



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

“Análisis morfológico de neuronas CA1 y CA3 de hipocampo dorsal y evaluación del proceso de aprendizaje y memoria espacial en ratas *Wistar* adultas”

Tesis presentada para obtener el título de:

Licenciatura en Biología

PRESENTA:

María Fernanda Medina Flores

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. Adriana Berenice Silva Gómez

Noviembre 2015



Esta investigación fue realizada con apoyo del Consejo de
Ciencia y Tecnología del Estado de Puebla

Dedicatorias

Esta tesis esta dedica a mi padre, el rey de reyes y Señor de señores: Jehová de los ejércitos. Él se encargó de darme la fuerza para concluir la carrera y finalizar mi proyecto de tesis, él se ha encargado de cumplir sus promesas.....

*Él provee de sana sabiduría a los rectos;
es escudo a los que caminan rectamente.*

*Es el que guarda las veredas del juicio,
y preserva el camino de sus santos.
Entonces entenderás justicia, juicio y
equidad,
y todo buen camino.*

*Cuando la sabiduría entrare en tu corazón,
y la ciencia fuere grata a tu alma,
la discreción te guardará; te preservará la
inteligencia,
para librate del mal camino
Proverbios 2:7-12*

*Bienaventurado el hombre que halla la
sabiduría,
y que obtiene la inteligencia;
porque su ganancia es mejor que la
ganancia de la plata,
y sus frutos más que el oro fino.*

Proverbios 3

*A ti, Dios de mis padres,
te alabo y te doy gracias.*

*Me has dado sabiduría y poder,
me has dado a conocer lo que te pedimos,
¡me has dado a conocer el sueño del rey!*

Daniel 2:23

Ma y pa: este trabajo es para ustedes y de ustedes. Gracias por sustentar con todos mis gastos durante estos 5 años y medio de carrera y por los otros 21 años atrás jajajaja, por lo que ahora podemos decir que tenemos un logro más :D. Gracias por ese apoyo incondicional que me han brindado, por las palabras que siempre me animaban a seguir adelante, por las veces que apure a mamá con la comida para que el domingo estuviera todo y pudiera regresar a Puebla con comida, por las veces que madrugaban para llevarme al autobús y llegar a tiempo, por estar siempre ahí conmigo, en las buenas y en las malas, por todos sus cuidados y más.... pero creo que si continuo no voy acabar y si... ya sé que les debo mucho.. no se me olvida jajaja, los quiero mucho.. saranghae.. fighting !!!!!!!!!!!!!!!

Dra. Berenice: le quiero agradecer por abrirme las puertas del laboratorio y permitirme concluir con broche de oro la carrera, le agradezco por confiar en mí y apoyarme cuando tenía dudas o papeles que entregar ><. Gracias por su ayuda y

por compartir un poquito de los muchos conocimientos que ha adquirido. La aprecio mucho, la considero una mujer muy inteligente y capaz de realizar toda actividad que se proponga. Estuve muy contenta en el laboratorio, aprendí mucho y me llevo recuerdos muy agradables pero sobre todo mucho conocimiento. Gracias.

Esta tesis también se la dedico a todos mis compañeros en el lab:

Adri: fuiste la que estuvo conmigo desde el primer día que pise este laboratorio, gracias por apoyarme en todo momento, por enseñarme a cómo utilizar todas estas cosas que tenemos y por brindarme tu amistad. Gracias por todas esas platicas de kpop que teníamos que me ayudaban a distraerme jeje..y al music bank! Fue una experiencia muy bonita :D. Eres una persona en la que puedo confiar y contar en todo momento. Gracias Adri, por aguantarme todo este tiempo jeje.

Luis: luis.. pues que te puedo decir, tú me ayudaste en las últimas pruebas que tenía que hacer, gracias por darme tus opiniones sobre mi escrito y demás, por que tus palabras de 'vamos Fer, si se puede', eres un gran compañero, muy inteligente.

Y a **Pau, Octavio y Jessi**, que cuando llegaron, dejamos de ser Adri y yo, y desde entonces el lab se llenó de pláticas y risas, gracias por compartir todas las cosas que nos pasaban durante el proceso de nuestros proyectos y por crear una gran atmosfera, que de verdad daban ganas de venir a trabajar, gracias por todas sus buenas vibras.

A mis amigos de toda la carrera, **Dani!!**, **Adrián y jorge**, gracias chicos por brindarme su amistad, por compartir momentos muy agradables, por soportarme por ser pacientes conmigo, son mis mejores amigos, hicieron que todos estos años fueran buenos, jaja gracias por compartir los gustos y disgustos de cada materia que tomamos juntos. Susi, Anita, Danae, Los quiero mucho amigos ! También les dedico esta tesis.

Gracias a cada uno de ustedes, sus consejos siempre fueron positivos hacia mí y de los cuales aprendí mucho! ÉXITO, y vamos declaro que vamos de triunfo en triunfo y de victoria en victoria!!!

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer de manera especial a:

M. en C. Montserrat Vázquez Balbuena
Dr. Arturo Reyes Lazalde

Por aceptar ser mis sinodales, ya que con sus comentarios y sugerencias, este trabajo mejoró y por lo cual se ha concluido de manera satisfactoria.

Gracias por el tiempo que me brindaron.

A la Escuela de Biología, por prepararme profesional durante estos 5 años.

Índice

Glosario de abreviaturas.....	1
Resumen.....	2
Introducción.....	3
Formación hipocampal.....	6
Hipocampo.....	8
Neuronas piramidales CA3.....	9
Neuronas piramidales CA1.....	10
Espinas dendríticas.....	11
Desarrollo cerebral.....	12
Aprendizaje y memoria.....	12
Neuroanatomía de la memoria.....	14
Prueba de reconocimiento de objetos.....	16
Fases de la prueba de reconocimiento de objetos.....	17
Ventajas y desventajas de la prueba de reconocimiento de objetos	18
Justificación.....	19
Hipótesis.....	20
Objetivo general.....	21
Objetivos particulares.....	21
Material y métodos.....	22
Material biológico.....	22
Obtención del tejido.....	22
Observación y análisis de neuronas CA1 y CA3 del hipocampo dorsal.....	23
Prueba de reconocimiento de objetos.....	25

Fase de habituación.....	25
Fase de muestra.....	25
Fase de elección.....	26
Análisis estadístico.....	27
Resultados.....	28
Neuronas piramidales CA1 del hipocampo dorsal.....	30
Neuronas piramidales CA3 del hipocampo dorsal.....	33
Densidad de espinas dendríticas de neuronas CA1 y CA3.....	36
Prueba de reconocimiento de objetos.....	37
Discusión.....	38
Conclusión.....	44
Bibliografía.....	45
Anexo 1.....	53
Anexo 2.....	54

Glosario de abreviaturas

CA - Cuerno de Ammon

CE - Corteza entorrinal

CPE - Corriente postsináptica excitatoria

EI - Episodios de inmovilidad

F- Objeto familiar

GD - Giro dentado

MCP - Memoria a corto plazo

MLP - Memoria a largo plazo

MTs - microtúbulos

N - Objeto novedoso

ON - óxido nítrico

PaS - Parasubículo

PER - Corteza Perirrinal

POR - Corteza Postrinal

PrS - Presubículo

RO - Reconocimiento de objetos

SUB - Subículo

SD - Sprague-Dawley

Resumen

La rata *Taiep* caracterizada por presentar temblor, ataxia, inmovilidad, epilepsia y parálisis; es un mutante mielínico autosómico recesivo que presenta hipomielinización y desmielinización del sistema nervioso central (SNC) durante el desarrollo, lo que provoca alteraciones a nivel molecular, morfológico y funcional de las neuronas. El objetivo de este trabajo fue determinar las características morfológicas de las neuronas piramidales CA1 y CA3 de hipocampo dorsal y su posible influencia en el desempeño de procesos de aprendizaje y memoria espacial en ratas *Taiep* adultas. Se emplearon 48 ratas adultas de la cepa Sprague-Dawley (SD) divididas en dos lotes de 24 ratas cada uno, éstos a su vez fueron divididos en 3 grupos: 1) *Taiep*, 2) portadoras y 3) control (n=8). Un lote se empleó para el análisis morfológico y el otro lote se sometió a la prueba de reconocimiento de objetos (RO). Para el análisis morfológico, cortes coronales de hipocampo dorsal fueron procesados de acuerdo a la técnica de Golgi-Cox y las neuronas piramidales CA1 y CA3 se analizaron con la técnica de Sholl. La prueba de RO permite evaluar la memoria espacial en ratas, basado en el tiempo que pasa explorando un objeto familiar y un objeto novedoso. En el primer ensayo (E1) la rata explora 4 objetos durante 5 minutos, después de un descanso de 30 minutos, se realiza el ensayo 2 (E2) en el cual se dejan 3 objetos empleados en el E1 (objeto familiar) dispuestos de manera diferente y se introduce un objeto nuevo. Se mide el tiempo de exploración de los objetos en E1 y E2, en donde el tiempo de exploración será mayor para el objeto novedoso, cuando se expresa memoria hacia lo familiar; o se explora el objeto familiar y el novedoso por el mismo tiempo, cuando hay una deficiencia del aprendizaje y memoria. Los resultados obtenidos muestran que la rata *Taiep* adulta presenta una disminución dendrítica de los arboles basales de las neuronas piramidales CA1 y CA3 del hipocampo dorsal. La rata portadora presenta una disminución en la arborización dendrítica de los árboles basales y apicales de neuronas CA3. Aunque en ambos grupos experimentales el proceso de aprendizaje y memoria no se ve afectado.

Introducción

Los desórdenes mielínicos en humanos provocan anormalidades en el comportamiento y la salud, ocasionando enfermedades como esclerosis múltiple, fenilcetonuria, epilepsia y desórdenes psiquiátricos (Fields 2008).

De acuerdo a los indicadores de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en América, el 40.3% de la población padece estas afecciones, por lo cual se han empleado nuevos modelos animales que permitan realizar investigaciones en esta área, siendo la rata *Taiep* uno de ellos.

La rata *Taiep* fue descrita por Holmgren y colaboradores en 1989 como un mutante mielínico de origen autosómico recesivo. El nombre *Taiep* es el acrónimo de las principales alteraciones neurológicas que aparecen progresivamente durante el primer año de vida del mutante: **T**emblor, se presenta en el 1° mes de vida e inicia en la cola y avanza hacia la parte proximal de las patas traseras, la **A**taxia locomotora se manifiesta a partir del 4° mes de edad, los episodios espontáneos de **I**nmovilidad en el 5° y 6° mes que son provocados cuando se sostiene a la rata por la cola o el tórax y pueden tardar desde segundos hasta minutos; a partir del 6° mes de edad, la rata presenta **E**pilepsia y en el 8° mes comienza la **P**arálisis progresiva de las patas traseras (Holmgren *et al.*, 1989).

Esta sintomatología se debe a que desde el nacimiento, la rata *Taiep* desarrolla una severa hipomielinización del sistema nervioso central (SNC) seguida de una desmielinización progresiva a lo largo de la vida. Morfológicamente se ha descrito que la pérdida de mielina es ocasionada por una acumulación de microtúbulos (MTs) en el citoplasma de los oligodendrocitos (Duncan *et al.*, 1992), y cambios en la orientación de los Mts cuando se compara con ratas SD normales (Song *et al.*, 1999), lo que provoca una disminución y el posterior bloqueo de las señales de transducción que participan en los mecanismos intracelulares necesarios para la formación y el mantenimiento de la mielina (León-Chávez *et al.*, 2003; Bloom *et al.*, 2013).

En la rata *Taiep*, investigaciones previas han mostrado que la acumulación de MTs en los oligodendrocitos interfiere con el transporte de las proteínas de mielina: la proteína básica de mielina (MBP), la proteína proteolípídica (PLP), el 2', 3'-nucleótido cíclico-3'-fosfodiesterasa (CNP) y la glicoproteína asociada a la mielina (MAG) (Lunn *et al.*, 1997a), provocando una severa desmielinización en estructuras cerebrales como los hemisferios, el cuerpo calloso, la médula espinal, el nervio óptico y el cerebelo. En estas estructuras la proteína que se ve mayormente comprometida es MAG debido a que los niveles de esta proteína son insuficientes desde el primer mes de vida de la rata, a los 2 meses de edad los niveles de CNP, PLP y MBP son reducidos de manera constante hasta quedar solo un 25% respecto de las ratas SD control y a partir de los 6 meses de edad se observa una disminución dramática de mielina hasta alcanzar niveles muy bajos pero estables a los 9 meses de edad (solo mantiene del 10% al 15% de mielina total), (Duncan *et al.*, 1992; Moller *et al.*, 1992; Moller *et al.*, 1997; Lunn *et al.*, 1997a, Lunn *et al.*, 1997b; Song *et al.*, 1999; O'Connor *et al.*, 2000).

Mediante estudios electrofisiológicos, Cortés *et al* (2005) describen que el ciclo de luz-oscuridad influye en la susceptibilidad a presentar episodios de inmovilidad (EI) (Figura 1), siendo las ratas *Taiep* machos de 8.5 y 9.5 meses de edad los más susceptibles, debido a que los EI son más frecuentes y tardan más tiempo (6.5 ± 0.4 EI, 27.6 ± 0.8 s) que en las ratas *Taiep* hembras (3.2 ± 0.3 EI, 22.5 ± 0.1 s), sin embargo, una vez que los organismos alcanzan los 10 meses de edad los EI disminuyen. Además, se registró que durante un EI, el hipocampo muestra una actividad desincronizada asociado a un bajo ritmo theta (5.73 ± 0.05 Hz) similar al que presentan las ratas SD normales cuando están en sueño REM. Debido a esto, la rata *Taiep* se ha empleado como modelo de estudio para enfermedades del sueño como la narcolepsia (Prieto *et al.*, 1991; Cortés *et al.*, 2005; Eguibar *et al.*, 2010; Eguibar y Cortés, 2012).

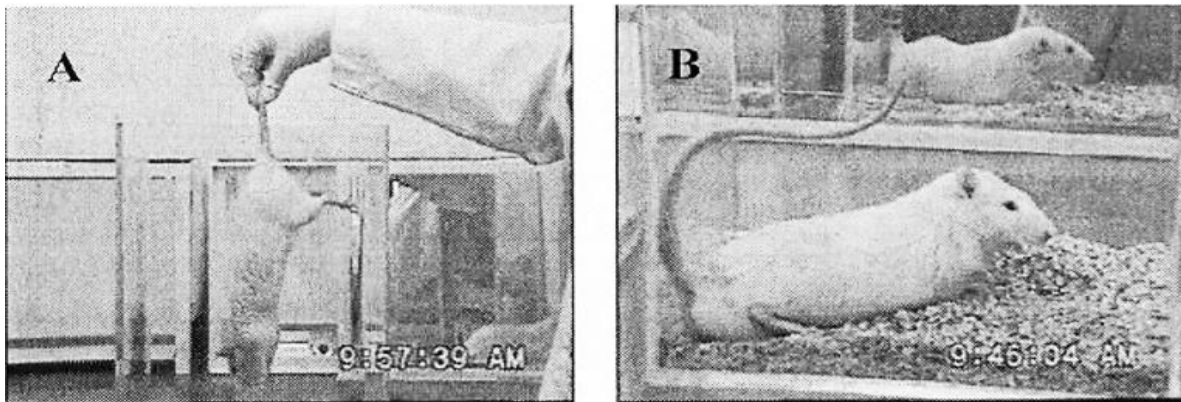


Figura 1. **Episodio de inmovilidad en la rata *Taiep***. En A se muestra el método de inducción de los EI y en B se observa a la rata *Taiep* durante un EI.

