

90



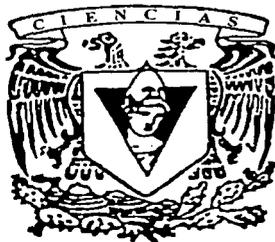
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**NEUROGÉNESIS EN EL BULBO OLFATORIO
DE LA RATA INDUCIDA POR CRISIS
EPILEPTICAS**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G O
P R E S E N T A :
ADRIÁN GUEVARA RIVERA

DIRECTOR DE TESIS: DR. RAFAEL GUTIÉRREZ AGUILAR



2002



**FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA

Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunico a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Neurogénesis en el bulbo olfatorio de la rata inducida por
crisis epilépticas"

realizado por ADRIAN GUEVARA RIVERA

con número de cuenta 09455665-0 , quién cubrió los créditos de la carrera de BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

DR. RAFAEL GUTIERREZ AGUILAR

Propietario

DRA. GLORIA ACACIA BENITEZ KING

Propietario

DRA. ROSALINDA GUEVARA GUZMAN

Suplente

DRA. CAROLINA ESCOBAR BRIONES

Suplente

BIOL. JOSE AQUILES BERNAL MORENO

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

Consejo Departamental de BIOLOGIA

DRA. PATRICIA RAMOS MORALES



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

Agradecimientos

Técnicos:

A mi director de tesis: Dr. Rafaél Gutiérrez Aguilar por todo el apoyo brindado durante el desarrollo de este trabajo, que me volvió a enseñar a leer y escribir.

A mis sinodales: Dra. Gloria A. Benítez, Biol. Aquiles Bernal, Dra. Carolina Escobar y Dra Rosalinda Guevara por las revisiones y sugerencia hechas al trabajo.

A mis compañeros de laboratorio: Gisela Gómez, Jazmín Maqueda, Hector Romo, Carmen Vivar, Benjamín Muños por su amistad y sugerencias y en especial a Mónica Ramirez y José Ayala Dávila por el apoyo en la estandarización de la técnica al igual que su amistad.

Personales:

A mis padres David y Luz Maria por confiar y apoyarme incondicionalmente en todos los momentos de mi vida.

A mis hermanos: Jorge, Iliana y Luz que me impulsan a seguir adelante con su ejemplo y su cariño. A mi abuela Maria por toda su comprensión.

A mis amigos del alma Ramón Pérez y Gabriel del Ángel que me han demostrado el valor de un amigo y con quienes he compartido las mejores experiencias de mi vida, y que además me ayudaron en la redacción de la tesis.

A mis queridos amigos: Edmundo, Ofelia, Barbara, Erika, Marcela, Gabriel Peña, Giovani, Bernardo, Henry, Alfredo, Julieta, Germán, Fransisco Franco, Jazmín M. Alejandra Juárez, por haber compartido la carrera introduciendo algo de cada uno en mi persona.

A mis amigos: Victor de la fuente, Angela, Roberto Cozatl, Liliana Galicia, Carlos Vázquez, Daniel, Edwin, Virginia, Adriana Manzo, Mary Colín, Carmina, Manuel Osegüera, Eduardo Caballero, Eduardo Rios, Mauricio, Roberto Cuevas, Krivsova y a todos aquellos con los que comparti mi carrera.

Indice.

Resumen	3
Capítulo 1. Neurogénesis.	5
1.1 Generalidades	
1.2 Ciclo celular	
1.3 Técnicas de marcaje de neurogénesis	
Capítulo 2. Bulbo olfatorio.	7
2.1 Generalidades	
2.2 Formación del bulbo olfatorio.	
2.3 Neurogénesis en bulbo olfatorio.	
2.4 Implicaciones funcionales.	
Capítulo 3. Neurogénesis en hipocampo	12
Capítulo 4 Kindling	14
Capítulo 5	16
5.1 Justificación.	
5.2 Hipótesis.	
5.3 Objetivos.	
Capítulo 6 Material y método.	18
Capítulo 7 Resultados.	23
Capítulo 8 Discusión.	33
Capítulo 9 Conclusiones.	37
Referencias.	38

Resumen.

La neurogénesis es el proceso de formación de neuronas que se inicia durante la gestación y finaliza pocos días después del nacimiento. Solamente el giro dentado del hipocampo y la zona subventricular (ZSV) mantienen este proceso a lo largo de toda la vida. Las células progenitoras de la ZSV migran hacia el bulbo olfatorio (BO) donde se diferencian. La neurogénesis es estimulada en el hipocampo por la epilepsia, el ejercicio, el aprendizaje, el estrés y otros factores. Se ha propuesto que las crisis convulsivas generan una reorganización aberrante de las nuevas neuronas, y ésta reorganización sostiene a la misma actividad epiléptica. Para explorar la posibilidad de que el incremento de la neurogénesis inducido por las crisis se de como una respuesta general de todos los sitios neurogénicos y no solamente en el hipocampo, decidimos investigar si las crisis convulsivas modifican la tasa de neurogénesis en el BO de la rata. Para esto utilizamos un marcador específico de proliferación celular, BrdU, un análogo de la timidina que se une al ADN durante la replicación celular y lo detectamos con el método de inmunohistoquímica.

Estudiamos el efecto de una crisis convulsiva generalizada producida por la inyección del convulsivante pentilenetetrazol (PTZ) a animales sanos y el efecto de varias crisis convulsivas generalizadas inducidas por el método de epileptización llamado "kindling". Éste consiste en la estimulación eléctrica repetitiva (un estímulo diario) de la amígdala del lóbulo temporal hasta producir crisis convulsivas. Se determinó la cantidad de células marcadas con BrdU, como índice de la neurogénesis, en animales no tratados y a diferentes tiempos después de una o varias crisis convulsivas. Además, evaluamos la neurogénesis durante el proceso de epileptización. Utilizamos dos vías de administración del BrdU, intraperitoneal e intra-cerebroventricular y comparamos su efectividad para marcar las células en el BO.

Nuestras observaciones mostraron que la vía de administración intraperitoneal fue más efectiva para marcar con BrdU a las células del BO. Cuatro días después de 5 crisis convulsivas o de una crisis única inducida por PTZ, se aumenta la cantidad de células inmunoreactivas a BrdU en la capa subependimal

del BO 80.5 y 95.3%, respectivamente. Asimismo, la estimulación repetitiva aplicada hasta alcanzar la fase conductual 3 del procedimiento del "kindling", que no involucra crisis epilépticas, produce un incremento del 43%. Ocho días después de las crisis, la cantidad de células inmunorreactivas continúan aumentadas 25.5% después de 5 crisis convulsivas y 16.5% después de una crisis aislada, con respecto al control. Sin embargo, el aumento observado a los 8 días es menor en un 55% que la observada a los 4 días. Cuando el grupo estimulado alcanzó la fase conductual 3 de "kindling" mantuvo un incremento del 52% en la cantidad de células marcadas 8 días después de la última estimulación.

Los resultados indicaron que las crisis convulsivas aisladas o las crisis repetidas inducidas por un modelo de epilepsia aumentan la neurogénesis en el BO. Más aún, la inducción de un estado creciente de excitabilidad en el sistema, es suficiente para incrementar la neurogénesis en esta estructura. Estos datos sugieren que las zonas neurogénicas del sistema nervioso central responden al incremento de la excitabilidad neuronal, independientemente de su relación con las estructuras involucradas en la epileptogénesis.

Capítulo 1. Neurogénesis.

1.1 Generalidades.

La neurogénesis es el proceso de formación de nuevas neuronas en el sistema nervioso. Normalmente, la neurogénesis comienza en la gestación y finaliza poco tiempo después del nacimiento en casi todas las estructuras (Angevine, 1965; Bayer, 1980; Bayer, 1983). Solamente en la base de la capa granular del hipocampo (zona subgranular) y en la zona subventricular (ZSV) del cerebro se mantiene la neurogénesis a lo largo de toda la vida (Bayer y col. 1982; Goldman y Nottebohm, 1983; Lois y Alvarez-Buylla, 1993; Cameron y col. 1993; Kaplan y col. 1977). De la ZSV migran células progenitoras que darán lugar a neuronas en el bulbo olfatorio (BO; Bertarbet y col. 1997, Parent y col. 2002). La neurogénesis varía de acuerdo con la edad de los individuos (Kuhn y col. 1996; Kaplan y col. 1985, Newman y col. 2000; Martínez-Marcos y col. 2000).

Ramón y Cajal (1959) escribió "... en centros adultos, las rutas nerviosas son algo arreglado, completado e inmutable. Todo puede morir, nada puede ser regenerado". Por mucho tiempo prevaleció la idea de que la neurogénesis era inexistente después del nacimiento. Sin embargo, esta idea ha sido reevaluada en las últimas décadas, se han acumulado evidencias que han demostrado la existencia de la neurogénesis en los vertebrados adultos (Eriksson y col. 1998; Goldman y Nottebohm, 1983).

1.2 Ciclo celular

La neurogénesis puede ser detectada mediante la adhesión de marcadores celulares al DNA (ácido desoxirribonucleico), durante la fase de replicación celular.

Para que las células se dividan se requiere que el DNA sea fielmente replicado, y que los cromosomas duplicados sean segregados en dos células separadas (Alberts y col. 1994). El ciclo celular consta de 4 fases: la fase G1 es el intervalo entre el final de la mitosis y el comienzo de la síntesis del DNA; la fase de síntesis (fase S) es cuando ocurre la replicación del DNA nuclear. En ese momento es posible agregar moléculas marcadas para detectar la neurogénesis (análogos de las bases nucleicas). La fase G2, es el siguiente intervalo de

preparación de la célula para iniciar la división, y el ciclo finaliza con la mitosis (fase M), donde ocurre la segregación de los cromosomas hacia dos células separadas (Alberts y col. 1994).

1.3 Técnicas de marcaje de neurogénesis

Una de las técnicas más empleadas para el marcaje de células de nueva generación es mediante la incorporación de $^3\text{H}^+$ Timidina al DNA durante la fase S. Este método semicuantitativo resulta costoso, laborioso e involucra el uso de isótopos radiactivos y equipo especializado para su detección; se requiere exponer al tejido durante 3 a 12 semanas a una emulsión sensitiva al tritio. La marca se localiza en una banda superficial de 2 o 3 μm de grosor.

Un método alternativo es usar la bromodeoxyuridina (BrdU), un análogo de la timidina, que se une a la cadena sencilla del DNA y que es posible detectarla mediante un anticuerpo monoclonal (Magaud y col. 1988). Esta molécula requiere sólo 2h para ser incorporada al núcleo celular y deja una marca irregular de puntos dispersos en la cromatina nuclear (Nowakowski y Rakic, 1981). Esta marca es indicativa de que la célula se ha dividido y su presencia se interpreta como una célula de nueva formación. Las células son marcadas durante un periodo discreto de tiempo (una o dos horas; Cameron y col. 2001) después de la administración de BrdU; este método es más rápido y accesible que con el uso de $^3\text{H}^+$ Timidina (Nowakowski y col. 1989; Houg y col. 1991; Migheli y col. 1991). El BrdU ha sido probado en el sistema nervioso central (SNC) *in vivo* (Miller y Nowakowski, 1988;) y en cultivo (Trent y col. 1986). Con esta técnica se puede estudiar la temporalidad de la distribución de las células proliferativas, en proceso de división celular y se ha analizado la neurogénesis y la migración de células de nueva generación (Altman y Das, 1966; Bayer, 1980; Bayer, 1983; Doetsch y col. 1997; Haydar y col. 2000; Kuhn y col. 1996; Lois y Alvarez-Buylla, 1994; Miller y Nowakowski, 1988).

Capítulo 2. Bulbo olfatorio.

El BO es la zona de proyección primaria de la vía olfativa. Los estímulos odoríferos interactúan con las neuronas receptoras olfatorias del epitelio olfatorio que revisten el interior de la nariz. Las neuronas receptoras olfatorias envían sus axones directamente al BO. Las neuronas del BO se proyectan a algunos blancos en el encéfalo anterior, que incluyen el núcleo olfatorio, el hipotálamo, la amígdala y varias regiones de la corteza cerebral. Las neuronas receptoras olfatorias presentan microvellosidades donde se localizan los receptores específicos a sustancias odoríferas. Los receptores son selectivos para una clase de compuestos que tienen una composición química definida (Purves y col. 1997).

