

ORIGINAL

Variaciones de las células de cuadrícula y de posicionamiento de la corteza entorrinal y del giro dentado de 6 humanos de 56 a 87 años



I. González-Marrero^a, J.A. Hernandez-Garcia^a, E. Gonzalez-Davila^b,
E.M. Carmona-Calero^{a,c}, J.M. Gonzalez-Toledo^a, L. Castañeyra-Ruiz^d,
L.G. Hernandez-Abad^{a,c} y A. Castañeyra-Perdomo^{a,c,*}

^a Unidad de Anatomía y Embriología Humana, Departamento de Ciencias Médicas Básicas, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de La Laguna, Tenerife, Islas Canaria, España

^b Departamento de Matemáticas, Estadística e Investigación Operativa, Universidad de La Laguna, Tenerife, Islas Canaria, España

^c Instituto de Investigación y Ciencias, Puerto del Rosario, Fuerteventura, Islas Canarias, España

^d Department of Neurological Surgery, Washington University School of Medicine and the St. Louis Children's Hospital, St. Louis, Missouri, Estados Unidos

Recibido el 25 de marzo de 2021; aceptado el 27 de abril de 2021

Accesible en línea el 14 de septiembre de 2021

PALABRAS CLAVE

Envejecimiento;
Giro dentado;
Corteza entorrinal;
Células de cuadrícula;
Células de posicionamiento

Resumen

Introducción: La relación entre la corteza entorrinal y el hipocampo ha sido estudiada por diferentes autores, que han destacado la importancia de las células de cuadrícula, las células de posicionamiento y la conexión trisináptica en los procesos que regulan: la persistencia de la memoria espacial, explícita y reciente, y su posible afección con el envejecimiento.

Objetivo: Observar si existen diferencias en el tamaño y número de células de cuadrícula contenidas en la lámina III de la corteza entorrinal y en la capa granular del giro dentado del hipocampo de pacientes mayores.

Métodos: Realizamos estudios posmortem del cerebro de 6 sujetos de edades comprendidas entre los 56 y 87 años. Los cortes de cerebros que contenían el giro dentado del hipocampo y la corteza entorrinal adyacente se tiñeron con el método de Klüver-Barrera, después se midió, mediante el programa Image J, el área neuronal individual, el área neuronal total, así como el número de neuronas, contenidas en cuadrículas rectangulares a nivel de la lámina III de la corteza entorrinal y la lámina II del giro dentado y se llevó a cabo un análisis estadístico.

Resultados: Se ha observado una reducción de la población celular de la capa piramidal externa de la corteza entorrinal, así como de las neuronas de la capa granular del giro dentado relacionada con el envejecimiento.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: acastane@ull.edu.es (A. Castañeyra-Perdomo).

KEYWORDS

Ageing;
Dentate gyrus;
Entorhinal cortex;
Grid cells;
Place cells

Conclusión: Nuestros resultados indican que el envejecimiento produce una disminución en el tamaño y la densidad neuronal en las células de cuadrícula de la corteza entorrinal y de posicionamiento del giro dentado.

© 2021 Sociedad Española de Neurología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Variations of the grid and place cells in the entorhinal cortex and dentate gyrus of 6 individuals aged 56 to 87 years

Abstract

Introduction: The relationship between the entorhinal cortex and the hippocampus has been studied by different authors, who have highlighted the importance of grid cells, place cells, and the trisynaptic circuit in the processes that they regulate: the persistence of spatial, explicit, and recent memory and their possible impairment with ageing.

Objective: We aimed to determine whether older age causes changes in the size and number of grid cells contained in layer III of the entorhinal cortex and in the granular layer of the dentate gyrus of the hippocampus.

Methods: We conducted post-mortem studies of the brains of 6 individuals aged 56–87 years. The brain sections containing the dentate gyrus and the adjacent entorhinal cortex were stained according to the Klüver-Barrera method, then the Image J software was used to measure the individual neuronal area, the total neuronal area, and the number of neurons contained in rectangular areas in layer III of the entorhinal cortex and layer II of the dentate gyrus. Statistical analysis was subsequently performed.

Results: We observed an age-related reduction in the cell population of the external pyramidal layer of the entorhinal cortex, and in the number of neurons in the granular layer of the dentate gyrus.

Conclusion: Our results indicate that ageing causes a decrease in the size and density of grid cells of the entorhinal cortex and place cells of the dentate gyrus.

© 2021 Sociedad Española de Neurología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introducción**Giro dentado**

El giro dentado (GD) constituye una región del hipocampo que se fusiona con la superficie enrollada del asta de Amón y abraza de esta manera las eferencias de las neuronas piramidales de esta. Medialmente se separa del giro parahipocampal por el surco del hipocampo y de la fimbria por el surco fimbriodentado (figs. 1–5)¹.

En el GD (figs. 1–5) se produce un fenómeno denominado potenciación a largo plazo, que consiste en el fortalecimiento de las conexiones sinápticas después de la estimulación repetida de forma duradera². También es uno de los lugares del sistema nervioso junto con el bulbo olfatorio donde se produce el fenómeno de la neurogénesis adulta. Algunos estudios plantean la hipótesis de que los nuevos recuerdos podrían utilizar preferentemente células dentadas recién formadas, lo que proporciona un mecanismo potencial para distinguir múltiples demandas de eventos similares o múltiples llegadas a la misma ubicación³. El GD está formado por 3 capas: polimórfica, granular y molecular; y participa en el circuito trisináptico⁴. Recibe aferencias

desde la corteza entorrinal (CE) por la vía perforante (procedente principalmente de la lámina III) pues no recibe aferencias de otras estructuras corticales^{5,6}. Las eferencias del GD constan de los axones de las células granulares denominados fibras musgosas que conectan con las neuronas piramidales de CA3 en el hipocampo y posteriormente desde CA3 se conectan con CA1 por las colaterales de Shaffer^{7,8}.

