.L., 2006b. Seizures accelerate functional integration of adult-generated granule cells. J.Neurosci. 26, 4095-4103.

Overstreet Wadiche, L.S., Bromberg, D.A., Bensen, A.L., Westbrook, G.L., 2005. GABAergic signaling to newborn neurons in dentate gyrus. J.Neurophysiol. 94 4528-4532.

Pala, A., Petersen, Carl C.H., 2015. In Vivo Measurement of Cell-Type-Specific Synaptic Connectivity and Synaptic Transmission in Layer 2/3 Mouse Barrel Cortex. Neuron 85, 68-75.

Palmer, A.L., Ousman, S.S., 2018. Astrocytes and Aging. Frontiers in aging neuroscience 10, 337-337.

Palmer, T.D., Willhoite, A.R., Gage, F.H., 2000. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. J.Comp Neurol. 425, 479-494.

Park, H., Poo, M.M., 2013. Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. Nat Rev Neurosci 14, 7-23.

Park, S.-S., Park, H.-S., Kim, C.-J., Kang, H.-S., Kim, D.-H., Baek, S.-S., Kim, T.-W., 2020. Physical exercise during exposure to 40-Hz light flicker improves cognitive functions in the 3xTg mouse model of Alzheimer’s disease. Alzheimer's research & therapy 12, 1-15.

Parras, C.M., Galli, R., Britz, O., Soares, S., Galichet, C., Battiste, J., Johnson, J.E., Nakafuku, M., Vescovi, A., Guillemot, F., 2004. Mash1 specifies neurons and oligodendrocytes in the postnatal brain. The EMBO journal 23, 4495-4505.

Pastor, M.A., Artieda, J., Arbizu, J., Marti-Climent, J.M., Peñuelas, I., Masdeu, J.C., 2002. Activation of human cerebral and cerebellar cortex by auditory stimulation at 40 Hz. Journal of Neuroscience 22, 10501-10506.

Pastor, M.A., Artieda, J., Arbizu, J., Valencia, M., Masdeu, J.C., 2003. Human cerebral activation during steady-state visual-evoked responses. Journal of neuroscience 23, 11621-11627.

Paxinos, G., Franklin, K.B.J., 2001. The mouse brain in stereotaxic coordinates.

Piatti, V.C., Davies-Sala, M.G., Esposito, M.S., Mongiat, L.A., Trinchero, M.F., Schinder, A.F., 2011. The timing for neuronal maturation in the adult hippocampus is modulated by local network activity. J Neurosci 31, 7715-7728.

Piatti, V.C., Esposito, M.S., Schinder, A.F., 2006. The timing of neuronal development in adult hippocampal neurogenesis. Neuroscientist. 12, 463-468.

Piatti, V.C., Ewell, L.A., Leutgeb, J.K., 2013. Neurogenesis in the dentate gyrus: carrying the message or dictating the tone. Front Neurosci 7, 50.

Pluvinage, J.V., Haney, M.S., Smith, B.A., Sun, J., Iram, T., Bonanno, L., Li, L., Lee, D.P., Morgens, D.W., Yang, A.C., 2019. CD22 blockade restores homeostatic microglial phagocytosis in ageing brains. Nature 568, 187-192.

Popescu, B.O., Toescu, E.C., Popescu, L.M., Bajenaru, O., Muresanu, D.F., Schultzberg, M., Bogdanovic, N., 2009. Blood-brain barrier alterations in ageing and dementia. Journal of the Neurological Sciences 283, 99-106.

Rager, G., Singer, W., 1998. The response of cat visual cortex to flicker stimuli of variable frequency. European Journal of Neuroscience 10, 1856-1877.

Ramón y Cajal, S., 1893. Estructura del asta de Ammon y fascia dentata. Tip. de Fortanet, Madrid.

Rao, M.S., Hattiangady, B., Abdel-Rahman, A., Stanley, D.P., Shetty, A.K., 2005. Newly born cells in the ageing dentate gyrus display normal migration, survival and neuronal fate choice but endure retarded early maturation. European Journal of Neuroscience 21, 464-476.

