

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE MEDICINA

ESCUELA DE POSTGRADO



**“EFECTO DEL ANTAGONISTA DE LOS RECEPTORES H₃
DE HISTAMINA SOBRE MEMORIA ESPACIAL,
NEUROGÉNESIS Y PLASTICIDAD HIPOCAMPAL EN
RATAS CON ASFIXIA PERINATAL”**

JESSICA MARÍA SÁNCHEZ TORRES

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN NEUROCIENCIAS

Directores de Tesis: Prof. Dr. José Luis Valdés Guerrero

Prof. Dra. Paola Morales Retamales

2018

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina que la Tesis de Magíster presentada por la candidata

JESSICA MARÍA SÁNCHEZ TORRES

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magíster en Neurociencias en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 19 de marzo de 2018.

Prof. Dr. José Luis Valdés Guerrero
Director de Tesis
Universidad de Chile

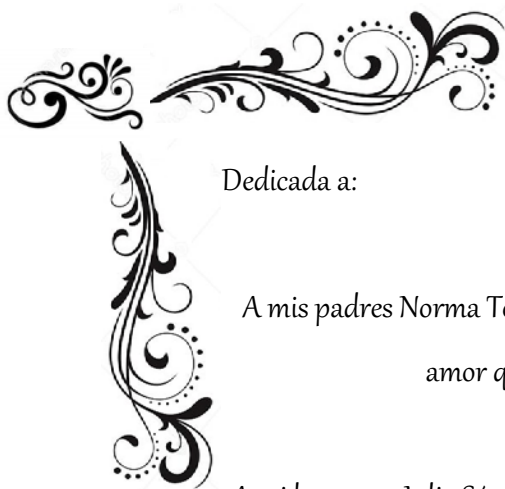
Prof. Dra. Paola Morales Retamales
Directora de Tesis
Universidad de Chile

COMISIÓN INFORMANTE DE TESIS

Prof. Dra. Jimena Sierralta

Prof. Dra. Andrea Paula-Lima

Prof. Dr. Pedro Maldonado
Presidente Comisión



Dedicada a:

A mis padres Norma Torres y Benjamín Sánchez por el gran apoyo y amor que siempre me han brindado

A mi hermano Julio Sánchez por darme ánimo y ayudarme a entender que los sueños se pueden hacer realidad

A Pascualita por su compañía constante y hacerme ver la vida de otra manera

y

A Álvaro por su amor, comprensión y apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer de manera especial a todas las personas que contribuyeron con la realización de este trabajo y que me permitieron culminar con éxito esta gran etapa de mi vida académica.

A mis directores de tesis, el Dr. José Luis Valdés y la Dra. Paola Morales por su orientación, dedicación, comprensión y apoyo constantes durante el desarrollo de este trabajo.

A Andrea Birkner por toda su ayuda técnica, comprensión, cariño y su amistad.

A Juan Galindo por su paciencia y todo el tiempo que dedicó en enseñarme los procesos técnicos necesarios para el trabajo en laboratorio.

A Yerko Fuentealba, Stephanie Cortez Blacutt y Noemí Grinspun por su ayuda técnica y por ayudarme a resolver todas mis dudas.

A Jamileth More por sus consejos y apoyo académico brindado todo este tiempo.

A Javier Silva por el tiempo que dedicó a resolver mis dudas.

A Andrea Tapia por su buena disposición, ayuda académica y su simpatía.

A Ronald Pérez por su ayuda inicial en la realización de los experimentos bioquímicos.

Al profesor Diego Bustamante por su simpatía y porque con cada conversación había algo nuevo que aprender.

A la Sra. Carmen Almeyda por su buena disposición y ayuda técnica brindada.

Quiero agradecer de manera especial a mi novio Álvaro Dávila por su amor, su comprensión y su apoyo constante tanto en lo académico como en lo personal.

Además, quiero agradecer de manera especial a la Fundación Guillermo Puelma por la beca de apoyo económico brindada durante la realización de mi tesis.

Y finalmente quiero agradecer a mi familia por todo el amor y apoyo brindados, porque ellos han sido la motivación constante que me ha permitido emprender con éxito todos mis proyectos.

ÍNDICE

RESUMEN	vii
ABSTRACT	ix
ABREVIATURAS	xi
I. INTRODUCCIÓN	12
1.1 Memoria espacial, plasticidad y neurogénesis hipocampal.....	12
1.2 Histamina en la memoria, plasticidad sináptica y neurogénesis.....	16
1.2.1 Histamina	16
1.2.2 Rol del receptor H ₃	18
1.3 La asfixia perinatal (AP).....	19
1.3.1 La AP como modelo	19
1.3.2 Memoria, plasticidad, histamina y neurogénesis en la AP	20
II. HIPÓTESIS.....	23
III. OBJETIVOS.....	23
3.1 Objetivo General	23
3.2 Objetivos Específicos.....	23
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	24
4.1 Diseño experimental.....	24
4.1.1 Animales	24
4.1.2 Inducción de la AP.....	24
4.1.3 Tratamiento farmacológico.....	25
4.1.4 Prueba de reconocimiento espacial.....	25
4.1.5 Procedimiento experimental	27

4.2 Procedimientos técnicos.....	28
4.2.1 Eutanasia.....	28
4.2.2 Histología.....	29
4.2.3 Inmunohistoquímica	29
4.2.4 Recuento celular	30
4.2.5 Software y Análisis Estadísticos.....	30
V. RESULTADOS	31
5.1 Evaluación de parámetros Apgar sobre la AP	31
5.2 Efecto del antagonista de los receptores H3 de histamina (tioperamida) en la formación de memoria espacial mediante la prueba de reconocimiento de objetos en la modalidad de localización.....	32
5.3 Efecto del antagonista de los receptores H3 de histamina (tioperamida) en la plasticidad sináptica hipocampal mediante inmunohistoquímica para Arc.....	34
5.4 Efecto del antagonista de los receptores H3 de histamina (tioperamida) en la neurogénesis hipocampal mediante inmunohistoquímica para doblecortina (Dcx). 	41
VI. DISCUSIÓN	46
VII. CONCLUSIONES	54
VIII. BIBLIOGRAFÍA	55

RESUMEN

La asfixia perinatal (AP) consiste en la interrupción de la disponibilidad de oxígeno hacia el feto durante el parto e implica una desregulación del intercambio gaseoso, produciendo acidosis metabólica y una crisis energética, lo que podría causar muerte celular.

La AP puede afectar distintas estructuras cerebrales, particularmente circuitos del hipocampo, y ocasionar un déficit de memoria espacial junto con la alteración del sistema neuromodulador histaminérgico. El autorreceptor H3 de histamina inhibe la síntesis y liberación de histamina por lo que antagonistas para este receptor aumentan la disponibilidad cerebral de este neurotransmisor, con efectos pro-cognitivos en sujetos normales o de reversión en el déficit de memoria en algunos modelos experimentales. Estudios previos de nuestro laboratorio mostraron que la AP induce una disminución del número y actividad de células histaminérgicas en el núcleo tuberomamilar del hipotálamo (NTM) lo que está asociado a una disminución de aprendizaje y de memoria no espacial evaluado por medio de una tarea de reconocimiento de objetos (modalidad novedad- independiente del hipocampo), por lo que este neuromodulador se sugiere como un blanco terapéutico interesante y novedoso para revertir procesos de deterioro cognitivo.

En este estudio se investigó si el déficit de memoria espacial en ratas adultas con AP podría ser prevenido por la administración de tioperamida, un antagonista de los receptores H3, y si esta mejora cognitiva pudiese ser debida a un aumento de la plasticidad sináptica y neurogénesis hipocampal. Esto se evaluó mediante análisis conductual (prueba de reconocimiento de objetos, modalidad localización-dependiente del hipocampo) e inmunohistoquímica para marcadores de plasticidad sináptica (Arc) y de neurogénesis (Dcx).

Comparado con los controles los animales con AP no mostraron diferencias significativas en cuanto al rendimiento de la memoria espacial (evaluada 1 hora después de la adquisición) y la expresión de Dcx. En contraste a lo anterior, la AP indujo una disminución significativa de la expresión de Arc comparado con los controles.

El tratamiento con tioperamida no tuvo efecto en la memoria espacial (1 hora post-adquisición), la expresión de Arc y de Dcx en los animales con AP y controles.

En conclusión, luego de una tarea de aprendizaje espacial, las ratas adultas con AP evidenciaron una disminución de la plasticidad sináptica comparado con los controles. Sin embargo, no evidenciaron diferencias en la memoria espacial (evaluada 1 hora post-adquisición), ni en la neurogénesis. No se descartan efectos a largo plazo. El tratamiento con tioperamida no tuvo efecto en la memoria espacial, plasticidad sináptica y neurogénesis hipocampal.

ABSTRACT

Perinatal Asphyxia (PA) is the interruption of the availability of oxygen to the fetus during delivery and involves a deregulation of gas exchange which produces metabolic acidosis and an energy crisis, which may cause cell death.

PA can affect different brain structures, particularly circuits of the hippocampus, causing spatial memory deficit along with an alteration of the histaminergic neuromodulatory system. The histamine H3 autoreceptor inhibits the synthesis and release of histamine and therefore the antagonists of this receptor increase the brain availability of this neurotransmitter, causing pro-cognitive effects in normal subjects or reversing memory deficits in some experimental models. Previous research from our laboratory showed that PA induces a decrease in the number and activity of histaminergic cells in the tuberomamillary nucleus of the hypothalamus (TMN), which is associated with a decrease in learning and non-spatial memory evaluated by an object recognition test (novel object preference task, hippocampus-independent memory), suggesting this neuromodulator as an interesting and novel therapeutic target to reverse cognitive impairment processes.

This research investigated whether the deficit of spatial memory in adult rats with AP could be prevented by the administration of thioperamide, an antagonist of the H3 receptors, and whether this cognitive improvement could be due to an increase in synaptic plasticity and hippocampal neurogenesis. This was assessed by behavioral analysis (object recognition test, hippocampus location-dependent method) and immunohistochemistry for synaptic plasticity (Arc) and neurogenesis (Dcx) markers.

Compared with the controls, the AP animals did not show significant differences in relation to the performance of the spatial memory (evaluated 1 hour after acquisition) and Dcx expression. In contrast with the above, the PA led to a significant decrease of Arc expression compared with controls.

Treatment with thioperamide had no effect in the spatial memory (1 hour post-acquisition), the Arc and Dcx expression in AP and control animals.

In conclusion, after a spatial learning task, the adult rats with AP showed a decrease of the synaptic plasticity in comparison with the controls, however there were no differences in the spatial memory (evaluated 1 hour after acquisition), or in the neurogenesis. Long term effects are not discarded. Treatment with thioperamide did not affect the spatial memory, synaptic plasticity and hippocampal neurogenesis.

ABREVIATURAS

AP	Asfixia perinatal
Arc	Proteína asociada al citoesqueleto regulada por actividad
BrdU	Bromodesoxiuridina (5-bromo-2-desoxiuridina)
CA	Cornu ammonis
CE	Corteza entorrinal
DAB	Diaminobencidina
DCX	Doblecortina
FMUCH	Facultad de Medicina de la Universidad de Chile
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
GC	Giro cingulado
IEG	Gen de expresión inmediata temprana
IR	Índice de reconocimiento
LTP	Potenciación a largo plazo
MAP-2	Proteína asociada a microtúbulos
NMDA	N-metil D-aspartato
NS	Núcleo septal
PB	Buffer fosfato
PBS	Buffer fosfato salino
PSD	Densidad postsináptica
SB	Subiculum
SNC	Sistema Nervioso Central
ZSG	Zona subgranular
ZSV	Zona subventricular

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Memoria espacial, plasticidad y neurogénesis hipocampal

El aprendizaje es el mecanismo mediante el cual se adquiere información nueva, generando cambios en la conducta del individuo con relación a las experiencias vividas, lo que le permite conocer, adaptarse y desenvolverse en el medio. El aprendizaje requiere del funcionamiento de la memoria, proceso cognitivo que permite codificar, almacenar y recuperar la información, siendo el hipocampo una estructura importante para llevar a cabo este proceso y fundamental para el procesamiento de la información espacial (Barker y Warburton, 2011; Broadbent et al., 2010; Clark et al., 2000; Morris et al., 1982, 1990). El hipocampo es una estructura ubicada en la porción media del lóbulo temporal que está compuesta por: el giro dentado (GD), el *cornu ammonis* (CA) y el *subiculum* (SB). El hipocampo se conecta con áreas de asociación cortical y con estructuras límbicas como el núcleo septal (NS) y el giro cingulado (GC) y adicionalmente, está interconectado con la corteza entorrinal (CE) cuyos axones proyectan hacia las dendritas de neuronas granulares en el GD, y neuronas piramidales en CA1 y CA3. Los axones de las neuronas granulares del GD (fibras musgosas) hacen sinapsis con neuronas piramidales en CA3, que a su vez proyectan hacia las neuronas piramidales en CA1 (colaterales de Schaffer) y CA2. Las neuronas granulares del GD reciben aferencias glutamatérgicas principalmente desde las capas II- III de la CE a través de la vía perforante y aferencias GABAérgicas desde las interneuronas del *hilus* ubicado entre ambas bandas del GD; las neuronas piramidales de CA1 y CA3 también reciben información de las capas II y III de la CE (Felten y Shetty, 2010; Paxinos, 2015) (ver **Figura 1**). Todo este circuito permite que las aferencias sensoriales de diferentes partes del cerebro se procesen y consoliden en el hipocampo, regresen a la corteza entorrinal y finalmente, a cortezas de asociación.

El hipocampo tiene un papel clave en el procesamiento de la memoria espacial. Así, lesiones hipocampales producen déficits de reconocimiento espacial en ratas evaluadas por medio del Laberinto Acuático de Morris (Morris et al., 1982, 1990) y en diferentes configuraciones de la prueba de reconocimiento de objetos, con excepción de la prueba en configuración novedad, demostrando así que el hipocampo juega un rol crucial en el

procesamiento de información con contenido espacial (Barker y Warburton, 2011; Broadbent et al., 2010; Clark et al., 2000). De esta manera, se ha demostrado mediante registros electrofisiológicos que células hipocampales responden con una alta tasa de disparo cuando el animal navega por un espacio específico del ambiente. Este tipo de neuronas piramidales se llaman *Place Cells* que junto con las *Grid Cells*, *Head Direction Cells*, *Border Cells* y *Speed Cells* permiten al hipocampo codificar la posición, dirección, distancia y velocidad respectivamente, cuando un animal navega o recorre un espacio determinado (O'Keefe y Dostrovsky, 1971) y son de gran importancia debido a que generan un mapa de representación espacial cerebral debido al desplazamiento del animal, en donde el mismo ambiente espacial puede activar diferentes subpoblaciones de células en un individuo (Dombeck et al., 2010).

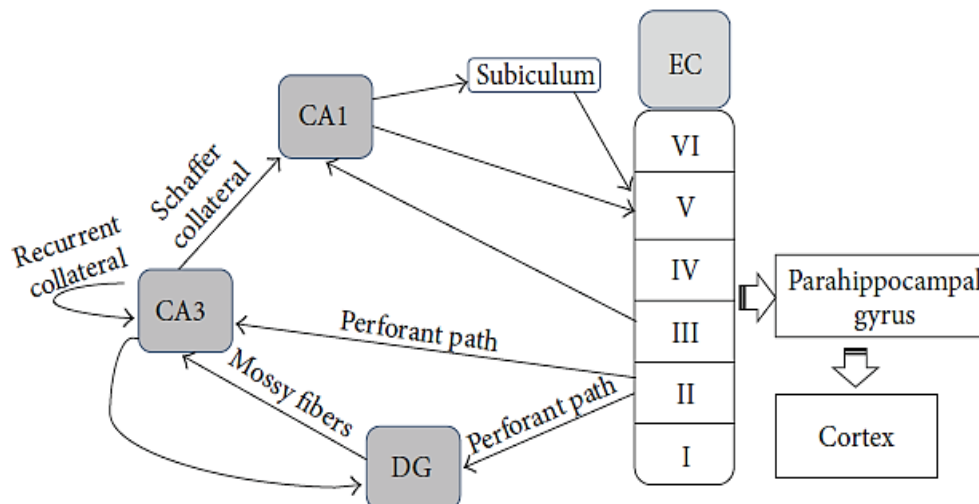


Figura 1. Representación general de la conectividad del hipocampo. Se muestra la vía monosináptica (proyecciones desde EC a CA1 o CA3) y la vía trisináptica (proyecciones desde EC a DG, CA3 y CA1). EC: corteza entorrinal; DG: giro dentado; CA: cornu ammonis (Yau et al., 2015).

Por lo tanto, la memoria espacial denota nuestra orientación en el espacio y permite generar una representación de los distintos lugares en los cuales nos movemos y recordar las situaciones asociadas a esos ambientes, siendo una memoria que depende de la integridad del hipocampo. Así, todo este proceso de aprendizaje provoca cambios en la plasticidad cerebral que implican modificaciones en la eficiencia de la transmisión sináptica e involucra el reordenamiento de las redes neuronales en respuesta a un estímulo (Hebb, 1949; Stanton,

1996). Estos cambios en plasticidad cerebral se pueden observar a través de varios mecanismos de plasticidad sináptica, siendo la expresión de Arc el mecanismo utilizado en el presente estudio.

El gen Arc forma parte de la familia de genes de expresión inmediata- temprana (*IEG*) que codifica para una proteína asociada al citoesqueleto Arg3.1 (*activity-regulated cytoskeleton-associated protein/activity-regulated gene 3.1*) y se reconoce como un marcador de actividad y plasticidad sináptica que participa en procesos de consolidación de memoria (Link et al., 1995). En el GD la consolidación de la *LTP* (potenciación a largo plazo) requiere de un período sostenido de síntesis de Arc que comienza, aproximadamente, 5 minutos desde la inducción de una estimulación de alta frecuencia y puede permanecer por 2 a 4 horas (Messaoudi et al., 2007). Después de esta estimulación, la actividad sináptica glutamatérgica, mediada por los receptores NMDA y señales extracelulares reguladas por quinasas, inducen la transcripción del mRNA de Arc en el soma. Si el estímulo es de larga duración, entonces el mRNA se transporta e induce la traducción de Arc en las espinas dendríticas de las células granulares del GD para así generar cambios permanentes asociados con la *LTP*, como expansión de densidades postsinápticas, aumento de espinas dendríticas postsinápticas y cambios en la sinaptogénesis (Guzowski et al., 2000; Panja et al., 2009; Steward y Worley, 2001).