Las corrientes sinápticas sincrónicas son de gran importancia debido a que mantienen la estabilidad neuronal, agrupan a poblaciones celulares con el objetivo de integrar y coordinar la información adquirida de manera sensorial (Gray, 1994), sin embargo, Bonansco y colaboradores (2009) mostraron que durante el desarrollo de la rata *Taiep* se presentan transmisiones asincrónicas en la médula espinal. Esto provoca una desorganización en la actividad sináptica de estructuras como el hipocampo, en donde hay un aumento de Ca^{++} extracelular generando corrientes postsinápticas excitatorias seguidas de corrientes sinápticas asincrónicas como consecuencia de una alteración de los mecanismos presinápticos en la liberación del neurotransmisor glutamato (Bonansco et al., 2009).

Investigaciones realizadas en cerebros post-mortem de pacientes con esclerosis múltiple, muestran que la desmielinización del hipocampo es frecuente y extensa lo que ocasiona un declive de los procesos cognitivos (Geurts et al., 2007).

A diferencia de otros mutantes mielínicos, la tasa de mortalidad de la rata *Taiep* es baja (Holmgren et al., 1989), por lo que ha sido empleada como modelo de estudio para enfermedades humanas relacionadas con desórdenes en el desarrollo y/o mantenimiento de la mielina en una edad adulta. A pesar de no tener

una enfermedad homóloga en humanos, esta rata ha funcionado como modelo en terapias de trasplante celular para el tratamiento de leucodistrofias y desórdenes mielínicos progresivos que pueden conllevar a una muerte temprana (Duncan, 2011).

Formación hipocampal

La formación hipocampal en la rata es una estructura alargada en forma de C, que va desde la línea media del cerebro cercana al núcleo septal (rostro-dorsal), sobre y detrás del tálamo en el lóbulo temporal medial (caudo-ventral) (Figura 2, Amaral y Witter, 1989; Anderson, 2007).

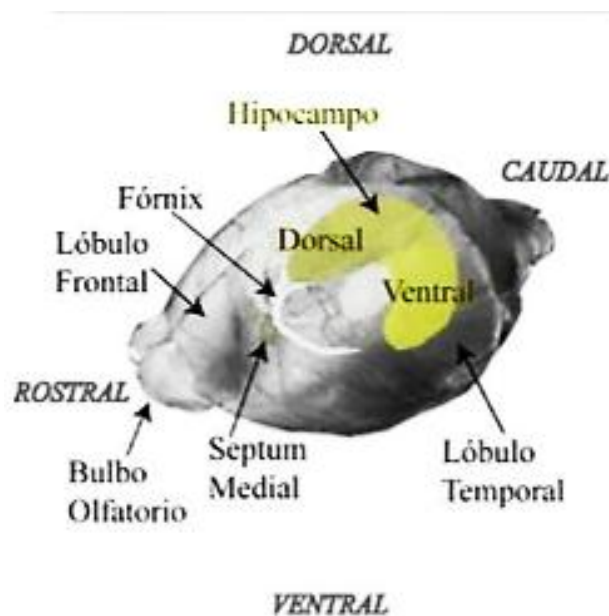


Figura 2. **Esquema de la anatomía del hipocampo.** En amarillo se muestra la posición del hipocampo en el cerebro de la rata (tomado y modificado de Piatti, 2009).

La formación hipocampal comprende cuatro estructuras corticales: el giro dentado (GD), el hipocampo que se divide en las subregiones Cornu Ammonis (CA), el complejo subicular que incluye al subículo (Sub), el presubículo (PrS) y el

parasubículo (PaS) y por último la corteza entorrinal (CE), que en roedores se divide en corteza perirrinal (PER) y corteza postrinal (POR) (Boccaro *et al.*, 2015).

Estas estructuras reciben información de áreas frontales, parietales y temporales, las cuales se comunican por medio de un circuito intrínseco hipocampal a través de proyecciones unidireccionales que inician en CE y se dirigen a GD. El GD se constituye por células granulares que proyectan hacia las neuronas piramidales del área CA3 del hipocampo y estas mandan el impulso a las neuronas piramidales del área CA1. Las neuronas piramidales CA1 se encargan de proyectar finalmente al Sub (Figura 3). Dicho circuito trisináptico tiene por objetivo generar un impulso con mayor excitabilidad desde las capas superficiales de la CE hasta las capas más profundas (Andersen, 2007).

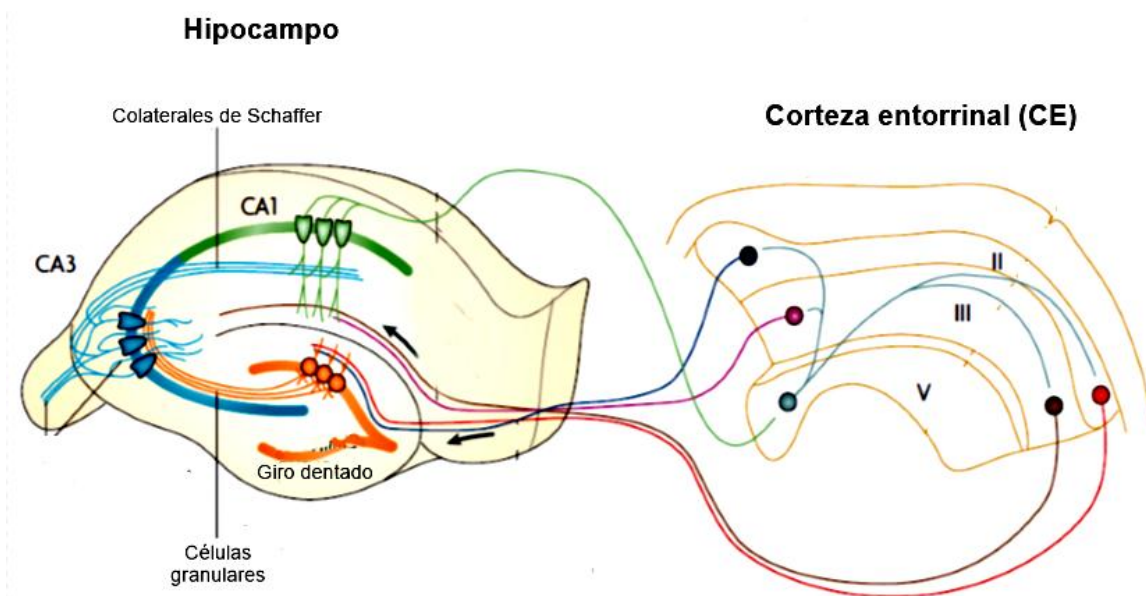


Figura 3. **Circuito hipocampal intrínseco.** Se describe de manera gráfica como se lleva a cabo la comunicación entre las capas más superficiales hasta las más profundas que conforman la formación hipocampal y el hipocampo (tomado y modificado de Song *et al.*, 2012).

Funcionalmente, la formación hipocampal juega un rol muy importante en la codificación, consolidación, recuperación de la memoria y regula la formación de la memoria espacial a largo plazo (Kandel, 2000) siendo el hipocampo una estructura

fundamental para integrar toda la información recibida debido a la organización divergente-convergente de sus conexiones, además de que se distingue por su organización anatómica laminar con límites definidos, lo que lo convierte en un excelente objeto de estudio (Piatti, 2009).

Hipocampo

El hipocampo se diferencia funcionalmente en dos regiones: la región dorsal, la cual se encarga del procesamiento espacial, mientras que la región ventral de los procesos de ansiedad y control inhibitorio del comportamiento (Bast y Feldon, 2003; Bannerman *et al.*, 2004).

Esta estructura se divide en cuatro campos: CA1, CA2, CA3 y CA4, los cuales están constituidos por una capa densa de células piramidales.

Las neuronas piramidales se encuentran en estructuras asociadas a procesos cognitivos como la corteza cerebral, la amígdala y el hipocampo (Spruston, 2008). Morfológicamente, estas neuronas cuentan con un soma en forma de pirámide, su árbol dendrítico cuenta con dos dominios distintos: las dendritas basolaterales y las dendritas apicales que descienden desde la base y el ápice del soma, respectivamente. Cuentan con una dendrita apical principal que se bifurca antes de dar lugar a un penacho de dendritas a una distancia variable del soma, y el axón surge de la base del soma haciendo muchos contactos sinápticos glutamatérgicos excitatorios a lo largo de su longitud (DeFelipe y Fariñas, 1992; Ito y Cacioppo, 1998; Spruston, 2008).

El hipocampo cuenta con una mayor actividad sináptica sincrónica en el SNC a diferencia de estructuras como la corteza visual, la corteza olfatoria y la corteza motora, lo cual se determinó mediante el empleo de multielectrodos implantados en el hipocampo de ratas, en donde se observó a un grupo de

células que se activan cuando el animal ocupa una determinada posición del espacio y explora un ambiente u objeto determinado con las extremidades (Gray, 1994). A este grupo de células, Moser *et al* (2015), las describen como “Células de lugar”, las cuales forman parte de una amplia red de neuronas moduladas espacialmente, como lo son las células de borde, las células de dirección y las células de cuadrante ó *grid cells*. La interacción de esas células permite la adquisición y codificación de la información (región CA3) que se encuentra en el ambiente como olores, estímulos táctiles y el tiempo, posteriormente esta información es consolidada y recordada (región CA1) cuando el animal se localiza en un espacio nuevo o un espacio ya visitado (Leutgeb *et al.*, 2004; Brun *et al.*, 2002; Moser *et al.*, 2015). Toda esta información ha servido como base para atribuir al hipocampo como la estructura principal en los procesos de aprendizaje y memoria espacial (Montgomery *et al.*, 2007; Moser *et al.*, 2015).

Neuronas piramidales CA3

La organización de las células piramidales CA3 y su longitud dendrítica es muy variable (~300 a 270 μm , figura 4). Las células pequeñas poseen un soma de aproximadamente 20 μm de diámetro y están localizadas en el extremo del GD. Las células grandes, con un soma de 30 μm de diámetro se localizan en la parte distal del campo. La distribución de los árboles dendríticos también varía dependiendo de la posición del soma o del cuerpo celular (Ishizuka *et al.*, 1995).

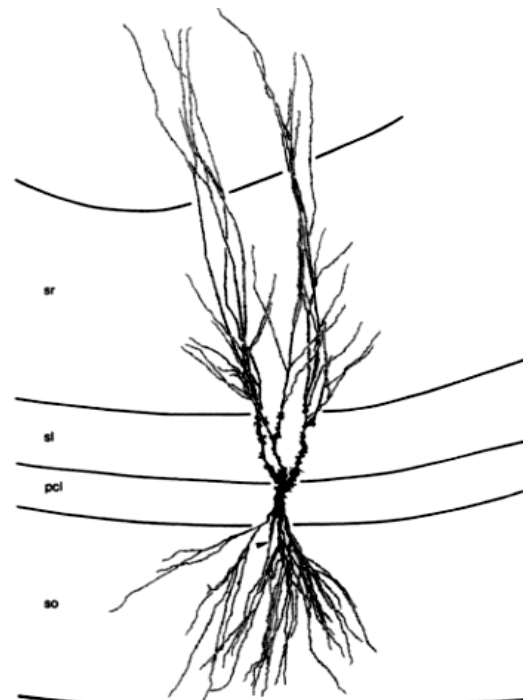
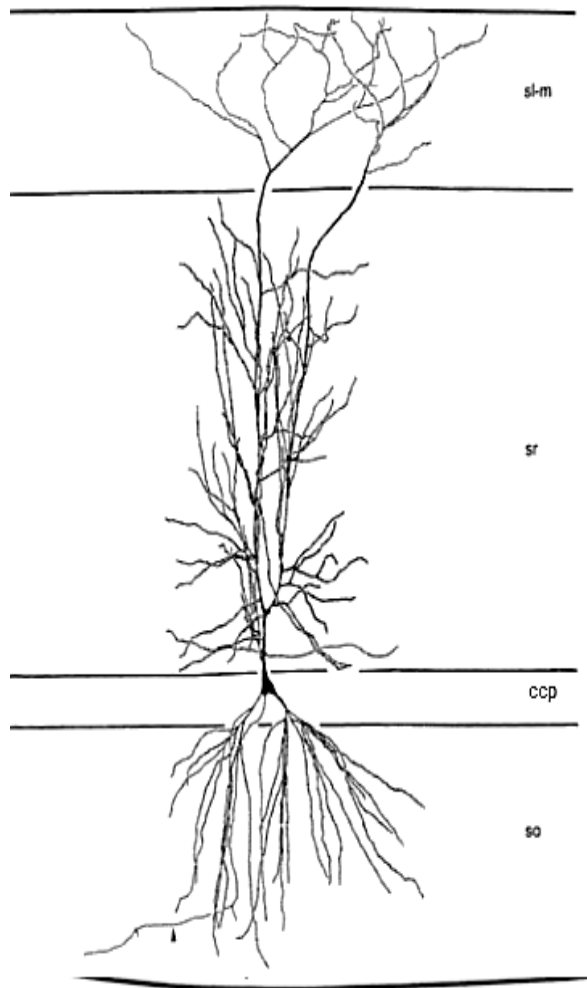


Figura 4. **Neurona piramidal CA3 de hipocampo dorsal.** Se muestran las capas del hipocampo en donde se distribuyen las ramificaciones dendríticas de la neurona piramidal. Sl-m: stratum lacunosum-moleculare; sr: stratum radiatum; ccp: capa de células piramidales; so: stratum oriens (Tomado y modificado de Andersen, 2007).

Estas células han sido ampliamente estudiadas debido a la alta interconectividad y excitabilidad que se genera cuando hay una entrada de información desde las células granulares del giro dentado hacia los axones de las neuronas CA3 (Andersen, 2007).

Neuronas piramidales CA1



Una característica muy particular de esta región es que las neuronas piramidales CA1 muestran una gran homogeneidad en sus árboles dendríticos, sin embargo las células son de menor tamaño (~120 a 135 μm) en comparación con las células CA3 (Figura 5). Las dendritas de estas neuronas forman una banda gruesa (estrato radiado, sr), las cuales reciben sinapsis de las colaterales de Schaffer, que son los axones de las neuronas piramidales CA3 que provocan una potencialización a largo plazo de la sinapsis, la cual es indispensable para el almacenamiento de la información y formación de la memoria (Purves *et al.*, 2007).

Figura 5. **Neurona piramidal CA1 de hipocampo dorsal.** Se muestran las capas del hipocampo en donde se distribuyen las ramificaciones dendríticas de la neurona piramidal. Sl-m: stratum lacunosum-moleculare; sr: stratum radiatum; ccp: capa de células piramidales; so: stratum oriens, (Tomado y modificado de Andersen, 2007).

Espinas dendríticas

Las espinas dendríticas son pequeñas protuberancias que surgen de las dendritas. Son bastante heterogéneas tanto en forma como en tamaño y su estructura consta de una pequeña cabeza conectada por un cuello delgado a la dendrita de la cual descienden (Figura 6). En la mayoría de las áreas del cerebro, las espinas son estructuras elementales que recubren la mayoría de neuronas principales siendo abundantes en las células piramidales de la corteza y células espinosas del estriado (Yuste, 2010). La función de una espina dendrítica es ayudar a que el número de sinapsis que llega a una dendrita aumente, ya que su longitud le permite alcanzar las dendritas o axones de otras neuronas (Sorra y Harris, 2000).

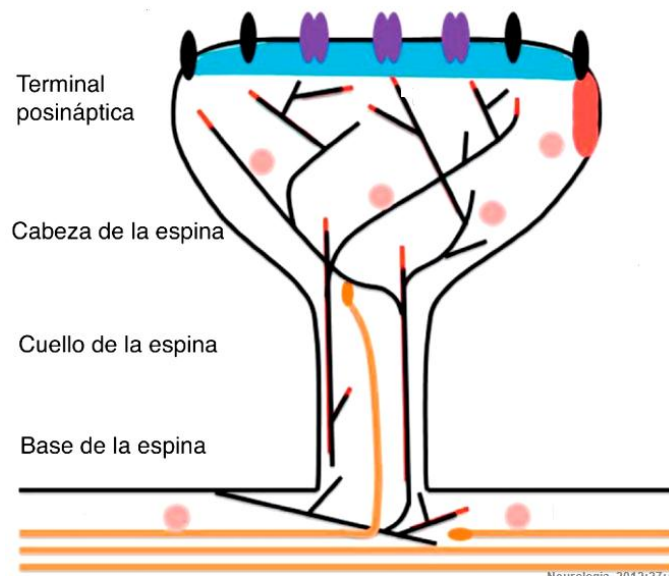


Figura 6. **Espina dendrítica.** Se muestra la morfología general de una espina dendrítica (Tomado y modificado de Soria y Pérez., 2012).

