



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE PSICOLOGÍA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

**EVALUACIÓN DE LA REORGANIZACIÓN ANATOMO-
FUNCIONAL DEL GIRO DENTADO DESPUÉS DE UNA LESIÓN
EXCITOTÓXICA: PAPEL DE LA NEUROGÉNESIS**

TESIS

Que para obtener el título de

Licenciada en psicología

P R E S E N T A

ANDREA AGUILAR ARREDONDO

DIRECTORA: DRA. ANGÉLICA ZEPEDA RIVERA



Ciudad Universitaria, México D.F

Agosto, 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría, en este espacio, dedicar este trabajo a los que me ayudaron y acompañaron en el camino:

A ti porque nadie sufrió más este trabajo, pero tampoco nadie lo disfruto más que tú.

A mi familia. Mamá, gracias por ser un ejemplo en mi vida, por tu comprensión y apoyo constante, eres el faro que alumbra mi camino y la mujer más sabia que conozco, gracias por ser mi amiga y confidente. Papá, gracias por ser ejemplo de constancia y dedicación, tu apoyo siempre está más allá de las palabras, eres un pilar esencial para mí, gracias por mostrar interés por mi trabajo y por escucharme cuando hablé de él. Adi, más que mi hermana eres una maestra de vida y mi mejor amiga, gracias por el apoyo, las palabras, los abrazos cuando se necesitan, tu presencia en los momentos más difíciles y por las bofetadas mentales cuando no sobran, no hay nadie que me conozca mejor que tú, eres la persona que más me importa y quiero en este mundo *"But you know I could stay here all night, and watch the clouds fall from the sky, because this river is wild"*... gracias por ser mi barca. Ale, gracias por siempre ser sincera y por ayudarme a encontrar la mejor solución cuando no la veo, te admiro mucho, siempre que me encuentro en una disyuntiva me pregunto qué harías tú... nunca me sale, pero por lo menos lo intento, no tengo tu fuerza de voluntad. Toño, llegaste a ser lo que jamás pensé que serías: mi hermano mayor (jejeje) y un confidente siempre honesto, gracias por ayudarme a entender a los hombres, por hacerme reír con tu risa cuando estoy mal y por escucharme. Los quiero mucho, sin ustedes no estaría donde estoy, ni sería lo que soy.

A mi tía Elvia por interesarse en mi trabajo, y más aún, por preguntarme acerca de él. A mi prima Tali por hacerme cuidar más a mis animales bajo amenaza de ir a liberarlos en la noche (jejeje).

A todas las ratas de experimentación empleadas a lo largo de todo el proyecto.

A la Dra. Angélica Zepeda, gracias por la oportunidad que me diste al aceptarme como tu alumna en el laboratorio y por tu guía y fuerte dedicación a lo largo de este trabajo, me has inculcado el amor y compromiso por la investigación; gracias por llegar a ser más que mi asesora de trabajo, Ange, agradezco infinitamente las enseñanzas de vida que me has dado, los abrazos y consejos siempre atinados, eres un ejemplo de mujer para mí y te admiro mucho. A la Dra. Clorinda Arias, gracias por la confianza que me ha dado y por aceptarme en su laboratorio, ha sido de las experiencias más enriquecedoras que he vivido, gracias también por sus consejos como mujer cuando los necesitaba.

A Olinka, por ser mi amiga durante casi 12 años, por la confianza depositada en mi y por dejarme enseñarte mis miedos, secretos y dolores más grandes sin huir al verlos, eres como una hermana para mí; a veces me sorprendo de cuánto nos parecemos, te quiero mucho amiga.

Al codón. Laura y Sandy...bel, gracias por su apoyo académico y personal cuando era necesario y menos lo esperaba, por la confianza, por los consejos y por los momentos que hemos pasado juntas, son inolvidables y los guardo como un tesoro, las quiero; Lau prometo llevarte a un spa por las electros.

A todos mis compañeros del laboratorio. A Abril, gracias por ser mi compañera de sufrimiento en esto de la escritura, la titulada y de anhelar un trabajo en el que entremos a las 12, almorcemos hasta las 2:00, salgamos a comer a las 2:30 y regresemos a las 5:00 para platicar y finalmente salir a las 7:00. Y del pasillo 2, gracias a Eva, por emocionarte cada vez que te contaba que ya casi terminaba... y por decirme que tengo alucinaciones olfativas; en especial gracias a Adhemar por ser mi mejor amigo y confidente, por tus consejos, apoyo incondicional y constante, por las pláticas y discusiones en torno a nuestros proyectos y por dejarme

contarte cosas que no podría contarle a nadie más. A Miguel Sarabia por ser mi compañero al empezar esto, por el aprendizaje conjunto y la compañía los domingos a las 10pm para inyectar ratas, sin ti no me habría acercado al ese bioterio sin luz. A Josué por hacer mucho más llevaderas las tardes en su laboratorio, gracias por la fe que tienes en mí y en mi desarrollo profesional, me ayudas más de lo que crees, más aún que las canciones de la Gaga (jajajaja).

A la UNAM, porque es un orgullo ser parte de esta institución y en especial de la Facultad de Psicología. A toda la gente que conocí allí, a los dos que me acompañaron a lo largo de casi toda la carrera y que en su momento fueron un tremendo apoyo y mi motivo de seguir adelante sin importar los obstáculos; siempre recordaré las vivencias y agradezco lo que me hicieron crecer, a veces sin intención, profesional y personalmente.

A la Dra. Martha Escobar por tomarse el tiempo para enriquecer este trabajo y por haberme dado la oportunidad de mi primer acercamiento con las neurociencias. Al Dr. Vladimir Orduña, por las asesorías y el apoyo que conjuntamente mejoraron este trabajo y por la pasión puesta en sus clases que me contagiaron el interés y respeto por las ciencias de la conducta. Al Dr. Antonio Zainos, al Dr. Arturo Bouzas, al Dr. Gustavo Bachá y al Dr. Julio Espinosa por las ganas puestas al impartir sus cátedras que me hicieron interesarme, amar y respetar la ciencia y las neurociencias.

A Uriel. Mi querido y adorado Ulrich, hay un momento en la vida de una mujer en el que se pregunta acerca de su futuro y se sorprende a si misma planeando, es entonces cuando la sempiterna se torna cabalmente tangible y... *oye sa mama...* jajajaja. Amor, gracias por ser como eres y por estar ahí; por tu sinceridad, por darme paz y por preocuparte por mí, por las enseñanzas que me has dado incluso sin proponértelo, por arriesgarte a cumplir tus metas, por decidir amarme y compartir una parte de tu vida y sueños conmigo, por hacerme reir taaaanto (recuerda que me río contigo, no de ti... si Juan); te admiro mucho y me das inspiración, pichón te quiero mucho, espero que no nos cansemos pronto de nuestros chistes y de estar juntos... has sido una luz al final del túnel.

Por último, al muchacho de ojos verde esmeralda y cabello color azabache (y a su creadora, claro está), tu valor para defender lo justo, a la gente que amas y tu honestidad han sido el más grande ejemplo en los últimos 10 años, gracias por enseñarme y recordarme constantemente que los obstáculos los puedes saltar y que las pérdidas pueden doler, pero que nunca te deben detener.

Este trabajo se realizó en el departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, bajo la dirección de la Dra. Angélica Zepeda. El trabajo se llevó a cabo con el programa de apoyos de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico PAPIIT IN215609 y IN213210, del Instituto del Ciencia y Tecnología del Distrito Federal PIFUTP 09-294 y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología proyecto 60851. Agradecimientos para el Dr. Luis Vaca y Claudia Moreno por proporcionarnos y guiarnos en el uso del microscopio FV10; al técnico Miguel Tapia de la Unidad de Microscopia del IIB por la ayuda y guía en el uso del microscopio confocal BXSIWI y a Laura Elisa Ramos Languren por su importante colaboración en la realización de la evaluación electrofisiológica de este trabajo.

ÍNDICE

Resumen.....	3
Introducción.....	5
Caracterización de la Neurogénesis en GD del cerebro adulto.....	6
Estructura y función del GD.....	9
Neurogénesis en Nichos no neurogénico	10
Factores que modulan la neurogénesis.....	11
Neurogénesis después de daño (NID).....	12
Reorganización anatómica y funcional después de daño.....	13
Funcionalidad de la neurogénesis inducida por daño.....	13
Función del GD en el aprendizaje y la memoria.....	14
El ácido kaínico como inductor de muerte neuronal.....	15
Justificación.....	15
Objetivo General.....	15
Objetivos particulares.....	16
Hipótesis.....	16
Materiales y Método.....	16
Resultados.....	30
Discusión.....	42
Referencias.....	50

RESUMEN

La neurogénesis es un proceso de plasticidad cerebral que ocurre en los organismos durante el desarrollo, sin embargo desde hace poco se descubrió que también sucede en organismos adultos. Actualmente se sabe que hay dos zonas claramente definidas en las que tiene lugar este proceso, una de ellas es la zona subgranular del giro dentado (GD) del hipocampo el cual tiene una función conductual estrechamente asociada: la memoria contextual. El fenómeno de neurogénesis sucede de manera constitutiva, pero hay eventos que la modulan negativa o positivamente; el daño cerebral es un ejemplo de esta última. Después de un proceso de lesión, las estructuras del sistema nervioso central, incluyendo al GD tienden a reorganizarse. Debido a que esta estructura es un nicho neurogénico, en este trabajo se propuso evaluar el papel de la neurogénesis en su reorganización después de sufrir un daño y establecer un correlato funcional (conductual y electrofisiológico) con la reestructuración morfológica. Para ello, se realizó una lesión focal con ácido kaínico (AK) o una lesión sham al GD de ratas jóvenes-adultas y se analizó a los 10, 25 y 60 días posteriores a la lesión: 1) la morfología del GD con la tinción de Nissl y el volumen de la capa granular empleando el estimador Cavalieri, 2) el marcado inmunohistoquímico de neuronas jóvenes y neuronas maduras, así como de astrocitos en cortes de cerebro; 3) la capacidad de los sujetos para recordar un contexto aversivo y por último; 4) la posibilidad de inducir una Potenciación de Largo Plazo (LTP) *in vivo* en la vía que va del GD a la región CA3 del hipocampo. Los resultados muestran que a los 10 días después de la lesión, el GD de los sujetos lesionados presenta un adelgazamiento de la capa granular e interrupciones en la misma. Sin embargo a los 25 y 60 días después de la lesión los sujetos muestran un GD reorganizado y la prueba de Cavalieri arroja una recuperación en el volumen de la capa granular similar al de los sujetos control. El análisis inmunohistoquímico muestra que hay un incremento en células positivas a doblecortina (neuronas jóvenes) a los 10 días de realizada la lesión y ausencia de NeuN (neuronas maduras) en la región en la que se indujo el mismo daño, a los 25 días el nivel de doblecortina ha decrementado, sin embargo aún es mayor que a los 60 días y que a los niveles de

los sujetos control, no hallando diferencias entre estos dos últimos grupos. En la capa granular se observa una marca continua de NeuN a los 25 y 60 días post-lesión. En la evaluación conductual se observó que 10 días posteriores a la lesión, los sujetos mostraban deficiencias para recordar dentro de un contexto, un ambiente aversivo, mientras que a los 25 y 60 días post-lesión exhibían la recuperación de la conducta. Por último, se observó que en el grupo de 10 días post-lesión no se logró inducir LTP, pero si en los grupos de 25 y 60 días post-lesión. Los resultados indican que después de una lesión excitotóxica focal, el GD de ratas adultas es capaz de reorganizarse tanto morfológica, como funcionalmente a través del tiempo y que la neurogénesis puede jugar un papel importante en dicho proceso.

INTRODUCCIÓN

La neurogénesis se define como el proceso de generación de neuronas funcionales a partir de células progenitoras (Ming, 2005). Durante casi un siglo se mantuvo el dogma que afirmaba que en el cerebro adulto este proceso no existía y que solo sucedía en etapas tempranas del desarrollo; esto en gran parte fue reforzado por la concepción que se tenía de que las vías del sistema nervioso no podían modificarse: “Una vez terminado el desarrollo, las fuentes de crecimiento y regeneración de los axones y dendritas se agotan irrevocablemente. En el cerebro adulto las vías nerviosas son fijas e inmutables; todo puede morir, nada puede regenerarse” (S. Ramón y Cajal, 1928, p. 750 citado. en Brailowsky et al., 1992).

Sin embargo en los años '60 los trabajos pioneros de Altman y Das demostraron que en el cerebro adulto de ratas había proliferación de nuevas células (Altman y Das, 1965 y 1966). Posteriormente se comprobó que la neurogénesis sucedía en diferentes especies de roedores (Kaplan, et al 1977; Lois & Álvarez-Buylla 1993; Sharp, et al 2002), aves (Goldman, et al 1983; Álvarez-Buylla 1992) y también en primates (Gould, et al 1999b) incluido el humano (Eriksson, et al 1998).

El desarrollo de nuevas formas de marcaje de células en proliferación (como el uso de retrovirus o bromodeoxiuridina, un marcador de la fase S del ciclo celular) hizo posible el estudio de la neurogénesis en el cerebro adulto, la cual se lleva a cabo de forma constitutiva (Kempermann et al., 2003; García et al., 2004; Ehninger et al., 2008) en dos zonas específicas del cerebro: las paredes de los ventrículos laterales, región conocida como Zona Subventricular (ZSV) y en la capa subgranular del GD del hipocampo, área llamada Zona Subgranular (ZSG). Un porcentaje de las células que proliferan en la ZSV migran como neuroblastos a través de la vía rostral migratoria llegando al bulbo olfatorio donde se diferencian en interneuronas GABAérgicas y dopaminérgicas de tipo granular y perigranular, las cuales posteriormente se integran al circuito del bulbo olfatorio (Alvarez-Buylla, et al 2004). Por su lado, un porcentaje de las neuronas que nacen en la ZSG del GD maduran como células granulares y se integran al circuito hipocámpico (Kaplan y Hinds, 1977; Ramirez-Amaya et al, 2006). En la rata el

proceso de neurogénesis decremента hacia la etapa senescente, aún cuando persiste hasta los 11 meses de edad (Kaplan et al., 1984).

Los primeros estudios que demostraron que las nuevas neuronas tenían relevancia funcional fueron los estudios del grupo de Fernando Nottebohm realizados en aves (Goldman, 1983) y posteriormente van Praag lo demostró en mamíferos (2002).

En ratas, el 85% (alrededor de 600 000) de las células granulares del GD se generan entre las semanas 2 y 3 postnatales (Schlessinger et al., 1975), sin embargo cuando los roedores alcanzan los 4 meses de edad (jóvenes adultos) la cantidad se incrementa a poco más de 1 millón (Boss et al., 1985) manteniéndose en un constante incremento durante esta etapa (Bayer et al., 1982). Se ha demostrado que cerca de 9000 nuevas células se generan cada día y que de estas aproximadamente el 50% expresan marcadores neuronales 5-12 días después de su nacimiento, llegando a constituir el 6% del total de la capa granular del GD al mes de nacidas (Cameron y McKay 2001). Estas investigaciones sugieren fuertemente que el GD está constantemente reemplazando neuronas que sustituyen su población original. En condiciones fisiológicas se ha demostrado que el 70% de las nuevas células adquieren un linaje neuronal (Cameron et al., 1993); sin embargo esto no garantiza que puedan sobrevivir hasta el punto de integrarse al circuito al que pertenecen y servir como neuronas funcionales. En realidad se sabe que un gran porcentaje (cerca del 50%) de las nuevas células (marcadas con BrdU) mueren dentro de las primeras 4 semanas y un adicional 26% de ellas mueren entre 1-6 meses después de nacidas (Dayer et al., 2003). Solo un poco más del 2.8% de las nuevas neuronas logran llegar a una etapa de maduración neuronal e integración al circuito al que pertenecen sirviendo como neuronas funcionales (Ramírez-Amaya et al., 2006).

Caracterización de la neurogénesis en GD del cerebro adulto de la rata

Las células progenitoras neurales del GD se han identificado a partir de su morfología, capacidad proliferativa y expresión de marcadores (Seri et al., 2001;

para una revisión ver Kempermann 2004) y se localizan particularmente en la ZSG del GD del hipocampo (Nowakowski et al., 1989). Estas células constituyen una población de células progenitoras quiescentes y son de tipo radial, positivas a: la proteína fibrilar acídica glial (GFAP), propia de astrocitos; SOX2 que es un factor de transcripción fundamental para mantener la capacidad de autorenovación de las células indiferenciadas y nestina, una proteína de filamentos intermedios que se expresa de manera transitoria antes de iniciarse el proceso de diferenciación neuronal (células tipo 1) (Mu, 2010). Estas células generadas en la ZSG, pueden autorenovarse y generar a su vez astrocitos y progenitores no radiales autorenovadores que expresan SOX2 y nestina, pero no GFAP (células tipo 2). La progeñie de estas células son neuroblastos positivos a doblecortina (DCX) que es una proteína que promueve la polimerización de los microtúbulos de neuronas jóvenes; estas células suelen diferenciarse en células granulares ya maduras del GD que expresan proteínas propias de etapas de maduración neuronal como Calbindina (Calb) o la proteína nuclear neuronal (NeuN) (von Bohlen y Halbach, 2007).

Una proporción importante de las células que nacen en el GD adulto, mueren dentro de las primeras cuatro semanas a partir de su nacimiento y tanto su sobrevivencia como su desarrollo fisiológico y morfológico, depende de diversos mecanismos como la expresión de neurotransmisores y presencia de factores neurotróficos. Los neuroblastos que sobreviven adquieren un linaje neuronal y a medida que maduran extienden sus axones a través del hilus hacia la capa de células piramidales de CA3 del hipocampo y también extienden proyecciones y reciben aferentes de la corteza entorinal (ver sección *Estructura y función del GD*). Así, se ha demostrado que la madurez electrofisiológica de las nuevas células granulares ocurre en un periodo de 2 a 7 semanas después de la división celular, lo que finalmente conlleva a que formen parte de un circuito funcional (van Praag, et al 2002, Overstreet-Wadiche et al., 2006; Ge et al., 2006).