La inducción de la expresión de Arc en las neuronas del GD se ha relacionado con el procesamiento de la información durante la exploración espacial (Ramirez-Amaya et al., 2013) siendo dependiente de la experiencia y crucial en la plasticidad y formación de memorias a largo plazo (Guzowski et al., 2000). Así, se ha demostrado que la inhibición temporal de la expresión de Arc en el GD impide la consolidación de la memoria a largo plazo (Nakayama et al., 2015) y de la misma manera, los ratones *knockout* para Arc no logran formar memoria a largo plazo en tareas de aprendizaje espacial y no espacial incluyendo el laberinto acuático de Morris y el reconocimiento de objetos respectivamente (Plath et al., 2006).

Por tanto, dado que el GD es una estructura importante en los procesos de memoria (Gilbert et al., 2001; Hernández-Rabaza et al., 2008; Traub y Miles, 1991) investigaciones sugieren que la neurogénesis adulta en la zona subgranular (ZSG) del GD es fundamental para el mantenimiento del circuito hipocampal al permitir el favorecimiento de la memoria. Así, se

demonstró que la inhibición de la neurogénesis hipocampal en ratones adultos jóvenes con el agente antimitótico metilazoxymetanol induce alteración en la memoria espacial evaluada por medio del Laberinto Acuático de Morris (Goodman et al., 2010) y de manera similar, al inhibir la neurogénesis adulta por medio de bajas dosis de radiación, ratas Long Evans evaluadas mediante la misma tarea, presentaron déficits en la memoria a largo plazo (Snyder et al., 2005).

La neurogénesis postnatal es un proceso que ocurre principalmente en dos regiones del SNC: en la zona subventricular (ZSV) ubicada en la pared de los ventrículos laterales y en la ZSG del GD del hipocampo (Altman, 1969; Altman y Das, 1965), siendo esta última la evaluada en el presente estudio. Los estudios indican que aproximadamente 700 nuevas neuronas se generan diariamente en el hipocampo del humano adulto (Spalding et al., 2013) mientras que en ratas adultas las células progenitoras neurales originan cerca de 9000 células nuevas de las cuales aproximadamente la mitad de ellas son precursores neuronales (Cameron y McKay, 2001). Las células progenitoras neurales son células que pueden autorrenovarse y diferenciarse en células neuronales y gliales, incluyendo oligodendrocitos y astrocitos (Gage, 2000; Reynolds y Weiss, 1992). En la neurogénesis adulta la proliferación de las células progenitoras neurales en el GD genera neuronas inmaduras que se diferenciarán, migrarán e incorporarán al circuito neuronal existente (Aimone et al., 2014) (ver **Figura 2**). Así, para la primera semana de maduración las nuevas neuronas no muestran actividad sináptica, es sólo durante la segunda y tercera semana que empiezan a presentar cambios en las amplitudes de sus potenciales de acción haciéndose visibles sus procesos dendríticos con pequeñas formaciones que se convertirán en espinas dendríticas y recibirán aferencias excitatorias provenientes de la vía perforante (Espósito et al., 2005). Para la cuarta semana de maduración las nuevas neuronas presentarán propiedades fisiológicas similares a neuronas granulares maduras como ramificaciones y espinas dendríticas (Ge et al., 2007; Zhao, 2006) (ver **Figura 2**). Todo este proceso de neurogénesis se puede observar a través de varios mecanismos celulares, entre los cuales se encuentra la Doblecortina (Dcx), utilizada en el presente estudio. La Doblecortina es una proteína microtubular citoplasmática codificada por el gen Dcx que se expresa exclusivamente en precursores neuronales recién generados y permanece durante el período de diferenciación neuronal que abarca entre 10 y 14 días (J. Brown et al., 2003; Couillard-Despres et al., 2005). Así, la doblecortina es un marcador que se encuentra

exclusivamente en neuronas inmaduras que están en procesos de migración y diferenciación (Gleeson et al., 1999).

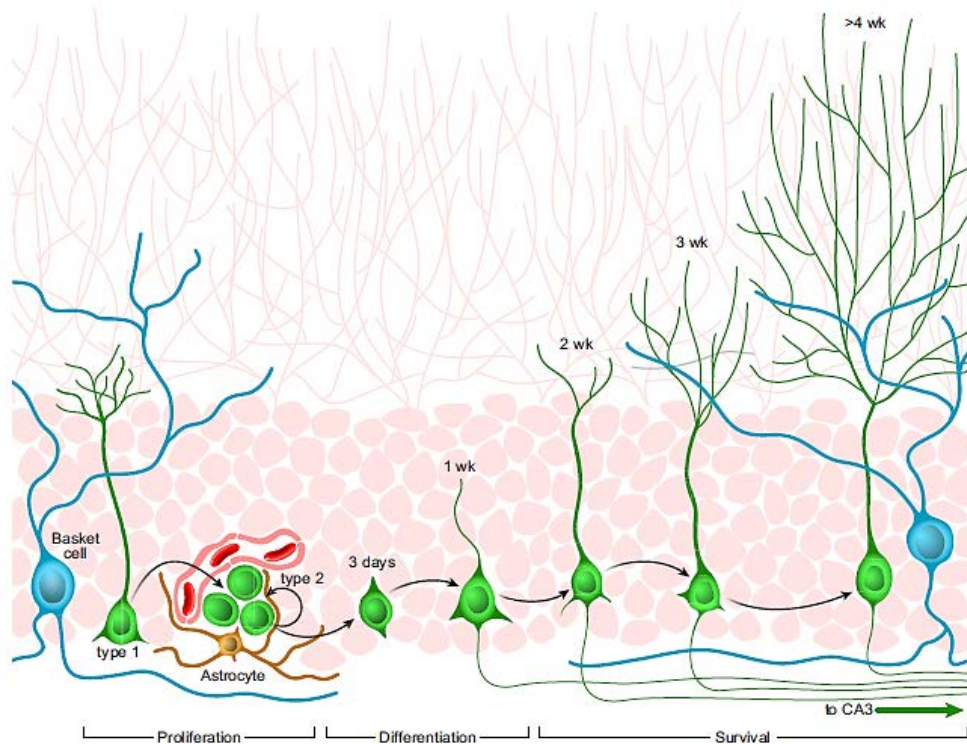


Figura 2. Desarrollo de las células granulares del GD, desde las células progenitoras hasta su maduración. Las nuevas neuronas pueden provenir de dos poblaciones de células progenitoras: las células tipo 1 (células gliales radiales) y las células tipo 2 (progenitoras neuronales). Las nuevas células se diferencian en neuronas que posteriormente alcanzarán su madurez (Aimone et al., 2014).

Por otro lado, diversos neurotransmisores pueden modular la memoria y la neurogénesis. Como se verá a continuación, la histamina se aborda en la presente investigación debido a que existen crecientes hallazgos que la catalogan como un importante modulador en estos dos procesos.

1.2 Histamina en la memoria, plasticidad sináptica y neurogénesis

1.2.1 Histamina

La histamina es una imidazolamina sintetizada a partir del aminoácido histidina por la histidina descarboxilasa en las neuronas histaminérgicas ubicadas en el núcleo tuberomamilar

(NTM) del hipotálamo basal posterior, las cuales proyectan ampliamente hacia distintas regiones cerebrales (ver **Figura 3**) (Panula et al., 1984; Watanabe et al., 1984; Yanai y Tashiro, 2007). Las principales aferencias hacia el NTM provienen de la corteza infralímbica, septum lateral, núcleo preóptico y grupos neuronales del tronco cerebral (Ericson et al., 1991).

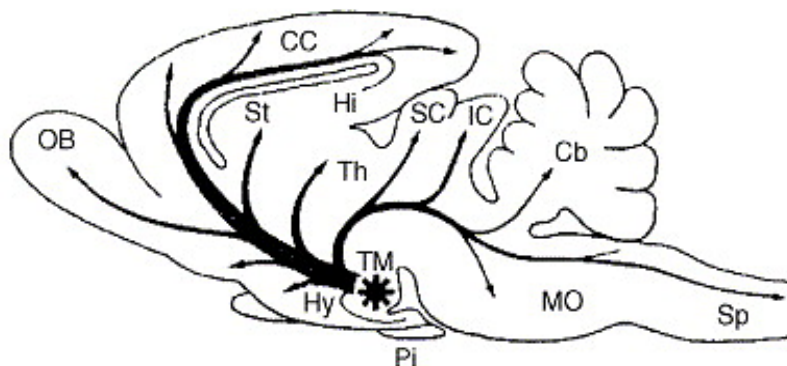


Figura 3. Inervación histaminérgica en el cerebro de ratona (sección sagital). Cb, cerebelo; CC, corteza cerebral; Hi, hipocampo; Hy, hipotálamo; IC, colículo inferior; MO, médula oblonga; OB, bulbo olfatorio; Pi, pituitaria; SC, colículo superior; Sp, médula espinal; St, estriado; Th, tálamo; TM, Núcleo tuberomamilar del hipotálamo (Yanai y Tashiro, 2007).

La histamina ha sido clásicamente asociada a reacciones periféricas inflamatorias (Dale y Laidlaw, 1910) pero también se ha demostrado su papel como neuromodulador de un amplio rango de funciones fisiológicas y cognitivas (Haas et al., 2008; Haas y Panula, 2003; Panula y Nuutinen, 2013; Valdés et al., 2006, 2010). Así, se ha encontrado que la histamina puede favorecer la formación de memoria espacial (Xu et al., 2009) y la plasticidad sináptica (Vorobjev et al., 1993). La histamina puede actuar sobre los receptores NMDA al debilitar la unión de Mg^{2+} para promover las sinapsis glutamatérgicas y potenciar la LTP en el hipocampo (Haas y Panula, 2003; Vorobjev et al., 1993). De la misma manera, se ha encontrado que la histamina puede modular procesos de neurogénesis. Durante el desarrollo de la ratona es una de las primeras moléculas en ser detectada en el sistema nervioso central (Vanhala et al., 1994) y se ha encontrado que puede inducir la proliferación y diferenciación neuronal de células madre neuronales embrionarias (Molina-Hernández y Velasco, 2008; Rodríguez-Martínez et al., 2012).

La actividad histaminérgica cerebral está regulada por medio de tres tipos de receptores histaminérgicos acoplados a proteínas G: H1, H2 y H3 (Haas et al., 2008; Leurs et al., 2005; Ling et al., 2004; Morgan et al., 2007; Munakata y Akaike, 1994) los cuales están ampliamente distribuidos en todo el cerebro (Schwartz et al., 1991). La presente investigación aborda el efecto de la histamina en la memoria, la plasticidad sináptica y la neurogénesis hipocampal mediante el receptor H3 debido a su importancia como autoreceptor al inhibir la síntesis y liberación de histamina (Arrang et al., 1983, 1987) y como heteroreceptor al inhibir la actividad de otros neurotransmisores como glutamato (R. Brown y Haas, 1999), GABA (Bergquist et al., 2006), serotonina (Threlfell et al., 2004), acetilcolina (Bacciottini et al., 2002) y noradrenalina (Carlo et al., 2000).

1.2.2 Rol del receptor H₃

Los receptores H3 fueron descritos en rebanadas de corteza cerebral de ratas al descubrir que la liberación de histamina, dependiente de Ca²⁺, era inhibida con la histamina exógena (Arrang et al., 1983, 1987). La activación presináptica de los receptores H3 inhibe la actividad glutamatérgica al reducir la entrada de Ca²⁺ intracelular, lo que impide la liberación de histamina en las terminales axónicas y, consecuentemente la transmisión sináptica (Doreulee et al., 2000; Dringenberg y Kuo, 2006). De esta manera, estudios con microdiálisis en ratas evidenciaron que al utilizar tioperamida, un antagonista del receptor H3, se produce un aumento de los niveles de histamina en el hipotálamo, la corteza cerebral y el núcleo magnocelular basal (Giannoni et al., 2009). Estos receptores también se localizan en el cerebelo, los ganglios basales, la corteza entorrinal, el núcleo accumbens, la amígdala y, de manera importante en el hipocampo (Pillot et al., 2002).

Se ha demostrado que antagonistas para el receptor histaminérgico H3 favorecen la formación memoria espacial y no-espacial en sujetos con y sin déficits de memoria. Así, al evaluar el efecto del antagonista H3 BF 2649 administrado de forma intraperitoneal en ratones, se observó un mayor rendimiento en la memoria no-espacial mediante la tarea de reconocimiento de objetos (Ligneau et al., 2007). Igualmente, al utilizar el antagonista H3 ciproxifan se encontró un mejor desempeño de memoria espacial en la prueba de Evitación Pasiva (Fox et al., 2002). De la misma manera, al evaluar el efecto de la administración

sistémica de tioperamida en ratones y ratas, se encontraron mejores índices de memoria espacial mediante la prueba de Evitación Pasiva (Bernaerts et al., 2004; Charlier et al., 2013; Miyazaki et al., 1995) y la prueba del Laberinto en Y (Orsetti et al., 2001). Así como ocurre en la memoria, también se ha encontrado que antagonistas para los receptores H3 favorecen la neurogénesis. Se ha demostrado que la administración a largo plazo del antagonista S38093 promueve la neurogénesis en el GD en ratones adultos (Guilloux et al., 2017). Este último antecedente es importante para la presente investigación porque apoya la idea de que la neurogénesis adulta puede ser modulada por la actividad de antagonistas para el receptor H3.

Estos antecedentes muestran que antagonistas para los receptores H3 al inhibir su actividad, favorecen los procesos de memoria espacial y no espacial debido al aumento de la actividad histaminérgica y de la disponibilidad de este neurotransmisor en distintas regiones cerebrales. Dado que la histamina tiene efectos pro-cognitivos en sujetos con y sin déficits de memoria, puede ser un blanco terapéutico interesante y novedoso para revertir procesos de deterioro cognitivo. Para ello, en la presente investigación se evaluó el efecto de la administración de un antagonista del receptor H3, tioperamida, en la memoria espacial de ratas expuestas a asfixia perinatal (AP), las cuales presentan déficits de memoria como se verá a continuación.

1.3 La asfixia perinatal (AP)

1.3.1 La AP como modelo

La asfixia perinatal (AP) es una complicación clínica que provoca una interrupción de la disponibilidad de oxígeno al feto durante el parto, generalmente debido a problemas como la compresión del cordón umbilical, contracciones uterinas anormales y desprendimiento de la placenta (Bax y Nelson, 1993; Berger y Garnier, 1999). Esta desregulación del intercambio gaseoso produce hipoxia, hipercapnia, acidosis y una crisis energética que causa riesgo metabólico junto con muerte celular, incremento en los niveles de neurotransmisores excitatorios y estrés oxidativo (Kohlhauser et al., 1999; Siesjö et al., 1995) incluso cuando no

hay consecuencias fatales para el recién nacido (Berger y Garnier, 1999; Herrera-Marschitz et al., 2011).

En un estudio llevado a cabo en el año 2010 se demostró que la incidencia de la AP en países desarrollados fue de 1-8/1000 nacidos vivos, mientras que en países subdesarrollados esta cifra fue mucho mayor, llegando a 26/1000 nacidos vivos (Kurinczuk et al., 2010). Aproximadamente el 45% de los recién nacidos mueren y el 25% de los que logran sobrevivir (Van Bel y Groenendaal, 2008) presentan alteraciones cognitivas y secuelas neurológicas como déficits de aprendizaje y memoria, problemas conductuales (De Haan et al., 2006) parálisis cerebral, epilepsia, pérdida de la audición, daño visual (Borg, 1997) y alteraciones neuropsiquiátricas (Weitzdoerfer et al., 2004). Así, el modelo de AP en ratas utilizado en el presente estudio (Bjelke et al., 1991; Herrera-Marschitz et al., 1993) presenta varias ventajas: (a) la asfixia que se induce en las ratas reproduce la situación clínica, como por ejemplo cuando la circulación en el cordón umbilical es alterada (Capani et al., 2009); (b) la asfixia es global y afecta al animal completo (Strackx et al., 2010); (c) no es invasivo, lo que evita confundir los efectos con procedimientos quirúrgicos y (d) es apropiado para estudios conductuales, ya que reproduce los déficits conductuales que presentan los niños que han sufrido AP (Herrera-Marschitz et al., 2011).

1.3.2 Memoria, plasticidad, histamina y neurogénesis en la AP

El desequilibrio metabólico originado por este cuadro hipóxico-isquémico ocasiona graves alteraciones cerebrales que van acompañadas de secuelas en el neurodesarrollo tanto en humanos como en modelos animales siendo el hipocampo y la memoria uno de los procesos cognitivos más afectados (De Haan et al., 2006; Gonzalez y Miller, 2006). En seres humanos se ha visto una reducción del área hipocampal junto con déficits de memoria episódica (Gadian et al., 2000; Vargha-Khadem et al., 1997). Igualmente, en modelos animales existen alteraciones tanto en el circuito neuronal relacionado con la memoria espacial (hipocampo, corteza parietal y pre-límbica) como en el relacionado con la memoria no espacial (tálamo y otras estructuras subcorticales) (Bjelke et al., 1991; Kohlhauser et al., 1999). Así, se ha demostrado que ratas adultas con AP presentan déficits de memoria espacial y no espacial. Por medio de la prueba de reconocimiento de objetos en la modalidad de novedad, se ha

evidenciado que estas ratas presentan déficits de memoria no espacial (Blanco et al., 2015; Flores-Balter et al., 2016; Galeano et al., 2015; Morales et al., 2010; Simola et al., 2008) y mediante la prueba del Laberinto Acuático de Morris se ha evidenciado la presencia de déficits de memoria espacial en ratas jóvenes y adultas con AP (Blanco et al., 2015; Galeano et al., 2011, 2015). No existen investigaciones publicadas a la fecha que evalúen la memoria espacial de ratas adultas con AP en un curso temporal más corto mediante la prueba de reconocimiento de objetos en la modalidad de localización.

A nivel morfológico la AP induce en el hipocampo alteraciones en las espinas dendríticas y la organización del citoesqueleto (Saraceno, Ayala, et al., 2012; Saraceno, Castilla, et al., 2012) que se acompaña de déficit cognitivo en ratas jóvenes junto con un aumento de la neurogénesis hipocampal observada mediante células positivas para BrdU/MAP-2 en la ZSG del GD, muerte celular debido a un incremento de proteínas apoptóticas (Morales et al., 2007, 2008), necrosis y autofagia (Herrera-Marschitz et al., 2011). Se ha sugerido que este incremento de la neurogénesis en ratas jóvenes con AP puede ser un factor compensatorio para permitir la recuperación funcional del hipocampo (Daval et al., 2004; Morales et al., 2005, 2007). Otras áreas del sistema nervioso central afectadas por un insulto asfíctico perinatal son el cerebelo, los ganglios basales y la corteza cerebral (Morales et al., 2010).

Así, dado que la AP induce déficit de memoria y alteraciones neuroanatómicas de los circuitos que la sustentan, en esta tesis se evaluó la memoria espacial de ratas adultas con AP mediante una prueba específica para memoria espacial dependiente del hipocampo (Barker y Warburton, 2011).

