

**CAMBIOS EN LA EXPRESION DEL RECEPTOR DE RYANODINA EN LA MEMORIA DE  
RECONOCIMIENTO DE OBJETO Y DURANTE EL ENVEJECIMIENTO**

**Tesis entregada a**

**LA UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO**

**en Cumplimiento Parcial de los requisitos para optar al grado de  
Doctor en Ciencias con Mención en Neurociencia**

**Facultad de Ciencias por**

**ALEJANDRA CAROLINA ARIAS CAVIERES**

**mes X, 201X**

**Dirigida por: Dr. Pablo Muñoz C**

**Co-Dirigida por: Dra. Cecilia Hidalgo T**

**FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO  
INFORME DE APROBACION  
TESIS DE DOCTORADO**

**Se informa a la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por:**

**ALEJANDRA CAROLINA ARIAS CAVIERES**

**Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Neurociencia, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día XX del Mes de XXXXX de 2014**

**Director de Tesis:**

**Dr. Pablo Muñoz C** .....

**Co-Director de Tesis:**

**Dra. Cecilia Hidalgo T** .....

**Comisión de Evaluación de la Tesis:**

**Dra. Kathleen Whitlock** .....

**Dr. Adrián Palacios** .....

**Dr. Martín Montecinos** .....

## AGRADECIMIENTOS

## CONTENIDOS

	página
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCION	3-16
APRENDIZAJE Y MEMORIA	3-9
ENVEJECIMIENTO Y DETERIORO COGNITIVO	9-11
CALCIO, RECEPTOR DE RYANODINA Y FORMACION DE MEMORIA	11-16
HIPOTESIS	17
OBJETIVO GENERAL	17
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
MATERIALES Y METODOS	19-26
RESULTADOS	27-59
DISCUSION	60-73
ACTIVIDAD EXPLORATORIA Y ENVEJECIMIENTO	61
MEMORIA Y ENVEJECIMIENTO	62-65
RECEPTOR DE RYANODINA Y CAMBIOS DE EXPRESION EN ETAPAS JUVENILES	65-68

RECEPTOR DE RYANODINA Y CAMBIOS DE EXPRESION

DURANTE EL ENVEJECIMIENTO

68-73

CONCLUSIONES

74

REFERENCIAS

75-81

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Esquema resumido de la localización de la corteza perirrinal e hipocampo..... pág. 7
- Figura 2: Diagrama esquemático que muestra las principales proyecciones entre el hipocampo y el circuito parahipocampal ..... pág. 8
- Figura 3: Imagen del canal/receptor de ryanodina..... pág. 15
- Figura 4: Protocolo conductual ..... pág. 22
- Figura 5: Ratas jóvenes y envejecidas fueron habituadas al aparato conductual..... pág. 29
- Figura 6: Ratas jóvenes y envejecidas presentan similar actividad locomotora al término de la tercera sesión..... pág. 31
- Figura 7: Dos fases de muestra no son suficientes para un reconocimiento espacial pero si de objeto nuevo en ratas jóvenes..... pág. 34
- Figura 8: Ambos grupos etarios disminuyen el tiempo de exploración y no presentan preferencia por objeto ..... pág. 37
- Figura 9: Ratas envejecidas presentan déficit en el reconocimiento espacial a largo plazo. .... pág. 39
- Figura 10: Ambos grupos etarios reconocen el objeto nuevo a corto y largo plazo..... pág. 41
- Figura 11: Reconocimiento espacial facilita el reconocimiento de objeto nuevo a largo plazo en ratas jóvenes y envejecidas ..... pág. 43

Figura 12: Incremento de los niveles relativos de ARNm de RyR2/RyR3 en CA1 de hipocampo de ratas jóvenes, pero no en ratas envejecidas posterior a reconocimiento espacial..... pág. 46

Figura 13: El reconocimiento de objeto no modifica los niveles relativos de ARNm de RyR1/RyR2/RyR3 en corteza perirhinal de ratas jóvenes y envejecidas..... pág. 49

Figura 14: Inmunodetección para la proteína de RyR2 en CA1 de hipocampo..... pág. 51

Figura 15: Inmunodetección para la proteína de RyR3 en CA1 de hipocampo..... pág. 52

Figura 16: Reconocimiento espacial incrementa los niveles proteicos de RyR2/RyR3 en CA1 de hipocampo de ratas jóvenes pero no en ratas envejecidas ..... pág. 55

Figura 17: Reconocimiento de objeto no modifica los niveles proteicos de RyR2/RyR3 en CPr de ratas jóvenes y envejecidas ..... pág. 57

Figura 18: Reconocimiento espacial pero no de objeto se relaciona con incrementos a nivel de proteína de la isoformas RyR2/RyR3 en CA1 de hipocampo en ratas jóvenes pero no en envejecidas..... pág. 59

Figura 19: Modelo del incremento de la AHP durante el envejecimiento: Participación de los canales de ryanodina..... pág.71

## LISTA DE ABREVIATURAS

AC	: Adenilato ciclasa
ADN	: Acido desoxirribonucleico
AMPA	: receptor glutamatérgico de tipo AMPA
AMPc	: Adenosina monofosfato cíclico.
ARNm	: Acido ribonucleico mensajero
4-CMC	: 4-Chloro-m-cresol
CA	: Campo Abierto
CA <sup>2+</sup>	: Calcio
CAM	: Calmodulina
CAMKK	: Calmodulina quinasa quinasa
CA1, CA3	: Cuerno de amon
CBP	: Proteína de unión a CREB
CCAV	: Canales de Calcio Activados por Voltaje
CIRC	: Liberación de Calcio Inducida por Calcio (Calcium Induced Calcium Release)
CP	: Corto Plazo

CREB	: Proteína de unión al elemento respuesta a $\text{Ca}^{2+}$ /AMPc (cAMP Response Element Binding)
Ctrol	: Control
CPr	: Corteza Perirrinal
Ct	: threshold cycle o ciclo umbral
DLP	: Depresión de Largo Plazo
FM	: Fase de Muestra
GD	: Giro Dentado
HP	: Hipocampo
IP3R	: Receptor de Inositol 1,4,5 Trisfosfato
KDa	: Kilo Dalton
LP	: Largo Plazo
MDa	: Mega Dalton
MR	: Memoria de Reconocimiento
NMDAR	: Receptor glutamatérgico de tipo NMDA ( <u>N</u> - <u>M</u> etil- <u>D</u> - <u>A</u> spartato)
PKA	: Proteína quinasa A
PLP	: Potenciación de Largo Plazo
RE	: Reconocimiento Espacial
RNS	: Especies reactivas del nitrógeno (Reactive Nitrogen Species)

- RO : Reconocimiento de Objeto
- ROS : Especies reactivas del oxígeno (Reactive Oxygen Species)
- RyR : Receptor de ryanodina
- SOR : Reconocimiento Espontáneo de Objeto (Spontaneous Object Recognition)
- SR : Surco Rinal

## RESUMEN

Un progresivo deterioro cognitivo de la memoria de reconocimiento tiene lugar durante el envejecimiento. El hipocampo y la corteza perirrinal son considerados los substratos neuro-anatómicos de la memoria de reconocimiento. Recientes evidencias apoyan el importante rol del canal/receptor de ryanodina (RyR) en la memoria dependiente del hipocampo, sin embargo, la participación del canal RyR en procesos de memoria y durante el envejecimiento ha sido poco estudiada. Objetivo: Evaluar si la memoria de reconocimiento de objeto incrementa la expresión de RyR. Métodos: Se evaluaron en ratas jóvenes (3 meses) o envejecidas (18 meses) las tareas de reconocimiento espacial y reconocimiento de objeto y se determinaron los cambios en los niveles de ARNm de RyR y de proteína en hipocampo y corteza perirrinal. Resultados: Encontramos que ratas jóvenes reconocen el cambio espacial y de objeto a largo plazo (24 horas) mientras ratas envejecidas no lo hacen. En ratas jóvenes, posterior al reconocimiento espacial encontramos incrementos en los niveles de ARNm y proteína de las isoformas RyR2/RyR3 en hipocampo pero estos cambios no ocurren después de la tarea de reconocimiento de objeto. En contraste, no encontramos cambios en la corteza perirrinal posterior a la tarea de reconocimiento. En ratas envejecidas, encontramos incrementados en hipocampo pero no en corteza perirrinal los niveles basales de las isoformas RyR2/RyR3 a nivel de mensajero y de proteína en relación a ratas jóvenes; estos niveles no cambian posterior a la tarea de reconocimiento espacial o reconocimiento de objeto. Conclusión: Nuestros datos indican que el reconocimiento espacial se asocia a incrementos de los niveles de ARNm y de las proteínas RyR2/RyR3 en el hipocampo, sugiriendo que estos cambios pueden ser necesarios para efectuar esta tarea, mientras que en ratas envejecidas el incremento basal de los niveles de ARNm y proteína RyR2/RyR3, y la falta de incremento de estos niveles en

respuesta al reconocimiento espacial, pueden contribuir a la señalización anormal de calcio y al deterioro conductual que exhiben estos roedores.

## **ABSTRACT**

A progressive cognitive decline in recognition memory takes place during aging. The hippocampus and the perirhinal cortex are considered anatomical substrates for recognition memory. Recent evidence supports an important role of the calcium release channel/ryanodine receptor (RyR) in hippocampal-dependent memory; however, RyR channel involvement in memory processes in young animals and during aging has been insufficiently studied. Objective: To evaluate whether object recognition memory increases RyR-expression in young and aged rodents. Methods: We evaluated young (3 months) or aged (18 months) rats in spatial recognition and object recognition tasks, and determined concomitant changes in RyR mRNA and protein levels in hippocampus and perirhinal cortex. Results: We found that young rats recognized spatial changes and novel object to long term (24 hours) whereas aged rats did not. In young rats, we found increased mRNA and protein levels of the RyR2/RyR3 isoforms in hippocampus after spatial recognition but not after object recognition tasks. In contrast, in the perirhinal cortex we did not detect changes after recognition task. In aged rats, we found increased RyR2/RyR3 mRNA and protein levels relative to young rats in hippocampus but not in perirhinal cortex, where these levels did not change after spatial recognition or object recognition tasks. Conclusion: Our data show that spatial recognition entails increased RyR2/RyR3 mRNA and protein levels in the hippocampus; we discuss the possibility that this increase may be required for spatial recognition. In contrast, the increased basal RyR2/RyR3 mRNA and protein levels displayed by aged rats, and their inability to increase after spatial recognition, may contribute to the abnormal calcium signaling and behavioral impairment exhibited by aged rodents.

## INTRODUCCION

### **Aprendizaje y memoria**

Una de las funciones más complejas del cerebro es su capacidad para adquirir y almacenar información, así como también la de recuperarla; esta capacidad cerebral permite a los individuos desarrollar procesos cognitivos tales como el aprendizaje y la memoria. El aprendizaje corresponde a la adquisición de nueva información que se observa mediante un cambio conductual, en tanto que la memoria ha sido definida como la capacidad del sistema nervioso de codificar, almacenar y recuperar la información aprendida (Squire L, 1992) y representa una función cognitiva humana esencial, no solo para la adquisición de la información sino también para la adaptación del individuo a su entorno (Yankner, Lu y cols., 2008).

En mamíferos, la memoria se divide en dos fases temporales, la memoria de corto plazo también llamada memoria de trabajo (Bird y Burgess., 2008), que presenta una duración de minutos a horas y requiere de modificaciones de proteínas pre-existentes, y la memoria de largo plazo (LP) que puede perdurar por días, semanas o años y requiere necesariamente de la síntesis de nuevos ARN mensajeros (ARNm) y de proteínas (Alberini, 2009; Kandel 2012).

Taxonómicamente, la memoria de largo plazo se divide en memoria “declarativa o explícita” y “no-declarativa o implícita”. La primera se refiere a la capacidad de recordar conscientemente hechos y eventos y depende de la integridad del lóbulo temporal, que comprende hipocampo, complejo subicular, corteza entorrinal, corteza perirrinal y corteza parahipocampal (Save, Poucet y cols., 1992; Squire y Zola.,1996). La segunda, implica habilidades y asociaciones que son adquiridas y recuperadas de forma inconsciente y que dependen de procesos que ocurren en el cerebelo, ganglios basales y cortezas motoras (Squire y Zola., 1996).

El papel del lóbulo temporal en procesos de aprendizaje y memoria emergió a partir de estudios realizados en el paciente H. M., a quien le extirparon ambos lóbulos temporales debido a crisis recurrentes de epilepsia. La información obtenida en este paciente permitió establecer que en los seres humanos el daño del lóbulo temporal resulta en una severa alteración de la memoria, desencadenando amnesia anterógrada que se caracteriza por el rápido olvido de acontecimientos recientes, y/o amnesia retrógrada, que corresponde al olvido de acontecimientos remotos, manteniendo intacta la memoria no declarativa, que incluye el aprendizaje procedural, el aprendizaje no asociativo y el condicionamiento clásico (Squire y Zola., 1996). Asimismo, los resultados obtenidos en primates y roedores, que representan modelos utilizados para evaluar procesos de aprendizaje y memoria, también dan cuenta de que la lesión del hipocampo, de la corteza perirrinal, de la corteza entorrinal y de la corteza prefrontal afectan la memoria declarativa (Morris y cols., 1984; Ennaceur y Aggleton., 1997; Winters, Forwood y cols., 2004; Yankner, Lu y cols., 2009; Uekita, Okanoya y cols., 2011).

Uno de los tipos de memoria declarativa es la memoria de reconocimiento (MR), que se define como la capacidad de discriminar entre un estímulo ya conocido o familiar y uno nuevo; este tipo de memoria constituye un proceso fundamental para nuestra vida diaria (Brown y Aggleton., 2001; Warburton y Brown.,2010; Burke, Wallace y cols., 2011; Uekita y Okanoya y cols., 2011). La memoria de reconocimiento presenta dos componentes: el componente de “recolección” que consiste en almacenar detalles contextuales (espaciales) de la situación y cuyo sustrato anatómico es el hipocampo, y el componente de “familiaridad” mediante el cual se almacena la información como un conocimiento no detallado (implícito) sin información sobre el contexto de aprendizaje, y cuyo sustrato anatómico es la corteza perirrinal (Save, Poucet y cols., 1992, Brown y Aggleton., 2001; Warburton y Brown., 2010; Uekita y Okanoya y cols., 2011).

Se ha establecido el papel del hipocampo y de la corteza perirrinal en la MR a través de estudios de lesión. En humanos, primates y roedores, la lesión del hipocampo deteriora

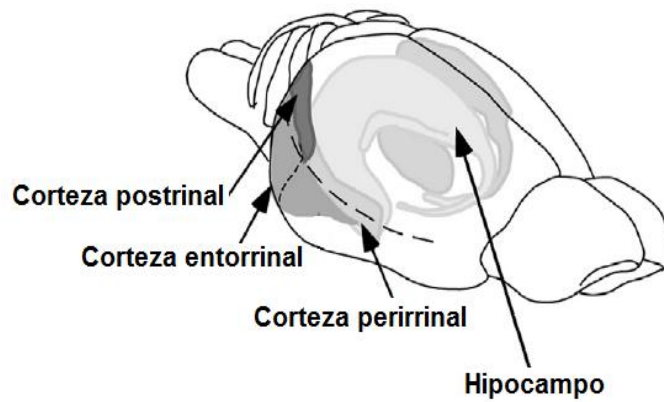
los procesos de aprendizaje y memoria de tipo espacial manteniendo intacta aquella de reconocimiento (Morris, Garrud y cols., 1984; Squire, 1992; Squire y Zola., 1996; Warburton y Brown., 2010; Uekita y Okanoya y cols., 2011). Es importante destacar que el daño de la corteza perirrinial resulta en deterioro en el reconocimiento de objeto manteniendo intacta la memoria de tipo espacial (Ennaceur y Aggleton., 1997; Winters y Bussey., 2005; Abe, Ishida y cols., 2009); estos resultados sugieren que el hipocampo es importante para el funcionamiento normal de la memoria espacial y la corteza perirrinial para el reconocimiento de un objeto nuevo.

Es interesante destacar que los cambios observados a nivel conductual y que ocurren tras una tarea conductual se correlacionan con cambios en la Potenciación de Largo Plazo (PLP) y la Depresión de Largo Plazo (DLP) (Whitlock, Heynen y cols., 2006; Gruart, Muñoz y cols., 2006); ambos tipos de respuesta se consideran actualmente un modelo ampliamente aceptado del mecanismo molecular y celular que subyace a los procesos de aprendizaje y memoria en hipocampo (Citri y Malenka., 2008). La PLP corresponde a un incremento en la eficacia sináptica durante un largo periodo de tiempo, que puede extenderse por horas, días e incluso semanas después de la aplicación de una estimulación tetánica presináptica de alta frecuencia (Malenka y cols., 1999). Se han descrito dos tipos de PLP: una dependiente del receptor de N-Metil-D-Aspartato (NMDA) y otra dependiente de Canales de Calcio Activados por Voltaje (CCAV) (Raymond, 2007; Citri y Malenka., 2008). En ambas situaciones, la PLP se expresa como un incremento de la respuesta postsináptica que se debe a la fosforilación e inserción de receptores glutamatérgicos de tipo AMPA (AMPA) (Lee y cols., 2000; Citri y Malenka., 2008). Por otra parte, la DLP corresponde a una disminución de la respuesta postsináptica (Citri y Malenka., 2008) que se debe a defosforilación por fosfatasas de proteínas previamente fosforiladas por quinasas, y a la endocitosis de receptores AMPA (Lee y cols., 2000; Citri y Malenka., 2008). Este tipo de plasticidad puede ser dependiente tanto del receptor de NMDA como de los receptores glutamatérgicos de tipo metabotrópico (mGLUR) (Citri y Malenka., 2008).

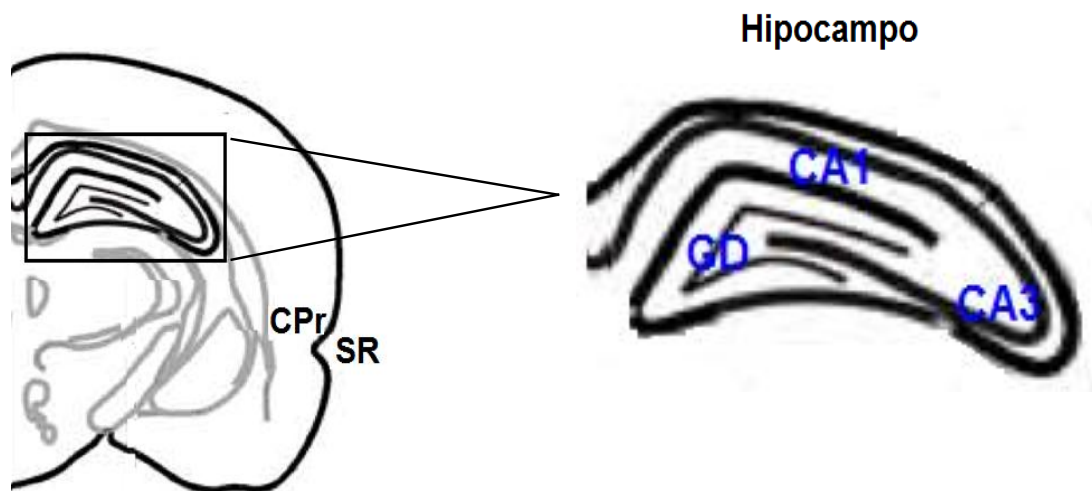
El hipocampo, la estructura principal en la cual se han correlacionado los procesos de aprendizaje y memoria, puede ser subdividido en tres áreas llamadas: giro dentado (GD), CA3 y CA1. La mayor entrada de información al hipocampo es a través de la vía perforante la cual surge principalmente desde las capas II/IV de la corteza entorrinal y con menor contribución de las capas III/V de esta corteza; los axones de la capa II/IV proyectan a las neuronas del GD, el cual a través de sus axones (fibras musgosas) proyecta a las neuronas piramidales de la región CA3, las cuales a su vez proyectan sus axones (colaterales de Schaffer) a la región CA1 del hipocampo; a su vez, los axones de las capas III/V ingresan al hipocampo y proyectan directamente a la región CA1, área que es la de mayor salida del hipocampo hacia el subiculum, la corteza entorrinal y la corteza prefrontal (Naber, Witter y cols., 1999; Warburton y Brown., 2010).

Por su parte, la corteza perirrinal que se encuentra en el surco rinal y comprende el área 35 y 36 de Brodmann (Kealy y Commins., 2011), está formada por las capas I, II, III, V y VI. Las capas II, III, V y VI forman una vía mayor que proyecta a la corteza entorrinal, la cual proyecta al hipocampo como se mencionó anteriormente. La corteza perirrinal recibe información del globus pallidus, tálamo, bulbo olfatorio, corteza prefrontal, corteza postrinal, corteza visual y corteza auditiva (Naber, Witters y cols., 1999, Heidbreder y Groenewegen., 2003; Kealy y Commins., 2011). Cabe destacar que el hipocampo y la corteza perirrinal se comunican a través de la corteza entorrinal (Naber, Witters y cols., 1999, Warburton y Brown., 2010; Kealy y Commins., 2011) (Figuras 1 y 2).

A



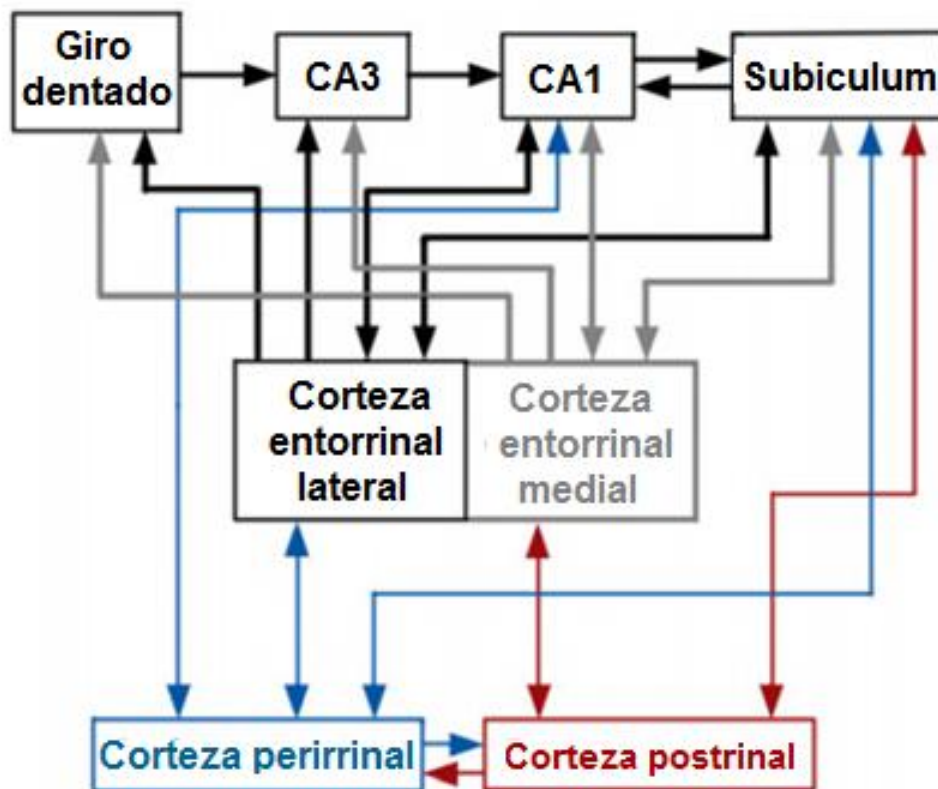
B



**Figura 1: Esquema resumido de la localización de la corteza perirrinal e hipocampo**

**A.** Vista lateral del cerebro en donde se muestra en gris oscuro la corteza postrinal y en gris más claro la corteza entorrinal, corteza adyacentes a la corteza perirrinal (línea entrecortada), también se muestra el hipocampo (Modificado de Agster and Burwell 2013).

**B.** Corte coronal de cerebro en donde se observa el hipocampo y la corteza perirrinal. A la derecha se muestra el hipocampo con sus respectivas regiones (GD, CA3, CA1). SR: Surco rinal, CPr: Corteza perirrinal (Modificado de Kadish and Thibault et al 2009)



**Figura 2: Diagrama esquemático que muestra las principales proyecciones entre el hipocampo y el circuito parahipocampal.**

Las flechas indican el sentido del flujo de información que comunica las distintas regiones del hipocampo con la corteza entorrinal, perirrinal y postrinal (Modificado de Kealy and Commins et al 2011).

Como se ha mencionado, la integridad del hipocampo y de la corteza es crítica para la formación de memoria, sin embargo, estas pueden ser fuertemente afectadas por el envejecimiento y/o enfermedades neurodegenerativas.

### **Envejecimiento y deterioro cognitivo**

El envejecimiento normal se ha asociado con un menoscabo en la capacidad de memorizar, retener y recuperar la información, afectando la memoria de tipo declarativa, especialmente la de tipo espacial, como se ha documentado en humanos, primates, perros y roedores, manteniendo intacta la memoria no declarativa (Albert 1997; Yankner, Lu y cols., 2008; Burke, Wallace y cols., 2010; Bergado, Almaguer y cols., 2011; Foster, Defazio y cols., 2012). Un tipo de memoria declarativa afectada durante el envejecimiento es la memoria de reconocimiento (MR) (Burke y cols., 2010; Gámiz y Gallo., 2012) la cual ha sido estudiada a través de la tarea denominada reconocimiento espontáneo de objetos (SOR: Spontaneous Object Recognition).

