

Facultad de Medicina



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**Astrogliosis-neurogénesis como mecanismo de
reparación neural**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

Doctor en Ciencias Biomédicas

Presenta

M.C. FELIPE ESTRADA ZALET A

Directora de Tesis:

DRA. LIMEI ZHANG

Ciudad Universitaria, 2012.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Comunicación Intercelular del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la UNAM, campus Ciudad Universitaria, bajo la tutoría de la **Dra. Limei Zhang** y el comité tutorial integrado por la **Dra. María Teresa Morales Guzmán** (INB, UNAM) y la **Dra. Alicia Ortega Aguilar** (FM, UNAM). Durante los estudios de doctorado, el autor de la tesis obtuvo generosos apoyos del programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM, y de los donativos de DGAPA-UNAM (PAPIIT) IN210406, IN224407 y CONACyT 46141-M, 49740-R, 61344, 79641 y 127777. El autor contó con una beca CONACyT para estudios de posgrado.

DEDICATORIA

A mi familia

A Li

A la UNAM

A la vida

(en el loco afán de encontrarle sentido)

AGRADECIMIENTOS

A Felipe, mi papá, por otorgarme su vida, su tiempo y después de mucho esfuerzo, su comprensión. Gracias pa por cambiarme la vida al regalarme un violonchelo, por los viernes de tour taquero y por las tardes de comida familiar en la oficina de patología, en las que despertaste mi curiosidad por la medicina y me enseñaste con tu flechita roja a ver células en donde solo podía observar manchas azules, rosas y moradas.

A Patricia, mi mamá, por regalarme mi vida, su vida y dedicarse de lleno a convertirme en lo que soy ahora. Gracias mamita por tu incondicional cariño y entendimiento cuando nadie me comprende, gracias por llevarme al box y por soportar mis suspensiones indefinidas y todas esas citas en “la dirección”. Nada de esto hubiera sido posible sin ti

A Rodrigo y Patricia, mis hermanos, por crecer a mi lado y por todo lo que hemos compartido juntos a lo largo de estos años. Gracias Bruder y Rebru por aguantar mi música, mi ruido y mis locuras.

A Gonzalo, mi hermano, por preguntarme un día acerca del trabajo de parto y posteriormente decidir ser mi compañero en tantos kilómetros recorridos y todos los que faltan por recorrer. Gracias por TODO chiquitín. Hay tantas cosas que se pueden complicar, pero antes muertos que dejar de soñar.

A Juan Carlos, mi hermano, por estar conmigo siempre que lo he necesitado, por toda la música que hemos hecho y toda la que nos falta por hacer. Gracias Mayito por mandarme a buscar acordes a la red y, después de ser digno de ti, permitirme formar a tu lado la blanca hostioidad.

A Kristal, mi amor, por llegar un 20 de abril desde Guadalajara a iluminar mi camino y cambiar el rumbo de mi vida. Gracias Dra. Rodríguez por venir en vacaciones a mi laboratorio justo antes de mi examen aunque insistí en que no lo hiciera, por no alejar su mano de la mía cuando me atreví a tomarla y (desde entonces) por motivarme a viajar tantos kilómetros y a sacar lo mejor de mi persona al estar conmigo a cada momento a pesar de estar tan lejos de mi. Gracias flaquita por escoger compartir toda tu vida conmigo, por tenerme todo el tiempo pensando en ti y por hacerme sentir que nada es imposible cuando te tengo a mi lado.

A Mónica, mi maestra y amiga, por enseñarme a tocar y escucharme hablar. Nunca tendré forma de agradecerte el haber creído en mi cuando nadie más lo hizo mi querida Moni. A ti, con mucho cariño y toda la música.

A Victor y Andreas, por su amistad y por reírse de mí cada vez que hablaba en clase sobre los “insultos cerebrales”. Disculpen mi imprudencia.

A Hugo y Estela. Mis queridos Hugh y Flais, con infinito agradecimiento por todas las Chope, los hermosos marcapulsores neuronales y por haberme abierto las puertas de su laboratorio y de su corazón.