Por otro lado, con respecto a la relación entre histamina y AP, estudios previos de nuestro laboratorio demostraron que el déficit de memoria no espacial se correlacionaba con una baja densidad de neuronas histaminérgicas en el núcleo NTM (Flores-Balter et al., 2016) siendo este antecedente importante porque es el primero que correlaciona la baja densidad de neuronas histaminérgicas con el déficit de memoria no espacial en ratas con AP. Sin embargo, no hay investigaciones publicadas a la fecha que relacionen la histamina con la memoria espacial en ratas con AP.

Así, en base a los antecedentes presentados, el objetivo de esta tesis fue evaluar el efecto de la administración de tioperamida, un antagonista de los receptores H3 que incrementa los niveles de histamina cerebral, en la formación de memoria espacial, plasticidad sináptica y neurogénesis hipocampal en ratas adultas con AP, mediante análisis conductual (prueba de reconocimiento de objetos modalidad localización- dependiente del hipocampo) e inmunohistoquímica para marcadores de plasticidad sináptica (Arc) y de neurogénesis (Dcx).

II. HIPÓTESIS

La asfixia perinatal induce déficit de memoria espacial en ratas adultas como consecuencia de una disminución en la plasticidad sináptica y neurogénesis hipocampal, efecto que es revertido mediante un antagonista para el receptor histaminérgico H3.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Determinar el efecto de un antagonista de los receptores H3 (tioperamida) en la formación de memoria espacial, plasticidad sináptica y neurogénesis hipocampal en ratas adultas control y con asfixia perinatal.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar el efecto de un antagonista de los receptores H3 de histamina (tioperamida) en la formación de memoria espacial mediante la prueba de reconocimiento de objetos (modalidad localización) en ratas adultas control y con asfixia perinatal.
- Determinar el efecto de un antagonista de los receptores H3 de histamina (tioperamida) en la plasticidad sináptica hipocampal mediante inmunohistoquímica para Arc en ratas adultas control y con asfixia perinatal.
- Determinar el efecto de un antagonista de los receptores H3 de histamina (tioperamida) en la neurogénesis hipocampal mediante inmunohistoquímica para doblecortina (Dcx) en ratas adultas control y con asfixia perinatal.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Diseño experimental

4.1.1 Animales

Se utilizaron en total 24 ratas macho Wistar con un peso entre 250 y 350 gramos (de 2,5 a 3 meses de edad), de las cuales 12 ratas fueron asfícticas (nacimiento por cesárea más inducción de la AP) y las otras 12 ratas los controles (nacimiento por cesárea sin asfixia). Todas las ratas se obtuvieron del bioterio del Programa de Farmacología molecular y clínica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Las ratas se mantuvieron en cajas independientes acondicionadas con lecho de mazorca, agua y comida *ad libitum*, en un ambiente con temperatura controlada a 23 °C, con ciclos de 12/12 horas, de luz/oscuridad. Todos los experimentos realizados contaron con la aprobación del comité de bioética de la universidad (CBA 0917 FMUCH) y se realizaron de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del NIH (USA) (Institute for Laboratory Animal Research, 2011).

4.1.2 Inducción de la AP

Las ratas preñadas de 22 días de gestación fueron anestesiadas, eutanizadas por dislocación cervical e histerectomizadas. Se removieron de dos a tres crías del cuerno uterino para utilizarlas como controles no asfícticos. Las demás crías dentro de los cuernos uterinos fueron inmersas en un baño con agua a 37 °C por 21 minutos. Luego las crías se removieron y reanimaron para restablecer la respiración normal (ver **Figura 4**). El grado de asfixia se determinó 60 minutos después del nacimiento mediante la tasa de sobrevivencia y recuperación, valorada mediante la escala Apgar (Bustamante et al., 2007; Herrera-Marschitz et al., 1993). Se evaluaron parámetros como el peso corporal, color de piel, frecuencia respiratoria, vocalización, grado de movilidad y *gasping* (respiración forzada). Finalmente, tanto las crías controles como con asfixia perinatal se asignaron a madres sustitutas.



Figura 4. Modelo de asfixia perinatal en ratas. Después de la histerectomía, un grupo de animales corresponderá al grupo control y a los otros se les inducirá la AP mediante un baño termorregulado por 21 minutos. Posteriormente se les aplicará la escala Apgar y finalmente se dejarán a las madres nodrizas (Marriott et al., 2017).

4.1.3 Tratamiento farmacológico

La tioperamida maleato (Sigma-Aldrich, Bornem, Belgium) se disolvió en solución salina (0.9% NaCl) a una dosis de 5 y 10 mg/kg y fue administrada de manera intraperitoneal (i.p), a un volumen de 1 ml/kg de peso corporal. Se utilizó como vehículo un volumen igual de solución salina sin el fármaco.

4.1.4 Prueba de reconocimiento espacial

Con el fin de evaluar la memoria espacial se realizó la prueba de reconocimiento de objetos en la modalidad de localización (*object location task*) (Barker y Warburton, 2011) (ver **Figura 5 y 7**). La arena o ambiente de la tarea fue una caja café cuadrada de 80x80x60 cm, con un piso de color negro. En ésta se ubicaron dos objetos iguales y posteriormente uno de ellos cambió de posición durante la fase de retención. En primera instancia los animales realizaron una fase de habituación para posteriormente realizar la fase de prueba que constó de dos partes adquisición y retención. Este procedimiento fue registrado con una cámara digital ubicada en posición cenital.

Habitación: durante 2 días consecutivos (día 1 y día 2) se les permitió a las ratas explorar libremente el ambiente de prueba durante 10 minutos en ausencia de objetos u otro estímulo que pudiese ser relevante, esto con el fin de evitar conductas ansiogénicas producidas por la exposición a un ambiente desconocido.

Prueba: se realizó al tercer día y comprendió una fase de adquisición y una fase de retención separada por 1 hora de descanso. En la fase de adquisición, a los animales se les presentó dos objetos iguales. Estos objetos estuvieron ubicados en las esquinas de la arena a 10 cm de las paredes (ver **Figura 5**). Cada animal fue colocado en el centro de la arena y se le permitió explorar los objetos por 5 minutos. Durante el periodo de descanso (60 minutos), todos los objetos se limpiaron con alcohol al 70% para remover claves olfatorias. Para la fase de retención uno de los dos objetos se cambió de posición y posteriormente se les permitió a las ratas explorar los dos objetos por 5 minutos. Se registró el tiempo de exploración y se calculó la proporción de tiempo que la rata gastó en explorar el objeto con la nueva ubicación respecto al tiempo total de exploración de los dos objetos (índice de reconocimiento, IR). Un mayor tiempo de exploración en el objeto que cambia de posición indica una memoria conservada.

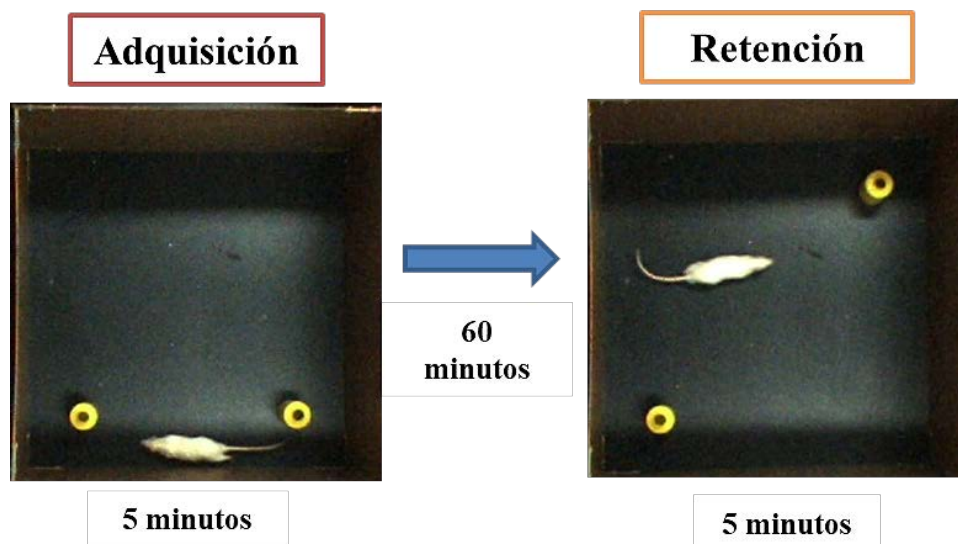


Figura 5. Fotografía de una rata realizando la prueba de reconocimiento de objetos (modalidad localización de objetos) (*Object location task*). Se muestran dos objetos iguales. En la fase de retención el animal explora los dos objetos, pero uno de ellos ha sido cambiado de posición.

4.1.5 Procedimiento experimental

Se realizaron dos series experimentales cada una con 12 ratas: Ratas cesárea con AP y ratas cesárea sin AP (controles). Cada serie tuvo dos condiciones experimentales, cada una con seis ratas: una con tratamiento farmacológico y otra sin tratamiento farmacológico. El detalle de las concentraciones se detalla en la sección 4.1.3. (ver **Figura 6**).

A los grupos tratados con tioperamida tanto controles como con AP, se les administró tres dosis de tioperamida de forma intraperitoneal, 10 minutos antes de realizar la tarea, una cada día de habituación (día 1 y día 2) y la tercera dosis se inyectó en la fase de adquisición del tercer día de prueba (día 3). De la misma manera, se administró solución salina (0.9% NaCl) a los grupos vehículo tanto controles como con AP. En los días de habituación 1 y 2 se le inyectó a la rata la mitad de la dosis de tioperamida (5 mg/kg), mientras que para el día 3 se aplicó una única dosis completa (10 mg/kg). Las ratas fueron eutanizadas cuatro horas después de realizar la prueba (ver **Figura 7**).

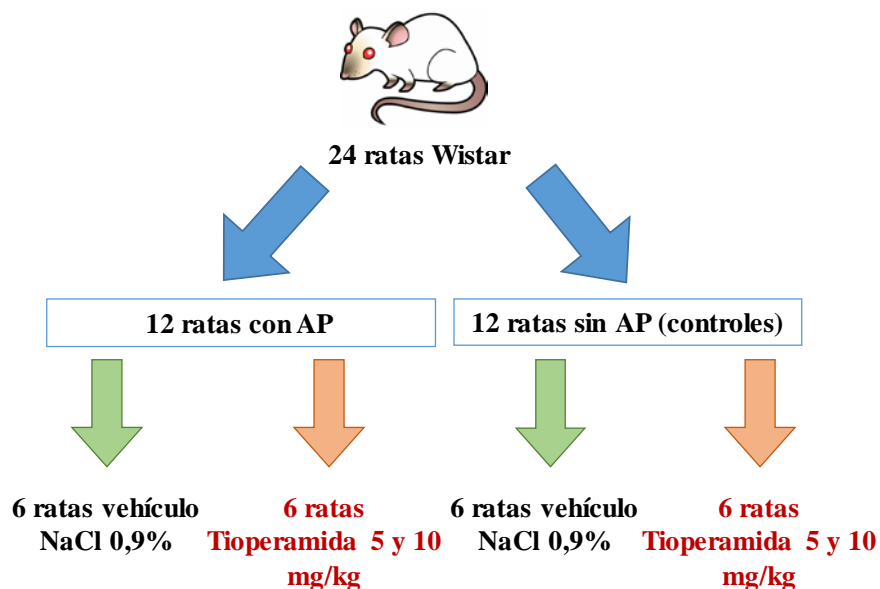


Figura 6. Grupos de animales y diseño experimental. Se realizaron dos series experimentales: el grupo de animales con AP (ratas cesárea +AP n=12) y los controles (ratas cesárea control n=12). Un grupo de animales recibió tratamiento con el antagonista H₃ y a otro grupo se les administró solución salina (vehículo).

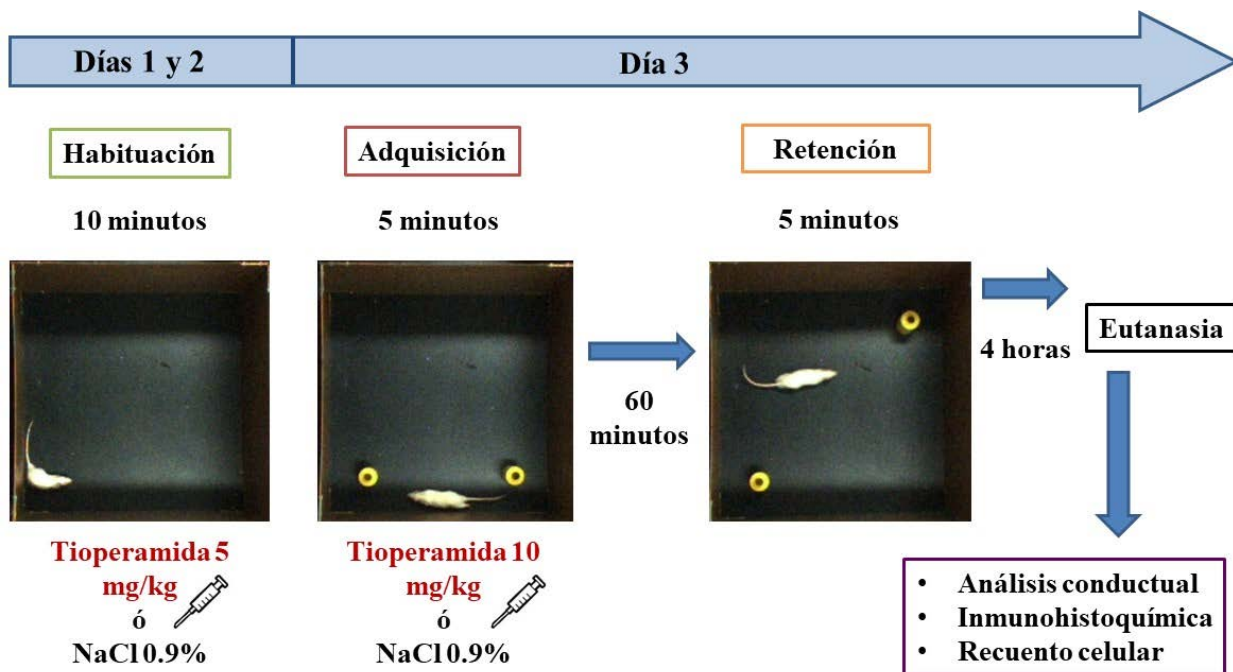


Figura 7. Prueba de memoria espacial. Se aplicó la tioperamida (i.p) 10 minutos antes de la habitación (día 1 y 2). Para el tercer día, se aplicó el doble de la dosis al inicio de la prueba (adquisición). En la fase de retención se calculó el IR. Se espera que la rata explore por mayor tiempo el objeto en la nueva ubicación como indicador de buena memoria. Al finalizar la prueba, después de cuatro horas a las ratas se les realizó eutanasia y sus cerebros fueron procesados para inmunohistoquímica.

4.2 Procedimientos técnicos

4.2.1 Eutanasia

La eutanasia se llevó a cabo cuatro horas después de haber realizado la prueba conductual. Las ratas fueron anestesiadas con isoflurano gaseoso al 2% en oxígeno a un flujo de 1L por minuto para posteriormente realizar una perfusión transcardíaca con 300 ml de solución salina (NaCl, 0,9%) seguido de 500 ml de paraformaldehído al 4%, en buffer de fosfato (PB, pH 7,4, 0,1M).

4.2.2 Histología

Los cerebros fueron removidos y colocados en solución de fijación (paraformaldehído al 4%, en buffer fosfato PB, pH 7,4, 0,1M) por dos horas y luego transferidos a sacarosa al 30% en PBS (buffer fosfato salino) 0,01 M con ázida de sodio al 0,02% para criopreservación del tejido por 3 días. Los cerebros se cortaron con un grosor de 50 μm en el plano coronal, usando un micrótopo de congelación. Las secciones fueron procesadas para tinción de Nissl y para inmunohistoquímica contra Arc y Dcx.

4.2.3 Inmunohistoquímica

Inmunohistoquímica contra Arc y Dcx: Los cortes flotantes se incubaron en H_2O_2 al 0,3% por 30 min, luego lavados en PBS y transferidos a una solución de bloqueo (0,4% Tritón X-100, 0,02% de ázida de sodio y 3% de suero normal de cabra en PBS) por una hora. Seguidamente, los cortes se incubaron con el anticuerpo primario durante toda la noche (entre 16 y 18 horas). La solución de incubación se constituyó del anticuerpo policlonal para Arc (*Synaptic Systems, Goetting en Germany*), diluido 1:5000 en solución de bloqueo o el anticuerpo policlonal para Dcx (*abcam 1:700*). Los cortes se lavaron en PBS por 1 hora antes de ser incubados con el anticuerpo secundario (*Biotin-SP-conjugated Affini pure goat anti-rabbit IgG (H+L) Jackson Immuno Research, PA, USA*) diluido 1:750 en 0,4% Tritón X-100 y en suero normal de cabra al 1,5% en PBS. Luego del lavado por 40 minutos, los cortes fueron incubados por 1 hora en el kit Vectastain ABC Elite (Laboratorios Vector, CA, USA) diluido 1:500 en PBS. Finalmente, se lavaron e incubaron en una solución al 0,05% de Diaminobencidina Hidrocloruro (DAB), 0,003% de H_2O_2 y 0,05% cloruro de níquel para generar una reacción cuyo producto final fue azul oscuro. Luego los cortes fueron montados en portaobjetos gelatinizados, secados a temperatura ambiente durante 3 días, deshidratados en una batería de alcoholes y xilol y, finalmente cubiertos con medio de montaje entellán y cubreobjetos.

4.2.4 Recuento celular

Se calculó la densidad de células inmunoreactivas a Arc y Dcx por mm² en el GD en nueve cortes coronales del hipocampo dorsal por rata (bregma: -2,56 mm a -5,80 mm). El conteo se realizó en: las bandas supra e infrapiramidal y las zonas: rostral (bregma: -2,56 mm a -3,30 mm), medial (bregma: -3,70 mm a -4,16 mm) y caudal (bregma: -4,52 mm a -5,80 mm) del hipocampo mediante el uso del microscopio óptico Nikon Type 104c (Eclipse E200). Se utilizó el programa Micrometrics SE Premium4 para la toma de microfotografías. El análisis y la edición de las imágenes se realizó a través del programa Image J.

4.2.5 Software y Análisis Estadísticos

Se utilizó una rutina construida en el software Matlab (MathWorks, Inc) para el registro de los datos y reconstrucción de las exploraciones realizadas por el animal a nivel conductual.