Numerosas evidencias dan cuenta del deterioro de la memoria declarativa de tipo espacial asociada con el envejecimiento (Barnes, 1979; Barnes y cols., 1988; Gage y cols., 1984; Ando y Ohashi., 1981; Veng y cols., 2003, Boric y cols., 2008, Bergado y cols., 2011, Wimmer y cols., 2012). Sin embargo, poco se conoce acerca del posible deterioro de la memoria de reconocimiento relacionada con el envejecimiento y las evidencias son contradictorias. Al respecto, autores como Cavoy y Delacour (1993), Lukaszeska y Radulska (1994), de Lima y cols (2005), Bergado, Almaguer y cols (2011) señalan que no hay deterioro en este tipo de memoria, en tanto que estudios recientes apoyan la idea de una declinación de este tipo de memoria (Burke, Wallace y cols., 2010, Burke, Wallace y cols., 2011, Gamiz y Gallo., 2012). Es por esto que la utilización de la tarea de SOR es relevante para discriminar entre memoria espacial y de reconocimiento, debido a que se ha mostrado

que el daño de la corteza perirrinal disminuye el reconocimiento de objeto nuevo en SOR (Winster y Bussey., 2005; Kealy y Commins.,2011), y que un buen rendimiento en esta tarea no requiere del hipocampo intacto (Kealy y Commins., 2011). De esta manera, la tarea de SOR proporciona una buena oportunidad para explorar el deterioro de ambos tipos de memoria asociado al envejecimiento, el cual puede ocurrir de manera independiente y/o en paralelo a los cambios que puedan ocurrir en el hipocampo y la corteza perirrinal, respectivamente.

El deterioro cognitivo asociado al envejecimiento fue atribuido inicialmente a una disminución en el número de neuronas corticales, pérdida de neuronas o retracción de las espinas dendríticas en el hipocampo (Burke y Barnes., 2006; Foster, 2007), y a una disminución tanto del volumen como de la activación de la corteza prefrontal, área cerebral involucrada en la memoria de trabajo, atención y planificación (Yankner, Lu y cols., 2008, Agster y Burwell., 2013). Sin embargo, estudios dan cuenta que la pérdida de neuronas no contribuye de manera significativa al deterioro cognitivo relacionado con el envejecimiento, que pueda asociarse con una disminución de la función cognitiva (Rapp, Deroche y cols., 2002, Burke y Barnes., 2006).

Por otra parte, un número creciente de evidencias sugieren que el deterioro cognitivo asociado al envejecimiento se puede deber a cambios en la expresión de genes (Furuichi, Furutama y cols., 1994; Veng y Browning., 2002; Monti, Berteotti y cols., 2005; Yankner, Lu y cols., 2008; Moyer, Furtak y cols., 2011; Bruno, Huang y cols., 2012; Segal y Korkotian., 2014); principalmente, de aquellos genes involucrados en la señalización mediada por calcio (Furuichi, Furutamana y colsl., 1994, Veng y Browning., 2002; Monti, Berteotti y cols., 2005, Moyer, Furtak y cols, 2011, Bruno y cols., 2012; Segal y Korkotian., 2014), que desencadenarían alteraciones en la homeostasis de calcio (Kumar y Foster., 2005; Gant, Sama y cols., 2006, Hidalgo y Carrasco., 2011; Foster 2012) o cambios en el estado redox de la célula (Hidalgo, Bull y cols., 2004, Bodhinathan, Kumar y cols., 2010.a, Paula-Lima, Adasme y cols., 2014), que en su conjunto desencadenarían alteraciones tanto en la PLP

como en la DLP. Al respecto, se ha descrito que el hipocampo de ratas envejecidas presenta una disminución respecto a ratas jóvenes en la inducción de la PLP en la sinapsis CA3-CA1 dependiente de NMDAR (Norris, Korol., 1996; Rosenwer y Barnes 2003), en tanto que la PLP dependiente de CCAV se ha encontrado incrementada (Rubillard, Gordon y cols., 2011). Se ha descrito además una mayor susceptibilidad a la inducción de la DLP, que puede ser revertida por el bloqueo de los CCAV (Norris, Korol y cols., 1996). Estos hallazgos sugieren que la mantención de los procesos cognitivos durante el envejecimiento no depende de la plasticidad mediada por NMDAR y que implica mecanismos compensatorios que involucran a los CCAV, que se encuentran incrementados durante el envejecimiento (Thibault y Lanfield., 1996; Veng, Mesches y cols., 2003).

En el caso de la CPr, se ha encontrado que el envejecimiento conlleva tanto una disminución en la expresión de la subunidad NR2A del receptor de NMDA (Liu, Smith y cols., 2008) como una disminución en los niveles de glutamato (Liu, Jing y cols., 2009); ambos cambios traerían como consecuencia un incremento en la susceptibilidad a la inducción de la DLP mediada por receptores de NMDA extra-sinápticos (Massey, Johnson y cols., 2004).

### **Calcio, receptor de ryanodina y formación de memoria**

El ion calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) es un mensajero celular versátil e importante para numerosas funciones que incluyen contracción muscular, apoptosis, crecimiento celular, proliferación celular y regulación génica (Berridge, Lipp y cols., 2000). La concentración extracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  se encuentra en el rango de 2 mM mientras que a nivel intracelular su concentración en reposo es de 0.007-0.1 micromolar (Berridge, Lipp y cols., 2000, Foster 2007). Esta asimetría, sumada a la existencia de un potencial de membrana negativo en reposo, proporciona una gradiente electroquímica significativa para la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  (Hidalgo y Carrasco., 2011).

A nivel neuronal las señales de calcio, que son incrementos transitorios de la concentración de calcio intracelular (Hidalgo y Carrasco, 2011), cumplen un rol importante en procesos como crecimiento axonal, liberación de neurotransmisor, excitabilidad, plasticidad neuronal y expresión génica; funciones que se han asociado con cambios estructurales y funcionales necesarios tanto para la plasticidad sináptica como para la formación de memoria (Berridge 1998; Silva, Kogan y cols., 1998; Berridge, Lipp y cols., 2000; Hidalgo, Bull y cols., 2004; Foster 2007). Para que ocurra un incremento transitorio de calcio es necesaria la actividad neuronal, la cual puede ser inducida por actividad eléctrica en el caso de modelos in vitro (Berridge, Lipp y cols., 2000) o a través de paradigmas conductuales en modelos in vivo (Zucchi y Ronca-Testoni., 1997; Whitlock, Heynen y cols., 2006).

La elevación de calcio intracelular ocurre inicialmente por la entrada de este ion a través del receptor de NMDA y por canales de calcio activados por voltaje. Esta entrada de calcio desencadena la amplificación y propagación de la señal de calcio mediante el mecanismo denominado liberación de calcio inducida por calcio (CICR: Calcium- Induced Calcium Release), que implica la activación por calcio de los canales de liberación de calcio presentes en el retículo endoplasmático (Berridge 1998; Berridge, Lipp y cols., 2000, Hidalgo, Bull y cols., 2004, Edwards y Rickard., 2006; Paula-Lima, Adasme y cols., 2014). El retículo endoplasmático (RE) es una red membranosa continua distribuida a lo largo de toda la célula, que a nivel neuronal se ha descrito en dendritas, espinas dendríticas, rodeando el núcleo y extendiéndose por el axón hasta llegar a los terminales presinápticos donde se asocia estrechamente con las mitocondrias (Berridge 1998; Berridge 2002).

El incremento y la amplificación de las señales de calcio, así como su propagación, reviste gran importancia debido a que activan vías de señalización citoplasmáticas sensibles a calcio, las cuales afectan eventos nucleares que desencadenan la expresión de genes esenciales para el desarrollo dendrítico, supervivencia neuronal, plasticidad sináptica; y para procesos de aprendizaje y memoria (Berridge 1998; Berridge, Lipp y cols., 2000; Berridge, Bootman y cols., 2003; Carrasco, Jaimovich y cols., 2004).

Dos tipos diferentes de canales intracelulares de calcio participan en la salida de calcio desde el RE, el canal receptor de inositol 1, 4, 5-trisfosfato (IP3R) y el canal receptor de ryanodina (RyR) (Hidalgo, Bull y cols., 2004; Edwards y Rickard.,2006; Paula-Lima, Adasme y cols., 2014). Una revisión reciente (Paula-Lima y cols., 2014) resume las evidencias que indican que en el hipocampo esta liberación de calcio es mediada principalmente por los canales RyR, cuya actividad es regulada por variados componentes celulares, fosforilación y agentes redox (Fill y Copello., 2002), proporcionando la mayor fracción del incremento de calcio en las espinas postsinápticas.

El canal RyR ha sido clonado, purificado y secuenciado de distintas especies y se han identificado tres isoformas: RyR1, RyR2 y RyR3 las cuales son codificadas por tres genes distintos y poseen alrededor de 5000 residuos de aminoácidos, presentando ~65% de identidad (Lanner, Georgiou y cols., 2010; Van Petegem 2012). La isoforma RyR1 se encuentra predominantemente en músculo esquelético, RyR2 en músculo cardiaco y RyR3 en cerebro; no obstante, todas las isoformas están expresadas en cerebro (Furuichi, Furutama y cols., 1994; Hidalgo, Bull y cols., 2004; Hertle y Yeckel., 2007; Adasme, Haeger y cols., 2011), siendo la isoforma RyR2 la más abundante (Sharp, McPherson y cols., 1993; Hertle y Yeckel., 2007; Adasme, Haeger y cols., 2011). A nivel cerebral, RyR se expresa en corteza frontal, bulbo olfatorio, tálamo, amígdala, corteza cingulada, corteza piriforme, corteza entorrinal, corteza occipital e hipocampo (Sharp, McPherson y cols, 1993; Furuichi, Furutama y cols., 1994, Zhao, Meiri y cols., 2000; Hertle y Yeckel., 2007).

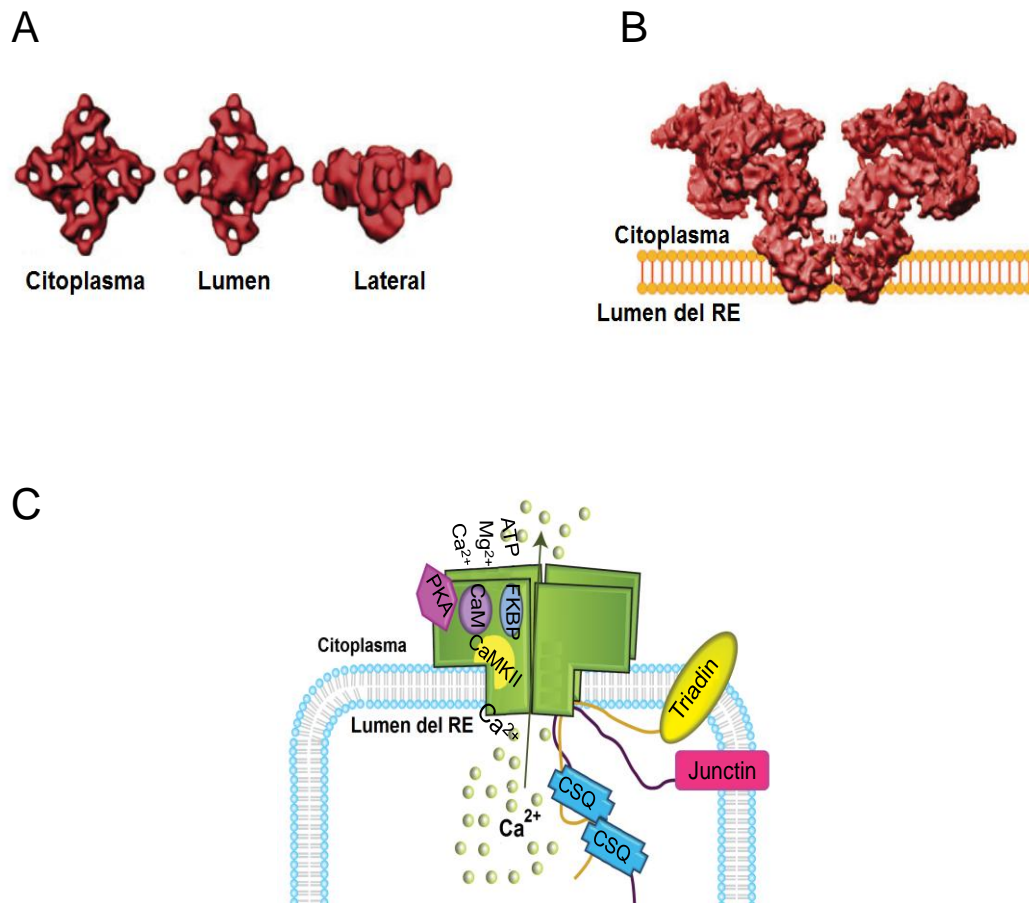
El receptor de ryanodina es un homotetrámero con una masa molecular >2 MDa en donde cada subunidad presenta un peso de ~560 kDa (Lanner, Georgiou y cols., 2010, Van Petegem 2012). Posee un gran segmento N-terminal ubicado en el citoplasma que representa aproximadamente el 90% de la proteína, mientras que su C-terminal es pequeño y también orientado hacia el citoplasma. La presencia de un gran segmento N-terminal permite que funcione como sitio de andamiaje para diversas proteínas jugando un rol central

en las vías de transducción de señales mediadas por calcio (Berridge, Bootman y cols., 2003).

El canal RyR puede ser activado por calcio, cafeína, 4-chloro-m-cresol (4-CMC) y ryanodina, alcaloide del cual proviene su nombre. Sin embargo, la ryanodina presenta un efecto dual sobre el receptor debido a que a bajas concentraciones ( $\leq 1\mu\text{M}$ ) activa el canal, mientras que a altas concentraciones ( $\geq 10\mu\text{M}$ ), lo inhibe (Zucchi y Ronca-Testoni.,1997; Fill y Copello., 2001). También puede ser inhibido por dantroleno y modulado por ATP,  $\text{H}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , quinasas, fosfatas, especies reactivas de oxígeno (ROS: Reactive Oxygen Species) y de nitrógeno (RNS: Reactive Nitrogen Species) (Lanner, Georgiou y cols., 2010).

El rol de RyR en cambios estructurales y funcionales necesarios para procesos de aprendizaje y formación de memoria ha sido evidenciado por distintos autores. En cultivo primario de hipocampo, la utilización de agonistas de RyR como cafeína y ryanodina genera señales de calcio a nivel dendrítico que desencadenan remodelamiento (incremento y elongación) de las espinas dendríticas (Korkotian y Segal., 1999; Adasme, Haeger y cols., 2011). A nivel electrofisiológico, específicamente en la PLP, la inhibición de RyR con  $10\mu\text{M}$  ryanodina previo a una estimulación tetánica, suprime la PLP de la sinapsis CA3-CA1 en rebanadas de hipocampo, mientras que su activación con  $1\mu\text{M}$  ryanodina convierte una PLP temprana en una PLP tardía (Lu y Hawkins., 2002). A nivel conductual, Zhao, Meri y cols (2000) demostraron que la memoria espacial incrementa la expresión tanto a nivel de mensajero como de la proteína RyR2 en hipocampo de ratas jóvenes entrenadas en el laberinto acuático de Morris. Asimismo, Adasme, Haeger y cols (2011) describen incremento de las isoformas RyR2/RyR3 en hipocampo a través de este mismo protocolo conductual. Por otra parte, el grupo de Galeotti, Quattrone y cols (2008) demostraron en ratones que el *knockdown* de las isoformas RyR2/RyR3, pero no así de RyR1, interfiere con la memoria espacial evaluada a través del protocolo de evitación pasiva. Asimismo, la activación de RyR con el agonista 4-CMC promueve la consolidación de la memoria espacial en ratones (Galeotti, Quattrone y cols., 2008) y en pollos (Baker, Edwards y cols., 2010) a través de este

mismo protocolo conductual, mientras que su inhibición con dantroleno disminuye la memoria asociativa (Edwards y Rickard., 2006).



**Figura 3: Imagen del canal/receptor de ryanodina**

**A.** Diferentes construcciones de la estructura del canal receptor de ryanodina vistas desde el citoplasma, del lumen del retículo endoplasmático y lateralmente. **B.** Imagen de RyR obtenida por microscopía crio-electrónica. (Modificada de Paula-Lima, Adasme y cols., 2014). **C.** Figura esquemática en donde se muestra un solo monómero de RyR y la interacción con varios moduladores. ATP: Adenosin trifosfato; Ca<sup>2+</sup>: Calcio; CaM: Calmodulina; CaMKII: Calcio calmodulina quinasa; CSQ: Calsecuestrina; FKBP: Proteína de unión a FK; PKA: Proteína quinasa A; Mg<sup>2+</sup>: Magnesio; RE: Retículo endoplasmático, (Modificada de Lanner, Georgiou y cols., 2010).

Estos datos sugieren que la liberación de calcio mediada por RyR es necesaria para la plasticidad sináptica, para el aprendizaje y la consolidación de la memoria en etapas juveniles. No obstante, se desconoce si durante el envejecimiento se altera el incremento de los niveles intracelulares de calcio requerido para promover la activación de vías de señalización, transcripción de genes y síntesis de proteínas necesarias tanto para la plasticidad sináptica como para la formación de memorias.

Las evidencias presentadas nos sugieren que el envejecimiento está asociado a un deterioro de la memoria espacial, que RyR es crítico para la plasticidad sináptica hipocampal, y para procesos de aprendizaje y memoria en etapas juveniles. Sin embargo, se desconoce la participación de RyR en la formación de memoria que involucren otras áreas del cerebro distintas al hipocampo como la corteza perirrinal en etapas juveniles, así como durante el envejecimiento. Entonces, de acuerdo a los antecedentes presentados, proponemos la siguiente hipótesis:

## **HIPÓTESIS**

Los niveles de expresión del receptor de ryanodina aumentan en ratas jóvenes en las regiones del cerebro involucradas en la memoria de reconocimiento, no así en las ratas envejecidas.

## **OBJETIVO GENERAL**

Estudiar la expresión de los canales RyR en respuesta a tareas de reconocimiento espacial y de objetos y determinar si esta expresión se ve afectada durante el envejecimiento.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Determinar si el envejecimiento altera la ejecución de tareas conductuales dependientes tanto del hipocampo como de la corteza perirrinal.
2. Determinar en ratas jóvenes si existe una correlación entre la ejecución de tareas conductuales dependientes tanto del hipocampo como de la corteza perirrinal, con los niveles de ARNm y proteína de las isoformas RyR2/RyR3.
3. Determinar en ratas envejecidas si existe una correlación entre la ejecución de tareas conductuales dependientes tanto del hipocampo como de la corteza perirrinal, con los niveles de ARNm y proteína de RyR2/RyR3.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Animales.**

Ratas machos Sprague Dawley de 3 meses (jóvenes) y 18 meses (envejecidas), fueron ubicadas dos por jaula y recibieron agua y alimento ad libitum con ciclos luz-obscuridad de 12 h, a una temperatura de  $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Las ratas fueron manipuladas y procesadas de acuerdo al protocolo de manipulación de la Universidad de Valparaíso, el cual está aprobado por el Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos, NIH (# A5823-01).

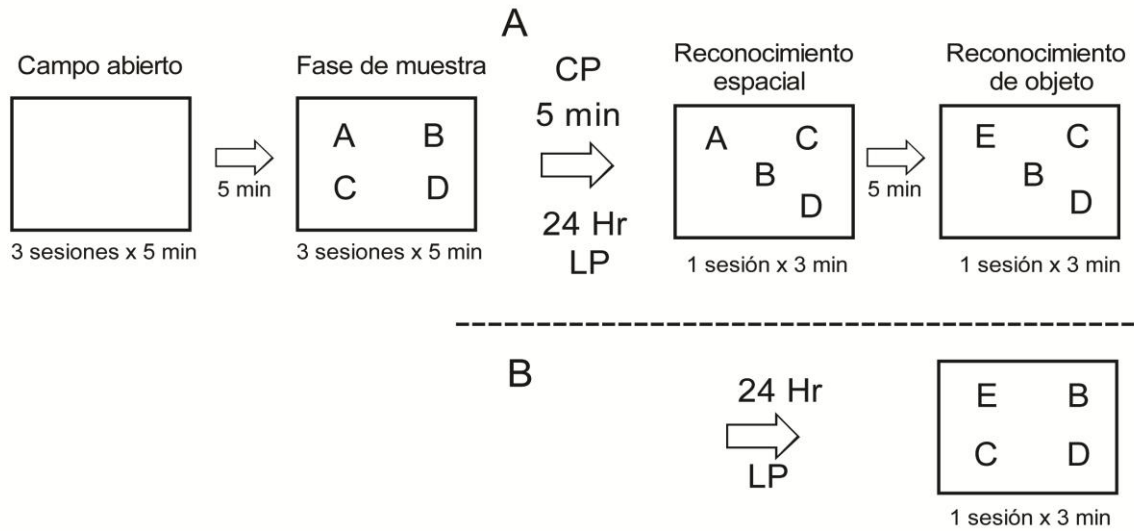
### **Aparato conductual**

El aparato conductual utilizado consiste en una caja rectangular de polietileno de color negro (65 x 50 x 50 cm) con iluminación proporcionada por dos tubos fluorescentes de 18 watts cada uno, los cuales entregan 288 lux a nivel del piso. Sobre el aparato conductual se encuentra una cámara de video la cual registra la actividad del animal para su posterior análisis.

### **Caracterización conductual a través de reconocimiento espontáneo de objeto**

El protocolo conductual utilizado se fundamenta en la motivación intrínseca de los animales de explorar objetos de manera espontánea, proporcionando con ello una medida válida de la función de la memoria (Ennaceur, Neave y cols., 1997). Un aspecto importante a considerar en esta tarea conductual es que no requiere entrenamiento previo ni refuerzo positivo o negativo (Warburton y Brown., 2010).

El protocolo consiste en que los animales exploran libremente el aparato conductual durante 5 minutos tres días consecutivos (Campo Abierto). En la siguiente fase, las ratas exploran cuatro objetos diferentes en textura, forma y color durante 5 minutos, por tres sesiones consecutivas separadas por un intervalo de 5 minutos (Fase de Muestra). Cinco minutos (corto plazo) o veinticuatro horas (largo plazo) después de la última sesión, la configuración de los objetos fue modificada por movimiento de dos objetos (Reconocimiento Espacial). Para evaluar reconocimiento de objeto, en algunos casos uno de los cuatro objetos familiares se reemplazó por uno nuevo luego del reconocimiento espacial. (Figura 4A). Sin embargo, para evitar la posible influencia de la tarea de reconocimiento espacial, se evaluó además el reconocimiento de objeto 24 horas después de la fase de muestra sin realizar previamente el reconocimiento espacial (Figura 4B). Para este protocolo conductual, se evaluaron los siguientes parámetros. Para campo abierto (CA), se evaluó el tiempo de exploración total, tiempo en la periferia, tiempo en el centro, distancia recorrida y velocidad promedio. Para la fase de muestra (FM), se determinó el tiempo de exploración total de los objetos y el tiempo promedio de exploración por objeto. Para evaluar el reconocimiento espacial y de objeto (RO), se evaluó el porcentaje (%) de índice de preferencia el cual se calcula como  $IP = (\text{tiempo de reconocimiento de un objeto} / \text{tiempo total de reconocimiento}) \times 100$ . Cabe destacar que se ha demostrado que el tiempo que el sujeto experimental gasta en explorar el objeto nuevo es mayor que el tiempo ocupado en el objeto familiar, y por lo tanto se considera una medida de la memoria de reconocimiento (Wan, Aggleton y cols., 1999; Burke, Wallace y cols., 2010). El análisis de los videos se realizó a través del software comercial ANY-MAZE versión 4.99.



**Figura 4: Protocolo conductual**

Ratas Sprague Dawley jóvenes (3 meses) o envejecidas (18 meses) exploran libremente el aparato conductual durante 5 minutos tres días consecutivos (Campo Abierto). En la siguiente fase, las ratas exploran cuatro objetos diferentes durante 5 minutos por tres sesiones consecutivas separadas por un intervalo de 5 minutos (Fase de Muestra). **A.** Cinco minutos o veinticuatro horas después de la fase de muestra, la configuración de los objetos fue modificada por movimiento de dos objetos (Reconocimiento Espacial); luego uno de los cuatro objetos familiares es reemplazado por uno nuevo (Reconocimiento de Objeto). **B.** 24 Horas después de la fase de muestra, se evaluó el reconocimiento de objeto sin realizar reconocimiento espacial manteniendo la configuración de la fase de muestra. CP: Corto plazo, LP: Largo plazo.

### **Extracción de RNA y RT-PCR:**

La extracción de ARNm total de CA1 de hipocampo y CPr se realizó usando Trizol® (Invitrogen) según las indicaciones del fabricante, seguido por el tratamiento con DNAasa I (Turbo DNA-free TM kit, Ambion, Austin, TX) para eliminar posibles contaminaciones con DNA genómico. Luego de cada extracción de ARN se evaluó la pureza por absorbancia según la razón medida a 260 y 280 nm, y su integridad a través de electroforesis en geles de agarosa en condiciones denaturantes. La cantidad obtenida se calculó por absorbancia. El cDNA de cada muestra se preparó el mismo día de la extracción con 2 µg de ARN total extraído utilizando transcriptasa reversa Improm- IITM (Promega, Madison, WI), según protocolo estándar del fabricante. Para la reacción de PCR se utilizó 200 ng de cDNA para un volumen final de amplificación de 20 µl (Applied Biosystems Thermal cycler). La amplificación fue realizada utilizando los siguientes partidores previamente descritos por Adasme, Haeger et al (2011): para RyR1 5'-GCCTTTGATGTGGGATTACAG -3' / 5'-CCCCAACTCGAACCTTCTCTC-3', para RyR2 5'-CTACTCAGGATGAGGTGCGA- 3' / 5'-CTCTCTTCAGATCCAAGCCA- 3', para RyR3 5'-GAAGCCTGTTGGACCATA-3' / 5'-TCCAGAGTGTTTGCATAAAGGAG-3' y para β-actina 5'-TCTACAATGAGCTGCGTGTG-3' / 5'-TACATGGCTGGGGTGTGAA-3'. Los experimentos de PCR cuantitativo (real time PCR) se realizaron por triplicado en el equipo MX3000P, Stratagene, La Jolla, CA., usando SyBR green como sonda fluorescente específica para ADN de doble hebra (Invitrogen, Carlsbad, CA), utilizando el método de  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Pfaffl, 2001) para PCR cuantitativo; se realizaron curvas de disociación para verificar la pureza de los productos obtenidos.