A Vito, mi amigo, compañero de laboratorio y de viaje turístico y mental, por tantas noches en vela... “trabajando”. Mi querido camarada, este trabajo jamás hubiera sido posible sin tu incondicional ayuda. En todos los sentidos: GRACIAS.

A Lana, Itzel, Licha, Javier y Claudine, por compartir tantas mañanas tarde y noches conmigo en el laboratorio y estar a mi lado siempre que lo necesité.

A Limei, mi tutora, amiga y madre académica, por enseñarme la ciencia tal y como debe aprenderse: en familia. Gracias Li por toda la música, por toda tu paciencia, por ayudarme a encontrar la salida del laberinto cada vez que quedé atrapado, por enseñarme el valor de la diligencia y la disciplina y por dejarme formar parte de tu laboratorio y de tu familia, de aquí hasta siempre.

A mi adorada UNAM, por abrirme todas las puertas, darme todo lo que he podido pedir y enseñarme que la única frontera que existe en el conocimiento es la que uno mismo quiera ponerse. MÉXICO, PUMAS, UNIVERSIDAD!

INDICE DE CONTENIDO

<i>I. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DERIVADA</i>	<i>8</i>
<i>II. RESUMEN</i>	<i>10</i>
<i>III. ABSTRACT</i>	<i>12</i>
<i>IV. GENERALIDADES</i>	<i>14</i>
<i>V. ANTECEDENTES DIRECTOS</i>	<i>41</i>
<i>VI. HIPÓTESIS</i>	<i>45</i>
<i>VII. OBJETIVOS</i>	<i>46</i>
<i>VIII. MATERIALES Y MÉTODOS</i>	<i>47</i>
<i>IX. RESULTADOS</i>	<i>54</i>
<i>X. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES</i>	<i>63</i>
<i>XI. BIBLIOGRAFÍA</i>	<i>68</i>

I. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DERIVADA

PUBLICACIONES CIENTÍFICAS

1. **Estrada FS, Hernandez VS, Medina MP, Corona-Morales AA, Gonzalez-Perez O, Vega-Gonzalez A, Zhang L, "Astrogliosis is temporally correlated with enhanced neurogenesis in adult rat hippocampus following a glucoprivic insult". Neurosci Lett. 2009, 459: 109-14.**
2. **Estrada FS, Hernandez VS, López-Hernández E, Corona-Morales AA, Solís H, Escobar A, Zhang L, "Glial Activation in a Pilocarpine Rat Model for Epileptogenesis: a Morphometric and Quantitative Analysis" Neurosci Lett. 2012, 514: 51-56.**

PRESENTACIONES EN CONGRESOS INTERNACIONALES

1. **F.S. Estrada; A.A. Corona Morales; X.G. Perez Medina; L. Zhang, "Adult hippocampal neurogenesis is altered by 2-deoxy-D-glucose administration in a time-dependent manner" 35th annual meeting, Society for Neuroscience, Washington, D.C., U.S.A 2005**
2. **F.S. Estrada, A.A Corona-Morales, V. Hernández, M.P. Medina, A. Vega-González, L. Zhang "A temporal correlation between cell proliferation and astrocytic reactivity in the adult rat hippocampus induced by a single 2-Deoxy-D-glucose application" 38th annual meeting, Society for Neuroscience, Washington, D.C., U.S.A 2008.**
3. **F.S. Estrada, H. Solís, E. López-Hernández, A.A Corona-Morales "Differential effects of pilocarpine dosages on cytoskeletal morphology and density of astrocytes from rat hippocampus: an approach to the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy" 40th annual meeting, Society for Neuroscience, San Diego, Ca., U.S.A 2010.**
4. **F.S. Estrada, L. Zhang "Extra-dentate gyrus neurogenesis and doublecortin expression in rat hippocampus post-pilocarpine insult" 41th annual meeting, Society for Neuroscience, Washington, D.C., U.S.A 2011.**

PLÁTICA INVITADA

- ***“Astrogliosis-neurogénesis como mecanismo de reparación cerebral después de un insulto metabólico”*** Seminario presentado en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la UNAM, el día 04 de junio de 2009.