Rao, M.S., Hattiangady, B., Shetty, A.K., 2006. The window and mechanisms of major age-related decline in the production of new neurons within the dentate gyrus of the hippocampus. Aging cell 5, 545-558.

Raz, N., Rodrigue, K., Head, D., Kennedy, K., Acker, J., 2004. Differential aging of the medial temporal lobe: a study of a five-year change. Neurology 62, 433-438.

Reichardt, L.F., 2006. Neurotrophin-regulated signalling pathways. Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences 361, 1545-1564.

Restivo, L., Niibori, Y., Mercaldo, V., Josselyn, S.A., Frankland, P.W., 2015. Development of Adult-Generated Cell Connectivity with Excitatory and Inhibitory Cell Populations in the Hippocampus. J Neurosci 35, 10600-10612.

Rex, C.S., Lauterborn, J.C., Lin, C.-Y., Kramár, E.A., Rogers, G.A., Gall, C.M., Lynch, G., 2006. Restoration of long-term potentiation in middle-aged hippocampus

after induction of brain-derived neurotrophic factor. Journal of neurophysiology 96, 677-685.

Ricceri, L., Colozza, C., Calamandrei, G., 2000. Ontogeny of spatial discrimination in mice: A longitudinal analysis in the modified open-field with objects. Developmental Psychobiology: The Journal of the International Society for Developmental Psychobiology 37, 109-118.

Rivolta, D., Heidegger, T., Scheller, B., Sauer, A., Schaum, M., Birkner, K., Singer, W., Wibral, M., Uhlhaas, P.J., 2015. Ketamine dysregulates the amplitude and connectivity of high-frequency oscillations in cortical–subcortical networks in humans: evidence from resting-state magnetoencephalography-recordings. Schizophrenia bulletin 41, 1105-1114.

Sahay, A., Scobie, K.N., Hill, A.S., O'Carroll, C.M., Kheirbek, M.A., Burghardt, N.S., Fenton, A.A., Dranovsky, A., Hen, R., 2011a. Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. Nature 472, 466-470.

Sahay, A., Wilson, D.A., Hen, R., 2011b. Pattern separation: a common function for new neurons in hippocampus and olfactory bulb. Neuron 70, 582-588.

Sandeman, D.C., Bazin, F., Beltz, B.S., 2011. Adult neurogenesis: examples from the decapod crustaceans and comparisons with mammals. Arthropod Struct Dev 40, 258-275.

Sandhu, S., Cook, P., Diamond, M.C., 1986. Rat cerebral cortical estrogen receptors: male-female, right-left. Experimental neurology 92, 186-196.

Sato, K., 2015. Effects of Microglia on Neurogenesis. Glia 63, 1394-1405.

Scahill, R.I., Frost, C., Jenkins, R., Whitwell, J.L., Rossor, M.N., Fox, N.C., 2003. A longitudinal study of brain volume changes in normal aging using serial registered magnetic resonance imaging. Archives of neurology 60, 989-994.

Scoville, W.B., Milner, B., 1957. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry 20, 11.

Scoville, W.B., Milner, B., 2000. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. 1957. J.Neuropsychiatry Clin.Neurosci. 12, 103-113.

Schaaf, M.J.M., Workel, J.O., Lesscher, H.M., Vreugdenhil, E., Oitzl, M.S., Ron de Kloet, E., 2001. Correlation between hippocampal BDNF mRNA expression and memory performance in senescent rats. Brain Research 915, 227-233.

Scharfman, H.E., Myers, C.E., 2013. Hilar mossy cells of the dentate gyrus: a historical perspective. Frontiers in neural circuits 6, 106.

Schinder, A.F., Poo, M., 2000. The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity. Trends Neurosci. 23, 639-645.

Seib, D.R.M., Corsini, N.S., Ellwanger, K., Plaas, C., Mateos, A., Pitzer, C., Niehrs, C., Celikel, T., Martin-Villalba, A., 2013. Loss of Dickkopf-1 restores

neurogenesis in old age and counteracts cognitive decline. Cell stem cell 12, 204-214.

Seib, D.R.M., Martin-Villalba, A., 2015. Neurogenesis in the Normal Ageing Hippocampus: A Mini-Review. Gerontology 61, 327-335.