El BO es una estructura altamente organizada y esto permite que sea utilizado como un modelo para estudiar las interacciones sinápticas y su desarrollo (Betarbet y col. 1997; Newman y col. 2000). Se forma a partir de células que migran desde una zona proliferativa localizada en la zona subventricular (ZSV). En vertebrados, esta zona presenta neurogénesis continua y está conformada por una capa endodimal y una subendodimal, compuestas por 4 tipos celulares: neuroblastos migratorios, precursores inmaduros, astrocitos y células endodimales (Doetsch y col. 1999; García-Verdugo y col. 1998). Las células germinales migran de 3 a 8 mm hacia la capa subendodimal del BO, a través de la vía migratoria rostral (Rousselot y Nottebohm, 1995; Doetsch y col. 1997) (figura 1); parte de la vía rostral también presenta neurogénesis (Gritti y col. 2002, Parent y col. 2002). En canarios, la neurogénesis se presenta durante el periodo de aprendizaje del canto (Alvarez-Buylla y Kirn, 1997) y representa un estado funcional y dinámico de proliferación, diferenciación y muerte celular (Newman y col. 2000). En esta especie, la neurogénesis se puede estimular mediante la administración de testosterona (Goldman y Nottebohm, 1983).

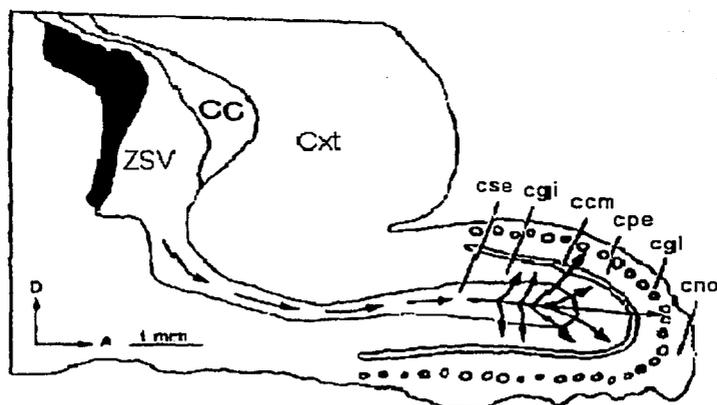


Figura 1. Esquema sagital de la proyección de la zona subventricular (ZSV), localizada junto al corpus callosum (cc), hacia el BO. Las células progenitoras de la ZSV migran hacia el BO a través de la corteza cerebral (Cxt) y llegan a la zona subependimal (cse) y de allí migran hacia las diferentes capas del BO, principalmente hacia la capa de células granulares (cgi), y hacia la capa glomerular (cgl). La migración hacia la capa de células mitrales (ccm), la capa externa plexiforme (cpe) y la capa de nervios olfatorios es mínima (cno). La "D" indica dorsal y la "A" anterior. La barra de calibración es de 1 mm. Esquema modificado de Parent y col. 1997.

Los astrocitos se desdiferencian y se transforman en los precursores primarios de las neuronas; su migración ocurre en cadenas a una velocidad aproximada de 23-30 $\mu\text{m}/\text{h}$, y estos precursores se asocian entre ellos sin requerir de fibras axonales o glia radial (Luskin, 1993; Lois y Alvarez-Buylla, 1993 y 1994). Durante la migración, existe una adherencia estricta de las células a los bordes de la ruta, y al llegar a la capa subependimal las células cambian su patrón de migración y se dirigen de manera radial hacia las distintas capas del BO (Luskin, 1993). El 75% de las células precursoras se diferencian en células granulares GABAérgicas y el 25% en periglomerulares GABAérgicas y dopaminérgicas (Luskin, 1993; Lois y Alvarez-Buylla, 1993; Betarbet y col. 1997). La proliferación y migración continúa desde la ZSV adulta aún en ausencia del BO, la vía migratoria rostral persiste por varias semanas y se hace más larga y ancha (Kirschenbaum y col. 1999). Sólo algunas interneuronas granulares y células mitrales nacen directamente en el BO en los primeros días postnatales (Luskin, 1993).

Existen factores que alteran la generación y supervivencia de nuevas neuronas en el BO y se han observado tanto *in vivo* (Doetsch y col. 1997 y 1999) como en cultivo (Reynolds y Weiss, 1992). La aplicación intracerebro ventricular del factor neurotrófico derivado del cerebro (Zigova y col. 1998), del factor de crecimiento endotelial y del factor de crecimiento de fibroblastos tipo 2 estimulan la proliferación, supervivencia y diferenciación neuronal en la ZSV, BO y epitelio olfatorio (Newman y col. 2000; Herzog y Otto, 1999; Mackay-Sim y Chuan, 2000). La aplicación de GABA y glutamato a cultivos de rebanadas organotípicas incrementa la proliferación en la ZSV al reducir el tiempo del ciclo celular, efecto mimetizado mediante la aplicación de agonistas de estos neurotransmisores, y bloqueado mediante la aplicación de antagonistas (Haydar y col. 2000).

El BO se encuentra conformado por 7 capas concéntricas (Figura 2; Ramón y Cajal, 1955; Bayer, 1983; Altman y Das, 1966; Hinds, 1967; Betarbet y col. 1997):

- 1) Capa externa de nervios olfatorios, compuesta por los axones de las neuronas receptoras olfatorias.
- 2) Capa glomerular con glomérulos e interneuronas granulares periglomerulares, consideradas como neuronas de salida, algunas son GABAérgicas y otras son dopaminérgicas, se forman entre el día E17 y el día P16.
- 3) Capa plexiforme externa compuesta por fibras y células mitrales pequeñas excitatorias y células en penacho que proyectan hacia los límites del bulbo; son formadas entre los días E15 y E18. Las células en penacho se dividen en internas, externas e intersticiales.
- 4) Capa de células mitrales largas y células granulares asociadas; las primeras son formadas hacia el día E15 y E18, mientras que las células granulares se forman entre el día P0 y P3. Las células mitrales son las principales neuronas de proyección del BO.
- 5) Capa plexiforme interna con interneuronas plexiformes, que se generan hacia el día P3.
- 6) Capa granular interna, con células granulares bipolares GABAérgicas arregladas en paquetes densos con procesos que establecen relaciones

sinápticas con las ramas terminales del nervio olfatorio y dendritas de las células mitrales. Éstas se desarrollan entre los días E17-19 y el días P20.

7) Capa subependimal, compuesta por células subependimales no diferenciadas, que se forma desde el día E12.

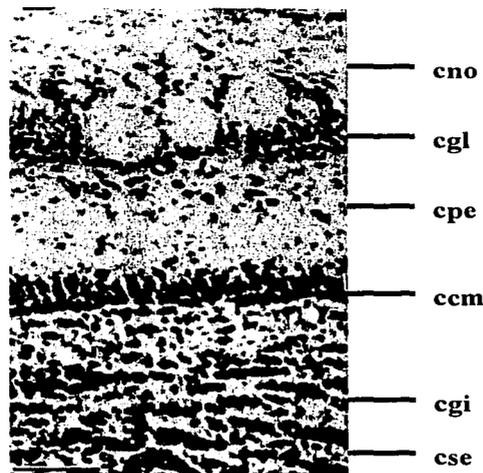


Figura 2. Fotomicrografía de campo claro de un corte sagital de bulbo olfatorio teñido con hematoxilina de Gill, que muestra su arreglo laminar concéntrico, conformado por: capa externa de nervios olfatorios (cno), capa glomerular (gl), capa plexiforme externa (cpe), capa de células mitrales (ccm), capa granular interna (cgi), capa subependimal (cse). La barra de calibración corresponde a 100 μ m. Figura modificada de Betarbet y col. 1997.

Durante la formación del BO primero se producen las células periglomerulares seguidas por las granulares y sirven de guía en la generación posterior de las células mitrales y las células en penacho. Esta secuencia temporal es necesaria para el establecimiento de conexiones anatómicas apropiadas entre el BO y la amígdala (Bayer, 1980; Hinds, 1967).

Los cilios del epitelio olfatorio transforman la señal química de la substancia odorífera en una señal eléctrica que estimula a los glomérulos, que son un conjunto de acumulaciones esféricas del neuropilo. Dentro de los glomérulos, los

axones de las células receptoras hacen contacto con las dendritas apicales de las células mitrales. Los cuerpos de las células mitrales extienden una dendrita primaria y dan origen a un penacho glomerular elaborado en el cual hacen sinapsis los axones olfatorios primarios. Las células granulares hacen sinapsis sobre las dendritas de las células mitrales y afinan la selectividad química de las células mitrales (Purves y col. 1997). En las células granulares y en las periglomerulares se ha encontrado GABA, calbindina, calretinina, paralbúmina, taurina, péptido intestinal vasoactivo y neuropéptido Y (Betarbet y col. 1997).

Sólo las células mitrales transmiten información olfatoria a los blancos en el resto del encéfalo. El principal blanco es la corteza piriforme y ésta proyecta, a su vez, a varios núcleos talámicos, a regiones neocorticales, al hipocampo y la amígdala. En consecuencia, la información acerca de los olores alcanza una amplia variedad de regiones del encéfalo anterior para influir en la conducta cognitiva, la emocional y en la homeostasis (Purves y col. 1997).

Muchos vertebrados dependen del sentido del olfato para su reproducción, forrajeo, jerarquización, rastreo, identificación y otras conductas sociales (Stock y col. 2001; Farbman, 1990). Sin la posibilidad de formar nuevas neuronas olfatorias continuamente, es probable que la supervivencia de los organismos se vea afectada. Las células olfatorias pueden morir en cualquier etapa de su diferenciación (jóvenes, inmaduras y maduras), es posible que un exceso de neuronas sensoriales se genere continuamente aun bajo condiciones fisiológicas normales (Farbman, 1990). Se ha comprobado que neuronas de nueva generación del BO participan en la memoria a corto plazo sobre el reconocimiento de olores. La reducción específica de la población de interneuronas nuevas resulta en una reducción de la discriminación de olores (Gheusi y col. 2000), sin embargo existe discusión sobre cómo se benefician los mamíferos al presentar neurogénesis durante su vida adulta en su ambiente natural (Boonstra y col. 2001).

Capítulo 3. Neurogénesis en el hipocampo.

La otra región que presenta neurogénesis sostenida a lo largo de la vida es la base de la capa granular (CG) del giro dentado (GD) del hipocampo. Varios estudios han demostrado la existencia de neurogénesis en el hipocampo de distintas especies animales como la rata, el ratón, el cobayo, la musaraña, la marmota, el macaco y el humano (Gould y Tanapat, 1997; Gould, 1998 y 1999b; Eriksson y col. 1998; Kornack y Rakic, 1999).

El hipocampo es una estructura del sistema límbico que participa en la regulación de la conducta y las emociones e interviene en los procesos de memoria y aprendizaje (Scoville y Milner, 1957; Squire, 1993). También es de interés por su susceptibilidad a producir actividad epileptiforme.

Se ha sugerido que la neurogénesis continua de células granulares es esencial para el aprendizaje y la memoria, procesos en los cuales participa activamente el hipocampo al servir de enlace entre las cortezas (Derrick y col. 2000; Crespo y col. 1986). La experiencia puede modular la proliferación celular del GD y esto puede implicar una importancia biológica, ligada con el aprendizaje y el medio ambiente (Squire, 1993). Las neuronas recién generadas pueden participar en el almacén de la memoria en la que participa el hipocampo (Dash y col. 2001; Nakagawa y col. 2000) y establecer conexiones funcionales (Stanfield y Trice 1988; Scharfman y col. 2000; Gray y Sundstrom 1998; Kempermann y col. 1997 y 1998; Gould y col. 1999a; Nilsson y col. 1999; Shors y col. 2001). En el GD existe una tasa de proliferación mínima de una neurona por cada 1000 células granulares existentes por día (Biebl y col. 2000).

La formación del GD en los roedores ocurre en parte después del nacimiento (Altman y Bayer, 1990; Squire, 1993). Las células progenitoras del GD son multipotenciales y pueden diferenciarse en neuronas excitatorias e inhibitorias y glia (Vicario-Abejón y col. 2000). Se puede inducir su diferenciación y proliferación *in vitro* e *in vivo* mediante factores de crecimiento como el factor de crecimiento de fibroblastos (Gage y col, 1998; Aberg y col. 2000), tal como sucede en BO, o mediante hormonas (Gould y col. 1992; Fuchs y Gould, 2000). También es posible inducir la diferenciación de las células progenitoras en regiones del

hipocampo donde normalmente no ocurre esta neurogénesis (Magavi y col. 2000). La proliferación de los progenitores neuronales del GD decrece con la edad (Gould y col. 1999a; Gould y col. 1992) y presenta cambios degenerativos con pérdida neuronal en hilus y CA3 (Kuhn y col. 1996) y la supervivencia de las células granulares de nueva generación depende de condiciones ambientales adecuadas (Kemperman y col. 1997).

Las neuronas de nueva generación nacen en el borde de la zona subgranular. Una semana después se alinean en el borde de la CG, migran de 4 a 10 días hasta ocupar toda la capa y extienden procesos neuronales y conexiones sinápticas. Treinta días después, éstas células son ya células maduras. El 80% de las neuronas de nueva generación expresan enolasa específica de neuronas, que es un marcador neuronal (Dash y col. 2001), así como la forma embrionaria de la molécula de adhesión neural (PSA-NCAM) y calbindina (Kuhn y col. 1996; Sloviter, 1989).