Se utilizó el programa SigmaPlot 11.0 y GraphPad Prism 6 para realizar los análisis estadísticos. Se utilizaron las pruebas ANOVA, el post hoc Holm-Sidak y t-test según correspondiera y las pruebas Mann-Whitney y Kruskal-Wallis para los datos que no presentaron homogeneidad de varianza o distribución normal según fuera el caso.

V. RESULTADOS

5.1 Evaluación de parámetros Apgar sobre la AP

Como se mencionó en la sección 4.1.2 (Metodología) a las ratas del presente estudio se les aplicó la escala Apgar, 60 minutos después de su nacimiento, para evaluar el grado de asfixia. La **Tabla 1** muestra el número total de ratas destinadas para la presente investigación de las cuales sólo 12 ratas de cada grupo participaron en este estudio. Se observó que, en comparación con los controles (n=17), la tasa de sobrevivencia para las ratas expuestas a AP (n=16) durante 21 minutos se redujo en 75,33%. Adicionalmente, mostraron varios parámetros que indicaron deterioro fisiológico en la función respiratoria y cardiovascular y, en la conducta espontánea como: *gasping* (respiración forzada) (44%), akinesia (69%) y una disminución significativa de la frecuencia respiratoria al compararlos con los controles (34,25+/-4,98 y 81,06+/-1,573 respectivamente, p=0,001 Mann-Whitney) (ver **Tabla 1**).

Parámetros Apgar	Control cesárea (n=17)	AP (n=16)
Tasa de sobrevivencia (%)	100%	75,33%
Peso (g)	6,25+/-0,168	5,81+/-0,172
Frecuencia respiratoria (eventos/min)	81,06+/-1,573	34,25+/-4,98*
Gasping (si) (%)	0%	44%
Color de la piel (%):		
- Rosado	100%	19%
- Rosado-azul	0%	63%
- Azul-rosado	0%	13%
- Azul	0%	6%
Vocalizaciones (si) (%)	100%	31%
Movimiento corporal espontáneo (%):		
- Sin movimiento (0)	0%	69%
- Movimiento único de las patas	0%	6%

delanteras o de la cabeza (1)		
- Movimiento de dos estructuras corporales (2)	0%	13%
- Movimiento de todas las estructuras corporales (3)	0%	6%
- Movimiento intenso (4)	100%	6%

Tabla 1. Escala Apgar. Se observan los parámetros evaluados 60 minutos después del nacimiento, para determinar la AP en las ratas destinadas para la presente investigación. Control cesárea n=17; AP n=16. Prueba de rangos de Mann-Whitney, *p<0,05.

5.2 Efecto del antagonista de los receptores H3 de histamina (tioperamida) en la formación de memoria espacial mediante la prueba de reconocimiento de objetos en la modalidad de localización.

Se realizó la prueba de reconocimiento de objetos en la modalidad de localización, en los grupos de ratas adultas con y sin AP, tratadas con tioperamida o solución salina. El rendimiento cognitivo fue expresado mediante el Índice de Reconocimiento (IR) que se obtuvo de dividir el tiempo (en segundos) que emplearon los animales en explorar el objeto con la nueva ubicación y el tiempo total empleado en explorar los dos objetos (objeto con la antigua ubicación y objeto con la nueva ubicación) durante la fase de retención. Un IR sobre 0,5 indica que el animal tuvo preferencia por explorar el objeto en la nueva ubicación. El número de animales analizados fue de 6 por cada uno de los cuatro grupos.

Los animales control vehículo tuvieron un IR que indicó su preferencia por el objeto en la nueva ubicación contrario a lo sucedido con los animales AP vehículo que presentaron un IR por debajo de 0,5 (0,649±0,0630 y 0,493±0,0749 respectivamente, p=0,144 t-test) indicando así que emplearon el mismo tiempo explorando los dos objetos, siendo incapaces de distinguir el objeto que había cambiado de ubicación. Aunque los animales con AP vehículo tuvieron un IR alrededor de 0,5 no se encontraron diferencias significativas al compararlos con los controles vehículo, indicando así una memoria conservada, es decir, sin déficit.

Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas al comparar el IR de los animales control tratados y no tratados con tioperamida ($0,693 \pm 0,0915$ y $0,649 \pm 0,0630$ respectivamente, $p=0,701$ t-test) y de los animales con AP tratados y no tratados con tioperamida ($0,663 \pm 0,0739$ y $0,493 \pm 0,0749$ respectivamente, $p=0,138$ t-test). En resumen, al comparar el IR de los cuatro grupos de animales no se observaron diferencias significativas ($p=0,283$ ANOVA de una vía) (ver **Figura 8**).

Por tanto, estos resultados indican que los animales con AP no presentaron déficit en su memoria espacial reciente (evaluada 1 hora después de la adquisición). Adicionalmente, el tratamiento con tioperamida no tuvo efecto en el rendimiento espacial de los grupos evaluados (ver **Figura 8**).

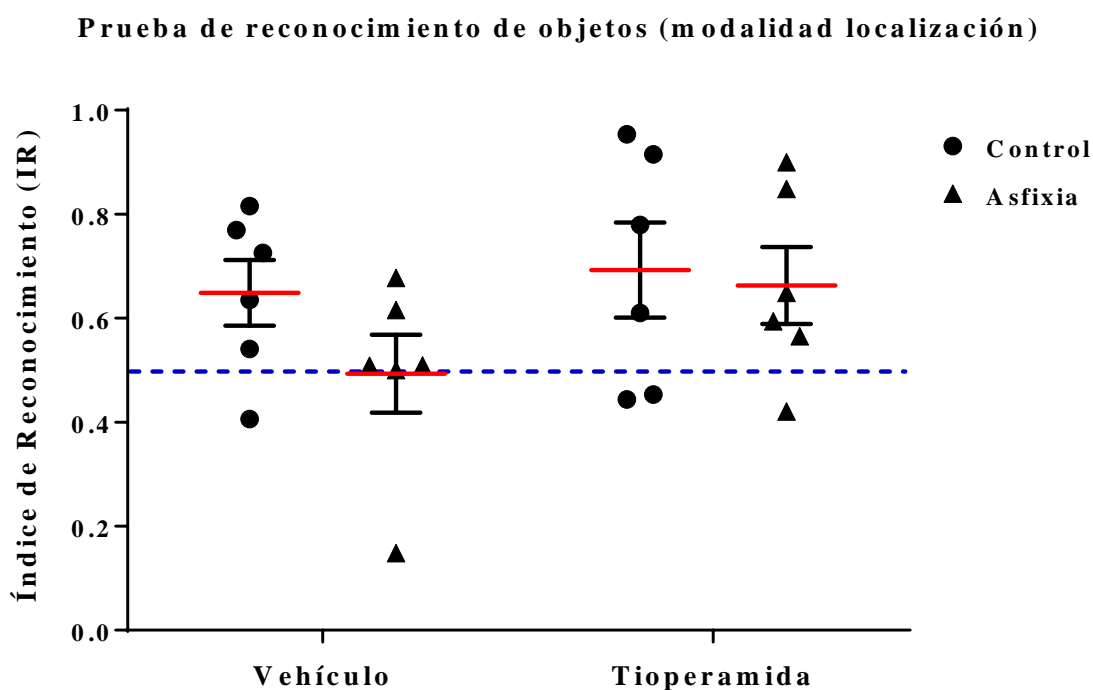
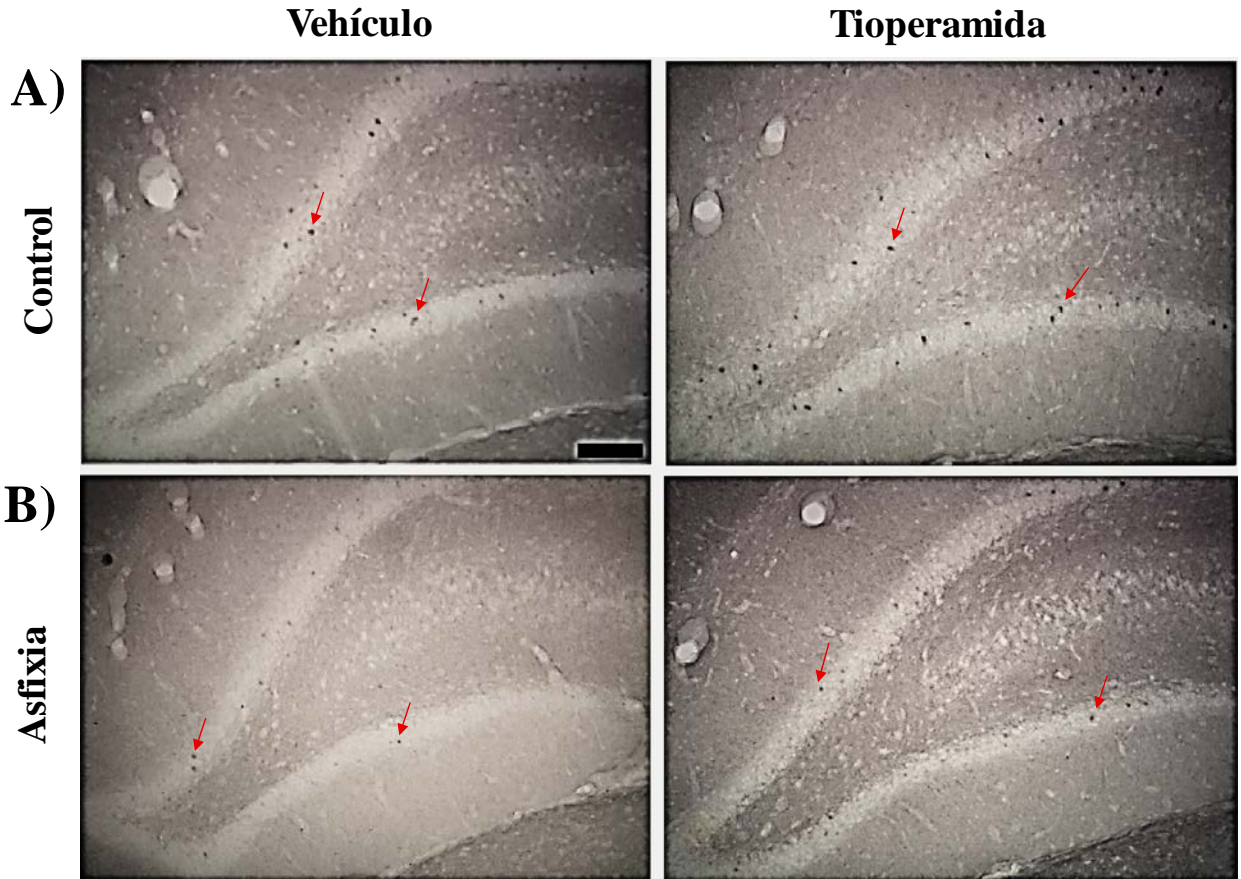


Figura 8. Índice de reconocimiento (IR) de cada grupo en la prueba de reconocimiento de objetos (modalidad localización). La línea azul punteada indica un IR de 0,5. La línea roja representa la media de cada grupo. $n=6$ para cada uno de los cuatro grupos. Los datos se expresan como el promedio de \pm error estándar de las medias SEM. ANOVA de una vía.

5.3 Efecto del antagonista de los receptores H3 de histamina (tioperamida) en la plasticidad sináptica hipocampal mediante inmunohistoquímica para Arc.

Al analizar la plasticidad sináptica, se observó una disminución significativa de neuronas que expresaron Arc/mm² en el grupo de animales con AP vehículo comparado con los animales control vehículo (71+/-15,718 y 126+/-20,315 respectivamente, p=0,023 ANOVA de dos vías seguido del método Holm-Sidak). Sin embargo, con respecto a los diferentes tratamientos, vehículo y tioperamida, se detectó que los animales control con tioperamida tuvieron aproximadamente el mismo número de neuronas inmunoreactivas para Arc/mm² que los animales control vehículo (p=0,929 ANOVA de dos vías, Holm-Sidak). Lo mismo ocurrió entre los animales con AP tratados con tioperamida y los animales AP vehículo (p=0,964 ANOVA de dos vías, Holm-Sidak).

Por tanto, estos resultados indican que los animales con AP presentaron una disminución significativa de su plasticidad sináptica, observada mediante la expresión para Arc. Sin embargo, esta reducción de la expresión de Arc no pudo ser revertida con el tratamiento con tioperamida en ningún grupo (ver **Figura 9 C**).



C) Inmunoreactividad para Arc en el GD

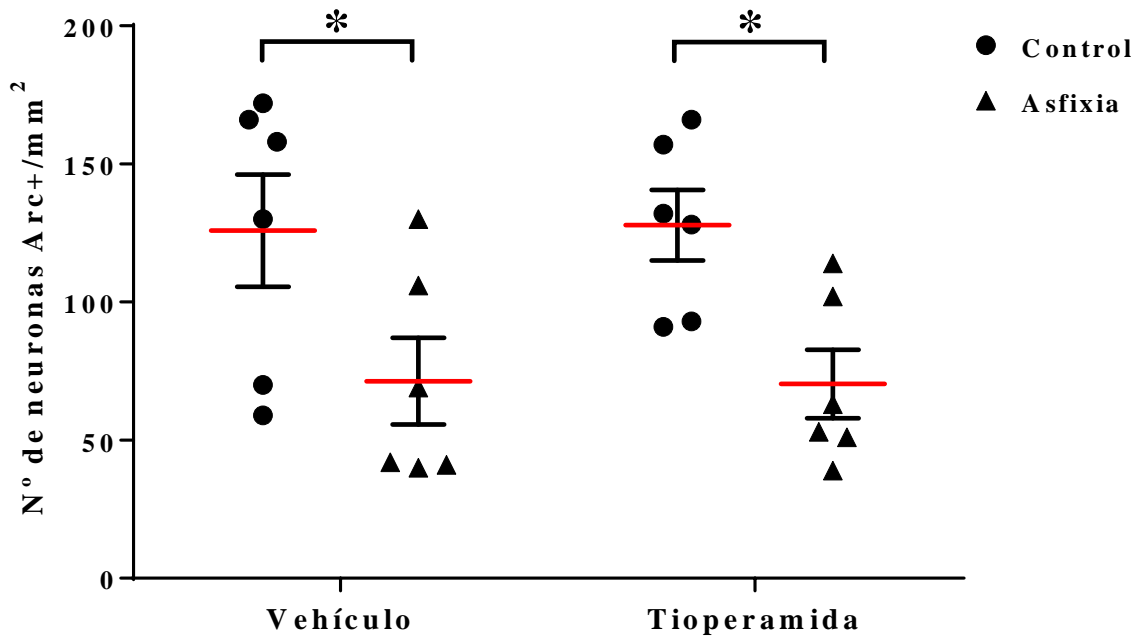


Figura 9. Densidad total de neuronas inmunoreactivas para Arc/mm² en el GD. **A).** Se observan microfotografías de la expresión de Arc/mm² en el GD del grupo control y, **B)** del grupo con AP. Barra escala 100 µm. **C).** Se observa la dispersión de la densidad total de neuronas inmunoreactivas para Arc/mm² en el GD. Nótese que no hay diferencias significativas con respecto al tratamiento con tioperamida entre el grupo con AP y entre el grupo control. La línea roja representa la media de cada grupo. n=6 para cada uno de los cuatro grupos. Los datos se expresan como el promedio de ± error estándar de las medias SEM. ANOVA de dos vías seguido del post hoc Holm-Sidak. *p<0,05 (control vs asfixia en la condición expuesta).

Inmunoreactividad para Arc en las bandas del GD

Se analizó la inmunoreactividad a Arc en las bandas supra e infrapiramidal del GD del hipocampo.

En a la banda suprapiramidal, al comparar el grupo control vehículo con el grupo AP vehículo no se observaron diferencias significativas (149±/26,267 y 99±/24,197 respectivamente, p=0,106 ANOVA de dos vías seguido del método Holm-Sidak) pero sí se encontró que el grupo AP con tioperamida presentó menor expresión para Arc/mm² que el grupo control con tioperamida (83±/13,970 y 147±/17,767 respectivamente, p=0,043 ANOVA de dos vías, Holm-Sidak). Al comparar los grupos control vehículo y control tioperamida no se encontraron diferencias significativas (p=0,952 ANOVA de dos vías, Holm-Sidak) y lo mismo se observó entre los grupos con AP vehículo y AP tioperamida (p=0,602 ANOVA de dos vías, Holm-Sidak) (ver **Figura 10**).

Con respecto a la banda infrapiramidal, el grupo con AP vehículo presentó una menor inmunoreactividad para Arc/mm² que el grupo control vehículo (29±/7,401 y 87±/11,131 respectivamente, p=0,004 ANOVA de dos vías seguido del método Holm-Sidak). Sin embargo, al igual que lo observado en la banda suprapiramidal, no se encontraron diferencias significativas de la expresión de Arc/mm² entre los grupos control vehículo y control tioperamida (p=0,685 ANOVA de dos vías, Holm-Sidak) y entre los grupos con AP vehículo y AP tioperamida (p=0,234 ANOVA de dos vías, Holm-Sidak) (ver **Figura 10**).

Por otro lado, al contrastar las dos bandas se encontró un aumento significativo de la expresión de Arc/mm² en la banda suprapiramidal tanto en el grupo control vehículo (p=0,026

ANOVA de dos vías, Holm-Sidak) como en el grupo con AP vehículo ($p=0,007$ ANOVA de dos vías, Holm-Sidak).

En resumen, los resultados muestran que los animales con AP presentaron una disminución significativa de su plasticidad sináptica evaluada a través de la expresión para Arc/ mm^2 en las dos bandas del GD. El tratamiento con tioperamida no tuvo efecto en los grupos evaluados (ver **Figura 10**).