Por otro lado, en el GD, que es una de las regiones encefálicas donde, como hemos referido anteriormente, hay neurogénesis adulta, se ha descrito que los glucocorticoides y la acción del sistema nervioso simpático (situación de estrés) inhiben este proceso de neurogénesis⁹. Igualmente hay evidencias que indican que la práctica de ejercicio aeróbico aumenta dicha neurogénesis¹⁰. Además, el GD está implicado en la memoria espacial ya que si se destruían un 90% de las neuronas granulares del GD de ratas estas mostraban una gran dificultad para manejar en un entorno por el que ya habían pasado¹¹. Estas neuronas granulares se corresponderían con las células de posicionamiento, que son cruciales para discriminar conductualmente memorias espaciales similares, prediciendo que las células de posicionamiento (CP) del GD cambian y reasignan su ajuste espacial relativo para la discriminación de memoria¹².

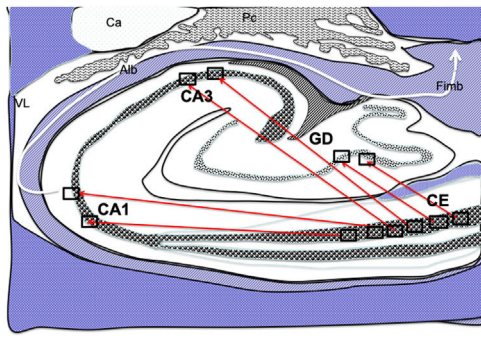


Figura 1 Dibujo esquemático de un corte transversal del hipocampo a nivel del cuerno temporal del ventrículo lateral derecho, donde la flechas señalarían las conexiones directas (flechas rojas de línea continua) desde las células de cuadrícula de la corteza entorrinal a las células de posicionamiento del GD, CA1 y CA3 y después hacia el albeus y fimbria (flecha blanca) ^{26–30}.

Alb: albeus; Ca: cola del caudado; CA1, CA3: zonas del asta de Amón del hipocampo; CE: corteza entorrinal; Fimb: fimbria; GD: giro dentado del hipocampo; Pc: plexos coroideos; VL: ventrículo lateral. Recuadros de GD, CA3 y CA1 posible localización de las células de posicionamiento; recuadros de CE posible localización de las células de cuadrícula.

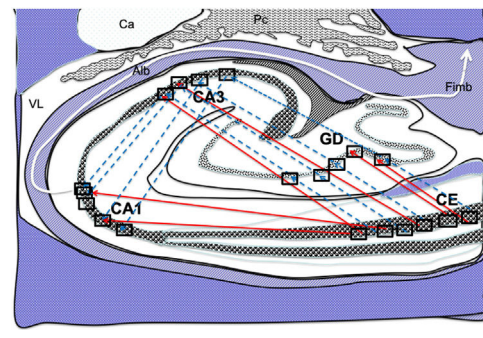


Figura 3 Dibujo esquemático de un corte transversal del hipocampo a nivel del cuerno temporal del ventrículo lateral derecho, donde la flechas señalarían ambas conexiones, directas (flechas rojas de línea continua) e indirectas (flechas azules de línea discontinua) desde las células de cuadrícula de la corteza entorrinal a las células de posicionamiento del GD, CA1 y CA3 ^{26–34}.

Alb: albeus; Ca: cola del caudado; CA1, CA3: zonas del asta de Amón del hipocampo; CE: corteza entorrinal; Fimb: fimbria; GD: giro dentado del hipocampo; Pc: plexos coroideos; VL: ventrículo lateral. Recuadros de GD, CA3 y CA1 posible localización de las células de posicionamiento; recuadros de CE posible localización de las células de cuadrícula.

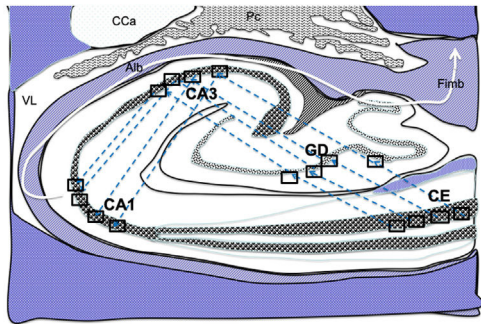


Figura 2 Dibujo esquemático de un corte transversal del hipocampo a nivel del cuerno temporal del ventrículo lateral derecho, donde la flechas señalarían las conexiones indirectas (flechas azules, de línea discontinua) desde las células de cuadrícula de la corteza entorrinal a las células de posicionamiento del hipocampo, de tal manera que en primer lugar estas conexiones van desde la CE al GD, después del GD a CA1, seguido de CA1 a CA3 y por último hacia el albeus y fimbria (flecha blanca) ^{31–34}.

Alb: albeus; Ca: cola del caudado; CA1, CA3: zonas del asta de Amón del hipocampo; CE: corteza entorrinal; Fimb: fimbria; GD: giro dentado del hipocampo; Pc: plexos coroideos; VL: ventrículo lateral. Recuadros de GD, CA3 y CA1 posible localización de las células de posicionamiento; recuadros de CE posible localización de las células de cuadrícula.

Corteza entorrinal

La CE (figs. 1-5) es un área localizada en la parte medial del lóbulo temporal situada entre el subículo y la corteza perirrinal^{13,14} y constituye la principal fuente de aferencias y eferencias del hipocampo^{2,13,14}. La CE cobra una gran importancia para los procesos de memoria reciente y

percepción temporal donde desempeñan un papel significativo las conexiones desde su lámina piramidal externa (lámina III), ya que son los lugares de las eferencias principales de la vía perforante, al GD. La CE a su vez recibe eferencias de la corteza prefrontal, perirrinal y parahipocampal¹⁵. Las capas profundas, principalmente la capa v, reciben una de las 3 eferencias principales del hipocampo y, a su vez, las conexiones recíprocas de otras áreas corticales que se proyectan a la CE superficial. Las neuronas en la CE lateral exhiben poca selectividad espacial¹⁶. Las neuronas de la CE medial presentan diversos «campos de lugar» adoptando un patrón rectangular o hexagonal denominándose células en cuadrícula^{17–19}.

Se piensa que en el hipocampo se inician procesos mnemónicos de todo el sistema a través de la reactivación de los rastros de memoria espacial y episódica adquiridos previamente, que pueden reclutar a la CE como una primera etapa de la redistribución de la memoria a otras áreas del encéfalo. La reactivación del hipocampo se produce durante la oleada de ondas agudas, en las que se dispara la red que sincroniza y codifica secuencias de los lugares²⁰. Se ha estudiado la coordinación de esta sincronización y codificación registrando la actividad de ensamblaje simultáneamente en la región CA1 del hipocampo y las capas superficiales de la CE medial. Así, se ha descrito que los ensamblajes de células entorrinales pueden reproducir trayectorias independientemente en el hipocampo, donde se observan oleadas de las ondas agudas con picos de la actividad de las células de cuadrícula espaciotemporalmente aleatorias y diversas²¹. Esto indica que el hipocampo no es el único iniciador de la reactivación de rastreo de memoria espacial y episódica^{20–23}.