La proliferación neuronal en el GD del hipocampo de rata adulta se incrementa por crisis epilépticas (figura 3) y se ha propuesto que esto contribuye a la reorganización de redes neuronales aberrantes (Parent y col. 1997) que, a su vez, pueden estar involucradas en la generación o mantenimiento de la actividad epileptiforme.

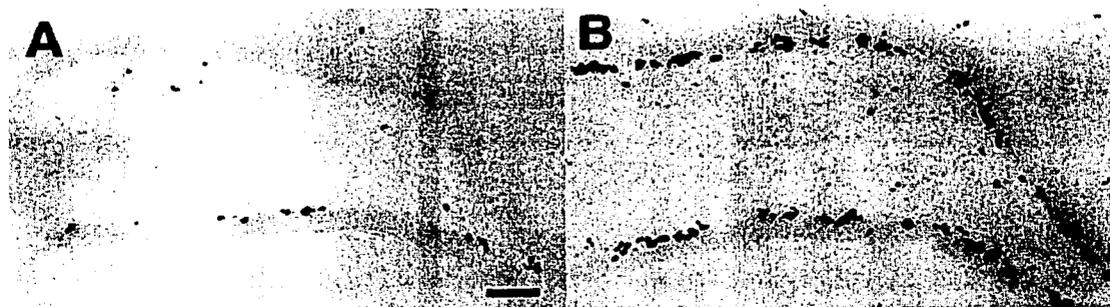


Figura 3. Fotomicrografía de campo claro de un corte coronal del GD de hipocampo de rata que muestra células marcadas con BrdU en la zona subgranular del GD en la condición control (A), y 13 días después de un estado epiléptico inducido por pilocarpina (B). La barra de calibración equivale a 100 μ m. Figura modificada de Parent y col. 1997.

En pacientes con epilepsia de lóbulo temporal y en roedores sometidos a un modelo de epilepsia límbica, las fibras musgosas (FM) se ramifican y establecen conexiones aberrantes (Davenport y col. 1990; Kato y col. 2001b; Holmes y col. 1999; Gombos y col. 1999; Van der Zee y col. 1995; Represa y col. 1994; Pollard y col. 1996; Cavazos y col. 1990; Sutula y col. 1988; Babb y col. 1991). Este estado epiléptico también produce un incremento de la neurogénesis (Parent y col. 1997 y 1998; Sankar y col. 2000; Gray y col. 1998; Nakagawa y col. 2000; Scott y col. 1998; Arvidsson y col. 2001; Dash y col. 2001, Eriksson y col. 1998, Parent y col. 2002). Muchas de las células de nueva generación migran anormalmente y se dispersan (Parent, y col. 1998; Scharfmann y col. 2000).

Los modelos de epilepsia en los que se usa la pilocarpina (Parent y col. 1997, 2002; Sankar y col. 2000), el ácido kaínico (Gray y Sundstrom, 1998; Nakagawa y col. 2000) o la estimulación iterativa del sistema límbico ("kindling") producen un incremento de la neurogénesis en la zona proliferativa subgranular del GD, en un rango que va del 75 al 140% (Parent y col. 1998; Nakagawa y col. 2000; Scott y col. 1998; Represa y col. 1989). Los daños producidos por isquemia focal (Arvidsson y col. 2001), por isquemia global (Liu y col. 1998), y el daño cerebral cortical también provocan proliferación neuronal en el GD (Dash y col. 2001). Es interesante que la estimulación de las FM para inducir potenciación a largo plazo (LTP) es también capaz de incrementar la neurogénesis de las células granulares en el GD (Derrick y col. 2000; Snyder y col. 2001; Van Praag y col. 1999).

Capítulo 4 "Kindling".

El "kindling" es un modelo de epileptogénesis experimental basado en la estimulación repetida, eléctrica o química, de diversas estructuras del sistema límbico que produce un incremento progresivo de su excitabilidad, que se propaga a otras regiones del SNC y que culmina con la generación de crisis convulsivas generalizadas (CCG; Goddard y col. 1969). El estímulo más utilizado es el eléctrico y generalmente se da en amígdala del lóbulo temporal, pues es una región que requiere bajo número de estímulos para generar CCG (de 10 a 12). Los

parámetros de estimulación más usados son pulsos monopolares de un milisegundo de duración a 60 Hz durante un segundo, con una intensidad de $150\mu\text{A} - 500\mu\text{A}$ (Goddard y col. 1969). Este modelo de epilepsia presenta características similares a la epilepsia de lóbulo temporal de humano y genera cambios plásticos en la excitabilidad cerebral que se traduce en un estado epiléptico permanente (Goddard y col. 1978; Nakagawa y col. 2000).

En la rata se presentan respuestas conductuales epileptiformes progresivas, conforme se incrementa el número de estimulaciones. Estos cambios conductuales se clasifican en 5 fases (Racine, 1972):

- Fase I. Guiño del ojo ipsilateral.
- Fase II. Guiño bilateral, movimientos faciales y masticación.
- Fase III. Movimientos de cabeza y faciales, masticación, sacudidas del perro mojado y mioclonias de miembros anteriores.
- Fase IV. Las conductas de la fase anterior y levantamiento sobre las patas traseras (posición de canguro).
- Fase V. Las conductas de la fase anterior más levantamientos repetidos sobre las patas traseras hasta la caída al suelo y CCG.

La epileptización por el método kindling es efectiva en varias especies de mamíferos, con variaciones a lo largo de la escala filogenética (Wada y col. 1978; McIntyre y Racine, 1986). Los cambios que genera son permanentes ya que una vez que se ha alcanzado la fase V puede dejarse de estimular por un periodo y las CCG vuelven a aparecer inmediatamente después de someter a los animales al estímulo original (McIntyre y Racine, 1986).

El modelo presenta varias ventajas: el proceso ocurre in vivo; facilita la producción de actividad epiléptica de una zona a través de la estimulación de otra, fenómeno conocido como transferencia; el sitio de estimulación puede ser escogido, se estimula el mismo sitio por la permanencia del electrodo, sin que exista daño por su implantación; el estímulo es controlado en intensidad, duración y frecuencia; es confiable debido a que siempre se presentan los mismos patrones conductuales, es objetivo y reproducible.

Capítulo 5

5.1 Justificación.

La neurogénesis es un proceso que sucede de manera normal en la ZSV y en el hipocampo del adulto (Bayer y col. 1982; Goldman y Nottebohm, 1983; Lois y Alvarez-Buylla, 1993; Cameron y col. 1993; Kaplan y Hinds, 1977). Además, las crisis convulsivas producen un incremento en la neurogénesis del hipocampo, estructura que está relacionada con la generación de la epilepsia (Parent y col. 1997). Se desconoce el efecto que tienen las crisis epilépticas sobre la neurogénesis de una región no involucrada directamente con la generación de la epilepsia. Sin embargo, puede suponerse que la neurogénesis sea un proceso reactivo a las crisis epilépticas que pueda presentarse en estas zonas neurogénicas.

Con estos antecedentes, decidimos investigar si las crisis convulsivas, la epileptogénesis y un estado epiléptico permanente provocan cambios en la tasa de neurogénesis en el BO, que es una zona con una tasa alta de generación de neuronas en el adulto. Si la neurogénesis responde al incremento progresivo de la hiperexcitabilidad del SNC, esperamos encontrar un correlato entre ésta y la tasa de proliferación neuronal en el BO.

5.2 Hipótesis

Si en el hipocampo, las crisis epilépticas favorecen la neurogénesis, entonces es otras zonas neurogénicas con crisis convulsivas también aumentarán su tasa de proliferación neuronal.

5.3 Objetivo General

Determinar el efecto que tienen las crisis convulsivas rproducidas por "kindling" amigdalino y por pentilenetetrazol y la hiperexcitabilidad en la tasa de neurogénesis en el bulbo olfatorio de rata.

Objetivos particulares.

Determinar la efectividad de la incorporación de BrdU en el BO, administrándolo por dos diferentes vías: intraperitoneal (i.p.) e intracerebroventricular (i.c.v).

Determinar cuantitativamente, con técnicas inmunohistoquímicas:

1. La cantidad de células marcadas por BrdU en el BO después de producir crisis convulsivas generalizadas únicas con pentilenetetrazol (PTZ).

2. La cantidad de células marcadas por BrdU en el BO durante la epileptogénesis producida por estimulación eléctrica repetitiva de la amígdala (kindling) y después de producir 5 crisis convulsivas generalizadas.

Capítulo 6 Material y Métodos.

Los experimentos se realizaron con 33 ratas Wistar macho adultas (280-340g; Harlan Sprague Dawley Inc., U.S.A.). Se determinó el número de células de nueva generación en el BO, mediante el uso del marcador de división celular bromodeoxiuridina (BrdU), que fue reconocido mediante un anticuerpo monoclonal para BrdU conjugado a fluoresceína. El BrdU fue administrado por dos vías, intraperitoneal e intracerebroventricular.

Se realizaron conteos de células inmunofluorescentes a dos tiempos distintos después de la administración de BrdU en todos los grupos estudiados. Estos fueron:

Grupo control: a) animales sanos inyectados via intracerebro ventricular (i.c.v.) con BrdU, evaluados después de 4 días de la inyección (n=3); b) animales sanos, inyectados con BrdU via intraperitoneal (i.p.) y evaluados 4 (n=3) y 8 (n=3) días después de la inyección.

Grupo con crisis únicas: a) animales con una crisis convulsiva generalizada inducida por la administración i.p. del convulsivante PTZ, inyectados i.c.v. con BrdU y evaluados 4 días (n=3) después de la inyección; b) animales tratados con PTZ e inyectados i.p. con BrdU y analizados 4 (n=3) y 8 (n=3) días después de la inyección.

Grupo estimulado sin crisis convulsivas: a) animales estimulados por el método de kindling hasta alcanzar la fase conductual 3 del proceso de epileptización; inyectados con BrdU i.c.v y evaluados 4 días después de la inyección (n=3), b) animales estimulados de la misma manera pero inyectados i.p. con BrdU y evaluados 4 (n=3) y 8 días (n=3) después de la inyección.

Grupo con 5 crisis convulsivas: a) animales a los que se les indujeron 5 CCG por el método de kindling e inyectados ic.v. con BrdU y evaluados 4 días después de la inyección (n=3); b) animales estimulados de la misma manera e inyectados i.p. con BrdU y que evaluados 4 (n=3) y 8 días (n=3) después de la inyección (ver Tabla 1).

	Control	Fase III	Kindling	PTZ
i.c.v 4 días	n = 3	---	n = 3	n = 3
i.p. 4 días	n = 3	n=3	n = 3	n = 3
i.p.8 días	n = 3	n=3	n = 3	n = 3

Tabla 1. Cuadro de grupos experimentales: animales control (control), animales estimulados hasta la fase III del kindling, animales con 5 CCG inducidas por Kindling y animales con una crisis aguda inducida por PTZ inyectados con BrdU por las vías intracerebro ventricular (i.c.v.) e intraperitoneal (i.p.). Los conteos de células inmunorreactivas se realizaron 4 u 8 días después de la inyección de BrdU.

Para la administración i.p. de BrdU, se utilizó una dosis de 100mg/kg, disuelto en solución salina a 15mg/ml. El volumen inyectado fue de 2ml (Kuhn y col. 1996). Para la administración i.c.v. de BrdU se implantó una cánula guía (aguja No. 22), cuya punta se fijó 0.3 mm sobre el tercer ventrículo del cerebro mediante cirugía estereotáxica en las coordenadas AP -4.3, L 0.0 y H 3.8; con 15° de inclinación, según el atlas estereotáxico de Paxinos y Watson, 1997. Después de un periodo de descanso postoperatorio de una semana, se introdujo una jeringa Hamilton por la cánula guía hasta el tercer ventrículo H 3.85 y se inyectó el BrdU a una concentración de 150 μ g/10 μ l diluido en solución salina (Gray y Sundstrom 1998).