Seki, T., 2003. Microenvironmental elements supporting adult hippocampal neurogenesis. Anat Sci Int 78, 69-78.

Shen, Q., Wu, X., Zhang, Z., Zhang, D., Yang, S., Xing, D., 2022. Gamma frequency light flicker regulates amyloid precursor protein trafficking for reducing β-amyloid load in Alzheimer's disease model. Aging Cell 21, e13573.

Shetty, A.K., Hattiangady, B., Shetty, G.A., 2005. Stem/progenitor cell proliferation factors FGF-2, IGF-1, and VEGF exhibit early decline during the course of aging in the hippocampus: role of astrocytes. Glia 51, 173-186.

Sierra, A., Encinas, J.M., Deudero, J.J., Chancey, J.H., Enikolopov, G., Overstreet-Wadiche, L.S., Tsirka, S.E., Maletic-Savatic, M., 2010. Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. Cell Stem Cell 7, 483-495.

Sik, A., Penttonen, M., Buzsaki, G., 1997. Interneurons in the hippocampal dentate gyrus: an in vivo intracellular study. Eur.J.Neurosci. 9, 573-588.

Singer, A.C., Martorell, A.J., Douglas, J.M., Abdurrob, F., Attokaren, M.K., Tipton, J., Mathys, H., Adaikkan, C., Tsai, L.-H., 2018. Noninvasive 40-Hz light flicker to recruit microglia and reduce amyloid beta load. Nature Protocols 13, 1850-1868.

Singh, B., Day, C.M., Abdella, S., Garg, S., 2024. Alzheimer's disease current therapies, novel drug delivery systems and future directions for better disease management. Journal of Controlled Release 367, 402-424.

Snyder, J.S., Ferrante, S.C., Cameron, H.A., 2012. Late maturation of adult-born neurons in the temporal dentate gyrus. PLoS One 7, e48757.

Snyder, J.S., Kee, N., Wojtowicz, J.M., 2001. Effects of adult neurogenesis on synaptic plasticity in the rat dentate gyrus. J.Neurophysiol. 85, 2423-2431.

Sohal, V.S., 2016. How close are we to understanding what (if anything) γ oscillations do in cortical circuits? Journal of Neuroscience 36, 10489-10495.

Sohal, V.S., Zhang, F., Yizhar, O., Deisseroth, K., 2009. Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. Nature 459, 698-702.

Solstad, T., Boccara, C.N., Kropff, E., Moser, M.-B., Moser, E.I., 2008. Representation of Geometric Borders in the Entorhinal Cortex. Science 322, 1865.

Song, J., Sun, J., Moss, J., Wen, Z., Sun, G.J., Hsu, D., Zhong, C., Davoudi, H., Christian, K.M., Toni, N., Ming, G.L., Song, H., 2013. Parvalbumin interneurons mediate neuronal circuitry-neurogenesis coupling in the adult hippocampus. Nat Neurosci 16, 1728-1730.

Sonntag, W.E., Lynch, C.D., Cooney, P.T., Hutchins, P.M., 1997a. Decreases in cerebral microvasculature with age are associated with the decline in growth hormone and insulin-like growth factor 1. Endocrinology 138, 3515-3520.

Sonntag, W.E., Lynch, C.D., Cooney, P.T., Hutchins, P.M., 1997b. Decreases in Cerebral Microvasculature with Age Are Associated with the Decline in Growth Hormone and Insulin-Like Growth Factor 1*. Endocrinology 138, 3515-3520.

Soula, M., Martín-Ávila, A., Zhang, Y., Dhingra, A., Nitzan, N., Sadowski, M.J., Gan, W.-B., Buzsáki, G., 2023. Forty-hertz light stimulation does not entrain native gamma oscillations in Alzheimer's disease model mice. Nature neuroscience 26, 570-578.

Spalding, K.L., Bergmann, O., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Huttner, H.B., Bostrom, E., Westerlund, I., Vial, C., Buchholz, B.A., Possnert, G., Mash, D.C., Druid, H., Frisen, J., 2013. Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. Cell 153, 1219-1227.