II. RESUMEN

Los "insultos cerebrales" hacen referencia a estímulos estresantes provenientes tanto del medio orgánico interno como del externo, que amenazan la homeostasis cerebral. El organismo, en respuesta a esta agresión, desata mecanismos de reparación tanto inmediatos como a largo plazo, tales como el reclutamiento de células sanguíneas, la activación glial (reactivación glial o astrogliosis) y la neurogénesis, en un intento por establecer un nuevo estado de equilibrio que puede resultar tanto en la recuperación fisiológica como en un estado patológico. Este estudio tiene como finalidad dilucidar los procesos de astrogliosis y neurogénesis consecuentes a insultos cerebrales en dos modelos experimentales. En el primer modelo utilizamos la molécula 2-deoxi-D-glucosa (2-DG) para provocar un insulto glucopéxico cerebral y en el segundo modelo usamos la pilocarpina, un agonista de los receptores muscarínicos de acetilcolina. La administración de la 2-DG ocasiona un descenso transitorio de los derivados de glucosa y ATP, provocando un insulto glucopéxico intracelular. En nuestro estudio, evaluamos los efectos de una sola administración de 2-DG (500 mg / kg, una dosis usada en la clínica) sobre la reactividad glial y la neurogénesis en el hipocampo de la rata adulta, así como la posible correlación temporal entre estos dos fenómenos. Nuestros datos sugieren que un estado neuroglucopéxico transitorio ejerce un efecto a corto plazo en la activación glial que posiblemente activa un efecto a largo plazo sobre la neurogénesis en el hipocampo. En el segundo modelo, investigamos la resiliencia glial y la neurogénesis en relación a la epileptogénesis tardía en el modelo animal de pilocarpina. Se evaluó cuantitativamente la expresión de la proteína ácida glial fibrilar (GFAP) y las densidades astrocíticas en el hipocampo en una forma dosis-respuesta después de 2, 4 y 8 semanas del insulto con pilocarpina. Los cambios en la expresión de GFAP se correlacionaron con las observaciones de activación microglial y neurogénesis aberrante. Utilizamos la dosis epileptógena de pilocarpina aplicada comúnmente y sus fracciones de un 1/2, un 1/4, y un 1/10. La expresión de GFAP, evaluada a las 2 semanas, reveló una hipertrofia citoesquelética dosis-dependiente y la pérdida de la densidad de células GFAP+ en el hipocampo. A las 4 y 8 semanas, todos los grupos presentaron fenómenos de recuperación con respecto a los parámetros anteriores, exceptuando al grupo de dosis completa, en el que estos parámetros no se recuperaron. Así mismo, observamos microgliosis fuerte y localizada, la cual fue revelada por la inmunoreactividad contra CD11b en el hilio en el grupo de dosis completa a las 2 y 4 semanas, manteniéndose hasta las 8 semanas. La expresión de doblecortina (DCX) se incrementó notablemente en los grupos sometidos a la administración de la dosis completa y 1/2 de la dosis a las dos semanas, mostrando abundantes dendritas basales DCX+

extendiéndose desde la capa de células granulares en el hilio que fueron disminuyendo gradualmente hasta mostrar patrones heterogéneos a las 4 y 8 semanas. Estos datos sugieren que la pérdida gradual de la capacidad de recuperación glial está directamente vinculada a la aparición de la epileptogénesis tardía en este modelo animal. La neurogénesis aberrante en la zona subgranular y la dendrogénesis ectópica DCX+ provocada por la administración de pilocarpina parece ser consecuencia de la expresión anormal de GFAP y de la muerte de las células gliales radiales, más que la causa principal del retraso en la epileptogénesis. Finalmente, reportamos el fenómeno de neurogénesis ectópica en los campos CA1-3 en este modelo animal de epilepsia.