Investigaciones previas muestran una fuerte relación entre el desarrollo del cerebro y cómo se lleva a cabo los procesos de aprendizaje y memoria (Purves *et al.*, 2007), pues repercute en las características morfológicas y funcionales de las dendritas y espinas dendríticas de las neuronas, fenómeno que se ha estudiado mayormente en corteza cerebral (Kolb *et al.*, 1998; Sorra y Harris, 2000; Verpelli *et al.*, 2010)

Desarrollo cerebral

El estudio sobre el desarrollo y maduración del cerebro se divide en dos fases: la primera es modulada por un ambiente materno (denominada fase *in utero*), donde comienza la generación neuronal, proceso conocido como neurogénesis, que a través de señales intracelulares promueven la diferenciación de las células nerviosas y su migración para establecer las primeras conexiones con poblaciones celulares específicas logrando así la maduración cerebral. Sin embargo, no todas las regiones del cerebro maduran de igual manera, por ejemplo, la corteza prefrontal es lenta y en humanos madura alrededor de los 30 años de edad (Pentanjek *et al.*, 2011). Por otro lado, en esta fase la mayoría de la neurogénesis es completada con excepción del hipocampo, ya que se encarga de generar neuronas a lo largo de toda la vida las cuales son necesarias para los procesos de aprendizaje y memoria (Kolb *et al.*, 2011) aunque la producción neuronal declina con la edad (Kolb *et al.*, 2013).

La segunda fase es la *postnatal*, en donde el desarrollo del cerebro es más prolongado, es decir, hay un crecimiento de dendritas y axones que provocan cambios en el tamaño del cerebro, el tamaño neuronal, la ramificación dendrítica, la densidad de espinas dendríticas, el número de sinapsis por neuronas y el grosor cortical (Sirevaag y Greenough, 1987). Estos cambios se deben a que la conectividad del cerebro es muy sensible al ambiente, a las experiencias que el organismo tiene por medio de las actividades motoras y sensoriales, a la relación parental, al estrés y a la dieta, por lo cual resultan factores de importante influencia que provocan cambios conductuales (Kolb *et al.*, 2011; Kolb *et al.*, 2013; Kolb *et al.*, 2014).

Aprendizaje y memoria

Los seres vivos tienen la necesidad de adaptarse al medio que los rodea, provocando modificaciones en sus capacidades físicas y cognitivas, lo cual conlleva a generar una serie de estrategias y habilidades que los hacen resistentes al ambiente y por lo tanto, exitosos en términos adaptativos. Estos

cambios conductuales se deben a las experiencias vividas y a la capacidad de retener información y recuperarla en el momento adecuado (Rosenzweig, 2003; Ruetti *et al.*, 2009).

El aprendizaje se define como el proceso activo, y de cierto modo no explícito, mediante el cual se adquiere nueva información; y la memoria, como la capacidad de codificar, almacenar y recuperar la información aprendida (Squire *et al.*, 1988; Squire *et al.*, 1996), siendo ambos procesos mutuamente dependientes ya que no hay aprendizaje sin memoria, ni memoria sin aprendizaje (Ruetti *et al.*, 2009).

La memoria es un proceso muy complejo el cual ha sido estudiado ampliamente (Squire *et al.*, 1988; Squire *et al.*, 1996; Ballesteros, 1999; Colom, 2001; Ruetti *et al.*, 2009; Squire *et al.*, 2007). Parte de esos estudios se han encargado de proponer múltiples clasificaciones sobre los sistemas de memoria, categorizándola de manera cualitativa en: memoria declarativa, que se define como la capacidad de recordar información de manera consciente, de eventos y hechos; y memoria no declarativa, que es una colección heterogénea de habilidades de aprendizaje que se adquiere de manera implícita o no consciente (Squire *et al.*, 1988; Squire *et al.*, 1996). De manera cuantitativa se clasifica en tres clases: memoria inmediata, memoria a corto plazo y memoria a largo plazo (Purves *et al.*, 2007). En la memoria inmediata el sujeto recibe la información del entorno a través de los órganos de los sentidos y la recuerda durante fracciones de segundos ya que la información se mantiene de manera transitoria hasta que se utiliza, después, es probable que se olvide. Este tipo de memoria se considera frágil e inestable, debido a que puede ser sensible a cualquier tipo de interferencia pero la información que llega a mantenerse pasa a la memoria a corto plazo (MCP) en donde el sujeto ya puede manipularla de manera consciente. La MCP se define como la capacidad de retener información reciente de una manera activa, sencilla, rápida y fácil y en donde se almacena una cantidad limitada de

información que está disponible sólo durante unos segundos hasta un minuto después de transcurrido el aprendizaje, sin embargo, este tipo de memoria también presenta limitaciones temporales, es decir, la información puede llegar a perderse por desvanecimiento o por la llegada de nueva información. La información que logra ser procesada se traslada a la memoria a largo plazo (MLP), la cual permite almacenar una gran cantidad de información durante períodos prolongados de tiempo, que puede ir desde meses hasta años y en algunos casos, toda la vida, por lo que la característica fundamental de este tipo de memoria es que constituye un almacén duradero de la información adquirida y que es menos susceptible de ser alterada por interferencias (Colom, 2001; Ruetti *et al.*, 2009; Mathiasen y DiCamillo, 2010).

Neuroanatomía de la memoria

Para conocer cuáles son las estructuras cerebrales que están involucradas en los procesos de aprendizaje y memoria se han realizado diversas investigaciones en humanos y primates con el objetivo de conocer el rol que juega cada estructura en estos procesos. Una de las estructuras considerada como esencial para la memoria es el hipocampo. Un daño en el área hipocampal en animales, produce un deterioro en la memoria similar al que ocurre en pacientes humanos (Eichenbaum, 1992); particularmente la memoria declarativa se altera cuando hay un daño bilateral limitado a la región CA1 de la formación hipocampal, un daño más allá de la región CA1 (Sub y CE) o una lesión en la formación hipocampal (Squire *et al.*, 1996).

Los procesos de aprendizaje y memoria también se han estudiado a nivel molecular. Se ha propuesto que una alteración en los genes de mielina y una disfunción sináptica entre las regiones del cerebro provocan alteraciones de los procesos cognitivos. La mielina se encarga de controlar la velocidad del impulso nervioso a través de los axones y de que los diferentes impulsos que recibe la neurona viajen de manera sincrónica entre las regiones corticales del cerebro, lo

cual es determinante para un óptimo desempeño de las tareas de aprendizaje y memoria (Fields, 2008).

Las alteraciones o daños a nivel estructural y/o molecular de regiones específicas del cerebro provocan un decline de los procesos cognitivos, es decir, en la edad adulta, la capacidad de aprender y recordar disminuye, lo que se considera como síntoma común de lo que posteriormente será una enfermedad neurodegenerativa (Mathiasen y DiCamillo, 2010), que se caracteriza por la pérdida de la memoria, alteraciones del juicio, el lenguaje, la orientación y la conducta, provocando cambios en el cerebro como la pérdida de neuronas y cambios degenerativos de las neuronas supervivientes. Es importante destacar e identificar la localización de estos cambios ya que es el factor que va a diferenciar una enfermedad de otra (Burns *et al.*, 2005). En la tabla 1 se presentan las principales alteraciones de la rata *Taiep* adulta durante su vida.

Tabla 1. Cambios degenerativos en la rata *Taiep* adulta. En esta tabla se muestran los principales cambios degenerativos que presenta la rata *Taiep* adulta.

Cambios degenerativos	Cambios en la rata <i>Taiep</i>
Acumulación de microtúbulos	La acumulación de MTs en oligodendrocitos afecta el transporte de las proteínas y los lípidos fundamentales para la formación de la mielina.
Vainas de mielina	El grosor de las vainas de mielina es menor desde el nacimiento, por lo que el organismo presenta una hipomielinización, a partir de los 6 meses esta mielina se pierde disminuye drásticamente desarrollando un proceso de desmielinización.
A nivel electrofisiológico	Debido al deterioro de la mielina, se producen anomalías en las ondas cerebrales ya que los potenciales de acción presentan una

	reducción de sus amplitudes y un incremento en sus latencias.
A nivel neuronal	Al presentar una actividad sináptica anormal en estructuras como la medula espinal y el hipocampo, se pierde la estabilidad neuronal a nivel morfológico y funcional, que afecta a procesos como el de aprendizaje y memoria.
Conducta	<ul style="list-style-type: none">• Secreción de hormonas: la rata Taiiep macho presenta un aumento en la cantidad de corticotropina, lo que ocasiona un aumento de las erecciones del pene (\approx 16 veces).• Incremento en la duración total del aseo.• Los patrones de sueño y vigilia se ven modificados• Aumenta hasta un 700% la frecuencia del bostezo.

Prueba de reconocimiento de objetos

En humanos, la memoria se evalúa mediante procesos verbales o escritos, mientras que en animales, las funciones cognitivas se observan a través de diferentes tipos de comportamientos. Se han diseñado diversas pruebas que permiten estudiar los procesos de aprendizaje y memoria para este propósito (Antunes y Biala, 2012).

La prueba de reconocimiento de objetos (RO) o también conocida por sus siglas en inglés NOR (one-trial novel object recognition) fue principalmente diseñada por Ennaceur y Delacour (1998), para medir la memoria declarativa y la

memoria a corto plazo en ratas. La flexibilidad de la prueba, actualmente, también se utiliza para evaluar la atención, la memoria espacial, la ansiedad, los efectos de tratamientos farmacológicos y los daños cerebrales que afectan los procesos de aprendizaje y memoria (Ennaceur, 2010; Mathiasen y DiCamillo, 2010). Modificaciones en el material que se emplea como los tipos de objetos, el tiempo destinado para cada fase, los tiempos de descanso entre las fases, las condiciones externas a la prueba y el cuidado hacia los animales producen cambios en el comportamiento de los organismos, los cuales dependen de lo que deseamos evaluar en esta prueba (Mathiasen *et al.*, 2010; Ennaceur 2010; Antunes *et al.*, 2012).

Esta prueba se basa en la conducta de exploración natural y espontánea que desarrolla la rata hacia los objetos que se le presentan (Ennaceur y Delacour, 1988). Se mide el tiempo que pasa explorando un objeto familiar y un objeto novedoso en la fase de elección. El tiempo de exploración será mayor para el objeto novedoso cuando existe memoria hacia lo familiar (Ennaceur y Delacour, 1988; Ennaceur, 2009). Un tiempo indistinto explorando el objeto familiar y novedoso, indica una deficiencia del aprendizaje y memoria así como una alteración en la región del hipocampo (Mumby *et al.*, 2007).

Fases de la prueba de reconocimiento de objetos

La prueba consiste en tres fases:

- *Fase de habituación:* la rata explora libremente la caja sin los objetos. El tiempo para esta fase puede ir desde los 10 hasta los 30 minutos.
- *Fase de muestra:* el animal a evaluar es colocado en el centro de la caja, la cual cuenta con los objetos (objetos familiares) en cada esquina y se le permite explorarla durante un tiempo determinado. La cantidad de objetos y el tiempo empleado para esta prueba también varía. La cantidad de objetos puede ir de 2 a 4 objetos y el tiempo de exploración puede ser de 3 a 5 minutos.

- *Fase de elección:* esta fase es muy similar a la fase de muestra con la diferencia de que un objeto familiar es sustituido por un objeto novedoso. El tiempo de exploración debe ser el mismo que se estableció para la fase de muestra. Si se evalúa la memoria espacial, entonces los objetos se cambian de posición (derecha-izquierda, arriba-abajo o en contraesquina).

El tiempo de descanso entre la fase de muestra y la fase de elección también se ajusta de acuerdo a los objetivos de la investigación (Ennaceur y Delacour, 1988; Antunes *et al.*, 2012).

Ventajas y desventajas

La prueba de RO ha sido muy útil y atractiva en la investigación debido a que se concluye en poco tiempo, no provoca un alto nivel de estrés a los organismos, no requiere de un entrenamiento previo de los animales, no implica una recompensa o castigo y no se emplean estímulos externos como comida o choques eléctricos. Dependiendo del objetivo de la investigación, los resultados se pueden interpretar por medio de diferentes análisis estadísticos como una T-student, una Anova de 1 o 2 vías o el empleo de índices tales como el índice de discriminación, índice de habituación total, índice de preferencia y el índice de reconocimiento (Ennaceur *et al.*, 1988; Mathiasen *et al.*, 2010; Antunes *et al.*, 2012). Se debe tener cuidado de cómo se colocan los objetos en la fase de muestra para cambiarlos de lugar correctamente en la fase de elección y prevenir que la rata tenga preferencia por un objeto o esquina de la caja, considerar la luz a emplear para evitar sombras en la caja ya que son lugares que las ratas prefieren y los resultados se podrían ver afectados, la selección de los objetos debe ser balanceada en tamaño, forma y peso lo cual permite evitar una preferencia o evitación de la rata hacia los objetos (Mathiasen *et al.*, 2010).

Justificación

La rata *Taiep* es un mutante mielínico que tiene un periodo de vida largo en comparación con otros mutantes (Bloom *et al.*, 2013). Presenta síntomas similares a otros mutantes mielínicos ya descritos, sin embargo, lo que la hizo atractiva para emplearla como nuevo modelo neurológico de estudio fue la aparición secuencial de la sintomatología y los episodios dramáticos de inmovilidad tónica que se presentan en el 5° mes de edad (Holmgren *et al.*, 1989). Estas características han permitido realizar diferentes tipos de investigaciones, la mayoría de éstas han sido a nivel ultraestructural, inmunológico, sensorial y fisiológico, con el objetivo de comprender el funcionamiento de la mielina y sus componentes en el sistema nervioso central, no obstante, existen pocos trabajos dedicados a explicar si estas alteraciones celulares y moleculares pueden provocar anomalías en la morfología neuronal del cerebro de la rata *Taiep* adulta o en su comportamiento.

El hipocampo ha sido una región poco explorada en estos organismos. Es importante analizar si se presentan modificaciones en la morfología neuronal del hipocampo dorsal de la rata *Taiep* adulta y si se presentan alteraciones en el desempeño de tareas de aprendizaje y memoria espacial.

Hipótesis

Las alteraciones mielinicas en la rata *Taip* macho adulta producen una disminución de la longitud dendrítica y de la densidad de espinas dendríticas en las neuronas piramidales CA1 y CA3 del hipocampo dorsal, lo cual pudiera provocar un déficit en el desempeño de tareas de aprendizaje y memoria espacial, como la prueba de reconocimiento de objetos.

Objetivo general

Estudiar la morfología de neuronas piramidales CA1 y CA3 de hipocampo dorsal de ratas *Taiep* macho adultas y explorar su capacidad de aprendizaje y memoria espacial.

Objetivos particulares

- 1.- Analizar la arborización dendrítica apical y basal de las neuronas CA1 y CA3 de hipocampo dorsal del mutante mielínico *Taiep* adulto.
- 2.- Calcular la densidad de espinas dendríticas de los arboles dendríticos apicales y basales de neuronas CA1 y CA3 de hipocampo dorsal de ratas *Taiep* adultas.
- 3.- Explorar el aprendizaje y la memoria espacial a corto y largo plazo de la rata *Taiep* adulta por medio de la prueba de reconocimiento de objetos.