Sprugnoli, G., Munsch, F., Cappon, D., Paciorek, R., Macone, J., Connor, A., El Fakhri, G., Salvador, R., Ruffini, G., Donohoe, K., 2021. Impact of multisession 40Hz tACS on hippocampal perfusion in patients with Alzheimer's disease. Alzheimer's Research & Therapy 13, 1-14.

Spruston, N., McBain, C., 2006. Structural and Functional Properties of Hippocampal Neurons, The Hippocampus Book. Oxford University Press, New York.

Squire, L.R., Wixted, J.T., 2011. The cognitive neuroscience of human memory since H.M. Annual review of neuroscience 34, 259-288.

Stachniak, T.J., Ghosh, A., Sternson, S.M., 2014. Chemogenetic synaptic silencing of neural circuits localizes a hypothalamus→ midbrain pathway for feeding behavior. Neuron 82, 797-808.

Strange, B.A., Witter, M.P., Lein, E.S., Moser, E.I., 2014. Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. Nature reviews neuroscience 15, 655-669.

Struble, R.G., Desmond, N.L., Levy, W.B., 1978. Anatomical evidence for interlamellar inhibition in the fascia dentata. Brain research 152, 580-585.

Sullivan, J.M., Benton, J.L., Sandeman, D.C., Beltz, B.S., 2007. Adult neurogenesis: a common strategy across diverse species. The Journal of comparative neurology 500, 574-584.

Sun, G.J., Sailor, K.A., Mahmood, Q.A., Chavali, N., Christian, K.M., Song, H., Ming, G.L., 2013. Seamless reconstruction of intact adult-born neurons by serial end-block imaging reveals complex axonal guidance and development in the adult hippocampus. J Neurosci 33, 11400-11411.

Sun, G.J., Zhou, Y., Stadel, R.P., Moss, J., Yong, J.H., Ito, S., Kawasaki, N.K., Phan, A.T., Oh, J.H., Modak, N., Reed, R.R., Toni, N., Song, H., Ming, G.L., 2015. Tangential migration of neuronal precursors of glutamatergic neurons in the adult mammalian brain. Proc Natl Acad Sci U S A 112, 9484-9489.

Tamura, M., Spellman, T.J., Rosen, A.M., Gogos, J.A., Gordon, J.A., 2017. Hippocampal-prefrontal theta-gamma coupling during performance of a spatial working memory task. Nature communications 8, 2182.

Tashiro, A., Sandler, V.M., Toni, N., Zhao, C., Gage, F.H., 2006. NMDA-receptor-mediated, cell-specific integration of new neurons in adult dentate gyrus. Nature 442, 929-933.

Temprana, S.G., Mongiat, L.A., Yang, S.M., Trinchero, M.F., Alvarez, D.D., Kropff, E., Giacomini, D., Beltramone, N., Lanuza, G.M., Schinder, A.F., 2015. Delayed Coupling to Feedback Inhibition during a Critical Period for the Integration of Adult-Born Granule Cells. Neuron 85, 116-130.

Terreros-Roncal, J., Moreno-Jiménez, E.P., Flor-García, M., Rodríguez-Moreno, C.B., Trinchero, M.F., Cafini, F., Rábano, A., Llorens-Martín, M., 2021. Impact of neurodegenerative diseases on human adult hippocampal neurogenesis. Science 374, 1106-1113.

Tobin, M.K., Musaraca, K., Disouky, A., Shetti, A., Bheri, A., Honer, W.G., Kim, N., Dawe, R.J., Bennett, D.A., Arfanakis, K., 2019. Human hippocampal neurogenesis persists in aged adults and Alzheimer's disease patients. Cell stem cell 24, 974-982. e973.

Toda, T., Parylak, S.L., Linker, S.B., Gage, F.H., 2019. The role of adult hippocampal neurogenesis in brain health and disease. Molecular psychiatry 24, 67-87.

Toni, N., Laplagne, D.A., Zhao, C., Lombardi, G., Ribak, C.E., Gage, F.H., Schinder, A.F., 2008. Neurons born in the adult dentate gyrus form functional synapses with target cells. Nat.Neurosci. 11, 901-907.