## **Inmuno-fluorescencia.**

Los cerebros fueron fijados con paraformaldehído (4%) y posteriormente seccionados en cortes de 40  $\mu\text{m}$  en criostato (Leica, modelo 1900). Los cortes flotantes fueron incubados por 12 horas usando una solución de bloqueo (suero de burro 3%; Tritón X-100 0,5% y borohidruro 0,5% en PBS 1X), posteriormente fueron lavados con PBS 1X tres veces por 10 minutos, luego se incubaron simultáneamente el anticuerpo primario anti RyR2 (ratón, 1:100) con anti KDEL (conejo 1:200) y en otro corte independiente con anti RyR3 (conejo, 1:100) con anti KDEL (ratón, 1:200) diluidos en solución de bloqueo (3% suero de burro, 0,5% tritón X-100 en PBS 1X) a 4°C por toda la noche. Luego de lavar con PBS 1X tres veces por 10 minutos, las rebanadas fueron incubadas con anticuerpos secundarios (para RyR2: Alexa 635 anti ratón y Alexa 488 anti conejo y para RyR3: Alexa 635 anti conejo y Alexa 488 anti ratón, dilución 1:300) por 2 h a temperatura ambiente. A continuación se lavaron las rebanadas con PBS 1X tres veces por 10 minutos y se incubaron con Hoechst (1:1000) por 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se lavaron las rebanadas con PBS 1X 3 veces por 10 minutos y fueron montadas sobre el medio de montaje DAKO en portaobjetos. Las imágenes de la región CA1 de hipocampo fueron obtenidas utilizando el microscopio confocal Olympus FV10i. Para ello se adquirieron secuencias de imágenes de 16 cortes confocales en el eje Z, cada corte con un espesor de 2  $\mu\text{m}$ , para cada fluoróforo

### **Preparación de extractos de proteínas.**

Secciones de CA1 de hipocampo o CPr se lisaron en buffer de homogenizado (20 mM MOPS-Tris pH 7.0, 0,3 M sacarosa, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 1% NP-40 y 0.1% SDS) al cual se adicionó una mezcla de inhibidores de proteasas (Protease Inhibitor Cocktail Set III, EDTA-Free, Calbiochem). A continuación se homogenizaron los tejidos con molidor eléctrico para tejidos y se sonicaron 3 veces por 15 seg con intervalos de frío de 15 seg entre cada sonicación. Finalmente, se centrifugaron a 4000 rpm (4°C) por 20 minutos y se recuperaron los sobrenadantes. Se guardó una alícuota para la determinación de la concentración de proteínas y la porción restante se congeló en nitrógeno líquido y se guardó a -80°C hasta su utilización. La determinación de la concentración de proteínas se realizó a través del kit qubit (Life Technology).

### **Electroforesis de proteínas y Western blot.**

La mezcla de proteínas obtenidas se denaturaron con tampón reductor 2x (SDS-PAGE: Glicerol 34,8 %, Tris Base 1 M, SDS 8 %, Azul de Bromofenol 0,04 %, EDTA 2 mM, ditionitrotol (DTT) 0,1 M y se separaron por electroforesis en geles de 4,5% poliacrilamida en condiciones denaturantes, con una base al 15 % para favorecer la separación de las distintas isoformas de RyR, manteniendo las proteínas de bajo peso molecular en el taco de 15%, entre estas  $\beta$ -actina que es la proteína con la cual se normalizan estos experimentos. Para la electroforesis se utilizó un sistema de tampón Tris-acetato (Novex NuPAGE®, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA), y una cámara Miniprotean III (BioRad). A continuación se transfirieron las proteínas electroforéticamente a membranas de PVDF (Polyvinylidene difluoride) de 0,2  $\mu$ m (BioRad) utilizando un sistema de transferencia húmeda 0,35 A por 180 min).

Posteriormente, se incubaron las membranas de PVDF durante 2 horas a temperatura ambiente con tampón de bloqueo preparado con leche descremada al 5% en TBS con Tween 20 al 0,2 % v/v (TBS-T) y se incubaron 12 h a 4°C con anticuerpo anti RyR2 (dilución 1:4000) en solución de bloqueo. Luego se lavaron 4 veces por 10 minutos con TBS-T 0,2 % y se incubaron con los anticuerpos anti IgG de ratón conjugado a peroxidasa (dilución 1:5000) en la misma solución de bloqueo. Al término de la incubación con el anticuerpo secundario, las membranas se lavaron 4 veces por 10 minutos con TBS-T 0,2 % y se detectó la isoforma RyR2 por quimioluminiscencia utilizando el equipo Chemidoc. Posteriormente, se trataron con una solución de “stripping” por 15 minutos, para remover el anticuerpo que reconoce a RyR2 y se bloquearon nuevamente durante 2 h con BSA al 5 % en TBS-T 0,2 %, para luego incubar con el anticuerpo anti RyR3 (1:4000) toda la noche en el mismo tampón de bloqueo. A continuación, se lavaron las membranas con TBS-T 0,2 % y se incubaron 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti IgG de ratón conjugado a peroxidasa (dilución 1:5000) en tampón de bloqueo. Luego de la incubación con el anticuerpo secundario, las membranas se lavaron 4 veces por 10 minutos con TBS-T 0,2 % y se detectó la isoforma RyR3 por quimioluminiscencia utilizando el equipo Chemidoc. El contenido de RyR2 y RyR3 se determinó por densitometría cuantificando las bandas con el software Imagemol. Los valores obtenidos se normalizaron utilizando los valores obtenidos de la cuantificación de la proteína  $\beta$ -actina que se utilizó como estándar por su expresión constitutiva. Para ello, luego de la incubación con los anticuerpos anti RyR, se trataron las membranas con solución de “stripping” y se bloquearon nuevamente por 2 horas con tampón de bloqueo, luego se incubaron con anticuerpo anti  $\beta$ -actina (dilución 1:20000) toda la noche a 4°C, se lavaron con TBS-T 0,2 % y enseguida se incubaron 2 horas a temperatura ambiente con anticuerpo anti IgG de ratón conjugado a peroxidasa. Finalmente, se lavaron las membranas y se detectó la abundancia de  $\beta$ -actina, por quimioluminiscencia. En todos los casos, la reacción de quimioluminiscencia se realizó

utilizando el kit ECL de Amersham Pharmacia Biotech. Las intensidades de las bandas resultantes se cuantificaron utilizando el software Image Lab.4.1.

## RESULTADOS

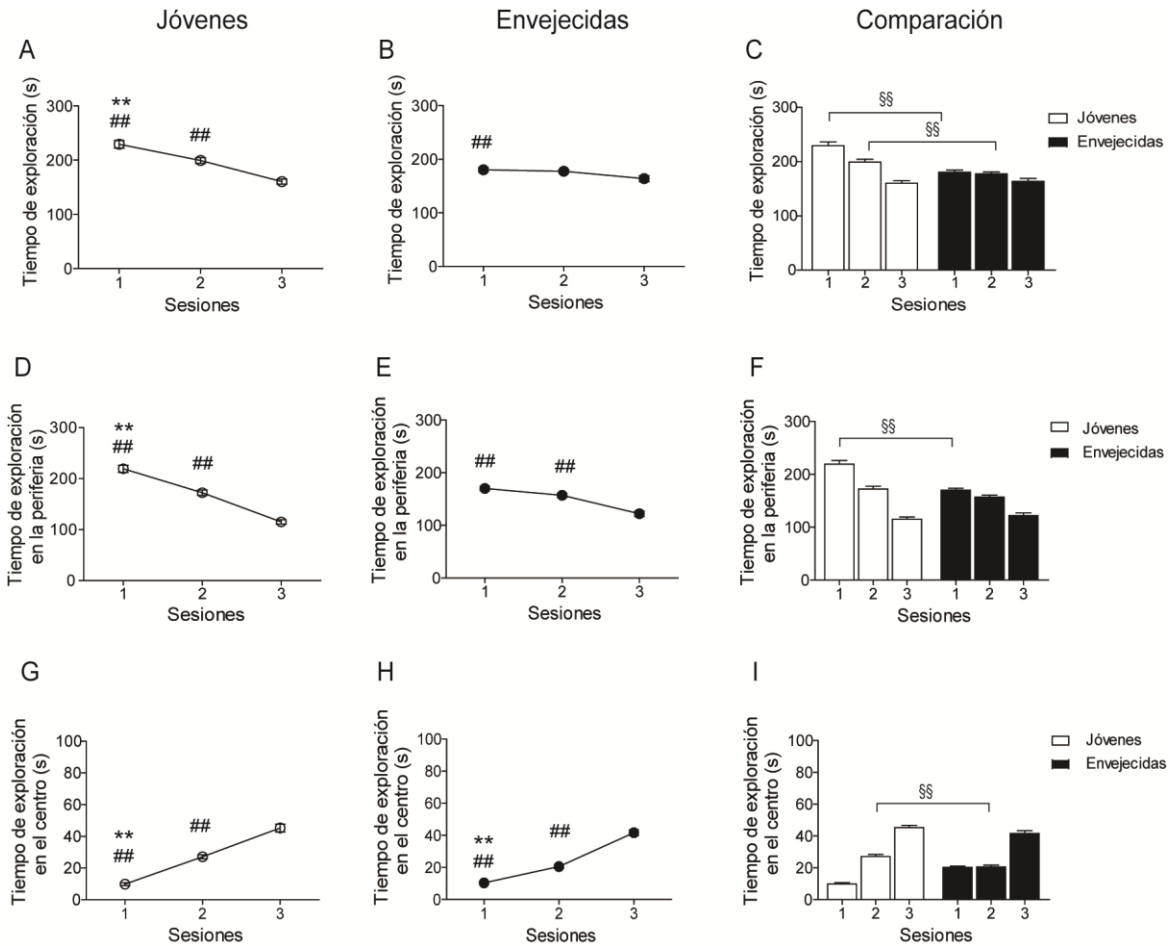
### **Ratas jóvenes y envejecidas fueron habituadas al aparato conductual**

Para establecer que las ratas se habituaron al aparato conductual, evaluamos parámetros exploratorios y locomotores en la prueba de campo abierto (CA) para ambos grupos experimentales. En ratas jóvenes encontramos una reducción significativa del tiempo de exploración a medida que aumentó el número de sesiones, encontrándose diferencias significativas entre la primera y segunda sesión, primera y tercera sesión y segunda respecto a la tercera sesión (Figura 5A,  $p < 0,0001$ ; ANOVA de una vía [ $F_{2,201}=36.10$ ] seguido de Tukey post hoc test,  $p < 0,05$ ). Los valores encontrados para la primera sesión fueron (en segundos):  $229 \pm 7$ , segunda sesión:  $199 \pm 5.2$  y para la tercera sesión:  $160 \pm 4,7$ . Mientras que en ratas envejecidas, encontramos diferencias significativas solo entre la primera y tercera sesión (Figura 5B,  $p = 0.016$ , ANOVA de una vía [ $F_{2,86}=4.28$ ] seguido de Tukey post hoc test,  $p < 0,05$ ). Los valores encontrados para la primera sesión fueron (en segundos):  $180 \pm 7$ , segunda sesión:  $177 \pm 3.5$  y tercera sesión  $163 \pm 5.2$ . Cuando comparamos ambos grupos, encontramos diferencias significativas en la primera y segunda sesión (Fig.5C,  $p < 0,05$ , ANOVA de dos vías seguido de Bonferroni post hoc test,  $p < 0,05$ ).

Posterior al análisis del tiempo de exploración, evaluamos como se distribuía este en ambos grupos etarios tanto en el centro como en la periferia del aparato conductual. En ratas jóvenes encontramos una reducción del tiempo que permanecen en la periferia a medida que transcurre el número de sesiones, encontrándose diferencias entre la primera con la segunda y la tercera sesión; y entre la segunda y la tercera sesión (Figura 5D,  $p < 0,0001$ ; ANOVA de una vía [ $F_{2,201}=86.42$ ] seguido de Tukey post hoc test,  $p < 0,05$ ). Los tiempos encontrados (en segundos) para la primera sesión fueron:  $219 \pm 7$ ; segunda sesión:  $172 \pm 5,2$  y tercera sesión:  $115 \pm 4,2$ . En ratas envejecidas, también encontramos diferencias

significativas entre la primera y la tercera sesión y entre la segunda y tercera sesión (Figura 5E,  $p < 0,0001$ ; ANOVA de una vía [ $F_{2,86}=34.93$ ] seguido de Tukey post hoc test,  $p < 0,05$ ). Los valores encontrados fueron (en s) para la primera sesión:  $170 \pm 4$ , segunda sesión:  $157 \pm 3.8$  y tercera sesión:  $122 \pm 5$ . Al comparar ambos grupos, encontramos diferencias significativas solo en la primera sesión (Figura 5F,  $p < 0,0001$ ; ANOVA de una vía seguido de Bonferroni post hoc test,  $p < 0,05$ ).

Cuando comparamos el tiempo de exploración en el centro, encontramos que las ratas jóvenes incrementan el tiempo de exploración en el centro a medida que aumenta el número de sesiones, encontrándose diferencias en todas las sesiones analizadas. Los tiempos encontrados (en segundos) para la primera sesión fueron:  $9 \pm 0,9$ , segunda sesión:  $27 \pm 1,2$  y tercera sesión:  $45 \pm 1.4$  (Figura 5G,  $p < 0.0001$ ; ANOVA de una vía [ $F_{2,102}=114.8$ ] seguido de Tukey post hoc test,  $p < 0.05$ ). En ratas envejecidas encontramos resultados similares; los valores para cada sesión son (en segundos) para la primera sesión:  $10 \pm 0,7$ , segunda sesión:  $20 \pm 1,1$  y tercera sesión:  $41 \pm 1,7$  (Figura 5H,  $p < 0.0001$ , ANOVA de una vía [ $F_{2,86}=162.4$ ] seguido de Tukey post hoc test,  $p < 0.05$ ). Finalmente, cuando comparamos ratas jóvenes contra envejecidas encontramos diferencias solo en la segunda sesión (Figura 5I,  $p < 0,0001$ ; ANOVA de una vía seguido de Bonferroni post hoc test,  $p < 0,05$ ).



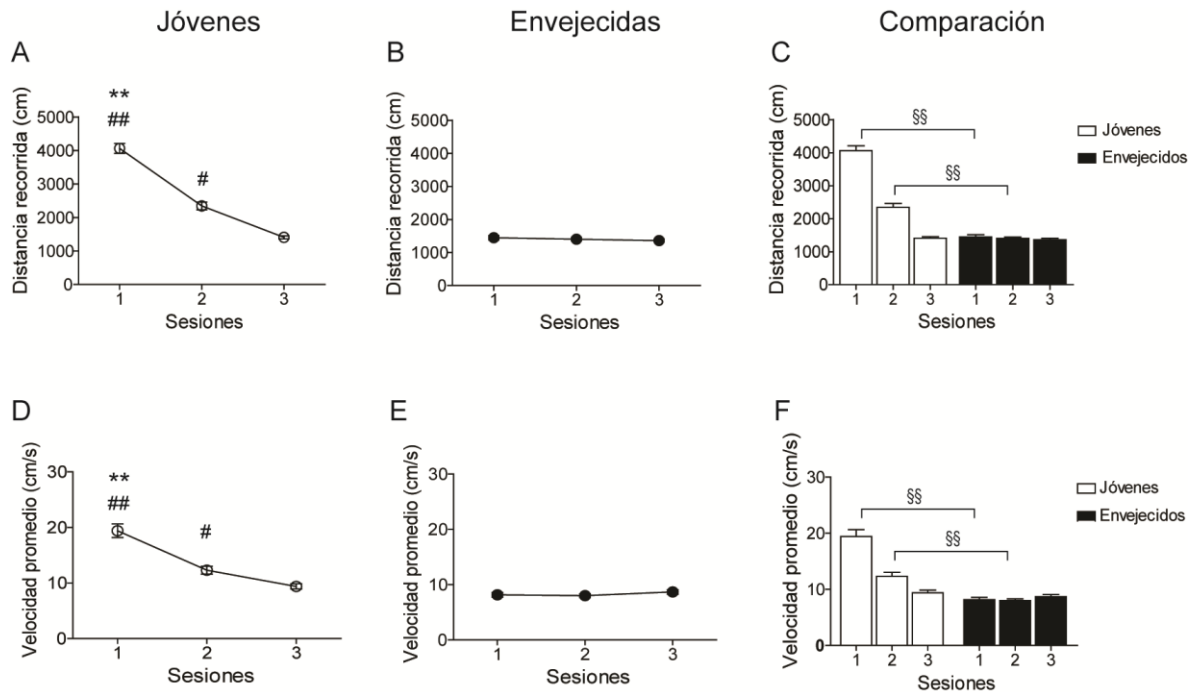
**Figura 5: Ratas jóvenes y envejecidas disminuyen el tiempo de exploración**

**A.** Disminución en el tiempo de exploración de ratas jóvenes. **B.** Ratas envejecidas solo presentan diferencias en la primera respecto a la tercera sesión. **C.** Se encontraron diferencias entre ambos grupos en la primera y segunda sesión. **D.** Ratas jóvenes disminuyen el tiempo de exploración en la periferia. **E.** Ratas envejecidas también disminuyen el tiempo de exploración en la periferia. **F.** Se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos solo en la primera sesión. **G.** Ratas jóvenes incrementan su tiempo de exploración en el centro. **H.** Ratas envejecidas al igual que jóvenes incrementan su tiempo de exploración en el centro. **I.** Se encontraron diferencias entre ambos grupos solo en la segunda sesión. Los valores se muestran como el promedio  $\pm$  error estándar con  $n=52$  para jóvenes y  $n=44$  para envejecidas. El análisis por grupo realizado fue ANOVA de una vía seguido de Tukey post hoc test y para comparar ambos grupos ANOVA de dos vías seguido de Bonferroni post hoc test. \*\*  $p < 0,001$ , significativo respecto a segunda sesión, ##  $p < 0,001$ , significativo respecto a la tercera sesión y §§  $p < 0,001$ , significativo entre grupos.

Por otra parte, para establecer un posible efecto locomotor sobre la tarea conductual a realizar, evaluamos la distancia recorrida y la velocidad promedio en ambos grupos etarios. Los datos obtenidos nos dan cuenta que las ratas jóvenes disminuyen la distancia recorrida a medida que aumenta el número de sesiones encontrando diferencias entre la primera con la segunda y tercera sesión; y entre la segunda con la tercera sesión (Figura 6A,  $p < 0,0001$ ; ANOVA de una vía [ $F_{2,201}=142.2$ ] seguido de Tukey post hoc test,  $p < 0,05$ ). Los valores encontrados son (en centímetros) para la primera sesión:  $4060 \pm 150$ , segunda sesión:  $2343 \pm 117$  y tercera sesión:  $1405 \pm 45.3$ . Para ratas envejecidas, no se encontraron diferencias entre sesiones (Figura 6B,  $p = 0.44$ ; ANOVA de una vía [ $F_{2,86}=0.81$ ] seguido de Tukey post hoc test,  $p > 0,05$ ). Las distancias recorridas son (en centímetros) para la primera sesión:  $1447 \pm 66,8$ , segunda sesión:  $1404 \pm 50,4$  y tercera sesión:  $1362 \pm 48,7$ . Al comparar ambos grupos, encontramos diferencias significativas entre la primera y segunda sesión (Figura 6C,  $p < 0,0001$ ; ANOVA de una vía seguido de Bonferroni post hoc test,  $p < 0,05$ ).

Finalmente al evaluar la velocidad promedio, encontramos que ratas jóvenes disminuyen significativamente su velocidad promedio encontrando diferencias entre la primera con la segunda y tercera sesión; y entre la segunda con la tercera sesión (Figura 6D,  $p < 0,0001$ ; ANOVA de una vía [ $F_{2,201}=35.65$ ] seguido de Tukey post hoc test,  $p < 0,05$ ). Los resultados encontrados fueron (en cm/s): para la primera sesión:  $19,4 \pm 1,2$ ; segunda sesión:  $12,3 \pm 0,7$  y tercera sesión:  $9,3 \pm 0,4$ . Para ratas envejecidas, encontramos que no existen cambios en su velocidad promedio entre sesiones (Figura 6E,  $p = 0,34$ ; ANOVA de una vía [ $F_{2,86}=1.08$ ] seguido de Tukey post hoc test,  $p > 0,05$ ). Cuando comparamos ambos grupos, encontramos diferencias entre la primera y segunda sesión (Figura 6F,  $p < 0,0001$ ; ANOVA de una vía seguido de Bonferroni post hoc test,  $p < 0,05$ ).

Los resultados encontrados nos sugieren que tanto los animales jóvenes como los envejecidos se habituaron exitosamente al aparato conductual y que no presentaron problemas locomotores que pudiesen afectar el posterior desarrollo de la tarea conductual.



**Figura 6: Ratas jóvenes y envejecidas presentan similar actividad locomotora al término de la tercera sesión**

**A.** Ratas jóvenes disminuyen significativamente la distancia recorrida. **B.** Ratas envejecidas mantienen similares distancias recorridas para cada sesión. **C.** Al comparar ambos grupos, se encontraron diferencias en la primera y segunda sesión. **D.** Disminución de la velocidad promedio en ratas jóvenes. **E.** Ratas envejecidas presentan similares velocidades de exploración. **F.** Se encontraron diferencias en la primera y segunda sesión entre ambos grupos. Los valores se muestran como el promedio  $\pm$  error estándar con  $n=52$  para jóvenes y  $n=44$  para envejecidas. El análisis por grupo realizado fue ANOVA de una vía seguido de Tukey post hoc test y para comparar ambos grupos ANOVA de dos vías seguido de Bonferroni post hoc test. \*\*  $p<0,001$ , significativo respecto a segunda sesión, ##  $p<0,001$ , significativo respecto a la tercera sesión y §§  $p<0,001$ , significativo entre grupos.

## **Dos fases de muestra no son suficientes para un reconocimiento espacial, pero sí de objeto en ratas jóvenes**

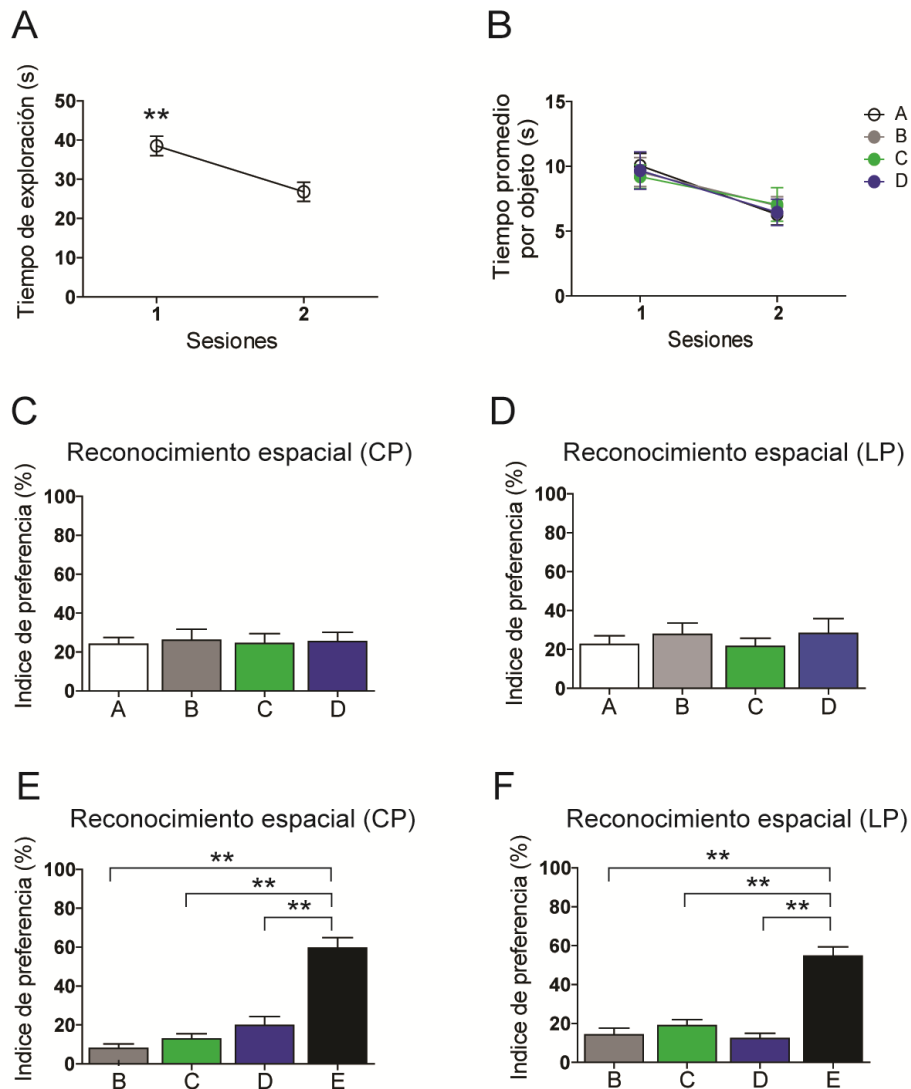
Una vez habituados los animales al aparato conductual, evaluamos el reconocimiento espacial y de objeto a corto y a largo plazo; utilizamos dos fases de muestra debido a que resultados previos obtenidos por Muñoz, Aspé y cols (2010) dan cuenta que una fase de muestra no es suficiente para el reconocimiento de objeto evaluado a 1 minuto, 3 y 24 horas posterior a esta fase de adquisición.

Como se muestra en la figura 7A, el tiempo promedio de exploración por sesión disminuyó significativamente entre la primera y segunda sesión. Los tiempos de exploración promedios fueron (en segundos): primera fase=  $38,5 \pm 2,5$  y segunda fase=  $26,8 \pm 2,4$  ( $p=0,020$ ; T-test). Por otra parte, al evaluar los tiempos promedios de exploración por objeto, encontramos que no existen diferencias significativas entre los valores encontrados en la primera fase (Figura 7B,  $p=0,95$ ; ANOVA de una vía [ $F_{3,45}=0.10$ ] seguido de Tukey post hoc test,  $p>0,05$ ) y segunda fase ( $p=0,90$ ; ANOVA de una vía [ $F_{3,45}=0.17$ ] seguido de Tukey post hoc test,  $p>0,05$ ). Los tiempos promedios de exploración por objetos para la primera fase de muestra son (en s): A=  $10 \pm 0,9$ ; B=  $9,5 \pm 1,1$ ; C=  $9,2 \pm 0,9$ ; D=  $9,6 \pm 1,4$  y para la segunda fase de muestra son (en s): A=  $6,2 \pm 0,8$ ; B=  $6,9 \pm 0,6$ ; C=  $7 \pm 1,2$ ; D=  $6,4 \pm 1$ .