III. ABSTRACT

“Brain insults” refer to stressful stimuli from both the external and the internal environment of the organism threatening cerebral homeostasis. The body, in response to this aggression, triggers both immediate and long term repair mechanisms, such as blood cells recruitment, glial activation (glial reactivation or astrogliosis) and neurogenesis, in an attempt to restore a new state of balance that can result in physiological recovery or in a pathological state. This study aims to elucidate the process of astrogliosis and neurogenesis in brain insults, as a consequence of two experimental models. In the first model, we used the molecule 2-deoxy-D-glucose to cause a neuroglycoprivic insult and in the second model we used pilocarpine, a muscarinic acetylcholine receptor agonist. Administration of 2-DG causes a transient decrease of ATP derived from glucose and intracellular glycoprivation, causing an insult. In our study, we evaluated the effects of a single administration of 2-DG (500 mg / kg, a clinically applicable dose) on glial reactivity and neurogenesis in the adult rat hippocampus, and the possible temporal correlation between these two phenomena. Our data suggest that a transient neuroglycoprivic state exerts short-term glial activation, possibly activating a long-term effect on neurogenesis in the hippocampus. In the second experiment, we investigated glial resilience and neurogenesis in relation to delayed epileptogenesis in the rat model of pilocarpine. We evaluated, morphometrically and quantitatively, the expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP), as well as astrocytic densities in the hippocampus in a dose-response manner after 2, 4 and 8 weeks of the pilocarpine insult. GFAP changes were correlated with observations on microglial activation and aberrant neurogenesis. We used a commonly applied epileptogenic dose of pilocarpine and its fractions of 1/2, 1/4, and 1/10. GFAP expression, evaluated at 2 weeks, showed a dose-dependent pattern of cytoskeletal hypertrophy and the loss of GFAP+ cell density in the hippocampus. At 4 - and 8 -week timepoints, all groups presented recovery of the above mentioned parameters, except for the full-dose group in which recovery was not observed. Microgliosis, revealed by strong CD11b immunoreactivity, was observed in the hilus in the full dose group at 2 - and 4 - weeks and maintained at the 8 weeks timepoint. The expression of doublecortin (DCX) increased substantially in the full dose and 1/2 dose at the two weeks time-point, showing abundant DCX basal dendrites extending from the granule cell layer into the hilus, which gradually decreased at 4 - and 8-week time points, which showed heterogeneous patterns. These data suggest that the gradual loss of astroglial resilience is directly linked to delayed epileptogenesis. The aberrant neurogenesis in the subgranular zone and ectopic DCX+ dendrogenesis caused by the pilocarpine insult seem to result from an abnormal expression of GFAP and radial glial cell

death, rather than being the main cause for a delay in epileptogenesis. Finally, we report ectopic neurogenesis in the CA1-3 fields in this animal model of epilepsy.

IV. GENERALIDADES

Los insultos cerebrales disparan una gran red de cambios morfológicos y metabólicos que juegan un rol prominente en la reparación del tejido nervioso [1, 2] . Tras un insulto, las neuronas lesionadas entran un estado de emergencia, cambiando rápidamente su expresión genética y estimulando a los astrocitos y células microgliales en busca del apoyo que requieren para restablecer su previo estado de equilibrio [3].

Estos procesos de “activación” astrocítica y microglial conforman una respuesta gradual y estereotipada de la población glial a las agresiones al sistema nervioso, respuesta que se observa en insultos tan distintos como la apoplejía, la isquemia, las enfermedades neurodegenerativas, la lesión axonal, diversos procesos inflamatorios/infecciosos y en enfermedades autoinmunes [4-6]. Estas respuestas van acompañadas, también de la producción gradual de citocinas proinflamatorias, así como de cambios funcionales en el endotelio vascular cerebral y el reclutamiento de células del sistema inmune al tejido lesionado.