Durante la vida diaria, se depende de los recuerdos de las experiencias pasadas para planificar el comportamiento futuro. Estos recuerdos están representados por la actividad de grupos neuronales específicos o «engramas»^{24,25}.

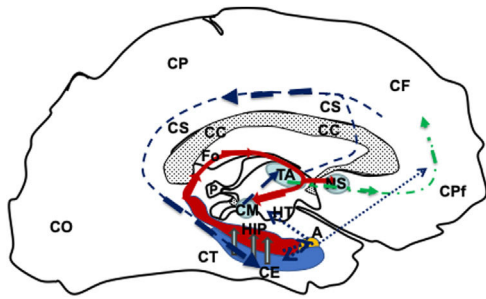


Figura 4 Dibujo esquemático de una visión medio sagital del telencéfalo izquierdo donde se representa el circuito de Papez; modificado de Kahle y Frostcher¹.

El circuito se iniciaría en la CE (azul), seguiría (flechas huecas grises) hacia el HIP (rojo) por el fornix (línea roja continua), llegaría al CM (azul) que conectarán con el TA (azul), mediante el haz mamilotálamico (línea azul oscura discontinua), desde el TA conectaría con las cortezas CPf y CCi para llegar a la corteza entorrinal nuevamente y cerrar el circuito (línea azul oscura discontinua). Además, el fornix (Fo) conectaría con en fornix contralateral a través de la comisura del fornix (CFo) y con los núcleos septales (N y homolaterales y contralaterales por la CBa y corteza prefrontal (línea verde discontinua de puntos y rayas). Por último el hipocampo y corteza entorrinal también conecta con el complejo amigdalino y este a su vez con el hipotálamo y la corteza prefrontal (línea azul de puntos).

A: complejo amigdalino; CBa:comisura blanca anterior; CC:cuerpo calloso; CCi:corteza cingular; CE:corteza entorrinal; CF:corteza frontal; CFo:comisura del fórnix; CM:cuerpo mamilario; CO:corteza occipital; CP:corteza parietal; CPf:corteza prefrontal; CT:corteza temporal; Fo:fórnix; HIP:hipocampo; HT:hipotálamo; NS:núcleos séptales; P:glándula pineal; TA:tálamo.

Los engramas neuronales se ensamblan durante el aprendizaje mediante modificación sináptica, y la reactivación del engrama representa la experiencia memorizada²⁴. Los engramas de recuerdos conscientes se almacenan inicialmente en el hipocampo durante varios días y luego se transfieren a las áreas corticales²⁵. En el GD del hipocampo, las células granulares agrupadas en células de posicionamiento¹² transforman entradas ricas desde las células de cuadrícula de la CE en una salida escasa, que se envía a la red celular piramidal formada por las células de posicionamiento altamente interconectada en el área del hipocampo CA3. Así se indica que los grupos sinápticos a lo largo del circuito trisináptico del hipocampo se reasignan constantemente para apoyar la formación de representaciones dinámicas en las áreas a lo largo del hipocampo en base a un código estable proporcionado por el GD²⁶.

Teniendo en cuenta: -que la CE es donde se localizan las células de cuadrícula que envían conexiones a los grupos neuronales de posicionamiento del GD (figs. 1-3), -que estas conexiones emiten pulsos de electricidad en un patrón regular para mapear el movimiento de un animal, - que es el inicio de la conexión trisináptica crucial en el circuito Papez (fig. 4)¹ y que forman parte de los elementos funcionales de la memoria espacial y la memoria reciente, el propósito del presente trabajo es observar y describir en 6 cerebros humanos de 56 a 87 años, las variaciones de las

neuronas contenidas áreas rectangulares de la lámina III de la CE (donde podrían estar las células de cuadrícula y la lámina II del GD donde estarían las células de posicionamiento).

El tamaño de estas áreas rectangulares o cuadrangulares, donde se encontrarían las células de cuadrícula de la CE, que incluso a veces se estiran o comprimen y posicionamiento del GD, ha sido muy discutido por diversos autores²⁷⁻²⁹; en vista de los resultados de estos autores y de que no hay un tamaño claro y definido, decidimos hacer las medidas en áreas rectangulares de $200 \times 250 \mu^2$.

Material y métodos

Las muestras fueron obtenidas de cerebros de cadáveres adultos (tabla 1) de 3 hombres de 56, 59 y 66 años y 3 mujeres de 62, 73 y 87 años de edad, procedentes de donaciones para la docencia y la investigación de la Unidad Departamental de Anatomía y Embriología Humana de la Universidad de La Laguna. Siguiéndose el protocolo del Departamento, a las 24 h del fallecimiento los cadáveres fueron perfundidos con formaldehído al 5%. Inmediatamente se extrajeron los encéfalos mediante la eliminación de la bóveda craneal y se diseccionaron 6 lóbulos temporales mediales que contenían la CE y el hipocampo. Cada pieza fue dividida a lo largo del eje anteroposterior en secciones coronales a través de la cabeza y el cuerpo del hipocampo y la CE subyacente. El comité ético de la Universidad de La Laguna aprobó y supervisó el estudio.

Las piezas extraídas fueron posfijadas en formol 5%, deshidratadas e incluidas en parafina. Las piezas fueron cortadas en secciones seriadas de 10 micras de espesor, recogiendo los cortes en 4 series alternas A, B, C y D. Se analizaron 2 series de muestras que fueron teñidas con Klüver-Barrera³⁰, método que combina 2 colorantes: violeta de cresilo (básico) y luxol fast blue (con afinidad por los lípidos de la vaina de mielina), donde se tiñe la mielina de azul y los núcleos y la sustancia de Nissl de violeta. La adquisición de las imágenes se realizó con un fotomicroscopio Leica DM 1000. Todas las imágenes fueron trasladadas en Adobe Photoshop. Asimismo, se utilizó el programa Image J (Java) para el análisis (recuento de células, el cálculo del perímetro, área neuronal individual y área neuronal total que ocupan en cada cuadrícula) de las neuronas contenidas en 7 cuadrículas, con un tamaño de $200 \times 250 \mu\text{m}$, de varias secciones rostro caudales de cada espécimen, a nivel de la lámina III de la CE y la lámina granular del GD.