Una vez establecido que ratas jóvenes no presentan preferencia por objeto, evaluamos el reconocimiento espacial y de objeto a corto y a largo plazo. Para el reconocimiento espacial, encontramos que no existe una discriminación por los objetos modificados de posición (B y C) a corto (Figura 7C) y a largo plazo (Figura 7D). Los valores encontrados para CP son los siguientes (en %): A=  $24 \pm 3,3$ ; B=  $26,1 \pm 5,5$ ; C=  $24,4 \pm 4,9$  y D=  $25,3 \pm 4,7$  ( $p=0,99$ ; ANOVA de una vía [ $F_{3,21}=0.028$ ] seguido de Tukey post hoc test,  $p>0,05$ ). Para largo plazo, los valores encontrados son (en %): A=  $22,5 \pm 4,5$ ; B=  $27,6 \pm 5,8$ ; C=  $21,5 \pm 4,1$  y D=  $28,2 \pm 7,6$  ( $p=0,84$ ; ANOVA de una vía [ $F=3,21=0.26$ ] seguido de Tukey post hoc test,  $p>0,05$ ).

Para el reconocimiento de objeto, encontramos que las ratas jóvenes discriminan el objeto nuevo (A por E) tanto a los cinco minutos (Figura 7E) como a las 24 horas (Figura 7F). Los índices de preferencia para CP (en %) son: para el objeto B=  $7,9 \pm 2,3$ ; C=  $12 \pm 7$ ; D=  $19,7 \pm 4,6$  y E=  $59,5 \pm 5,3$  ( $p < 0.0001$ , ANOVA de una vía [ $F_{3,21} = 26.19$ ] seguido de Tukey post hoc test,  $p < 0,05$ ) y para largo plazo (en %): B=  $14,1 \pm 3,5$ ; C=  $18,9 \pm 2,9$ ; D=  $12,2 \pm 2,6$  y E=  $54,6 \pm 4,6$  ( $p < 0.0001$ , ANOVA de una vía [ $F_{3,21} = 23.80$ ] seguido de Tukey post hoc test,  $p < 0,05$ ).

Los resultados encontrados para dos fases de muestra nos sugieren que las ratas jóvenes: a) se familiarizan con los objetos disminuyendo su tiempo de exploración, b) que no presentan preferencia por alguno de los objetos debido a que exploran tiempos similares, c) que dos fases de muestras no son suficientes para una discriminación espacial de los objetos modificados de posición, pero si para discriminar un objeto nuevo.



**Figura 7: Dos fases de muestra no son suficientes para el reconocimiento espacial pero si de objeto nuevo en ratas jóvenes**

**A.** Disminución en el tiempo de exploración en ratas jóvenes (T-test,  $p=$ ). **B.** No existe preferencia por objeto en la primera y segunda fase de muestra. **C.** Ratas jóvenes no discriminan el cambio espacial a corto plazo. **D.** No se encontraron diferencias significativas en reconocimiento espacial a largo plazo. **E.** Ratas jóvenes discriminan el objeto nuevo a corto plazo. **F.** Se encontraron diferencias significativas en el reconocimiento de objeto nuevo a largo plazo. CP: Corto plazo y LP: Largo plazo. Los valores se muestran como el promedio  $\pm$  error estándar con  $n=16$ . El análisis realizado fue ANOVA de una vía seguido de Tukey post hoc test. \*\*  $p < 0,001$ .

**Ambos grupos etarios disminuyen el tiempo de exploración tras tres fases de muestra y no presentan preferencia por objeto.**

Una vez establecido que dos fases de muestra no son suficientes para una discriminación espacial efectiva y considerando que el protocolo conductual pretende establecer diferencias entre los procesos de discriminación espacial y de reconocimiento de objeto, se decidió aumentar de dos a tres el número de sesiones de la fase de muestra.

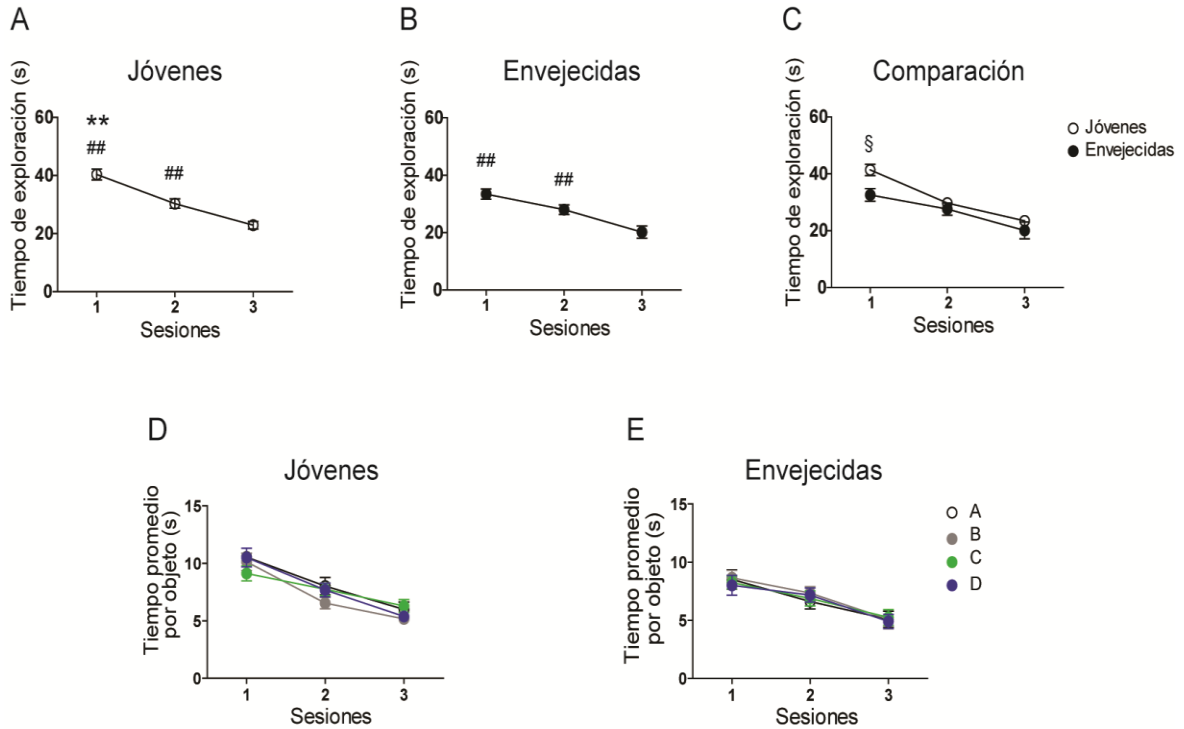
En ratas jóvenes, observamos que existen diferencias significativas en los tiempos promedios de exploración por sesión para la primera fase con respecto a la segunda y a la tercera fase y entre la segunda fase respecto a la tercera fase (Figura 8A,  $p < 0,0001$ ; ANOVA de una vía [ $F_{2,102}=29.94$ ] seguido de Tukey y post hoc test,  $p < 0,05$ ). Los tiempos de exploración fueron (en s): para la primera fase:  $41,3 \pm 2$ , segunda fase:  $29,2 \pm 1,7$  y tercera fase:  $23,4 \pm 1,3$ . Además, no encontramos diferencias significativas en la exploración por objeto en la primera fase (Figura 8D,  $p = 0,39$ ; ANOVA de una vía [ $F_{3,153}=1$ ] seguido de Tukey post hoc test,  $p > 0,05$ ), segunda fase (Figura 8D,  $p = 0,43$ ; ANOVA de una vía [ $F_{3,153}=0.92$ ] seguido de Tukey post hoc test,  $p > 0,05$ ) y tercera fase (Figura 8D  $p = 0,34$ ; ANOVA de una vía [ $F_{3,153}=1.10$ ] seguido de Tukey post hoc test,  $p > 0,05$ ). Los tiempos promedio para cada objeto fueron (en s) para la primera fase, A=  $10,7 \pm 0,3$ , B=  $10,44 \pm 0,8$ , C=  $9,4 \pm 0,6$  y D=  $10,6 \pm 0,8$ . Para la segunda sesión, A=  $7,88 \pm 0,7$ , B=  $6,7 \pm 0,5$ , C=  $7,6 \pm 0,5$  y D=  $7,5 \pm 0,6$  y para la tercera sesión, A=  $6,2 \pm 0,6$ , B=  $5,4 \pm 0,4$ , C=  $6,3 \pm 0,5$  y D=  $5,4 \pm 0,3$ , respectivamente.

En ratas envejecidas, encontramos que también existen diferencias significativas en los tiempos promedios de exploración por sesión para la primera fase con respecto a la tercera y entre la segunda y la tercera sesión (Figura 8B,  $p < 0,0001$ ; ANOVA de una vía [ $F_{2,86}=13,32$ ] seguido de Tukey post hoc test,  $p < 0,05$ ). Los tiempos de exploración fueron (en s): para la primera fase:  $41,3 \pm 2$ , segunda fase:  $29,2 \pm 1,7$  y tercera fase:  $23,4 \pm 1,3$ . Al igual que en ratas jóvenes, no encontramos diferencias significativas en la exploración por objeto en la primera fase (Figura 8E  $p = 0,90$ ; ANOVA de una vía [ $F_{3,129}=0,18$ ] seguido de Tukey post

hoc test,  $p > 0,05$ ), segunda fase (Figura 8E,  $p = 0,75$ ; ANOVA de una vía [ $F_{3,129} = 0,39$ ] seguido de Tukey post hoc test,  $p > 0,05$ ) y tercera fase (Figura 8E,  $p = 0,97$ ; ANOVA de una vía [ $F_{3,129} = 0,08$ ] seguido de Tukey post hoc test,  $p > 0,05$ ). Los tiempos promedio para cada objeto fueron (en s) para la primera fase,  $A = 8,5 \pm 0,8$ ,  $B = 8,6 \pm 0,6$ ,  $C = 8,2 \pm 0,5$  y  $D = 8 \pm 0,8$ . Para la segunda sesión,  $A = 6,6 \pm 0,6$ ,  $B = 7,3 \pm 0,5$ ,  $C = 6,8 \pm 0,6$  y  $D = 7,1 \pm 0,6$  y para la tercera sesión,  $A = 5 \pm 0,6$ ,  $B = 5 \pm 0,8$ ,  $C = 5,2 \pm 0,6$  y  $D = 4,8 \pm 0,9$ .

Posteriormente, comparamos los tiempos promedios de exploración por sesión para ambos grupos, encontrando diferencias significativas solo en la primera sesión (Figura 8C,  $p < 0,0001$ ; ANOVA de una vía seguido de Bonferroni post hoc test,  $p < 0,05$ ).

Los resultados encontrados muestran que tanto ratas jóvenes como envejecidas no presentan preferencia por ninguno de los 4 objetos durante el desarrollo de cada fase de muestra. Asimismo, si bien existen diferencias significativas solo en la primera sesión, ambos grupos etarios se encuentran igualmente familiarizados con los 4 objetos presentados al término de esta fase experimental, de tal manera que ambos grupos se encuentran en igualdad de condiciones para enfrentar la tarea conductual a evaluar.



**Figura 8: Ambos grupos etarios disminuyen el tiempo de exploración y no presentan preferencia por objeto**

**A.** Ratas jóvenes disminuyen el tiempo de exploración de los objetos. **B.** Ratas envejecidas reducen el tiempo de exploración con el número de sesiones. **C.** Diferencias solo en la primera sesión entre ambos grupos etarios. **D.** Ratas jóvenes no presentan preferencia por objeto durante las tres sesiones. **E.** Ratas envejecidas al igual que jóvenes no presentan preferencia por objeto. Los valores se muestran como el promedio  $\pm$  error estándar con  $n=52$  para jóvenes y  $n=44$  para envejecidas. El análisis por grupo realizado fue ANOVA de una vía seguido de Tukey post hoc test y para comparar ambos grupos ANOVA de dos vías seguido de Bonferroni post hoc test. \*\*  $p<0,001$ , significativo respecto a segunda sesión, ##  $p<0,001$ , significativo respecto a la tercera sesión y §  $p<0,05$ , significativo entre grupos.

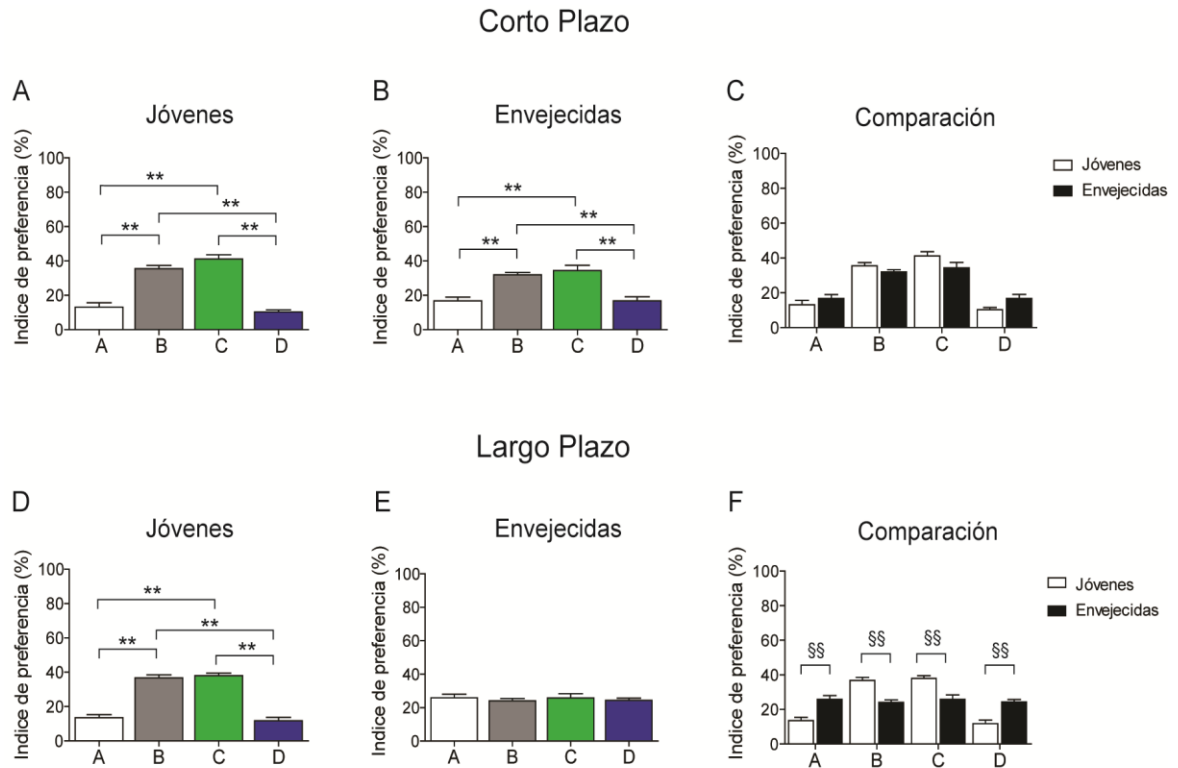
### **Ratas envejecidas presentan deterioro en el reconocimiento espacial a largo plazo**

Una vez establecido que ambos grupos etarios no presentan problemas exploratorios y locomotores ni preferencia por objeto, evaluamos el reconocimiento espacial a corto y largo plazo.

Como se muestra en la figura 9A, ratas jóvenes discriminan el cambio espacial tanto a corto plazo ( $p < 0,0001$ ; ANOVA de una vía [ $F_{3,21}=40,56$ ] seguido de Tukey post hoc test,  $p < 0,05$ ) como a largo plazo (Figura 9D,  $p < 0,0001$ ; ANOVA de una vía [ $F_{3,36}=46,24$ ] seguido de Tukey post hoc test,  $p < 0,05$ ). Los porcentajes de exploración para cada objeto a corto plazo son los siguientes (en %), para el objeto A=  $13,1 \pm 2,5$ , B=  $35,4 \pm 1,9$ , C=  $41,1 \pm 2,4$  y D=  $10,2 \pm 1,24$ ; mientras que los porcentajes de preferencia por objeto para largo plazo son (en %), para el objeto A=  $13,5 \pm 1,7$ , B=  $36,7 \pm 1,8$ , C=  $37,9 \pm 1,5$  y D=  $11,7 \pm 2$ ; respectivamente.

Cuando evaluamos el reconocimiento espacial en ratas envejecidas, encontramos que estas discriminan el cambio de configuración espacial a corto plazo (Figura 9B,  $p = 0,0001$ ; ANOVA de una vía [ $F_{3,18}=46,24$ ] seguido de Tukey post hoc test,  $p < 0,05$ ) pero no así a largo plazo (Figura 9E,  $p = 0,91$ ; ANOVA de una vía [ $F_{3,30}=0,16$ ] seguido de Tukey post hoc test,  $p > 0,05$ ). Los índices de preferencia para cada objeto a corto plazo son los siguientes (en %), para el objeto A=  $16,8 \pm 2,1$ ; B=  $31,9 \pm 1,3$ , C=  $34,4 \pm 3$  y D=  $16,8 \pm 2,3$ . Para largo plazo, los índices de preferencia por objeto son (en %) para A=  $25,8 \pm 2,2$ , B=  $24 \pm 1,5$ , C=  $25,7 \pm 2,6$  y D=  $24,3 \pm 1,3$ .

Finalmente, cuando comparamos ambos grupos no encontramos diferencias significativas a corto plazo (Figura 9C,  $p > 0,05$ ; ANOVA de dos vías seguido de Bonferroni post hoc test,  $p > 0,05$ ), pero si a largo plazo (Figura 9F,  $p < 0,0001$ ; ANOVA de dos vías seguido de Bonferroni post hoc test,  $p < 0,05$ ).



**Figura 9: Ratas envejecidas presentan déficit en el reconocimiento espacial a largo plazo**

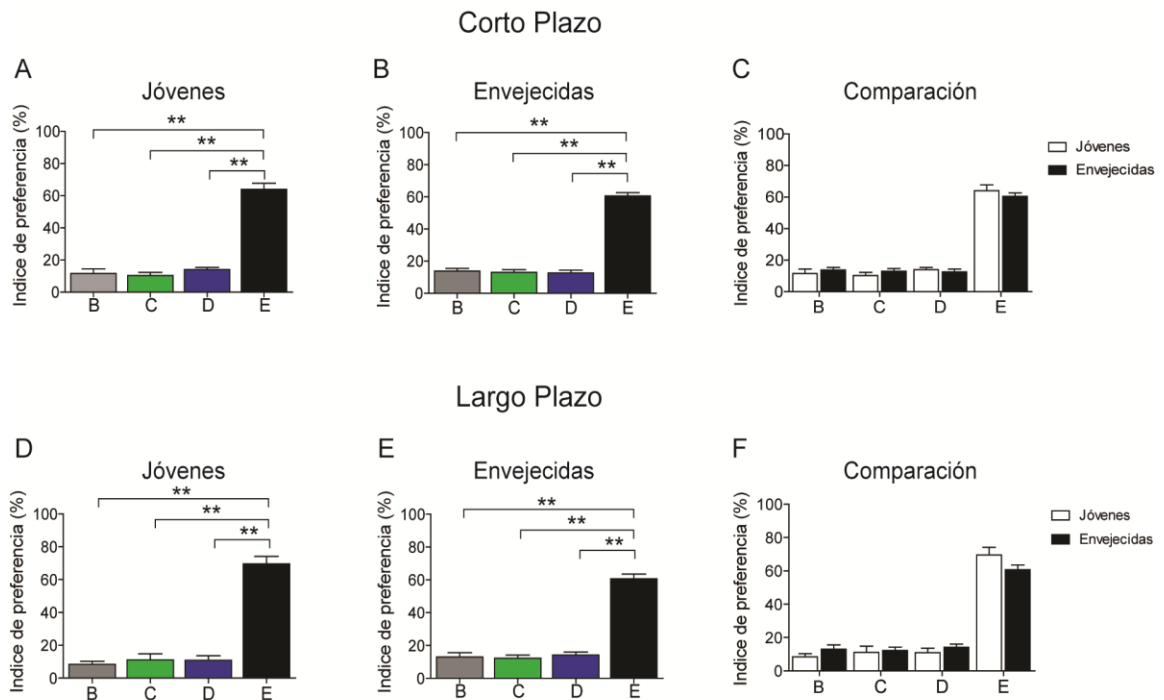
**A.** Ratas jóvenes reconocen el rearrreglo espacial a corto plazo. **B.** Ratas envejecidas discriminan el cambio espacial de los objetos a CP. **C.** Ambos grupos etarios discriminan el cambio espacial a CP. **D.** Ratas jóvenes reconocen el cambio espacial a LP. **E.** Ratas envejecidas no reconocen el cambio espacial a LP. **F.** Ratas jóvenes reconocen el rearrreglo espacial no así las ratas envejecidas. Los valores se muestran como el promedio  $\pm$  error estándar con  $n=8$  para jóvenes a corto plazo,  $n=7$  para envejecidas a corto plazo,  $n=14$  para jóvenes a largo plazo y  $n=11$  para envejecidas a largo plazo. El análisis por grupo realizado fue ANOVA de una vía seguido de Tukey post hoc test y para comparar ambos grupos ANOVA de dos vías seguido de Bonferroni post hoc test. \*\*  $p<0,001$  intragrupal y §§  $p<0,001$  intergrupala.

### **Ratas jóvenes y envejecidas reconocen el objeto nuevo a corto y largo plazo.**

Cinco minutos después de evaluar reconocimiento espacial a CP y LP, evaluamos el reconocimiento de objeto nuevo, según el protocolo reseñado en la figura 4A. A corto plazo, encontramos que ratas jóvenes discriminan el objeto nuevo con respecto a los objetos familiares (Figura 10A,  $p < 0,0001$ ; ANOVA de una vía [ $F_{3,21}=73,69$ ] seguido de Tukey post hoc test,  $p < 0,05$ ) y a largo plazo encontramos similares resultados (Figura 10D,  $p < 0,0001$ ; ANOVA de una vía [ $F_{3,36}=58,25$ ] seguido de Tukey post hoc test,  $p < 0,05$ ). Los porcentajes de exploración para cada objeto a corto plazo son los siguientes (en %), para el objeto B=  $11,6 \pm 2,8$ , C=  $10,2 \pm 1,1$ , D=  $14 \pm 1,3$  y E=  $64 \pm 3,7$ ; mientras que los porcentajes para largo plazo son (en %), para el objeto B=  $8,4 \pm 1,8$ , C=  $11,1 \pm 3,6$ , D=  $10,8 \pm 2,7$  y E=  $69,5 \pm 4,6$ .

En ratas envejecidas encontramos que estas reconocen el objeto nuevo tanto a corto plazo (Figura 10B,  $p < 0,0001$ ; ANOVA de una vía [ $F_{3,18}=129,5$ ] seguido de Tukey post hoc test,  $p < 0,05$ ) como a largo plazo (Figura 10E,  $p < 0,0001$ ; ANOVA de una vía [ $F_{3,30}=74,02$ ] seguido de Tukey post hoc test,  $p < 0,05$ ). Los índices de reconocimiento a corto plazo (en %) son: para el objeto B=  $13,8 \pm 1,6$ , C=  $13 \pm 1,16$ , D=  $12,6 \pm 1,7$  y E=  $60,5 \pm 2$ ; mientras que los porcentajes para largo plazo son (en %), para el objeto B=  $12,9 \pm 2,6$ , C=  $12,2 \pm 1,9$ , D=  $14,1 \pm 1,8$  y E=  $60,6 \pm 2,9$ .

Posteriormente, comparamos ambos grupos etarios no encontrándose diferencias significativas a corto plazo (Figura 10C,  $p > 0,05$ ; ANOVA de dos vías seguido de Bonferroni post hoc test,  $p > 0,05$ ) como a largo plazo (Figura 10F,  $p > 0,05$ ; ANOVA de dos vías seguido de Bonferroni post hoc test,  $p > 0,05$ ).