Las células granulares del GD del hipocampo forman parte del circuito trisináptico involucrado en el establecimiento de la potenciación de largo plazo (LTP por sus

siglas en inglés), un patrón de actividad cerebral que está asociado con el procesamiento de nueva información (Lynch et al., 1990). El análisis de este parámetro electrofisiológico es ampliamente utilizado como herramienta para el estudio de los mecanismos de almacenamiento de información y de comunicación sináptica en el Sistema Nervioso Central (SNC), pues estos implican cambios a distintos niveles moleculares y celulares que subyacen a la plasticidad sináptica asociada al aprendizaje y la memoria. Aunque se sabe que las conexiones que pueda generar una célula granular (como las sinapsis que establece con las proyecciones de las fibras musgosas) son de una elevada capacidad de reorganización, la adición de nuevas neuronas podría jugar un papel importante en el establecimiento de nuevos circuitos capaces de almacenar nuevas memorias (Palmer et al., 1995), o borrar las preexistentes para mantener la homeostasis de esta región cerebral que recibe constantemente información multimodal, según modelos computacionales (Chambers et al 2004, Deisseroth et al., 2004). La evaluación de la capacidad de un circuito para presentar LTP es un parámetro confiable para establecer su funcionalidad y grado de plasticidad.

Por otra parte, se ha encontrado que los progenitores neuronales pueden generar neuronas si se aíslan y trasplantan a regiones neurogénicas, incluso de un animal a otro, pero no sucede lo mismo si se trasplantan a regiones no neurogénicas (Gage et al., 1995; Suhonen et al., 1996), sugiriendo que tanto el nicho neurogénico (microambiente determinado que mantiene y regula el comportamiento de las células progenitoras), (revisado en Ma et al., 2009) como las propias células progenitoras, tienen características que contribuyen a determinar un linaje celular (Alvarez- Buylla, et al 2004).

A medida que las células recién nacidas van madurando, expresan diferentes proteínas y factores de transcripción que facilitan la identificación de la etapa de maduración en la que se encuentran, de hecho cada etapa tiene una duración más o menos específica y definida, en la cual estas proteínas y factores pueden emplearse como blancos de identificación por técnicas inmunohistoquímicas (Figura 1).

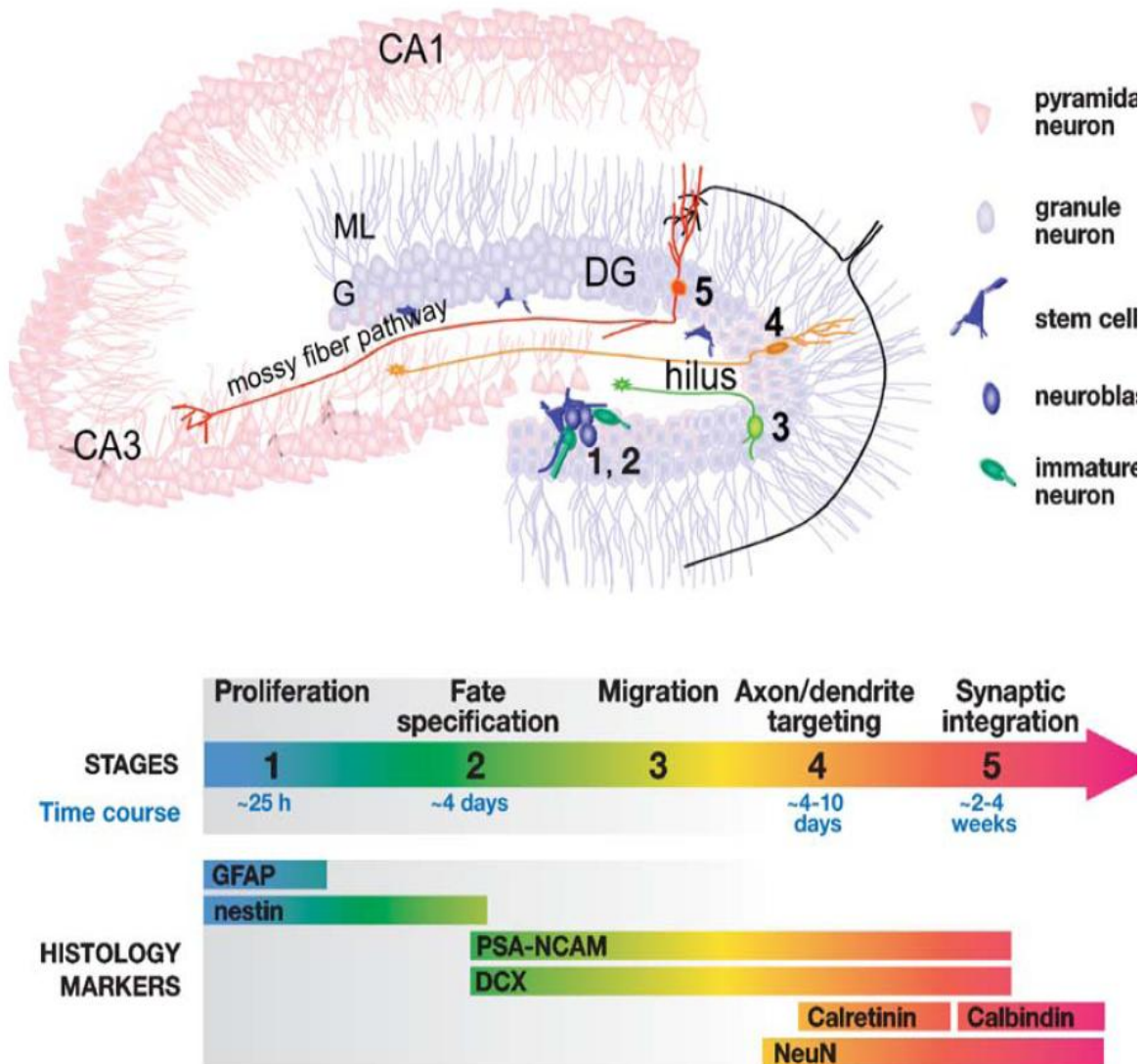


Figura 1. Marcadores histológicos propios de las diferentes etapas de maduración (indicados con los números) de las células granulares en el GD de la rata (tomado de Ming et al., 2005).

Estructura y función del Giro Dentado

El GD es una estructura trilaminar que se ubica debajo de la región CA1 del hipocampo. La capa más externa del GD es la molecular, que prácticamente está libre de células y es donde se encuentran las dendritas de las células granulares que reciben la información proveniente de la corteza entorinal a través de los axones que conforman la vía perforante. La capa media es la granular, que está compuesta de los cuerpos de las células granulares cuyos axones proyectan a la

región CA3 y por último, la capa más profunda es la capa polimórfica o hilus, que se compone de una gran variedad de tipos neuronales, siendo las más comunes las llamadas células musgosas cuyos axones proyectan a la capa molecular del GD ipsi y contralateral (Andersen P., 2007) siendo su blanco las dendritas de la región CA3 del hipocampo. Algunos grupos de investigación han postulado que la función del GD es organizar la información que se envía por medio de los axones de las células granulares hacia CA3 (revisado en Treves et al., 2008). Sugieren que el GD contribuye a separar los patrones de activación neuronales ya almacenados de aquellos que es necesario evocar en un momento dado, impidiendo que los patrones neuronales que se evocan interfieran con los almacenados. Se postula que duplica la información que la corteza entorinal envía a CA3 a través de la vía perforante, con la peculiaridad de que además involucra una separación anatómica, pues el GD es una estructura separada de CA3. Si un nuevo patrón de activación necesita ser almacenado en CA3, primero necesita ser codificado por el GD y después enviado como un patrón de activación a CA3; en otras palabras, el GD promueve la generación de nuevos patrones de activación sin interferir con los ya almacenados (para una revisión ver Treves et al., 2008).

Neurogénesis en nichos no neurogénicos

Aun cuando existe mucha evidencia acerca de neurogénesis en los nichos neurogénicos anteriormente mencionados, también existe literatura al respecto de proliferación y neurogénesis en zonas no neurogénicas. Varios trabajos muestran que en zonas como la neocorteza, el estriado, el séptum, la *sustancia negra* y la región CA1 del hipocampo, existe proliferación de nuevas células que logran diferenciarse en neuronas (Palmer et al. 1995; Palmer et al., 1999; Magavi et al., 2000; Zhao et al., 2003; Rietze et al., 2000; Nakatomi et al., 2002). Sin embargo, algunos grupos han buscado replicar estos resultados y no han podido demostrar la neurogénesis en estas regiones (Kornack et al., 2001; Bhardwaj et al., 2006).

Se ha reportado que es posible que exista otra zona neurogénica llamada la Zona Subcallosal (ZSC), la cual se ubica entre el hipocampo y el cuerpo calloso y se ha propuesto como un posible tercer nicho neurogénico, pues células aisladas de

esta zona cultivadas como neuroesferas se comportan como células progenitoras neuronales, mientras que en experimentos *in vivo* las células nacidas en la ZSC migran dentro del cuerpo caloso y se convierten en oligodendrocitos (Seri et al., 2006).

Factores que modulan la neurogénesis

Si bien como se ha descrito, la neurogénesis es un mecanismo que sucede de forma constitutiva y natural, existen condiciones que pueden promoverla o disminuirla, tales como la presencia de moléculas en el ambiente extracelular, (por ejemplo: factores neurotróficos, neurotransmisores), factores intrínsecos (por ejemplo: modulación de proteínas y genes reguladores como WNT, Notch, Sonic Hedgehog, etc) y mecanismos epigenéticos que no alteran la secuencia genómica, pero si producen modificaciones biológicas persistentes (por ejemplo: metilaciones, acetilaciones, etc.) que se reflejan en la tasa de nacimiento de neuronas (revisado en Ma et al., 2009 y 2010).

A nivel de manipulaciones conductuales, se ha documentado que el ejercicio físico (Kempermann et al., 1997; van Praag et al., 1999a, b, van Praag et al., 2000), así como la exposición a un ambiente enriquecido (van Praag et al., 2000 y Leal-Galicia et al., 2008) promueven un incremento en la neurogénesis de la ZSG, tanto en ratas adultas como en envejecidas y otro factor que promueve el incremento de la neurogénesis en el propio GD, es el mismo aprendizaje de tareas dependientes del hipocampo (Gould et al., 1999a).

Por otro lado, así como existen factores que promueven un incremento en la neurogénesis, también existen factores que la modulan de forma negativa, es decir, disminuyéndola. El estrés es uno de éstos, el cual se ha demostrado que disminuye los niveles de la neurogénesis afectando a la morfología y supervivencia de las neuronas, a través de la disminución de glucocorticoides, pues estos parecen actuar como factores tróficos en tiempos cortos (Gould 1990). Así mismo, la edad constituye un factor asociado a la disminución de la neurogénesis (Kuhn et al., 1996); sin embargo se ha podido demostrar que la

exposición a un ambiente enriquecido promueve que la neurogénesis disminuya de manera más lenta, pues ratas envejecidas expuestas durante un tiempo de vida prolongado a ambiente enriquecido poseen una tasa de neurogénesis más alta que ratas envejecidas o expuestas a un ambiente no enriquecido (Leal-Galicia et al., 2008). La tasa de nacimiento de neuronas es un proceso reversible al menos en condiciones experimentales.

De manera interesante también se ha observado que la proliferación celular y la neurogénesis incrementan después de diversos procesos de daño cerebral en múltiples modelos animales, como se revisará en la sección siguiente. Sin embargo, la implicación funcional de la neurogénesis en un proceso de daño nervioso aún no está clara.

Neurogénesis después de daño cerebral

La neurogénesis adulta representa una forma de plasticidad estructural nerviosa y en los últimos años ha tomado importancia como un posible mecanismo de neuroreparación. El estudio experimental de la neurogénesis posterior al daño del SNC se ha desarrollado a partir de modelos animales en los que se mimetizan algunas de las condiciones patológicas que suceden en los humanos. Así, se ha mostrado que como consecuencia de procesos isquémicos (Jin et al., 2001; Kawai et al., 2004), crisis epilépticas (Scharfman et al., 2000), trauma cerebral (Sun et al., 2007), excitotoxicidad (Gray et al., 1998; Dong et al., 2003; Hattiangady et al., 2008) y enfermedades neurodegenerativas (Höglinger et al., 2004, revisado en Steiner et al., 2006) hay una respuesta exacerbada de proliferación celular y de neurogénesis (revisado por Zepeda et al., 2009). Más allá de la proliferación misma, se ha reportado que las células que nacen después de una lesión, migran del nicho neurogénico a la zona de lesión (Masuda et al., 2007). Sin embargo, una de las preguntas que más interés genera en términos de la neurogénesis como un mecanismo de neuroreparación, es el potencial de las nuevas neuronas de reemplazar a las neuronas afectadas ya que hasta el momento los resultados obtenidos dejan dudas importantes en cuanto a la reorganización estructural del

área lesionada, aun cuando muestran que la conducta asociada a la región lesionada se restablece (Ohab et al., 2006; Kolb et al., 2007).

Resulta interesante mencionar que la neurogénesis que se observa después de un proceso de lesión ocurre principalmente en los nichos neurogénicos de la SZV y la ZSG.

Reorganización anatómica y funcional después de daño cerebral

Dentro del sistema nervioso central (SNC) existen estructuras cuyo funcionamiento está relacionado con una función particular, por lo que al sufrir daño, la función relacionada a la estructura lesionada se altera o se pierde. Los mecanismos de neuroreparación que se han descrito para el SNC abarcan modificaciones neuroquímicas y morfológicas de las células remanentes (Zepeda et al., 2004; Holopainen, 2008). Sin embargo, la neurogénesis ha sido recientemente postulada como un posible mecanismo de reparación del SN. A este respecto resultan particularmente interesantes los resultados que muestran que después de ocasionar una lesión excitotóxica en el GD existe un proceso de reorganización anatómica de la zona lesionada. (Dong et al., 2003; Ogita et al., 2005; Hernández-Ortega et al., 2007) y aquellos que muestran que después de un proceso isquémico en el que se daña CA1 y ante la presencia exógena de factores de crecimiento, se exagera el proceso de neurogénesis y se observa la mejora en un tipo de aprendizaje espacial asociado a la zona lesionada (Nakatomi et al., 2002). Sin embargo, los estudios que reportan reestructuración anatómica del GD, no evalúan la reorganización funcional y los estudios que han abordado esta última se han enfocado a valorar el potencial de algunos factores de crecimiento como promotores de la neurogénesis. Así hasta el momento no existen estudios que evalúen el papel de la neurogénesis endógena en un proceso de reorganización funcional de un nicho neurogénico.

Funcionalidad de la neurogénesis inducida por daño

En relación a lo anterior, se ha propuesto que las nuevas células podrían estar participando en el restablecimiento del aprendizaje y la memoria de la zona

lesionada, pues en un par de trabajos se demuestra que existe una fuerte asociación entre la generación de nuevas neuronas subsecuente a un daño y la mejora en un tipo de aprendizaje espacial asociado a la zona lesionada (CA1) (Nakatomi et al., 2002; Bendel et al., 2005).

Otros han propuesto que la adición de nuevas células al GD y por lo tanto al circuito trisináptico, sería equivalente a incrementar la memoria de trabajo asociada al hipocampo, es decir, a incrementar el almacenamiento de memoria transitoria creando más “salidas” para que la memoria transitoria pase a regiones corticales. Sin embargo, si una neurona se integra de forma estratégica al GD de tal manera que, el procesamiento de la información se vuelva más eficiente, entonces se puede incrementar el procesamiento de información compleja en el circuito (Kempermann 2002 y 2008).

Función del GD en el aprendizaje y la memoria

La interrogante acerca de la funcionalidad de las nuevas neuronas en el GD, lleva a preguntarse acerca de las funciones asociadas al mismo. Se sabe que el GD es un nicho neurogénico y que posee un correlato funcional muy claro. El aprendizaje dependiente de contexto es un aprendizaje que se modula en esta estructura.

En algunos estudios se demuestra que el daño al GD produce un déficit en la ejecución correcta de tareas de memoria que implican asociaciones espaciales y contextuales (Anagnostaras et al., 1999; Lee y Kesner, 2004; Saxe et al., 2006). La memoria contextual capacita a un organismo para identificar un ambiente familiar rápidamente, y como resultado, le permiten detectar eficientemente un cambio producido en un ambiente determinado (Lee y Kesner, 2004). Se ha postulado que en condiciones normales, la incorporación de nuevas neuronas al GD pudiera promover la generación de nuevos patrones de activación relacionados a memoria en CA3. (Treves et al., 2008). Mientras que, en condiciones de daño al GD, la adición de nuevas neuronas pudiera promover la reorganización del circuito alterado (Dong et al., 2003; Ogita et al., 2005; Hernández-Ortega et al, 2007).

El ácido kaínico como inductor de muerte neuronal

El ácido kaínico (*AK*, *monohidrato del ácido acético 2-carboxi-4-isopropenil-3-pirrolidinil*) es un análogo no degradable del ácido glutámico, y agonista de los receptores ionotrópicos AMPA/Kainato que permite la despolarización y entrada masiva del ion Ca^{2+} produciendo excitotoxicidad en células blanco, particularmente en el hipocampo.

Los modelos de daño con AK emplean inyecciones intraperitoneales o intracerebrales. En ambos casos, se incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno, se alteran funciones mitocondriales y se induce muerte celular por vía excitotóxica y apoptótica, la cual es característica de enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer (revisado en Zheng et al, 2011).

La inyección intraperitoneal afecta varias estructuras, incluyendo CA3, CA1 y GD (Wang et al., 2005; Pinheiro y Mulle 2006). La inyección intracerebral y el daño que provoca se puede dirigir a una región particular, lo que representa un modelo de lesión excitotóxica focal que facilita tanto la evaluación de la reorganización funcional, como de la estructural.