Análisis estadístico

La información es resumida con medias (desviación estándar) para las variables distribuidas normalmente y con mediana (intervalo del rango intercuartílico) para las que no lo cumplen. Las comparaciones entre CE y GD fueron realizadas con el test de la U de Mann-Whitney. Para estudiar la evolución del recuento de células en función de la zona (CE o GD), sexo y edad (< 65 o ≥ 65 años) se aplicó un modelo lineal generalizado con distribución de Poisson y enlace logarítmico, mientras para el área individual y el área total neuronal se utilizó un modelo lineal general. Para

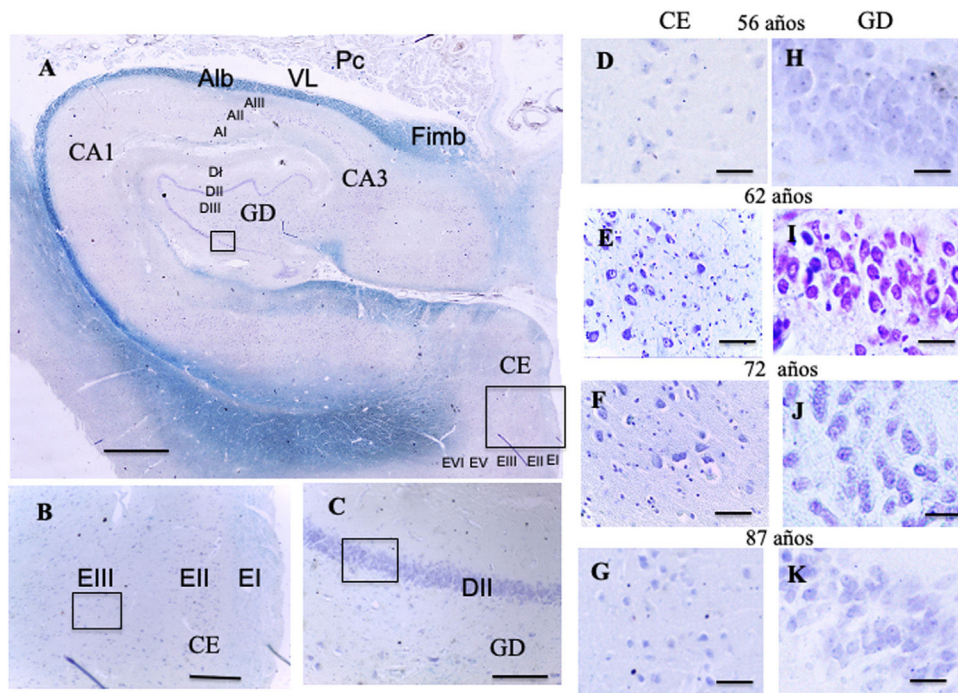


Figura 5 A: Fotografía de una visión panorámica de un corte transversal de hipocampo (giro dentado y asta de Amón) y corteza entorrinal. Barra 1000 μ m. B: Detalle del recuadro de CE en la fotografía A, barra 250 μ m, donde el pequeño recuadro se correspondería con la células se cuadrícula de la lámina III. C: Detalle del recuadro del GD en la fotografía A, barra 250 μ m, donde el pequeño recuadro se correspondería con la células de posicionamiento de la lámina II.

D, E, F, G: Microfotografías de la lámina III de la CE con la posible localización de las células de cuadrícula; H, I, J, K: Microfotografías de la lámina II del GD con la posible localización de las células de posicionamiento, barra 50 μ m.

D y H: 56 años; E e I: 62 años; F y J: 72 años; G y K: 87 años.

AI: lámina I molecular del asta de Amón; AII: lámina II piramidal del asta de Amón; AIII: lámina III polimorfa del asta de Amón; Alb: albeus; CA1, CA3: zonas del asta de Amón del hipocampo; CE: corteza entorrinal; DI: lámina I molecular del giro dentado; DII: lámina II granular del giro dentado; DIII: lámina III polimorfa del giro dentado; EI: lámina I molecular de la CE; EII: lámina II de células estrelladas de la CE; EIII: lámina III piramidal externa de la CE; EV: Lámina V piramidal interna de la CE; EVI: lámina VI lámina polimorfa de la CE; Fimb: fimbria; GD: giro dentado del hipocampo, Pc: plexos coroides; VL: ventrículo lateral. Recuadros de GD posible localización de las células de posicionamiento; recuadros de CE posible localización de las células de cuadrícula.

Tabla 1 Distribución de los casos (pacientes) por edad, sexo, enfermedad de base, causa del fallecimiento, tratamiento y posible afección cerebral

Edad (años)	Sexo	Enfermedad base	Causa fallecimiento	Tratamiento	Afección cerebral
56	Hombre	Cáncer pulmón	Insuficiencia respiratoria	Quimioterapia	No
59	Hombre	Cáncer de colon	Obstrucción intestinal	Quimioterapia	No
62	Mujer	EPOC	Insuficiencia respiratoria	Corticoides Broncodilatores	No
66	Hombre	Cáncer bronc epide sinc bilat	Insuficiencia respiratoria	Cirugía Radioterapia	No
73	Mujer	Leiomiomasarcoma	P. cardiorrespiratoria	Cirugía Radioterapia	No
87	Mujer	Neumonía derecha	Septicemia	Antibióticos	No

Tabla 2 Estadística descriptiva (mediana e intervalo intercuartílico)

		Corteza entorrinal	Giro dentado	Valor de p
Recuento de células		16 (14,2-18,7)	32,5 (23,5-41,5)	< 0,001
Área neuronal	Individual	1.295,9 (1090,6-1804,7)	1.959,8 (1.668,9-2.631,0)	< 0,001
	Total	22.389 (16.844-31.276)	62.472 (38.026-104.335)	< 0,001

Tabla 3 Modelo loglineal para el recuento de células

Parámetros	Coefficientes	Error estándar	Estadístico de Wald	Valor de p
<i>Sexo = Mujer</i>	−0,105	0,069	2,274	0,132
<i>Zona = Giro dentado</i>	0,861	0,071	145,29	< 0,001
<i>Edad = ≥ 65</i>	0,025	0,105	0,057	0,811
<i>Interacciones</i>				
(Sexo = Mujer)*(Edad = ≥ 65)	−0,336	0,106	10,021	0,002
(Zona = Giro dentado)*(Edad = ≥ 65)	−0,358	0,106	10,618	0,001
<i>Intersección</i>	2,899	0,066	1905,02	< 0,001

ambos modelos se incorporó, cuando fueron significativas, las interacciones entre los diferentes factores considerados.