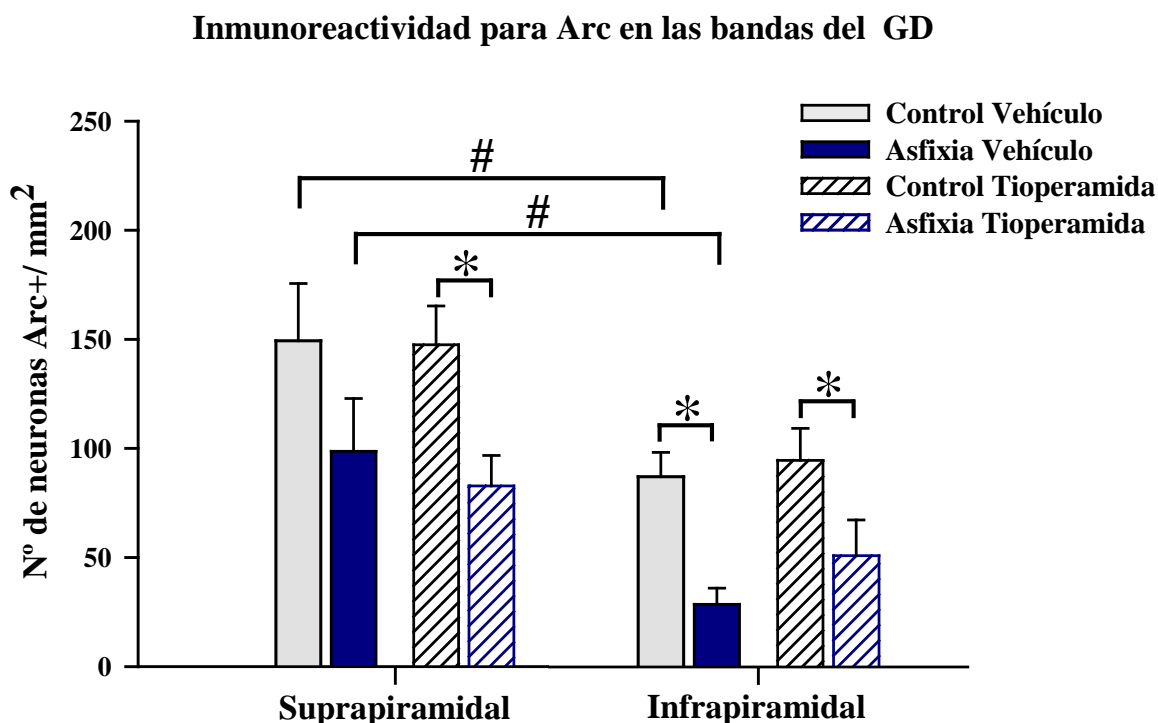


Figura 10. Densidad total de neuronas inmunoreactivas para Arc/ mm^2 en las bandas suprapiramidal e infrapiramidal en el GD. $n=6$ para cada uno de los cuatro grupos. Los datos se expresan como el promedio de \pm error estándar de las medias SEM. ANOVA de dos vías seguido del post hoc Holm-Sidak. * $p<0,05$ (control vs asfixia en la condición expuesta) y # $p<0,05$ (comparación entre las dos bandas en el grupo expuesto).

Inmunoreactividad para Arc en las zonas del GD

Se encontró que el grupo con AP vehículo presentó menor inmunoreactividad para Arc/ mm^2 al compararlo con el grupo control vehículo en la zona rostral y en la zona medial ($p=0,024$ y $p=0,021$ respectivamente, ANOVA de dos vías, Holm-Sidak) encontrándose que en la zona caudal estuvo cerca del nivel de significancia ($p=0,06$ ANOVA de dos vías, Holm-

Sidak). Esta disminución de la expresión de Arc se mantuvo en los animales con AP tratados con tioperamida, al compararlos con los controles, en las zonas medial y caudal ($p=0,016$ y $p=0,025$ respectivamente, ANOVA de dos vías, Holm-Sidak) y en la zona rostral estuvo cerca del nivel de significancia ($p=0,07$ ANOVA de dos vías, Holm-Sidak) (ver **Figura 11**).

Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas entre los animales control vehículo y control tioperamida en ninguna de las tres zonas (Rostral: $p=0,745$; Medial: $p=0,832$; Caudal: $p=0,913$. ANOVA de dos vías, Holm-Sidak) y de la misma manera, entre los animales con AP vehículo y con tioperamida (Rostral: $p=0,840$; Medial: $p=0,937$; Caudal: $p=0,719$. ANOVA de dos vías, Holm-Sidak) (ver **Figura 11**).

Adicionalmente, los grupos control vehículo y AP con tioperamida presentaron un aumento significativo para Arc/mm² en la zona medial al compararla con la zona caudal ($p=0,017$ y $p=0,04$ respectivamente, ANOVA seguido de la prueba Holm-Sidak).

En resumen, estos resultados indican al igual que lo observado en las bandas, una disminución significativa de la plasticidad sináptica en los animales con AP, evaluada mediante la expresión de Arc, en las distintas porciones del eje rostro-caudal del hipocampo.

En relación con el tratamiento, la administración de tioperamida no afectó la expresión de Arc en ninguna zona de ningún grupo de animales (ver **Figura 11**).

Inmunoreactividad para Arc en las zonas del GD

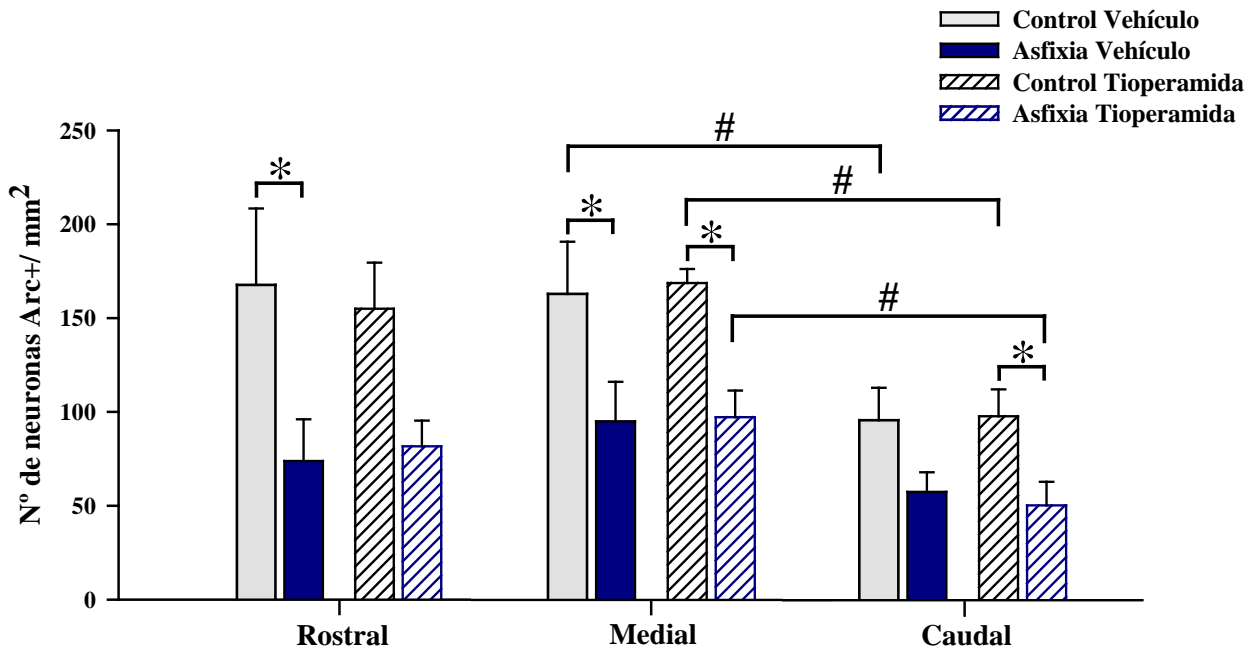


Figura 11. Densidad total de neuronas inmunoreactivas para Arc/mm² en las zonas rostral, medial y caudal del GD. n=6 para cada uno de los cuatro grupos. Los datos se expresan como el promedio de \pm error estándar de las medias SEM. ANOVA de dos vías seguido del post hoc Holm-Sidak. *p<0,05 (control vs asfixia en la condición expuesta) y #p<0,05 (zonas: medial vs caudal del grupo expuesto).

Finalmente se evaluó la relación entre la conducta (IR obtenido en la prueba de localización de objetos) y la inmunoreactividad para Arc/mm², pero no se encontró una correlación significativa (ver **Figura 12** y **Tabla 2**).

Por lo tanto, dado los resultados obtenidos anteriormente, se concluye que los animales con AP presentaron una menor inmunoreactividad para Arc al realizar el análisis total, por bandas y por las distintas porciones del eje rostro-caudal, indicando así una disminución en su plasticidad sináptica que no se correlacionó con la conducta. Adicionalmente, la administración de tioperamida no afectó los resultados obtenidos.

Conducta y expresión de Arc en el GD

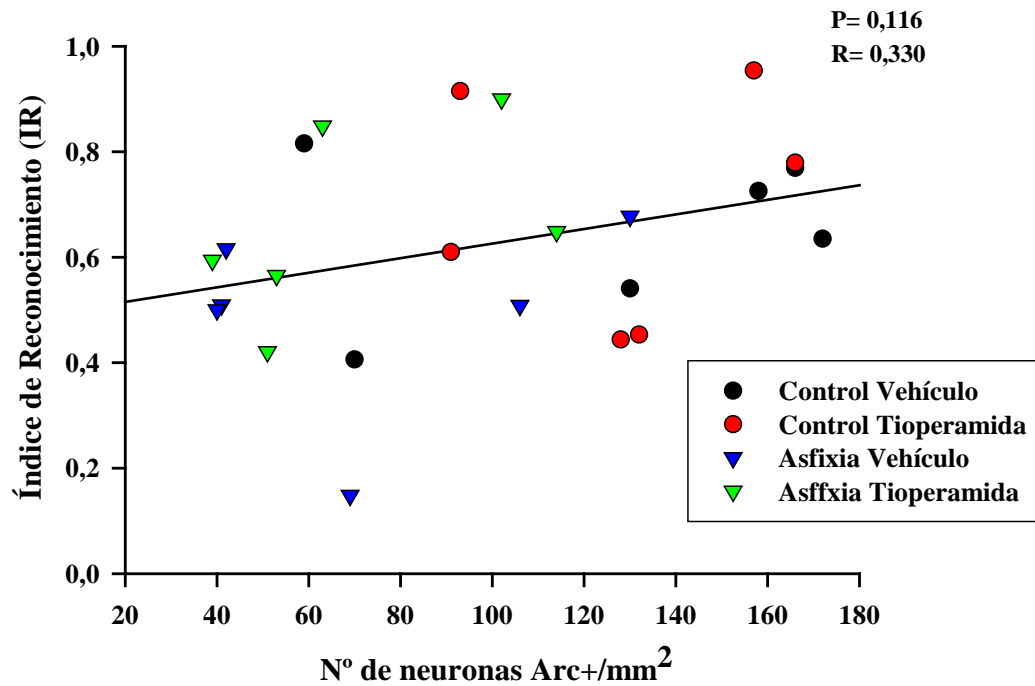


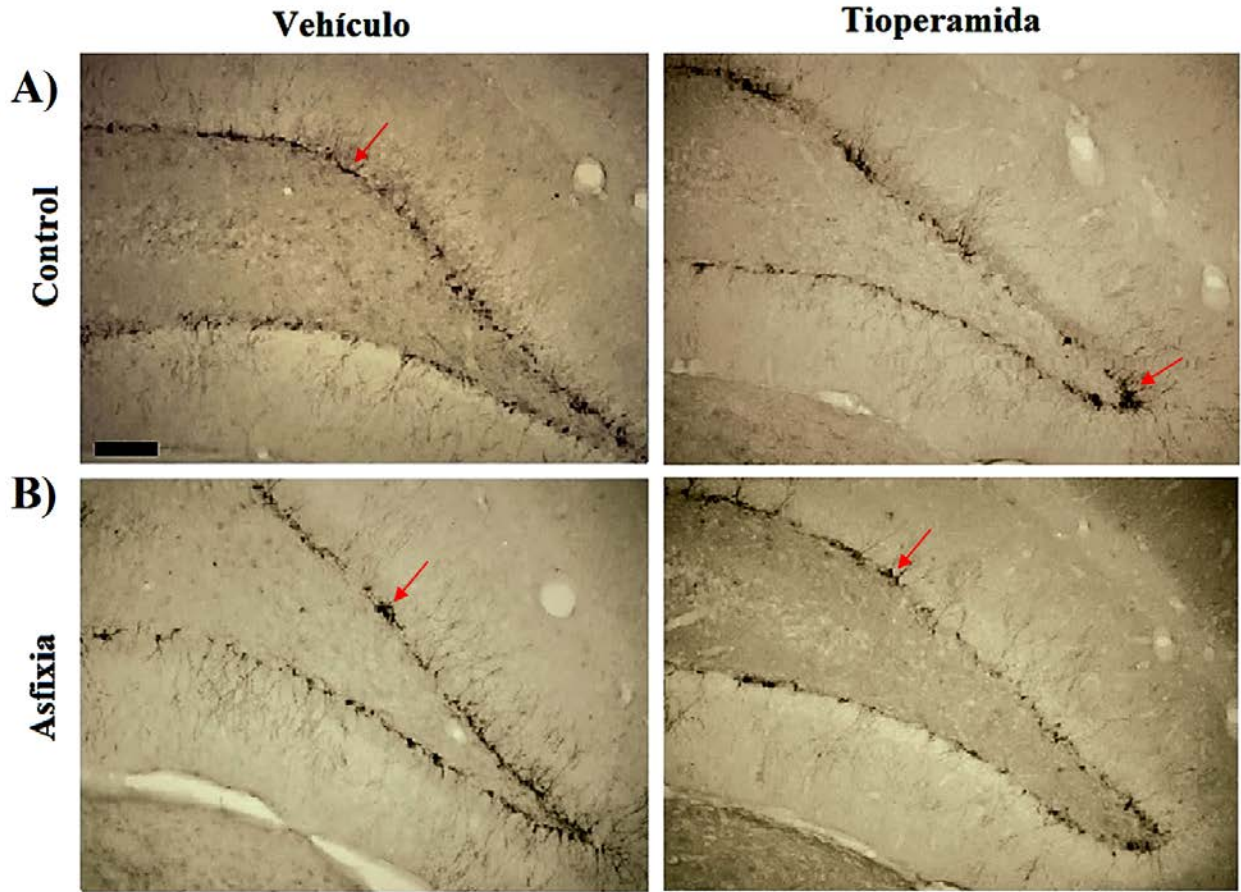
Figura 12. Regresión lineal entre conducta y expresión de Arc en el GD. Correlación entre la conducta (medida a través del IR) y el número de neuronas inmunoreactivas para Arc/mm² en el GD en todos los animales. n=24. Nótese que no hay una correlación significativa.

Regresión lineal entre conducta y expresión de Arc en el GD			
GD	P	R	n
Total GD	0,116	0,330	24
B. Suprapiramidal	0,1	0,344	24
B. Infrapiramidal	0,35	0,199	24
Z. Rostral	0,284	0,228	24
Z. Medial	0,193	0,275	24
Z. Caudal	0,071	0,375	24

Tabla 2. Regresión lineal entre conducta y expresión de Arc en las bandas y en las zonas del GD. Correlación entre la conducta (medida a través del IR) y el número de neuronas inmunoreactivas para Arc/mm² en todos los animales. n=24. Nótese que no hay una correlación significativa en ningún grupo.

5.4 Efecto del antagonista de los receptores H3 de histamina (tioperamida) en la neurogénesis hipocampal mediante inmunohistoquímica para doblecortina (Dcx).

Con respecto a la expresión de Dcx/mm² no se observaron diferencias significativas entre los controles y los animales con AP tratados y no tratados con tioperamida (controles: vehículo 1500+/-190,13 y tioperamida 1574+/-134,75. AP: vehículo 1435+/-265 y tioperamida 1412+/-192,83. p=0,940 ANOVA de una vía). Por tanto, se puede observar que los animales con AP no presentaron una disminución de su neurogénesis hipocampal en la edad adulta ya que la inmunoreactividad para Dcx fue similar a los controles. Adicionalmente, el tratamiento con tioperamida no afectó este resultado (ver **Figura 13**).



C) Inmunoreactividad para Dcx en el GD

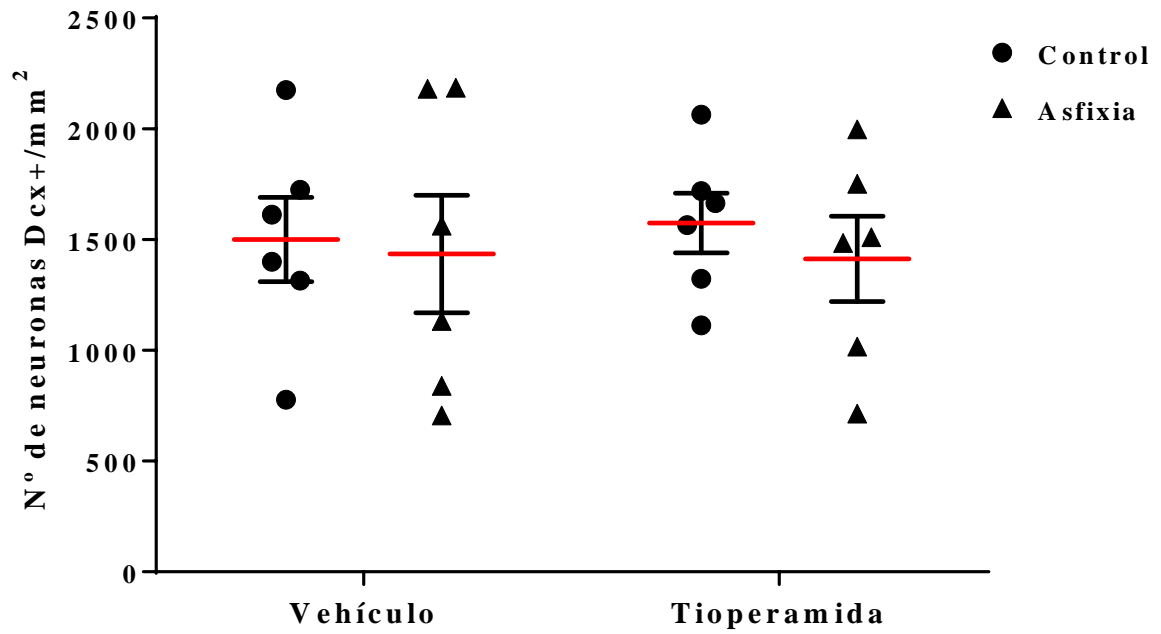


Figura 13. Densidad total de neuronas inmunoreactivas para Dcx/mm² en el GD. A). Se observan microfotografías del GD que expresan Dcx/mm² en el grupo control y B) en el grupo con AP. Barra escala 100 μm. C). Dispersión de la densidad total de neuronas inmunoreactivas para Dcx/mm² en el GD. Nótese que no hay diferencias significativas en ninguno de los grupos. La línea roja representa la media de cada grupo; n=6 para cada uno de los cuatro grupos. Los datos se expresan como el promedio de ± error estándar de las medias SEM. ANOVA de una vía.

Inmunoreactividad para Dcx en las bandas del GD

Al realizar el análisis de la expresión de Dcx/mm² en la banda suprapiramidal no se observó ninguna diferencia significativa en ningún grupo (p=0,862 ANOVA de una vía) y lo mismo ocurrió en la banda infrapiramidal (p=0,988 ANOVA de una vía). Por tanto, estos resultados mantienen lo encontrado en el análisis total, ya que los animales con AP tuvieron una inmunoreactividad para Dcx similar a los controles y el tratamiento con tioperamida no afectó este resultado (ver **Figura 14**).