Toni, N., Schinder, A.F., 2015. Maturation and Functional Integration of New Granule Cells into the Adult Hippocampus. Cold Spring Harb Perspect Biol 8, a018903.

Torborg, C.L., Nakashiba, T., Tonegawa, S., McBain, C.J., 2010. Control of CA3 output by feedforward inhibition despite developmental changes in the excitation-inhibition balance. J Neurosci 30, 15628-15637.

Tozuka, Y., Fukuda, S., Namba, T., Seki, T., Hisatsune, T., 2005. GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells. Neuron 47, 803-815.

Treves, A., Tashiro, A., Witter, M.E., Moser, E.I., 2008. What is the mammalian dentate gyrus good for? Neuroscience 154, 1155-1172.

Trimper, J.B., Galloway, C.R., Jones, A.C., Mandi, K., Manns, J.R., 2017. Gamma oscillations in rat hippocampal subregions dentate gyrus, CA3, CA1, and subiculum underlie associative memory encoding. Cell reports 21, 2419-2432.

Trinchero, M.F., Buttner, K.A., Sulkes Cuevas, J.N., Temprana, S.G., Fontanet, P., Monzon Salinas, M.C., Ledda, F., Paratcha, G., Schinder, A.F., 2017. High Plasticity of New Granule Cell in the Aging Hippocampus. Cell Rep 21, 1129-1139.

Trinchero, M.F., Herrero, M., Monzón-Salinas, M.C., Schinder, A.F., 2019a. Experience-Dependent Structural Plasticity of Adult-Born Neurons in the Aging Hippocampus. Frontiers in neuroscience 13, 739-739.

Trinchero, M.F., Herrero, M., Schinder, A.F., 2019b. Rejuvenating the Brain With Chronic Exercise Through Adult Neurogenesis.

Tzilivaki, A., Tukker, J.J., Maier, N., Poirazi, P., Sammons, R.P., Schmitz, D., 2023. Hippocampal GABAergic interneurons and memory. Neuron 111, 3154-3175.

Udeochu, J.C., Shea, J.M., Villeda, S.A., 2016. Microglia communication: Parallels between aging and Alzheimer's disease. Clinical and Experimental Neuroimmunology 7, 114-125.

van Praag, H., Christie, B.R., Sejnowski, T.J., Gage, F.H., 1999. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 96, 13427-13431.

van Praag, H., Schinder, A.F., Christie, B.R., Toni, N., Palmer, T.D., Gage, F.H., 2002. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. Nature 415, 1030-1034.

van Praag, H., Shubert, T., Zhao, C., Gage, F.H., 2005. Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. J.Neurosci. 25, 8680-8685.

Verbitsky, M., Yonan, A.L., Malleret, G., Kandel, E.R., Gilliam, T.C., Pavlidis, P., 2004. Altered hippocampal transcript profile accompanies an age-related spatial memory deficit in mice. Learn Mem 11, 253-260.

Verret, L., Mann, E.O., Hang, G.B., Barth, A.M., Cobos, I., Ho, K., Devidze, N., Masliah, E., Kreitzer, A.C., Mody, I., 2012. Inhibitory interneuron deficit links altered network activity and cognitive dysfunction in Alzheimer model. Cell 149, 708-721.

Villanueva-Castillo, C., Tecuatl, C., Herrera-López, G., Galván, E.J., 2017. Aging-related impairments of hippocampal mossy fibers synapses on CA3 pyramidal cells. Neurobiology of aging 49, 119-137.

Villeda, S.A., Luo, J., Mosher, K.I., Zou, B., Britschgi, M., Bieri, G., Stan, T.M., Fainberg, N., Ding, Z., Eggel, A., Lucin, K.M., Czirr, E., Park, J.-S., Couillard-Després, S., Aigner, L., Li, G., Peskind, E.R., Kaye, J.A., Quinn, J.F., Galasko, D.R., Xie, X.S., Rando, T.A., Wyss-Coray, T., 2011. The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. Nature 477, 90-94.

Vivar, C., Potter, M.C., van Praag, H., 2013. All about running: synaptic plasticity, growth factors and adult hippocampal neurogenesis. Neurogenesis and neural plasticity, 189-210.