JUSTIFICACIÓN

A pesar de que el GD es una estructura neurogénica, hasta el momento no se ha establecido su posibilidad de reestructuración anatómica y funcional después de una lesión excitotóxica extensa en el adulto; aunado a ello se desconoce el papel de la neurogénesis en este proceso. Por lo anterior resulta interesante evaluar la reorganización de esta estructura neurogénica en la etapa adulta posterior a una lesión excitotóxica.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar si la reorganización estructural del GD de ratas adultas, después de una lesión excitotóxica, se asocia a procesos de neurogénesis y explorar si existe una correlación temporal entre procesos de maduración neuronal en la zona lesionada y la recuperación funcional (conductual y electrofisiológica) del GD.

Objetivos Particulares

1. Evaluar la ejecución de tareas de condicionamiento aversivo contextual (CAC), campo abierto (CA) y reconocimiento de lugar (RL) de ratas Wistar jóvenes adultas lesionadas con AK a diferentes tiempos comparadas con ratas no lesionadas.
2. Caracterizar la reorganización estructural del GD, empleando la técnica de tinción de Nissl y el método Cavalieri de estimación volumétrica, en diferentes ventanas de tiempo post-lesión.
3. Evaluar la capacidad de reorganización y plasticidad sinápticas en la vía del GD a CA3 por medio de la inducción de LTP posterior a diferentes tiempos post-lesión.
4. Evaluar la posible correlación entre neurogénesis inducida por daño en el proceso de reorganización estructural y funcional del GD.

HIPÓTESIS

El GD de la rata adulta es capaz de reestructurarse morfológica y funcionalmente después de una lesión excitotóxica debido a un incremento en la tasa de generación e incorporación de nuevas neuronas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sujetos

Se emplearon 54 ratas adultas machos de la cepa Wistar con un peso de 250g a 350g y 4 meses de edad, alojadas en grupos de 5 en cajas de acrílico, mantenidas en un ciclo invertido de 12 h luz/12 h oscuridad con acceso libre a comida y agua.

Cirugía Estereotáxica

Todos los procedimientos se realizaron siguiendo el código de ética para trabajo con animales del Instituto de Investigaciones Biomédicas y tratando de minimizar el malestar de los sujetos.

Con el fin de producir la lesión al GD, se anestesió a los animales con Isoflurano al 2% en una mezcla de O₂ 95% y CO₂ 5% y se montaron en un aparato estereotáxico. La barra de los incisivos se colocó a -3.3 mm debajo del cero horizontal. Por medio de una jeringa Hamilton de 10µl controlada por un inyector automático (Stoelting Co) se infundió unilateralmente a un grupo de sujetos (n=22) 0.75 nmolas/min de AK (KA; Sigma Aldrich, Chemie) en el GD en base a las coordenadas: AP -3.8, ML -2.4 y DV -3.5 a partir de bregma (Paxinos y Watson, 1982).

El AK se disolvió en 50µl de NaOH 1N, y se aforó a 1ml incorporando amortiguador de fosfatos (AF) 10mM con un pH de 7.2; el pH de la solución se fijó a 7.0-7.5, se inyectó 1µl/min de esta solución que contenía 0.75 nmolas de AK, se dejó reposar por dos minutos. A los sujetos de cirugía “sham” se les introdujo el inyector de infusión en la misma zona del GD, pero no se administró ningún fármaco (n=24). A los animales intactos no se les practicó ningún procedimiento quirúrgico (n=8).

Inyecciones de BrdU

Con el objeto de marcar células en proliferación, se inyectó a los sujetos 5-Bromo 2-deoxyuridina (50mg/kg peso corporal) (Sigma-Aldrich) disuelta en 0.9% de solución salina desde el mismo día de la cirugía y durante los tres días siguientes. Las inyecciones fueron intraperitoneales y separadas entre sí por 12 horas.

Aparatos

En esta sección se describen los aparatos que se utilizaron para la evaluación conductual y en la siguiente se describen tanto las tareas, como los protocolos experimentales empleados.

Arena (caja) de reconocimiento de lugar

La caja experimental donde se llevó a cabo la tarea de reconocimiento de lugar (RL), fue de acrílico negro con medidas de 60x60x30cm. Los objetos empleados fueron de plástico y vidrio, como frascos, envases y tapas de plástico, de medidas

variables entre ellos de: 6-7cm de alto por 4-10cm de ancho y 4-10cm de profundidad.

Arena (caja) de campo abierto

La tarea de campo abierto se llevó a cabo en una arena de acrílico negro con medidas de 80x80x30cm, dividida con líneas de pintura blanca en 16 cuadros iguales de 20x20 cada uno.

Cámara de condicionamiento aversivo contextual (CAC)

Se utilizó una cámara de condicionamiento de 25 cm de largo x 25 cm de ancho x 20 cm de alto (San Diego Instruments). Las paredes y techo de la caja son de acrílico transparente y el piso removible está formado por una rejilla de 23 tubos de acero inoxidable. La cámara está equipada con una matriz de rayos infrarrojos a nivel del piso y los movimientos dentro se registran a partir de la interrupción de los rayos y la información se envía a una computadora que almacena los resultados y que controla el equipo. El techo de la cámara está equipado con una bocina por medio de la que se produce un tono al interior de la cámara y los cilindros del piso están electrificados de manera que generan una corriente eléctrica; la aparición de ambos estímulos está controlada por el experimentador.

Cámara de condicionamiento aversivo (contexto alterado)

La cámara de condicionamiento alterado consiste en la cámara anteriormente descrita, pero con varias modificaciones: el piso está cubierto con una plancha de acrílico opaco, las paredes se cubrieron por fuera con laminas de papel a rayas blancas y negras, se insertó una placa vertical de acrílico en medio de la cámara de manera que el interior quedó dividido en dos secciones triangulares y se añadió una bola de algodón impregnada con esencia de cereza por debajo del piso de acrílico.

Protocolo conductual

Los sujetos se evaluaron durante la fase de oscuridad del ciclo invertido. El cuarto en el que se llevó a cabo tanto el entrenamiento, como la evaluación se mantuvo en oscuridad sin pistas visuales. Al día 4 (n=15), 19 (n=16) o 54 (n=15) posterior a la lesión (AK y sham) y durante los cuatro días siguientes los animales se habituaron al experimentador (ver sección de *Manipulación y habituación*) y a la caja de RL (ver sección *Aparatos*). Durante los tres días siguientes los animales se sometieron al siguiente protocolo conductual: el día 7, 22 o 57 los sujetos se evaluaron en la tarea de reconocimiento de lugar (RL); los días 8, 23 o 58 post-lesión se evaluaron en la tarea de campo abierto (CA) y se condicionaron en el protocolo de condicionamiento de aversión contextual (CAC). Los días 9, 24 o 59 post-lesión se les evaluó la memoria aversiva contextual (MAC) y la memoria aversiva (MA) en un contexto alterado (Figura 2).

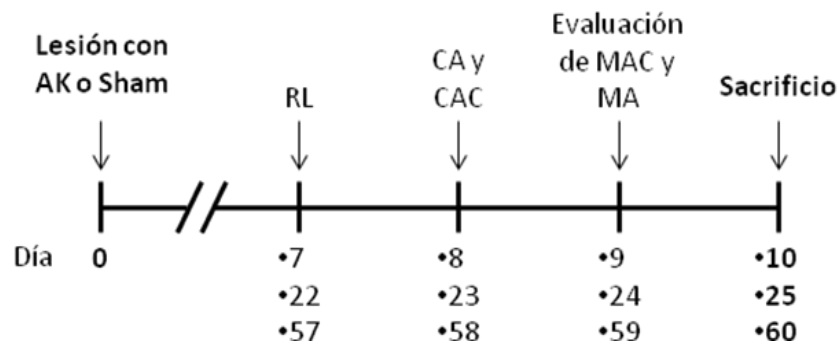


Figura 2. Línea temporal a partir del día de lesión, procediendo con la aplicación de las tareas conductuales y finalizando con el sacrificio de los sujetos.

Manipulación y habituación

4, 19 y 54 días después de la lesión con AK o control inició la fase de habituación y manipulación de los sujetos de cada grupo; ésta precedió al entrenamiento y a la evaluación conductual. La manipulación consistió en tocar a cada sujeto por 10 minutos durante 4 días consecutivos y la habituación consistió en permitir a cada sujeto acostumbrarse al tacto y olor del experimentador, así como a la caja

experimental empleada en la tarea de RL en sesiones de 30 minutos por sujeto durante 4 días previos a la evaluación de esa misma tarea.

Evaluación conductual

Para evaluar la recuperación funcional posterior a la lesión en GD se empleó la tarea de CAC, cuya función depende del GD. Así mismo se empleó la tarea de RL, que es una tarea asociada al hipocampo en general, la tarea de condicionamiento aversivo (usando para ello la versión del contexto alterado del CAC) y la tarea de CA como control de la actividad locomotora.

Condicionamiento de aversión contextual (CAC)

Este es una forma de aprendizaje asociativo de larga duración propia del hipocampo (Phillips y LeDoux 1992) y particularmente del GD (Lee y Kesner, 2004; Saxe, et al., 2006 y Hernández-Rabaza, et al., 2009).

El condicionamiento consiste en la asociación entre un estímulo condicionado (EC) (un tono) y un estímulo incondicionado (EI) (un choque eléctrico) en un contexto determinado. Como consecuencia del choque, los sujetos presentan la respuesta condicionada (RC) de congelamiento, inmovilidad o “freezing” cuya definición operacional es “la ausencia total de movimientos excepto por los generados por la respiración” (De Oca et al., 1998).

El condicionamiento se llevó a cabo en la caja de condicionamiento contextual previamente descrita en la sección de “Aparatos”. La tarea consistió en una sesión de condicionamiento y una sesión de evaluación separadas por 24 hrs.

Ocho, 23 o 58 días posteriores a la lesión, se condicionó a los sujetos individualmente colocándolos en la cámara de condicionamiento y permitiéndoles explorarla por 2 min (periodo “pretono”) antes de que se administrara el primer pareamiento de tono-choque; la exploración libre permite al sujeto asociar el contexto con el consecuente estímulo aversivo.

Al término de los 2 min, se presentó un tono auditivo (20 seg., 80dB y 2 KHz) que coterminaba con un choque en las patas (2 seg, 1mA) administrado a través del piso. Cuatro minutos después y a intervalos regulares se presentaron 4 pareamientos más de tono-choque.

El movimiento del sujeto (interrupción de al menos un rayo infrarrojo) se registró previo a la presentación del primer tono y a lo largo de toda la sesión que duró 22 min. Los sujetos se devolvieron a su caja habitación y 24 horas después se evaluó la memoria aversiva contextual.

Evaluación de la memoria aversiva contextual (MAC)

Para ello se colocó individualmente a los sujetos en el contexto de entrenamiento y se evaluó la cantidad de tiempo que permanecieron “congelados” o inmóviles en un lapso de 5 min sin que se presentara ni el tono ni el choque.

Los sujetos se devolvieron a sus cajas habitación y después de cada sesión la cámara de condicionamiento se aseó con solución limpiadora que consistió en 10% de extrán y 10% de alcohol a 96° en agua bidestilada.

Evaluación de la memoria aversiva (MA)

Dos horas después de la evaluación de la MAC, se evaluó a los sujetos en la tarea de memoria aversiva (MA) que depende particularmente de la amígdala basolateral (Phillips y LeDoux, 1992). Para ello, se colocó a cada sujeto individualmente en la caja de condicionamiento alterado, previamente descrita en la sección de *Aparatos*.

Después de 2 min (periodo “pretono”) se administró, por 20 seg, el tono empleado en el CAC y 260 seg después de iniciada la sesión, se volvió a presentar el tono. No se administró el choque en ningún momento y la conducta de “congelamiento” se evaluó desde el inicio de la sesión y a lo largo de toda la sesión que duró 400 seg.

Los resultados de las pruebas antes mencionadas se reportan como el porcentaje de tiempo (seg) que los individuos presentan congelamiento o inmovilidad en relación al tiempo total de evaluación. El tiempo de inmovilidad se registra por medio de la computadora que controla la cámara de condicionamiento y por medio de la observación del experimentador. En la Figura 3 se muestra el protocolo experimental empleado en esta tarea.

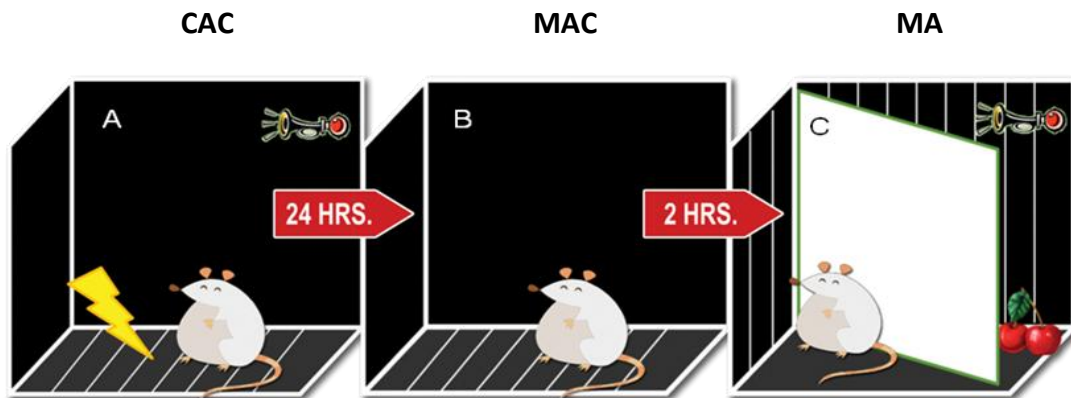


Figura 3. Protocolo experimental para la evaluación de la memoria contextual aversiva y de la memoria aversiva. (A) Condicionamiento de aversión contextual (CAC) que consistió en una sesión de 22 minutos con 5 pareamientos tono-choque en los que se midió la inmovilidad como respuesta de miedo ante esta asociación. (B) Fase de evaluación de la Memoria Aversiva Contextual (MAC, dependiente de GD) en la que se coloca al mismo sujeto del condicionamiento y se evalúa su inmovilidad ante el contexto por un tiempo de 5 minutos. (C) Evaluación de la Memoria Aversiva (MA, independiente de GD) en la que se evalúa el recuerdo del tono en un contexto diferente.

Evaluación del campo abierto (CA)

Esta tarea se empleó como control positivo de la tarea de CAC ya que se vale de la conducta innata de los roedores de explorar lugares novedosos. En la tarea de CAC la conducta a evaluar es la inmovilidad y la tarea de CA se utilizó para validar que la inmovilidad se debió al miedo y no a un problema motor.

La tarea se llevó a cabo (previo a cualquier otra tarea) en la caja experimental previamente descrita en la sección de *Aparatos*. Para ello, se colocó a cada sujeto individualmente dentro de la caja cerca de una de las esquinas de la misma y mirando hacia la pared. Se permitió que los sujetos exploraran la caja libremente

durante 5 min y se contabilizó tanto el número de veces que cruzó alguna línea, como el número de veces que se movió de un cuadrante a otro; cada cuadrante representa cuatro cuadros del CA (Figura 4).

Evaluación del reconocimiento de lugar (RL)

Esta es una tarea de memoria espacial particularmente modulada por la región CA1 del hipocampo (Ennaceur et al 1997, Mumby et al 2002; Brun et al., 2002).

Para su evaluación, se colocaron dos objetos idénticos en dos esquinas contrarias dentro de la caja previamente descrita en la sección de Aparatos. Se introdujo individualmente al sujeto dentro de la caja y se le permitió explorar los objetos libremente durante 5 min. Cada sesión fue videograbada y empleando la grabación, el experimentador analizó el tiempo dedicado a explorar cada objeto. Al finalizar la sesión se retiró al sujeto a su caja habitación por un intervalo de 15 min y mientras tanto, se limpiaron los objetos empleados y uno de los dos objetos se cambió de lugar a una esquina adyacente. El sujeto se reintrodujo en la caja pasado este periodo y se evaluó el tiempo de exploración que dedicaba al objeto en la ubicación familiar y en la ubicación novedosa (Mumby et al., 2002). En la Figura 5 se muestra un esquema de la tarea.

El reconocimiento de lugar se obtuvo calculando el tiempo de exploración del objeto en la nueva ubicación respecto al tiempo total de exploración durante la segunda fase y para ello se empleó la siguiente fórmula:

$$RL = \frac{TE \text{ en el lugar novedoso}}{TE \text{ en el lugar novedoso} + TE \text{ en el lugar familiar}}$$

Donde: RL es índice de reconocimiento de lugar y TE es tiempo de exploración correspondiente a la segunda fase de exploración.

A medida que el índice incrementa (>0.5) el reconocimiento de lugar será mayor, si el índice está por debajo del azar (<0.5), se considera como déficit en el reconocimiento de lugar.

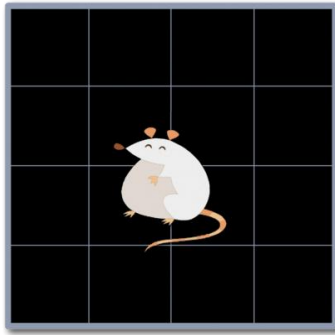


Figura 4. Caja empleada para la tarea de campo abierto, dividida en 16 cuadros y en 4 cuadrantes iguales imaginarios.

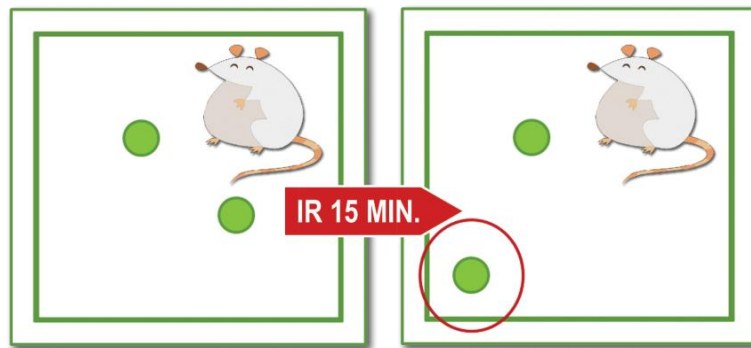


Figura 5. Protocolo experimental para la tarea de reconocimiento de lugar. IR es intervalo de retención, periodo en el cual el sujeto es aislado durante 15 minutos en su caja-hogar.