La neurogénesis en adulto persiste a lo largo de la vida y ocurre en regiones restringidas del cerebro de los mamíferos, incluídas entre ellas la zona subventricular de los ventrículos laterales [7] y la zona subgranular del giro dentado [8]. Las neuronas nacidas en la zona subventricular viajan a través del tracto migratorio rostral hacia el bulbo olfatorio [9], entrando también a la neocorteza de asociación [10], mientras que las nuevas neuronas nacidas en la zona subgranular en el giro dentado abandonan esta capa y migran hacia la capa de células granulares adyacente. La regulación de la neurogénesis en estas regiones está sujeta a la influencia de factores de crecimiento [11], neurotransmisión excitatoria, esteroides adrenales [12], hormonas sexuales [13], estrés [14] y aprendizaje, [15] e inclusive puede ser modificada farmacológicamente [16].

Los eventos patológicos también estimulan la neurogénesis en el cerebro adulto. Una lesión mecánica en la capa de células granulares del giro dentado de la rata incrementa la proliferación de precursores neuronales granulares en la zona subgranular adyacente, demostrado por la incorporación de marcadores como la 5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU) y otros [17]. Las convulsiones también disparan la neurogénesis, ya que el tejido cerebral sometido a este tipo de insulto muestra la presencia de células BrdU positivas coexpresando marcadores neuronales como TOAD-64, tubulina clase III- β y la proteína asociada a microtúbulos tipo 2 [18]. Finalmente, la apoptosis, inducida por estrés oxidativo en neuronas

corticotalámicas incrementa el marcaje con BrdU en células que posteriormente expresan los marcadores neuronales doblecortina (DCX) y proteína específica nuclear neuronal (NeuN) [19].

Contrario a las neuronas, que reaccionan en formas muy distintas a diversos tipos de patologías, la respuesta glial es relativamente estereotipada. Además, la similitud en la respuesta glial bajo diferentes condiciones patológicas sugiere que estos cambios celulares reflejan una estrategia conservada a lo largo de la evolución, que en conjunto con la producción de nuevas neuronas en el cerebro adulto a partir de precursores identificados como astrocitos [20] juegan un papel prominente en la protección y reparación del sistema nervioso lesionado,

Dadas estas evidencias, el entendimiento de las señales que conducen tanto a la activación glial como a la estimulación de los precursores neurales endógenos en el cerebro adulto podría, en un futuro, conformar la base racional para la intervención específica en la respuesta cerebral del cerebro lesionado. Por ello, esta tesis tiene como finalidad aportar evidencias sobre el comportamiento de los procesos de activación glial y neurogénesis en la reparación del sistema nervioso después de un insulto, a corto, mediano y largo plazo, con el propósito de contribuir al entendimiento de los mecanismos subyacentes que pudieran ligar a los procesos de astrogliosis y neurogénesis en el intento de alcanzar la reparación neural.

EL HIPOCAMPO

DESARROLLO Y CITOARQUITECTURA

Aunque no existe un consenso referente a los términos utilizados para nombrar al hipocampo y la corteza cerebral adyacente, los términos hipocampo o formación hipocámpica se utilizan para referirse a la porción interna del lóbulo temporal que abarca al giro dentado, a los campos “Cornu Ammonis” CA1-CA3 y CA4, (también llamado el “hilus”, considerado parte del giro dentado) y el subículum. Esta estructura ha sido estudiada por muchos años y su gradual entendimiento ha permitido entender el papel que este circuito, rico en aferencias y eferencias establecidas principalmente a través de la corteza entorrinal (Fig. 1), tiene en la adquisición y procesamiento de la memoria [21].