Inmunoreactividad para Dcx en las bandas del GD

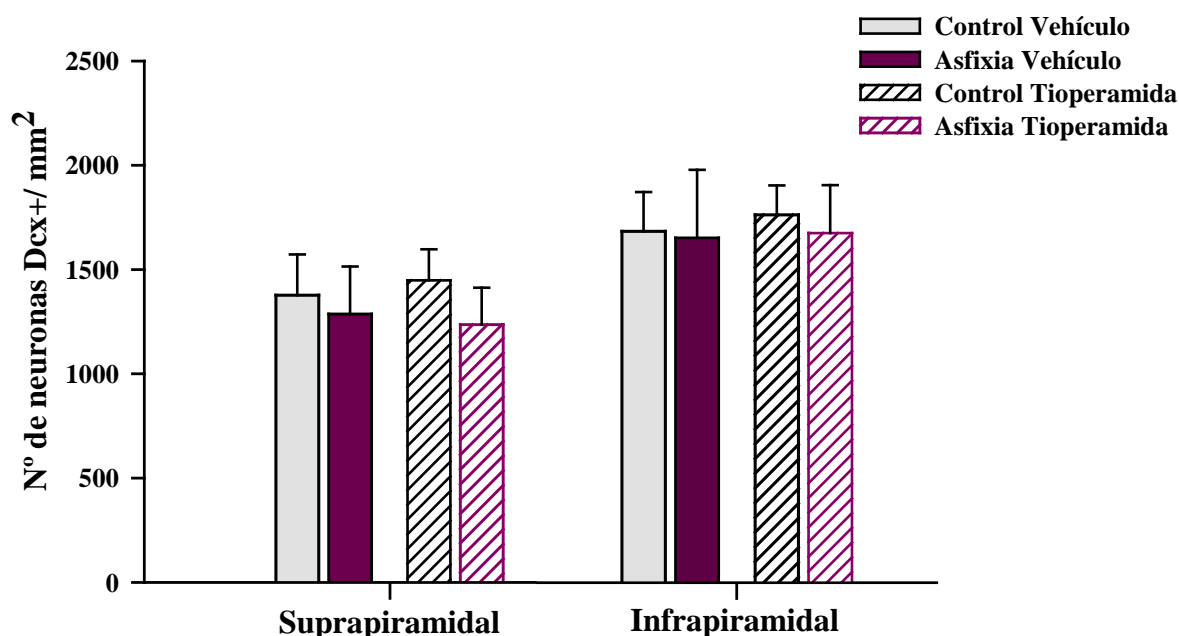


Figura 14. Densidad total de neuronas inmunoreactivas para Dcx/mm² en las bandas supra e infrapiramidal en el GD. Nótese que no hay diferencias significativas. n=6 para cada uno de los cuatro grupos. Los datos se expresan como el promedio de ± error estándar de las medias SEM. ANOVA de una vía.

Inmunoreactividad para Dcx en las zonas del GD

En relación con los resultados de la expresión de Dcx/mm² en las distintas zonas del GD, tampoco se encontraron diferencias significativas entre los controles y los animales con AP tratados y no tratados con tioperamida (rostral p=0,816, medial p=0,907 y caudal p=0,398. ANOVA de una vía). Por tanto, al igual que lo observado al realizar el análisis total y por bandas, la expresión de Dcx/ mm² en el eje rostro-caudal fue similar entre los grupos control y con AP. De la misma manera, el tratamiento con tioperamida tampoco afectó los resultados obtenidos de los grupos analizados (ver **Figura 15**).

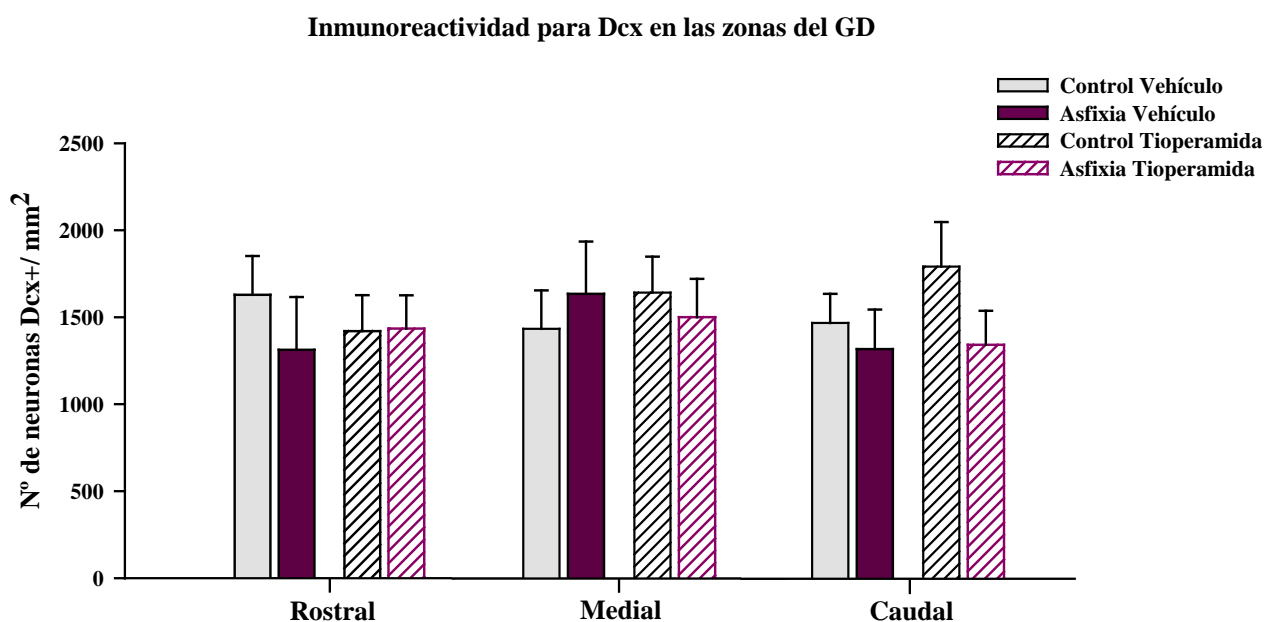


Figura 15. Densidad total de neuronas inmunoreactivas para Dcx/mm² en las zonas rostral, medial y caudal del GD. Se observa que no hay diferencias significativas en ningún grupo. n=6 para cada uno de los cuatro grupos. Los datos se expresan como el promedio de \pm error estándar de las medias SEM. ANOVA de una vía.

Finalmente, al correlacionar la conducta (IR obtenido en la prueba de localización de objetos) y la inmunoreactividad para Dcx/mm², no se encontró un resultado significativo en los grupos evaluados (ver **Tabla 3**).

Regresión lineal entre conducta y expresión de Dcx en el GD			
GD	P	R	n
Total GD	0,843	0,0428	24
B. Suprapiramidal	0,939	0,0164	24
B. Infrapiramidal	0,593	0,115	24
Z. Rostral	0,494	0,147	24
Z. Medial	0,652	0,096	24
Z. Caudal	0,229	0,255	24

Tabla 3. Regresión lineal entre conducta y expresión de Dcx en las bandas y en las zonas del GD. Correlación entre la conducta (medida a través del IR) y el número de neuronas inmunoreactivas para Dcx/mm² en todos los animales. n=24. Nótese que no hay una correlación significativa en ningún grupo.

Por lo tanto, dado los resultados obtenidos anteriormente, se concluye que los animales con AP presentaron una inmunoreactividad para Dcx similar a los controles, indicando una neurogénesis hipocampal conservada que no se correlacionó con la conducta. Adicionalmente, la administración de tioperamida no afectó los resultados obtenidos en ningún grupo.

VI. DISCUSIÓN

En este estudio se propuso determinar el efecto de un antagonista de los receptores H3 (tioperamida) en la formación de memoria espacial, plasticidad sináptica y neurogénesis hipocampal en ratas adultas control y con asfixia perinatal. Se encontraron los siguientes resultados: (i) Los animales con AP no presentaron déficit en su memoria espacial reciente evaluada 1 hora después de la adquisición. Si bien los animales con AP vehículo tuvieron un IR alrededor de 0,5 en la prueba de reconocimientos de objetos (modalidad localización) indicando así su incapacidad para desarrollar con éxito la prueba de memoria espacial, no se encontraron diferencias significativas al compararlos con el grupo control. (ii) Los animales con AP presentaron una reducción significativa de expresión de Arc/mm² con respecto a los controles. Esta diferencia se observa en las dos bandas y en las tres porciones del eje rostro-caudal del GD del hipocampo. Así, los animales con AP presentaron una disminución de su plasticidad sináptica. (iii) No se observaron diferencias significativas con respecto a la expresión de Dcx/mm². Los animales con AP presentaron una inmunoreactividad similar a los controles demostrando así una neurogénesis conservada. (iv) No se encontraron diferencias significativas entre los animales tratados y no tratados con tioperamida en la prueba de memoria espacial, la expresión de Arc/mm² y Dcx/mm². Por tanto, el tratamiento con tioperamida no tuvo efecto en los parámetros observados en esta investigación.

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio se observó, que si bien, la media del IR obtenido por las ratas con AP estuvo por debajo de los otros grupos con un puntaje alrededor de 0,5, indicando así su incapacidad para desarrollar con éxito la tarea de memoria espacial, los resultados muestran que no presentaron déficit en su memoria espacial a corto plazo (1 hora post-adquisición) al compararlas con los controles. Esto concuerda con un estudio realizado en paralelo por nuestro equipo de laboratorio (en proceso de publicación) (Silva, 2017). En tal estudio se utilizó la misma prueba conductual empleada en esta investigación, las ratas con AP también tuvieron un IR alrededor de 0,5 (0,493) y al igual que en la presente tesis, tampoco evidenciaron déficits de memoria espacial a los 60 minutos. Sólo presentaron alteraciones de la memoria espacial evaluada 24 horas después de la adquisición.

Así, en conjunto con los resultados y los antecedentes, se sugiere la presencia de un daño específico de la retención de la memoria espacial en ratas adultas con AP asociado con procesos de consolidación (largo plazo) y no con procesos de adquisición de la información (corto plazo).

Si bien está ampliamente reconocido que ratas adultas con AP tienen déficits en memoria espacial y no espacial (Blanco et al., 2015; Flores-Balter et al., 2016; Galeano et al., 2011, 2015; Morales et al., 2010; Simola et al., 2008), llama la atención el desempeño irregular que estas ratas han tenido en la adquisición de la memoria espacial evaluada mediante el Laberinto Acuático de Morris (Blanco et al., 2015; Galeano et al., 2011), sugiriendo así que esta etapa de la memoria puede tener cierto grado de sensibilidad al ser evaluada. Por tanto, cabe la posibilidad de que la memoria espacial a corto plazo sea menos sensible a los efectos nocivos de la AP que la memoria a largo plazo. Una explicación para esto podría ser una mayor participación de mecanismos neuroprotectores en el circuito neuronal que la sustentan. Así, se ha evidenciado que luego de un insulto asfíctico se produce un aumento significativo de la neurogénesis en el GD de ratas jóvenes con AP (Morales et al., 2008) y se ha demostrado que la neurogénesis adulta es necesaria para la formación de la memoria espacial (Goodman et al., 2010; Snyder et al., 2005). De la misma manera, se ha detectado una mayor ramificación (*sprouting*) de fibras musgosas del GD hacia la región CA3 en ratas adultas con AP (Morales et al., 2010). El incremento de la ramificación de fibras musgosas se ha correlacionado con mejor rendimiento cognitivo en el Laberinto Acuático de Morris (Prior et al., 1997). Por tanto, estos fenómenos podrían facilitar la recuperación de la funcionalidad del hipocampo haciendo que la memoria espacial a corto plazo no se vea afectada o sea menos sensible a un daño.

De la misma manera, factores relacionados con la recuperación de las ratas después de sufrir un insulto asfíctico podrían ocasionar una vulnerabilidad diferencial hacia los efectos perjudiciales de la AP. Se ha sugerido que el daño de la asfixia no se puede determinar únicamente por el tiempo de inmersión en el baño termorregulado. Se han reportado grandes variaciones en el porcentaje de ratas que sobrevive a este insulto, así en una asfixia de 21 minutos (utilizada en el presente estudio) sobrevive del 10% al 70% de las ratas (Loidl et al., 2000; Tapia-Bustos et al., 2016). En el presente estudio el 75% de las ratas sobrevivieron y mediante la escala Apgar se observó que el grado de recuperación luego de la inducción de la

AP, puede variar en cada individuo (ver Resultados: sección 5.1). No se conoce con certeza el origen de esta variabilidad, pero se sugiere que puede ser debido a la ubicación intrauterina y el tiempo de espera entre una cría y otra para salir del cuerno. Los animales con AP utilizados en este estudio presentaron características típicas que los identificaron como sujetos asfícticos tales como: una disminución significativa de la frecuencia respiratoria acompañada de *gaspings*, color de piel rosado azulado y bajo movimiento corporal espontáneo. Sin embargo, entre las mismas ratas con AP existieron variaciones individuales de los parámetros evaluados, ya que, aunque un gran porcentaje de ratas presentó color de piel rosado-azulado y un escaso movimiento corporal espontáneo otro pequeño porcentaje mostró parámetros más asociados con una recuperación normal como color de piel rosado, movimiento corporal espontáneo y un alto porcentaje (56%) no presentó respiración forzada. Por tanto, estos datos sugieren que el grado de recuperación después de sufrir un insulto asfíctico, es distinto para cada rata. Es importante mencionar que en este estudio se tomaron todas las ratas expuestas al insulto asfíctico y no se seleccionaron a las ratas por sus parámetros Apgar. Así, el Apgar obtenido en este estudio corresponde al dato de todas las ratas en conjunto y no se puede conocer con certeza que Apgar le corresponde a cada una, ya que no se ha podido implementar un método que permita identificar a la rata con su Apgar correspondiente. De esta manera, se sugiere para futuros estudios seleccionar a las ratas de acuerdo con sus parámetros Apgar a modo de obtener una mayor uniformidad de las características evaluadas o implementar un método que permita asociar de manera individual el Apgar de los animales. Esto permitiría correlacionar el Apgar individual con el IR obtenido en la conducta. Así, como consideración adicional para futuras investigaciones, quedaría por estudiar la correlación entre el rendimiento obtenido en una prueba espacial y parámetros Apgar para así determinar si la memoria espacial en ratas adultas puede verse afectada de acuerdo con el grado de recuperación después de la exposición a la AP.

Por otro lado, está ampliamente demostrado que la histamina mejora el aprendizaje y procesos relacionados con la memoria (Chen et al., 1999; Xu et al., 2009) y que antagonistas para el receptor H3 como la tioperamida, al aumentar la histamina cerebral (Arrang et al., 1983, 1987; Giannoni et al., 2009) favorecen la formación de memoria espacial en sujetos con o sin déficits (Bernaerts et al., 2004; Charlier et al., 2013; Orsetti et al., 2001, 2002). De

manera importante, un estudio en paralelo desarrollado por nuestro equipo de laboratorio demostró que una dosis de tioperamida de 10 mg/kg revierte el déficit de memoria no espacial en ratas adultas con AP evaluada 90 minutos después de la adquisición en la prueba de reconocimiento de objetos (modalidad de novedad) y que este déficit estaba correlacionado con la disminución significativa del número de neuronas histaminérgicas en el núcleo tuberomamilar ventral del hipotálamo (Flores-Balter et al., 2016). En la presente investigación se pudo observar que si bien, los animales con AP presentaron una inclinación a tener mayores IRs con la administración de tioperamida, no se encontró ningún efecto significativo del tratamiento con el fármaco en estos animales ni en los controles (ver Figura 8. Resultados: sección 5.2). Cabe mencionar que los resultados del efecto de la tioperamida corresponden a animales AP sin déficit de memoria espacial y hay que considerar que el efecto de la tioperamida puede depender del grado de compromiso de la memoria. Así, se ha demostrado por medio de la tarea de Evitación Pasiva que el déficit de memoria espacial inducido por escopolamina (anticolinérgico) se revirtió completamente con 5 y 10 mg/kg de tioperamida mientras que el inducido por la dizocilpina (antagonista NMDA) se revirtió sólo con 10 mg/kg (Bernaerts et al., 2004). Por tanto, no se descarta la probabilidad de que, dado que los animales con AP no presentaron déficit de su memoria espacial a corto plazo, es posible que el efecto positivo de la tioperamida no se haya reflejado de manera significativa en la conducta con las dosis administradas. Adicionalmente, existen antecedentes que indican que los efectos de la tioperamida pueden depender de la dosis y del momento de su administración. Así, se ha observado en animales normales que sólo la administración sistémica de 20 mg/kg de tioperamida, 20 minutos antes de la etapa de adquisición y/o retención en la prueba de Evitación Pasiva, mejora el rendimiento cognitivo después de 24 horas (Charlier et al., 2013). Dosis intermedias 5, 10 y 20 mg/kg tienen efecto 24 horas después de la realización de la prueba de Evitación Pasiva cuando se administran inmediatamente después de la adquisición (Bernaerts et al., 2004). La administración de una dosis más baja (2 mg/kg) inmediatamente después de la adquisición, tiene efecto en la retención evaluada 5 horas después de la realización de la prueba del Laberinto en Y (Orsetti et al., 2001). De la misma manera, el efecto de antagonistas H3 en la memoria puede depender del tipo de paradigma conductual. Un estudio reveló que la tioperamida y el ciproxifan revirtieron de manera significativa el déficit de memoria espacial inducido por la escopolamina en la tarea del Laberinto Acuático

de Morris, mientras que en el Laberinto de Barnes solo el ciproxifan tuvo un efecto significativo (Komater et al., 2005).

Por tanto, dado que el efecto de los antagonistas H3 puede depender del grado de compromiso de la memoria, de la dosis, del momento de administración y del tipo de paradigma conductual y, dado que no existen investigaciones a la fecha que evalúen el efecto de la tioperamida en la memoria espacial a corto plazo mediante el paradigma conductual utilizado en este estudio, los resultados obtenidos en esta investigación son un punto de partida para futuras investigaciones.