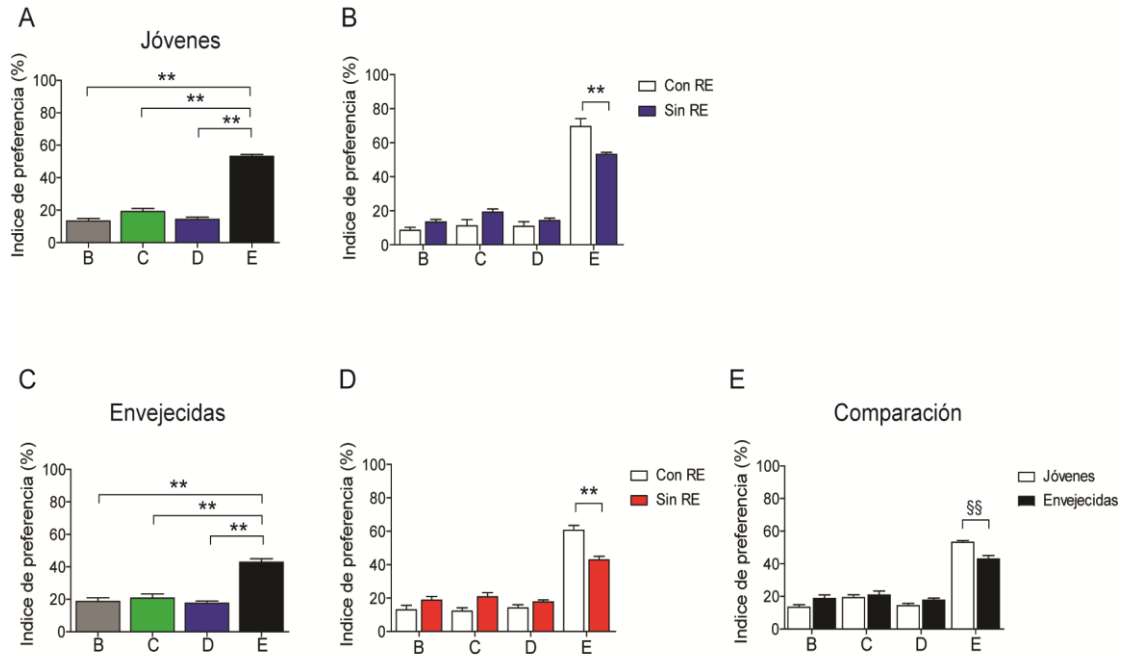


**Figura 10: Ambos grupos etarios reconocen el objeto nuevo a corto y largo plazo**

**A.** Ratas jóvenes reconocen el objeto nuevo a CP. **B.** Ratas envejecidas discriminan el objeto nuevo a CP. **C.** No se observan diferencias entre ambos grupos a corto plazo. **D.** Ratas jóvenes identifican el objeto nuevo a LP. **E.** Ratas envejecidas reconocen el objeto nuevo a LP. **F.** Ambos grupos etarios discriminan el objeto nuevo a LP. Los valores se muestran como el promedio  $\pm$  error estándar con  $n=8$  para jóvenes a corto plazo,  $n=7$  para envejecidas a corto plazo,  $n=14$  para jóvenes a largo plazo y  $n=11$  para envejecidas a largo plazo. El análisis por grupo realizado fue ANOVA de una vía seguido de Tukey post hoc test y para comparar ambos grupos ANOVA de dos vías seguido de Bonferroni post hoc test. \*\*  $p<0,001$  intragrupal.

**La tarea previa de reconocimiento espacial facilita el reconocimiento de objeto nuevo a largo plazo en ratas jóvenes y envejecidas.**

Si bien en el acápite anterior señalamos que ambos grupos etarios discriminan el objeto nuevo, no descartamos la posibilidad que el reconocimiento espacial previo pudiera afectar el reconocimiento de objeto nuevo tanto en ratas jóvenes como en envejecidas. Para evaluar esta posibilidad, medimos el reconocimiento de objeto a largo plazo, debido a que es en esta condición donde encontramos cambios en RE, sin realizar previamente el reconocimiento espacial, manteniendo la configuración de la fase de muestra (Figura 4B). De acuerdo a los resultados encontrados, podemos señalar que ratas jóvenes discriminan el objeto nuevo (Figura 11A,  $p < 0,0001$ ; ANOVA de una vía [ $F_{3,21}=123,7$ ] seguido de Tukey post hoc test,  $p < 0,05$ ). Los índices de reconocimiento son (en %) para el objeto B= $13,4 \pm 1,4$ , C= $19,2 \pm 1,8$ , D= $14,2 \pm 1,3$  y E= $53,1 \pm 1,1$ . Sin embargo, sus índices de reconocimiento son menores a los encontrados cuando realizan previamente la tarea de RE (Figura 11B,  $p < 0,05$ ; ANOVA de dos vías seguido de Bonferroni post hoc test,  $p < 0,05$ ). En ratas envejecidas encontramos que reconocen el objeto nuevo (Figura 11C,  $p < 0,0001$ ; ANOVA de una vía [ $F_{3,21}=0,77$ ] seguido de Tukey post hoc test,  $p < 0,05$ ), pero en menor medida si se compara a cuando realizan previamente la tarea de RE (Figura 11D,  $p < 0,05$ ; ANOVA de dos vías seguido de Bonferroni post hoc test,  $p < 0,05$ ). Los valores encontrados son (en %): para el objeto B= $18,6 \pm 2,3$ , C= $20,7 \pm 2,4$ , D= $17,6 \pm 1,3$  y E= $42,8 \pm 2,1$ . De manera interesante, al comparar ambos grupos etarios, encontramos diferencias significativas (Figura 11E,  $p < 0,05$ ; ANOVA de dos vías seguido de Bonferroni post hoc test,  $p < 0,05$ ), lo que nos sugiere por una parte, que el reconocimiento espacial facilita el reconocimiento de objeto nuevo a largo plazo tanto en ratas jóvenes como en envejecidas y por otra, que las ratas envejecidas presentan menor reconocimiento de objeto dando cuenta de un deterioro cognitivo, que posiblemente se aminora en parte por la tarea previa de RE.



**Figura 11: Reconocimiento espacial facilita el reconocimiento de objeto nuevo a largo plazo en ratas jóvenes y envejecidas.**

**A.** Ratas jóvenes discriminan el objeto nuevo a LP. **B.** Ratas jóvenes reconocen el objeto nuevo, pero en menor medida a cuando realizan R.E. **C.** Ratas envejecidas identifican el objeto nuevo a LP. **D.** El reconocimiento espacial previo facilita el reconocimiento del objeto nuevo a LP en ratas envejecidas. **E.** Ratas envejecidas presentan un menor índice de reconocimiento de objeto respecto a ratas envejecidas. Los valores se muestran como el promedio  $\pm$  error estándar con  $n=8$  para jóvenes y envejecidas. El análisis por grupo realizado fue ANOVA de una vía seguido de Tukey post hoc test y para comparar ambos grupos ANOVA de dos vías seguido de Bonferroni post hoc test. \*\*  $p < 0,001$  intragrupal y §§  $p < 0,001$  intergrupala.

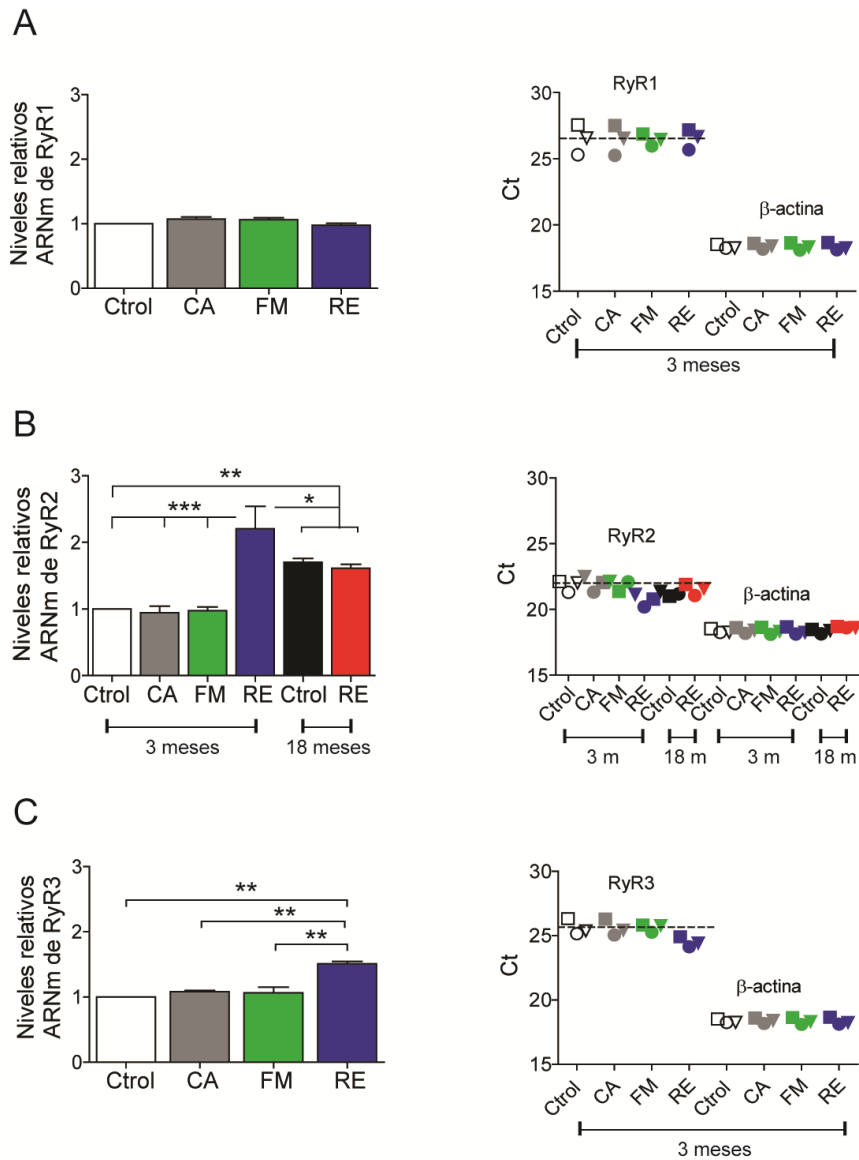
**El reconocimiento espacial a largo plazo incrementa los niveles de ARNm de RyR2/RyR3 pero no de RyR1 en la región CA1 de hipocampo en animales jóvenes; estos cambios no ocurren en animales envejecidos.**

Seis horas después de concluido el protocolo conductual, se evaluó a través de qRT-PCR la expresión de las tres isoformas de RyR en la región CA1 de hipocampo, y se comparó su expresión relativa respecto a los animales controles que no fueron sometidos a la tarea conductual. Asimismo, para confirmar que los posibles cambios en la expresión de los transcritos de RyR son inducidos solo por la tarea de reconocimiento espacial y no por la manipulación previa del animal, se evaluó también el contenido de ARNm de animales expuestos a campo abierto o fase de muestra.

Encontramos que no existen cambios en los niveles relativos de RyR1 en CA1 de hipocampo tras exponer ratas jóvenes a los distintos protocolos (Figura 12A,  $p=0,18$ ; ANOVA de una vía [ $F_{3,6}=2,19$ ] seguido de Tukey post hoc test,  $p>0,05$ ); los valores encontrados para RyR1 son: control= 1, campo abierto=  $1,07\pm 0,03$ ; fase de muestra=  $1,06\pm 0,02$  y reconocimiento espacial=  $0,97\pm 0,03$ . Respecto a la isoforma RyR2, encontramos diferencias significativas (Figura 12B,  $p=0,006$ ; ANOVA de una vía [ $F_{3,6}=11,82$ ] seguido de Tukey post hoc test,  $p<0,05$ ); los valores encontrados para el mensajero de RyR2 fueron: control= 1, CA=  $0,94\pm 0,09$ ; FM=  $0,97\pm 0,05$  y para RE=  $2,2\pm 0,33$ . Para la isoforma RyR3 también se encontraron diferencias significativas (Figura 12C,  $p=0,008$ ; ANOVA de una vía [ $F_{3,6}=26,03$ ] seguido de Tukey post hoc test,  $p<0,05$ ); en este caso los valores encontrados para el mensajero de RyR3 fueron: control= 1, CA=  $1,08\pm 0,02$ ; FM=  $1,06\pm 0,08$  y RE=  $1,50\pm 0,03$ .

Cuando evaluamos los niveles de expresión de RyR2 en ratas envejecidas, encontramos que no existen diferencias significativas entre la condición control y posterior al RE (Figura 12B); no obstante, al evaluar los niveles basales de ARNm de RyR2 en ratas envejecidas control con respecto a ratas jóvenes control, encontramos aumentos

significativos (Figura 12B). Asimismo, cuando comparamos ratas jóvenes posterior a RE respecto a ratas envejecidas posterior a RE no encontramos diferencias (Figura 12B,  $p=0,26$ ). Los incrementos relativos de ARNm de la isoforma RyR2 para ratas envejecidas en condición control y posterior a RE fueron:  $1,7\pm 0,05$  y  $1,61\pm 0,06$ , respectivamente. Los datos obtenidos nos sugieren que los cambios en la expresión de las isoformas RyR2/RyR3 están asociados a la formación de memoria espacial en ratas jóvenes pero no así en ratas envejecidas, las cuales en condición basal ya presentan niveles incrementados de la isoforma RyR2 la cual no incrementa posterior al reconocimiento espacial a largo plazo (24 h).



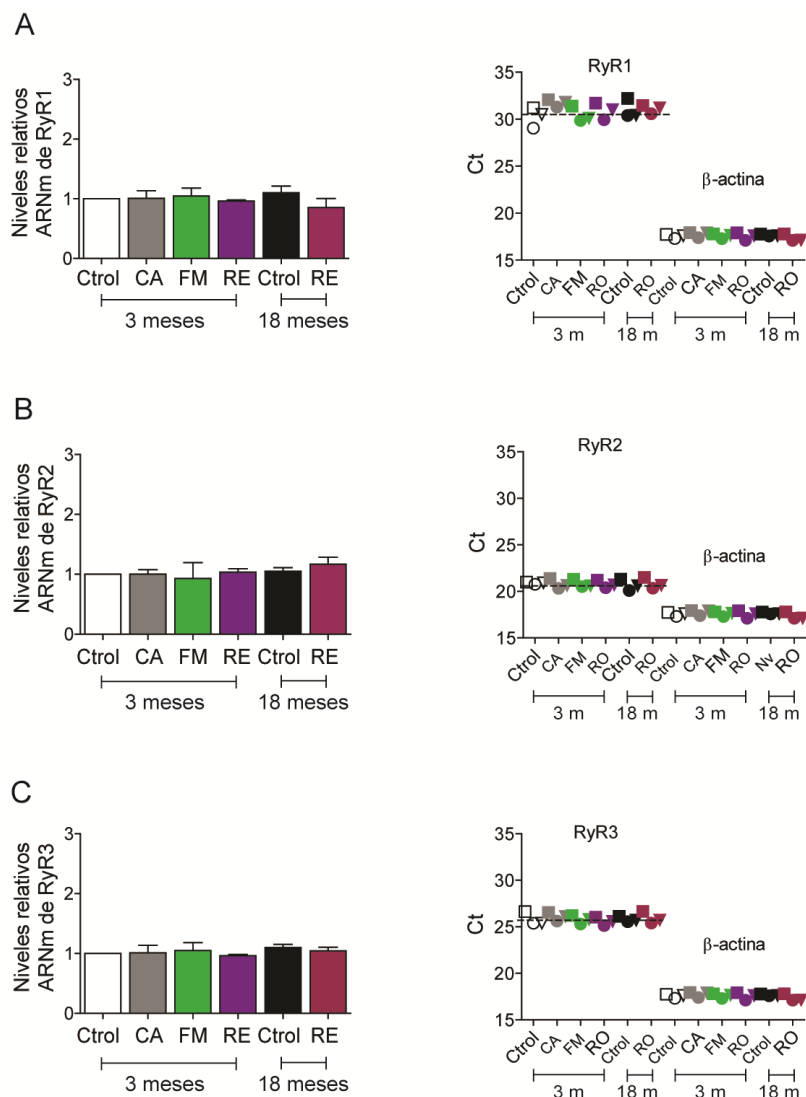
**Figura 12: Incremento de los niveles relativos de ARNm de RyR2/RyR3 en CA1 de hipocampo de ratas jóvenes, pero no en ratas envejecidas posterior a reconocimiento espacial.**

**A.** No se observan cambios en los niveles de expresión de RyR1 (A la derecha se muestra gráfico de cada ciclo de amplificación para cada condición experimental). **B.** Incremento de los niveles relativos de RyR2 posterior a la fase de reconocimiento espacial en ratas jóvenes, pero no en ratas envejecidas (A la derecha, gráfico en donde se muestra el ciclo de amplificación para cada condición experimental). **C.** Aumento significativo en los niveles relativos de RyR3 posterior a la fase de reconocimiento (A la derecha se muestra el gráfico para cada ciclo de amplificación por condición experimental). Ctról: control, CA: campo abierto, FM: fase de muestra y RE: reconocimiento espacial. Los Incrementos relativos están expresados como el promedio±S.E.M respecto a las veces de cambio relativo al control, con n=3 para cada condición experimental. \*p<0,05, \*\* p<0,001 y \*\*\*p<0,0001.

## **El reconocimiento de objeto a largo plazo no modifica los niveles de ARNm de RyR en corteza perirrinal de animales jóvenes y envejecidos.**

De la misma forma que en CA1, evaluamos los cambios relativos de las isoformas de RyR en corteza perirrinal de ambos grupos etarios. No encontramos diferencias significativas tras exponer ratas jóvenes al protocolo de reconocimiento de objeto a largo plazo (Figura 4B) en los niveles relativos de ARNm de las isoformas RyR1 (Figura 13A  $p=0,89$ ; ANOVA de una vía [ $F_{3,6}=0,19$ ] seguido de Tukey post hoc test,  $p>0,05$ ), RyR2 (Figura 13B,  $p=0,95$ ; ANOVA de una vía [ $F_{3,6}=0,09$ ] seguido de Tukey post hoc test,  $p>0,05$ ) y RyR3 (Figura 13C,  $p=0,99$ ; ANOVA de una vía [ $F_{3,6}=0,01$ ] seguido de Tukey post hoc test,  $p>0,05$ ). Los valores encontrados para cada isoforma son para RyR1: Control=1, CA=1±0,12, FM=1±0,13, RO=0,96±0,02. Para la isoforma RyR2 los valores encontrados son: Control=1, CA=1±0,07, FM=0,92±0,26 y RO: 1,03±0,05 y para RyR3 fueron: Control=1, CA= 1±0,12, FM=1,04±0,12 y RO=1±0,03. Con respecto a ratas envejecidas, tampoco se encontraron diferencias significativas entre ratas control y entrenadas para las isoformas RyR1 (Figura 13A,  $p= 0,43$ ), RyR2 (Figura 13B,  $p= 0,29$ ) y RyR3 (Figura 13C,  $p= 0,38$ ). Al comparar los niveles de expresión en condición control de ratas envejecidas respecto a jóvenes control, tampoco encontramos diferencias significativas para RyR1 (Figura 13A,  $p= 0,46$ ), RyR2 (Figura 13B,  $p= 0,49$ ) y RyR3 (Figura 13C,  $p= 0,18$ ). Los valores encontrados en ratas envejecidas para cada condición fueron para RyR1: control=1,05±0,06 y RO=1,17±0,11. Es importante enfatizar que la detección de los niveles de ARNm de esta isoforma en ratas jóvenes y envejecidas está en el límite de detección de la técnica de qRT-PCR. Para RyR2, control= 1,10±0,11 y RO=0,85±0,15; y para RyR3: control=1,08±0,05 y RO=1,04±0,06. Cabe destacar que tampoco se encontraron diferencias significativas entre animales jóvenes con respecto a animales envejecidos entrenados para las tres isoformas de RyR ( $p>0,05$ ). Los resultados obtenidos en CPr, nos indican que en esta área del cerebro

no cambian los niveles de ARNm del receptor de ryanodina durante la formación de memorias relacionadas con reconocimiento de objeto nuevo tanto en etapas juveniles como durante el envejecimiento, sugiriendo que RyR no participa en estos procesos.



**Figura 13: El reconocimiento de objeto no modifica los niveles relativos de ARNm de RyR1/RyR2/RyR3 en corteza perirrinal de ratas jóvenes y envejecidas.**

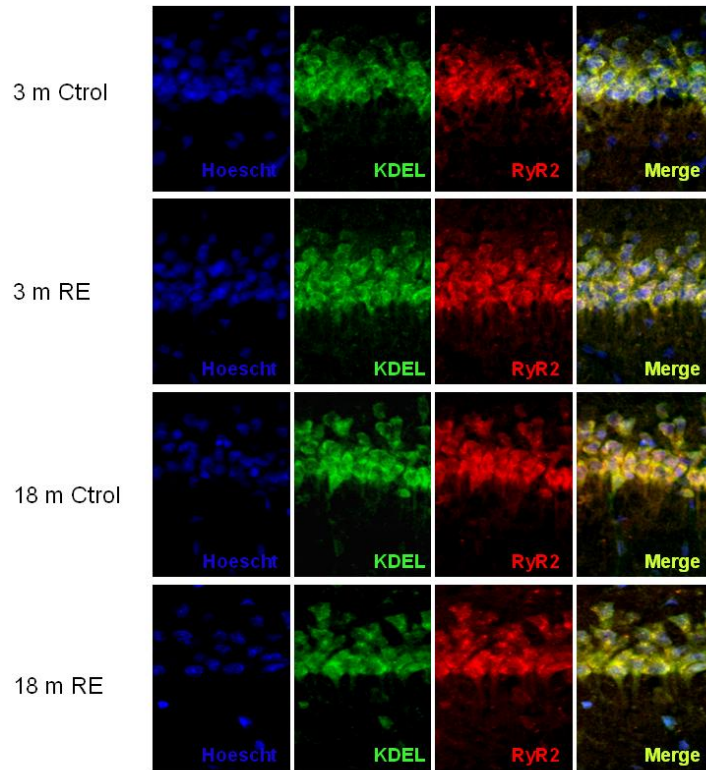
**A.** No se observan cambios en los niveles de expresión de RyR1 posterior a RO. Tampoco se encontraron diferencias entre ratas envejecidas control y entrenada posterior a RO respecto a envejecida control (A la derecha se muestra el ciclo de amplificación para cada condición experimental). **B.** Reconocimiento de objeto no modifica los niveles relativos de RyR2 en ratas jóvenes. Además, no se encontraron diferencias entre ratas envejecidas control y entrenada y entre ratas jóvenes controles respecto a envejecidas (A la derecha se muestra el ciclo de amplificación para cada condición experimental). **C.** No se observa incremento de ARNm de RyR3 posterior al reconocimiento de objeto en ratas jóvenes. Tampoco se encontraron diferencias entre ratas envejecidas control y entrenada y entre ratas jóvenes controles respecto a envejecidas control (A la derecha se muestra el ciclo de amplificación para cada condición experimental). Ctrl: control, CA: campo abierto, FM: fase de muestra y RO: reconocimiento de objeto. n=3 para cada condición experimental. Los incrementos relativos están expresados como el promedio  $\pm$  S.E.M respecto a las veces de cambio relativo al control.

## **Inmunodetección de la proteína RyR2 en hipocampo de ratas jóvenes y envejecidas naive.**

Como una primera aproximación para evaluar el contenido proteico de las isoformas RyR2/RyR3 en CA1 de hipocampo de ambos grupos etarios se realizaron determinaciones de inmunofluorescencia seis horas después de finalizado el protocolo conductual. Al respecto, encontramos que la isoforma RyR2 incrementa significativamente posterior al reconocimiento espacial en ratas jóvenes (Figura 14C;  $p=0,0092$  T-test). Al cuantificar la fluorescencia de RyR2, encontramos que ratas envejecidas presentan incrementos de esta isoforma tanto en condición control (Figura 14C;  $p=0.035$  T-test) como posterior al reconocimiento espacial (Figura 14C;  $p=0,021$ ) respecto a ratas jóvenes control. Cuando comparamos ratas jóvenes entrenadas no encontramos diferencias respecto a ratas envejecidas control ( $p=0,25$ ) o ratas envejecidas entrenadas ( $p=0,13$ ); y cuando comparamos ratas envejecidas control respecto a entrenadas tampoco encontramos diferencias significativas entre ellas ( $p=0,63$ ).

Para la isoforma RyR3 encontramos diferencias significativas entre ratas jóvenes control respecto a ratas jóvenes entrenadas (Figura 15C;  $p=0,04$ ), a ratas envejecidas control ( $p=0,01$ ) y ratas envejecidas entrenadas ( $p=0,04$ ). Sin embargo, no encontramos diferencias significativas entre ratas jóvenes entrenadas respecto a envejecidas control ( $p=0.047$ ) o envejecidas entrenadas ( $p=0,04$ ) ni tampoco entre ratas envejecidas control respecto a envejecidas entrenadas ( $p=0,54$ ).

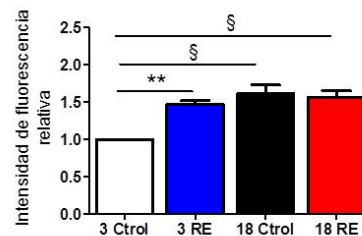
A



B

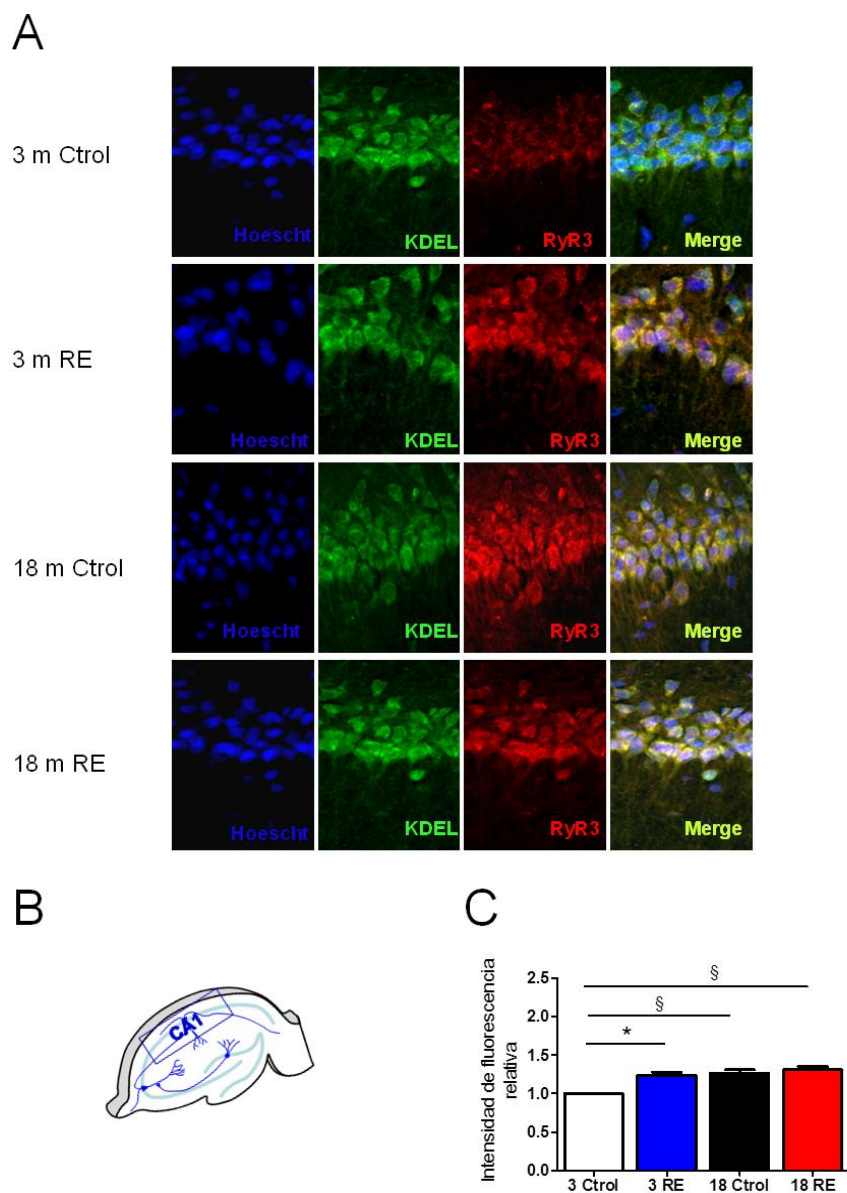


C



**Figura 14: Inmunodetección para la proteína RyR2 en CA1 de hipocampo.**

**A.** Imagen confocal representativa de inmuno fluorescencia para RyR2 (rojo); se identificó además el RE con KDEL (verde) y los núcleos con Hoescht (azul). **B.** Esquema de una rebanada de hipocampo en donde se señala la región CA1 (rectángulo azul), zona de donde se obtuvo la imagen confocal. **C.** Reconocimiento espacial y envejecimiento incrementan el contenido proteico de RyR2 en CA1 de hipocampo. Ctrol: Control, RE: Reconocimiento espacial. Los Incrementos relativos están expresados como el promedio $\pm$ S.E.M respecto a las veces de cambio relativo al control, con n=3 para cada condición experimental. El análisis por grupo realizado fue ANOVA de una vía seguido de Tukey post hoc test y para comparar ambos grupos ANOVA de dos vías seguido de Bonferroni post hoc test. \*\* p<0,001 intragrupal y § p<0,01intergrupala.