Para realizar el Kindling amigdalino se implantó un electrodo, para esa cirugía se anestesió a los animales con ketamina (60 mg/kg i.p.) y se implantó estereotáxicamente un electrodo bipolar de acero inoxidable en el núcleo basolateral de la amígdala izquierda, AP -2.8, L 4.8, H -8.4 con respecto a Bregma (Paxinos y Watson, 1997). El grupo de animales que recibió inyección i.c.v. de BrdU fue implantado además con la cánula guía en la misma operación. Las ratas fueron mantenidas en un periodo de descanso postoperatorio de una semana y después se fijó el umbral de estimulación (cantidad mínima de corriente necesaria para producir un guiño del ojo ipsilateral) con el que posteriormente se estimularon diariamente. Se aplicó un tren de pulsos de un segundo de duración, compuesto a su vez por pulsos de un milisegundo a una frecuencia de 60Hz, y con una intensidad de 500 μ A cada 24h. Un grupo de 6 animales fue estimulado hasta

que presentó por 3 días consecutivos las respuestas conductuales correspondientes a la fase III según la escala de Racine (1972); y otro grupo de 9 animales fue estimulado hasta que presentó 5 CCG consecutivas. El BrdU se administró dos horas después del estímulo que indujo por dos días consecutivos las conductas correspondientes a la fase III de la escala de Racine (1972) y en el grupo que recibió el protocolo completo de kindling, dos horas después de la cuarta CCG.

El grupo de animales que fue inyectado con PTZ (60 mg/ kg I.P.) presentó una crisis convulsiva generalizada clónico-tónica de aproximadamente 2 minutos de duración. Dos horas después de la crisis se inyectaron con BrdU.

La preparación del tejido para los estudios inmunohistoquímicos se realizó 4 u 8 días después de la administración de BrdU (ver tabla 1). Los animales fueron anestesiados con una inyección de pentobarbital sódico (Anestosal 50 mg/kg) y se perfundieron vía intracardiaca con 50 ml de buffer de fosfatos (pH 7.4) a una velocidad de 10 ml/ minuto, seguido por 500 ml de paraformaldehído al 4% diluido en buffer de fosfatos 0.1M a pH 7.4 a 4°C. Posteriormente, se removieron los cerebros y se colocaron en 20 ml de la misma solución fijadora por 2h a temperatura ambiente y después en una solución de buffer de fosfatos salino (PBS) con sacarosa al 30% a pH 7.4, para su crioprotección, durante 48 h a 4°C.

Los BO se cortaron en un microtomo de deslizamiento (Jung Histoslide 2000R Leica) a -18°C en cortes coronales de 30 µm que se colectaron en PBS 0.1M pH 7.4 en cajas de cultivo de 24 pozos.

Para realizar la inmunohistoquímica contra BrdU se utilizaron los siguientes reactivos y soluciones, siguiendo el método previamente descrito (Kuhn y col. 1996; Scharfman y col. 2000; Parent y col. 1997).

- BrdU, Sigma, No. catalogo B9285
- PBS, Buffer de fosfatos salino 0.1M a pH 7.4 y a pH 9.5.
- Solución de 50% Formamida (Sigma) / 50% citrato de sodio salino (SSC) 2x 0.03M. (Sigma) a 65°C.
- Solución de HCl 2N a 37°C.
- Solución de ácido bórico 0.1M pH 8.5.

- Solución de bloqueo: PBS 0.1M con 10% de suero de caballo y 0.3% de detergente Tween20 (Sigma).
- Solución de incubación del anticuerpo: antiBrdU acoplado a fluoresceína (Harlan, anti-Bromodeoxyuridine FITC conj, de Sera Lab, No catálogo 18-0103) diluido 1:80 en PBS 0.1M pH 7.4, con 5% de suero de caballo.

Procedimiento. Los cortes, en libre flotación, fueron lavados por 15 minutos en PBS 0.1M pH 7.4, dos veces seguidas y luego con PBS pH 9.5 durante 30 minutos. Posteriormente se incubaron durante 2 horas en formamida/SSC para eliminar estructuras secundarias del DNA. Posteriormente se cambió la solución por SSC y se incubaron durante 10 minutos. Para desnaturalizar el DNA se incubaron 30 minutos en HCl a 37°C; y se neutralizó la reacción con un lavado de ácido bórico por 10 minutos. Se lavaron los cortes con PBS 0.1M pH 9.5 durante 30 minutos. Se realizaron después dos lavados en PBS 0.1M pH 7.4 de 10 minutos cada uno. Para bloquear la unión inespecífica del anticuerpo, las rebanadas se incubaron 2 horas en la solución de bloqueo. Después se incubaron los cortes por 2 horas a temperatura ambiente con la solución del anticuerpo para BrdU y después a 4°C durante 48 horas en oscuridad y agitación constante. Se lavaron los cortes dos veces con PBS pH 7.4, por 10 minutos. Finalmente los cortes fueron montados en portaobjetos y cubiertos con cubreobjetos con el medio de montaje Citifluor (#0 Ted Pella).

Los cortes fueron observados en un microscopio invertido de epifluorescencia (Axiovert-100 Zeiss) con filtros apropiados para fluoresceína, que emite en color verde a 450-490 nm de longitud de onda. La marca de BrdU se observa como puntos fluorescentes dispersos de cromatina en los núcleos de las células, claramente distinguibles del fondo. Se contaron únicamente las células inmunoreactivas en la capa subependimal del BO en 6 cortes de 30 μm por rata. Éstos se seleccionaron a partir de 300 μm del extremo distal del BO, cada 300 μm , que en su conjunto abarcaron 1800 μm de cada bulbo (Gray y Sundstrom, 1998). Los cortes fueron observados y fotografiados con un microscopio confocal a 60x y 100x (Microscopio invertido Nikon Diaphot acoplado a un sistema de análisis confocal BioRad), con el programa COMOS. Las fotomicrografías fueron

ensambladas y digitalizadas por computadora mediante el programa Confocal Assistant 4.02 y mediante Paint Shop Pro 7 (Jasc Software Inc.).

Se promedió el número de células marcadas en 6 rebanadas por cada animal, en cada grupo experimental de 3 animales; por lo tanto, cada promedio fue el resultado de 18 cortes. Los datos de los distintos grupos fueron evaluados con la prueba estadística ANOVA con un grado de confiabilidad del 99.9999%, seguido por una prueba Post-Hoc HSD de Tukey.

Capítulo 7 Resultados.

La marca celular de BrdU se observó como puntos dispersos en los núcleos celulares, distinguibles del fondo. Los núcleos marcados presentaron una forma circular o alargada, de 6-7 μm de diámetro (figura 4B). Esta marca está restringida al núcleo y no se observó en el citosol o prolongaciones celulares. Cuatro y ocho días después de la administración del BrdU, las células inmunorreactivas se concentraron exclusivamente en la capa subependimal del BO (fig 4A).

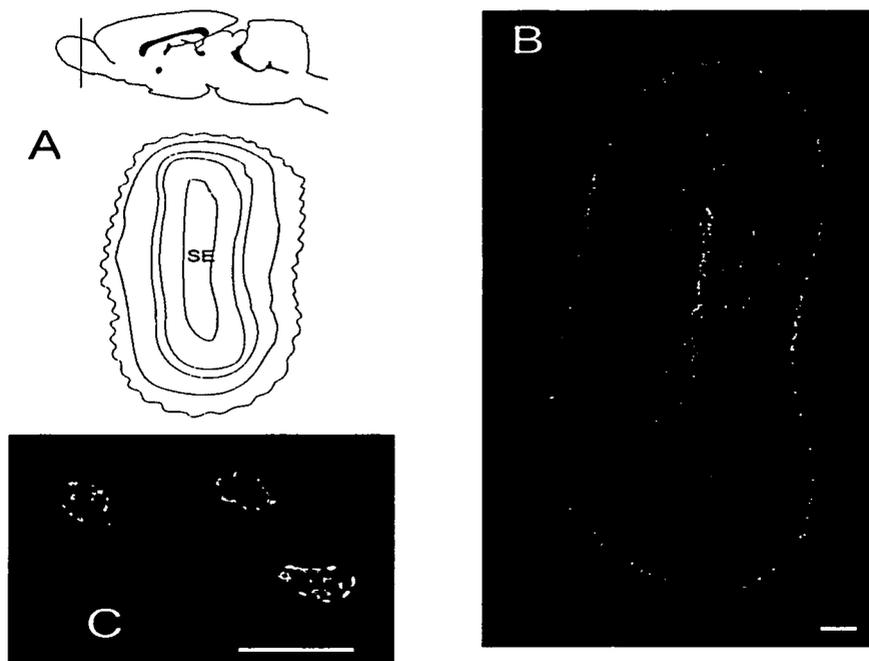


Figura 4A) Esquema del bulbo olfatorio que muestra la orientación de los cortes histológicos procesados y de las capas celulares que lo conforman. B) Fotomicrografía tomadas con un microscopio confocal de cortes coronales de BO de una rata control, procesados para la detección inmunohistológica de BrdU. Los núcleos de células positivas para BrdU están restringidas a la capa subependimal (SE). La barra de calibración equivale a 200 μm . C) Marca característica de BrdU en las células donde se observan puntos dispersos en el núcleo. La barra de calibración equivale a 10 μm .

Los resultados de la cuantificación de células marcadas con BrdU en los grupos controles se muestran en la figura 5. Las ratas del grupo control, procesadas 4 días después de la inyección i.c.v. de BrdU tuvieron en promedio 143.1 ± 16.01 células marcadas por rata ($n=3$), mientras que las inyectadas por vía i.p. tuvieron 203.7 ± 22.07 células ($n=3$). Las ratas procesadas 8 días después de la inyección i.p. de BrdU tuvieron un promedio de 483.1 ± 14.87 células con marca (Figura 5). Las diferencias entre estos grupos control fueron estadísticamente significativas ($p < 0.00001$).

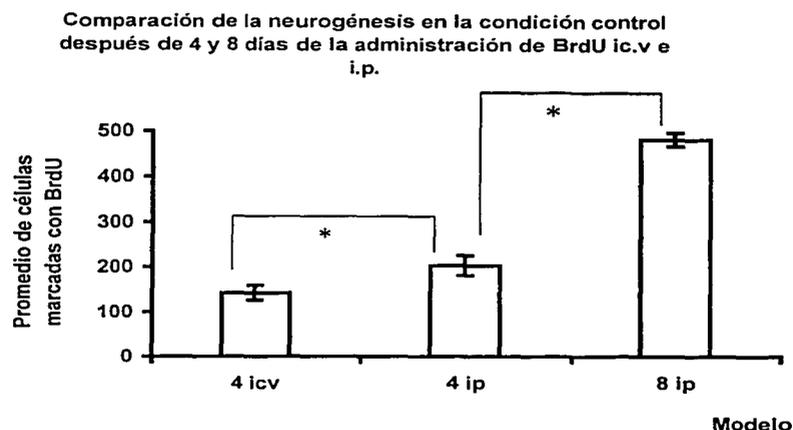


Figura 5. Histograma que muestra la media (\pm desviación estándar) de las células marcadas con BrdU después de 4 días de su administración intracerebro ventricular, y 4 y 8 días de su administración intraperitoneal. Cada barra equivale al número de células marcadas de 18 cortes histológicos promediados de 3 ratas. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos unidos por líneas. (* $p < 0.001$; ANOVA seguida por prueba post-hoc HSD de Tukey).

La inyección i.p. marcó $42.3 \pm 0.5\%$ más células que las que la administración i.c.v.. Debido a esto se decidió seguir este protocolo para el resto del estudio. En estas condiciones, el incremento en el número de células inmunopositivas determinado a los 8 días de la inyección i.p. de BrdU con respecto al determinado a los 4 días fue de $137.2 \pm 20.6\%$.

En la figura 6 se muestra el promedio de células marcadas en la capa subependimal del BO 4 días después de la inyección i.c.v. de BrdU en la condición control, y después crisis inducidas por "kindling" y por PTZ. Los valores medios fueron, para el grupo control: 143.1 ± 16.01 células; grupo con 5 CCG: 216.6 ± 12.23 , grupo con una sola crisis inducida por PTZ: 211.1 ± 23.63 . Los incrementos de cada grupo, con respecto al grupo control fueron: 51.32 ± 7.54 % para el grupo con 5 CCG, 47.48 ± 0.01 % para el grupo con una sola crisis. Las diferencias entre ambos grupos experimentales y el control fueron estadísticamente significativas $F = (1,10) 1153.043 = p < 0.00001$. En la figura 7 se muestran las fotomicrografías de las condiciones: control (C), y PTZ (P), donde se observa el aumento de la neurogénesis. En la figura 7 se muestra un acercamiento de las fotomicrografías de la condición control y después de la crisis única inducida por PTZ; y en la figura 8 se muestran fotomicrografías de las 3 condiciones después de 4 días de la administración i.c.v de BrdU: control (C), kindling (K) y PTZ (P).