Resultados

Cualitativos

Giro dentado (figs. 5 A, C)

En el grupo de edades de 56 a 62 años se observa en la capa granular una gran densidad de neuronas granulares con núcleos ocupando gran parte del citoplasma y en los que se aprecia un nucléolo central o periférico con escasas variaciones entre las edades de este grupo (figs. 5 H, I).

En el segundo grupo de edades desde 66 a 87, en la lámina II hay una gran densidad de neuronas granulares en las que se observan núcleos grandes que ocupan gran parte del citoplasma con nucléolos que se localizan en disposición central y otros periféricamente. Se aprecian pequeñas diferencias cualitativas con el grupo anterior que se acentúan más en la última edad estudiada (mujer de 87 años), en la capa granular donde cualitativamente parece observarse una menor densidad de neuronas granulares, su núcleo sigue abarcando gran parte del citoplasma y sus nucléolos centrales en disposición preferentemente central (figs. 5 J, K).

Corteza entorrinal (figs. 5 A, B)

En el primer grupo, de 56 años a 62 años, se observa una capa piramidal externa (Capa 3) en la que se localizan neuronas piramidales de tamaño mediano y grande agrupadas donde destacan un núcleo prominente ocupando casi la totalidad del citoplasma con una cromatina dispersa y un único nucléolo en posición central. Entre ellas se disponen en menor densidad neuronas pequeñas. Cualitativamente no se parecían diferencias al comparar las edades de este grupo (figs. 5, D, E).

En el siguiente grupo de edades, de 66 a 87 años, a los 66 años de forma parecida al grupo de edades anteriores, la capa piramidal externa muestra una densidad relativamente baja de neuronas piramidales de tamaño medio con núcleos

claros que ocupan gran parte del citoplasma. En las siguientes edades hay más variaciones cualitativas que en las edades anteriores, de tal manera que en el caso de la mujer de 73 años la capa piramidal externa tiene una población de células piramidales menos numerosa que se acentúa a los 87 años, donde no se consigue delimitar bien el núcleo, que a veces se dispone central y en otras ocasiones periféricamente (figs. 5 F, G).

Resultados cuantitativos

La muestra está constituida por 3 hombres y 3 mujeres, con una edad media de 67,5 años (11,36) con 3 individuos superando los 65 años (tabla 1). La tabla 2 muestra la estadística descriptiva de los valores de recuento de células, área individual y área total neuronal en las 2 regiones estudiadas. Para todas ellas los valores en GD fueron superiores a CE de forma significativa ($p < 0,001$).

Para el recuento de células (tabla 3), la diferencia entre el GD y CE se ve reducida en el caso de las personas de más de 65 años ($p = 0,001$), observándose además una caída en ambas zonas en el caso de mujeres mayores de 65 años ($p = 0,002$) (fig. 6 a).

El área neuronal individual (tabla 4) tanto en el GD como el CE mantuvo la misma estructura en función del sexo y grupo de edad, con valores superiores en GD ($p = 0,002$) e inferiores en mujeres ($p = 0,045$) y en personas mayores de 65 años ($p < 0,001$) (fig. 6b).

Los resultados del estudio sobre el área total neuronal se muestran en la tabla 5, donde se observa la combinación de los resultados comentados en el caso del recuento de células y área neuronal individual. Los valores son superiores en GD frente a CE ($p < 0,001$), inferiores en mujeres frente hombres ($p = 0,034$) y produciéndose una reducción en la diferencia entre GD y CE cuando estamos con personas mayores de 65 años ($p = 0,020$) (fig. 6c).

Indudablemente estos resultados deben ser tomados con cautela, debido al número de muestras y los rangos de edades en los que se ha realizado el estudio.

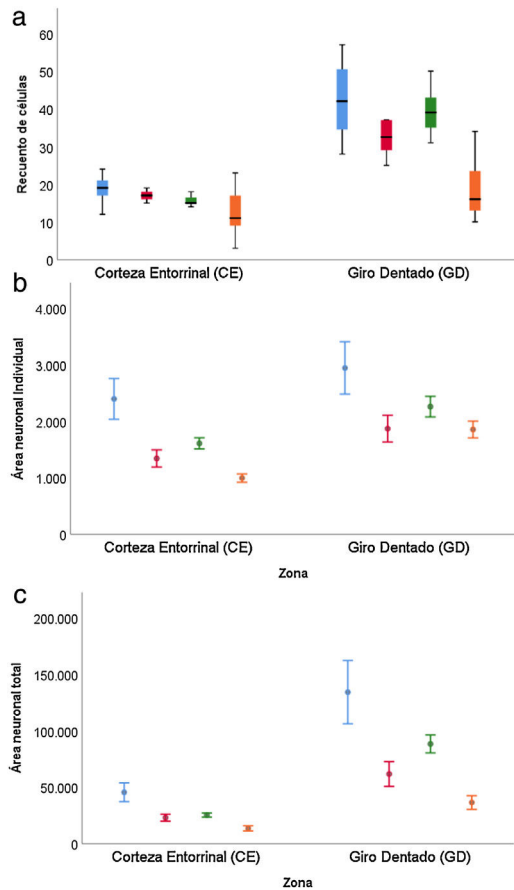


Figura 6 Distribución del recuento de células (a), área individual (b) y área total neuronal (c), en función de la zona, sexo y edad (las barras representan el error estándar).

Discusión

Hoy en día, las consecuencias para la salud pública de las enfermedades que afectan la memoria y la navegación espacial son altas y crecen a medida que la población envejece, lo que lleva a centrarse en seguir explorando estas regiones

del encéfalo³¹, como son la CE, el hipocampo y sus células de cuadrícula y posicionamiento.