Material y métodos

Material biológico

Se trabajó con un total de 48 ratas macho de la cepa Sprague Dawley (SD) obtenidas del bioterio Claude Bernard de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, con un peso de 400 gr. \pm 20 gr, de entre 15 y 16 semanas de edad, las cuales se dividieron en dos lotes experimentales: 1) para realizar el análisis morfológico y 2) para realizar la prueba de reconocimiento de objetos. Cada lote constó de 3 grupos: 1) *Taiep*, 2) *Taiep* portadoras (estos organismos presentan un alelo alterado y un alelo normal, por lo que no presenta los síntomas de la enfermedad pero puede transmitirlo a sus descendientes) y 3) SD, cada uno con una n=8. Los animales se mantuvieron bajo condiciones estándares de bioterio, alimentados con dieta estándar y agua *ad libitum*, a temperatura ambiente constante de 18°C-22°C, con humedad relativa del 50% y ciclos de luz/oscuridad con intervalos de 12 horas (7:00 am-7:00pm).

Debido a las alteraciones motoras que presentan a esta edad, a las ratas *Taiep*, se les colocó los pellets de alimento sobre el suelo de la caja y se extremaron el cuidado y el aseo.

Obtención del tejido

Las ratas destinadas para realizar el análisis morfológico fueron anestesiadas vía intraperitoneal con una dosis subletal (70 mg/kg peso; Juárez *et al*, 2008) de pentobarbital sódico (SEDALPHARMA®), posteriormente se realizó una perfusión de lavado a través del ventrículo izquierdo del corazón con solución salina al 0.9%. Inmediatamente se realizó una craneotomía para extraer el cerebro, el cual se colocó en 20 ml de solución Golgi-Cox para ser almacenados en completa oscuridad por 14 días. A los primeros siete días se cambió la solución con solución fresca de Golgi-Cox y se dejó concluir el tiempo ya indicado. Posteriormente, los cerebros se cambiaron a solución de sacarosa al 30% por un

periodo de 5 días para proceder al corte de los mismos (Gibb *et al.*, 1998; Levine *et al.*, 2013).

Se obtuvieron cortes coronales de hipocampo dorsal de 200 μm de grosor con un vibrotomo (vibrotomo manual NVSL®, 2007); se colocaron en portaobjetos gelatinizados al 2% en una cámara húmeda por 24 horas. Posteriormente se realizó el revelado de los cortes histológicos: se colocan las laminillas en agua destilada por 1 minuto para enjuagarlas, después en hidróxido de amonio por 30 minutos. Se enjuaga nuevamente en agua destilada por 1 minuto y se colocan en fijador rápido de Kodak® por 30 minutos. Se vuelven a enjuagar en agua destilada por 1 minuto. Posteriormente se procede a la deshidratación del tejido: se incuban las laminillas en diferentes concentraciones de alcohol (50%, 70%, 95%) por 1 minuto para cada concentración y dos pasos de alcohol al 100% por 5 minutos respectivamente. Como último paso se dejaron las laminillas durante 15 minutos en xileno, transcurrido este tiempo, se fijaron en resina sintética (Entellan®) y se dejaron secar aproximadamente por 3 días para la observación al microscopio.

Observación y análisis de neuronas CA1 y CA3 de hipocampo dorsal

Las neuronas se observaron mediante un microscopio óptico que tiene acoplada una cámara lúcida (Leica®, Figura 7). Se dibujaron 20 neuronas por cada cerebro a una amplificación de 400X, 10 neuronas piramidales CA1 y 10 neuronas piramidales CA3: 5 neuronas del hemisferio derecho y 5 del hemisferio izquierdo. Sólo se dibujaron aquellas neuronas que se encontraban en la región CA1 y CA3 del hipocampo dorsal con buena impregnación de la tinción, completas y con soma piramidal, preferentemente aisladas, es decir, que no formaran parte de un cúmulo de neuronas.

Se dibujaron espinas dendríticas del tercer orden de ramificación a una amplificación de 1000X de segmentos dendríticos de al menos 10 μm de longitud.



Figura 7. **Método para dibujar las neuronas piramidales.** Se ilustra el microscopio óptico acoplado a una cámara lucida, por la cual se observan las neuronas y se dibujan para su posterior análisis, (Tomado y modificado de Kolb *et al.*, 1998).

Una vez obtenidos los dibujos de las neuronas, se calculó con ayuda del análisis de Sholl el número de intersecciones dendríticas y a partir de ese parámetro se calculó la longitud del árbol dendrítico, el número de ramificaciones y el número máximo de orden dendrítico por cada neurona (Figura 8).

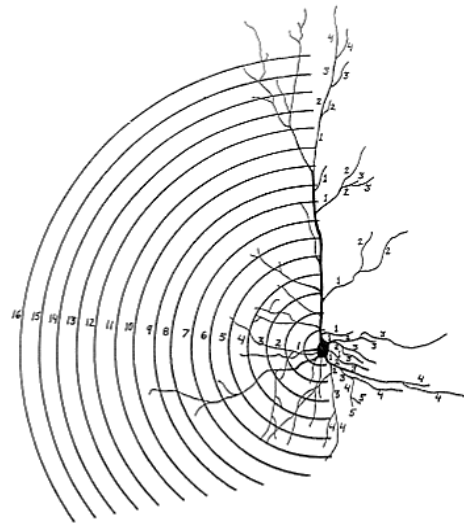


Figura 8. **Análisis de Sholl.** Consiste en colocar una plantilla de círculos concéntricos sobre la neurona en donde el primer círculo se coloca en el soma y se cuentan las intersecciones dendríticas en cada círculo concéntrico, (Tomado y modificado de Kolb *et al.*, 1998).

Prueba de reconocimiento de objetos

Se realizó un estudio exploratorio para el segundo lote de ratas destinadas a medir la capacidad de aprendizaje y memoria; este lote fue trasladado al cuarto de conducta 30 minutos antes de iniciar la prueba. En cada prueba las ratas se colocaron en el centro de la caja, orientadas hacia la misma pared trasera, en completo silencio y con un foco de 40 Wattz de luz roja constante.

Habitación

Se colocó a la rata en una caja de madera con dimensiones de 81x61x30.4 cm, cubierta con una cama de aserrín y se le permitió explorarla durante 15 minutos, concluido el tiempo, se colocó nuevamente a la rata en su caja hogar. Entre cada rata se lavó perfectamente la caja con agua, jabón líquido y alcohol al 10% y se cambió el aserrín con el objetivo de eliminar rastros de olor que influyeran en la conducta expresada por el siguiente animal puesto a prueba (Antunes *et al.*, 2012; Ennaceur, 2010). Después de 24 horas de esta fase, se realizó la fase de muestra.

Fase de muestra

Esta fase consistió en preparar la caja de madera como se describió previamente pero ahora contenía 4 objetos que denominamos familiares (F) de tamaño similar pero de diferentes texturas, colores y formas; entre el objeto y el vértice de la caja se dejó una separación de 12 cm para que el animal pudiera explorar el objeto completamente. Se emplearon 4 objetos para evitar que la rata tuviera preferencia por alguna esquina.

El tiempo que se le dio a la rata para esta fase fue de 5 minutos. Concluido este tiempo, se le dio al animal un descanso de 30 minutos, el cual se aprovechó para lavar los objetos meticulosamente con agua, jabón y alcohol al 10%, de igual manera se lavó la caja de madera y se cambió el aserrín, para eliminar todo rastro de olor. Este procedimiento se repitió entre cada cambio de rata.

Fase de elección (memoria a corto plazo)

Una vez transcurridos los 30 minutos de descanso se sometió a la rata a la fase de elección.

La caja de madera se preparó como se describió previamente, para esta fase, se dejaron 3 objetos empleados en la fase de muestra (F) y se agregó 1 objeto novedoso (N) cambiando de lugar todos los objetos (de esquina superior a inferior de manera cruzada). Se colocó de nuevo a cada rata dentro de la caja durante 5 minutos, y terminado este tiempo se retiró al animal para lavar los objetos y la caja (Figura 9).

Concluida la prueba, se regresó a la rata a su caja hogar y se le dejó descansar durante 15 días.

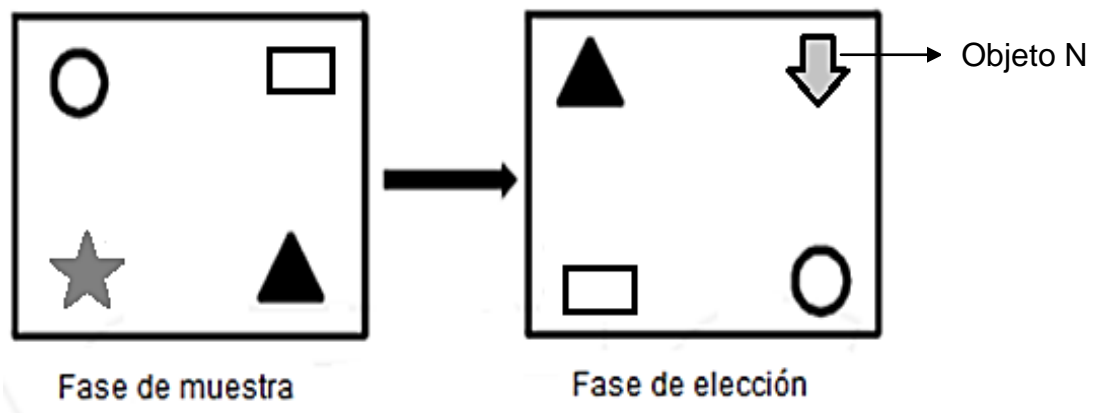


Figura 9. Prueba de reconocimiento de objetos. Se muestra el diagrama de la prueba de RO.

Fase de elección a los 15 días (memoria a largo plazo)

En esta fase se realizó de la misma manera, los objetos F se siguieron manteniendo, se quitó el objeto N y se sustituyó por otro. Los cuidados hacia los objetos y la caja fueron los mismos así como el tiempo de exploración (5 minutos). Todas las fases fueron video grabadas para posteriormente ser analizadas.

De ambas fases de elección se midió el tiempo total que la rata paso explorando tanto los objetos familiares como el objeto novedoso, tomando en cuenta lo siguiente:

Se consideró como exploración del objeto cuando la rata dirigía la nariz a una distancia $\leq 2\text{cm}$ hacia el objeto, lo olfateaba y/o lo tocaba con las patas delanteras. No se contó como exploración si la rata se acostaba, sentaba o pasaba sobre el objeto.

Los tiempos de exploración fueron obtenidos con ayuda de un cronómetro.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos del análisis de Sholl y los datos de longitud dendrítica por orden de ramificación fueron analizados con una ANOVA de 2 vías, posteriormente se realizó una post-ANOVA de comparaciones múltiples de Bonferroni, siendo las variables independientes el tipo de rata, el orden de ramificación y el círculo concéntrico.

Los datos de longitud dendrítica total, densidad de espinas dendríticas y aprendizaje y memoria espacial (Anexo 1) se analizaron con una ANOVA de una vía, teniendo como variable dependiente la longitud, el número de espinas dendríticas y el tiempo de exploración.

Para todos los resultados se consideró una diferencia significativa cuando $P \leq 0.05$. Todas las pruebas estadísticas se realizaron en el programa GraphPad Prism 5.0.

Resultados

Las neuronas que se emplearon para este estudio tenían las características primordiales de una neurona piramidal. Se analizaron aquellas neuronas que se tiñeron completamente con la tinción de Golgi-Cox, con soma piramidal y los arboles dendríticos completos (Figura 10 y 11).

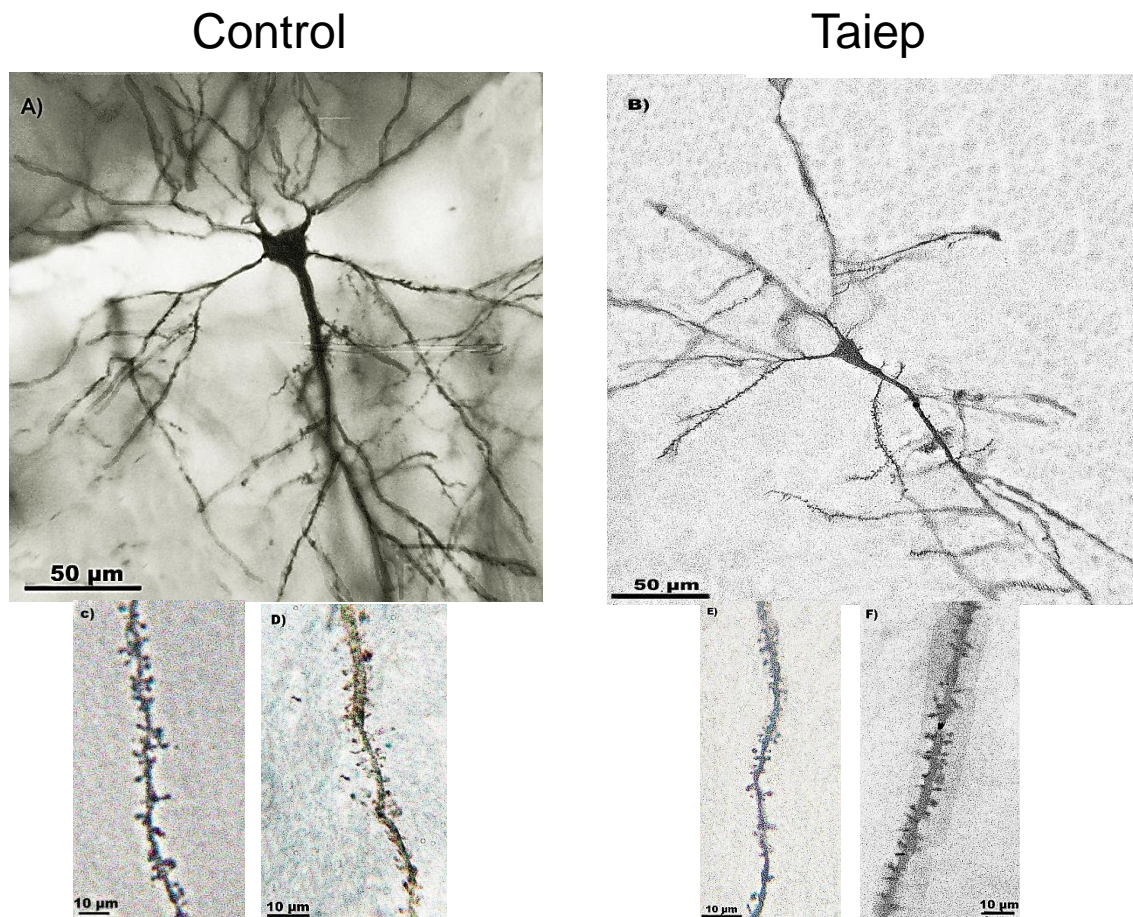


Figura 10. **Neuronas piramidales CA1 de hipocampo dorsal.** Se muestra en A) la neurona CA1 de la rata SD control, en C) las espinas dendríticas basolaterales y en D) las espinas dendríticas apicales. En B) se muestra una neurona CA1 de la rata *Taiep*, en E) las espinas dendríticas basolaterales y en F) las espinas dendríticas apicales. Nótese que la neurona CA1 de la rata *Taiep* presenta poca ramificación dendrítica basal y apical cuando se compara con el grupo control, sin embargo, no se observa una diferencia significativa en la cantidad de espinas dendríticas para ambos grupos.