Uno de los hallazgos más importantes de esta investigación es haber encontrado una disminución significativa de la plasticidad sináptica en animales con AP. Se observó que la AP indujo una disminución significativa de la expresión total de Arc/mm² en el GD comparado con los controles (ver Resultados: sección 5.3) que permaneció tanto en las bandas infra y suprapiramidal como en el eje rostro-caudal, evidenciando así alteraciones en la plasticidad sináptica. Se ha demostrado que las neuronas granulares de la banda suprapiramidal presentan una gran activación frente estímulos espaciales, siendo mayor la actividad en el eje rostro-medial cuando se procesa información a corto plazo (Gallitano et al., 2016). Así, este hallazgo es importante porque demuestra la presencia de alteraciones en la plasticidad sináptica de ratas adultas con AP, lo que sugiere que efectivamente pueden presentar déficits cognitivos como consecuencia de la alteración en los procesos de plasticidad. El desequilibrio metabólico originado por la AP ocasiona graves alteraciones cerebrales en la plasticidad sináptica estructural. En seres humanos se ha visto una reducción del área hipocampal junto con déficits de memoria espacial (Gadian et al., 2000; Vargha-Khadem et al., 1997). Igualmente, en modelos animales existen alteraciones tanto en el circuito neuronal relacionado con la memoria espacial (hipocampo, corteza parietal y pre-límbica) como en el relacionado con la memoria no espacial (tálamo y otras estructuras subcorticales) (Bjelke et al., 1991; Kohlhauser et al., 1999). Así, ratas con AP a los siete días de nacidas presentan un aumento de proteínas pro y anti apoptóticas (BAD y BCL-2 respectivamente), células con morfología apoptótica (contracción del citoesqueleto, condensación de la cromatina) y muerte celular en las regiones CA1, CA3 y GD del hipocampo que persiste en CA3 después de un mes de la exposición a la AP (Morales et al.,

2008, 2010). La muerte celular no sólo está presente en las primeras etapas del nacimiento, sino también en la adultez (Kohlhauser et al., 1999). Adicionalmente, se han observado alteraciones en las neuronas piramidales del área hipocampal CA1 en ratas con AP de 4 meses de edad que incluyen el aumento de células apoptóticas, la disminución en el número de espinas dendríticas con forma de hongo y disminución de β -actina, una proteína importante para la integridad estructural de las PSD (densidades postsinápticas) las cuales evidenciaron un incremento de grosor y nivel de ubiquitinación (Saraceno, Castilla, et al., 2012). Al respecto, la ubiquitinación de proteínas sinápticas se ha observado en algunos trastornos neurodegenerativos (Korhonen y Lindholm, 2004). Por tanto, las disfunciones de las espinas dendríticas encontradas en ratas con AP indican cierto grado de degeneración sináptica que podría ocasionar alteraciones en la memoria. Las alteraciones en la plasticidad sináptica no sólo se han evidenciado de forma estructural sino también funcional. Así, estudios electrofisiológicos de nuestro laboratorio mostraron una disminución de *LTP* en el hipocampo de ratas adultas que sufrieron AP (Rojas-Mancilla et al., 2018 en preparación).

El gen *Arc* codifica una proteína asociada al citoesqueleto que participa en la plasticidad neuronal del GD del hipocampo (Link et al., 1995) siendo crucial para la consolidación de la memoria espacial y el mantenimiento de *LTP* (Guzowski et al., 2000; Messaoudi et al., 2007; Nakayama et al., 2015; Plath et al., 2006; Ramirez-Amaya et al., 2013). Por tanto, como se describió anteriormente, las alteraciones en las neuronas hipocampales debido a la AP podrían afectar la expresión de *Arc* dificultando su actividad y participación en el procesamiento de la memoria espacial.

Así, dado lo anterior, se sugiere que la menor inmunoreactividad para *Arc* observada en los animales con AP puede ser debido a: (i) un menor número de neuronas en el GD y por consiguiente haya menos neuronas que expresen *Arc* y/o (ii) a alteraciones morfológicas y estructurales relacionadas con las neuronas hipocampales lo que afectaría a las espinas dendríticas y a las PSD ocasionando dificultades en la expresión *Arc*.

Por otro lado, como se pudo observar en los resultados (ver Resultados: sección 5.3), el tratamiento con tioperamida no afectó la expresión de *Arc* en ninguno de los grupos evaluados. Está bien documentado que la histamina favorece los procesos de plasticidad sináptica potenciando la *LTP* en el hipocampo y promoviendo las sinapsis glutamatérgicas

debilitando la unión de Mg^{2+} a los receptores NMDA (Haas y Panula, 2003; Vorobjev et al., 1993). Por tanto, los cambios en la plasticidad sináptica por la tioperamida podrían ser realizados por una vía alternativa y no la relacionada con la expresión de Arc. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que factores relacionados a la dosis y administración de la tioperamida hayan afectado la expresión de Arc.

Con respecto a la inmunoreactividad para Dcx (ver Resultados: sección 5.4), se encontró que los animales con AP presentaron una inmunoreactividad similar a los controles, demostrando así que la neurogénesis hipocampal está conservada. Se ha observado que en la primera semana de vida de ratas con AP, hay un incremento de muerte celular en todo el hipocampo que se acompaña de un aumento en la neurogénesis en el GD y el área CA1 (Morales et al., 2008). De la misma manera, cultivos organotípicos han mostrado un aumento de la neurogénesis en el GD observada mediante inmunoreactividad para BrdU/MAP-2 (Morales et al., 2005, 2007). Sin embargo, no está claro que un evento ocurrido en el momento de nacer afecte de manera permanente la proliferación celular. Por lo tanto, encontrar una inmunoreactividad similar entre los dos grupos sugiere que la dinámica de generación de las nuevas neuronas en ratas adultas con AP se recupera. Adicionalmente, se ha sugerido que este aumento en la neurogénesis puede ser un mecanismo compensatorio para reparar los daños causados en la plasticidad, como se mencionó en la parte conductual de esta discusión.

Estudios *in vitro* han mostrado que la histamina favorece los procesos de proliferación y diferenciación neuronal (Molina-Hernández y Velasco, 2008; Rodríguez-Martínez et al., 2012). Recientemente en un estudio se demostró que la administración durante 28 días consecutivos del antagonista S38093 para el receptor H3 promueve la neurogénesis en el GD de ratones adultos (3 meses de edad) (Guilloux et al., 2017). Se evidenció un aumento del número de células en la proliferación y la supervivencia por medio de BrdU y un aumento en la maduración mediante Dcx que se reflejó únicamente en el incremento de neuronas con dendritas terciarias (Guilloux et al., 2017). En el presente estudio no evaluamos el número de ramificaciones o complejidad de las arborizaciones dendríticas tanto en las neuronas que expresaron Dcx como las que expresaron Arc, por lo tanto, se sugiere para futuras investigaciones evaluar las características morfológicas de las neuronas hipocampales en ratas adultas con AP con y sin tratamiento con antagonistas H3.

En la rata adulta normal el ciclo de proliferación de una célula progenitora neural es de 25 horas, siendo posible encontrar cada 4 horas nuevos precursores neuronales en el GD (Cameron y McKay, 2001). En esta investigación se administró tioperamida dos días antes de eutanizar a los animales (los días 1 y 2 habituación; 5 mg/kg) por lo que al realizar el recuento de células DCX positivas se obtuvo el número total de neuronas inmaduras que se encontraron al día 3 que incluía neuronas inmaduras generadas días antes, durante y después de la fase de habituación. Por lo tanto, el efecto de la administración del antagonista H3 pudo estar enmascarado por la proliferación basal. Esta dificultad técnica se hubiera podido superar utilizando un marcador como el BrdU, un marcador de proliferación celular que se incorpora a la fase S del ciclo celular (Taupin 2007) y tiene la ventaja de que permite ver de manera diferencial las neuronas que se generan en un momento determinado.

En conclusión, dado que la AP es una complicación médica que puede afectar el desarrollo del individuo a largo plazo, esta investigación permitió acercarse a los fenómenos y las consecuencias que la AP puede desencadenar en la memoria, plasticidad sináptica y neurogénesis en una ventana temporal que todavía sigue en investigación, como es la adultez. Estudios sobre la plasticidad sináptica estructural y funcional podrían complementar los hallazgos de esta investigación. Así, esta investigación podría funcionar como un punto de partida para orientar futuras investigaciones.

VII. CONCLUSIONES

- Comparado con los controles, los animales con AP no presentaron déficit en su memoria espacial evaluada 1 hora después de la adquisición mediante la prueba de reconocimiento de objetos en la modalidad de localización.
- Comparado con los controles, los animales con AP evidenciaron una disminución de la plasticidad sináptica hipocampal evaluada mediante inmunohistoquímica para Arc.
- Comparado con los controles, los animales con AP no evidenciaron cambios en la neurogénesis hipocampal evaluada mediante inmunohistoquímica para Dcx.
- El tratamiento con tioperamida no tuvo efecto en la memoria espacial, plasticidad sináptica y neurogénesis hipocampal en los animales con AP y controles.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Aimone, J., Li, Y., Lee, S., Clemenson, G., Deng, W., y Gage, F. (2014). Regulation and Function of Adult Neurogenesis: From Genes to Cognition. *Physiological Reviews*, 94(4), 991-1026.
- Altman, J. (1969). Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *Journal of Comparative Neurology*, 137(4), 433-457.
- Altman, J., y Das, G. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *Journal of Comparative Neurology*, 124(3), 319-335.
- Arrang, J., Garbarg, M., y Schwartz, J. (1983). Auto-inhibition of brain histamine release mediated by a novel class (H3) of histamine receptor. *Nature*, 302(5911), 832-837.
- Arrang, J., Garbarg, M., y Schwartz, J. (1987). Autoinhibition of histamine synthesis mediated by presynaptic H3-receptors. *Neuroscience*, 23(1), 149-157.
- Bacciottini, L., Passani, M., Giovannelli, L., Cangoli, I., Mannaioni, P., Schunack, W., y Blandina, P. (2002). Endogenous histamine in the medial septum-diagonal band complex increases the release of acetylcholine from the hippocampus: A dual-probe microdialysis study in the freely moving rat. *European Journal of Neuroscience*, 15(10), 1669-1680.
- Barker, G., y Warburton, E. (2011). When Is the Hippocampus Involved in Recognition Memory? *Journal of Neuroscience*, 31(29), 10721-10731.
- Bax, M., y Nelson, K. (1993). Birth Asphyxia: a Statement. *Developmental Medicine & Child Neurology*, 35(11), 1022-1024.
- Berger, R., y Garnier, Y. (1999). Pathophysiology of perinatal brain damage. *Brain Research Reviews*.
- Bergquist, F., Ruthven, A., Ludwig, M., y Dutia, M. (2006). Histaminergic and glycinergic modulation of GABA release in the vestibular nuclei of normal and labyrinthectomised rats. *The Journal of physiology*, 577(Pt 3), 857-868.
- Bernaerts, P., Lamberty, Y., y Tirelli, E. (2004). Histamine H3 antagonist thioperamide dose-dependently enhances memory consolidation and reverses amnesia induced by dizocilpine or scopolamine in a one-trial inhibitory avoidance task in mice. *Behavioural*

- Brain Research, 154(1), 211-219.
- Bjelke, B., Andersson, K., Ögren, S., y Bolme, P. (1991). Asphyctic lesion: proliferation of tyrosine hydroxylase-immunoreactive nerve cell bodies in the rat substantia nigra and functional changes in dopamine neurotransmission. *Brain Research*, 543(1), 1-9.
- Blanco, E., Galeano, P., Holubiec, M., Romero, J., Logica, T., Rivera, P., Pavón, F., Suarez, J., Capani, F., y Rodríguez de Fonseca, F. (2015). Perinatal asphyxia results in altered expression of the hippocampal acylethanolamide/endocannabinoid signaling system associated to memory impairments in postweaned rats. *Frontiers in Neuroanatomy*, 9, 141.
- Borg, E. (1997). Perinatal asphyxia, hypoxia, ischemia and hearing loss. An overview. *Scandinavian audiology*, 26(2), 77-91.
- Broadbent, N., Gaskin, S., Squire, L., y Clark, R. (2010). Object recognition memory and the rodent hippocampus. *Learning & Memory*, 17(1), 5-11.
- Brown, J., Couillard-Després, S., Cooper-Kuhn, C., Winkler, J., Aigner, L., y Kuhn, H. (2003). Transient Expression of Doublecortin during Adult Neurogenesis. *Journal of Comparative Neurology*, 467(1), 1-10.
- Brown, R., y Haas, H. (1999). On the mechanism of histaminergic inhibition of glutamate release in the rat dentate gyrus. *Journal of Physiology*, 515(3), 777-786.
- Bustamante, D., Morales, P., Pereyra, J., Goiny, M., y Herrera-Marschitz, M. (2007). Nicotinamide prevents the effect of perinatal asphyxia on dopamine release evaluated with in vivo microdialysis 3 months after birth. *Experimental Brain Research*, 177(3), 358-369.
- Cameron, H., y McKay, R. (2001). Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *Journal of Comparative Neurology*, 435(4), 406-417.
- Capani, F., Saraceno, G., Botti, V., Aon-Bertolino, L., Madureira de Oliveira, D., Barreto, G., Galeano, P., Giraldez-Alvarez, L., y Coirini, H. (2009). Protein ubiquitination in postsynaptic densities after hypoxia in rat neostriatum is blocked by hypothermia. *Experimental Neurology*, 219(2), 404-413.
- Carlo, G., Ghi, P., y Orsetti, M. (2000). Effect of R(-)-alpha-methylhistamine and thioperamide on in vivo release of norepinephrine in the rat hippocampus. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 24(2), 275-284.

- Charlier, Y., Brabant, C., Serrano, M., Lamberty, Y., y Tirelli, E. (2013). The prototypical histamine H3 receptor inverse agonist thioperamide improves multiple aspects of memory processing in an inhibitory avoidance task. *Behavioural Brain Research*, 253, 121-127.
- Chen, Z., Sugimoto, Y., y Kamei, C. (1999). Effects of intracerebroventricular injection of alpha-fluoromethylhistidine on radial maze performance in rats. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 64(3), 513-518.
- Clark, R., Zola, S., y Squire, L. (2000). Impaired recognition memory in rats after damage to the hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 20(23), 8853-8860.
- Couillard-Despres, S., Winner, B., Schaubeck, S., Aigner, R., Vroemen, M., Weidner, N., Bogdahn, U., Winkler, J., Kuhn, H., y Aigner, L. (2005). Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. *European Journal of Neuroscience*, 21(1), 1-14.
- Dale, H., y Laidlaw, P. (1910). The physiological action of beta-iminazolyethylamine. *The Journal of physiology*, 41(5), 318-344.
- Daval, J. L., Pourié, G., Grojean, S., Lièvre, V., Strazielle, C., Blaise, S., y Vert, P. (2004). Neonatal Hypoxia Triggers Transient Apoptosis Followed by Neurogenesis in the Rat CA1 Hippocampus. *Pediatric Research*, 55(4), 561-567.
- De Haan, M., Wyatt, J., Roth, S., Vargha-Khadem, F., Gadian, D., y Mishkin, M. (2006). Brain and cognitive-behavioural development after asphyxia at term birth. *Developmental Science*, 9(4), 350-358.
- Dombeck, D., Harvey, C., Tian, L., Looger, L., y Tank, D. (2010). Functional imaging of hippocampal place cells at cellular resolution during virtual navigation. *Nature Neuroscience*, 13(11), 1433-1440.
- Doreulee, N., Yanovsky, Y., Flagmeyer, I., Stevens, D. R., Haas, H., y Brown, R. E. (2000). Histamine H3 receptors depress synaptic transmission in the corticostriatal pathway. *Neuropharmacology*, 40(1), 106-113.
- Dringenberg, H. C., y Kuo, M. C. (2006). Cholinergic, histaminergic, and noradrenergic regulation of LTP stability and induction threshold: cognitive implications. *Exs*, 98, 165-183.
- Ericson, H., Blomqvist, A., y Köehler, C. (1991). Origin of neuronal inputs to the region of the tuberomammillary nucleus of the rat brain. *Journal of Comparative Neurology*,

311(1), 45-64.

- Espósito, M. S., Piatti, V. C., Laplagne, D. A., Morgenstern, N. A., Ferrari, C. C., Pitossi, F. J., y Schinder, A. F. (2005). Neuronal Differentiation in the Adult Hippocampus Recapitulates Embryonic Development. *The Journal of neuroscience*, 25(44), 10074-10086.
- Felten, D. L., y Shetty, A. N. (2010). *Netter's Atlas of Neuroscience. Netter's Atlas of Neuroscience. 2 Edn. Philadelphia: Saunders; Elsevier, 438.*
- Flores-Balter, G., Cordova-Jadue, H., Chiti-Morales, A., Lespay, C., Espina-Marchant, P., Falcon, R., Grinspun, N., Sanchez, J., Bustamante, D., Morales, P., Herrera-Marschitz, M., y Valdés, J. L. (2016). Effect of perinatal asphyxia on tuberomammillary nucleus neuronal density and object recognition memory: A possible role for histamine? *Behavioural Brain Research*, 313, 226-232.
- Fox, G. B., Pan, J. B., Esbenshade, T. A., Bennani, Y. L., Black, L. A., Faghieh, R., Hancock, A. A., y Decker, M. W. (2002). Effects of histamine H3 receptor ligands GT-2331 and ciproxifan in a repeated acquisition avoidance response in the spontaneously hypertensive rat pup. *Behavioural Brain Research*, 131(1-2), 151-161.
- Gadian, D. G., Aicardi, J., Watkins, K. E., Porter, D. A., Mishkin, M., y Vargha-Khadem, F. (2000). Developmental amnesia associated with early hypoxic-ischaemic injury. *Brain : a journal of neurology*, 123 Pt 3, 499-507.
- Gage, F. H. (2000). Mammalian Neural Stem Cells. *Science*, 287(5457), 1433-1438.
- Galeano, P., Blanco, E., Logica Tornatore, T. M. A., Romero, J. I., Holubiec, M. I., Rodríguez de Fonseca, F., y Capani, F. (2015). Life-long environmental enrichment counteracts spatial learning, reference and working memory deficits in middle-aged rats subjected to perinatal asphyxia. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 8.
- Galeano, P., Blanco Calvo, E., Madureira de Oliveira, D., Cuenya, L., Kamenetzky, G. V., Mustaca, A. E., Barreto, G. E., Giraldez-Alvarez, L. D., Milei, J., y Capani, F. (2011). Long-lasting effects of perinatal asphyxia on exploration, memory and incentive downshift. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 29(6), 609-619.
- Gallitano, A. L., Satvat, E., Gil, M., y Marrone, D. F. (2016). Distinct dendritic morphology across the blades of the rodent dentate gyrus. *Synapse*, 70(7), 277-282.
- Ge, S., Yang, C. hao, Hsu, K. sen, Ming, G. li, y Song, H. (2007). A Critical Period for

- Enhanced Synaptic Plasticity in Newly Generated Neurons of the Adult Brain. *Neuron*, 54(4), 559-566.
- Giannoni, P., Passani, M. B., Nosi, D., Chazot, P. L., Shenton, F. C., Medhurst, A. D., Munari, L., y Blandina, P. (2009). Heterogeneity of histaminergic neurons in the tuberomammillary nucleus of the rat. *European Journal of Neuroscience*, 29(12), 2363-2374.
- Gilbert, P. E., Kesner, R. P., y Lee, I. (2001). Dissociating hippocampal subregions: A double dissociation between dentate gyrus and CA1. *Hippocampus*, 11(6), 626-636.
- Gleeson, J. G., Peter, L., Flanagan, L. A., y Walsh, C. A. (1999). Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron*, 23(2), 257-271.
- Gonzalez, F. F., y Miller, S. P. (2006). Does perinatal asphyxia impair cognitive function without cerebral palsy? *Archives of Disease in Childhood: Fetal and Neonatal Edition*.
- Goodman, T., Trouche, S., Massou, I., Verret, L., Zerwas, M., Roullet, P., y Rampon, C. (2010). Young hippocampal neurons are critical for recent and remote spatial memory in adult mice. *Neuroscience*, 171(3), 769-778.
- Guilloux, J. P., Samuels, B. A., Mendez-David, I., Hu, A., Levinstein, M., Faye, C., Mekiri, M., Mocaer, E., Gardier, A. M., Hen, R., Sors, A., y David, D. J. (2017). S 38093, a histamine H3 antagonist/inverse agonist, promotes hippocampal neurogenesis and improves context discrimination task in aged mice. *Scientific Reports*, 7.
- Guzowski, J. F., Lyford, G. L., Stevenson, G. D., Houston, F. P., McGaugh, J. L., Worley, P. F., y Barnes, C. A. (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. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 20(11), 3993-4001.
- Haas, H., y Panula, P. (2003). The role of histamine and the tuberomammillary nucleus in the nervous system. *Nat Rev Neurosci*, 4(2), 121-130.
- Haas, H., Sergeeva, O. A., y Selbach, O. (2008). Histamine in the Nervous System. *Physiological Reviews*, 88(3), 1183-1241.
- Hebb, D. O. (1949). *The Organization of Behavior*. *The Organization of Behavior*, 911(1), 335.