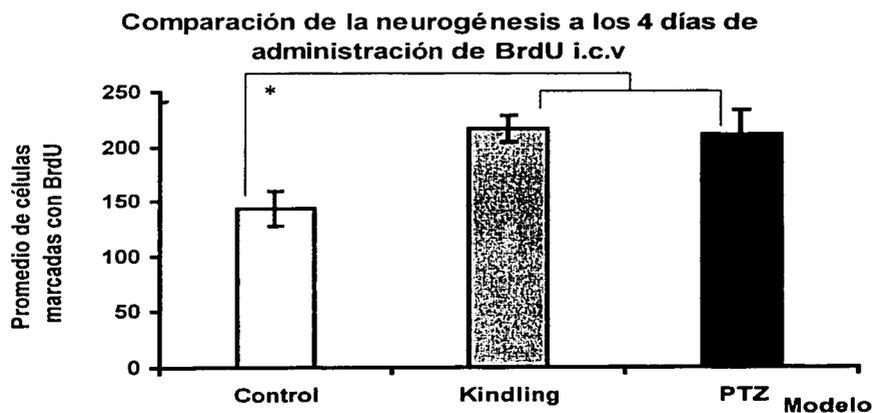


Figura 6. Histograma que muestra la media (\pm desviación estándar) de las células marcadas con BrdU después de 4 días de su administración intracerebro ventricular en la condición control, después de 5 crisis inducidas por "Kindling", y después de una crisis única inducida por PTZ. Cada barra equivale al número de células marcadas de 18 cortes histológicos promediados de 3 ratas. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos unidos por líneas. (* $\alpha < 0.00001$; ANOVA seguida por prueba post-hoc HSD de Tukey).

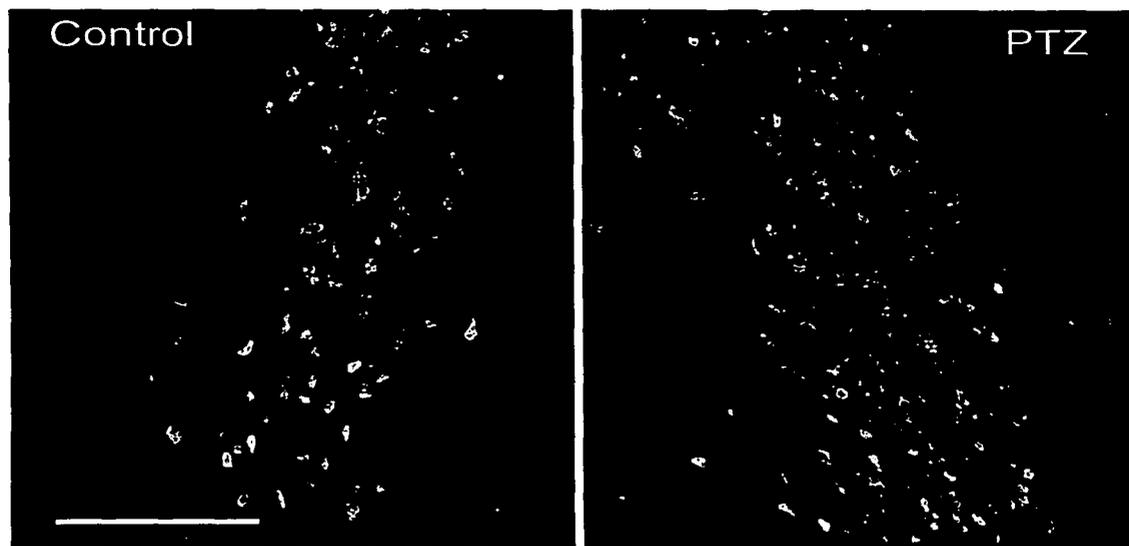


Figura 7. Fotomicrografía que muestra la capa subependimal en la condición control (C) y después de una crisis única (PTZ) 4 días después de la administración i.c.v. de BrdU. Nótese el aumento en la cantidad de células marcadas después de la CCG con respecto al control. La barra de calibración equivale a 50 μm .

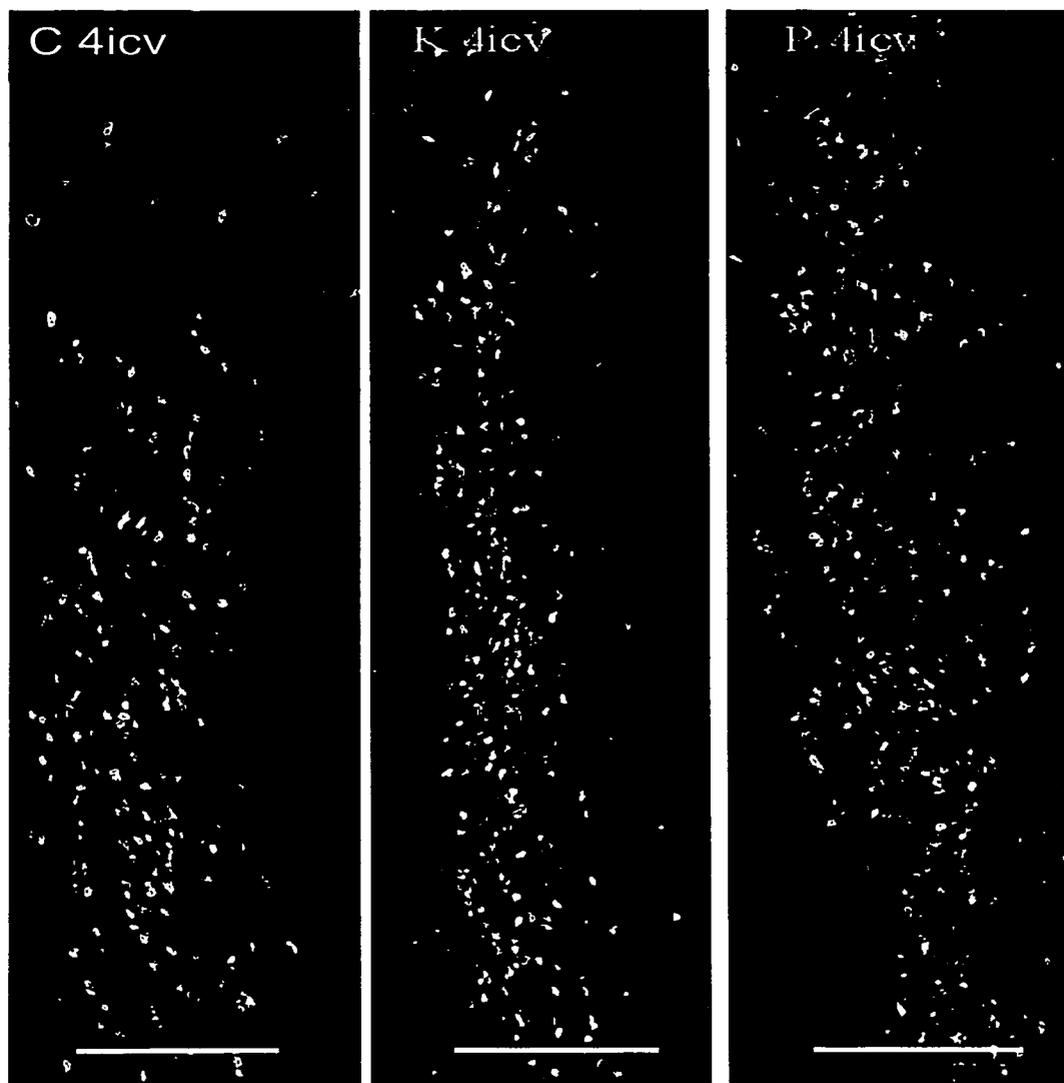


Figura 8. Fotomicrografía de cortes coronales de bulbo olfatorio. Se muestra la capa subependimal en la condición control (C), Kindling (K) y PTZ (P) después de 4 días de la administración i.c.v. de BrdU. Nótese el aumento en la cantidad de células marcadas después de las CCG con respecto al control. La barra de calibración equivale a 100 μm .

En la figura 9 se muestra el promedio de células marcadas en la capa subependimal del BO 4 días después de la inyección i.p. de BrdU en cada condición experimental. El promedio de células marcadas para cada grupo fue: control, 203.7 ± 22.07 células; grupo "fase III", 291.3 ± 29.03 células; grupo kindling, 367.7 ± 17.33 células y grupo PTZ 397.88 ± 31.17 células. Así, el aumento del porcentaje de células marcadas de cada grupo con respecto al control fueron: "fase III" $43.04 \pm 1.4\%$; kindling, $80.52 \pm 12.4\%$ y PTZ $95.36 \pm 6.58\%$. Las diferencias entre el control y las 3 condiciones experimentales fueron estadísticamente significativas $F = (1,10) 1153.043 = p < 0.00001$. En la figura 10 se muestran las fotomicrografías 4 días después de la administración i.p. de BrdU en las condiciones: control (C), fase III (FIII), "kindling" (K) y PTZ (P).

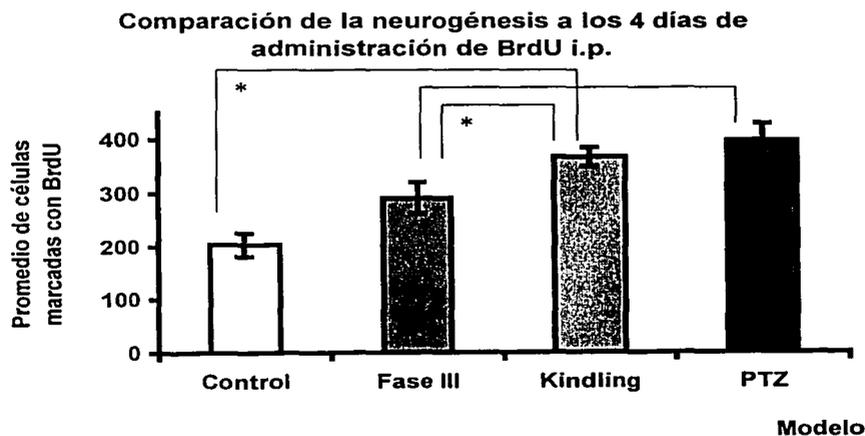


Figura 6. Histograma que muestra la media (\pm desviación estándar) de las células marcadas con BrdU después de 4 días de su administración intraperitoneal en la condición control, después de la estimulación hasta fase III, después de 5 crisis inducidas por "Kindling", y después de una crisis única inducida por PTZ. Cada barra equivale al número de células marcadas de 18 cortes histológicos promediados de 3 ratas. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos unidos por líneas. (* $\alpha < 0.00001$; ANOVA seguida por prueba post-hoc HSD de Tukey).

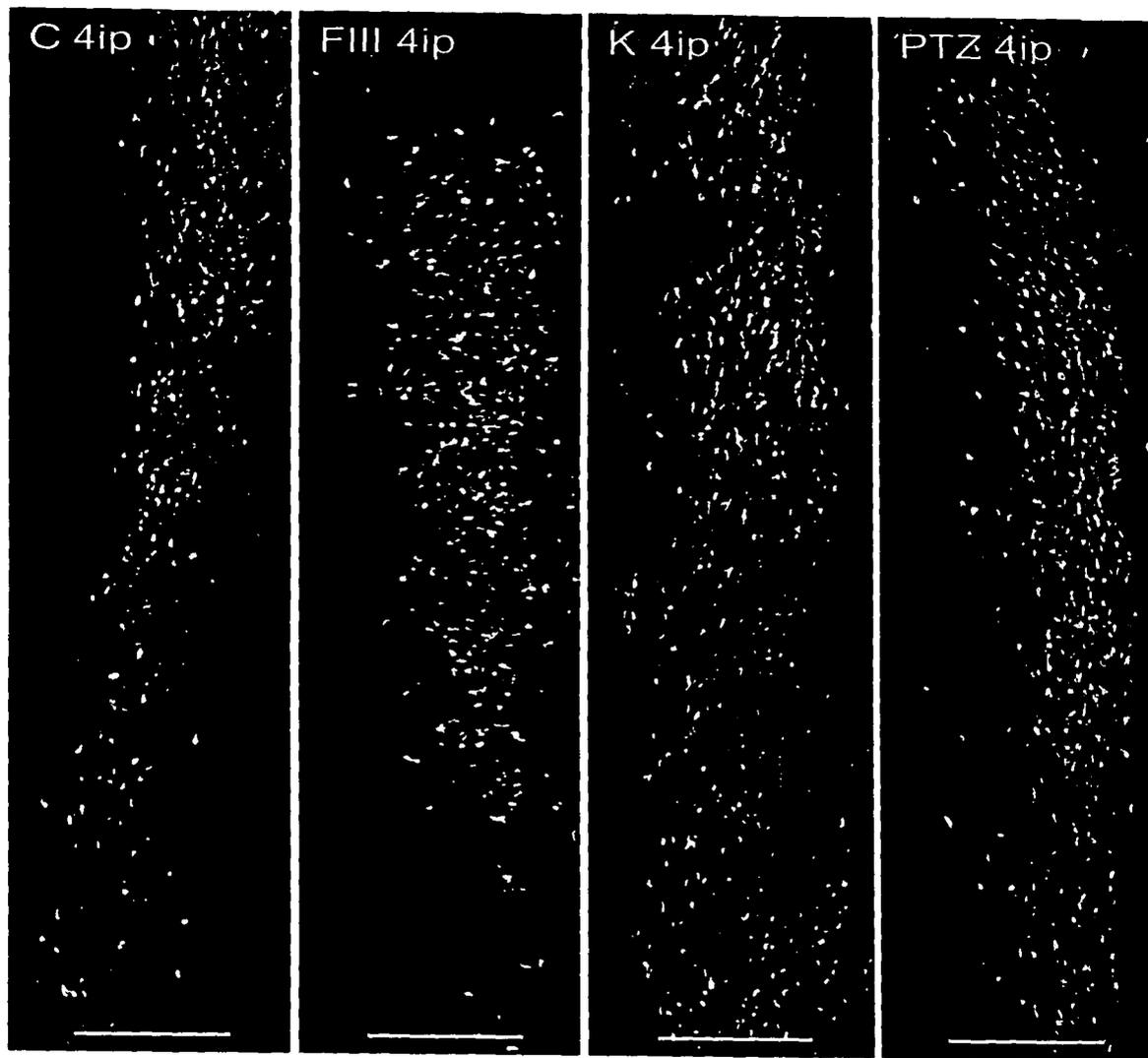


Figura 10. Fotomicrografía de cortes coronales de bulbo olfatorio. Se muestra la capa subependimal en la condición control (C), Fase III (FIII), Kindling (K) y PTZ (P) 4 días después de la administración i.p. de BrdU. Nótese el aumento en la cantidad de células marcadas después de alcanzar la Fase III de kindling y después de las CCG con respecto al control. La barra de calibración equivale a 100 μ m.