Las células de cuadrícula, localizadas en la lámina III (lámina piramidal externa) de la CE^{27,32} es el lugar de origen de las aferencias a las células de posicionamiento situadas en el GD y asta de Amón del hipocampo. Sin embargo, las localizaciones y conexiones de estas células son discutidas por los autores. Así, por un lado, a las células de posicionamiento se las localiza en las capa granular de GD y en las capas de células piramidales de CA3, CA2 y CA1 que es donde llegan las conexiones directas desde las células de cuadrículas de CE (fig. 1)^{26,27,32,33}. Pero, por otro lado, esto contradeciría otros hallazgos^{34–37} que defienden las conexiones indirectas como son la vía perforante, conexión trisináptica y el circuito de Papez donde las conexiones irían: desde la CE al GD, del GD hacia CA3 y desde CA3 por las colaterales Shaffer a CA1 (fig. 2)^{31–34}. Las conexiones indirectas parecen ser lo más aceptado, y se podría decir que ambos grupos de autores tendrían razón, pero siendo más abundantes las conexiones indirectas que las conexiones directas (fig. 3). De cualquier manera, los cambios que tienen lugar en el GD y CA3 con la edad pueden explicar el aumento de las alteraciones que se producen con el envejecimiento, que también contribuyen a la disminución de la función cognitiva. En cambio, aún no se sabe si este aumento de la susceptibilidad a alteraciones como convulsiones o deterioro cognitivo es causa o efecto de estos cambios en dichas estructuras relacionados con la edad³⁸. De tal manera que en un estudio realizado con técnicas de imagen mediante resonancia magnética se observó que la atrofia se produce en mayor medida en CA1 y GD durante el envejecimiento^{38–42}.

Estos resultados descritos anteriormente^{38–42} concuerdan parcialmente con los resultados en el presente trabajo donde hemos observado una disminución significativa del número y tamaño neural de las neuronas granulares del GD. También, mediante resonancia magnética de difusión⁴², se ha descrito una atrofia lineal en CA2, CA3 y GD proporcionalmente a la edad. Pero, otro estudio⁴³ explica que esta disminución tenía lugar en el subículo y no en GD ni CA1.

Lo que está claro es que la mayoría de los autores han observado^{38,43,44} la asociación entre la edad avanzada y la disminución del tamaño o afectación de CA3 y GD. Por lo

Tabla 4 Modelo lineal general para el área neuronal individual

Parámetros	Coefficientes	Error estándar	Intervalo de confianza al 95%	Valor de p
Sexo = Mujer	−453,4	221,7	(−896,7; −10,2)	0,045
Zona = Giro Dentado	680,4	211,3	(258,0; 1102,8)	0,002
Edad = ≥ 65	−775,5	220,7	(−1216,6; −334,3)	0,001
Intersección	2214,3	205,3	(1804,0; 2624,6)	< 0,001

Tabla 5 Modelo lineal general para el área neuronal total

Parámetros	Coefficientes	Error estándar	Intervalo de confianza al 95%	Valor de p
Sexo = Mujer	−25098,9	11.555,6	(−48205,7; −1992,2)	0,034
Zona = Giro dentado	80.303,1	15.565,9	(491.772; 111429,1)	< 0,001
Edad = ≥ 65	−13890,7	15.973,6	(−45.832,0; 18050,5)	0,388
(Zona = Giro dentado) * (Edad = ≥ 65)	−52464,1	21.920,8	(−96.297,4; −8630,8)	0,020
Intersección	47.491,5	12.205,1	(23.085,9; 71897,1)	< 0,001

tanto, los cambios vistos pueden contribuir a los déficits mnemónicos observados con la edad al debilitar el procesamiento de información novedosa y reciente, y al fortalecer el procesamiento de la información previamente almacenada.

Como podemos comprobar, nuestros resultados en el GD podrían confirmar los hallazgos descritos por varios autores en las diferentes partes del hipocampo, por lo tanto, parece claro que el envejecimiento afecta el GD y el hipocampo en general produciendo una disminución de la superficie que ocupan las células de posicionamiento en las zonas estudiadas.

En la enfermedad de Alzheimer, que es un trastorno neurodegenerativo progresivo y afecta al 60-80% de todos los casos de demencia en la población anciana en todo el mundo, donde perderse es uno de los primeros síntomas cognitivos que surgen en los pacientes con dicha enfermedad. Se ha visto que el inicio temprano del deterioro amnésico ocurre primero en la CE y luego se extiende al hipocampo, lo que hace que la localización de las conexiones entorrinal-hipocampal, o sea desde las células de cuadrícula a las células de posicionamiento, sea la región más vulnerable ya que se ha descrito una clara pérdida neuronal tanto de las células de cuadrícula como de posicionamiento en modelos roedores de la enfermedad de Alzheimer⁴⁵. Por otro lado, en décadas recientes se ha podido demostrar que la neurogénesis posnatal^{46,47} es un proceso que dura hasta la edad adulta que persiste en la vejez, en el anciano e incluso en pacientes con la enfermedad de Alzheimer⁴⁸. Asimismo, se ha visto que el ejercicio físico voluntario aumentaba la neurogénesis en el GD en ratas adultas^{10,49}. También y muy importante, se ha demostrado que dichas neuronas neoformadas migran a los lugares dañados, que son los nichos origen de vías nerviosas, cobrando gran importancia en procesos de aprendizaje y memoria⁵⁰. En base tanto a nuestro resultado como a los del resto de los autores anteriormente citados, e independientemente del grado de neurogénesis que haya habido en nuestros casos, se podría decir que en edades avanzadas hay cuantitativamente una pérdida neuronal.

El lugar de localización de las células del hipocampo son un sistema modelo de cómo el cerebro construye representaciones cognitivas y de cómo estas representaciones apoyan el comportamiento complejo, el aprendizaje y la memoria^{16,49,50}. En este sentido se ha visto en ratas que varias de estas unidades individuales de localización, las neuronas del hipocampo, estarían relacionadas principalmente con células de cuadrícula de la CE medial^{16,51}. También, mediante resultados de experimentos en plataformas robóticas se ha propuesto un modelo entorrinal-hipocampal que puede construir mapas cognitivos con éxito; igualmente se han desarrollado más cognitivos inspirados en experimentos neurobiológicos^{49,50}. Además, se ha descrito que estas células de cuadrícula de poblaciones de neuronas de la CE lateral representan el tiempo inherentemente a través de la codificación de la experiencia. Esta representación del tiempo episódico se puede integrar con las entradas espaciales de la CE medial en el hipocampo, lo que permite al hipocampo almacenar una representación unificada de qué, dónde y cuándo¹⁵.