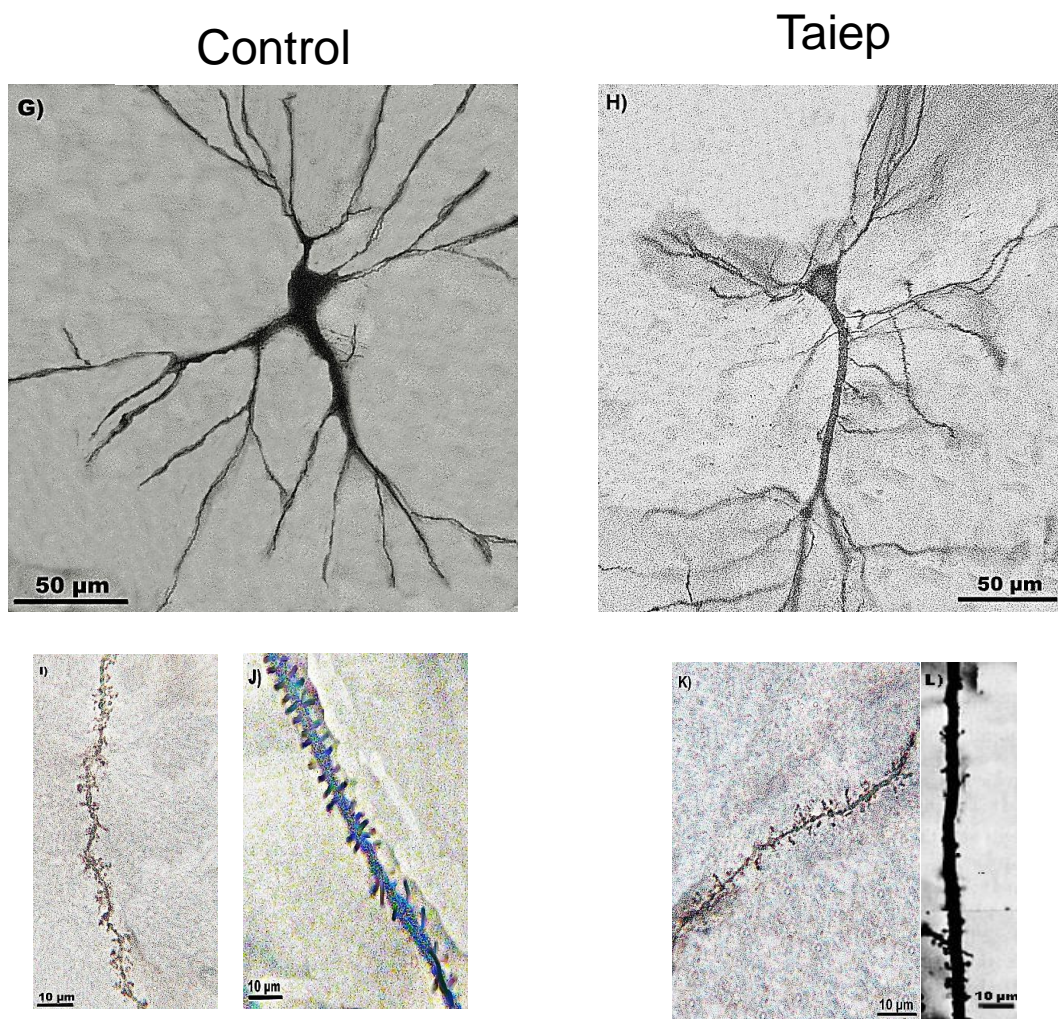


Figura 11. **Neuronas piramidales CA3 de hipocampo dorsal.** Se muestra en G) una neurona piramidal CA3 de la rata SD control, en I) sus espinas dendríticas basolaterales y en J) sus espinas dendríticas apicales. En H) se muestra una neurona CA3 de la rata *Taiep*, en K) sus espinas dendríticas basales y en L) sus espinas dendríticas apicales. Se observa que en el grupo de la rata *Taiep*, la ramificación dendrítica apical es menor en comparación con el grupo control, sin embargo, la cantidad de espinas dendríticas y su distribución a lo largo de la dendrita no presenta diferencias significativas para ambos grupos.

Resultados morfológicos

Neuronas piramidales CA1 del hipocampo dorsal

De acuerdo a los datos obtenidos con el análisis de Sholl se observa una disminución en el número de intersecciones dendríticas del árbol dendrítico basolateral de las neuronas piramidales CA1 de las ratas *Taiep* y portadoras respecto del grupo control (Figura 12, valores negativos). En las ratas *Taiep*, la disminución se presenta en los círculos concéntricos 5 al 8 y en las ratas portadoras la disminución se encuentra en los círculos concéntricos 6 al 11 (ANOVA de dos vías: fenotipo [$F_{2,437} = 43.58, P < 0.0001$]; círculo concéntrico [$F_{22,437} = 437.1, P < 0.0001$]; interacción [$F_{44,437} = 1.920, P < 0.0006$]).

El árbol dendrítico apical de las ratas portadoras presentan una disminución significativa en el círculo concéntrico número 11 respecto al grupo control (Figura 12, valores positivos, ANOVA de dos vías: fenotipo [$F_{2,513} = 36.45, P < 0.0001$]; círculo concéntrico [$F_{26,513} = 58.16, P < 0.0001$]; interacción [$F_{52,513} = 0.6265, P < 0.9809$])

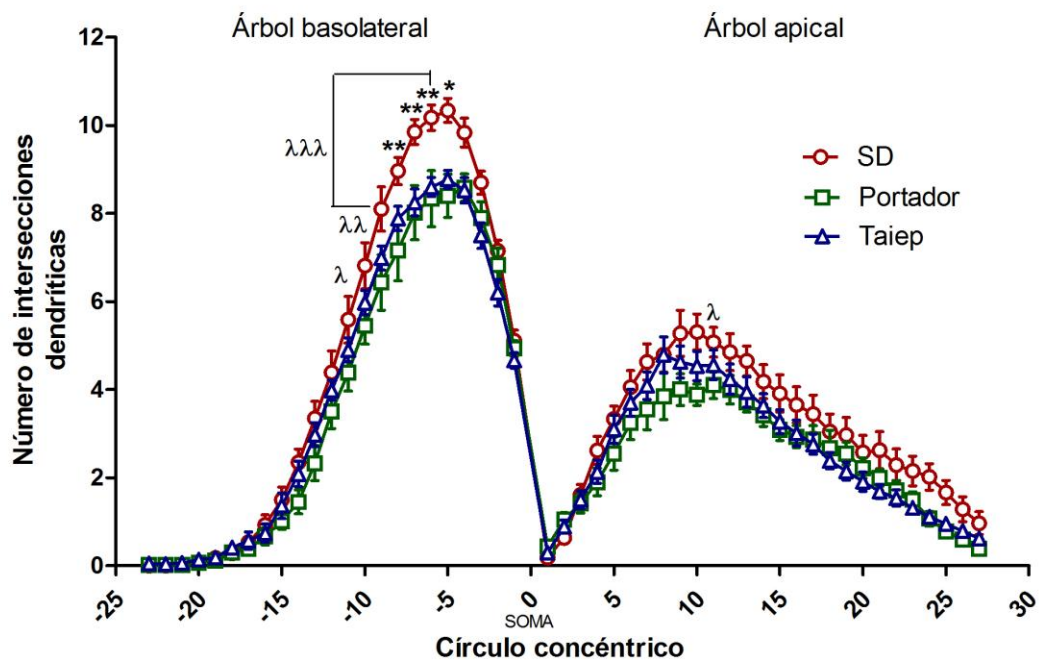


Figura 12. **Arborización dendrítica de neuronas CA1 de hipocampo dorsal.** Intersecciones por círculo concéntrico. λ Control vs Portador, * Control vs *Taiep*; λ, * p<0.05; λλ, ** p<0.01; λλλ p<0.001 .

Los resultados obtenidos de la longitud por orden de ramificación muestran una disminución al nivel del 4to orden de ramificación dendrítica del árbol basolateral de neuronas CA1 de ratas *Taiep* y portadoras respecto del grupo control (Figura 13, valores negativos, ANOVA de dos vías: fenotipo [$F_{2,152} = 7.590$, $P < 0.0005$]; orden de ramificación [$F_{7,152} = 280.8$, $P < 0.0001$]; interacción [$F_{14,152} = 2.761$, $P < 0.0011$]).

Del árbol apical, el grupo de las ratas portadoras presenta una disminución de la longitud dendrítica en el 1er orden de ramificación al compararlas con el grupo control (Figura 13, valores positivos, ANOVA de dos vías: fenotipo [$F_{2,114} = 4.129$, $P < 0.0186$]; orden de ramificación [$F_{5,114} = 183.9$, $P < 0.0001$]).

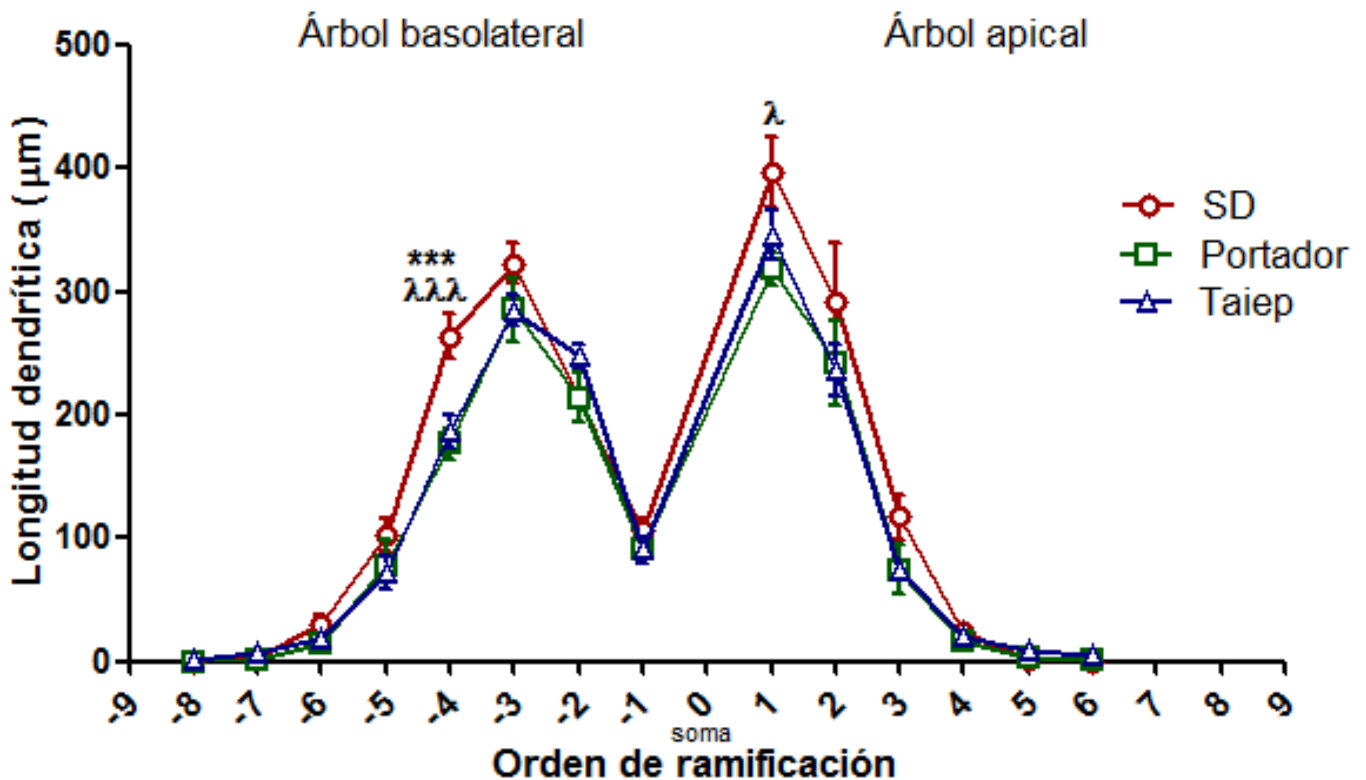


Figura 13. Longitud dendrítica por orden de ramificación de neuronas CA1 de hipocampo dorsal. λ Control vs Portador, * Control vs *Taiep*; λ $p < 0.05$; $\lambda\lambda\lambda$; *** $p < 0.001$.

Los resultados obtenidos de longitud dendrítica total del árbol basolateral de neuronas CA1 (Figura 14A), indican que existe una disminución significativa entre el grupo de las portadoras [$F_{2,21} = 7.586, P < 0.0038$] y las *Taiiep* respecto del grupo control, mientras que los árboles apicales de estas neuronas no muestran diferencias significativas entre los grupos (Figura 14B).

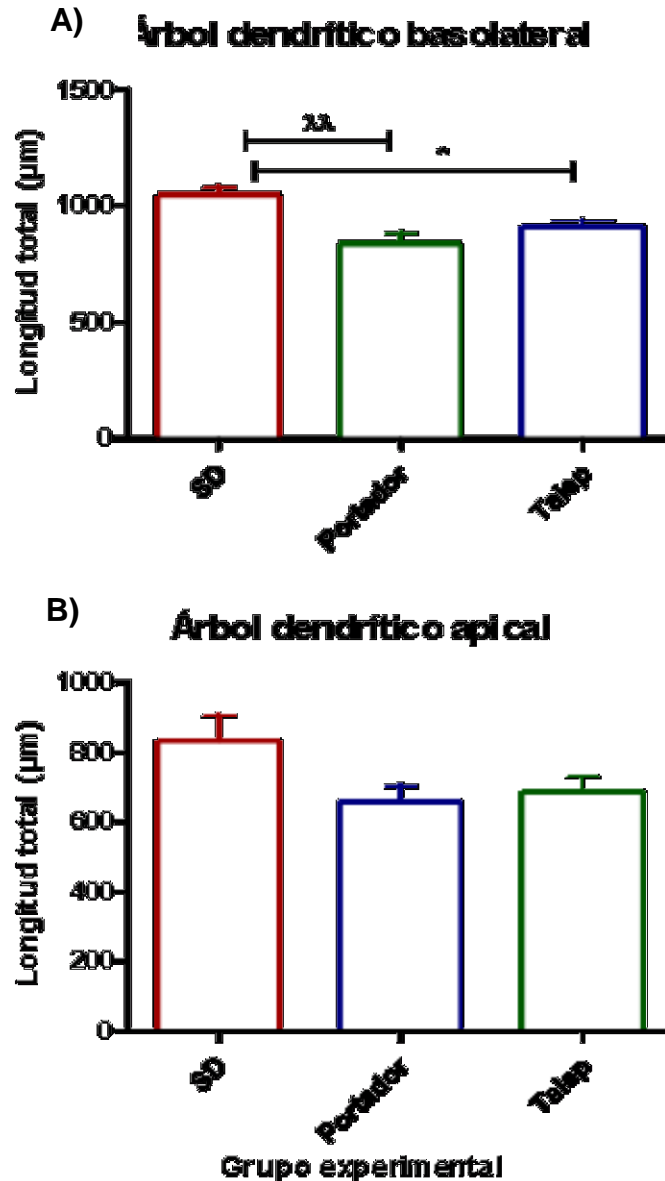


Figura 14. Longitud dendrítica total de neuronas piramidales CA1 de hipocampo dorsal. A) árbol dendrítico basolateral y B) árbol dendrítico apical. λ Control vs Portador, * Control vs *Taiiep*; * $p < 0.05$; $\lambda\lambda$ $p < 0.01$.

Neuronas piramidales CA3 del hipocampo dorsal

Los datos obtenidos con el análisis de Sholl muestran que el árbol basolateral de las neuronas piramidales CA3 de las ratas *Taiep* y de las ratas portadoras muestra una disminución significativa en el número de intersecciones dendríticas por círculo concéntrico respecto del grupo control. El grupo de las ratas *Taiep* muestra esta disminución en los círculos concéntricos 7 al 13 y el grupo de las ratas portadoras muestra una disminución en los círculos concéntricos 8 al 14 (Figura 15, valores negativos, fenotipo, [$F_{2,513} = 66.65$, $P < 0.0001$]; círculo concéntrico [$F_{26,513} = 309.8$, $P < 0.0001$]; interacción [$F_{52,513} = 2.350$, $P < 0.0001$]).