En la figura 11 se muestra el promedio del número de células marcadas de la capa subependimal de los distintos grupos experimentales procesados 8 días después de la inyección i.p. de BrdU. El grupo control tuvo 483.1 ± 14.87 células marcadas, el grupo "fase III", 734.8 ± 47.70 células, el grupo kindling, 606.3 ± 14.08 células y el grupo PTZ, 562.38 ± 11.17 células. Con respecto al grupo control, estos grupos presentaron un aumento de: $52.13 \pm 5.04\%$ para el grupo "fase III"; $25.52 \pm 0.98\%$ para el grupo "kindling"; el grupo "PTZ" presentó un incremento del $16.5 \pm 1.31\%$. Las diferencias entre el grupo control y los 3 experimentales y entre los grupos "fase III" y "kindling" fueron estadísticamente significativas $F = (1,10) 1153.043 = p < 0.00001$. En la figura 12 se muestran las fotomicrografías 8 días después de la administración i.p. de BrdU en las condiciones: control (C), fase III (FIII), "kindling" (K) y PTZ (P)

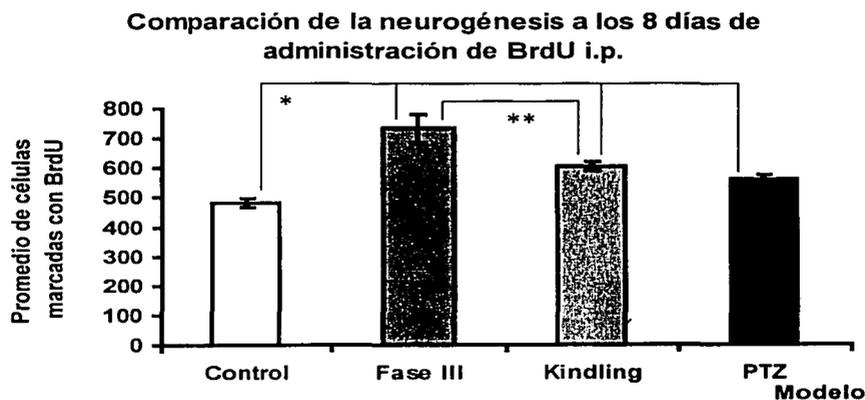


Figura 11. Histograma que muestra la media (\pm desviación estándar) de las células marcadas con BrdU después de 8 días de su administración intraperitoneal en la condición control, después de la estimulación hasta fase III, después de 5 crisis inducidas por "Kindling", y después de una crisis única inducida por PTZ. Cada barra equivale al número de células marcadas de 18 cortes histológicos promediados de 3 ratas. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos unidos por líneas. (* $\alpha < 0.00001$; ANOVA seguida por prueba post-hoc HSD de Tukey).

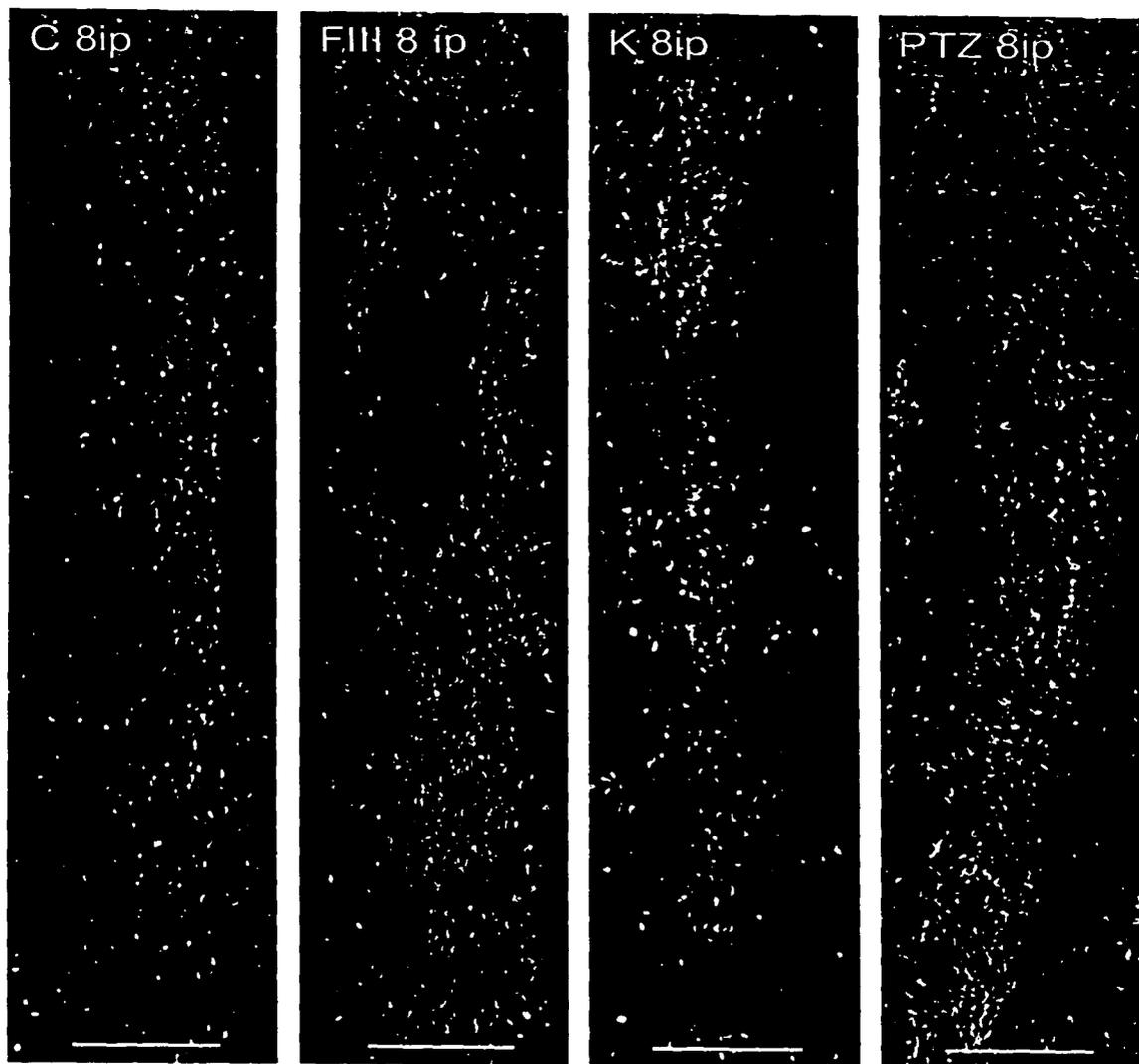


Figura 12. Fotomicrografía de cortes coronales de bulbo olfatorio. Se muestra la capa subependimal en la condición control (C), Fase III (FIII), Kindling (K) y PTZ (P) 8 días después de la administración i.p. de BrdU. La barra de calibración equivale a 100 μ m.

La neurogénesis fue mayor en todos los grupos experimentales comparados con el control. En los animales estimulados hasta alcanzar la fase III de kindling, el incremento observado a los 4 días se mantiene después de 8 días. Sin embargo, en los grupos después de una crisis inducida por PTZ o después de 5 crisis producidas por el "kindling", el incremento del 85% observado después de 4 días decayó para 8 días a solamente un 20% con respecto al control (figura 13).

Comparación del incremento de la neurogénesis con respecto al control para todas las condiciones.

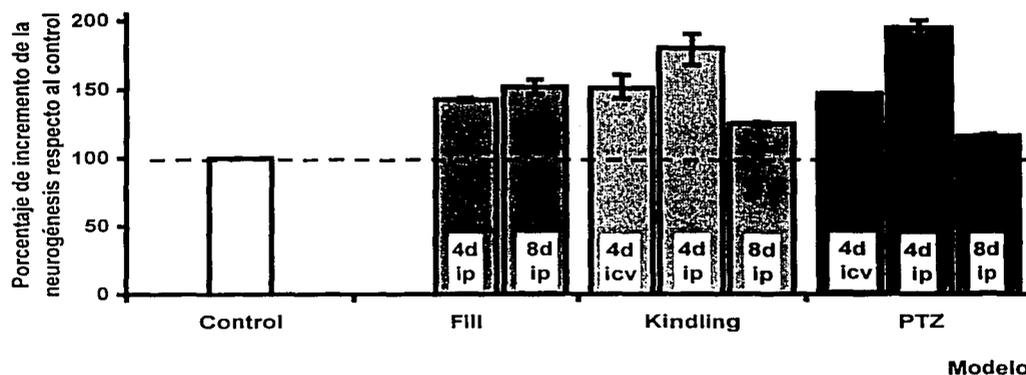


Figura 13. Histograma que muestra el incremento en la cantidad de células marcadas en cada condición experimental con respecto a la condición control. El control se consideró como el 100%. 4d y 8d indican el procesamiento del tejido 4 y 8 días después de la inyección intraperitoneal (ip) o intracerebroventricular (icv).

Capítulo 8 Discusión.

Nuestros resultados nos permiten concluir que las crisis convulsivas producen un aumento en el número de células marcadas con el marcador de división celular BrdU, que refleja un incremento de la neurogénesis del BO. Más aún, la estimulación eléctrica repetitiva de la amígdala del lóbulo temporal, que produce conductas epileptiformes sin producir crisis convulsivas generalizadas, produce también un incremento de la neurogénesis.

Las características de la marca con BrdU que se obtuvieron coinciden con las reportadas en la literatura (Miller y Nowakowski, 1988; Nowakowski y Rakic, 1989; Luskin, 1993).

La inyección intraperitoneal de BrdU permitió una mayor incorporación del marcador que la inyección intracerebroventricular, posiblemente debido a que la concentración administrada i.c.v. fue insuficiente comparada con los 100 mg/kg administrados i.p. Nosotros quisimos probar la efectividad de la inyección i.c.v por el hecho de que en la ZSV se originan las células que migran al BO. Bielb y col. (2000) inyectaron BrdU i.p. (200mg/kg) en ratas control, 4 días después hizo una cuantificación y extrapolación de toda la estructura y encontró aproximadamente 59,150 células marcadas en toda la estructura del BO, si nosotros extrapolamos los datos de las 203.7 ± 22.07 células multiplicadas por los 100 cortes que tiene el bulbo obtenemos un resultado similar con 20,370 células con la mitad de la dosis de BrdU administrado.

El número de células marcadas a los 8 días en la condición control fue mayor que a los 4 días en un 137.2 ± 20.6 %, como se mostró en la figura 5. Este incremento se debe a que la marca de BrdU se mantiene durante las siguientes divisiones mitóticas, por lo que el efecto es acumulativo (Miller y Nowakowski, 1988; Nowakowski y Rakic, 1989). Podemos suponer que la neurogénesis control mantiene una tasa de proliferación constante.

Se sabe que la estimulación diaria de la amígdala culmina en CCG, mediante un aumento progresivo de la excitación del cerebro (Goddard y col. 1969). De acuerdo con esto, observamos que la estimulación diaria de la amígdala, hasta alcanzar el estadio III de "kindling", produjo un aumento del

número de células BrdU-positivas con respecto a los animales no estimulados y al terminar el procedimiento de "kindling" el número de células positivas era aún mayor. Es decir, se incrementó la cantidad de células marcadas de acuerdo al incremento en la epileptización de los sujetos experimentales.