Actualmente se está discutiendo, con más frecuencia, sobre el efecto del envejecimiento en la CE ya que

hasta hace poco tiempo los estudios del envejecimiento se centraban más en el GD y las distintas regiones del asta de Amón. En nuestro trabajo tratamos de describir los efectos del envejecimiento no solo en el GD, sino que hemos querido hacer énfasis en la CE (lámina III) que es origen de las eferencias la vía trisináptica y/o circuito de Papez. Así, se ha descrito⁴⁴ una disminución, con la edad, de las conexiones entre la CE y el GD como consecuencia de la pérdida de la densidad de las espinas dendríticas en las neuronas granulares del GD (lugar de las aferencias de la vía perforante); y en otro estudio en humanos, mediante resonancia magnética, se ha descrito que el espesor de la CE varía a lo largo de la vida; va a ir aumentando hasta que alcanza su pico máximo aproximadamente a los 44 años para luego disminuir con el envejecimiento⁵².

Los resultados de estos trabajos sobre la disminución de las conexiones y la reducción del espesor de la CE estarían apoyados por los resultados de nuestro trabajo, que muestran la gran sensibilidad de las neuronas de la CE al envejecimiento, donde describimos alteraciones cualitativas que se ponen de manifiesto claramente a los 87 años de edad, y también alteraciones cuantitativas donde vemos una disminución del número de neuronas en las cuadrículas estudiadas, en las que hipertrofia neuronal compensatoria no consigue evitar la pérdida de densidad neuronal de las cuadrículas.

Conclusiones

Se podría concluir que, en nuestros casos, se producen alteraciones cualitativas y cuantitativas tanto en la CE como en el GD que alcanzan su máxima expresión a la mayor edad estudiada, 87 años. Estas alteraciones se producen en las áreas rectangulares estudiadas descritas, que se podrían corresponder con las células de cuadrícula de la CE y las células de posicionamiento del GD. En general, podemos decir que los resultados obtenidos en nuestro limitado material concuerdan bastante con lo descrito en la bibliografía sobre los efectos negativos del envejecimiento sobre la CE y el GD.

Financiación

Este trabajo ha sido subvencionado por la Fundación Canaria Instituto de Investigación y Ciencias (INIPRO), proyecto: N.º 03/14

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

Bibliografía

1. Kahle W, Frostche M. Atlas de anatomía con correlación clínica. Sistema nervioso y órganos de los sentidos. 9.ª ed Madrid: Editorial medica panamericana; 2008.