El árbol apical de las ratas portadoras de esas neuronas muestran una disminución en los círculos concéntricos 13 al 22 respecto a las ratas SD control, (Figura 15, valores positivos, fenotipo [$F_{2,513} = 49.97$, $P < 0.0001$]; círculo concéntrico [$F_{26,513} = 66.63$, $P < 0.0001$]; interacción [$F_{52,513} = 3.055$, $P < 0.0001$]).

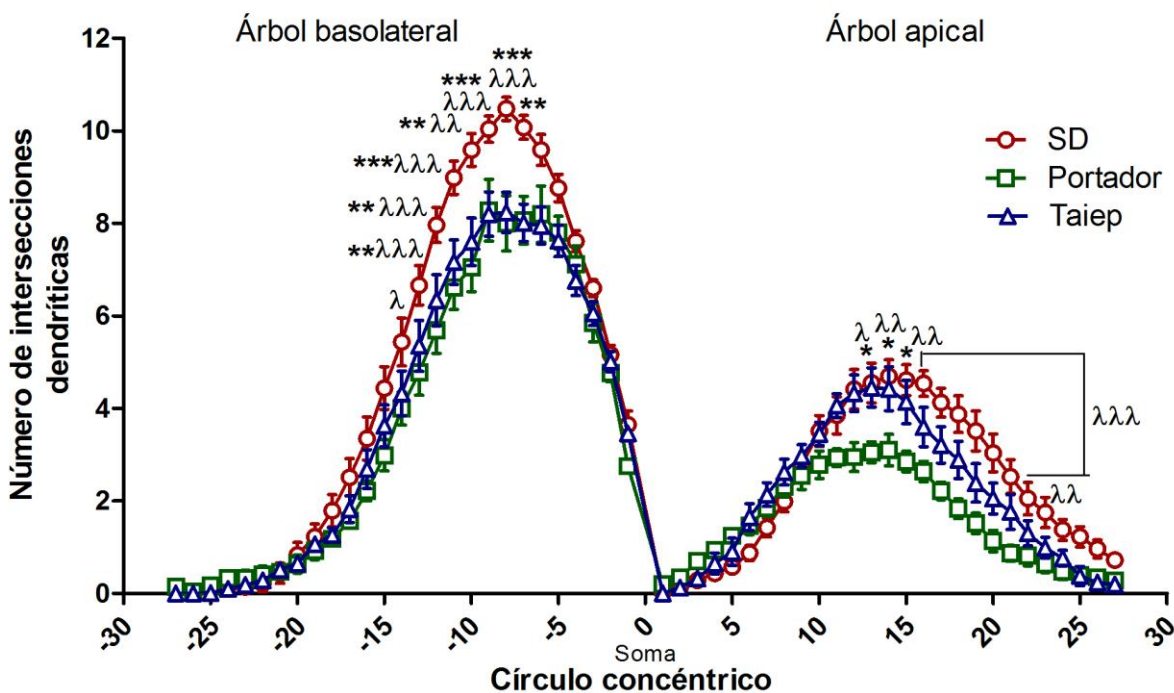


Figura 15. **Arborización dendrítica de neuronas CA3 del hipocampo dorsal.** Intersecciones por círculo concéntrico. λ Control vs Portador, * Control vs *Taiep*; λ $p < 0.05$, $\lambda\lambda$, ** $p < 0.01$, $\lambda\lambda\lambda$, *** $p < 0.001$.

En la longitud dendrítica por orden de ramificación encontramos que las ratas *Taiep* exhiben una disminución significativa al nivel del 3er y 4to orden de ramificación del árbol basolateral, mientras que las ratas portadoras solamente disminuyen su longitud dendrítica en el 3er orden de ramificación respecto del grupo control (Figura 16, valores negativos, fenotipo [$F_{2,152} = 9.666, P < 0.0001$]; orden de ramificación [$F_{7,152} = 171.2, P < 0.0001$]).

En cuanto al árbol dendrítico apical, observamos que las ratas *Taiep* presentan una disminución en la longitud en el 1er orden de ramificación y las ratas portadoras muestran una disminución de la longitud dendrítica en los círculos concéntricos 2 y 3 respecto del grupo control y las ratas *Taiep* (Figura 16, valores positivos, fenotipo [$F_{2,114} = 4.494, P < 0.0002$]; orden de ramificación [$F_{5,114} = 139.0, P < 0.0001$]; interacción [$F_{10,114} = 1.943, P < 0.0463$]).

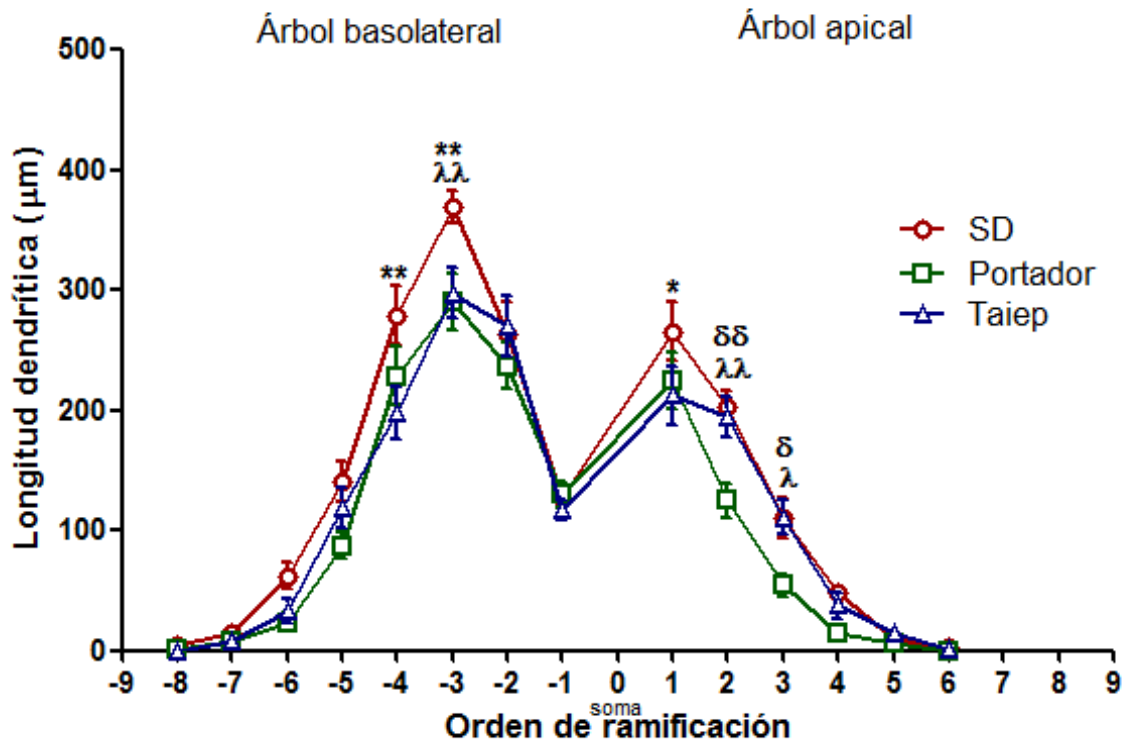


Figura 16. Longitud dendrítica por orden de ramificación de neuronas CA3 de hipocampo dorsal. λ Control vs Portador, * Control vs *Taiep*, Portador vs *Taiep*; * , λ p<0.05; λλ, **, δδ p<0.01

Respecto a la longitud dendrítica total de las neuronas CA3 de hipocampo dorsal, encontramos que las ratas *Taiep* y las ratas portadoras muestran una disminución significativa del árbol basolateral al compararlas con el grupo control (Figura 17A, [$F_{2,21} = 7.368, P < 0.0043$]), mientras que para el árbol apical se observa que el grupo de las ratas portadoras presentan una disminución de la longitud dendrítica solo respecto al grupo control (Figura 17B, [$F_{2,21} = 6.603, P < 0.0066$]).

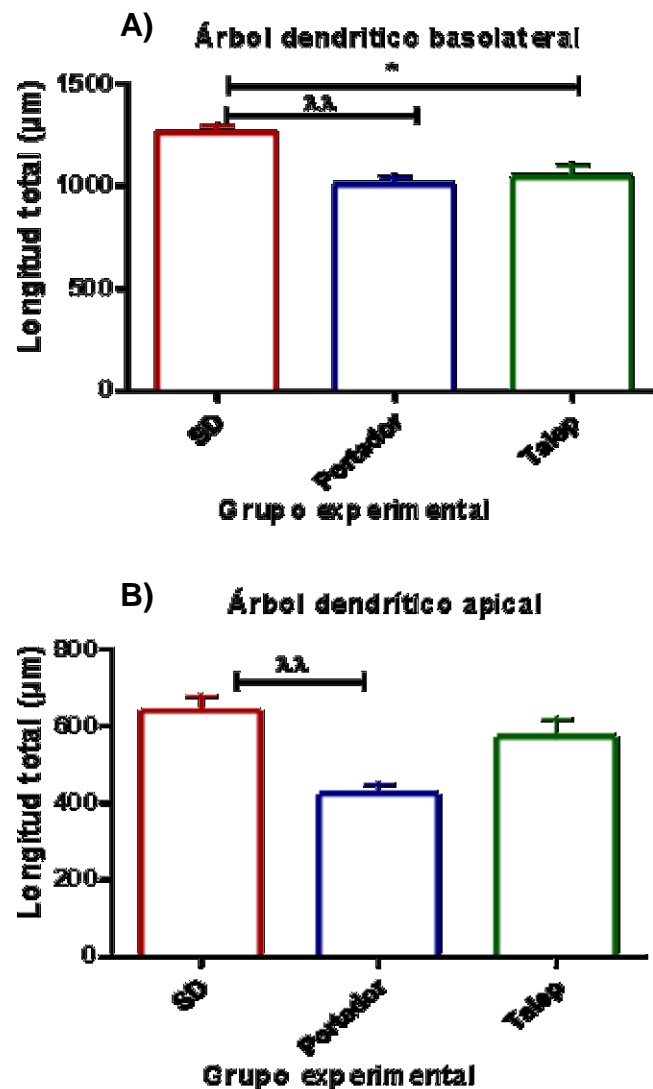


Figura 17. Longitud dendrítica total de neuronas piramidales CA3 de hipocampo dorsal. A) árbol dendrítico basolateral y B) árbol dendrítico apical. $\lambda\lambda$ Control vs Portador, * Control vs *Taiep*. * $p < 0.05$, $\lambda\lambda$ $p < 0.01$.

Densidad de espinas dendríticas de neuronas CA1 y CA3

Los arboles dendríticos basolaterales y apicales de neuronas piramidales CA1 y CA3 de hipocampo dorsal no muestran cambios significativos en la densidad de espinas dendríticas entre los grupos (Figura 18).

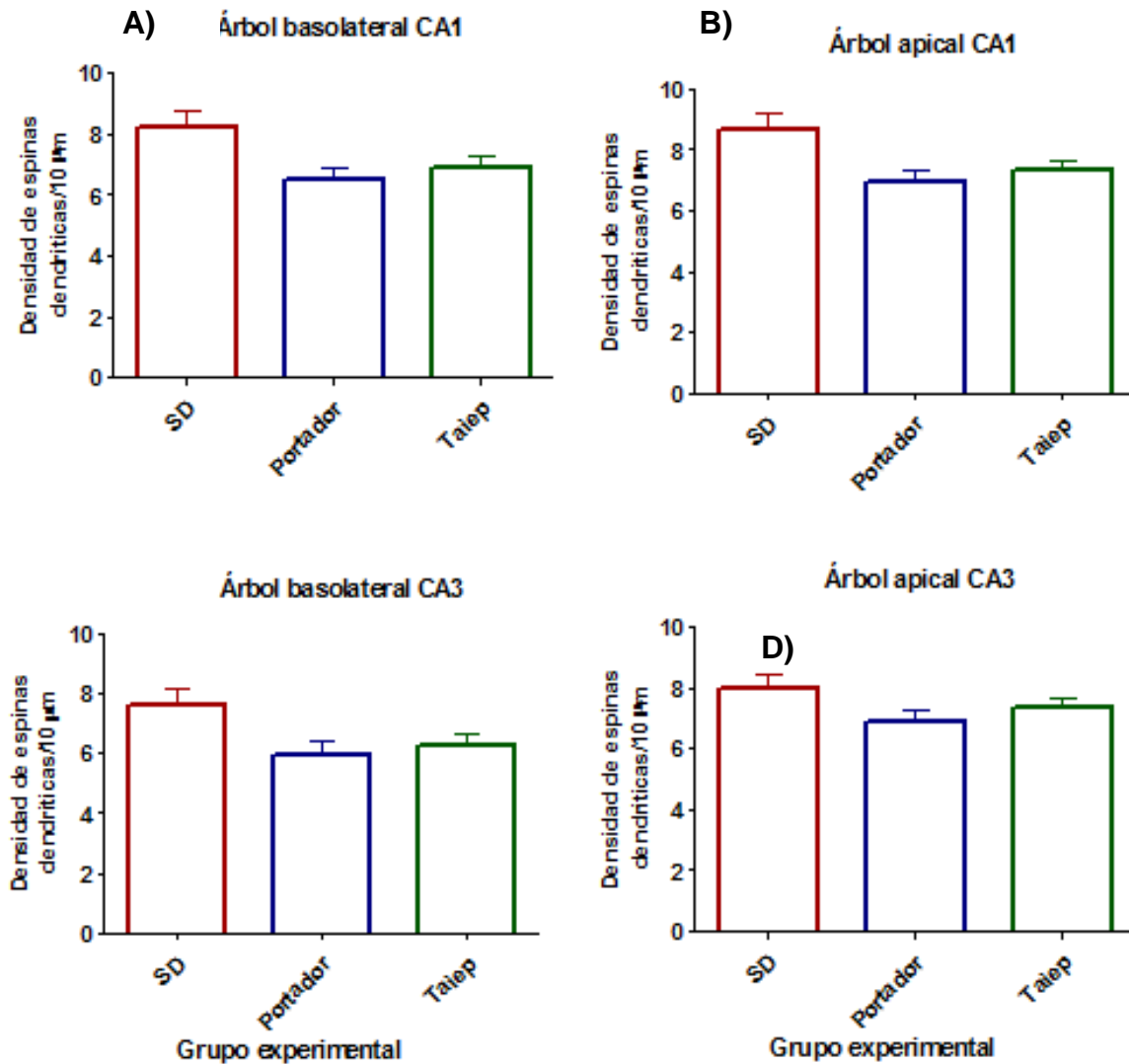


Figura 18. Densidad de espinas dendríticas de neuronas CA1 y CA3 del hipocampo dorsal. A) árbol basolateral ($p=0.053$) y B) árbol apical ($p=0.045$) de neuronas CA1 del hipocampo dorsal. C) árbol basolateral ($p=0.055$) y D) árbol apical ($p=0.221$) de neuronas CA3 del hipocampo dorsal.

Resultados de aprendizaje y memoria

Prueba de reconocimiento de objetos

Para los resultados obtenidos en la fase de elección a corto plazo y a largo plazo, la ANOVA de una vía mostró que todas las ratas independientemente del grupo al que pertenecían tuvieron una tendencia a explorar por más tiempo el objeto novedoso (Figura 19).