Procedimiento Electrofisiológico

En este estudio se empleó la inducción de LTP *in vivo*, en la vía que comunica al GD con CA3 para evaluar la capacidad de inducir un fenómeno de plasticidad sináptica entre estas dos regiones, de acuerdo al protocolo experimental descrito previamente por Escobar et al, 1997; Gómez-Palacio y Escobar 2008 y Schjetnan y Escobar 2010.

Durante el procedimiento electrofisiológico, los animales se anestesiaron con pentobarbital (50mg/kg. IP), suministrando inyecciones suplementarias (25mg/kg) a intervalos de 1 hora con el fin de mantener los niveles de anestesia. Con el objetivo de mantener la temperatura corporal, se emplearon cojines homotérmicos

(Braintree Scientific, INC). Las respuestas hipocampales fueron registradas utilizando un electrodo monopolar de acero inoxidable (diámetro 0.005", Mediwire, Chicago, IL) colocado en el área CA3 del hipocampo en las siguientes coordenadas estereotáxicas: AP -2.9, ML +2.2, DV -3.0 (Paxinos y Watson, 1982). Las respuestas se evocaron a través de la estimulación directa del GD empleando un electrodo bipolar de acero inoxidable (diámetro 0.005", Mediwire, Chicago, IL) colocado en las coordenadas estereotáxicas correspondientes (AP -3.5, ML -2.0, DV 3.1; Paxinos y Watson, 1982). La estimulación (pulsos monofásicos de 20-40 μ A y 0.1-0.25 msec de duración) se suministró por medio de un estimulador Grass S48 llevada al electrodo por una unidad de aislamiento PSIU6. Las respuestas evocadas se registraron utilizando un amplificador Grass P5, la señal se digitalizó para su almacenamiento y posterior análisis empleando el software BrainWave (Datawave Co.). En principio, se tomó la línea base durante 20 minutos evocando respuestas cada 20 segundos, posteriormente se indujo la LTP a través de estimulación tetánica, que consistió en la aplicación de 3 trenes de 1 msec de duración y 100 Hz de frecuencia con intervalos intratren de 20 seg. Las respuestas evocadas se registraron durante tres horas tras la estimulación tetánica. La LTP se analizó por medio de la medición de la pendiente de los potenciales postsinápticos excitatorios de campo (PPSE).

Al final del registro electrofisiológico, se utilizó el agonista del receptor metabotrópico a glutamato tipo II 2-(2,3-dicarboxi-ciclopropil) glycina (DCG-IV; 0.5 μ l a una concentración de 5 μ M infundido en 5 min) con el fin de verificar que la señal obtenida haya sido en efecto generada por las fibras musgosas hipocampales (Calixto et al., 2003). A lo largo del experimento se mantuvo un monitoreo constante del EEG.

Inmediatamente después de evaluar la LTP, los mismos sujetos se sacrificaron y los cerebros se extrajeron para llevar a cabo el análisis estructural e inmunohistoquímico del tejido.

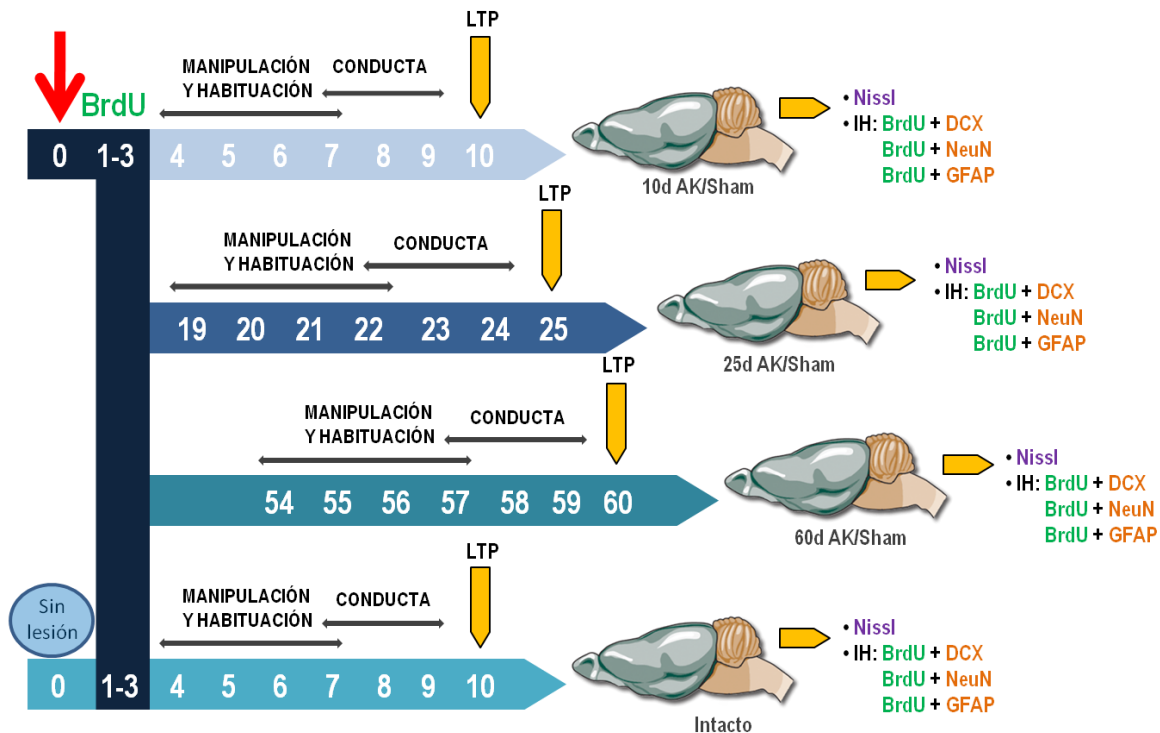


Figura 6. Protocolo experimental general. La flecha roja del Día 0 refiere la lesión que se indujo (con AK o sham).

Grupos

En la siguiente tabla se describen los grupos empleados en esta investigación.

Grupo	Tratamiento	Día de sacrificio
Intacto (n=8)	Sin lesión Aplicación de protocolos conductuales LTP (n=4)	Día 10
10dAK (n=7)	Lesión con AK Aplicación de protocolos conductuales LTP (n=5)	Día 10
10dSham (n=8)	Operación sham con cánula Aplicación de protocolos conductuales LTP (n=5)	Día 10
25dAK (n=8)	Lesión con AK Aplicación de protocolos conductuales LTP (n=4)	Día 25
25dSham (n=8)	Operación sham con cánula	Día 25

	Aplicación de protocolos conductuales LTP (n=4)	
60dAK (n=7)	Lesión con AK Aplicación de protocolos conductuales LTP (n=5)	Día 60
60dSham (n=8)	Operación sham con cánula Aplicación de protocolos conductuales LTP (n=5)	Día 60

Tabla 1. Descripción de los grupos empleados, así como el tratamiento administrado y el día de sacrificio.

A continuación un esquema general del procedimiento experimental (Figura 6):

Procedimientos histoquímicos e inmunohistoquímicos

Una vez realizada la evaluación conductual, se efectuó una perfusión intracardial con 250ml de 0.9% de salina seguido de 250ml de 4% de paraformaldehído en 0.1M de amortiguador de fosfatos (AF) (pH de 7.4). Su cerebro se extrajo y almacenó en solución fijadora a 4°C por 24 horas adicionales. Posteriormente, los cerebros se mantuvieron en soluciones de 15% y 30% de sacarosa por 48 horas cada una para después ser cortados. Por medio de un criostato (Leica) se obtuvieron secciones coronales congeladas de 30 micras de todo el hipocampo. Cada 5 secciones se montó un corte en una laminilla previamente gelatinizada (portaobjetos bañados en solución de gelatina y sulfato de cromo) para llevar a cabo la histología de Nissl y las demás secciones fueron almacenadas en líquido de crioprotección (25% de etilenglicol, 25% de glicerol y 50% de AF al 0.2M, pH 7.4) para su posterior análisis inmunohistoquímico.

Tinción de Nissl: es una tinción que marca los gránulos de Nissl, que son fragmentos de retículo endoplásmico rugoso, haciendo evidentes los cuerpos celulares, no así las dendritas y axones. Esta tinción se llevó a cabo en las secciones montadas en laminillas gelatinizadas; se realizó con el fin de observar el daño causado al GD y corroborar que dicha área neurogénica fue lesionada. El tejido montado se sumergió durante 2 minutos en agua bidestilada para hidratarlo y posteriormente se sumergió en 70%, 95% y 100% EtOH durante 2 minutos cada

uno para deshidratarlo. Finalmente se sumergieron por 4 minutos en violeta de cresilo (0.1%) que se empleó como colorante para teñir los somas, se lavaron en Xilol durante 2 minutos y se cubrieron con medio de montaje Permount (Daigger) y un cubreobjetos.

Inmunohistoquímica anti BrdU: la 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) es un análogo de timidina y se incorpora al ADN de células en síntesis (durante la fase S del ciclo celular), por lo que marca células en proliferación de cualquier tipo. La técnica para marcar a las células consistió en lo siguiente: los cortes colectados en solución de crioprotección se lavaron 3 veces (10 min por lavado) en AF, se sumergieron en 2N HCL previamente calentado a 37°C y se mantuvieron por 30 min a dicha temperatura para desnaturalizar las proteínas; posteriormente se neutralizaron con 0.1M amortiguador de boratos (AB) sumergiéndolos en la solución por 10 min a temperatura ambiente (TA); se incubaron por 24 hrs en suero de caballo (Vector) (25µl/1ml) diluido en 0.3% de tritón en AF a -4°C. Posteriormente, se incubaron en el anticuerpo monoclonal primario anti-BrdU (Roche) por 24 horas, y se realizaron 3 lavados de 10 min en 0.3% tritón diluido en AF; inmediatamente después se incubaron en un anticuerpo secundario anti-ratón Alexa Fluor 488 (1:500, Invitrogen, USA) por 3 horas, por último se lavaron 3 veces durante 10 min en 0.3% tritón diluido en AF

Dobles Inmunohistoquímicas: los cortes colectados en solución de crioprotección se lavaron 3 veces (10 min por lavado) en AF, se incubaron en anticuerpos primarios contra doblecortina (DCX), proteína fibrilar acídica glial (GFAP) o NeuN y BrdU. Las secciones se montaron en portaobjetos de vidrio (Thermo Scientific) previamente silanizados (2% silano en 100ml de acetona) cubriéndolos con medio de montaje para fluorescencia DAKO. A continuación se presentan unas tablas con la descripción de los anticuerpos primarios (tabla 2) y secundarios (tabla 3) empleados.

Anticuerpos Primarios	Marca	Etapa	Especie	Dilución	Compañía
BrdU	Duplicación del DNA	Proliferación	Ratón	1:100	Roche
DCX	Microtúbulos	Neuroblastos en migración	Cabra	1:250	Santa Cruz Biotech.
NeuN	Núcleos neuronales	Neuronas postmitóticas	Ratón	1:800	Sigma
GFAP	Citoesqueleto de astrocitos	Astrocitos maduros	conejo	1:1000	DAKO

Tabla 2. Descripción de los anticuerpos primarios empleados.

Anticuerpos secundarios	Especie	dilución	Compañía
Alexa Fluor 488	Cabra anti-ratón	1:500	Invitrogen
Alexa Fluor 546	Cabra anti-conejo	1:250	Invitrogen
Dy Light 594	Burro anti-cabra	1:600	Jackson Immuno Research

Tabla 3. Descripción de los anticuerpos secundarios empleados.

Análisis al microscopio confocal

Las secciones procesadas para inmunohistoquímica se analizaron usando los microscopios confocales Olympus BXSIWI equipado con una unidad de disco giratorio (DSU) y Fluoview de Olympus (FV10). Para cada sujeto se analizaron 4 secciones de tejido separados por 240 micras entre cortes. En todos los casos se obtuvieron imágenes de un solo plano focal de 3 zonas aleatorias del GD a un aumento de 20x (12 zonas diferentes en total por sujeto). Posteriormente, éstas se exportaron al programa ImagePro por medio del que se evaluó la densidad de la marca presente de los 3 marcadores a analizar: GFAP, NeuN y DCX. Los datos se analizaron como porcentajes de densidad de señal, es decir, en número de píxeles/ μm y se realizó un ANOVA de medidas repetidas, para obtener la comparación entre grupos.

Análisis estereológico del volumen del GD (Cavalieri)

El análisis estereológico para medir el volumen celular total de la capa granular del GD, se realizó empleando el método de disección de Cavalieri del programa *Stereoinvestigator*.

Se tomaron en cuenta los cortes recolectados y teñidos para Nissl que abarcaron de las coordenadas AP-3.2 a -5.2 de acuerdo a Paxinos y Watson (1982) y para cada corte se delimitó el contorno del área de la capa granular del GD. El grosor digital de las secciones en el que se hizo cada medición fue de 15-21 μ m en un total de 12-15 cortes por sujeto; cada corte tenía sobrepuesta una cuadrícula digital que permitió calcular junto con otros elementos el área del GD.

De acuerdo con el principio de Cavalieri, el volumen de una muestra puede ser estimado por la fórmula siguiente: $V=PutN/n$, donde el volumen es la suma de las áreas de cada sección de un grueso t determinado (15-21 μ m por sujeto), P es el número total de puntos (de la gradilla) que caen dentro del área muestreada de las secciones, u es el área representada por un punto en una sección, N es el número total de secciones a lo largo de todo el GD y n es la cantidad de cortes empleados para este procedimiento (12-15 secciones por sujeto). Se realizó un ANOVA de una vía para evaluar diferencias entre grupos.

RESULTADOS

Los resultados de esta investigación se dividen en cuatro partes: análisis de tejido con la tinción de Nissl y la prueba Cavalieri para medir volumen del GD, resultados Inmunohistoquímicos, conductuales y por último resultados electrofisiológicos.

Histológicos (tinción de Nissl)

El análisis histológico de Nissl se realizó para observar la morfología de la lesión al GD. Los sujetos del grupo 10dAK exhiben un GD desestructurado e interrumpido en la capa dorsal y ventral, además se puede apreciar un adelgazamiento general

de toda la capa granular (Figura 7D, E y F) en comparación con los sujetos con lesión Sham o el control Intacto (Figura 7A, B y C), en los cuales no se aprecia lesión alguna en el GD. A los 25 días después de infundir AK, se observa un GD continuo, aunque en algunos sujetos, con deformaciones y adelgazamiento de la capa granular a lo largo de todo el eje anteroposterior (Figura 7G, H, I). Sin embargo en los sujetos del grupo 60dAK se muestra que el GD se encuentra reestructurado y en la mayoría de los tejidos no se observan deformaciones, interrupciones, o adelgazamientos de la capa granular (Figura 7J, K y L).

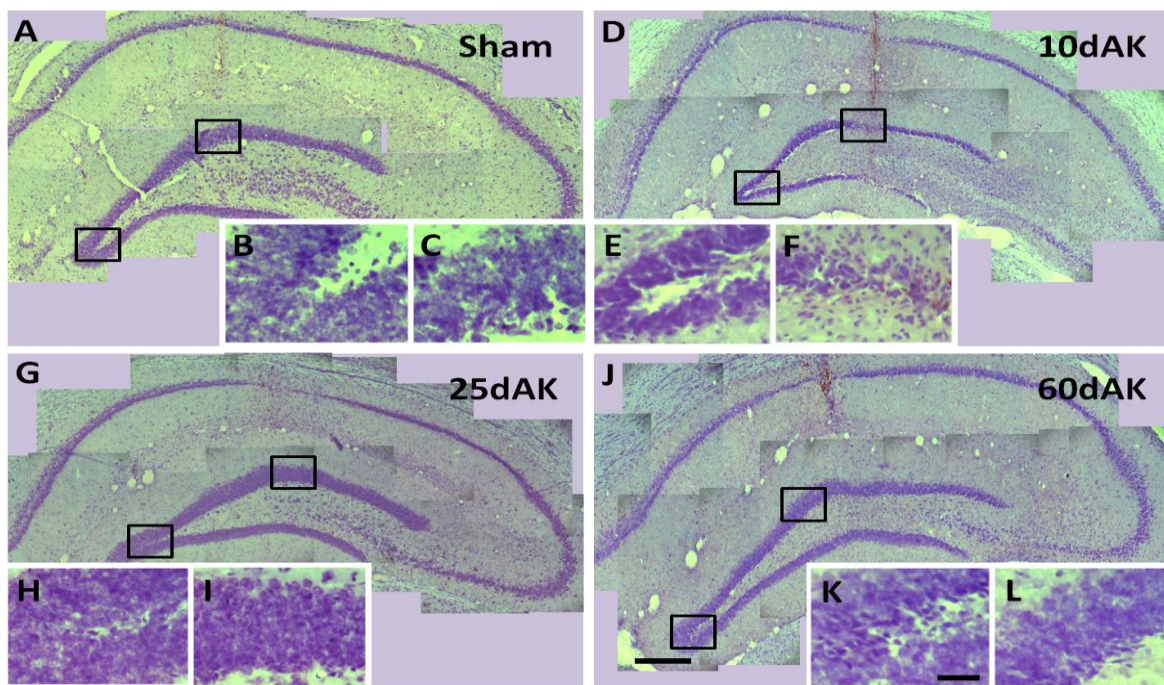


Figura 7. Imágenes representativas de cortes coronales de cerebro procesados con la tinción de Nissl de un sujeto correspondiente al grupo: control (A), 10dAk (D), 25dAK (G) y 60dAK (J). Se muestran ampliaciones a 40x de dos zonas del GD de cada sujeto: la cresta (región medial del GD) (B: control, E: 10dAK, H: 25dAK y K: 60dAK) y de la capa dorsal (C: control, F: 10dAK, I: 25dAK y L: 60dAK). Escala de A, D, G y J: 400 μ . Escala de B, C, E, F, H, I, K y L: 60 μ . El eje indica la orientación del corte: D: dorsal, M: medial, L: lateral, V: ventral y aplica también para las imágenes 9, 10 y 11.