El análisis de proliferación neuronal 4 y 8 días después del último estímulo eléctrico de la amígdala (con y sin crisis) y de la crisis inducida por PTZ reveló diferencias, de acuerdo al tratamiento, en la tasa de proliferación. En el grupo estimulado hasta alcanzar la "fase III", el aumento observado a los 8 días fue similar al observado a los 4 días. Sin embargo, en el grupo "kindling" observamos que el incremento en el número de células BrdU positivas fue del $80.52 \pm 12.4\%$ después de 4 días mientras que después de 8 días fue de $25.52 \pm 0.98\%$ (figura 13). Esto sugiere que las crisis convulsivas inducen un incremento inicial en la neurogénesis que parece no ser sostenido en el tiempo al cesar las crisis. Experimentos realizados en hipocampo muestran que las CCG también inducen un incremento en la neurogénesis de las células granulares, que es elevado en la primera semana y que se reduce después de 10 días sin estimulación del sistema (Parent y col. 1998 y 1999; Nakagawa y col. 2000; Cameron y col. 1998; Scharfman y col. 2000; Sankar y col. 2000; Gray y Sundstrom, 1998). En este sentido, Parent y col (1997 y 1998) han sugerido que el número total de descargas de crisis generalizadas es crítico para estimular la proliferación en el giro dentado. Nosotros encontramos que una sola crisis convulsiva es suficiente para generar un incremento significativo de la neurogénesis en el BO, pero este aumento tampoco se mantuvo a lo largo del tiempo, como se muestra en la figura 10; y es interesante que una sola crisis convulsiva generalizada inducida por PTZ produzca un incremento de las células inmunorreactivas a BrdU similar al observado después de 5 CCG. Además, nuestros resultados coinciden con el reporte de Parent y col. (2002) donde después de una CCG inducida por pilocarpina provoca una mayor proliferación celular en la ZSV que terminan su migración en el BO, que nosotros observamos también después de CCG. Una sola crisis convulsiva provocada por PTZ implica una inhibición de la inhibición de todo el sistema

(Huang y col. 2001), o desinhibición, que produce crisis convulsivas y éste es un modelo de CCG que no implica la existencia de un estado epiléptico.

Una explicación del por qué se observa mayor neurogénesis en los animales estimulados sin CCG (experimentos de fase 3) que en los animales con crisis convulsivas inducidas por Kindling o PTZ, pudiera ser el que las crisis convulsivas dañen a las células recién formadas. De hecho, se ha observado que muchas células granulares en el BO se pierden después de un corto tiempo de supervivencia (Kato y col. 2001a). Es entonces posible que las CCG modifiquen el tiempo de supervivencia de estas células.

Nuestras observaciones muestran que el BO, al igual que la otra zona del SNC donde hay neurogénesis —el GD del hipocampo— presenta un incremento de la neurogénesis (Sutula y col. 1988; Scharfmann y col. 2000; Adams y col. 1997), posiblemente como un fenómeno reactivo asociado al incremento de la excitabilidad producido por la estimulación eléctrica y química que conduce a crisis convulsivas.

La ZSV genera células precursoras que migran hacia el BO (Luskin, 1993; Lois y Alvarez-Buylla, 1993; Lois y Alvarez-Buylla, 1994, Kirschenbaum y col. 1999). Las células llegan a la capa subependimal y posteriormente migran radialmente a las capas exteriores del BO. Nosotros encontramos que las células inmunoreactivas estuvieron restringidas a la capa subependimal del BO después de 4 días de haber sido marcadas, como se observa en la figura 9, posiblemente porque acababan de migrar de la ZSV. Ésto coincide con reportes previos que sugieren que 4 días no son suficientes para que las células se desplacen a la capa granular y subsiguientes del BO (Betarbet y col. 1997; Luskin, 1993; Lois y Alvarez-Buylla, 1994). Tampoco es suficiente éste tiempo para que se maduren las células, ya que el proceso de maduración requiere más de 20 días (Dash y col. 2001; Betarbet y col. 1997).

En nuestro estudio se sugiere que las crisis o la inducción de hiperexcitabilidad del SNC favorecen la neurogénesis del BO. Si bien estos datos no permiten valorar el aporte de un posible incremento en la velocidad de la migración celular desde la ZSV, demuestran que finalmente hay un mayor número

de células en el BO después del establecimiento de un estado de hiperexcitabilidad. Sin embargo, el simple aumento de la velocidad de migración podría descartarse ya que la tasa de migración es normalmente de 0.7mm/día (Luskin, 1993; Lois y Alvarez-Buylla, 1993) y nuestras observaciones muestran que a los 8 días las células inmunorreactivas a BrdU permanecen en la capa subependimal en todos los grupos experimentales.

Se sabe que los progenitores en hipocampo se diferencian finalmente en 95% neuronas y 5% de glia (Cameron y col. 1993). En el BO, las células terminan su migración en la capa de células granulares y en la capa periglomerular. Después de 3 semanas, aproximadamente el 59% de las células de la capa granular y el 51% de la periglomerular son inmunorreactivas a GABA (Betarbet y col. 1997; Bayer, 1993; Kato y col. 2001a) y 76.9% de las células periglomerulares presentan calretinina. Dash y col (2001) encontraron que el 65% de las células con BrdU presentaron colocalización con el marcador neuronal TOAD-64 después de daño físico.

Suhonen y col. (1996) mostraron que células progenitoras de hipocampo de rata injertadas en la vía migratoria rostral migraron a la zona subependimal en un 73%, algunas a la capa de células granulares del BO (19%) y pocas (8%) a la capa glomerular después de una semana.

La neurogénesis en el BO del adulto seguramente tiene algún papel funcional. Nuestro diseño experimental no nos permite saber si la proliferación provocada por CCG tiene una función activa en el proceso olfativo, sin embargo es posible que las crisis produzcan algún cambio en la capacidad olfatoria. Esta idea es consistente con las observaciones que muestran que la neurogénesis en el BO tiene implicaciones en la discriminación de olores y ésto es dependiente de la migración neuronal (Gheusi y col. 2000).

Capítulo 9 Conclusiones:

La neurogénesis en el BO se aumenta al incrementar el estado de excitabilidad del sistema.

La estimulación del sistema límbico (kindling) produce un incremento progresivo de la excitabilidad del SNC y éste coincide con un incremento de la neurogénesis, aún antes de presentarse crisis convulsivas. Más aún, una sola crisis convulsiva generalizada (inducida por PTZ) provoca el mismo efecto en la proliferación que 5 crisis convulsivas inducidas por kindling.

Concluimos que el incremento de la neurogénesis en el BO puede ser un proceso reactivo al incremento de excitabilidad del SNC. Esto implica que el incremento de actividad de la zona neurogénica no depende de que la estructura esté directamente involucrada en la generación de la actividad epileptiforme.

Referencias

- Aberg, M.A., Aberg, N.D., Hedbäcker, H., Orsarsson, J., Eriksson, P.S. Periferal infusion of IGF-I selectively induces neurogenesis in the adult rat hippocampus. *J. Neurosci.* 20:2896-2903, 2000.
- Adams, B., Sazgar, M., Osehobo, P., Van der Zee, C., Diamond, J., Fahnestock, M., Racine, R.J. Nerve growth factor accelerates seizure development, enhances mossy fiber sprouting, and attenuates seizure-Induced decreases in neuronal density in the kindling model of epilepsy. *J. Neurosci.* 17: 5288-5296, 1997.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Keith, R., Watson, J. *Molecular biology of the cell.* 3rd edition. Garland Publishing Inc. New York & London. 1994.
- Altman, J., Bayer, S.A. Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods. *J. Comp. Neurol.* 301: 365-381, 1990.
- Altman, J., Das, G.D. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. 1.A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in neonate rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions. *J Comp Neurol.* 126:337-89. 1966.
- Alvarez-Buylla, A., Kirn, J.R. Birth, migration, incorporation, and death of vocal control neurons in adult songbirds. *J Neurobiol.* 33:585-601, 1997.
- Angevine, J.B. Time of neuron origin in the hippocampal region. An autoradiographic study in the mouse. *Exp Neurol. Suppl.* 2:1-70, 1965.

Arvidsson, A., Kokaia, Z., Lindvall, O. N-methyl-D-aspartate receptor-mediated increase of neurogenesis in adult rat dentate gyrus following stroke. *Eur.J.Neurosci.* 14:10-18, 2001.

Babb, T.L., Kupfer, W.R., Pretorius, J.K., Crandall, P.H., Levesque, M.F. Synaptic reorganization by mossy fibers in human epileptic fascia dentata. *Neuroscience* 42:351-63, 1991.

Bayer, S.A. Quantitative 3H-Thymidine radiographic analyses of neurogenesis in the rat amygdala. *J.Comp.Neurol.* 194:845-875, 1980.

Bayer, S.A. H-Tymidine-radiographic studies of neurogenesis in the rat olfactory bulb. *Exp. Brain.Res.* 50:329-340, 1983.

Bayer, S.A., Yackel, J., Puri, P. Neurons in the rat dentate gyrus granular layer substantially increase during juvenile and adult life. *Science* 216:890-892, 1982.

Betarbet, R., Zigova, T., Bakay, R.A.E., Luskin, B. Dopaminergic and Gabaergic interneurons of the olfactory bulb are derived from the neonatal subventricular zone. *Int.J.Dev.Neurosci.* 14:921-930, 1997.

Biebl, M., Cooper, C.M., Winkler, J., Kuhn, H.G. Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain. *Neurosci.Lett.* 291:17-20, 2000.

Boonstra, R., Galea, L., Matthews, S., Wojtowics, J.M. Adult neurogenesis in natural populations. *Can.J.Physiol.Pharmacol.* 79:297-302, 2001.

Cameron, H.A., Woolley, C.S., McEwen, B.S., Gould, E. Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neurosci.* 56:337-344, 1993.

Cameron, H.A., Tanapat, P., Gould, E. Adrenal steroids and N-methyl-D-aspartate receptor activation regulate neurogenesis in the dentate gyrus of adult rats through a common pathway. *Neurosci.* 82:349-354, 1998.

Cameron, H.A., McKay, R.D. Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J.Com.Neurol.* 435:406-417, 2001.

Cavazos, J.E., Sutula, T.P. Progressive neuronal loss induced by kindling: a possible mechanism for mossy fiber synaptic reorganization and hippocampal sclerosis. *Brain Res.* 527:1-6, 1990.

Crespo, D., Stanfield, B.B., Cowan, W.M. Evidence that late-generated granule cells do not simply replace earlier formed neurons in the rat dentate gyrus. *Exp.Brain.Res.* 62:541-548, 1986.

Dash, P.S., Mach, S.A., Moore, A.N. Enhanced neurogenesis in the rodent hippocampus following traumatic brain injury. *J.Neurosci.Res.* 63:313-319, 2001.

Davenport, C.J., Brown, W.J., Babb, T.L. Sprouting of GABAergic and mossy fiber axons in dentate gyrus following intrahippocampal kainate in the rat. *Exp. Neurol.* 109:180-190, 1990.

Derrick, B.E., York, A.D., Martinez, Jr. J.O. Increased granule cell neurogenesis in the adult dentate gyrus following mossy fiber stimulation sufficient to induce long-term potentiation. *Brain Res.* 857:300-307, 2000.

Doetsch, F., Caille, I., Lim, D.A., García-Verdugo, J.M., Alvarez-Buylla, A. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97:703-716, 1999.

Doetsch, F., García-Verdugo, J.M., Alvarez-Buylla, A. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J. Neurosci.* 17:5046-5061, 1997.

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

Farbman, A. Olfactory neurogenesis: genetic or enviromental controls? *Trends Neurosci.* 13:362-365, 1990.

Fuchs, E., Gould, E. Mini-review: in vivo neurogenesis in the adult brain: regulation and functional implications. *Eur.J.Neurosci.* 12:2211-2214, 2000.

Gage, F.H., Kempermann, G., Palmer, T.D., Peterson, D.A., Jasodhara, R. Multipotent progenitor cells in the dentate gyrus. *J.Neurobiol.* 36:249-266, 1998.

García-Verdugo, J.M., Doetsch, F., Wichterle, H., Lim, D.A., Alvarez-Buylla, A. Architecture and cell types of the adult subventricular zone: in search of the stem cells. *J.Neurobiol.* 36:234-248. 1998.

Gheusi, G., Cremer, H., McLean, H., Chazal, G., Vincent, J.D., Lledo, P.M. Importance of newly generated neurons in the adult olfactory bulb for odor discrimination. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 97:1823-1828, 2000.

Goddard, G.V., McIntyre, D.C., Leech, C.K. A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. *Exp.Neurol.*25:295-330, 1969.