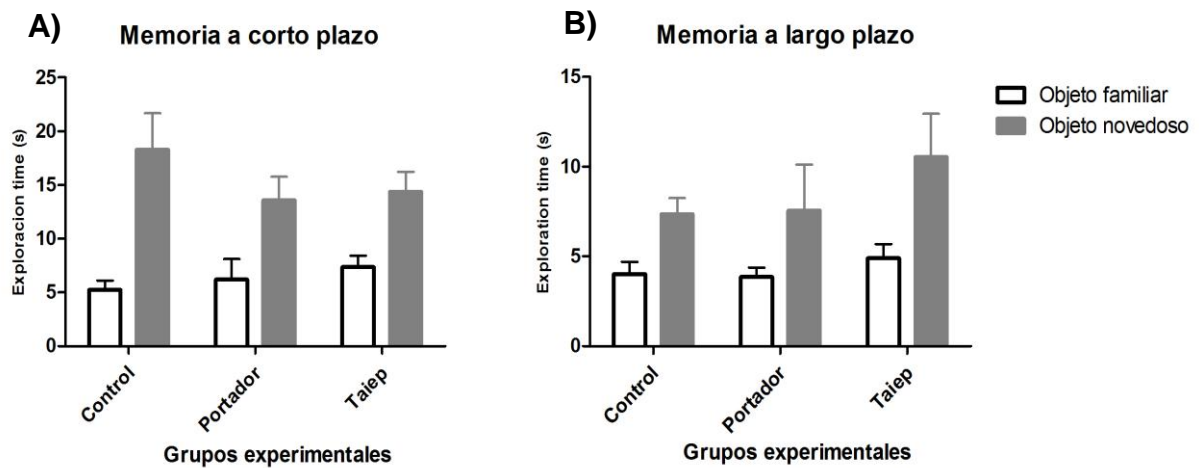


Figura 19. **Tiempo de exploración en la prueba de aprendizaje y memoria.** Tiempo de exploración invertido en los objetos familiares y novedosos en la fase de elección a corto plazo (A), ($p=0.417$) y largo plazo (B), ($p=0.458$) después de la adquisición del aprendizaje. Se grafican los promedios \pm e.e de los tiempos de interacción que cada grupo paso con los objetos.

Discusión

En el presente estudio, se muestra que los arboles dendríticos apicales y basales de neuronas piramidales CA1 y CA3 de hipocampo dorsal de ratas *Taiep* y ratas portadoras adultas presentan una disminución en el número de intersecciones dendríticas, longitud dendrítica por orden de ramificación y longitud dendrítica total. Así mismo se muestra que el proceso de aprendizaje y memoria no se ve afectado.

Se ha considerado a la edad como un factor importante que provoca cambios en la estructura y en la función del cerebro, lo que conlleva a un decline en la memoria, en la actividad motora, en los patrones del sueño y en la función neuroendocrina cuando el individuo envejece. Estos cambios son ocasionados primordialmente por la muerte de neuronas así como por una retracción dendrítica de los árboles y una disminución en la cantidad de neurotransmisores liberados como la dopamina, la norepinefrina y la acetilcolina, lo que ocasiona un déficit en la sinapsis y un desequilibrio de los circuitos neuronales. Por otra parte, investigaciones previas han mostrado que por la edad, el sistema nervioso presenta un deterioro progresivo de las células debido a un daño genético o a una acumulación de radicales libres (Kandel *et al.*, 2000).

En el caso de la rata *Taiep* se ha mostrado un incremento en los niveles de óxido nítrico (ON) (León-Chávez *et al.*, 2003; León-Chávez *et al.*, 2006), lo cual se ha relacionado con apoptosis y necrosis neuronal (Zhou *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2004). Soto-Rodríguez y colaboradores (2012) a su vez mostraron que la producción de ON en el cerebelo de la rata *Taiep* a los 30 días de edad incrementa un $95\% \pm 2\%$ y alcanza su nivel máximo a los 3 meses de vida ($155\% \pm 46\%$) comparados con las ratas SD no mutantes, mientras que en el tallo cerebral, la producción de ON incrementa significativamente $73\% \pm 19\%$ a los 3 meses de edad, $60\% \pm 23\%$ a los 6 meses y $371\% \pm 80\%$ a los 8 meses lo que provoca una disminución en el número de neuronas y una reducción de las proyecciones dendríticas, así como una anomalía en la morfología de las neuronas de

Purkinje en el cerebelo y de las neuronas magnocelulares del tallo cerebral (León-Chávez *et al.*, 2006; Soto-Rodríguez *et al.*, 2012).

Sin embargo la presencia de ON y sus isoformas (iNOS y nNOS, por sus siglas en inglés), no sólo se expresan en el cerebelo sino también en el hipocampo de ratas adultas, indicando que la producción y distribución de ellas es diferente en cada región del cerebro y dependiente de la edad de los animales (Siles *et al.*, 2002).

Con base en estos antecedentes nuestros resultados relacionados con una disminución de la ramificación dendrítica de los arboles basales y apicales de neuronas CA1 y CA3 de ratas *Taiep* y portadoras adultas pueden deberse a que además de la desmielinización producida por la mutación, el ON y sus isoformas producen una neurotoxicidad que conlleva a la pérdida de neuronas y de sus ramificaciones en el cerebro (Vernet *et al.*, 1998).

La densidad de espinas dendríticas no se vio afectada en ratas portadoras y *Taiep* a pesar de la reducción en la arborización dendrítica, lo que surge que la arborización dendrítica de los árboles y la expresión de espinas dendríticas son procesos independientes (Kolb *et al.*, 1998), o bien, que los cambios en la densidad de espinas se realizan en otras poblaciones celulares del hipocampo (Burke *et al.*, 2006).

En investigaciones previas se han reportado alteraciones en la transmisión sináptica en estructuras como la médula espinal y el hipocampo de la rata *Taiep* (Bonansco *et al.*, 2004; Bonansco *et al.*, 2006; Bonansco *et al.*, 2009; Fuenzalida *et al.*, 2009) debido a una constante liberación de glutamato. Después de que un potencial de acción ha llegado a la terminal presináptica hay un flujo intracelular del Ca^{++} , lo que provoca la liberación del neurotransmisor glutamato por algunos milisegundos, generando una corriente postsináptica excitatoria (CPE), sin embargo en algunas sinapsis centrales y periféricas, la liberación sincrónica del neurotransmisor puede ser seguida por niveles más bajos de liberación, generando una corriente sináptica asincrónica, tal como se ha observado en la

rata *Taiep* (Bonansco *et al.*, 2006), por lo que en este organismo, la elevada liberación del Ca^{++} presináptico es un factor determinante en la liberación asincrónica del glutamato, lo que ocasiona una alteración en la distribución de los receptores de glutamato en el hipocampo y por lo tanto un incremento en la probabilidad de toxicidad neuronal (Bonansco *et al.*, 2009).

La toxicidad neuronal o también conocida como dendrotoxicidad generada por la excesiva liberación de glutamato provoca un incremento en la actividad de los receptores de glutamato, lo que promueve la entrada excesiva de Ca^{++} a la célula, que es secuestrado por la mitocondria. Esto ocasiona un incremento del Ca^{++} mitocondrial, que genera una disfunción metabólica, la producción de radicales libres y la activación de proteasas, óxido nítrico, etc. lo que finalmente produce una degeneración de las neuronas y su posterior muerte (Kandel *et al.*, 2013).

Mark y colaboradores (1996) demostraron que la cantidad de Ca^{++} que entra a una neurona piramidal está directamente relacionada con la edad ya que a partir del primer mes de vida ocurre un incremento de Ca^{++} intracelular, lo que ocasiona un aumento en el volumen del soma y la retracción de las dendritas, debido a que la alta concentración de Ca^{++} disminuye el metabolismo celular y degrada las proteínas del citoesqueleto. Es posible que esa sea la causa de la retracción dendrítica observada en nuestros resultados.

En cuanto a los receptores de glutamato (NMDA) y su excesiva activación, nuestros resultados concuerdan con Dekkers (1994) y Bellinger (1987), los cuales mencionan que la constante estimulación y liberación de neurotransmisores ocasiona una disminución en el número y en la longitud de dendritas, factor fuertemente relacionado con la edad, generando una pérdida o relocalización de la sinapsis (Dekkers *et al.*, 1994), además de que este proceso se ha asociado con diferentes enfermedades neurodegenerativas como la epilepsia, aunque a la edad de las ratas *Taiep* utilizadas en este trabajo no se presenta epilepsia, algunos autores han propuesto que las convulsiones prolongadas o recurrentes provocan

un daño neuronal y la muerte de muchas regiones cerebrales, especialmente el hipocampo, generando una disminución en la longitud total, el número de ramificaciones dendríticas y una reducción de la densidad de espinas dendríticas tanto de neuronas CA1 como de neuronas piramidales CA3 (Swann *et al.*, 2000; Nishimura *et al.*, 2011).

De acuerdo con resultados obtenidos de la morfología neuronal de la rata mutante *Taiep* joven (Bravo-Durán, 2013), también el árbol basolateral de neuronas CA1 y CA3 exhibe una mayor disminución de la arborización dendrítica en comparación con el árbol apical, y además presentan un decremento en la densidad de espinas dendríticas, por lo cual proponemos que la edad y el grado de desmielinización son factores que influyen en la retracción dendrítica de las neuronas piramidales CA1 y CA3 del hipocampo dorsal.

En el ratón mutante MeCP2 adulto, el cual presenta ataxia, convulsiones y un decline en la capacidad cognitiva, las neuronas piramidales CA1 presentan una reducción de la arborización dendrítica basolateral (Wang *et al.*, 2013) y una disminución en la densidad de espinas dendríticas (Robinson *et al.*; 2012), en cambio, nosotros mostramos que las neuronas CA3 son las más afectadas en comparación con las neuronas CA1, esto se puede deber a las propiedades funcionales de las neuronas. Las neuronas piramidales CA3 reciben impulsos excitatorios de 3 regiones principales: 1) de las células granulares del giro dentado, 2) de la capa II de la corteza entorrinal y 3) de los axones de otras neuronas CA3, por lo que la entrada de impulsos en esta región es numerosa requiriendo una mayor activación de los receptores NMDA, en cambio las neuronas CA1 reciben impulsos nerviosos de la corteza entorrinal y de las neuronas CA3, además se ha registrado que también reciben impulsos neuromoduladores de regiones subcorticales, activando receptores de dopamina mientras que los receptores a glutamato mantienen una distribución aleatoria y en menor proporción (Andersen *et al.*, 2007). Estudios electrofisiológicos han documentado que el receptor de dopamina D2 es sintetizado por las neuronas piramidales CA1 y las células granulares del giro dentado, y se encuentran

principalmente en el estrato lacunosum-moleculare, en donde se localizan los arboles dendríticos de las neuronas piramidales. El incremento en las concentraciones de glutamato activa a los receptores D2, los cuales funcionan como un inhibidor de la excitabilidad neuronal, sugiriendo que la dopamina juega un rol inhibitorio en las células piramidales del hipocampo ante una constante excitabilidad, proporcionando protección a las neuronas CA1 ante la neurotoxicidad inducida por glutamato (Bozzi *et al.*, 2000). Es posible por tanto que las dendritas de las neuronas CA3 sean más susceptibles a la reducción dendrítica que las dendritas de las neuronas CA1.

En investigaciones previas se ha reportado que las alteraciones en los arboles dendríticos del hipocampo dorsal conllevan a un decline de los procesos cognitivos (Ishizuka *et al.*, 1995; Bellinger *et al.*, 1978; Grill y Riddle 2002; Montgomery y Buzsáka, 2007; Bravo-Durán, 2013), sin embargo, a pesar de que los resultados del análisis morfológico de las neuronas piramidales del hipocampo dorsal muestra una disminución en la ramificación dendrítica, la prueba de aprendizaje y memoria fue ejecutada de manera eficiente por los animales. Esto se puede deber a que las estructuras del lóbulo temporal medial (hipocampo, giro dentado, corteza perirrinal, corteza entorrinal) maduran a diferente tiempo, lo que favorece el proceso de aprendizaje y memoria a diferentes edades (Alvarado *et al.*, 2000; Reger *et al.*, 2010), sugiriendo que cuando hay algún daño en alguna estructura puede existir alguna otra que funcione como relevo evitando que el impacto del daño sea mayor durante cierto periodo de tiempo.

Es posible considerar que la conectividad funcional del hipocampo de la rata *Taiep* adulta presenta anormalidades (Roosendaal *et al.*, 2010), sin embargo las consecuencias funcionales sean mayormente notables en modelos seniles. Por otro lado, la sintomatología de la rata *Taiep* no fue impedimento para la exploración de los objetos, lo que permite evaluar las capacidades cognitivas reales de los organismos.

Sugerimos realizar estudios de la morfología neuronal del hipocampo de ratas seniles así como en las estructuras que colaboran en la adquisición y retención de la información como la corteza entorrinal y la neocorteza (Álvarez & Squire, 1994).

Conclusión

La rata *Taiep* macho adulta presenta una disminución significativa en la arborización dendrítica de los árboles basolaterales tanto de neuronas piramidales CA1 como de neuronas CA3 del hipocampo dorsal.

La rata portadora adulta muestra una disminución significativa en la arborización dendrítica de los árboles basales y apicales de neuronas CA3 del hipocampo dorsal.

La densidad de espinas dendríticas no se ve afectada en las neuronas CA1 y CA3 del hipocampo por el fenotipo portador o *Taiep*.

El desempeño de las ratas portadoras y *Taiep* adulta en la prueba de aprendizaje y memoria espacial de reconocimiento de objetos es tan eficiente como el de las ratas que no portan la mutación.

Bibliografía

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

Andersen P., Morris R., Amaral D., Bliss T. & O'Keefe J. (2007). The hippocampus book. Oxford Neuroscience.

Antunes M. & Biala G. (2012). The novel object recognition memory: neurobiology test procedure, and its modifications. *Cognitive Processing*, 13:93-110.

Ballesteros S. (1999). Memoria humana: investigación y teoría. *Psicothema*, 11:705-723.

Bannerman D.M., Rawlins J.N., McHugh S.B., Deacon R.M., Yee B.K., Bast T., Zhang W.N., Pothuizen H.H. & Feldon J (2004). Regional dissociations within the hippocampus--memory and anxiety. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 28:273-283.

Bast T. & Feldon J. (2003). Hippocampal modulation of sensorimotor processes. *Progress in Neurobiology*, 70:319-345.

Bellinger D., Levitan A., Waternaux C., Needleman H. & Robinowitz M. (1978). Longitudinal analysis of prenatal and postnatal lead exposure and early cognitive development. *The New England Journal of Medicine*, 316:1037-1043.

Bloom CM., Post RJ., Anch AM. & Davenport DG. (2013). Behavioral assessment of visual deficits in the Taiep mutant. *Degenerative Neurological and Neuromuscular Disease*, 3:15-21.

Boccarda C.N., Kjonigsen L.J., Hammer I.M., Bjaalie J.G., Leergaard T.B. & Witte M.P. (2015). A Three-Plane Architectonic Atlas of the Rat Hippocampal Region. *Hippocampus*, 00:1-20.

Bonansco C. & Fuenzalida M. (2004). Altered synaptic and electrical properties of lumbar motoneurons in the neurological glial mutant *taiep* rat. *Experimental Brain Research*, 156:104-110.

Bonansco C., Fuenzalida M., Couve E., Aliaga E. & Roncagliolo M. (2009). The Taiep Rat: A Neurological Mutant as a Model to Understand the Role of Glia Cells in Synaptic Transmission. *Asian Journal of Cancer*, 8:121-126.

Bonansco C., Fuenzalida M., Olivares V., Molina C. & Roncagliolo M. (2007). Asynchronous transmission in the CA3-CA1 hippocampal synapses in the neurological mutant *taiep* rat. *Journal of Neuroscience Research*, 85:223-229.

Bozzi Y., Vallone D. & Borrelli E. (2000). Neuroprotective role of dopamine against hippocampal cell death. *The Journal of Neuroscience*, 22:8643-8649.

Bravo-Durán A. (2013). Caracterización de la morfología neuronal de hipocampo dorsal y evaluación del aprendizaje y memoria espacial de ratas *taiep*, Tesis de licenciatura. Escuela de Biología, BUAP.

Brun V., Otnaess M., Molden S., Steffenach H., Witter M., Moser M.B & Moser E. (2002). Place cells and place recognition maintained by direct Entorhinal-Hippocampal circuitry. *Science*, 296:2243-2246.

Burke S. & Barnes C. (2006). Neural plasticity in the ageing brain. *Nature Reviews Neuroscience*, 7:30-40.