Resultados del análisis estereológico de Cavalieri

Para medir el volumen total de la capa granular del GD se llevó a cabo un análisis Cavalieri en el tejido procesado para tinción de Nissl. Debido a que no se detectaron diferencias morfológicas entre los grupos sham y el grupo intacto, se decidió incluirlos en un mismo grupo control. Los resultados, muestran una diferencia estadísticamente significativa (ANOVA de una vía con un post hoc de Fisher; $F_{(3,15)} = 11.232$; $p < 0.01$) al comparar el volumen de la capa granular del GD del grupo 10dAK en comparación a los otros tres grupos (control o sham/intacto, 25dAK y 60dAK; Figura 8), el cual se encuentra disminuido (Tabla 4).

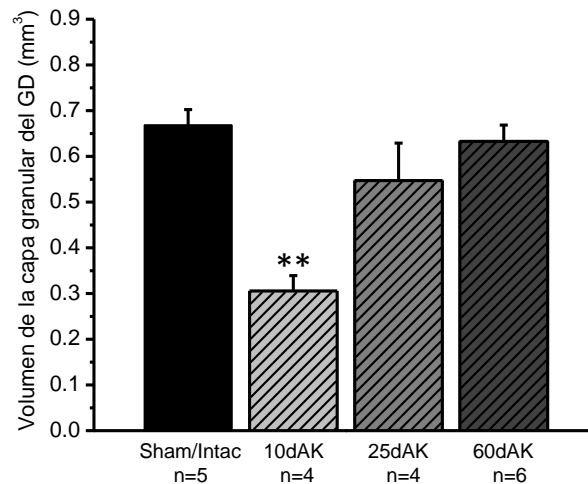


Figura 8. Se muestra la media del volumen \pm EE de la capa granular del GD en los diferentes grupos. La diferencia en el volumen de la capa granular del GD en el grupo 10dAK es estadísticamente significativa en comparación a los otros grupos ($F_{(3,15)} = 11.232$; $**p < 0.01$).

Grupo	Coefficiente Gundersen	Volumen de capa granular del GD (mm ³)
Sham/Intacto	0.010	0.667 \pm 0.034 (n=5)
10dAK	0.021	0.305 \pm 0.082 (n=4)
25dAk	0.016	0.547 \pm 0.036 (n=4)
60dAk	0.015	0.633 \pm 0.034 (n=6)

Tabla 4. Datos cuantitativos correspondientes a la gráfica de la Figura 8. Se muestra la media \pm EE del volumen de la capa granular del GD en los 4 grupos a través de la prueba de Cavalieri. El volumen total de

la capa granular del GD en el grupo 10dAk es menor que en los otros tres grupos. El coeficiente de Gundersen representa la predicción de la exactitud de un estimado estereológico; cuando este es < 0.05 .

Análisis inmunohistoquímico de marcadores de proliferación celular

La ANOVA de medidas repetidas reveló diferencias estadísticamente significativas entre los grupos al evaluar la densidad de marca de DCX (marcador de neuronas jóvenes, de 4 días a 2 semanas de nacidas, en migración) en el tejido procesado ($F_{(3,12)}= 15.868$, $p<0.001$). La prueba post hoc de Fisher mostró un incremento en la densidad de marca en el grupo 10dAK con respecto a la de los grupos Sham/Intacto 60dAK ($p<0.0001$) y 25dAK ($p<0.001$). Así mismo la densidad de marca difiere del grupo 25dAK al compararlo contra los grupos sham/intacto y 60dAK ($p<0.0001$). No se encontraron diferencias significativas entre el grupo sham/intacto y 60dAK ($p=0.0821$) (Figura 9).

Los resultados de la inmunohistoquímica contra la proteína fibrilar ácida glial (GFAP, por sus siglas en inglés) revelan que existe una respuesta glial ante la lesión por AK que se manifiesta como gliosis reactiva. Esta representa la forma de cicatrización en el SN y ocurre a partir de la proliferación y engrosamiento de los astrocitos que circundan una zona de lesión. La prueba de ANOVA de medidas repetidas arrojó diferencias estadísticamente significativas en la densidad de marca ($F_{(3,12)}= 19.809$, $p<0.0001$) y la prueba post hoc de Fisher muestra que tales diferencias se encuentran entre el grupo Sham/Intacto al compararlo contra los grupos 10dAK y 25dAK; de igual manera al comparar el grupo 60dAK contra 10dAK y 25dAK se revelaron diferencias similares ($p<0.0001$; Figura 10). Al comparar al grupo Sham/Intacto contra el grupo 60dAK se encontraron diferencias significativas ($p=0.001$). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar el grupo 10dAK contra el grupo 25dAK ($p=0.3687$)

Por otro lado, se encontraron diferencias significativas en la densidad de marca de NeuN, marcador de neuronas maduras e integradas, ($F_{(3,12)}= 13.368$, $p<0.001$) al comparar el grupo 10dAK, en el cual la capa granular se encuentra interrumpida y desprovista de neuronas, contra el resto de los grupos que muestran una capa

granular intacta o reconstituida (Figura 11). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar el grupo 25dAK contra los grupos 60dAK y Sham/Intacto ($p=0.1020$ y $p=0.9993$ respectivamente), ni al comparar el grupo 60dAK contra el grupo Sham/Intacto ($p=0.120$). En cada grupo se analizaron 3 campos de 4 secciones de 4 sujetos.

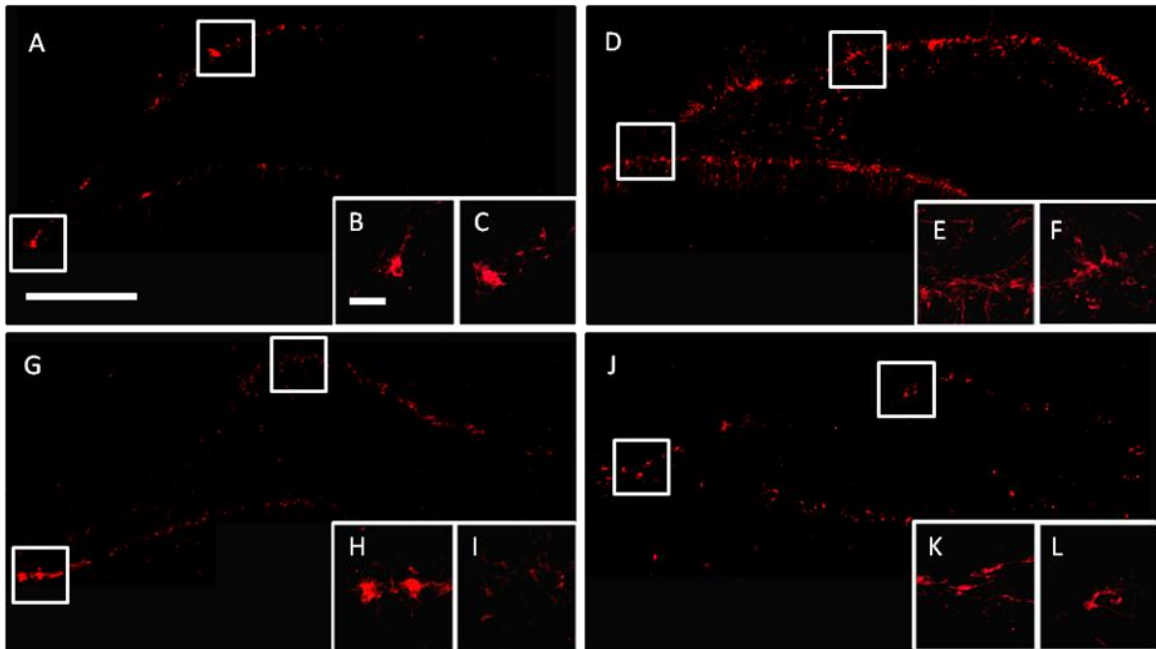


Figura 9. Imágenes representativas de cortes coronales procesados para inmunohistoquímica contra DCX del grupo Sham/Intacto y de cada tiempo postlesión. (A) grupo Sham/Intacto, (D) grupo 10dAK, (G) grupo 25dAK, (J) grupo 60dAK. La escala en (A, D, G y J) corresponde a 400 μ m. Aumentos de la cresta (B, E, H y K) y aumentos de la capa dorsal (C, F, I y L). La escala en los recuadros corresponde a 60 μ m. Se observa un incremento en la marca de DCX 10 días después de la lesión con AK comparada con los demás grupos.

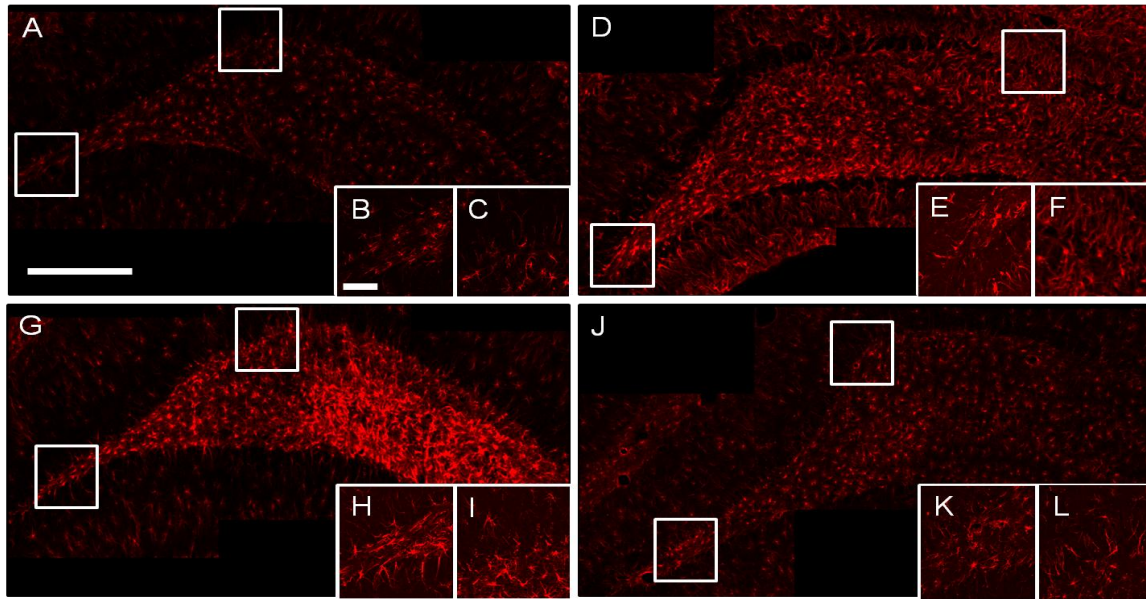


Figura 10. Imágenes representativas de GFAP del grupo Sham/Intacto y de cada tiempo postlesión. (A) grupo Sham/Intacto, (D) grupo 10dAK, (G) grupo 25dAK, (J) grupo 60dAK. La escala en (A, D, G y J) corresponde a 400µm. Aumentos de la cresta (B, E, H y K) de todos los grupos y aumentos de la capa dorsal (C, F, I y L). La escala en (B) corresponde a 75µm. Se observa un incremento en la marca de GFAP 10 y 25 días después de la lesión con AK (gliosis reactiva), comparada con un Sham/Intacto o 60 días después de AK.

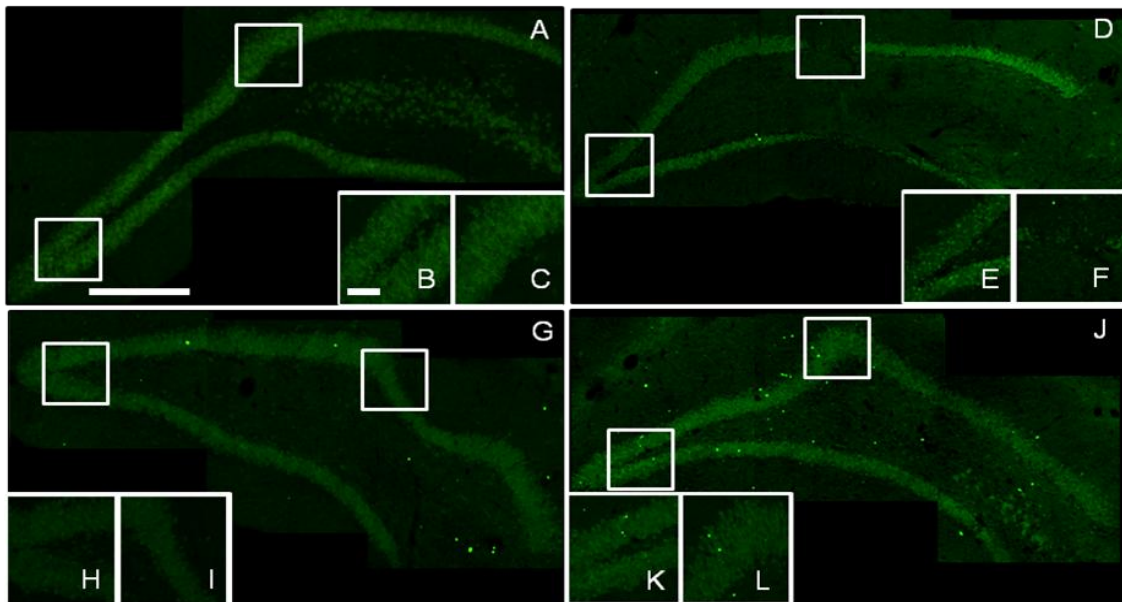


Figura 11. Imágenes representativas de NeuN del grupo Sham/Intacto y de cada tiempo postlesión. (A) grupo Sham/Intacto, (D) grupo 10dAK, (G) grupo 25dAK, (J) grupo 60dAK. La escala en (A, D, G y J) corresponde a 400µm. Aumentos de la cresta (B, E, H y K) de todos los grupos y aumentos de la capa dorsal (C, F, I y L). La escala en (B) corresponde a 75µm. Se observa un decremento en la marca de NeuN 10 días después de la lesión con AK en comparación al resto de los grupos.

Pruebas conductuales

Respecto a la tarea de reconocimiento de lugar (RL), que evalúa memoria de tipo espacial, los resultados de la ANOVA de medidas repetidas muestran que el tiempo que los sujetos dedican a explorar los dos objetos de prueba durante la fase de adquisición es similar entre todos los grupos, es decir, no se encontraron diferencias de grupo ($F_{(6,47)}=0.304$, $p=0.9316$; Figura 12A, barras A). Sin embargo, todos los grupos son capaces de reconocer un objeto familiar en una locación diferente respecto a uno que no se ha movido de lugar (lugar familiar) durante la fase de reconocimiento, es decir se encontraron diferencias de fase ($F_{(6,47)}=232.546$, $p<0.0001$; Figura 12^a, barras R), mostrando así que la lesión en el GD no afectó la ejecución de esta tarea de tipo espacial.

Para corroborar que la inmovilidad observada en los sujetos sometidos a la tarea de CAC se debía al recuerdo aversivo (tanto en la ejecución de la MAC, como en la MA) y no a un problema de motricidad se realizó la tarea de campo abierto (CA). Los resultados muestran que las funciones locomotoras de los sujetos se encuentran intactas y similares entre los grupos (Figura 12B). Los resultados se presentan en número de cruces en total, mostrando que en todo el campo abierto la movilidad de los sujetos es similar entre grupos sin diferencias estadísticamente significativas ($F_{(6,47)}=1.561$, $p=0.1797$).

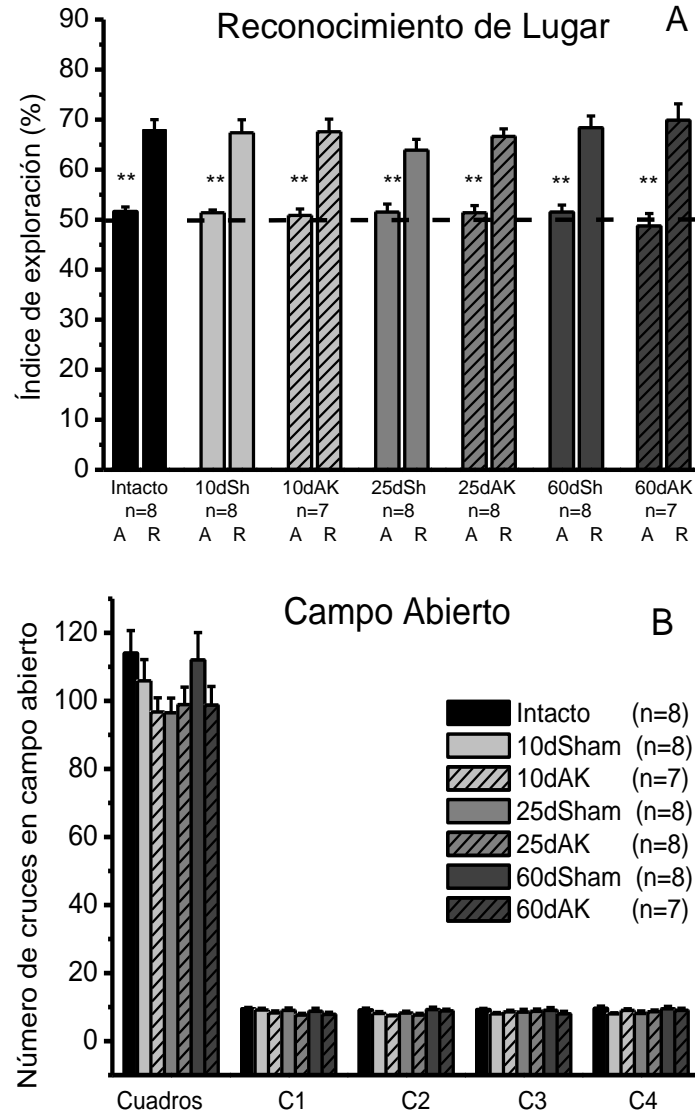


Figura 12. (A) Evaluación de la memoria espacial en la tarea de reconocimiento de lugar (RL). Todos los grupos en la fase de adquisición (barras “A”) dedicaron un porcentaje de tiempo muy parecido al azar (línea punteada equivalente) a explorar los dos objetos ($F_{(6,47)}=0.304$, $p=0.9316$). En la fase de reconocimiento (barras “R”) todos los grupos dedicaron más tiempo a explorar el objeto ubicado en la nueva locación ($F_{(6,47)}=232.546$, $p<0.0001$). (B) Evaluación de la motricidad de los sujetos. Todos los sujetos muestran una motricidad facilitada y similar comparando el total de cruces por los cuadros del campo abierto ($F_{(6,47)}=1.561$, $p=0.1797$).