**Figura 15: Inmunodetección para la proteína RyR3 en CA1 de hipocampo.**

**A.** Imagen confocal representativa de inmuno fluorescencia para RyR3 (rojo); se identificó además el RE con KDEL (verde) y los núcleos con Hoescht (azul). **B.** Esquema de una rebanada de hipocampo en donde se señala la región CA1 (rectángulo azul), zona de donde se obtuvo la imagen confocal. **C.** Reconocimiento espacial y envejecimiento incrementan el contenido proteico de RyR2 en CA1 de hipocampo. Ctrl: Control, RE: Reconocimiento espacial. Los Incrementos relativos están expresados como el promedio $\pm$ S.E.M respecto a las veces de cambio relativo al control, con n=3 para cada condición experimental. El análisis por grupo realizado fue ANOVA de una vía seguido de Tukey post hoc test y para comparar ambos grupos ANOVA de dos vías seguido de Bonferroni post hoc test. \*\* p<0,001 intragrupal y § p<0,01 intergrupala.

**El reconocimiento espacial pero no de objeto incrementa el contenido proteico de RyR2/RyR3 en CA1 de hipocampo de ratas jóvenes, pero no en ratas envejecidas.**

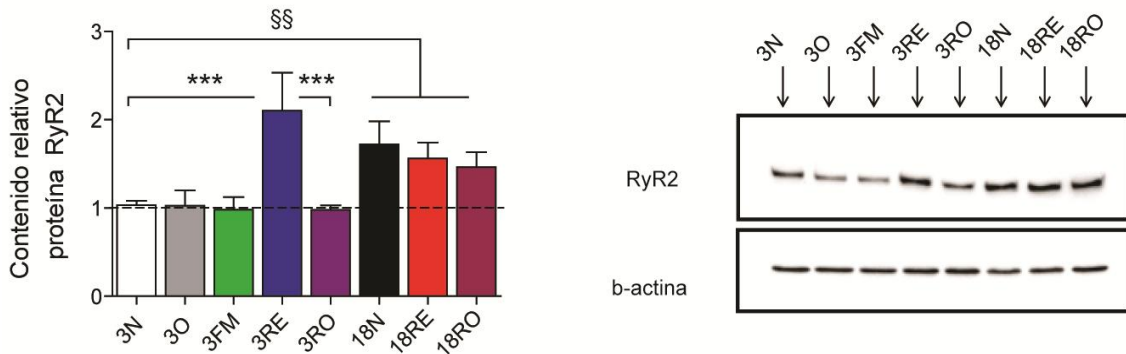
Puesto que la técnica de inmunofluorescencia permite observar localización y es una técnica semicuantitativa, como segunda aproximación evaluamos mediante western blot el contenido proteico de RyR2/RyR3 en CA1 de hipocampo seis horas después de finalizado el protocolo conductual. Los resultados obtenidos para cada condición fueron normalizados respecto a  $\beta$ -actina y se expresaron los valores respecto a los obtenidos en ratas jóvenes control. En ratas jóvenes encontramos que el RE, pero no el RO, produce aumentos significativos para la isoforma RyR2 (Figura 16A,  $p=0,0021$ ; ANOVA de una vía [ $F_{4,24}=5,76$ ] seguido de Tukey post hoc test,  $p<0,05$ ); los valores obtenidos para cada condición son: control=  $1,03\pm 0,04$ , campo abierto=  $1,02\pm 0,17$ , fase de muestra=  $0,98\pm 0,14$ , reconocimiento espacial=  $2,10\pm 0,43$  y reconocimiento de objeto=  $0,97\pm 0,05$ . En ratas envejecidas no encontramos diferencias significativas entre aquellas expuestas a la tarea de reconocimiento y los controles (Figura 16A,  $p=0,27$ ; ANOVA de una vía [ $F_{2,12}=1,45$ ] seguido de Tukey post hoc test,  $p>0,05$ ). Los valores encontrados fueron: control=  $1,72\pm 0,26$ ; RE=  $1,56\pm 0,18$  y RO=  $1,46\pm 0,17$ . Sin embargo, encontramos aumentos significativos de RyR2 en ratas envejecidas control respecto a ratas jóvenes control (Figura 16A,  $p=0,047$ ) y entre ratas envejecidas con RE y RO respecto a ratas jóvenes control (Figura 16A,  $p=0,029$  y  $p=0,029$ ). No obstante, no encontramos diferencias significativas entre ratas envejecidas entrenadas respecto a jóvenes entrenadas (Figura 16A,  $p>0,05$ ).

Para la isoforma RyR3 encontramos resultados similares. Para ratas jóvenes encontramos diferencias significativas tras RE pero no tras RO (Figura 16B,  $p=0,001$ ; ANOVA de una vía [ $F_{4,20}=10,21$ ] seguido de Tukey post hoc test,  $p<0,05$ ); los valores obtenidos para cada condición son: control=  $1\pm 0,05$ , campo abierto=  $0,98\pm 0,12$ , fase de muestra=  $0,99\pm 0,06$ , reconocimiento espacial=  $1,62\pm 0,04$  y reconocimiento de

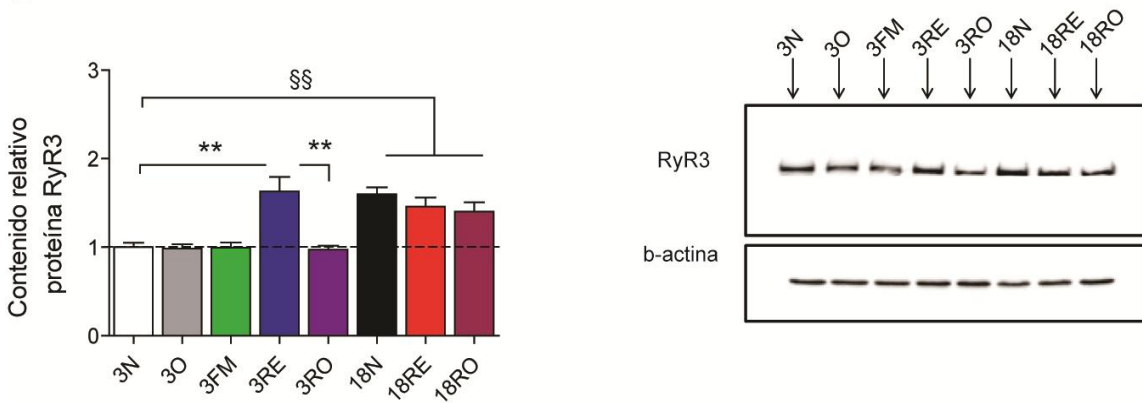
objeto=0,97±0,04. En ratas envejecidas al igual que para RyR2 no encontramos diferencias significativas entre aquellas expuestas a la tarea de reconocimiento y las ratas envejecidas control (Figura 16B, p=0,08; ANOVA de una vía [ $F_{2,10}=3,19$ ] seguido de Tukey post hoc test, p>0,05). Los valores encontrados fueron: control=1,59±0,07; RE=1,45±0,07 y RO=1,40±0,13. Igualmente, encontramos aumentos significativos de RyR3 en ratas envejecidas control respecto a ratas jóvenes control (Figura 16B, p<0,001) y entre ratas envejecidas con RE y RO respecto a ratas jóvenes control (Figura 16B, p= 0,001 y p=0,009). No obstante, no encontramos diferencias significativas entre ratas envejecidas entrenadas respecto a jóvenes entrenadas (Figura 16B, p>0,05).

Los resultados encontrados muestran que el RE pero no de objeto incrementan los niveles relativos de la proteína de las isoformas RyR2/RyR3 sugiriendo que estos incrementos podrían contribuir a cambios más permanentes que favorezcan el almacenamiento de la memoria espacial a largo plazo. Asimismo, estos resultados sugieren que los incrementos basales de RyR2/RyR3 en ratas envejecidas control que no aumentan tras RE podrían contribuir a una señalización anormal de calcio y con ello al deterioro cognitivo observado.

A



B



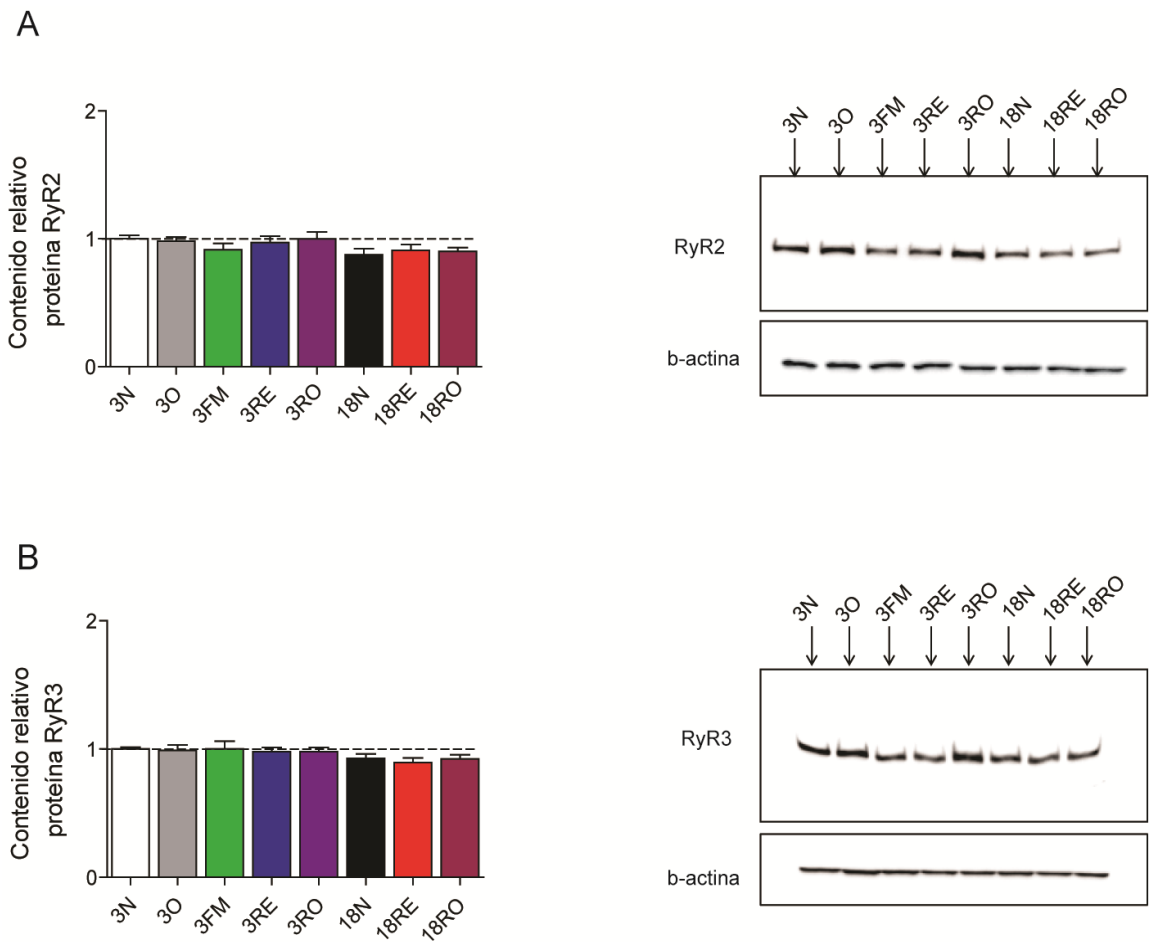
**Figura 16: Reconocimiento espacial incrementa los niveles proteicos de RyR2/RyR3 en CA1 de hipocampo de ratas jóvenes pero no en ratas envejecidas.**

**A.** En ratas jóvenes incrementan los niveles relativos de RyR2 en CA1 posterior al RE, sin embargo, ratas envejecidas esto no ocurre. Asimismo, se encontraron diferencias significativas entre ratas jóvenes control con ratas envejecidas control (A la derecha imagen representativa para cada condición experimental; n=7). **B.** Incremento de los niveles relativos de RyR3 posterior a la fase de reconocimiento espacial. No se encontraron diferencias significativas en ratas envejecidas, asimismo, se encontraron incrementos significativos en los niveles relativos en condición control de ratas jóvenes respecto a ratas envejecidas control (A la derecha imagen representativa para cada condición experimental; n=6). Ctlol: control, CA: Campo abierto, FM: Fase de muestra, RE: reconocimiento espacial y RO: reconocimiento de objeto. \*\*p<0,001, \*\*\*p<0,0001 intragrupal y §§ p<0,001 intergrupala

**La tarea de reconocimiento de objeto no modifica los niveles de RyR en CPr de ratas jóvenes y envejecidas.**

Del mismo modo que en CA1, evaluamos el contenido proteico en CPr seis horas después de finalizado el protocolo conductual. En ratas jóvenes no se encontraron diferencias para la isoforma RyR2 (Figura 17A,  $p=0,63$ ; ANOVA de una vía [ $F_{4,24}=0,64$ ] seguido de Tukey post hoc test,  $p>0,05$ ), los valores obtenidos para fueron: control=  $1\pm 0,02$ , campo abierto=  $0,98\pm 0,03$ , fase de muestra=  $0,91\pm 0,05$ , reconocimiento espacial= $0,97\pm 0,06$  y reconocimiento de objeto= $0,99\pm 0,05$ . En ratas envejecidas tampoco encontramos diferencias significativas para esta isoforma de RyR entre ratas con reconocimiento espacial y de objeto respecto a ratas envejecidas control (Figura 17A,  $p=0,76$ ; ANOVA de una vía [ $F_{2,12}=0,29$ ] seguido de Tukey post hoc test,  $p>0,05$ ). Los valores encontrados fueron: control= $0,87\pm 0,04$ ; RE= $0,90\pm 0,04$  y RO= $0,90\pm 0,03$ . Por otra parte, al comparar ambos grupos etarios en condición control, no encontramos diferencias significativas (Figura 17A,  $p=0,12$ ). Asimismo, no encontramos diferencias entre ratas jóvenes entrenadas y ratas envejecidas entrenadas ( $p>0,05$ ).

Para la isoforma RyR3, tampoco se encontraron diferencias significativas (Figura 17B,  $p=0,97$ ; ANOVA de una vía [ $F_{4,20}=0,10$ ] seguido de Tukey post hoc test,  $p>0,05$ ) los valores obtenidos fueron: control=  $1\pm 0,01$ , campo abierto=  $0,99\pm 0,04$ , fase de muestra=  $1\pm 0,06$ , reconocimiento espacial= $0,98\pm 0,03$  y reconocimiento de objeto= $0,98\pm 0,07$ . En ratas envejecidas no encontramos diferencias significativas entre ratas expuestas a RE y ratas control (Figura 17B,  $p=0,77$ ; ANOVA de una vía [ $F_{2,10}=0,03$ ] seguido de Tukey post hoc test,  $p>0,05$ ). Los valores encontrados para RyR3 fueron: control= $0,92\pm 0,03$ ; RE= $0,89\pm 0,03$  y RO= $0,92\pm 0,03$ . Al igual que para la isoforma RyR2, no encontramos diferencias significativas entre ratas jóvenes y envejecidas control (figura 17B,  $p=0,12$ ) ni entre jóvenes entrenadas respecto a envejecidas entrenadas ( $p>0,05$ ).



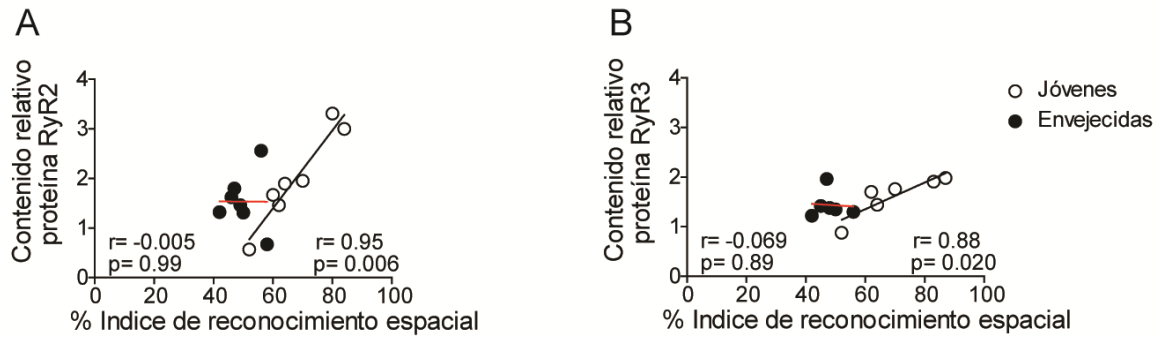
**Figura 17: Reconocimiento de objeto no modifica los niveles proteicos de RyR2/RyR3 en CPR de ratas jóvenes y envejecidas.**

**A.** Reconocimiento de objeto no modifica los niveles relativos de RyR2 en ratas jóvenes ni en ratas envejecidas. Asimismo, no se encontraron diferencias significativas entre ratas jóvenes control con ratas envejecidas control. (A la derecha imagen representativa para cada condición experimental; n=7) **B.** No se encontraron diferencias significativas en los niveles relativos de RyR3 posterior a la fase de reconocimiento de objeto en ratas jóvenes, tampoco se encontraron diferencias significativas en ratas envejecidas, igualmente, no se encontraron incrementos significativos en los niveles relativos en condición control de ratas jóvenes respecto a ratas envejecidas control (A la derecha imagen representativa para cada condición experimental; n=7). Ctrl: control, CA: Campo abierto, FM: Fase de muestra, RE: Reconocimiento espacial y RO: Reconocimiento espacial.

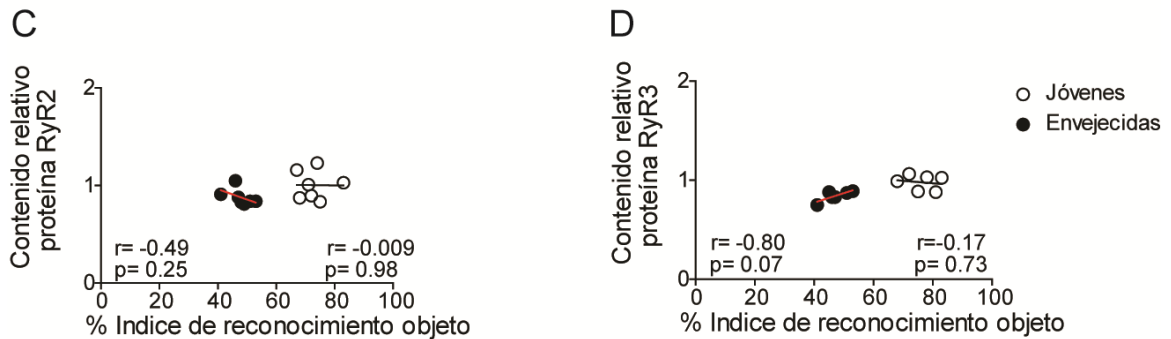
**Relación entre el índice de preferencia en reconocimiento espacial y de objeto respecto a incrementos relativos de las isoformas de RyR2/RyR3 a nivel de proteína de CA1 de hipocampo y corteza perirrinal.**

Posterior al análisis de contenido proteico de RyR2/RyR3 en CA1 hipocampal y CPr, realizamos una correlación entre los niveles de proteína y el índice de preferencia de reconocimiento espacial y de objeto. Al respecto, encontramos que a mayor índice de reconocimiento espacial existe un incremento en el contenido proteico de la isoforma RyR2 en CA1 de hipocampo de ratas jóvenes (Figura 18A,  $p=0,006$ ; círculos blancos); sin embargo, esta tendencia no la encontramos en ratas envejecidas (Figura 18A,  $p=0,99$ ; círculos negros). Para la isoforma RyR3 encontramos una correlación positiva para ratas jóvenes (Figura 18B,  $p=0,02$ ; círculos blancos) no así para envejecidas (Figura 18B,  $p=0,89$ ; círculos negros). Por otra parte, en corteza perirrinal no encontramos una relación entre índice de preferencia de objeto con cambios en los niveles de proteína de RyR2 para ratas jóvenes (Figura 18C,  $p=0,98$ ) o envejecidas (Figura 18C,  $p=0,25$ ); tampoco para RyR3 en jóvenes (Figura 18D,  $p=0,73$ ) o envejecidas (Figura 18D,  $p=0,07$ ).

## CA1 de Hipocampo



## CPr



**Figura 18: Reconocimiento espacial pero no de objeto se relaciona con incrementos a nivel de proteína de la isoformas RyR2/RyR3 en CA1 de hipocampo en ratas jóvenes pero no en envejecidas.**

**A.** Un mayor reconocimiento espacial incrementa la isoforma RyR2 en ratas jóvenes, pero no en envejecidas en CA1 de hipocampo. **B.** Un mayor reconocimiento de espacial se relaciona con incrementos de la isoforma RyR3 en ratas jóvenes en CA1 de HP, pero no en ratas envejecidas **C.** Incrementos en el reconocimiento de objeto no se relaciona con incrementos de la isoforma RyR2 en ratas jóvenes y envejecidas en CPr. **D.** Incrementos en el reconocimiento de objeto no se relaciona con incrementos de la isoforma RyR3 en ratas jóvenes y envejecidas en CPr.

## DISCUSION

Durante el envejecimiento normal se ha reportado que decaen las funciones cognitivas, principalmente aquellas dependientes del hipocampo (Ingram, London y cols., 1981; Ando y Ohashi., 1991; Burke y Barnes., 2006; Yankner, Lu y cols., 2008; Burke, Wallace y cols., 2010; Bergado, Almaguer y cols., 2011; Wimmer, Hernandez y cols., 2012; Burke, Maurer y cols., 2014). No obstante, evidencias recientes dan cuenta que no solo existe una vulnerabilidad del hipocampo frente al envejecimiento, sino que también de otras áreas cerebrales como la corteza perirrinal y la corteza prefrontal, las cuales están involucradas en otros tipos de memoria. Actualmente, las evidencias sugieren que la alteración en la expresión de genes involucrados en la formación de memorias se correlaciona con cambios en la plasticidad sináptica y déficit cognitivo asociado al envejecimiento normal.

En esta tesis exploramos posibles correlaciones entre la memoria de tipo espacial y de reconocimiento de objeto con los cambios de expresión de las isoformas RyR2/RyR3 a nivel de ARNm y de proteína en CA1 de hipocampo (HP) y en la corteza perirrinal (CPr) de ratas jóvenes y envejecidas. Encontramos que el reconocimiento espacial a largo plazo, pero no el de objeto, incrementa los niveles de mensajero y de proteína de las isoformas RyR2/RyR3 en CA1 de hipocampo de ratas jóvenes, y que estos aumentos se correlacionan con el índice de reconocimiento espacial. Además, encontramos que ratas envejecidas no reconocen a largo ni el cambio espacial ni el de objeto nuevo, y presentan niveles basales elevados de RyR2/RyR3 en CA1 de hipocampo respecto a ratas jóvenes control, y que estos niveles elevados no cambian posterior al reconocimiento espacial o de objeto nuevo. En contraste, en corteza perirrinal no encontramos cambios de expresión de RyR posterior al reconocimiento de objeto, una tarea que involucra esta área del cerebro.

## Actividad exploratoria y envejecimiento

Previo a la caracterización conductual, evaluamos la actividad exploratoria en ambos grupos en la tarea denominada "Campo Abierto". En esta etapa encontramos una menor actividad locomotora en ratas envejecidas respecto a ratas jóvenes (Figura 6E). Esta menor actividad locomotora no se debe a problemas motivacionales debido a que se seleccionaron animales cuyos tiempos de exploración fueron superior al 60% (Figura 5B). Además, el tiempo asignado para la tarea conductual no excedió los 5 minutos, tiempo que según descrito previamente no afecta la motivación innata para la exploración de los objetos en roedores (Shukit-Hale, 1999; Bergado, Almaguer y col., 2011). También descartamos efectos ansiosos que pudieran afectar la actividad locomotora tal como el "tigmotaxis" (incremento en el tiempo de permanencia en la periferia) sugerido por Bergado, Almaguer y cols (2011) debido a que los animales usados en este trabajo disminuyen el tiempo de permanencia en la periferia (Figura 5E) e incrementan su tiempo en el centro (Figura 5H). Es importante destacar, además que Shukit-Hale (1999) utilizando ratas Fischer 344 como otro modelo para evaluar el efecto del envejecimiento en la actividad locomotora, demostró que ratas de edad inferior a los 20 meses no presentan problemas locomotores evaluados a través de las pruebas de *wire suspension/wire hanging* (prueba que mide fuerza muscular), *plank walking* (mide balance y coordinación) e *inclined screening* (mide tono muscular, fuerza, resistencia y equilibrio).