Burns J., David A., Mackintosh A., Boll S. & Greenwood J. (2005). The effect of chronic anti-hypertensive therapy with Bendroflumethiazide a sympathetic drive. *Clinical Medicine: Cardiology*, 2:263-269.

Colom R. (2001). Inteligencia y Memoria de Trabajo: La Relación Entre Factor G, Complejidad Cognitiva y Capacidad de Procesamiento. *Psicología: Teoría e Pesquisa*, 17:37-47.

Cortés M. del C., Gavito B., Ita M., Valencia J. & Eguibar J.R. (2005). Characterization of the spontaneous and gripping-induced immobility episodes on *taiep* rats. *Synapse*, 58:95-101.

DeFelipe J. & Fariñas I. (1992). The pyramidal neuron of the cerebral cortex: morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. *Progress in neurobiology*, 36:563-607.

Dekkers J., Becker D., Cook J. & Navarrete R. (1994). Early postnatal changes in the somatodendritic morphology of ankle flexor motoneurons in the rat. *European Journal of Neuroscience*, 6:87-89.

Duncan I.D., Lunn K.F., Holmgren B., Urba-Holmgren R. & Brignolo-Holmes I. (1992). The *Taiep* Rat: a myelin mutant with an associated oligodendrocyte microtubular defect. *Journal of Neuroscience*, 21:870-884.

Duncan I.D., Kondo Y. & Zhang S.C. (2011). The myelin mutants as models to study myelin repair in the leukodystrophies. *Neurotherapeutics*, 8:607-624.

Eguibar J.R. & Cortés M. del C. (2010). The myelin mutant *taiep* as a model for absence crisis. *Gaceta Médica de México*, 146:11-18.

Eguibar J.R., Cortés M. del C., Lara-Lozano M. & Mendiola D. (2012). Dopaminergic D2-like antagonist produce yawning in the myelin mutant *taiep* and Sprague-Dawley rats. *Pharmacology Biochemistry*, 102:118-123.

Eichenbaum, H., Otto, T. & Cohen, N.J. (1992). The Hippocampus - What Does It Do?. *Behavioral and Neural Biology*, 57:1-35.

Ennaceur A. & Delacour J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. *Behavioral Brain Research*, 31:47-59.

Ennaceur A. (2009). One-trial object recognition in rats and mice: Methodological and theoretical issues. *Behavior Brain Research*, 215:244-254.

Ennaceur A. (2010). One-trial object recognition in rats and mice: methodological and theoretical issues. *Behavioural Brain Research*, 215:244-254.

Fields D.R. (2008). White matter in learning, cognition and psychiatric disorders. *Trends in Neurosciences*, 31:361-370.

Fuenzalida M., Aliaga E., Olivares V., Roncagliolo S. & Bonansco C. (2009). Developmental increase of asynchronous glutamate release from hippocampal synapses in mutant *taiep* rat. *Synapse*, 63:502-509.

Gibb R. & Kolb B. (1998). A method for vibratome sectioning of Golgi-Cox stained whole rat. *Journal of Neuroscience methods*, 79:1-4.

Geurts J.J., Bo L., Roosendaal S.D., Hazes T., Daniels R., Barkhof F., Witter M.P., Huitinga I. & Vab der Valk P. (2007). Extensive hippocampal demyelination in multiple sclerosis. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 66:819-827.

Gray C.M. (1994). Synchronous Oscillations in Neuronal Systems: Mechanisms and Functions. *Journal of Computational Neuroscience*, 1:11-38.

Grill J. & Riddle D. (2002). Age-related and laminar-specific dendritic changes in the medial frontal cortex of the rat. *Brain research*, 937:8-21.

Holmgren B., Urbá-Holmgren R., Riboni L. & Vega-Saenz de Miera R. (1989). Sprague Dawley Rat Mutant with Tremor, Ataxia, Tonic immobility Episodes, Epilepsy and Paralysis. *Laboratory Animal Science*, 39 (3):226-228.

Ito, T.A., & Cacioppo, J.T. (1998). Representation of the contours of mental health. *Psychological Inquiry*, 9, 43-48.

Ishizuka N., Cowan W.M. & Amaral D.G. (1995). A quantitative analysis of the dendritic organization of pyramidal cells in the rat hippocampus. *Journal of Comparative Neurology*, 362:17-45.

Juárez I., Gratton A. & Flores G. (2008). Ontogeny of altered dendritic morphology in the rat prefrontal Cortex, hippocampus, and nucleus accumbens following cesarean delivery and birth anoxia. *Journal of Comparative Neurology*, 507:1734-1747.

Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessell T.M., Siegelbaum. & Hudspeth A.J. (2000). Principles of Neural Science. Ed. Mac Graw Hill. United States of América.

Kolb B., Forgie M., Gibb R., Gorny G. & Rowntree S. (1998). Age, experience and the changing brain. *Neuroscience & Biobehavior Reviews*, 22:143-159.

Kolb B. & Gibb R. (2011). Brain Plasticity and Behaviour in the Developing brain. *Journal of the Canadian Academic of Child and Adolescent Psychiatry*, 20:265-276.

Kolb B., Mychasiuk R., Muhammad A. & Gibb R. (2013). Brain plasticity in the developing brain. *Progress in Brain Research*, 207:35-64.

Kolb B., Mychasiuk R. & Gibb R. (2014). Brain development, experience, and behavior. *Pediatric Blood & Cancer*, 61:1720–1723.

León-Chávez B., Gonzalez-Barrios A., Ugarte A., Meraz M.A. & Martinez-Fong D. (2003). Evidence in vitro of glial cell priming in the *taiep* rat. *Brain Research*, 965:274-278.

León-Chávez., Aguilar-Alonso P., Gonzalez-Barrios J.A., Eguibar J.R., Ugarte A., Brambila E., Ruiz-Aguelles A. & Martinez-Fong D. (2006). Increased nitric oxide levels and nitric oxide synthase isoform expression in the cerebellum of the *taiep* rat during its severe demyelination stage. *Brain Research*, 1121:221-230.

Leutgeb S., Leutgeb J., Treves A., Moser M.B & Moser E. (2004). Distinct ensemble codes in hippocampal areas CA3 and CA1. *Science*, 305:1295-1298.

Levine N., Rademacher D., Collier T., O'Malley J., Kells A., San Sebastian W., Bankiewicz K. & Steece-Collier K. (2013). Advances in thin tissue Golgi-Cox impregnation:Fast, reliable methods for multi-assay analyses in rodent and non-human primate brain, *Journal of Neuroscience Methods*, 213:214-227.

Lunn K., Bass P. & Duncan I. (1997a). Microtubule organization and stability in the oligodendrocyte. *The Journal of Neuroscience*, 13:4921-4932.

Lunn K., Clayton M. & Duncan I. (1997b). The temporal progression of the myelination defect in the *taiep* rat. *Journal of Neurocytology*, 26:267-281.

Mathiasen J.R. & DiCamillo A. (2010). Novel Object Recognition in the Rat: A Facile Assay for Cognitive Function. *Current Protocols in Pharmacology*, 49:1-15.

Moller J.R., Carmody B.I, Durr E.C., Holmgren B., Urba-Holmgren R., Brignolo-Holmes I. & Duncan I.D. (1992). Biochemical analysis of myelin proteins in a new neurological rat mutant. *Transactions of the American Society for Neurochemistry*, 23:198-204.

Moller J.R., Durr P.G., Quartes R.H & Dunca I.D. (1997). Biochemical analysis of myelin proteins in a novel neurological mutant: the *taiep* rat. *Journal of Neurochemistry*, 69:773-779.

Montgomery S.M. & Buzsáki G. (2007). Gamma oscillations dynamically couple hippocampal CA3 and CA1 regions during memory task performance. 104:14495-14500.

Moser M-B., Rowland D. & Moser E.I. (2015). Place cells, grid cells, and Memory. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7:1-15.

Mumby D., Piterkin P., Lecluse V. & Lehmann H. (2007). Perirhinal Cortex Damage and Anterograde de Object-Recognition in Rats After Long Retention Intervals. *Behavioural Brain Research*, 185:82-87.

Nishimura M., Gu X. & Swann JW. (2011). Seizures in early life suppress hippocampal dendrite growth while impairing spatial learning. *Neurobiology of disease*, 44:205-214.

O'Connor L., Goetz B. & Couve E. (2000). Intracellular distribution of myelin protein gene products is altered in oligodendrocytes of the *taiep* rat. *Molecular and Neuroscience*, 16:396-407.

Oliveira M.M.A., Hawk D.J., Abel T. & Haveke R. (2010). Post-training reversible inactivation of the hippocampus enhances novel object recognition memory. *Learning & Memory*, 17:155–16.

Petanjek Z., Judas M. & Simic G. (2011) Extraordinary neoteny of synaptic spines in the human prefrontal cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108:13281–13286.

Piatti V. (2009). Maduración neuronal en el giro dentado del hipocampo adulto. Tesis de doctorado. Facultad de ciencias exactas y naturales, Universidad de Buenos Aires.

Prieto G.J., Urba-Holmgren R. & Holmgren B. (1991). Sleep and EEG disturbances in a rat neurological mutant *taiep* with inmobility episodes: a model of narcolepsy-cataplexy. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 79:141-147.

Purves D., Augustine G.J., Fitzpatrick D., Hall W.C., Lamantia A-S., Mcnamara J.O. & Williams S.M. (2007). *Neurociencia*. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España.

Robinson L., Guy J., McKay L., Brockett E., Spike R.C., Selfridge J., De Sousa D., Merusi C., Riedel G. & Bird A. (2012). Morphological and functional reversal of phenotypes in a mouse model of Rett syndrome. *Brain*, 135:2699-2710.

Roncagliolo M., Schlageter C., León C., Couve E., Bonansco C & Eguibar J.R. (2006). Developmental impairment of compound action potential in the optic nerve of myelin mutant *taiep* rats. *Brain Research*, 1067:78-84.

Roosendaal S.D., Hulst H.E., Vrenken H., Feenstra H.E., Castelijns J.A., Pouwels P.J., Barkhof F. & Geurts J.J. (2010). Structural and functional hippocampal changes in multiple sclerosis patients with intact memory function. *Radiology*, 255:595-604.

Rosenzweig M.R. & Bennett E. (1996). Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior. *Behavioural Brain Research*, 78:57-65.

Rosenzweig M.R. (2003). Effects of differential experience on the brain and behavior. *Developmental Neuropsychology*, 24:523-540.

Ruetti E., Justel N. & Bentosela M. (2009). Perspectivas clásicas y contemporáneas acerca de la memoria. *Suma Psicológica*, 16:65-8.

Siles E., Martínez-Lara E., Canuelo A., Sanchez M., Hernández R., Lopez-Ramos J.C., Del Moral M.L., Esteban F.J., Blanco S., Pedrosa J.A., Rodrigo J. & Peinado M.A. (2002). Age-related changes of the nitric oxide system in the rat brain. *Brain research*, 956:385-392.

Sirevaag A.M. & Greenough W.T. (1987). A multivariate statistical summary of synaptic plasticity measures in rats exposed to complex, social and individual environments. *Brain Research*, 441:386-392.

Song J., Christian K., Ming G-L. & Song H. (2012). Modification of hippocampal circuitry by adult neurogenesis. *Developmental Neurobiology*, 72: 1032-1043.

Song J., O'Connor L.T., Yu W., Baas P.W. & Duncan I. (1999). Microtubule alterations in cultured *taiep* rat oligodendrocytes lead to the deficits in myelin membrane formation. *Journal of Neurocytology*, 28:671-678.

Soria C. & Pérez Vega M.I. (2012). Participación de las proteínas de unión a la actina y vías de señalización asociadas a la formación y mantenimiento de las espinas dendríticas. *Neurología*, 27(7): 421-431.

Sorra K.E & Harris K.M. (2000). Overview on the structure, composition, function, development, and plasticity of hippocampal dendritic spines. *Hippocampus*, 10:501-511.

Soto-Rodríguez G., Martínez-Fong D., Arroyo R., Aguilar-Alonso P., Rubio H., Eguibar J.R., Ugarte A., Torres-Soto M., González-Barrios J.A., Cebada J., Brambila E. & León-Chavez B. (2012). Nitric oxide production is associated to increased lipoperoxidation and active caspasa-3 in demyelinated brain regions of the taiep rat. *Advanced in Bioscience and Biotechnology*, 3:695-704.

Spruston N. (2008). Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration. *Nature*, 9:206-221.

Squire R.L & Zola M.E. (1988). Memory: brain systems and behavior. *Trends in Neuroscience*, 11:170-175.

Squire R.L & Zola M.E. (1996). Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93:13515-13522.

Squire L.R., Wixted J.T. & Clark R.E. (2007). Recognition memory and the medial temporal lobe: A new perspective. *Nature Reviews*, 8:872–883.

Swann J., Al-Noori S., Jiang M. & Lee C. (2000). Spine loss and other dendritic abnormalities in epilepsy. *Hippocampus*, 10:617-625.

Verpelli C., Piccolo G., Zibetti C., Zanchi A., Gardoni F., Huang K., Brambilla D., Di Luca M., Battaglioli E. & Sala C. (2010). Synaptic activity controls dendritic spine morphology by modulating Eef2-dependent BDNF synthesis. *The Journal of Neuroscience*, 30:5830-5842.

Vernet D., Bonavera J.J., Swerdloff R., Gonzalez-Cadavid N. & Wang C. (1998). Spontaneous expression of inducible nitric oxide synthase in the hypothalamus and other brain regions of aging rats. *Endocrinology*, 139:3254-3261.

Wang I., Reyes A. & Zhou Z. (2013). Neuronal morphology in MeCP2 mouse models is intrinsically variable and depends on age, cell type and *Mecp2* mutation. *Neurobiology of Disease*, 58:3-12.

Verpelli C., Piccoli G., Zibetti C., Zanchi A., Gardoni F., Huang K., Brambilla D., Di Luca., Battaglioli E. & Sala C. (2010). Synaptic activity controls dendritic spine

morphology by modulating eEF2-dependent BDNF synthesis. *The Journal of Neuroscience*, 30:5830-5842.

Yuste R. (2010). *Dendritic Spines*. The MIT Press Cambridge, Massachusetts.

Zhang Y., Wang H., Li J., Jimenez D.A., Levitan E.S., Aizenman E. & Ronsenberg P.A. (2004). Peroxynitrite-induced neuronal apoptosis is mediated by intracellular zinc release and 12-lipoxygenase activation. *Journal of Neurocytology*, 24:10616-10627.

Zhou J.F., Yan X.F., Ruan Z.R., Peng F.Y., Cai D., Yuan H., Sun L., Ding D.Y. & Xu S.S. (2000). Heroin abuse and nitric oxide, oxidation, peroxidation, lipoperoxidation. *Biomedical and Environmental Sciences*, 13:131-139.

Anexo 1

Variables a evaluar

Indicador	Descripción
Longitud dendrítica por orden de ramificación	Nos indica la complejidad de los arboles dendríticos que presenta una neurona. Se calcula con la suma de intersecciones dendríticas en círculos concéntricos por orden de ramificación y se expresa en μm .
Longitud dendrítica total	Es el tamaño del árbol dendrítico completo. Se calcula con la suma de intersecciones dendríticas por círculo concéntrico que tiene un radio de 10 μm y el resultado se expresa en μm .
Densidad de espinas dendríticas	Es la cantidad de espinas por unidad de longitud dendrítica. Se expresa como el promedio de espinas de un fragmento dendrítico de 10 μm .
Aprendizaje y memoria espacial (Prueba de reconocimiento de objetos)	Es la capacidad de reconocer un objeto novedoso en un ambiente familiar. Se evalúa el tiempo en segundos que invierte la rata en explorar un objeto nuevo.

Anexo 2

Esta investigación se presentó en *the 45th Annual Meeting of the Society for Neuroscience*, con el título:

Morphological Análisis of CA1-CA3 neurons of dorsal hippocampus and evaluating the learning and spatial memory process in adult Taiep rats.