Para la tarea de CAC, en el tiempo previo (2 minutos) a la realización del entrenamiento (tiempo pretono), se evaluó la inmovilidad de los sujetos ante el contexto de condicionamiento, pero previo a la asociación con el estímulo aversivo (choque eléctrico). Los datos se analizaron mediante la aplicación de un ANOVA

factorial y la prueba post-hoc de Fisher muestran una tendencia similar en todos los grupos en cuanto al movimiento que exhibieron los sujetos; el ANOVA factorial no reveló diferencias estadísticamente significativas ($F_{(6,47)}=1.312$, $p=0.2705$) (Figura 13A).

Una vez concluida la fase de “pretono”, inició la fase de entrenamiento. En ésta, todos los grupos mostraron una tendencia similar a incrementar su inmovilidad a medida que la sesión de entrenamiento transcurría y a medida que los pareamientos de EI-EC se presentaban (Figura 13B). La ANOVA de medidas repetidas no arrojó diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($F_{(6,47)}=1.309$, $p=0.1624$).

Un día después de realizar el entrenamiento se procedió a evaluar la memoria aversiva contextual (MAC) dependiente de GD. Los resultados de la ANOVA factorial muestran que todos los grupos con excepción del 10dAK recuperan la MAC ($F_{(6,47)}=13.587$, $**p\leq 0.0001$). El grupo 10dAK presenta un porcentaje bajo de inmovilidad, parecido al porcentaje mostrado durante la fase de pretono, indicando la incapacidad de los sujetos de este grupo de recuperar la memoria aversiva contextual (Figura 13C).

Dos horas después de someter a los sujetos a la prueba de MAC, se evaluó la memoria aversiva (MA) que es independiente de GD. Todos los grupos mostraron porcentajes altos de inmovilidad ante la presentación del tono, que estaba asociado con el choque eléctrico, en el contexto alterado, lo cual indica que la MA (asociada a la amígdala basolateral) está preservada (Figura 13D). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en la ANOVA factorial realizada ($F_{(6,47)}=.827$, $p=0.5551$).

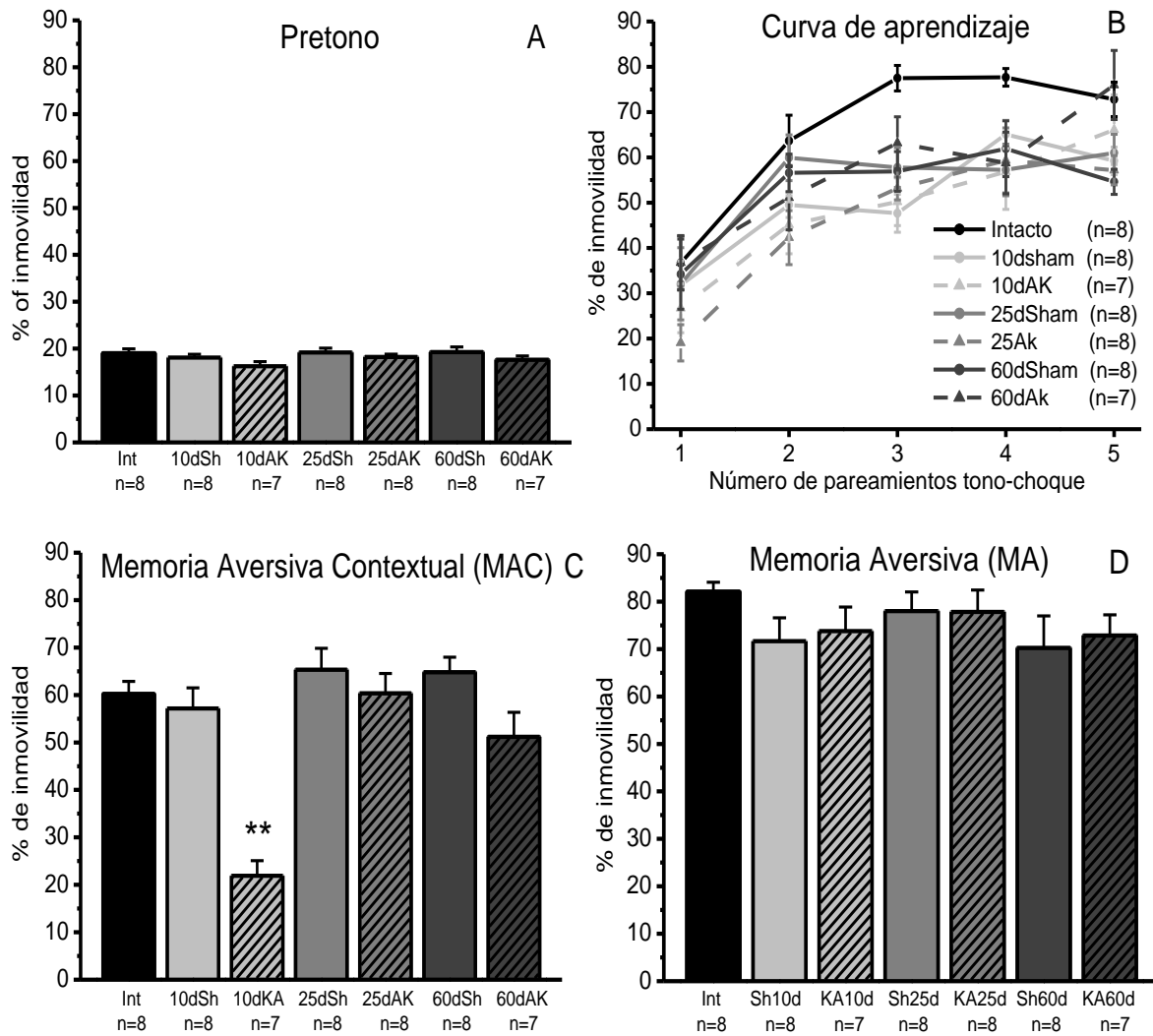


Figura 13. Condicionamiento de Aversión Contextual. (A) Porcentaje de inmovilidad en el tiempo previo a la presentación de los pareamientos de EC-EI (tiempo pretono). Todos los grupos presentan un porcentaje de inmovilidad muy bajo y similar. (B) Curvas de aprendizaje en el entrenamiento de la tarea de CAC. Tanto los grupos lesionados con AK, como los grupos control Sham y el control intacto incrementan su porcentaje de inmovilidad a medida que ocurren los pareamientos de EC-EI y que transcurre la sesión de condicionamiento, lo que indica la capacidad de aprendizaje de la asociación ($F_{(6,47)}=1.309$, $p=0.1624$). (C) Evaluación de la MAC. La evaluación de la memoria aversiva contextual muestra la incapacidad de los sujetos del grupo 10dAK de recordar el contexto que 24 hrs antes constituyó un contexto aversivo ($F_{(6,47)}=13.587$, $p<0.0001$) comparado con el resto de los grupos. (D) Evaluación de la MA. El porcentaje de inmovilidad de los sujetos se encuentra altamente conservado, es decir, existe el recuerdo de que el tono está vinculado a un estímulo aversivo independientemente del contexto ($F_{(6,47)}=0.827$, $p=0.5551$).**

Electrofisiológicos

Los resultados muestran que la administración de una estimulación de alta frecuencia (3 trenes de 1 msec de duración y 100Hz con un intervalo intertren de 20 seg) en la vía que conecta al GD con la región CA3 del hipocampo fue capaz de generar LTP en sujetos adultos, *in vivo*, como se observa en la Figura 14B. Las respuestas evocadas en la región CA3 se midieron a partir de la obtención de potenciales post-sinápticos excitatorios (PPSE), estas respuestas fueron inducidas por pulsos monofásicos de 20 a 40 μ A y 0.25 msec de duración e inician de 1.1-1.7 msec post-estimulación. Presentan un valle hacia los 8.2 msec. La amplitud promedio de los PPSE de campo fue de 0.36 ± 0.02 mV con una pendiente promedio de 0.13 ± 0.01 (Figura 14A panel izquierdo).

En los grupos 10dSham, 25dAK, 25dSham, 60dAK, 60dSham e Intacto se obtuvo LTP, la cual se caracterizó por un incremento inicial lento en la pendiente de los PPSE de campo, en concordancia con investigaciones previas en las que el incremento se muestra de forma similar (Escobar et al, 1997; Gómez-Palacio y Escobar 2008; Schjetnan y Escobar 2010)

En el grupo 10dAK la estimulación de alta frecuencia no fue capaz de inducir LTP (Figura 14C) no observándose un incremento significativo del promedio de la pendiente (105.02 ± 0.258). No obstante el grupo 10dSham logra presentar LTP con un incremento promedio de 141.372 ± 0.720 (Figura 14D).

En los grupos 25dAK y 25dSham fue posible inducir LTP (Figura 14E y F). Para el grupo 25dAK se registró un incremento promedio de 132.103 ± 0.649 y para el grupo 25dSham de 152.281 ± 0.922 . De manera similar el fenómeno pudo observarse tanto para el grupo 60dAK como para 60dSham (Figura 14G y H), reportando un incremento de 147.204 ± 0.537 y de 132.681 ± 0.651 , respectivamente

Se realizó un ANOVA de medidas repetidas que muestra diferencias significativas entre los grupos ($F_{(6,23)}=7.156$, $p<0.01$). La prueba post-hoc de Fisher muestra diferencias significativas ($p<0.01$) entre el grupo 10dAK y el resto de los grupos.

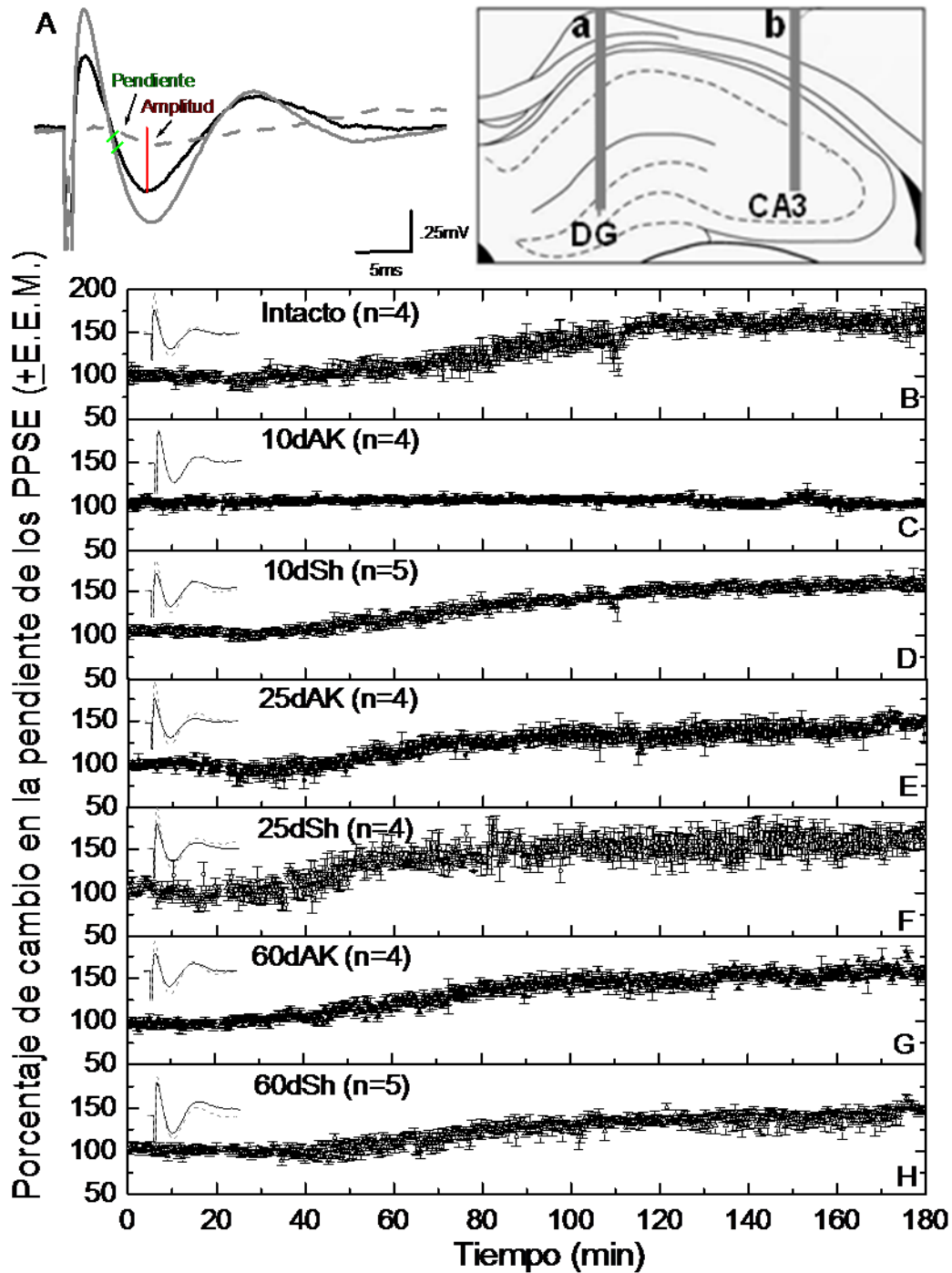


Figura 14. (A, panel izquierdo) Trazo representativo de los PPSE, obtenidos de la línea base (línea negra continua), así como de la señal posterior a los trenes de estimulación (línea gris continua) y después de la aplicación de DCG-IV (línea gris punteada), el cual decrementó a un 15% las respuestas evocadas. (A, panel derecho) Se muestra la posición del electrodo de registro en CA3 y del electrodo de estimulación en GD. Panel inferior: registro electrofisiológico de la LTP *in vivo* en la vía del GD a CA3; los registros corresponden a: (B) Grupo Intacto, (C) 10dAK (D) 10dSham, (E) 25dAK, (F) 25dSham, (G) 60dAK y (H) 60dSham. Se muestra la pendiente de los PPSE durante los primeros 20 minutos que corresponden a la línea base, posterior a los cuales se administraron los trenes de alta frecuencia. Por último se procedió a

un registro durante 3 horas para observar los cambios porcentuales en la pendiente de los PPSE (cambios en la eficiencia sináptica). El fenómeno se caracterizó por un incremento inicial lento en la pendiente de todos los grupos, con excepción del grupo 10dAK, logrando un incremento promedio de (B) 147.71 ± 1.45 , (D) 141.372 ± 0.720 , (E) 132.103 ± 0.649 , (F) 152.281 ± 0.922 , (G) 147.204 ± 0.537 y (H) 132.681 ± 0.651 . El grupo 10dAK no presentó LTP registrando un incremento, parecido a la línea base, de 105.02 ± 0.258 .

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se encontró que el GD del hipocampo es capaz de reorganizarse morfológica, funcional y electrofisiológicamente a través del tiempo, correlacionando con el incremento en el número de nuevas neuronas maduras en la misma estructura.

En las últimas décadas el estudio de procesos y mecanismos que subyacen a eventos como el aprendizaje, la memoria, el pensamiento y, el lenguaje han sido de interés para la investigación neurocientífica. Sin embargo no es sólo la búsqueda de los mecanismos que subyacen a tales procesos cognitivos lo que ha llevado al creciente interés de la investigación básica, sino también, la posibilidad de encontrar estrategias que permitan su manipulación y restauración en procesos de envejecimiento o neurodegeneración. Es en este marco que surge el campo de estudio de la neuroreparación, como la serie de procesos por los cuales el SNC puede hacer uso de su capacidad plástica para autorepararse y modificarse ante un daño. Existen diversos mecanismos de plasticidad cerebral (sinaptogénesis, axogénesis, modificaciones bioquímicas y electrofisiológicas y neurogénesis) que promueven el rearrreglo de un circuito en condiciones fisiológicas (por ejemplo: modificaciones producidas por aprendizaje o memoria), pero también en condiciones patológicas, es decir, después de producir una lesión al SNC (Zepeda et al., 2004).

La neurogénesis en las últimas décadas ha tomado importancia como un posible mecanismo de neuroreparación en la etapa adulta del mamífero. Esto a partir de que dicho evento se ha visto exacerbado después de diversos procesos de lesión experimental (Gray et al., 1998; Sharfman et al., 2000; Dong et al., 2003; Hoglinger et al., 2004; Sun et al., 2007; Hattiangady et al., 2008; para una revisión

de lesión por isquemia Zepeda et al 2009). Sin embargo, aun se desconoce si la neurogénesis que ocurre en los nichos neurogénicos posterior a una lesión es parte de la respuesta de daño o juega algún papel en la reorganización estructural.

Es un hecho aceptado que la lesión a una zona del SN provoca la pérdida o alteración de las funciones asociadas a dicha área. Sin embargo, también se ha visto que la misma conducta alterada o perdida, tiende a recuperarse a través del tiempo después de haber sufrido un daño (Brailowsky et al, 1992). Así, el propósito de este trabajo fue analizar si existía una recuperación funcional (conductual y electrofisiológica) asociada a la integración de nuevas neuronas que promoviera una reorganización anatómica del GD del hipocampo.