2. Kandel ER, Schwartz J, Jessell T, Siegelbaum S, Hudspeth AJ. *Principios de la ciencia neural*. 5.^a ed Chicago: McGraw Hill Professional; 2013.
3. Nakashiba T, Cushman JD, Pelkey KA, Renaudineau S, Buhl DL, McHugh TJ, et al. Young dentate granule cells mediate pattern separation, whereas old granule cells facilitate pattern completion. *Cell*. 2012;149:188–201.
4. Treves A, Tashiro A, Witter MP, Moser EI. What is the mammalian dentate gyrus good for? 2008;154:1155–72.
5. Blumenfeld H. *Neuroanatomy through clinical cases*. 2nd ed. Sunderland, Mass: Sinauer Associates; 2010.
6. Nolte J. *The human brain: An introduction to its functional neuroanatomy*. 8th Edition Philadelphia: Elsevier; 2020.
7. Arrigoni E, Greene RW. Schaffer collateral and perforant path inputs activate different subtypes of NMDA receptors on the same CA1 pyramidal cell. *Br J Pharmacol*. 2004;142:317–22.
8. Scharfman HE. The enigmatic mossy cell of the dentate gyrus. *Nat Rev Neurosci*. 2016;17:562–75.
9. Gould E, Tanapat P, McEwen BS, Flügge G, Fuchs E. Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:3168–71.
10. Praag H, van Kempermann G, Gage FH. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci*. 1999;2:266–70.
11. Xavier GF, Infantozzi Costa VC. Dentate gyrus and spatial behaviour. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2009;33:762–73.
12. Van Dijk MT, Fenton AA. On how the dentate gyrus contributes to memory discrimination. *Neuron*. 2018;98:832–45.
13. Insausti R, Tuñón T, Sobreviela T, Insausti AM, Gonzalo LM. The human entorhinal cortex: A cytoarchitectonic analysis. *J Comp Neurol*. 1995;355:171–98.
14. Sobreviela T, Insausti A, Salinas A, Gonzalo LM, Insausti R. La corteza entorrinal (formación del hipocampo) en el envejecimiento y en la enfermedad de Alzheimer. Interpretación neuroanatómica. *Rev Med Univ Navarra*. 1997;41:19–27.
15. Tsao A, Sugar J, Lu L, Wang C, Knierim JJ, Moser MB, et al. Integrating time from experience in the lateral entorhinal cortex. *Nature*. 2018;561:57–62.
16. Hargreaves E, Rao G, Lee I, Knierim J. Major dissociation between medial and lateral entorhinal input to dorsal hippocampus. *Science*. 2005;308:1792–4.
17. Fyhn M, Molden S, Witter M, Moser E, Moser M. Spatial representation in the entorhinal cortex. *Science*. 2004;305:1258–64.
18. Hafting T, Fyhn M, Molden S, Moser M, Moser E. Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. *Nature*. 2005;436:801–6.
19. Miao C, Cao Q, Moser MB, Moser EI. Parvalbumin and somatostatin interneurons control different space-coding networks in the medial entorhinal cortex. *Cell*. 2017;171:507–21.
20. O'Neill J, Boccara CN, Stella F, Schoenenberger P, Csicsvari J. Superficial layers of the medial entorhinal cortex replay independently of the hippocampus. *Science*. 2017;355:184–8.
21. Park SW, Jang HJ, Kim M, Kwag J. Spatiotemporally random and diverse grid cell spike patterns contribute to the transformation of grid cell to place cell in a neural network model. *PLoS One*. 2019;14:e0225100.
22. Yamamoto J, Tonegawa S. Direct medial entorhinal cortex input to hippocampal ca1 is crucial for extended quiet awake. *Neuron*. 2017;96:217–27.
23. Grieves RM, Duvelle É, Wood ER, Dudchenko PA. Field repetition and local mapping in the hippocampus and the medial entorhinal cortex. *J Neurophysiol*. 2017;118:2378–88.
24. Ramirez S, Liu X, Lin PA, Suh J, Pignatelli M, Redondo RL, et al. Creating a false memory in the hippocampus. *Science*. 2013;341:387–91.
25. Kitamura T, Ogawa SK, Roy DS, Okuyama T, Morrissey MD, Smith LM, et al. Engrams and circuits crucial for systems consolidation of a memory. *Science*. 2017;356:73–8.
26. Hainmueller T, Bartos M. Parallel emergence of stable and dynamic memory engrams in the hippocampus. *Nature*. 2018;558:292–6.
27. Neher T, Azizi AH, Cheng S. From grid cells to place cells with realistic field sizes. *PLoS One*. 2017;12:e0181618.
28. Santos-Pata D, Zucca R, Low SC, Verschure PFMJ. Size matters: How scaling affects the interaction between grid and border cells. *Front Comput Neurosci*. 2017;11:65.
29. Keinath AT, Rechnitz O, Balasubramanian V, Epstein RA. Environmental deformations dynamically shift human spatial memory. *Hippocampus*. 2021;31:89–101.
30. Klüver H, Barrera E. A method for the combined staining of cells and fibers in the nervous system. *J Neuroph Exp Neurol*. 1953;12:400–3.
31. Kraboth Z, Kálmán B. Neuroscience highlights: Main cell types underlying memory and spatial navigation. *Ideggyogy Sz*. 2020;73:295–301.
32. Moser MB, Rowland DC, Moser EI. Place cells, grid cells, and memory. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015;7:a021808.
33. Hainmueller T, Bartos M. Dentate gyrus circuits for encoding, retrieval and discrimination of episodic memories. *Nat Rev Neurosci*. 2020;21:153–68.
34. Ramón y Cajal S. Vías eferentes y ganglios subordinados al asta de Amón. En: *Textura del sistemas nervioso del hombre y de los vertebrados Tomo II segunda parte*. Madrid: Imprenta y Librería de Nicolás Moya; 1904. p. 999–1042.
35. Lorente de Nó R. Transmission of impulses through cranial motor nuclei. *J Neurophysiol*. 1939;2:402–64.
36. Shah A, Singh S, Jhavar, Goel A. Analysis of the anatomy of the Papez circuit and adjoining limbic system by fiber dissection techniques. *J Clin Neurosci*. 2012;19:289–98.
37. Carasatorre M, Ramírez-Amaya V, Díaz Cintra S. Plasticidad sináptica estructural en el hipocampo inducida por la experiencia espacial y sus implicaciones en el procesamiento de información. *Neurología*. 2016;31:543–9.
38. Richard G, Kolskär K, Sanders AM, Kaufmann T, Petersen A, Doan NT, et al. Assessing distinct patterns of cognitive aging using tissue-specific brain age prediction based on diffusion tensor imaging and brain morphometry. *Peer J*. 2018;6:5908e.
39. Wisse LE, Biessels GJ, Heringa SM, Kuijff HJ, Koek DH, Luijten PR, et al., Utrecht Vascular Cognitive Impairment (VCI) Study Group. Hippocampal subfield volumes at 7T in early Alzheimer's disease and normal aging. *Neurobiol Aging*. 2014;35:2039–45.
40. Wisse LEM, Chételat G, Daugherty AM, de Flores R, la Joie R, Mueller SG, et al. Hippocampal subfield volumetry from structural isotropic 1mm³ MRI scans: A note of caution. *Hum Brain Mapp*. 2021;42:539–60.
41. Wisse LE, Biessels GJ, Geerlings MI. A critical appraisal of the hippocampal subfield segmentation package in freesurfer. *Front Aging Neurosci*. 2014;6:261.
42. Pereira JB, Valls-Pedret C, Ros E, Palacios E, Falcón C, Bargalló N, et al. Regional vulnerability of hippocampal subfields to aging measured by structural and diffusion MRI. *Hippocampus*. 2014;24:403–14.
43. La Joie R, Perrotin A, de La Sayette V, Egret S, Doeuvre L, Belliard S, et al. Hippocampal subfield volumetry in mild cognitive impairment Alzheimer's disease and semantic dementia. *Neuroimage Clin*. 2013;3:155–62.
44. Yassa MA, Mattfeld AT, Stark SM, Craig EL, Stark. Age-related memory deficits linked to circuit-specific disruptions in the hippocampus. *Neuroscience*. 2011;108:8873–8.
45. Long X, Tao Y, Chen XC, Deng B, Cai J, Zhang SJ. Getting lost: Place cells and grid cells in rodent models of Alzheimer's disease. *Neurosci Bull*. 2021, <http://dx.doi.org/10.1007/s12264-021-00670-3>.

46. Moreno-Jiménez EP, Flor-García M, Terreros-Roncal J, Rábano A, Cafini F, Pallas-Bazarra N, et al. Adult hippocampal neurogenesis is abundant in neurologically healthy subjects and drops sharply in patients with Alzheimer's disease. *Nat Med.* 2019;25: 554–60.
47. Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Daniel A, et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med.* 1998;4:1313–7.
48. Deng W, Aimone JB, Gage FH. New neurons and new memories: How does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat Rev Neurosci.* 2010;11:339–50.
49. Wang J, Yan R, Tang H. Multi-Scale Extension in an entorhinal-hippocampal model for cognitive map building. *Front Neurobot.* 2021;14:592057.
50. Zeng T, Si B. A brain-inspired compact cognitive mapping system. *Cogn Neurodyn.* 2021;15:91–101.
51. Krishna A, Mittal D, Virupaksha SG, Nair AR, Narayanan R, Thakur CS. Biomimetic FPGA-based spatial navigation model with grid cells and place cells. *Neural Netw.* 2021;139:45–63.
52. Hasan KM, Mwangi B, Cao B, Keser Z, Tustison NJ, Kochunov P, et al. Entorhinal cortex thickness across the human lifespan. *J Neuroimaging.* 2016;26:278–82.