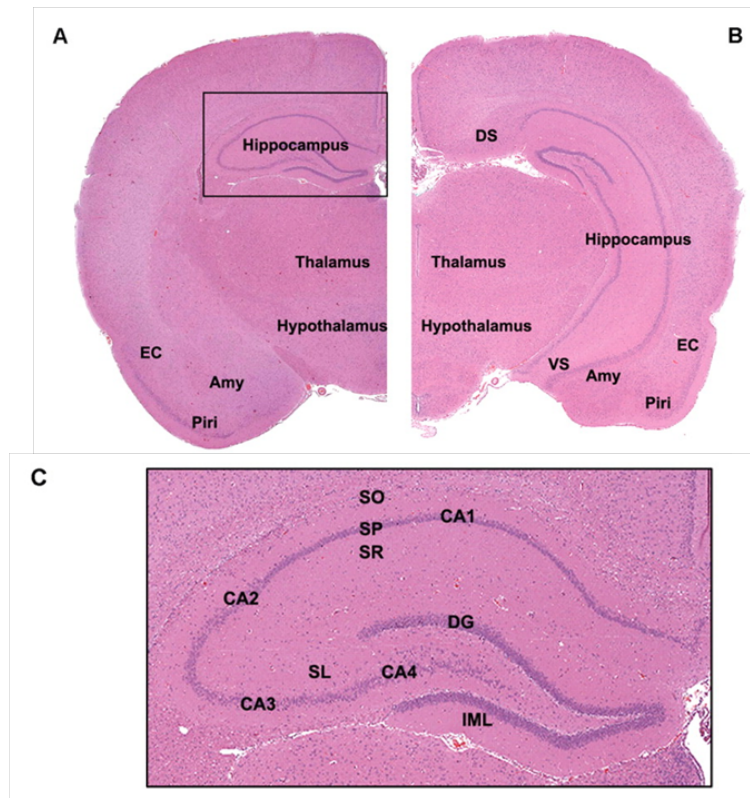


Fig. 1. Histología del hipocampo Abreviaturas: Amy: Amígdala, CA, cornu ammonis; DG, giro dentado; EC, corteza entorrinal; IML, capa molecular interna; SO, stratum oriens; SP, stratum pyramidale; SR, stratum radiatum; SL, stratum lacunosum moleculare; VS/DS, subículo ventral/dorsal; Piri, corteza piriforme. Tomada de [22]

EL GIRO DENTADO

La estructura denominada giro dentado (DG) es una porción bien conservada de la corteza con una estructura trilaminar, considerada como típica de la corteza primitiva o “alocorteza”. La capa más externa, cercana a la fisura hipocampal, se denomina capa molecular (dividida a su vez en externa e interna), y se caracteriza por ser una región libre de cuerpos celulares que contiene las dendritas de las células granulares y las aferencias de la corteza entorrinal y de las fibras comisurales. Las fibras adicionales localizadas en esta región provienen de una variedad de interneuronas locales que se encuentran presentes en cualquiera de las tres capas del DG [23].

Debajo de la capa molecular, se encuentra el área más prominente del giro dentado, la capa celular principal, compuesta de células granulares densamente agrupadas con somas pequeños (8-12 μm de diámetro). Estas células bifurcan sus dendritas en la proximidad del soma, extendiéndolas preferentemente hacia la capa molecular. En roedores adultos, las

dendritas basales no se observan en condiciones normales, sin embargo, en ratas de cinco o diez días de edad, estas dendritas basales han sido descritas. [24]. Las características morfológicas de estas dendritas basales (ramificaciones y densidad de espinas) son similares a las de las dendritas apicales. Tanto las dendritas basales, como las apicales, están involucradas en la circuitería excitatoria típica del DG, mediada por las células musgosas [25].

La tercera capa del DG, denominada hilus o capa polimórfica, es la capa más profunda y se encuentra localizada por debajo de la capa de células granulares, extendiéndose hasta el borde de la capa dendrítica de CA3, interpuesta entre las hojas supra e infrapiramidales del DG. Las células musgosas son el tipo celular más numeroso en el hilio, a pesar de ser entre 25 y 30 veces menos abundantes que las células granulares [26]. Estas neuronas excitatorias se caracterizan por poseer dendritas con una gran cantidad de espinas y algunas excrecencias tortuosas tanto en el cuerpo celular como en los tallos dendríticos, principalmente confinadas al hilus [27].