En el presente trabajo se corroboró que existe una reorganización anatómica del GD de ratas adultas (de la capa granular) posterior una lesión con AK a una dosis subepileptogénica, como lo han demostrado otros trabajos (Ogita et al., 2005 y Hernández-Ortega et al., 2007). Diez días después de la administración del AK, el análisis histológico reveló la presencia de una lesión en la capa granular del GD, la cual se observó adelgazada y en algunos sectores interrumpida por completo. También se observó un incremento en la cantidad de células picnóticas tanto en la capa granular, como en el hilus y en las regiones CA1, y CA3, las cuales presentan una lesión considerable debido a la alta densidad de receptores AMPA/Kainato en las neuronas piramidales de esas regiones (Nusser Z. 1999). A los 25 y 60 días se observa que la capa granular se encuentra reconstituida o reorganizada, sin embargo aún se observan células picnóticas, algunas deformidades en la anatomía general del GD y una constante ausencia de neuronas piramidales en CA1 y CA3 (Figura 7).

El análisis estereológico con la prueba Cavalieri corroboró una reducción de casi el 50% del volumen total de la capa granular de los sujetos del grupo 10dAK, significativamente menor que el volumen en los otros tres grupos (25dAK, 60dAK y Sham/Intacto), (Figura 8 y Tabla 4). En otras palabras, el GD de la rata se reorganiza a los 25 y 60 días después de la lesión con AK, y correlaciona con un incremento en el número total de células, lo que lleva a un aumento en el volumen

de la capa granular. A pesar de esta verificación de reorganización morfológica, la técnica de Nissl no permitía asegurar que fueran neuronas las células que estaban aumentando el volumen de la capa del GD en estos sujetos. Por ello, se decidió evaluar el linaje de las células que constituían el GD de los sujetos de todos los grupos. Se evaluó la densidad de 4 diferentes marcadores histológicos, uno propio de proliferación celular (BrdU) y los otros 3 correspondientes a diferentes linajes y etapas de maduración neuronal y de glía: doblecortina (DCX), que es una proteína que promueve la polimerización de los microtúbulos y se expresa en neuronas jóvenes (de 4 días a 2 semanas después de nacidas) en migración; GFAP, que es una proteína de citoesqueleto de astrocitos y así mismo marcador de glía radial (precursores neurales); y NeuN, que es una proteína de matriz nuclear expresada en neuronas maduras e integradas al circuito del GD.

En un inicio, se intentó evaluar la co-localización entre BrdU y los otros marcadores, lo que permitiría determinar el linaje que adquirieron las células que nacieron después de la lesión. Sin embargo, al momento de evaluar el tejido procesado para la doble inmunohistoquímica se observó que el BrdU era prácticamente indetectable a los 25dAK y 60dAK. Existen grupos que reportan que la cantidad de células BrdU positivas tiende a disminuir entre 50 y 76% a partir de las 4 semanas de haberse inyectado, argumentando que la disminución se podría deber a la muerte de las células o a la dilución del análogo en las células hijas (Dayer et al., 2003). Aún cuando en el presente trabajo se empleó la dosis de BrdU más baja reportada en la literatura, que pudiera marcar células en proliferación de manera asintótica, la técnica no permitió realizar un análisis apropiado de co-localización.

Sin embargo, empleando los diferentes marcadores de proliferación neuronal, se encontró un incremento en la tasa neurogénica posterior a una lesión, lo que coincide con lo reportado en otros estudios (Gray et al., 1998; Sharfman et al., 2000; Dong et al., 2003; Hoglinger et al., 2004; Sun et al., 2007; Hattiangady et al., 2008). Se corroboró un aumento en DCX en el grupo 10dAK, lo cual indica un incremento en la cantidad de neuronas jóvenes. Esta fue disminuyendo a lo largo

del tiempo y hacia los 25d post-lesión, la densidad de la marca era parecida a la de los grupos 60dAK y Sham/Intacto (Figura 9). Este resultado sugiere que como consecuencia de la lesión ocurren dos eventos 1) células de tipo 2, DCX positivas inician su maduración y 2) se activa el proceso de proliferación celular y de neurogénesis. Sin embargo, trabajos anteriores han mostrado que hasta un 90% de células en fase S del ciclo celular colocalizan con células DCX positivas, (Rao y Shetty, 2004) y que el aumento de DCX se ocurre tan rápido como 24 h después de la lesión (Michel Gabriela, tesis de licenciatura).

En este caso la presencia de células DCX-positivas 10 días después de la lesión, apoya la idea de que estas células siguen sosteniendo la neurogénesis posterior a la lesión, pues la ventana de expresión de esta proteína dura entre 4 días y 2 semanas, aproximadamente, después de nacida la célula (Ming y Song 2005). Recientemente, en el laboratorio se realizó un trabajo que evaluó la expresión temporal de diversos marcadores de proliferación y maduración neuronal después de una lesión con AK (Tesis de Licenciatura, Gabriela Michel C. 2010). En este trabajo se observó un incremento importante en los precursores neurales (Blbp), y en proliferación celular (PCNA), así como en neuronas jóvenes (DCX) después de 7 días de realizada la lesión, de la misma manera, se observó un aumento en células Calretinina positivas (CalR) (proteína de unión a Calcio, propia de neuronas jóvenes, postmitóticas) desde las 24 horas después de la lesión y manteniéndose hacia los 7 días después de la misma. Lo anterior indica que después de una lesión se desencadena una serie de eventos que dan lugar a un incremento en la proliferación celular y en la tasa neurogénica identificada por la presencia de neuronas DCX- positivas, apoyando los resultados obtenidos en este trabajo.

Entre los primeros eventos que ocurren posteriores a una lesión nerviosa, se encuentra la activación de la glía. El papel que puede representar la glia en un proceso de lesión en el SNC está bien caracterizado. En varios trabajos se ha visto que después de un daño se forma la llamada cicatriz glial, constituida de astrocitos reactivos y microglia principalmente. Estos astrocitos presentan un

incremento en la formación de filamentos intermedios, lo cual les da justamente el aspecto de fibrosos y de ahí su nombre de astrocitos fibrosos o reactivos (Para una revisión ver Nieto-Sampedro et al., 2002 o Sofroniew 2009), de tal manera que la marca que presentan estos astrocitos es más intensa y la medición de densidad incrementa, como se corroboró en este trabajo. En los sujetos de los grupos 10dAK y 25dAK se da una respuesta glial tal que la densidad de marca es superior a la marca de los grupos Sham/Intacto y 60dAK. La observación del tejido confirmó que los astrocitos tienen la morfología típica de glía reactiva. Sin embargo, tanto en la cresta, como en la capa dorsal del GD se podían observar algunas células gliales con morfología radial (Figura 10). Esto podría indicar no solo la respuesta esperada de gliosis ante una lesión, sino un incremento en la glía radial y por tanto en precursores neurales como algunos grupos han afirmado (Tramontino AD et al., 2003; Kuhn et al, 2001; Sharp et al., 2002; Robel et al 2011).

NeuN, como anteriormente se mencionó, es una proteína nuclear propia de neuronas maduras e integradas a un circuito. El análisis de densidad de marca de NeuN reveló que existen más células NeuN positivas en el GD de los sujetos de los grupos 25dAK y 60dAK en comparación al grupo 10dAK. Esto indica que después de la lesión los sujetos del grupo 10dAK muestran una reducción importante en cantidad de neuronas maduras (disminución en la densidad de marca) y que a los 25 y 60 días posteriores los sujetos logran recuperar neuronas (aumento en densidad de marca) en cantidades equiparables a los niveles del grupo Sham/Intacto (Figura 11). Este dato, en conjunto con resultados de la prueba Cavalieri, permiten concluir que el aumento en el volumen a lo largo del tiempo en la capa granular está dado por la presencia de neuronas maduras y no por cicatrización glial o microglia.

Si bien encontramos una asociación entre el aumento en nuevas neuronas y la integración de las mismas a la reorganización anatómica, esto no indica que las nuevas neuronas sean funcionales, es decir, que sirvan al sistema al que se están integrando. Muy pocos trabajos han estudiado las repercusiones que tiene la

neurogénesis a nivel funcional después de una lesión. Un par de trabajos revelan que posterior a una lesión isquémica hay proliferación de nuevas neuronas en la región CA1 del hipocampo y que esto se asocia con una mejora en la ejecución de la tarea espacial del laberinto de agua de Morris (Nakatomi et al., 2002; Bendel et al., 2005).

El objetivo de evaluar la ejecución de pruebas de memoria dependientes del GD y analizar el establecimiento de la LTP en los sujetos después de la lesión fue poder asociar la recuperación funcional y la capacidad plástica de la vía, con la reorganización morfológica observada a través del tiempo. La evaluación del campo abierto (CA) y del reconocimiento de lugar (RL), sirvieron como controles para verificar: 1) que la motricidad de los sujetos sometidos al protocolo de CAC, se hallaba en condiciones óptimas, lo cual indicó que la inmovilidad observada en los sujetos era producto de la aversión generada ante las condiciones experimentales y no a un déficit motor, (esto apoyó el subsecuente resultado de que la inmovilidad observada en los sujetos de los grupos 25dAK y 60dAK fue producto del recuerdo del contexto aversivo) y 2) que el daño provocado a CA1 por la difusión del AK o por el daño mecánico con el inyector de infusión no fueron lo suficientemente graves como para provocar un déficit conductual y por tanto un efecto secundario de la observación principal de este trabajo (que era la lesión focal sobre el GD) (Figura 12) .

La memoria aversiva contextual (MAC) está modulada por el GD y varios trabajos han reportado que cuando se daña el GD, los sujetos no recuerdan la aversión a un contexto en específico (Lee y Kesner, 2004; Saxe et al., 2006). Sin embargo los sujetos con el GD intacto, si muestran una conducta de miedo asociada a algún otro tipo de estímulos (como por ejemplo sonidos). En este trabajo se corroboró que los sujetos con lesión del GD (10dAK), fueron incapaces de recordar un contexto aversivo, aunque si recordaron un estímulo aversivo condicionado (tono) No obstante, en los sujetos de los grupos 25dAK y 60dAK, se observó una recuperación en la MAC, apoyando la idea de que la reorganización morfológica y los incrementos en nuevas neuronas pueden estar involucrados en dicha

reorganización funcional (Figura 13). La asociación observada en este trabajo entre reorganización morfológica (volumen celular e incrementos en DCX y NeuN) y conductual después de una lesión en un nicho neurogénico no se había reportado anteriormente.

Por último para evaluar un parámetro de reorganización sináptica a nivel electrofisiológico se aplicó un protocolo de LTP *in vivo* en los sujetos de estudio. A partir de esta evaluación se mostró que efectivamente la vía que va del GD a CA3 no genera una LTP a los 10d posteriores a la lesión con AK, sin embargo en los grupos 25dAK y 60dAK se indujo una LTP de magnitud comparable con los grupos sham e Intacto (Figura 14). Esto indica que 25 y 60 días posteriores a la lesión, la vía se recupera y genera una LTP prácticamente normal. Estos datos apoyan la idea de que las neuronas nuevas que se generaron posterior al daño, también se integraron a la circuitería del GD (o al menos una población de ellas suficientes para sostener la LTP). En este sentido existe amplia evidencia que apoya la integración funcional de nuevas neuronas en el GD a nivel electrofisiológico (van Praag et al., 1999; Pujadas et al., 2010); y neuroquímico (Ramirez-Amaya et al., 2006; Ge et al., 2006).

El modelo empleado en esta investigación tiene la ventaja de que la estructura blanco (el GD) es un nicho neurogénico y que además tiene una función conductual bien definida, lo cual facilitó el estudio de las correlaciones entre el daño con AK y la recuperación estructural observada a través del tiempo. Además las nuevas neuronas que nacieron posteriores a la lesión no tuvieron que migrar a otras zonas e intentar integrarse a un circuito de neuronas con un linaje diferente al de ellas, lo que se ha planteado como una limitante importante en la neuroreparación.

Algunos grupos argumentan que las lesiones pueden influir en la velocidad de proliferación, maduración o en la manera como las nuevas neuronas se integran a los circuitos (Parent et al., 1997; Deisseroth et al., 2004; Overstreet-Wadiche et al., 2006). Es posible que la velocidad de integración y maduración de las nuevas neuronas se modifique, promoviendo una más rápida realización de estos

procesos en pos de recuperar prontamente la homeostasis del sistema, sin embargo esto no se ha comprobado aún, aunque es posible que en este trabajo los niveles altos de DCX y NeuN se deban también a una maduración e integración más rápida de las neuronas al circuito, resultado de la producción de factores endógenos en respuesta al daño, como ha sido sugerido recientemente (Yoneyama et al., 2011).

Para poder asegurar que la neurogénesis tiene un papel fundamental en la recuperación conductual y electrofisiológica observada, no es suficiente con los experimentos realizados, pues siempre se puede argumentar que existen otros mecanismos de plasticidad neuronal que pueden estar participando. Una prueba fehaciente del papel de la neurogénesis sería abatir ésta y realizar los mismos protocolos de estudio conductual y de LTP. Sin embargo, la posibilidad de la neurogénesis como mecanismo de reparación después de una lesión abre la puerta a la búsqueda y desarrollo de futuras estrategias terapéuticas y de manipulación biológica que puedan promover o acelerar los mecanismos de reparación del SNC después de sufrir un daño.

REFERENCIAS

1. Altman J, Das GD. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. J Comp Neurol. 124(3):319-35.
2. Altman J, Das GD. (1966). Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. I. 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(3):337-89.
3. Alvarez-Buylla A. (1992). Neurogenesis and plasticity in the CNS of adult birds. Exp Neurol. 115(1):110-4.
4. Alvarez-Buylla A, Lim DA. (2004). For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. Neuron. 41(5):683-6.
5. Anagnostaras SG, Maren S y Fanselow M. (1999). Temporally graded retrograde amnesia of contextual fear after hippocampal damage in rats: within-subjects examination. J Neurosci. 19(3):1106–1114.
6. Andersen P. (2007). The hippocampus book. EU: Oxford University Press. pp: 832.
7. Bayer SA, Yackel JW y Puri S. (1982). Neurons in the rat dentate gyrus granular layer substantially increase during juvenile and adult life. Science. 216(4548): 890-892.
8. Bendel O, Bueters T, von Euler M, Ove Ogren S, Sandin J, von Euler G. (2005). Reappearance of hippocampal CA1 neurons after ischemia is associated with recovery of learning and memory. J Cereb Blood Flow Metab. 25(12):1586-95.
9. Bhardwaj RD, Curtis MA, Spalding KL, Buchholz BA, Fink D, Björk-Eriksson T, Nordborg C, Gage FH, Druid H, Eriksson PS, Frisén J. (2006).

- Neocortical neurogenesis in humans is restricted to development. Proc Natl Acad Sci U S A. 103(33):12564-8.
10. Boss BD, Peterson GM y Cowan WM. (1985). On the number of neurons in the dentate gyrus of the rat. Brain Res. 338: 144—150.
 11. Brailowsky, S., Stein, D., y Will, B. (1992). El Cerebro Averiado. (1a ed.). México: Fondo de Cultura Económica.
 12. Brun VH, Otnass MK, Molden S, Steffenach HA, Witter MP, Moser MB y Moser EI. (2002). Place cells and place recognition maintained by direct entorhinal-hippocampal circuitry. Science. 296(5576):2243-6.
 13. Calixto E, Thiels E, Klann E y Barrionuevo G. (2003). Early maintenance of hippocampal mossy fiber--long-term potentiation depends on protein and RNA synthesis and presynaptic granule cell integrity. J Neurosci. 23(12):4842-9.
 14. Cameron HA, Woolley S, McEwen y Gould E. (1993). Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. Neurosci. 56(2): 337-344.
 15. Cameron HA y McKay RDG. (2001). Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. J Comp Neurol. 435:406–417.
 16. Chambers RA, Potenza MN, Hoffman RE y Miranker W. (2004). Simulated apoptosis/neurogenesis regulates learning and memory capabilities of adaptive neural networks. Neuropsychopharmacology. 29(4):747-58.
 17. Dayer AG, Ford AA, Cleaver KM, Yassaee M y Cameron HA. (2003). Short-term and long-term survival of new neurons in the rat dentate gyrus. J Comp Neurol. 460:563–572.

18. De Oca BM, DeCola JP, Maren S, Fanselow MS. (1998). Distinct regions of the periaqueductal gray are involved in the acquisition and expression of defensive responses. J Neurosci. 18(9):3426-32.
19. Deisseroth K, Singe S, Toda H, Monje M, Palmer TD y Malenka RC. (2004). Excitation-neurogenesis coupling in adult neural stem/progenitor cells. Neuron. 42: 535–552.
20. Dong H, Csernansky CA, Goico B, Csernansky JG. (2003). Hippocampal neurogenesis follows kainic acid-induced apoptosis in neonatal rats. J Neurosci. 23(5):1742-9.
21. Ehninger D, Kempermann G. (2008). Neurogenesis in the adult hippocampus. Cell Tissue Res. 331(1):243-50.
22. Ennaceur A, Neave N, Aggleton JP. (1997). Spontaneous object recognition and object location memory in rats: the effects of lesions in the cingulate cortices, the medial prefrontal cortex, the cingulum bundle and the fornix. Exp Brain Res. 113(3):509-19.
23. Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. Nat Med. 4(11):1313-7.
24. Escobar ML, Barea-Rodríguez EJ, Derrick BE, Reyes JA, Martínez JL Jr. (1997). Opioid receptor modulation of mossy fiber synaptogenesis: independence from long-term potentiation. Brain Res. 751(2):330-5.
25. Gage FH, Coates PW, Palmer TD, Kuhn HG, Fisher LJ, Suhonen JO, Peterson DA, Suhr ST, Ray J. (1995). Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. Proc Natl Acad Sci U S A. 92(25):11879-83.
26. Gage FH. (2000). Mammalian neural stem cells. Science. 287(5457):1433-8.