Wang, H., Keiser, J.A., Olszewski, B., Rosebury, W., Robertson, A., Kovesdi, I., Gordon, D., 2004. Delayed angiogenesis in aging rats and therapeutic effect of adenoviral gene transfer of VEGF. International journal of molecular medicine 13, 581-587.

Wang, L., Chang, X., She, L., Xu, D., Huang, W., Poo, M.-M., 2015. Autocrine action of BDNF on dendrite development of adult-born hippocampal neurons. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 35, 8384-8393.

Wang, S., Scott, B.W., Wojtowicz, J.M., 2000. Heterogenous properties of dentate granule neurons in the adult rat. J.Neurobiol. 42, 248-257.

Wang, Y.-Z., Plane, J.M., Jiang, P., Zhou, C.J., Deng, W., 2011. Concise review: quiescent and active states of endogenous adult neural stem cells: identification and characterization. Stem cells 29, 907-912.

Waterhouse, E.G., An, J.J., Orefice, L.L., Baydyuk, M., Liao, G.Y., Zheng, K., Lu, B., Xu, B., 2012. BDNF promotes differentiation and maturation of adult-born neurons through GABAergic transmission. J Neurosci 32, 14318-14330.

Wu, Y., Bottes, S., Fisch, R., Zehnder, C., Cole, J.D., Pilz, G.-A., Helmchen, F., Simons, B.D., Jessberger, S., 2023. Chronic in vivo imaging defines age-dependent alterations of neurogenesis in the mouse hippocampus. Nature Aging 3, 380-390.

Xu, B., Gottschalk, W., Chow, A., Wilson, R.I., Schnell, E., Zang, K., Wang, D., Nicoll, R.A., Lu, B., Reichardt, L.F., 2000. The role of brain-derived neurotrophic factor receptors in the mature hippocampus: modulation of long-term potentiation through a presynaptic mechanism involving TrkB. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 20, 6888-6897.

Yamamoto, J., Suh, J., Takeuchi, D., Tonegawa, S., 2014. Successful execution of working memory linked to synchronized high-frequency gamma oscillations. Cell 157, 845-857.

Yang, S.M., Alvarez, D.D., Schinder, A.F., 2015. Reliable Genetic Labeling of Adult-Born Dentate Granule Cells Using Ascl1CreERT2 and GlastCreERT2 Murine Lines. J Neurosci 35, 15379-15390.

Yassa, M.A., Muftuler, L.T., Stark, C.E.L., 2010. Ultrahigh-resolution microstructural diffusion tensor imaging reveals perforant path degradation in aged humans in vivo. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107, 12687-12691.

Zeng, Y., Tan, M., Kohyama, J., Sneddon, M., Watson, J.B., Sun, Y.E., Xie, C.-W., 2011. Epigenetic Enhancement of BDNF Signaling Rescues Synaptic Plasticity in Aging, Journal of Neuroscience, pp. 17800-17810.

Zhao, C., Teng, E.M., Summers Jr., R.G., Ming, G.L., Gage, F.H., 2006. Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. J.Neurosci. 26, 3-11.

Zheng, L., Yu, M., Lin, R., Wang, Y., Zhuo, Z., Cheng, N., Wang, M., Tang, Y., Wang, L., Hou, S.-T., 2020. Rhythmic light flicker rescues hippocampal low gamma and protects ischemic neurons by enhancing presynaptic plasticity. Nature communications 11, 3012.

Zhou, Y., Su, Y., Li, S., Kennedy, B.C., Zhang, D.Y., Bond, A.M., Sun, Y., Jacob, F., Lu, L., Hu, P., 2022. Molecular landscapes of human hippocampal immature neurons across lifespan. Nature 607, 527-533.

Ziegler-Waldkirch, S., d′ Errico, P., Sauer, J.F., Erny, D., Savanthrapadian, S., Loreth, D., Katzmarski, N., Blank, T., Bartos, M., Prinz, M., 2018. Seed-induced Aβ deposition is modulated by microglia under environmental enrichment in a mouse model of Alzheimer's disease. The EMBO journal 37, 167-182.

Zocher, S., Toda, T., 2023. Epigenetic aging in adult neurogenesis. Hippocampus 33, 347-359.