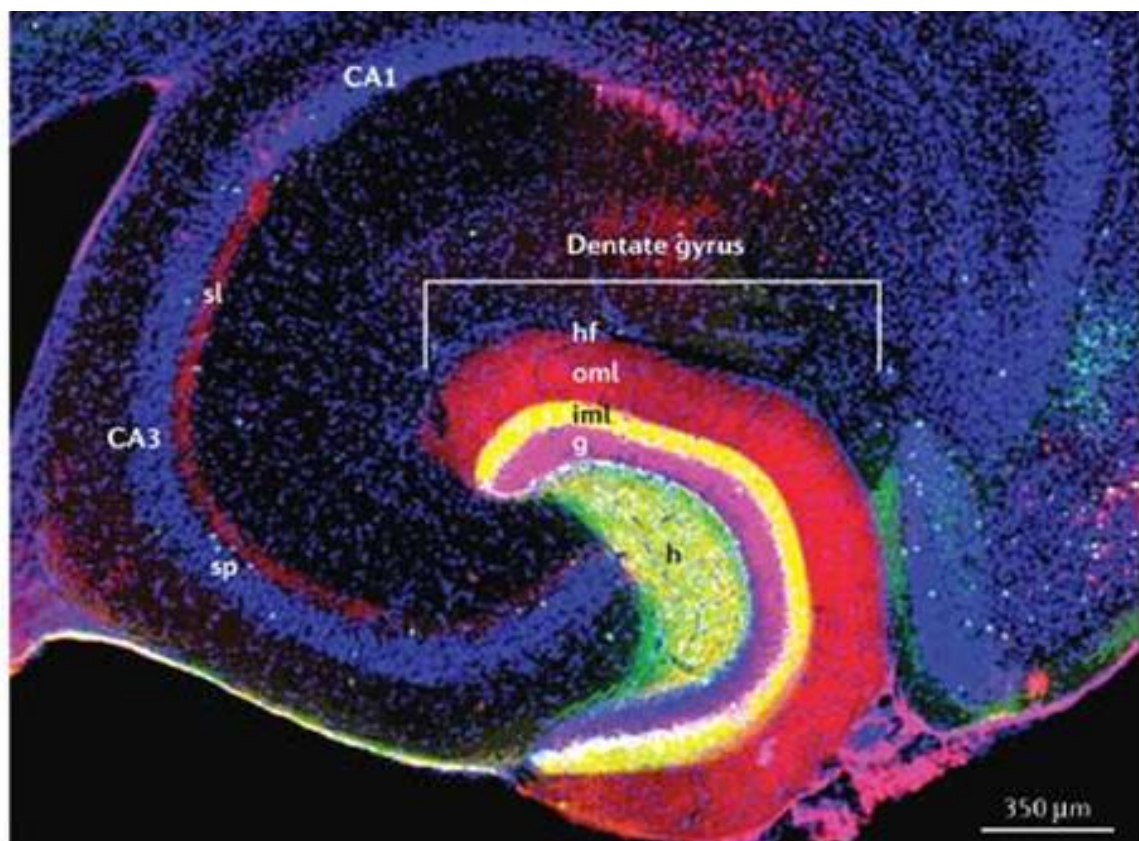


Fig. 2. Estructura trilaminar del giro dentado. Utilizando técnicas de inmunohistoquímica, las células musgosas en el hilus del hipocampo (h), reactivas a calretinina, pueden visualizarse en color verde. Los axones de estas neuronas dan origen a una proyección laminar en la capa molecular interna (iml) en las regiones ipsi y contralaterales (fibras comisurales). La capa molecular externa (oml) es la zona de

terminación de las fibras de la corteza entorrinal. Los cuerpos neuronales se observan contrateñidos con DAPI (azul), permitiéndonos observar la capa piramidal (sp) en las áreas CA1 y CA3, y la capa de células granulares (g) del giro dentado. Las células granulares fueron teñidas contra calbindina (rojo), marcaje que exhibe sus dendritas extendiéndose hacia la fisura hipocampal y sus axones, las fibras musgosas, terminando en el stratum lucidum (sl) de CA3. Tomado de [28]