Goddard, G.V., McNaughton, B.L., Douglas, R.M., Barnes, C.A. Synaptic change in the limbic system: evidence from studies using electrical stimulation with and

without seizure activity. From *Limbic mechanisms* Plenum Publishing Corporation 1978.

Goldman, S.A., Nottebohm, F. Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* 80:2390-2394, 1983.

Gombos, Z., Spiller, A., Cottrell, G.A., Racine, R.J., Burnham, W.M. Mossy fiber sprouting induced by repeated electroconvulsive shock seizures. *Brain Res.* 844: 28-33, 1999.

Gould, E., Tanapat, P. Lesion-induced proliferation of neuronal progenitors in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* 80:427-436, 1997.

Gould, E., Reeves, A.J., Fallah, M., Tanapat, P., Gross, C.G., Fuchs, E. Hippocampal neurogenesis in adult old world primates. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 96:5263-5267, 1999b.

Gould, E., Tanapat, P., McEwen, B.S., Flugge, 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.* 95:3168-71, 1998.

Gould, E., Cameron, H.A., Daniels, D.C., Woolley, C.S., McEwen, B.S. Adrenal hormones suppress cell division in the adult rat dentate gyrus. *J.Neurosci.* 12:3642-3650, 1992.

Gould, E., Beylin, A., Tanapat, P., Reeves, A., Shors, T.J. Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat.Neurosci.* 2:260-265, 1999a.

Gray, W.P., Sundstrom, L.E. Kainic acid increases the proliferation of granule cell progenitors in the dentate gyrus of the adult rat. *Brain Res.* 790:52-59, 1998.

Gritti, A., Bonfanti, L., Doetsch, F., Caille, I., Alvarez-Buylla, A., Lim, D.A., Galli, R., Garcia-Verdugo, J.M., Herrera, D.G., Vescovi, A.L. Multipotent neural stem cells reside into the rostral extension and olfactory bulb of adult rodents. *J.Neurosci.* 22:437-445, 2002.

Haydar, T., Wang, F., Schwartz, M.L., Rakic, P. Differential modulation of proliferation in the neocortical ventricular and subventricular zones. *J.Neurosci.* 20:5764-5774, 2000.

Herzog, C., Otto, T. Regeneration of olfactory receptor neurons following chemical lesion: time course and enhancement with growth factor administration. *Brain Res.* 849:155-161, 1999.

Hinds, J.W. Autoradiographic study of histogenesis in the mouse olfactory bulb. I. Time of origin of neurons and neuroglia. *J.Comp.Neurol.* 134:287-322, 1967.

Huang, R.Q., Bell-Horner, C.L., Dibas, M.I., Covey, D.F., Drewe, J.A., Dillon, G.H. Pentylentetrazole-induced inhibition of recombinant gamma-aminobutyric acid type A (GABA(A)) receptors: mechanism and site of action. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 298:986-95, 2001.

Houng, P.L., Kolk, A.H., Eggelte, T.A., Verstijnen, C.P., Gilis, H., Hendriks, J.T. Measurement of antigen specific lymphocyte proliferation using 5-bromo-deoxyuridine incorporation. *J.Immun.Meth.* 140:243-248, 1991.

Kaplan, M.S., Hinds, J.W. Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science* 197:1092-1094, 1977.

Kaplan, M.S., McNelly, N.A., Hinds, J.W. Population dynamics of adult-formed granule neurons of the rat olfactory bulb. *J.Comp.Neurol.* 239:117-25, 1985.

Kato, T., Yokouchi, K., Fukushima, N., Kawagihi, K., Li, Z., Moriizumi, T. Continual replacement of newly-generated olfactory neurons in adult rats. *Neurosci.Lett.* 307:17-20, 2001a.

Kato, K., Takahiro, M., Tawara, Y., Kobayashi, K., Oka, T., Okabe, A., Shiodaka, S. Dendritic aberrations in the hippocampal granular layer and the amygdalo-hippocampal area following kindled-seizures. *Brain Res.* 901:281-295, 2001b.

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

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

Kirschenbaum, B., Doetsch, F., Lois, C., Alvarez-Buylla, A. Adult subventricular zone neuronal precursors continue to proliferate and migrate in the absence of the olfactory bulb. *J.Neurosci.* 19:2171-2180, 1999.

Kornack, D.R., Rakic, P. Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 96:5768-73, 1999.

Kuhn, H.G., Dickinson-Anson, H., Gage, F.H. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J.Neurosci.* 16:2027-2033, 1996.

Liu, J., Solway, K., Messing, R.O., Sharp, F.R. Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils. *J.Neurosci.* 18:7768-7778, 1998.

Lois, C., Alvarez-Buylla, A. Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* 90:2074-2077, 1993.

Lois, C., Alvarez-Buylla, A. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 264:1145-8, 1994.

Luskin, M.B. Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron* 11:173-89, 1993.

Mackay-Sim, A., Chuah, M.I. Neurotrophic factors in the primary olfactory pathway. *Prog. Neurobiol.* 62:527-559, 2000.

Magavi, S.S., Leavitt, B.R., Macklis, J.D. Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. *Nature* 405:951-955, 2000.

Magaud, J.P., Sargent, T., Mason, D.Y. Detection of human white cell proliferative responses by immunoenzymatic measurements of bromodeoxyuridine uptake. *J.Immunol.Meth.* 106:95, 1988.

McIntyre, D.C., Racine, R.J. Kindling mechanisms: current progress on an experimental epilepsy model. *Prog. Neurobiol.* 27:1-12, 1986.

Migheli, A., Mocellini, C., Giordana, M.T. Ultrastructural detection of DNA-incorporated bromodeoxyuridine in resin embedded brain tissue. *Histochemistry* 95:491-494, 1991.

Miller, M.W., Nowakowski, R.S. Use of bromodeoxyuridine-immunohistochemistry to examine the proliferation, migration and time of origin of cells in the central nervous system. *Brain Res.* 457:44-52, 1988.

Nakagawa, E., Aimi, Y., Yasuhara, O., Tooyama, I., Shimada, M., McGeer, P.L., Kimura, H. Enhancement of progenitor cell division in the dentate gyrus triggered by initial limbic seizures in rat models of epilepsy. *Epilepsia* 41:10-18, 2000.

Newman, M.P., Féron, F., Mackay-sim, A. Growth factor regulation of neurogenesis in adult olfactory epithelium. *Neurosci.* 99:343-350, 2000.

Nilsson, M., Perfilieva, E., Johansson, U., Orwar, O., Eriksson, P.S. Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory. *J. Neurobiol.* 39:569-578; 1999

Nowakowski, R.S., Lewin, S.B., Miller, M.W. Bromodeoxyuridine immunohistochemical determination of the lengths of the cell cycle and the DNA-synthetic phase for an anatomically defined population. *J.Neurocytol.* 18:311-318, 1989.

Parent, J.M., Yu, T., Leibowitz, R., Geschwind, D., Sloviter, R., Lowenstein, D. Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *J.Neurosci.* 17:3727-3738, 1997.

Parent, J.M., Janumpalli, S., McNamara, J., Lowenstein, D. Increased dentate granule cell neurogenesis following amygdala kindling in the adult rat. *Neurosci.Lett.* 247:9-12, 1998.

Parent, J.M., Tada, E., Fike, J.R., Lowenstein, D.H. Inhibition of dentate granule cell neurogenesis with brain irradiation does not prevent seizure-induced mossy fiber synaptic reorganization in the rat. *J.Neurosci.* 19:4508-4519, 1999.

Parent, J.M., Valentin, V.V., Lowenstein, D.H. Prolonged seizures increase proliferation neuroblast in the adult rat subventricular zone-olfactory bulb pathway. *J.Neurosci.* 22:3174-3188, 2002

Paxinos, G., Watson, C. The rat brain in stereotaxic coordinates, San Diego, Academic Press. 1997.

Pollard, H., Bugra, K., Khrestchatisky, M., Represa, A., Ben-Ari, Y. Seizure-induced molecular changes, sprouting and synaptogenesis of hippocampal mossy fibers. *Epilepsy.Res.Suppl.* 12:355-63, 1996.

Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Katz, L.C., Lamantia, A.S., McNamara, J.O. Neuroscience. Sinaver Associates, Inc. Publishers. Massachusetts. 1997.

Racine, R.J. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephal.Clin.Neurophysiol.* 32: 281-294, 1972.

Ramón y Cajal, S. Degeneración y Regeneración. Ed Hafner, Vol II, pp 750, 1959.

Ramón y Cajal, S. Histologie du systeme nerveux. Instituto Ramón y Cajal, Madrid. Vol. 2. pp. 80-119. 1911 (1955).

Represa, A., Le Gall La Salle, G., Ben-Ari, Y., Hippocampal plasticity in the kindling model of epilepsy in rats. *Neurosci.Lett.* 99:345-350, 1989.

Represa, A., Niquet, J., Pollard, H., Khrestchatisky, M., Ben-Ari, Y. From seizures to neo-synaptogenesis: intrinsic and extrinsic determinants of mossy fiber sprouting in the adult hippocampus. *Hippocampus* 4:270-4, 1994.

Reynolds, B.A., Weiss, S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255:1707-10, 1992.

Rousselot, P., Nottebohm, F. Expression of polysialylated N-CAM in the central nervous system of adult canaries and its possible relation to function. *J.Comp.Neurol.* 356:629-40, 1995.

Sankar, R., Shin, D., Liu, H., Katsumori, H., Wasterlain, C.G. Granule cell neurogenesis after status epilepticus in the immature rat brain. *Epilepsia* 41(supl.6):S53-S56, 2000.

Scharfman, H., Goodman, J., Sollas, A. Granule-like neurons at the hilar/CA3 border after status epilepticus and their synchrony with area CA3 pyramidal cells: functional implications of seizure-induced neurogenesis. *J.Neurosci.* 20:6144-6158, 2000.

Scott, B.W., Wang, S., Burnham, W.M., De Boni, U, Wojtowicz, J.M. Kindling-induced neurogenesis in the dentate gyrus of the rat. *Neurosci.Lett.* 248:73-76, 1998.

Scoville, W.B., Milner, B. Loss of recent memory after bilateral hippocampus lesions. *J.Neurol.Psychiatry.* 20:11-21,1957.

Shors, T.J., Miesegaes, G., Beylin, A., Zhao, M., Rydel, T., Gould, E. Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature* 410:372-375, 2001.

Sloviter, R. Calcium-binding protein (Calbindin-D_{28k}) and Parvalbumin immunocytochemistry: Localization in the rat hippocampus with specific reference to the selective vulnerability of hippocampal neurons to seizure activity. *J.Comp.Neurol.* 280:183-196, 1989.

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

Squire, L.R. The hippocampus and spatial memory. *Trends Neurosci.* 16:56-57, 1993.

Stanfield, B.B., Trice, J.E. Evidence that granule cells generated in the dentate gyrus of adult rats extend axonal projections. *Exp. Brain Res.* 72:399-406, 1988.

Stock, H.S., Hand, G.A., Ford, K., Wilson, M. Changes in defensive behaviors following olfactory bulbectomy in male and female rats. *Brain Res.* 903:242-246, 2001.

Suhonen, J., Peterson, D.A., Ray, J., Gage, F.H. Differentiation of adult hippocampus-derived progenitor into olfactory neurons in vivo. *Nature* 383:624-627, 1996.

Sutula, t., He, X., Cavazos, J., Scott, G., Synaptic reorganization in the hippocampus induced by abnormal functional activity. *Science* 239:1147-1150, 1988.

Trent, J.M., Gerner, R., Broderick, R., Crossen, P.E. Cell cycle analysis using bromodeoxyuridine: comparison of methods for analysis of total cell transit time. *Cancer Genet. Cytogenet.* 19:43-50, 1986.

Van der Zee, C.E., Rashid, K., Le, K., Moore, K.A., Stanis, J., Diamond, J., Racine, R.J., Fahnstock, M. Intraventricular administration of antibodies to nerve growth factor retards kindling and blocks mossy fiber sprouting in adult rats. *J. Neurosci.* 15:5316-5323, 1995.

Van Praag, H., Christie, B.R., Sejnowski, T.J., Gage, F.H. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:13427-31, 1999.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Vicario-Abejón, C., Collin, C., Tsoulfas, P., McKay, R.D.G. Hippocampal stem cells differentiate into excitatory and inhibitory neurons. *Eur.J.Neurosci.* 12:677-688, 2000.

Wada, J.A., Mizoguchi, T., Osawa, T. Secondarily generalized convulsive seizures induced by daily amygdaloid stimulation in rhesus monkeys. *Neurology* 28:1026-36, 1978.

Zigova, T., Pencea, V., Wiegand, S.J., Luskin, M.B. Intraventricular administration of BDNF increases the number of newly generated neurons in the adult olfactory bulb. *Moll.Cel Neurosci.* 11:234-245, 1998.