- Hernández-Rabaza, V., Hontecillas-Prieto, L., Velázquez-Sánchez, C., Ferragud, A., Pérez-Villaba, A., Arcusa, A., Barcia, J. A., Trejo, J. L., y Canales, J. J. (2008). The hippocampal dentate gyrus is essential for generating contextual memories of fear and drug-induced reward. *Neurobiology of Learning and Memory*, 90(3), 553-559.
- Herrera-Marschitz, M., Loidl, C. F., Andersson, K., y Ungerstedt, U. (1993). Prevention of mortality induced by perinatal asphyxia: Hypothermia or glutamate antagonism? *Amino Acids*, 5(3), 413-419.
- Herrera-Marschitz, M., Morales, P., Leyton, L., Bustamante, D., Klawitter, V., Espina-Marchant, P., Allende, C., Lisboa, F., Cunich, G., Jara-Cavieles, A., Neira, T., Gutierrez-Hernandez, M. A., Gonzalez-Lira, V., Simola, N., Schmitt, A., Morelli, M., Tasker, R. A., y Gebicke-Haerter, P. J. (2011). Perinatal asphyxia: Current status and approaches towards neuroprotective strategies, with focus on sentinel proteins. *Neurotoxicity Research*.
- Institute for Laboratory Animal Research. (2011). *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: 8th Ed. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*.
- Kohlhauser, C., Kaehler, S., Mosgoeller, W., Singewald, N., Kouvelas, D., Prast, H., Hoeger, H., y Lubec, B. (1999). Histological changes and neurotransmitter levels three months following perinatal asphyxia in the rat. *Life Sciences*, 64(23), 2109-2124.
- Komater, V. A., Buckley, M. J., Browman, K. E., Pan, J. B., Hancock, A. A., Decker, M. W., y Fox, G. B. (2005). Effects of histamine H3 receptor antagonists in two models of spatial learning. *Behavioural Brain Research*, 159(2), 295-300.
- Korhonen, L., y Lindholm, D. (2004). The ubiquitin proteasome system in synaptic and axonal degeneration: A new twist to an old cycle. *Journal of Cell Biology*.
- Kurinczuk, J. J., White-Koning, M., y Badawi, N. (2010). Epidemiology of neonatal encephalopathy and hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Early Human Development*.
- Leurs, R., Bakker, R. A., Timmerman, H., y de Esch, I. J. P. (2005). The histamine H3 receptor: from gene cloning to H3 receptor drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4(2), 107-120.
- Ligneau, X., Perrin, D., Landais, L., Camelin, J. C., Calmels, T. P., Berrebi-Bertrand, I., ... Schwartz, J. C. (2007). BF2.649 [1-{3-[3-(4-Chlorophenyl)propoxy]propyl}piperidine, hydrochloride], a nonimidazole inverse agonist/antagonist at the human histamine H3

- receptor: Preclinical pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther*, 320(1), 365-375.
- Ling, P., Ngo, K., Nguyen, S., Thurmond, R. L., Edwards, J. P., Karlsson, L., y Fung-Leung, W.-P. (2004). Histamine H4 receptor mediates eosinophil chemotaxis with cell shape change and adhesion molecule upregulation. *British journal of pharmacology*, 142(1), 161-171.
- Link, W. W., Konietzko, U. U., Kauselmann, G. G., Krug, M. M., Schwanke, B. B., Frey, U. U., y Kuhl, D. D. (1995). Somatodendritic expression of an immediate early gene is regulated by synaptic activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(12), 5734-5738.
- Loidl, C. F., Gavilanes, A. W. D., Van Dijk, E. H. J., Vreuls, W., Blokland, A., Vles, J. S. H., Steinbusch, H. W. M., y Blanco, C. E. (2000). Effects of hypothermia and gender on survival and behavior after perinatal asphyxia in rats. *Physiology and Behavior*, 68(3), 263-269.
- Marriott, A. L., Rojas-Mancilla, E., Morales, P., Herrera-Marschitz, M., y Tasker, R. A. (2017). Models of progressive neurological dysfunction originating early in life. *Progress in Neurobiology*.
- Messaoudi, E., Kanhema, T., Soule, J., Tiron, A., Dageyte, G., da Silva, B., y Bramham, C. R. (2007). Sustained Arc/Arg3.1 Synthesis Controls Long-Term Potentiation Consolidation through Regulation of Local Actin Polymerization in the Dentate Gyrus In Vivo. *Journal of Neuroscience*, 27(39), 10445-10455.
- Miyazaki, S., Imaizumi, M., y Onodera, K. (1995). Effects of thioperamide on the cholinergic system and the step-through passive avoidance test in mice. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 17(10), 653-658.
- Molina-Hernández, A., y Velasco, I. (2008). Histamine induces neural stem cell proliferation and neuronal differentiation by activation of distinct histamine receptors. *Journal of Neurochemistry*, 106(2), 706-717.
- Morales, P., Fiedler, J. L., Andrés, S., Berrios, C., Huaiquín, P., Bustamante, D., Cardenas, S., Parra, E., y Herrera-Marschitz, M. (2008). Plasticity of hippocampus following perinatal asphyxia: Effects on postnatal apoptosis and neurogenesis. *Journal of Neuroscience Research*, 86(12), 2650-2662.
- Morales, P., Huaiquin, P., Bustamante, D., Fiedler, J., y Herrera-Marschitz, M. (2007).

- Perinatal asphyxia induces neurogenesis in hippocampus: An organotypic culture study. *Neurotoxicity Research*, 12(1), 81-84.
- Morales, P., Reyes, P., Klawitter, V., Huaiquín, P., Bustamante, D., Fiedler, J., y Herrera-Marschitz, M. (2005). Effects of perinatal asphyxia on cell proliferation and neuronal phenotype evaluated with organotypic hippocampal cultures. *Neuroscience*, 135(2), 421-431.
- Morales, P., Simola, N., Bustamante, D., Lisboa, F., Fiedler, J., Gebicke-Haerter, P. J., Morelli, M., Tasker, R. A., y Herrera-Marschitz, M. (2010). Nicotinamide prevents the long-term effects of perinatal asphyxia on apoptosis, non-spatial working memory and anxiety in rats. *Experimental Brain Research*, 202(1), 1-14.
- Morgan, R. K., McAllister, B., Cross, L., Green, D. S., Kornfeld, H., Center, D. M., y Cruikshank, W. W. (2007). Histamine 4 receptor activation induces recruitment of FoxP3+ T cells and inhibits allergic asthma in a murine model. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 178(12), 8081-8089.
- Morris, R., Garrud, P., Rawlins, J., y O'Keefe, J. (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*, 297(5868), 681-683.
- Morris, R., Schenk, F., Tweedie, F., y Jarrard, L. (1990). Ibotenate Lesions of Hippocampus and/or Subiculum: Dissociating Components of Allocentric Spatial Learning. *European Journal of Neuroscience*, 2(12), 1016-1028.
- Munakata, M., y Akaike, N. (1994). Regulation of K⁺ conductance by histamine H1 and H2 receptors in neurones dissociated from rat neostriatum. *The Journal of physiology*, 480 (Pt 2), 233-245.
- Nakayama, D., Iwata, H., Teshirogi, C., Ikegaya, Y., Matsuki, N., y Nomura, H. (2015). Long-Delayed Expression of the Immediate Early Gene Arc/Arg3.1 Refines Neuronal Circuits to Perpetuate Fear Memory. *Journal of Neuroscience*, 35(2), 819-830.
- O'Keefe, J., y Dostrovsky, J. (1971). Short Communications The hippocampus as a spatial map: Preliminary evidence from unit activity in the freely moving rat. *Brain research*, 34, 171-175.
- Orsetti, M., Ferretti, C., Gamalero, R. S., y Ghi, P. (2002). Histamine H3-receptor blockade in the rat nucleus basalis magnocellularis improves place recognition memory. *Psychopharmacology*, 159(2), 133-137.

- Orsetti, M., Ghi, P., y Carlo, G. (2001). Histamine H3-receptor antagonism improves memory retention and reverses the cognitive deficit induced by scopolamine in a two-trial place recognition task. En *Behavioural Brain Research* (Vol. 124, pp. 235-242).
- Panja, D., Dageyte, G., Bidinosti, M., Wibrand, K., Kristiansen, Å. M., Sonenberg, N., y Bramham, C. R. (2009). Novel translational control in arc-dependent long term potentiation consolidation in Vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 284(46), 31498-31511.
- Panula, P., y Nuutinen, S. (2013). The histaminergic network in the brain: Basic organization and role in disease. *Nature Reviews Neuroscience*.
- Panula, P., Yang, H., y Costa, E. (1984). Histamine-containing neurons in the rat hypothalamus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(8), 2572-2576.
- Paxinos, G. (2015). *The Rat Nervous System. The Rat Nervous System*.
- Pillot, C., Heron, A., Cochois, V., Tardivel-Lacombe, J., Ligneau, X., Schwartz, J. C., y Arrang, J. M. (2002). A detailed mapping of the histamine H3 receptor and its gene transcripts in rat brain. *Neuroscience*, 114(1), 173-193.
- Plath, N., Ohana, O., Dammermann, B., Errington, M. L., Schmitz, D., Gross, C., ... Kuhl, D. (2006). Arc/Arg3.1 Is Essential for the Consolidation of Synaptic Plasticity and Memories. *Neuron*, 52(3), 437-444.
- Prior, H., Schwegler, H., y Dücker, G. (1997). Dissociation of spatial reference memory, spatial working memory, and hippocampal mossy fiber distribution in two rat strains differing in emotionality. *Behavioural Brain Research*, 87(2), 183-194.
- Ramirez-Amaya, V., Angulo-Perkins, A., Chawla, M. K., Barnes, C. A., y Rosi, S. (2013). Sustained Transcription of the Immediate Early Gene Arc in the Dentate Gyrus after Spatial Exploration. *Journal of Neuroscience*, 33(4), 1631-1639.
- Reynolds, B. A., y Weiss, S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*, 255(5052), 1707-1710.
- Rodríguez-Martínez, G., Velasco, I., García-López, G., Solís, K. H., Flores-Herrera, H., Díaz, N. F., y Molina-Hernández, A. (2012). Histamine is required during neural stem cell proliferation to increase neuron differentiation. *Neuroscience*, 216, 10-17.
- Saraceno, G. E., Ayala, M. V., Badorrey, M. S., Holubiec, M., Romero, J. I., Galeano, P.,

- Barreto, G., Giraldez-Alvárez, L. D., Kölliker-fres, R., Coirini, H., y Capani, F. (2012). Effects of perinatal asphyxia on rat striatal cytoskeleton. *Synapse*, 66(1), 9-19.
- Saraceno, G. E., Castilla, R., Barreto, G. E., Gonzalez, J., Klliker-Frers, R. A., y Capani, F. (2012). Hippocampal dendritic spines modifications induced by perinatal asphyxia. *Neural Plasticity*, 2012.
- Schwartz, J. C., Arrang, J. M., Garbarg, M., Pollard, H., y Ruat, M. (1991). *Histaminergic transmission in the mammalian brain. Physiological reviews*, 71(1).
- Siesjö, B. K., Katsura, K., Zhao, Q., Folbergrová, J., Pahlmark, K., Siesjö, P., y Smith, M. L. (1995). Mechanisms of secondary brain damage in global and focal ischemia: a speculative synthesis. *Journal of neurotrauma*, 12(5), 943-956.
- Silva, J. (2017). *Efecto del ejercicio físico voluntario sobre las capacidades de memoria en un modelo animal de Asfixia Perinatal*. Tesis. Universidad de Chile.
- Simola, N., Bustamante, D., Pinna, A., Pontis, S., Morales, P., Morelli, M., y Herrera-Marschitz, M. (2008). Acute perinatal asphyxia impairs non-spatial memory and alters motor coordination in adult male rats. *Experimental Brain Research*, 185(4), 595-601.
- Snyder, J. S., Hong, N. S., McDonald, R. J., y Wojtowicz, J. M. (2005). A role for adult neurogenesis in spatial long-term memory. *Neuroscience*, 130(4), 843-852.
- Spalding, K. L., Bergmann, O., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Huttner, H. B., Boström, E., Westerlund, I., Vial, C., Buchholz, B. A., Possnert, G., Mash, D. C., Druid, H., y Frisén, J. (2013). Dynamics of Hippocampal Neurogenesis in Adult Humans. *Cell*, 153(6), 1219-1227.
- Stanton, P. K. (1996). LTD, LTP, and the sliding threshold for long-term synaptic plasticity. *Hippocampus*, 6(1), 35-42.
- Steward, O., y Worley, P. F. (2001). Selective targeting of newly synthesized Arc mRNA to active synapses requires NMDA receptor activation. *Neuron*, 30(1), 227-240.
- Strackx, E., Van den Hove, D. L. A., Prickaerts, J., Zimmermann, L., Steinbusch, H. W. M., Blanco, C. E., Danilo Gavilanes, A. W., y Vles, J. S. H. (2010). Fetal asphyctic preconditioning protects against perinatal asphyxia-induced behavioral consequences in adulthood. *Behavioural Brain Research*, 208(2), 343-351.
- Tapia-Bustos, A., Perez-Lobos, R., Vío, V., Lespay-Rebolledo, C., Palacios, E., Chiti-Morales, A., Bustamante, D., Herrera-Marschitz, M., y Morales, P. (2016). Modulation of

- Postnatal Neurogenesis by Perinatal Asphyxia: Effect of D1 and D2 Dopamine Receptor Agonists. *Neurotoxicity Research*, 1-13.
- Threlfell, S., Cragg, S. J., Kallo, I., Turi, G. F., Coen, C. W., y Greenfield, S. A. (2004). Histamine H3 Receptors Inhibit Serotonin Release in Substantia Nigra Pars Reticulata. *Journal of Neuroscience*, 24(40), 8704-8710.
- Traub, R. D., y Miles, R. (1991). *Neuronal Networks of the Hippocampus. Neuronal Networks of the Hippocampus*, 777(1991).
- Valdés, J. L., Maldonado, P., Recabarren, M., Fuentes, R., y Torrealba, F. (2006). The infralimbic cortical area commands the behavioral and vegetative arousal during appetitive behavior in the rat. *European Journal of Neuroscience*, 23(5), 1352-1364.
- Valdés, J. L., Sánchez, C., Riveros, M. E., Blandina, P., Contreras, M., Farías, P., y Torrealba, F. (2010). The histaminergic tuberomammillary nucleus is critical for motivated arousal. *European Journal of Neuroscience*, 31(11), 2073-2085.
- Van Bel, F., y Groenendaal, F. (2008). Long-term pharmacologic neuroprotection after birth asphyxia: Where do we stand? *Neonatology*.
- Vanhala, A., Yamatodani, A., y Panula, P. (1994). Distribution of histamine-, 5-hydroxytryptamine-, and tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons and nerve fibers in developing rat brain. *Journal of Comparative Neurology*, 347(1), 101-114.
- Vargha-Khadem, F., Gadian, D. G., Watkins, K. E., Connelly, A., Van Paesschen, W., y Mishkin, M. (1997). Differential effects of early hippocampal pathology on episodic and semantic memory. *Science*, 277(5324), 376-380.
- Vorobjev, V. S., Sharonova, I. N., Walsh, I. B., y Haas, H. (1993). Histamine potentiates N-methyl-d-aspartate responses in acutely isolated hippocampal neurons. *Neuron*, 11(5), 837-844.
- Watanabe, T., Taguchi, Y., Shiosaka, S., Tanaka, J., Kubota, H., Terano, Y., Tohyama, M., y Wada, H. (1984). Distribution of the histaminergic neuron system in the central nervous system of rats; a fluorescent immunohistochemical analysis with histidine decarboxylase as a marker. *Brain Research*, 295(1), 13-25.
- Weitzdoerfer, R., Pollak, A., y Lubec, B. (2004). Perinatal asphyxia in the rat has lifelong effects on morphology, cognitive functions, and behavior. En *Seminars in Perinatology* (Vol. 28, pp. 249-256).

- Xu, L. S., Fan, Y. Y., He, P., Zhang, W. P., Hu, W. W., y Chen, Z. (2009). Ameliorative effects of histamine on spatial memory deficits induced by scopolamine infusion into bilateral dorsal or ventral hippocampus as evaluated by the radial arm maze task. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 36(8), 816-821.
- Yanai, K., y Tashiro, M. (2007). The physiological and pathophysiological roles of neuronal histamine: An insight from human positron emission tomography studies. *Pharmacology and Therapeutics*.
- Yau, S. Y., Li, A., y So, K. F. (2015). Involvement of Adult Hippocampal Neurogenesis in Learning and Forgetting. *Neural Plasticity*.
- Zhao, C. (2006). Distinct Morphological Stages of Dentate Granule Neuron Maturation in the Adult Mouse Hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 26(1), 3-11.