## Memoria y Envejecimiento

Un componente cognitivo afectado durante el envejecimiento normal es la memoria declarativa (Ingram y cols., 1981; Bergado, Almaguer y cols., 2011; Wimmer, Hernández y cols., 2012). Para evaluar este tipo de memoria tanto a corto plazo (CP) como a largo plazo (LP) utilizamos el protocolo de reconocimiento de objeto que presenta un componente espacial llamado reconocimiento espacial (RE) y otro llamado reconocimiento de objeto (RO).

A corto plazo, encontramos que ratas envejecidas reconocen al igual que las jóvenes el cambio espacial (Figura 9A y 9B). Estos resultados son consistentes a los reportados por Wimmer, Hernández y cols (2012) utilizando ratones C57BL6 de 22-24 meses de edad. No obstante, en la tarea de RE a largo plazo (24 horas) encontramos que las ratas envejecidas presentan un bajo índice de reconocimiento por lo objetos modificados de posición respecto a las ratas jóvenes (Figura 9F). Estos resultados que también están de acuerdo con los descritos por Wimmer, Hernández y cols (2012) utilizando este mismo protocolo concuerdan, además, con los resultados obtenidos con otros paradigmas conductuales que se utilizan para evaluar memoria espacial tales como el “laberinto en forma de T” usado en ratas Fischer 344 de 24 meses (Ando y Ohashi., 1991), el “laberinto radial de ocho brazos” utilizando ratas Wistar de 26 meses (Ingram, London y cols 1981) y el “laberinto acuático de Morris” utilizado ratas Sprague Dawley de 24 meses (Gage, Dunnett y cols., 1984), en ratas Long Evans de 27-28 meses (Rapp, Rosenberg y cols., 1987), ratas Wistar de 24 meses (Van der Staay y de Jonge., 1993) y en ratas Long Evans de 24 meses (Boric, Muñoz y cols., 2008).

Una posible explicación para comprender a nivel conductual el déficit espacial observado en ratas envejecidas ha sido sugerida por Faust, Robbiati y cols (2014), quienes hacen referencia a una disminución en la actividad por parte de las células de lugar (*place cells*) en el área CA1 de hipocampo, área del cerebro crítica para la formación de las

memorias episódicas (Morris, 1984). Estas células en etapas juveniles incrementan su actividad (número de disparos) mientras el animal adquiere información a través de claves visuales del contexto de aprendizaje y de esta forma elabora un mapa del lugar, de tal manera que frente a una nueva exposición al mismo contexto el animal reconoce los rearrreglos espaciales basándose en las claves visuales y en consecuencia ejecuta la respuesta (O'Keefe y Dostrovsky., 1997; O'Keefe 1976; Frank, Satnley y cols, 2004, Faust, Robbiati y cols., 2013). De manera interesante, la elaboración del campo de lugar y el reconocimiento del cambio espacial depende del receptor de NMDA (Dupret, O`Neill y cols., 2010) ya que su inhibición desencadena una disminución o alteración en el patrón de respuesta de las neuronas piramidales de CA1, que se ha correlacionado con alteración de la memoria espacial (Faust, Robbiati y cols., 2013). Al respecto, si bien nosotros no evaluamos el reconocimiento espacial a través de esta estrategia experimental (movimiento libre con electrodos implantados en CA1), nuestros resultados son consistentes a los reportados por los autores mencionados anteriormente, pues observamos que si bien ratas jóvenes discriminan el rearrreglo espacial de los objetos a largo plazo; las ratas envejecidas no lo hacen.

En el caso de las ratas envejecidas, creemos que no existe una elaboración del campo de lugar debido a que durante el envejecimiento la actividad del receptor de NMDA está disminuida por alteración del estado redox neuronal que se produce debido a un aumento de especies oxidantes en el hipocampo (Paula-Lima, Adasme y cols., 2014), alteración que desencadena una disminución en la entrada de calcio vía receptor de NMDA afectando con ello la inducción de la PLP (Bodhinathan, Kumar y cols., 2010). Por lo tanto, lo esperado es que durante el envejecimiento disminuya la elaboración de campos de lugar o que estos tengan baja especificidad desencadenando con esto que las ratas envejecidas no discriminen los objetos modificados de posición, manifestándose como una alteración de la memoria espacial como ha sido previamente reportado (Ando y Ohashi., 1991; Veng, Mesches y cols., 2003; Ingram, London y cols., 1981; Gage, Dunnett y cols., 1984; Rapp,

Rosenberg y cols., 1987; Barnes 1988; Brandeis, Brandys y cols., 1989; Van der Staay y de Jonge., 1993; Shukitt-Hale., 1999; Boric, Munoz y cols., 2008; Burke, Maurer y cols. 2014).

En relación al reconocimiento de objeto durante el envejecimiento normal, se ha descrito que existen déficit en la capacidad de roedores para discriminar nuevos estímulos (Burke, Wallace y cols., 2010, Foster 2012; Burke, Hartzell y cols., 2012; Burke, Maurer y cols., 2014) similar a lo observado cuando existe lesión de la corteza perirrinal (McTighe y cols, 2010.). Sin embargo, como se mencionó anteriormente, las evidencias son contradictorias. La controversia se debe a los diferentes intervalos de tiempo utilizados por los distintos autores entre la fase de muestra y la de reconocimiento de objeto; de esta manera los resultados encontrados a corto plazo (5 minutos) que señalan que ratas envejecidas reconocen el objeto nuevo de manera similar a las jóvenes, son consistentes a los encontrados por otros autores (Cavoy y Delacour., 1993; Lukaszewska y Radulska., 1994; Burke, Wallace y cols., 2010; Bergado, Almaguer y cols., 2011) que utilizaron intervalos de tiempo de 5 minutos, 1 minuto, 2 minutos y 3 minutos, respectivamente. En cambio, a largo plazo encontramos disminución del reconocimiento de objeto en ratas envejecidas cuando no se realiza RE previamente (Figura 11D). Estos resultados que también son consistentes con los encontrados por otros investigadores que evalúan el reconocimiento de objetos con intervalos de tiempo superior a las 24 horas (Bartolini, Casamenti y cols., 1996; de Lima, Laranja y cols., 2005; Burke, Wallace y cols., 2010; Gamiz y Gallo., 2012).

Posibles explicaciones a nivel conductual de esta disminución en la exploración del objeto nuevo a largo plazo, fueron propuestas por Burke, Wallace y cols (2010). Al respecto, estos autores señalan que dos eventos podrían explicar una disminución en el índice de preferencia por el objeto nuevo: 1) un aumento en la exploración del objeto familiar, lo que implicaría que el animal "olvidó" que previamente había explorado estos objetos y los considera nuevos y 2) una disminución en la exploración del objeto novedoso, lo que implicaría que el animal identifica erróneamente el objeto nuevo como familiar. En ambos

casos, la disminución se manifiesta conductualmente como un deterioro del reconocimiento de objeto nuevo.

Los resultados encontrados en esta tesis para RE y RO para ambos intervalos de tiempo nos dan cuenta que memorias de corto plazo no son afectadas durante el envejecimiento mientras que las memorias de largo plazo son vulnerables durante esta etapa de la vida (Burke, Wallace y cols., 2010, Foster 2012, Gamiz y Gallo., 2012; Wimmer, Hernández y cols., 2012).

### **Receptor de ryanodina y cambios de expresión en etapas juveniles**

En la segunda parte de este proyecto, evaluamos los cambios de expresión a nivel de mensajero y proteína de las isoformas de RyR en CA1 de hipocampo y CPr en ratas jóvenes y envejecidas y los correlacionamos con el rendimiento conductual.

En CA1 de hipocampo encontramos que el reconocimiento espacial, pero no el de objeto, incrementa la expresión del mensajero (Figura 12) y de la proteína (Figura 16) de las isoformas RyR2/RyR3 en ratas jóvenes entrenadas. Estos resultados son consistentes a los descritos en hipocampo completo de ratas Wistar de entre 2-3 meses por Zhao, Meiri y cols (2000) y por Adasme, Haeger y cols (2011) en ratas Sprague Dawley de 3 meses tras ser entrenadas en el laberinto acuático de Morris.

La contribución de RyR en procesos de aprendizaje y memoria ha sido considerada como crítica, debido a que inhibir la expresión (*knockdown*) de las isoformas RyR2/RyR3 interfiere con la memoria espacial evaluada a través del protocolo de evitación pasiva en ratones (Galeotti y cols., 2008), mientras que la estimulación de RyR por agonistas promueve la consolidación de la memoria espacial en roedores (Galeotti y cols., 2008; Adasme y cols., 2011) y en pollos (Baker y cols., 2010) y su inhibición interfiere con la memoria asociativa (Edwards y Rickard., 2006). Entonces, de acuerdo a lo encontrado en

esta tesis doctoral y a los antecedentes señalados, postulamos que los cambios observados a nivel de mensajero y de proteína podrían estar relacionados con eventos moleculares necesarios para generar memoria de reconocimiento espacial en etapa juvenil.

El mecanismo a través del cual RyR podría participar en la formación de memoria implica posiblemente la propiedad de RyR de amplificar la señal de calcio a través del mecanismo conocido como “liberación de calcio inducida por calcio” (Hidalgo, Bull y cols., 2004), lo que permite activar cascadas de señalización dependiente de calcio que finalmente desencadenan la fosforilación de la serina-133 de CREB (cAMP response element binding o elemento de respuesta a AMPc) (Impey y cols., 1998, Taubenfeld y cols., 1999, Monti y cols., 2005). Este factor transcripcional participa en la inducción de expresión de genes tales como Arc (proteína asociada a citoesqueleto), BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor o factor neurotrófico derivado de cerebro) y reelina entre otros, los cuales se consideran necesarios para la formación y consolidación de la memoria (Guzowski et al., 2001, Monti et al., 2005, Adasme et al., 2011).

Con respecto a la corteza perirrinal, no encontramos incrementos ni del mensajero (Figura 13) ni de la proteína RyR (Figura 17) en ratas jóvenes posterior al reconocimiento espacial o de objeto. De manera interesante, datos aportados por el grupo de Zhao, Meiri y cols (2000) a través de hibridación in situ, muestran un bajo nivel de expresión a nivel del mensajero de RyR2 en ratas Wistar de entre 60-90 días, sugiriendo que esta isoforma es débilmente expresada en esta etapa del desarrollo. Nosotros en esta tesis mostramos que las tres isoformas de RyR se expresan discretamente a nivel de mensajero en esta área cerebral. Más aún, encontramos que la detección de ARNm de la isoforma RyR1 a través de PCR en tiempo real se encuentra en el límite de resolución de esta técnica, lo que sugiere que por su muy baja expresión no se requiere de RyR1 para procesos de aprendizaje y memoria.

A partir de los datos obtenidos en esta tesis, planteamos que a diferencia del hipocampo, la corteza perirrinal no requiere cambios en la expresión de RyR para la

formación y/o consolidación de este tipo de memoria en etapas juveniles. De hecho, las evidencias electrofisiológicas que se correlacionan con este tipo de memoria apuntan a una contribución por parte del receptor de inositol 1,4,5-trisfosfato por activación de receptores metabotrópicos glutamatérgicos de tipo mGluRI y mGluRII, y de receptores colinérgicos metabotrópicos de tipo mAChR1 (Banks, Bashir y cols., 2012). Mientras que a nivel conductual se ha sugerido una modulación dopaminérgica a través de los receptores D1 para la formación y consolidación de la memoria de reconocimiento de objeto (Balderas, Moreno-Castilla y cols., 2013).

### **Receptor de ryanodina y cambios de expresión durante el envejecimiento**

En CA1 de hipocampo, encontramos que ratas envejecidas no presentan incrementos tanto a nivel del mensajero (Figura 12B) como de la proteína RyR2/3 (Figura 16) posterior al reconocimiento espacial o de objeto, como se observó en ratas jóvenes. En contraste, observamos que este grupo de animales presenta en condición control niveles incrementados de RyR2/RyR3 tanto a nivel del mensajero como de la proteína respecto a ratas jóvenes control.

Respecto a la expresión de RyR durante el envejecimiento, datos aportados por Kadish, Thibault y cols (2009) en ratas Fisher 344 de 23 meses, muestran incrementos en la expresión del mensajero de RyR2 en hipocampo completo, desconociéndose lo que ocurre con las otras isoformas de RyR. Más aún, se desconoce completamente lo que sucede con el contenido proteico de RyR durante el envejecimiento.

En relación a los incrementos en condición basal del contenido proteico, datos aportados por otros investigadores dan cuenta tanto de incrementos (Thibault y Landfield., 1996; Veng, Mesches y cols., 2003; Monti, Berteotti y cols., 2005, Kadish, Thibault y cols., 2009; Bruno, Huang y cols., 2012) como de disminución de otras proteínas durante el envejecimiento (Kadish, Thibault y cols., 2009; Moyer, Furtak y cols., 2011), los cuales

podrían afectar los procesos de aprendizaje y memoria. Específicamente, datos aportados por el grupo de Monti, Berteotti y cols (2005) muestran que ratas Wistar de 30 meses no incrementan Arc posterior al protocolo de condicionamiento al miedo como lo hacen las ratas jóvenes. De hecho, estos autores muestran que esta proteína se encuentra sobreexpresada en ratas envejecidas y lo correlacionan con el déficit observado en estos animales, resultados que son similares a los observados en nuestro estudio con RyR a través de reconocimiento espontáneo de objeto. De manera interesante, estos investigadores encuentran que la razón CREB fosforilado/CREB total se encuentra incrementada en hipocampo durante el envejecimiento, sugiriendo que la condición basal hay un incremento en el estado de fosforilación de CREB que trae como consecuencia un aumento de las proteínas involucradas en la formación de memorias, las cuales se correlacionan con deterioro cognitivo.

En el caso particular de RyR, creemos que su sobreexpresión en ratas envejecidas podría ser inicialmente ser un mecanismo compensatorio debido a la menor entrada de calcio a través del receptor de NMDA el cual presenta una disminución en su función (Bodhinathan, Kumar y cols., 2010). Sin embargo, esta sobreexpresión podría afectar las señales de calcio dependientes de actividad neuronal y en consecuencia, causar una disminución de las funciones cognitivas. Al respecto, se ha propuesto que el deterioro cognitivo asociado con el envejecimiento se debe a una desregulación de los procesos dependientes de calcio en áreas como CA1 de hipocampo (Kumar y Foster., 2005; Gant, Sama y cols., 2006), los cuales se han correlacionado con un aumento en la amplitud de la fase de *After Hyper Polarization* (AHP) del potencial de acción que es considerado un marcador celular de envejecimiento (Stutzmann, Smith y cols., 2006; Bodhinathan, Kumar y cols., 2010), con una disminución de la plasticidad sináptica a corto plazo (Thibault, Hadley y cols., 2001) y con una mayor susceptibilidad a la inducción de la depresión de largo plazo (Kumar y Foster., 2005).

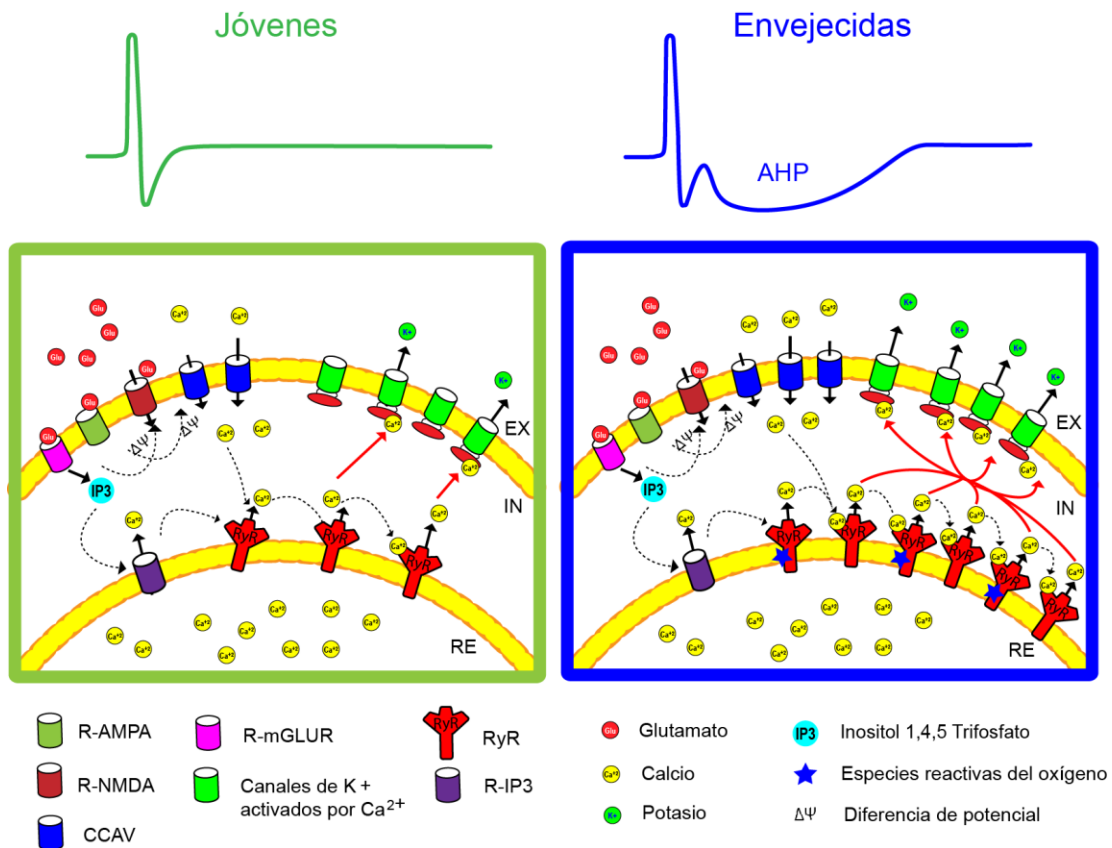
El mecanismo que subyace a estos procesos es pobremente conocido. No obstante, se ha propuesto que esta desregulación del calcio durante el envejecimiento se debería a una mayor entrada de calcio a través de los canales de calcio tipo L, los cuales se encuentran sobreexpresados durante el envejecimiento (Thibault y Landfield., 1996; Veng y Browning., 2002). Sin embargo, trabajos posteriores dan cuenta que la inhibición con nifedipino (bloqueador de canales de calcio tipo L) en neuronas piramidales de CA1 de hipocampo de ratas envejecidas no disminuye la amplitud de la AHP (Gant, Sama y cols., 2006) sugiriendo que esta alteración en condición basal de la homeostasis de calcio no se debe a este canal.

El posible rol de RyR en la desregulación de calcio fue sugerida por Gant, Sama y cols (2006), quienes utilizando rebanadas de hipocampo provenientes de ratas Fischer 344 de 23 meses de edad, inhibieron RyR con concentraciones elevadas de ryanodina (20  $\mu$ M) y observaron una disminución de la AHP, recuperando el fenotipo mostrados por ratas jóvenes. Estos resultados involucran directamente a RyR con alteraciones de los procesos relacionados con plasticidad sináptica durante el envejecimiento. Otras evidencias que involucran a RyR fueron aportadas por el grupo de Kadish, Thibault y cols (2009), los cuales describen una disminución en la expresión de FKBP1a y 1b un gen que codifica para la proteína estabilizadora de RyR en estado cerrado en hipocampo de ratas envejecidas, sugiriendo que ocurren incrementos de calcio intracelular en condición basal debido a la fuga de calcio mediada por RyR desde el retículo endoplasmático y con ello afectando los mecanismos de plasticidad sináptica.

Por otra parte, un cuerpo creciente de evidencia señala que durante el envejecimiento incrementa el estrés oxidativo, lo que influye en el estado redox de la célula aumentando los niveles de especies oxidantes (Paula-Lima, Adasme y cols., 2014) y con ello modificando la actividad de ciertas proteínas. En particular, RyR es susceptible a cambios redox debido a la presencia de residuos de cisteína de los cuales entre 10 a 12 se han identificado en RyR1 como altamente susceptibles a oxidación por agentes endógenos

(Aracena-Parks y cols., 2006), los cuales desencadenan una mayor sensibilidad de RyR a la activación por calcio en músculo (Hidalgo, Bull y cols., 2004) y neuronas (Bull, Finkelstein y cols., 2008; Paula-Lima, Adasme y cols., 2014). De esta manera, la mayor presencia de especies oxidante desencadenaría una mayor liberación de calcio mediada por RyR, contribuyendo a la alteración de calcio descrita durante el envejecimiento. Las evidencias que sugieren que cambios en el estado redox afectan a RyR y con ello a los mecanismos de plasticidad sináptica fueron aportados por el grupo de Bodhinathan, Kumar y cols (2010) quienes evaluaron el efecto de DTT, un agente reductor, sobre la amplitud de la AHP en el área CA1 de hipocampo de ratas envejecidas. Estos autores encontraron que en presencia de DTT disminuye la amplitud de la AHP alcanzando niveles similares a los observados cuando inhiben RyR con 20  $\mu$ M de ryanodina. Más aún, los autores observan que una vez bloqueado el receptor y agregando DTT, no hay una mayor disminución de la amplitud de la AHP, sugiriendo que RyR y no así otras proteínas que también pueden ser afectadas por cambios redox está involucrado en la disminución de la excitabilidad neuronal y en consecuencia de los mecanismos que subyacen a la plasticidad sináptica.

A partir de los datos obtenidos y considerando los antecedentes mencionados, proponemos el siguiente modelo:



**Figura 19: Modelo del incremento de la AHP durante el envejecimiento: Participación de los canales de ryanodina.**

En animales jóvenes, el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Ca}^{2+}$ ) intracelular postsináptico deriva principalmente de la entrada de calcio mediada por el receptor de NMDA (R-NMDA). La activación de este receptor requiere de la unión de glutamato (Glu) y la despolarización debido a la actividad del receptor AMPA (R-AMPA). El potencial de acción activa los canales de calcio activados por voltaje que incrementan la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ . La entrada de calcio a través del R-NMDA y CCAV activa a los receptores de ryanodina (RyR) ubicados en el retículo endoplasmático (RE), los que liberan y amplifican la señal de calcio en forma redox-dependiente. Este incremento de calcio estimula la apertura de canales de  $\text{K}^+$  activados por calcio ubicados en la membrana plasmática resultando en una salida de  $\text{K}^+$  que hiperpolariza transitoriamente la membrana postsináptica. Durante el envejecimiento, el incremento de los CCAV, de RyR y de las especies reactivas del oxígeno (ROS) generan un incremento mayor de calcio intracelular en respuesta a la activación neuronal activando a un mayor número de canales de  $\text{K}^+$  activados por calcio lo que desencadena un periodo mayor de hiperpolarización que disminuye la capacidad de respuesta frente a estímulos de alta frecuencia.

En el caso de la corteza perirrinal, no encontramos cambios ni en la expresión del mensajero ni de la proteína de RyR posterior al protocolo conductual (reconocimiento de objeto) o cuando comparamos ratas envejecidas control respecto a jóvenes control. Sin embargo, encontramos una discreta expresión en esta área cerebral de las tres isoformas de RyR, similar a lo encontrado en ratas jóvenes lo cual nos sugiere que la expresión de esta isoforma no es requerida durante esta etapa del desarrollo para procesos de aprendizaje y memoria.

El declive cognitivo de la memoria de reconocimiento inicialmente se explicó por disminución en el número de neuronas corticales, sin embargo, Rapp y Deroche (2002) y Burke y Hartzell y cols (2012) confirman que no existe tal disminución neuronal que se correlacione con déficit cognitivo. Otra posible explicación surge a partir de alteraciones bioquímicas y moleculares reportados en la CPr, tales como disminución en los niveles de glutamato en la CPr (Liu, Jing y cols. 2009), disminución en la expresión de la subunidad NR2A del receptor de NMDA como alteración en la composición de este receptor (Liu, Smith y cols., 2008), disminución en la expresión de proteínas buffer de calcio tales como calbindin-D28 (Moyer, Furtak y cols., 2011), disminución en la expresión de genes de expresión temprana como Arc (Fletcher, Calhoun y cols., 2006, Burke, Hartzell y cols., 2012), que en su conjunto traerían como consecuencia alteración en la LTP y LTD modelo molecular y celular de los procesos de aprendizaje y memoria; sin embargo, aún no existe una caracterización a través de estos modelos durante el envejecimiento en la CPr.

A nivel electrofisiológico, se ha tratado de correlacionar el deterioro cognitivo de esta área cerebral con una disminución de la tasa de disparos (firing rate) neuronal que traería como consecuencia alteración de la transmisión sináptica; disminución de dopamina que se ha correlacionado con disminución del volumen de la sustancia nigra y el área tegmental ventral (Barili y cols., 1998) que traería como consecuencia alteración en la modulación de la sinapsis glutamatérgica afectando la consolidación de la memoria (Balderas, Moreno y cols.,

2013). Sin embargo, un cuerpo creciente de evidencias sugiere que no hay cambio en la tasa de disparos de las neuronas de la CPr (Xiang, Brown y cols., 1988; Burke, Hartzell y cols., 2012; Burke, Maurer y cols., 2014), sino mas bien proponen un “desacople” entre la actividad neuronal y la expresión de genes, específicamente, una disminución en la expresión de Arc posterior al reconocimiento de objeto (Fletcher, Calhoun y cols., 2006, Burke Hartzell y cols., 2012) gen cuya expresión es considerada crítica para la consolidación de la memoria. (Guzowski, Lyford y cols., 2000). Específicamente, la idea de desacople surge de datos aportados principalmente por el grupo de Burke, Hartzell y cols (2012) los cuales muestran que aproximadamente un 15% de las neuronas de la capa V de la CPr es positiva en la expresión del mensajero de Arc y que no necesariamente se relaciona con una reducción en el número de células activas, pero que si se correlaciona con bajo reconocimiento del objeto nuevo, resultados que son comparables cuando hay lesión de la corteza perirrinial (McTighe, Cowell y cols., 2010). De esta manera Burke, Maurer y cols (2014) proponen que este desacople altera los mecanismos de expresión de genes necesarios para la formación y consolidación de memorias, expresión que se ha reportado previamente como disminución de la expresión de la subunidad NR2A del receptor de NMDA, el cual es considerado crítico para los procesos de plasticidad sináptica (Liu, Smith y cols.,2008), disminución de Arc afectando el tráfico del receptor AMPA (Chowdhury, Shepherd y cols., 2006) y disminución en la expresión de proteínas buffer de calcio tales como calbindin-D28, cambios que traerían como consecuencia alteraciones en los mecanismos que subyacen a la plasticidad sináptica. Sin embargo, el mecanismo involucrado se desconoce aún.

## CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados encontrados y a las evidencias aportadas por otros investigadores, concluimos que:

- a) Ratas envejecidas presentan deterioro de la memoria espacial y de reconocimiento de objeto nuevo a largo plazo.
- b) Incrementos tanto del mensajero como de la proteína RyR en etapas tempranas a nivel hipocampal, podrían contribuir a cambios más permanentes, tales como modificaciones estructurales de las neuronas que favorezcan el almacenamiento de la memoria espacial a largo plazo.
- c) Durante el envejecimiento los incrementos basales de la proteína RyR en hipocampo, podrían contribuir a una señalización anormal de calcio y al deterioro conductual reportado por distintos autores, así como también, a los defectos de memoria de largo plazo reportados en esta tesis.
- d) Tanto la tarea de reconocimiento de objeto en ratas jóvenes como el envejecimiento, no modifican los niveles de expresión de RyR en corteza perirrinal, sugiriendo que la formación de memoria en etapas tempranas como el deterioro cognitivo asociado a esta área cerebral durante el envejecimiento no se correlaciona con cambios en la expresión de RyR.

## REFERENCIAS

- Abe, H., Ishida, Y., Nonaka H y Iwasaki T. (2009). "Functional difference between rat perirhinal cortex and hippocampus in object and place discrimination tasks." *Behavioural Brain Research* 197(2): 388-397.
- Adasme, T., P. Haeger., Paula-Lima, A., Espinoza, I., Casa-Alarcón., Carrasco, MA y Hidalgo, C. (2011). "Involvement of ryanodine receptors in neurotrophin-induced hippocampal synaptic plasticity and spatial memory formation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(7): 3029-3034.
- Agster, K. L. y R. D. Burwell. (2013). "Hippocampal and subicular efferents and afferents of the perirhinal, postrhinal, and entorhinal cortices of the rat." *Behavioural Brain Research* 254: 50-64.
- Alberini, C. M. (2009). "Transcription factors in long-term memory and synaptic plasticity." *Physiol Rev* 89(1): 121-145.
- Albert MS. (1997). "The ageing brain: normal and abnormal memory" *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 352(1362):1703-1709.
- Ando, S y Ohashi, Y. (1991). "Longitudinal study on age-related changes of working and reference memory in the rat." *Neurosci Lett* 128(1): 17-20.
- Aracena-Parks, P., S. A. Goonasekera, Gilman CP, Dirksen RT, Hidalgo C, Hamilton SL. (2006). "Identification of cysteines involved in S-nitrosylation, S-glutathionylation, and oxidation to disulfides in ryanodine receptor type 1." *J Biol Chem* **281**(52): 40354-40368.
- Baker, K. D., Edwards, TM y Rickard NS. (2010). "A ryanodine receptor agonist promotes the consolidation of long-term memory in young chicks." *Behav Brain Res* **206**(1): 143-146.
- Balderas, I., P. Moreno-Castilla y Bermudez-Rattoni F. (2013). "Dopamine D1 receptor activity modulates object recognition memory consolidation in the perirhinal cortex but not in the hippocampus." *Hippocampus* 23(10): 873-878.
- Banks, PJ., Bashir, ZI. y Brown MW. (2012). "Recognition memory and synaptic plasticity in the perirhinal and prefrontal cortices." *Hippocampus* 22(10): 2012-2031.
- Barili, P., G. De Carolis, Zaccheo D, Amenta F. (1998). "Sensitivity to ageing of the limbic dopaminergic system: a review." *Mech Ageing Dev* 106(1-2): 57-92.
- Barnes, C A. (1979). "Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat." *J Comp Physiol Psychol* 93(1): 74-104.
- Barnes, CA. (1988). "Aging and the physiology of spatial memory." *Neurobiol Aging* 9(5-6): 563-568.
- Bartolini, L., Casamenti, F y Pepeu, G. (1996). "Aniracetam restores object recognition impaired by age, scopolamine, and nucleus basalis lesions." *Pharmacol Biochem Behav* 53(2): 277-283.
- Bergado, JA., Almaguer, W., Rojas, y., Capdevila, V y Frey, JU. (2011). "Spatial and emotional memory in aged rats: a behavioral-statistical analysis." *Neuroscience* 172: 256-269.
- Berridge, M J. (1998). "Neuronal calcium signaling." *Neuron* 21(1): 13-26.
- Berridge, M J. (2002). "The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle." *Cell Calcium* 32(5-6): 235-249.

- Berridge, MJ., Bootman, MD. y Roderick HL (2003). "Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling." *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(7): 517-529.
- Berridge, MJ., Lipp, P y Bootman, MD. (2000). "The versatility and universality of calcium signalling." *Nat Rev Mol Cell Biol* 1(1): 11-21.
- Bird, C. M. y N. Burgess. (2008). "The hippocampus and memory: insights from spatial processing." *Nat Rev Neurosci* 9(3): 182-194.
- Bodhinathan, K., Kumar, A y Foster, TC. (2010). "Intracellular redox state alters NMDA receptor response during aging through Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II." *J Neurosci* 30(5): 1914-1924.
- Bodhinathan, K., Kumar, A y Foster, TC. (2010). "Redox sensitive calcium stores underlie enhanced after hyperpolarization of aged neurons: role for ryanodine receptor mediated calcium signaling." *J Neurophysiol* 104(5): 2586-2593.
- Boric, K., Munoz, P., Gallagher, M y Kirkwood, A. (2008). "Potential adaptive function for altered long-term potentiation mechanisms in aging hippocampus." *J Neurosci* 28(32): 8034-8039.
- Brandeis, R., Brandys, Y. y Yehuda, S. (1989). "The use of the Morris Water Maze in the study of memory and learning." *Int J Neurosci* 48(1-2): 29-69.
- Brown, M. W. y Aggleton JP. (2001). "Recognition memory: what are the roles of the perirhinal cortex and hippocampus?" *Nat Rev Neurosci* 2(1): 51-61.
- Bruno, AM., Huang, JY., Bennett, DA., Marr, RA., Hastings, ML y Stutzmann, GE. (2012). "Altered ryanodine receptor expression in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease." *Neurobiol Aging* 33(5): 1001 e1001-1006.
- Bull, R., Finkelstein, JP., Gálvez, J., Sánchez, G., Donoso, P., Behrens, MI y Hidalgo C. (2008). "Ischemia enhances activation by Ca<sup>2+</sup> and redox modification of ryanodine receptor channels from rat brain cortex." *J Neurosci* 28(38): 9463-9472.
- Burke, SN y Barnes CA. (2006). "Neural plasticity in the ageing brain." *Nat Rev Neurosci* 7(1): 30-40.
- Burke, SN., Hartzell, AL., Lister, JP., Hoang, LT y Barnes CA. (2012). "Layer V perirhinal cortical ensemble activity during object exploration: a comparison between young and aged rats." *Hippocampus* 22(10): 2080-2093.
- Burke, SN., Maurer, AP., Nematollahi, S., Uprety, A., Wallace, JL y Barnes CA. (2014). "Advanced age dissociates dual functions of the perirhinal cortex." *J Neurosci* 34(2): 467-480.
- Burke, S N., Wallace, J. L., Hartzell, AL., Nematollahi, S., Plange, K y Barnes CA. (2011). "Age-associated deficits in pattern separation functions of the perirhinal cortex: a cross-species consensus." *Behav Neurosci* 125(6): 836-847.
- Burke, SN., Wallace JL., Nematollahi, S., Uprety, A y Barnes CA. (2010). "Pattern separation deficits may contribute to age-associated recognition impairments." *Behav Neurosci* 124(5): 559-573.
- Carrasco, MA., Jaimovich, E., Kemmerling, U yHidalgo C. (2004). "Signal transduction and gene expression regulated by calcium release from internal stores in excitable cells." *Biol Res* 37(4): 701-712.
- Cavoy, A y Delacour, J. (1993). "Spatial but not object recognition is impaired by aging in rats." *Physiol Behav* 53(3): 527-530.
- Citri, A. y Malenka, RC. (2008). "Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms." *Neuropsychopharmacology* 33(1): 18-41.

- Chowdhury, S., Shepherd, D., Okuno, H., Lyford, G., Petralia, RS., Plath, N., Kuhl, D., Huganir, RL y Worley PF. (2006). "Arc/Arg3.1 interacts with the endocytic machinery to regulate AMPA receptor trafficking." *Neuron* 52(3): 445-459.
- de Lima, MN., Laranja, DC., Caldana, F., Bromberg, E., Roesler, R y Schröder N. (2005). "Reversal of age-related deficits in object recognition memory in rats with l-deprenyl." *Exp Gerontol* 40(6): 506-511.
- Dupret, DJ., O'Neill, J., Pleydell-Bouverie, B y Csicsvari, J. (2010). "The reorganization and reactivation of hippocampal maps predict spatial memory performance." *Nat Neurosci* 13(8): 995-1002.
- Edwards, TM y Rickard, NS. (2006). "Pharmacological evidence indicating a complex role for ryanodine receptor calcium release channels in memory processing for a passive avoidance task." *Neurobiol Learn Mem* 86(1): 1-8.
- Ennaceur, A y Aggleton, JP. (1997). "The effects of neurotoxic lesions of the perirhinal cortex combined to fornix transection on object recognition memory in the rat." *Behav Brain Res* 88(2): 181-193.
- Ennaceur, A., Neave, N y Aggleton, JP. (1997). "Spontaneous object recognition and object location memory in rats: the effects of lesions in the cingulate cortices, the medial prefrontal cortex, the cingulum bundle and the fornix." *Exp Brain Res* 113(3): 509-519.
- Faust, TW., Robbiati, S., Huerta, TS y Huerta, PT. (2013). "Dynamic NMDAR-mediated properties of place cells during the object place memory task." *Front Behav Neurosci* 7: 202.
- Fill, M y Copello, JA. (2002). "Ryanodine receptor calcium release channels." *Physiol Rev* 82(4): 893-922.
- Fletcher, BR., Calhoun, ME, Rapp, PR y Shapiro ML (2006). "Fornix lesions decouple the induction of hippocampal arc transcription from behavior but not plasticity." *J Neurosci* 26(5): 1507-1515.
- Foster, T C. (2007). "Calcium homeostasis and modulation of synaptic plasticity in the aged brain." *Aging Cell* 6(3): 319-325.
- Foster, TC. (2012). "Dissecting the age-related decline on spatial learning and memory tasks in rodent models: N-methyl-D-aspartate receptors and voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels in senescent synaptic plasticity." *Prog Neurobiol* 96(3): 283-303.
- Frank, L. M., Stanley, GB y Brown, EN. (2004). "Hippocampal plasticity across multiple days of exposure to novel environments." *J Neurosci* 24(35): 7681-7689.
- Furuichi, T., Furutama, D., Hakamata, Y., Nakai, H y Mikoshiva, K. (1994). "Multiple types of ryanodine receptor/Ca<sup>2+</sup> release channels are differentially expressed in rabbit brain." *J Neurosci* 14(8): 4794-4805.
- Gage FH, Dunnet SB and Bjorklund A (1984). "Spatial learning and motor deficits in aged rats." *Neurobiol Aging* 5(1): 43-48.
- Galeotti N, Quanttrone A and Vivoli E (2008). "Different involvement of type 1, 2, and 3 ryanodine receptors in memory processes." *Learn Mem* 15(5): 315-323.
- Gamiz, F y Gallo, M (2012). "Spontaneous object recognition memory in aged rats: Complexity versus similarity." *Learn Mem* 19(10): 444-448.
- Gant, J. C., M. M. Sama, et al. (2006). "Early and simultaneous emergence of multiple hippocampal biomarkers of aging is mediated by Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release." *J Neurosci* 26(13): 3482-3490.

- Gruart, A, Muñoz, MD, Delgado-García, JM (2006). "Involvement of the CA3-CA1 synapse in the acquisition of associative learning in behaving mice." *J Neurosci* 26(4):1077-1087.
- Guzowski, JF., Lyford, GL., Stevenson, GD., Houston, FP., McGaugh JL., Worley, PF y Barnes CA. (2000). "Inhibition of activity-dependent arc protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory." *J Neurosci* 20(11): 3993-4001.
- Guzowski, J.F., Setlow, B., Wagner, EK y McGaugh, JL. (2001). "Experience-dependent gene expression in the rat hippocampus after spatial learning: a comparison of the immediate-early genes Arc, c-fos, and zif268." *J Neurosci* 21(14): 5089-5098.
- Hamilton, SL y Serysheva, I. (2009). "Ryanodine receptor structure: progress and challenges." *J Biol Chem* 284(7): 4047-4051.
- Heidbreder, CA y Groenewegen, HJ. (2003). "The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics." *Neurosci Biobehav Rev* 27(6): 555-579.
- Hertle, DN y Yeckel, MF (2007). "Distribution of inositol-1,4,5-trisphosphate receptor isoforms and ryanodine receptor isoforms during maturation of the rat hippocampus." *Neuroscience* 150(3): 625-638.
- Hidalgo, C., Bull, R., Behrens, MI y Donoso, P. (2004). "Redox regulation of RyR-mediated Ca<sup>2+</sup> release in muscle and neurons." *Biol Res* 37(4): 539-552.
- Hidalgo, C y Carrasco MA. (2011). "Redox control of brain calcium in health and disease." *Antioxid Redox Signal* 14(7): 1203-1207.
- Impey, S., Smith, DM., Obrietan, K., Donahue, R., Wade, C y Storm, DR. (1998). "Stimulation of cAMP response element (CRE)-mediated transcription during contextual learning." *Nat Neurosci* 1(7): 595-601.
- Ingram, DK., London, E. D y Goodrick, CL. (1981). "Age and neurochemical correlates of radial maze performance in rats." *Neurobiol Aging* 2(1): 41-47.
- Kadish, I., Thibault, O., Blalock, EM., Chen, KC., Gant, JC., Porter, NM y Landfield, PW. (2009). "Hippocampal and cognitive aging across the lifespan: a bioenergetic shift precedes and increased cholesterol trafficking parallels memory impairment." *J Neurosci* 29(6): 1805-1816.
- Kandel E. (2012). "The molecular biology of memory: cAMP, PKA, CRE, CREB-1, CREB-2, and CPEB". *Molecular Brain* 5:14.
- Kealy, J y Commins, S. (2011). "The rat perirhinal cortex: A review of anatomy, physiology, plasticity, and function." *Prog Neurobiol* 93(4): 522-548.
- Korkotian, E y Segal, M. (1999). "Release of calcium from stores alters the morphology of dendritic spines in cultured hippocampal neurons." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(21): 12068-12072.
- Kumar, A., Bodhinathan, K y Foster, TC. (2009). "Susceptibility to Calcium Dysregulation during Brain Aging." *Front Aging Neurosci* 1: 2.
- Kumar, A y Foster, TC. (2005). "Intracellular calcium stores contribute to increased susceptibility to LTD induction during aging." *Brain Res* 1031(1): 125-128.
- Lanner, JT., Georgiou, DK., Joshi, AD y Hamilton, SL. (2010). "Ryanodine receptors: structure, expression, molecular details, and function in calcium release." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2(11): 3996.
- Lee, HK., Barbarosie, M., Kameyama, K., Bear, M y Huganir R (2000) "Regulation of distinct AMPA phosphorylation sites during bidirectional synaptic plasticity". *Nature* 405(6789):955-959.

- Liu, P., Y. Jin y Zhan, H. (2009). "Age-related changes in arginine and its metabolites in memory-associated brain structures." *Neuroscience* 164(2): 611-628.
- Liu, P., Smith, PF y Darlington, C. (2008). "Glutamate receptor subunits expression in memory-associated brain structures: regional variations and effects of aging." *Synapse* 62(11): 834-841.
- Lu, Y. F. y Hawkins, RD. (2002). "Ryanodine receptors contribute to cGMP-induced late-phase LTP and CREB phosphorylation in the hippocampus." *J Neurophysiol* 88(3): 1270-1278.
- Lukaszewska, I. y Radulska, A (1994). "Object recognition is not impaired in old rats." *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 54(2): 143-150.
- Malenka, R y Nicoll, R. (1999) Long-term potentiation –a decade of progress?. *Science* 285: 1870-1874
- Markowska, AL y Breckler, SJ. (1999). "Behavioral biomarkers of aging: illustration of a multivariate approach for detecting age-related behavioral changes." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 54(12): B549-566.
- Massey, P., Johnson, B., Moulton, P., Auberson, Y., Brown, M., Molnar, E., Collingridge, G y Bashir, Z (2004). "Differential Roles of NR2A and NR2B-Containing NMDA Receptors in Cortical Long-Term Potentiation and Long-Term Depression." *J Neurosci* 24(36):7821-7828.
- Munoz P, Aspé M, Contreras L and Palacios A (2010) "Correlations of recognition memory performance with expression and methylation of brain-derived neurotrophic factor in rats". *Biol Res* 43(2):251-258.
- McTighe, S. M., Cowell, RA., Winters, BD., Bussey, TJ y Saksida, LM. (2010). "Paradoxical false memory for objects after brain damage." *Science* 330(6009): 1408-1410.
- Monti, B., Berteotti, C y Contestabile, A.(2005). "Dysregulation of memory-related proteins in the hippocampus of aged rats and their relation with cognitive impairment." *Hippocampus* 15(8): 1041-1049.
- Morris, R. (1984). "Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat." *J Neurosci Methods* 11(1): 47-60.
- Morris, RG., Garrud, P., Rawlins JN y O'Keefe J. (1982). "Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions." *Nature* 297(5868): 681-683.
- Moyer, JR., Furtak, S.C., McGann, JP y Brown TH. (2011). "Aging-related changes in calcium-binding proteins in rat perirhinal cortex." *Neurobiol Aging* 32(9): 1693-1706.
- Naber, PA., Witter, MP y Lopez da Silva, FH.(1999). "Perirhinal cortex input to the hippocampus in the rat: evidence for parallel pathways, both direct and indirect. A combined physiological and anatomical study." *Eur J Neurosci* 11(11): 4119-4133.
- Norris, C., Korol, D y Foster T (1996) "Increased susceptibility to induction of long-term depression and long-term potentiation reversal during aging". *J Neurosci* 16(17):5382-5392.
- O'Keefe, J. (1976). "Place units in the hippocampus of the freely moving rat." *Exp Neurol* 51(1): 78-109.
- O'Keefe, J y Dostrovsky, J. (1971). "The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat." *Brain Res* 34(1): 171-175.
- Paula-Lima, A. C., T. Adasme, et al. (2014). "Contribution of Ca Release Channels to Hippocampal Synaptic Plasticity and Spatial Memory: Potential Redox Modulation." *Antioxid Redox Signal*.

- Pfaffl, MW. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." *Nucleic Acids Res* 29(9): e45.
- Rapp, PR., Deroche, PS., Mao, Y., Burwell, RD. (2002). "Neuron number in the parahippocampal region is preserved in aged rats with spatial learning deficits." *Cereb Cortex* 12(11): 1171-1179.
- Rapp, PR., Rosenberg, RE y Gallagher, M. (1987). "An evaluation of spatial information processing in aged rats." *Behav Neurosci* 101(1): 3-12.
- Raymond CR. (2007). "LTP form 1,2 and 3:different mechanisms for the "long" in long-term potentiation". *Trends Neurosci* 30(4):167-175.
- Robillard, JM., Gordon,GR., Choi,HB., Christie, BR and MacVicar, BA. (2011). "Glutathione restores the mechanism of synaptic plasticity in aged mice to that of the adult". *Plos One* 6(5):e20676-e20679.
- Rosenzweig E y Barnes C. (2003). "Impact of aging on hippocampal function:plasticity, network dynamics, and cognition". *Progress in Neurol* 69(3):143-179.
- Save E, Poucet B, Foreman N and Buhot MC (1992). "Object exploration and reactions to spatial and nonspatial changes in hooded rats following damage to parietal cortex or hippocampal formation." *Behav Neurosci* 106(3): 447-456.
- Segal, M y Korkotian, E.(2014). "Endoplasmic reticulum calcium stores in dendritic spines." *Front Neuroanat* 8: 64-69.
- Sharp, AH., McPherson, PS., Dawson, TM., Aoki, C., Campbell, K.P y Snyder, S.H (1993). "Differential immunohistochemical localization of inositol 1,4,5-trisphosphate- and ryanodine-sensitive Ca<sup>2+</sup> release channels in rat brain." *J Neurosci* 13(7): 3051-3063.
- Shukitt-Hale, B. (1999). "The effects of aging and oxidative stress on psychomotor and cognitive behavior." *Age (Omaha)* 22(1): 9-17.
- Silva, AJ., Kogan, JH., Frankland, PW y Kida, S. (1998). "CREB and memory." *Annu Rev Neurosci* 21: 127-148.
- Squire, LR. (1992). "Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans." *Psychol Rev* 99(2): 195-231.
- Squire, L. R. y Zola SM. (1996). "Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(24): 13515-13522.
- Stutzmann, GE., Smith, I., Caccamo, A., Oddo, S., Laferla, FM y Parker, I. (2006). "Enhanced ryanodine receptor recruitment contributes to Ca<sup>2+</sup> disruptions in young, adult, and aged Alzheimer's disease mice." *J Neurosci* 26(19): 5180-5189.
- Taubenfeld, S. M., K. A. Wiig, et al. (1999). "A molecular correlate of memory and amnesia in the hippocampus." *Nat Neurosci* 2(4): 309-310.
- Thibault, O., Hadley,R y Landfield, PW. (2001). "Elevated postsynaptic [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and L-type calcium channel activity in aged hippocampal neurons: relationship to impaired synaptic plasticity." *J Neurosci* 21(24): 9744-9756.
- Thibault, O y Landfield, PW. (1996). "Increase in single L-type calcium channels in hippocampal neurons during aging." *Science* 272(5264): 1017-1020.
- Uekita, T y Okanoya K. (2011). "Hippocampus lesions induced deficits in social and spatial recognition in *Octodon degus*." *Behav Brain Res* 219(2): 302-309.
- van der Staay, FJ. y de Jonge, M. (1993). "Effects of age on water escape behavior and on repeated acquisition in rats." *Behav Neural Biol* 60(1): 33-41.
- Van Petegem, F. (2012). "Ryanodine receptors: structure and function." *J Biol Chem* 287(38): 31624-31632.

- Veng, LM y Browning MD. (2002). "Regionally selective alterations in expression of the alpha(1D) subunit (Ca(v)1.3) of L-type calcium channels in the hippocampus of aged rats." *Brain Res Mol Brain Res* 107(2): 120-127.
- Veng, LM., Mesches, MH y Browning, MD (2003). "Age-related working memory impairment is correlated with increases in the L-type calcium channel protein alpha1D (Cav1.3) in area CA1 of the hippocampus and both are ameliorated by chronic nimodipine treatment." *Brain Res Mol Brain Res* 110(2): 193-202.
- Wan H, Aggleton, J y Brown, M. (1999). "Different contributions of the hippocampus and perirhinal cortex to recognition memory." *J Neurosci* 19(3): 1142-1148.
- Warburton, EC y Brown, MW. (2010). "Findings from animals concerning when interactions between perirhinal cortex, hippocampus and medial prefrontal cortex are necessary for recognition memory." *Neuropsychologia* 48(8): 2262-2272.
- Whitlock J, Heynen A, Shuler M and Bear. (2006). "Learning induces long-term potentiation in the hippocampus." *Science* 313(5790): 1093-1097.
- Wimmer, ME., Hernandez,PJ., Blackvell, J y Abel, T. (2012). "Aging impairs hippocampus-dependent long-term memory for object location in mice." *Neurobiol Aging* 33(9): 2220-2224.
- Winters, BD y Bussey,TJ. (2005). "Removal of cholinergic input to perirhinal cortex disrupts object recognition but not spatial working memory in the rat." *Eur J Neurosci* 21(8): 2263-2270.
- Winters, BD. y Bussey, TJ. (2005). "Transient inactivation of perirhinal cortex disrupts encoding, retrieval, and consolidation of object recognition memory." *J Neurosci* 25(1): 52-61.
- Winters, BD., Forwood, SE., Cowell, RA., Saksida, LM y Bussey TJ. (2004). "Double dissociation between the effects of peri-postrhinal cortex and hippocampal lesions on tests of object recognition and spatial memory: heterogeneity of function within the temporal lobe." *J Neurosci* 24(26): 5901-5908.
- Witter, MP., Wouterlood, FG., Naber, PA y Van Haeften T. (2000). "Anatomical organization of the parahippocampal-hippocampal network." *Ann N Y Acad Sci* 911: 1-24.
- Xiang, JZ. y Brown, MW. (1998). "Differential neuronal encoding of novelty, familiarity and recency in regions of the anterior temporal lobe." *Neuropharmacology* 37(4-5): 657-676.
- Yankner, B. A., Lu, T y Loerch, P.(2008). "The aging brain." *Annu Rev Pathol* 3: 41-66.
- Zhao, W., Meiri, N., Xu, H., Cavallaro, S., Quattrone, A., Zhan, L y Alkon, DL. (2000). "Spatial learning induced changes in expression of the ryanodine type II receptor in the rat hippocampus." *FASEB J* 14(2): 290-300.
- Zucchi, R. y Ronca-Testoni ,S. (1997). "The sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> channel/ryanodine receptor: modulation by endogenous effectors, drugs and disease states." *Pharmacol Rev* 49(1): 1-51.