27. Garcia AD, Doan NB, Imura T, Bush TG, Sofroniew MV. (2004). GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. Nat Neurosci. 7(11):1233-41
28. Ge S, Goh ELK, Sailor KA, Kitabatake Y, Ming G y Song H. (2006). GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. Nature. 439(7076): 589–593.
29. Gasper ER, Llorens-Martin MV, Leuner B, Gould E, Trejo JL. (2009). Blockade of insulin-like growth factor-I has complex effects on structural plasticity in the hippocampus. Hippocampus.
30. Goldman SA, Nottebohm F. (1983). Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. Proc Natl Acad Sci U S A. 80(8):2390-4.
31. Gómez-Palacio-Schjetnan A, Escobar ML. (2008). In vivo BDNF modulation of adult functional and morphological synaptic plasticity at hippocampal mossy fibers. Neurosci Lett. 445(1):62-7.
32. Gould E, Woolley CS, McEwen BS. (1990). Short-term glucocorticoid manipulations affect neuronal morphology and survival in the adult dentate gyrus. Neuroscience. 37(2):367-75.
33. Gould E, Beylin A, Tanapat P, Reeves A, Shors TJ. (1999a). Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. Nat Neurosci. 2(3):260-5.
34. Gould E, Reeves AJ, Fallah M, Tanapat P, Gross CG, Fuchs E. (1999b). Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates. Proc Natl Acad Sci U S A. 96(9):5263-7.
35. Gray WP, Sundstrom LE. (1998). Kainic acid increases the proliferation of granule cell progenitors in the dentate gyrus of the adult rat. Brain Res. 790(1-2):52-9.

36. Hattiangady B, Rao MS, Shetty AK. (2008). Plasticity of hippocampal stem/progenitor cells to enhance neurogenesis in response to kainate-induced injury is lost by middle age. Aging Cell. 7(2):207-24.
37. Hernández-Ortega K, Ferrera P, Arias C. (2007). Sequential expression of cell-cycle regulators and Alzheimer's disease-related proteins in entorhinal cortex after hippocampal excitotoxic damage. J Neurosci Res. 85(8):1744-51.
38. Hernández-Rabaza V, Llorens-Martín M, Velázquez-Sánchez C, Ferragud A, Arcusa A, Gumus HG, Gómez-Pinedo U, Pérez-Villalba A, Roselló J, Trejo JL, Barcia JA, Canales JJ. (2009). Inhibition of adult hippocampal neurogenesis disrupts contextual learning but spares spatial working memory, long-term conditional rule retention and spatial reversal. Neuroscience. 159(1):59-68.
39. Höglinger GU, Rizk P, Muriel MP, Duyckaerts C, Oertel WH, Caille I, Hirsch EC. (2004). Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. Nat Neurosci. 7(7):726-35.
40. Holopainen IE. (2008). Seizures in the developing brain: Cellular and molecular mechanisms of neuronal damage, neurogenesis and cellular reorganization. Neurochem Int. 52: 935–947.
41. Jin K, Minami M, Lan JQ, Mao XO, Bateur S, Simon RP y Greenberg DA. (2001). Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. Proc Natl Acad Sci U S A. 98(8): 4710–4715.
42. Kaplan MS, Hinds JW. (1977). Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. Science. 197(4308):1092-4.
43. Kaplan MS, Bell DH. (1984). Mitotic neuroblasts in the 9-day-old and 11-month-old rodent hippocampus. J Neurosci. 4(6):1429-41.

44. Kawai T, Takagi N, Miyake-Takagi K, Okuyama N, Mochizuki N y Takeo S. (2004). Characterization of BrdU-positive neurons induced by transient global ischemia in adult hippocampus. J Cereb Blood Flow Metab. 24:548–555.
45. Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. (1997). More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. Nature. 386(6624):493-5.
46. Kempermann G. (2002). Why new neurons? Possible functions for adult hippocampal neurogenesis. J Neurosci. 22(3):635-8.
47. Kempermann G y Neumann H. (2003). Microglia: The Enemy Within? Neurosci. 302: 1689-1690.
48. Kempermann G, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G. (2004). Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. Trends Neurosci. 27(8):447-52.
49. Kempermann G. (2008). The neurogenic reserve hypothesis: what is adult hippocampal neurogenesis good for? Trends Neurosci. 31(4):163-9.
50. Kesner RP, Lee I, Gilbert P. (2004). A behavioral assessment of hippocampal function based on a subregional analysis. Rev Neurosci. (5):333-51.
51. Kolb B, Morshead C, Gonzalez C, Kim M, Gregg C, Shingo T, Weiss S. (2007). Growth factor-stimulated generation of new cortical tissue and functional recovery after stroke damage to the motor cortex of rats. J Cereb Blood Flow Metab. 27(5):983-97.
52. Kornack DR, Rakic P. (2001). Cell proliferation without neurogenesis in adult primate neocortex. Science. 294(5549):2127-30.
53. Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH. (1996). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. J Neurosci. 16(6):2027-33.

54. Kuhn HG, Palmer TD y Fuchs E. (2001). Adult neurogenesis: a compensatory mechanism for neuronal damage. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci. 251: 152–158.
55. Leal-Galicia P, Castañeda-Bueno M, Quiroz-Baez R, Arias C. (2008). Long-term exposure to environmental enrichment since youth prevents recognition memory decline and increases synaptic plasticity markers in aging. Neurobiol Learn Mem. 90(3):511-8.
56. Lee E, Son H. (2009). Adult hippocampal neurogenesis and related neurotrophic factors. BMB Rep. 42(5):239-44.
57. Lee I, Kesner RP. (2004). Differential contributions of dorsal hippocampal subregions to memory acquisition and retrieval in contextual fear-conditioning. Hippocampus. 14(3):301-10.
58. Lee J, Duan W, Mattson MP. (2002). Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice. J Neurochem. 82(6):1367-75.
59. Lois C, Alvarez-Buylla A. (1993). Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. Proc Natl Acad Sci U S A. 90(5):2074-7.
60. Lynch G, Kessler M, Arai A, Larson J. (1990). The nature and causes of hippocampal long-term potentiation. Prog Brain Res. 83:233-50.
61. Ma DK, Bonaguidi MA, Ming GL, Song H. (2009). Adult neural stem cells in the mammalian central nervous system. Cell Res. 19(6):672-82.
62. Ma DK, Marchetto MC, Guo JU, Ming G, Gage F y Song H. (2010). Epigenetic choreographers of neurogenesis in the adult mammalian brain. Rev Nat Neurosci. 13(11): 1338-1344.

63. Magavi SS, Leavitt BR, Macklis JD. (2000). Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. Nature. 405(6789):951-5.
64. Masuda T, Isobe Y, Aihara N, Furuyama F, Misumi S, Kim TS, Nishino H y Hida H. (2007). Increase in neurogenesis and neuroblast migration after a small intracerebral hemorrhage in rats. Neurosci Lett. 425: 114–119.
65. Michel Chávez Gabriela (2010). Tesis de licenciatura: Papel de la neurogénesis den la reorganización estructural del giro dentado de la rata después de una lesión excitotóxica. Directora: Clorinda Arias Álvarez.
66. Ming GL, Song H. (2005). Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. Annu Rev Neurosci. 28:223-50.
67. Mu Y, Lee SW y Gage F. (2010). Signaling in adult neurogénesis. Curr Op Neurobiol. 20:416–423.
68. Mumby DG, Gaskin S, Glenn MJ, Schramek TE, Lehmann H. (2002). Hippocampal damage and exploratory preferences in rats: memory for objects, places, and contexts. Learn Mem. 9(2):49-57.
69. Nakatomi H, Kuriu T, Okabe S, Yamamoto S, Hatano O, Kawahara N, Tamura A, Kirino T y Nakafuku M. (2002). Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. Cell. 110: 429–441
70. Naylor M, Bowen KK, Sailor KA, Dempsey RJ, Vemuganti R. (2005). Preconditioning-induced ischemic tolerance stimulates growth factor expression and neurogenesis in adult rat hippocampus. Neurochem Int. 47(8):565-72.
71. Nieto-Sampedro M, Collazos-Castro Je, Taylor JS, Gudiño-Cabrera G, Verdú-Navarro E, Pascual-Piedrola JI e Insausti-Serrano R. (2002). Trauma en el sistema nervioso central y su reparación. Rev Neurol. 35: 534-552.

72. Nowakowski RS, Lewin SB, Miller MW. (1989). Bromodeoxyuridine immunohistochemical determination of the lengths of the cell cycle and the DNA-synthetic phase for an anatomically defined population. J Neurocytol. 18(3):311-8.
73. Nusser Z. (1999). A new approach to estimate the number, density and variability of receptors at central synapses. Eur J Neurosci. 11(3):745-52.
74. Ogita K, Nishiyama N, Sugiyama C, Higuchi K, Yoneyama N y Yoneda Y. (2005). Regeneration of granule neurons after lesioning of hippocampal dentate gyrus: evaluation using adult mice treated with trimethyltin chloride as a model. J Neurosc Res. 82:609–621
75. Ohab JJ, Fleming S, Blesch A, Carmichael ST. (2006). A neurovascular niche for neurogenesis after stroke. J Neurosci. 26(50):13007-16.
76. Okano H, Sakaguchi M, Ohki K, Suzuki N y Sawamoto K. (2007). Regeneration of the central nervous system using endogenous repair mechanisms. J Neurochem. 102: 1459–1465.
77. Overstreet-Wadiche LS, Bromberg DA, Bensen AL y westbrook G. (2006). Seizures accelerate functional integration of adult-generated granule cells. J Neurosci. 26(15):4095– 4103.
78. Palmer TD, Ray J, Gage FH. (1995). FGF-2-responsive neuronal progenitors reside in proliferative and quiescent regions of the adult rodent brain. Mol Cell Neurosci. 6(5):474-86.
79. Palmer TD, Markakis EA, Willhoite AR, Safar F Y Gage FH. (1999). Fibroblast Growth Factor-2 Activates a Latent Neurogenic Program in Neural Stem Cells from Diverse Regions of the Adult CNS. J. Neurosci. 19(19):8487–8497.
80. Parent JM, Yu Tw, Leibowitz RT, Geschwind DH, Sloviter RS y Lowenstein DH. (1997). Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and

- contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus.
J Neurosci. 17(10):3727–3738.
81. Paxinos G y Watson C. (1982). The rat brain in stereotaxic coordinates.
82. Phillips RG, LeDoux JE. (1992). Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. Behav Neurosci. 106(2):274-85.
83. Pinheiro P y Mulle C. (2006). Kainate receptors. Cell Tissue Res. 326:457–482.
84. Pujadas L, Gruart A, Bosch C, Delgado L, Teixeira CM, Rossi D, de Lecea L, Martínez A, Delgado-García JM y Soriano E. (2010). Reelin regulates postnatal neurogenesis and enhances spine hypertrophy and long-term potentiation. J Neurosci. 30(13):4636-49.
85. Ramirez Amaya V, Marrone DF, Gage F, Worley PF y Barnes CA. (2006). Integration of new neurons into functional neural networks. J Neurosci. 26(47):12237–12241.
86. Rao MS y Shetty AK. (2004). Efficacy of doublecortin as a marker to analyse the absolute number and dendritic growth of newly generated neurons in the adult dentate gyrus. Eur J Neurosci. 19(2):234-46.
87. Rietze R, Poulin P, Weiss S. (2000). Mitotically active cells that generate neurons and astrocytes are present in multiple regions of the adult mouse hippocampus. J Comp Neurol. 424(3):397-408.
88. Robel S, Berninger B y Götz M. The stem cell potential of glia: lessons from reactive gliosis. Nature. 12:88-104.
89. Saxe MD, Battaglia F, Wang JW, Malleret G, David DJ, Monckton JE, Garcia AD, Sofroniew MV, Kandel ER, Santarelli L, Hen R, Drew MR. (2006). Ablation of hippocampal neurogenesis impairs contextual fear

- conditioning and synaptic plasticity in the dentate gyrus. Proc Natl Acad Sci U S A. 103(46):17501-6.
90. Scharfman HE, Goodman JH, Sollas AL. (2000). 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(16):6144-58.
91. Schjetnan AG, Escobar ML. (2010). In vivo BDNF modulation of hippocampal mossy fiber plasticity induced by high frequency stimulation. Hippocampus. doi: 10.1002/hipo.20866.
92. Schlessinger AR, Cowan WM, Gottlieb DI. (1975). An autoradiographic study of the time of origin and the pattern of granule cell migration in the dentate gyrus of the rat. J Comp Neurol. 159(2):149-75.
93. Seri B, García-Verdugo JM, McEwen BS, Alvarez-Buylla A. (2001). Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. J Neurosci. 21(18):7153-60.
94. Seri B, Herrera DG, Gritti A, Ferron S, Collado L, Vescovi A, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. (2006). Composition and organization of the SCZ: a large germinal layer containing neural stem cells in the adult mammalian brain. Cereb Cortex. 16 Suppl 1:1103-11.
95. Sharp FR, Liu J, Bernabeu R. (2002). Neurogenesis following brain ischemia. Brain Res Dev Brain Res. 134(1-2):23-30.
96. Shimazu K, Zhao M, Sakata K, Akbarian S, Bates B, Jaenisch R, Lu B. (2006). NT-3 facilitates hippocampal plasticity and learning and memory by regulating neurogenesis. Learn Mem. 13(3):307-15.
97. Sofroniew MV. (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. Cell. 32(12): 638-647.

98. Steiner B, Wolf S, Kempermann G. (2006). Adult neurogenesis and neurodegenerative disease. Regen Med. 1(1):15-28.
99. Suhonen JO, Peterson DA, Ray J, Gage FH. (1996). Differentiation of adult hippocampus-derived progenitors into olfactory neurons in vivo. Nature. 1996. 383(6601):624-7.
100. Sun D, McGinn MJ, Zhou Z, Harvey HB, Bullock MR, Colello RJ. (2007). Anatomical integration of newly generated dentate granule neurons following traumatic brain injury in adult rats and its association to cognitive recovery. Exp Neurol. 204(1):264-72.
101. Taliaz D, Stall N, Dar DE, Zangen A. (2009). Knockdown of brain-derived neurotrophic factor in specific brain sites precipitates behaviors associated with depression and reduces neurogenesis. Mol Psychiatry. 15(1):80-92.
102. Tonchev AB, Yamashima T, Sawamoto K y Okano H. (2005). Enhanced proliferation of progenitor cells in the subventricular zone and limited neuronal production in the striatum and neocortex of adult macaque monkeys after global cerebral ischemia. J Neurosci Res. 81:776–788.
103. Tramontin AD, García-Verdugo JM, Lim DA, Alvarez-Buylla A. (2003). Postnatal development of radial glia and the ventricular zone (VZ): a continuum of the neural stem cell compartment. Cereb Cortex. 13(6):580-7.
104. Treves A, Tashiro A, Witter MP y Moser EI. (2008). What is the mammalian dentate gyrus good for?. Neurosci. 154: 1155–1172
105. van Praag H, Kempermann G, Gage FH. (1999a). Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. Nat Neurosci. 2(3):266-70.

106. van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage FH. (1999b). Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 96(23):13427-31.
107. van Praag H, Kempermann G, Gage FH. (2000). Neural consequences of environmental enrichment. Nat Rev Neurosci. 1(3):191-8.
108. van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH. (2002). Functional neurogenesis in the adult hippocampus. Nature. 415(6875):1030-4.
109. Von Bohlen y Halbach. (2007). Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus. Cell Tissue Res. 329:409–420.
110. Wada K, Sugimori H, Bhide PG, Moskowitz MA, Finklestein SP. (2003). Effect of basic fibroblast growth factor treatment on brain progenitor cells after permanent focal ischemia in rats. Stroke. 34(11):2722-8.
111. Wang Q, Yu S, Simonyi A, Sun GY y Sun AY. (2005). Kainic acid-mediated excitotoxicity as a model for neurodegeneration. Mol Neurobiol. 31(1–3): 3–16.
112. Yamamoto S, Nagao M, Sugimori M, Kosako H, Nakatomi H, Yamamoto N, Takebayashi H, Nabeshima Y, Kitamura T, Weinmaster G, Nakamura K, Nakafuku M. (2002). Transcription factor expression and Notch-dependent regulation of neural progenitors in the adult rat spinal cord. J Neurosci. 21(24):9814-23.
113. Yoneyama M, Shiba T, Hasebe S, Ogita K. (2011). Adult neurogenesis is regulated by endogenous factors produced during neurodegeneration. J Pharmacol Sci. 115(4):425-32.
114. Yoshimura S, Takagi Y, Harada J, Teramoto T, Thomas SS, Waeber C, Bakowska JC, Breakefield XO, Moskowitz MA. (2001). FGF-2 regulation

of neurogenesis in adult hippocampus after brain injury. Proc Natl Acad Sci U S A. 98(10):5874-9. Epub 2001 Apr 24

115. Zepeda A, Sengpiel F, Guagnelli MA, Vaca L, Arias C. (2004). Functional reorganization of visual cortex maps after ischemic lesions is accompanied by changes in expression of cytoskeletal proteins and NMDA and GABA(A) receptor subunits. J Neurosci. 24(8):1812-21.
116. Zepeda A, Michel G, Aguilar-Arredondo A y Arias C (2009). Neurogenesis after brain stroke: is there a relationship with functional recovery? Current Trends in Neurology. 3:33-44.
117. Zhao M, Momma S, Delfani K, Carlen M, Cassidy RM, Johansson CB, Brismar H, Shupliakov O, Frisen J, Janson AM. (2003). Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. Proc Natl Acad Sci U S A. 100(13):7925-30.
118. Zheng XY, Zhang HL, Luo Q y Zhu J. (2011). Kainic acid-induced neurodegenerative model: potentials and limitations. J Biomed Biotechnol. 2011:457079.