LAS CAPAS PIRAMIDALES DEL HIPOCAMPO

La organización de las capas piramidales del hipocampo es similar para las regiones CA1 y CA3. La capa celular principal se conoce como capa de células piramidales. La porción localizada en el eje exterior es llamada stratum oriens. En el campo CA3, mas no en CA2/CA1, puede apreciarse una región acelular justo por encima de la capa de células piramidales, la cual está ocupada por los axones de las fibras musgosas originados de las células granulares del DG. Esta estrecha capa se conoce como stratum lucidum. Por encima del stratum lucidum en CA3, e inmediatamente debajo de la capa de células piramidales en CA2 y CA1, se encuentra el stratum radiatum. La siguiente capa del hipocampo se conoce como stratum lacunosum moleculare. La proliferación de células piramidales de las regiones CA1 y CA3 ocurre enteramente durante el periodo embrionario E14 a E19 (Bayer 1980) y su maduración se extiende al periodo postnatal.

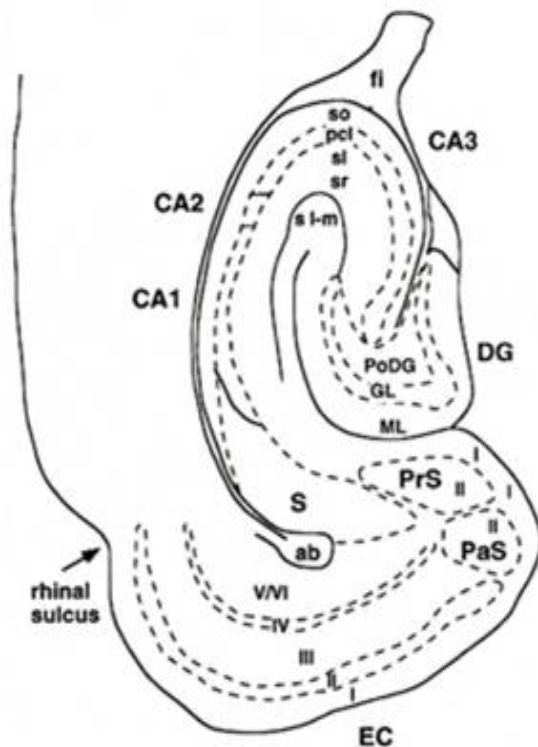


Fig. 3. Diagrama de un corte transversal del hipocampo de la rata. Abreviaturas: EC, corteza entorrinal; DG, giro dentado; CA cornu ammonis; S, subiculum; PrS, presubiculum; PaS parasubiculum; ab, giro angular; so, stratum oriens; pcl, capa de células piramidales; sl, stratum lucidum; sr, stratum radiatum; s l-m, stratum lacunosum moleculare; PoDG, capa polimórfica del giro dentado; GL, capa de células granulares del giro dentado; ML, capa molecular del giro dentado. Tomado de [29]

LA CONECTIVIDAD INTRÍNSECA DEL HIPOCAMPO

Al igual que ocurre en la neocorteza, las interneuronas GABAérgicas y las células glutamatérgicas principales son los componentes primarios de la red hipocámpica. Las interneuronas GABAérgicas se encuentran distribuidas a lo largo de todo el hipocampo en un patrón tipo mosaico. Por otro lado, los cuerpos celulares de las neuronas glutamatérgicas se encuentran en capas celulares bien definidas, que pueden ser distinguidas con el uso de microscopía de baja magnificación. Existen tres tipos de neuronas glutamatérgicas principales, cuyas características anatómicas distintivas definen las subregiones del hipocampo. Las células granulares del giro dentado reciben aferencias sinápticas glutamatérgicas (sinapsis I) de las capas superficiales de la corteza entorrinal. Las células granulares realizan proyecciones hacia las dendritas proximales de las células piramidales de CA3, a través del tracto de las fibras musgosas (sinapsis II). Estas envían axones a las células piramidales de CA1 a través de un conjunto de ramas denominadas colaterales de Schaffer (sinapsis III), las cuales a su vez proyectan hacia el subiculum, estructura encargada de enviar información de salida [30]. Además de este circuito trisináptico, también existe una proyección directa desde la corteza entorrinal hacia las células piramidales de CA3 y de CA1, proveyendo así al hipocampo de vías sinápticas paralelas para el procesamiento de la información (Johnston & Amaral: Hippocampus en [31])

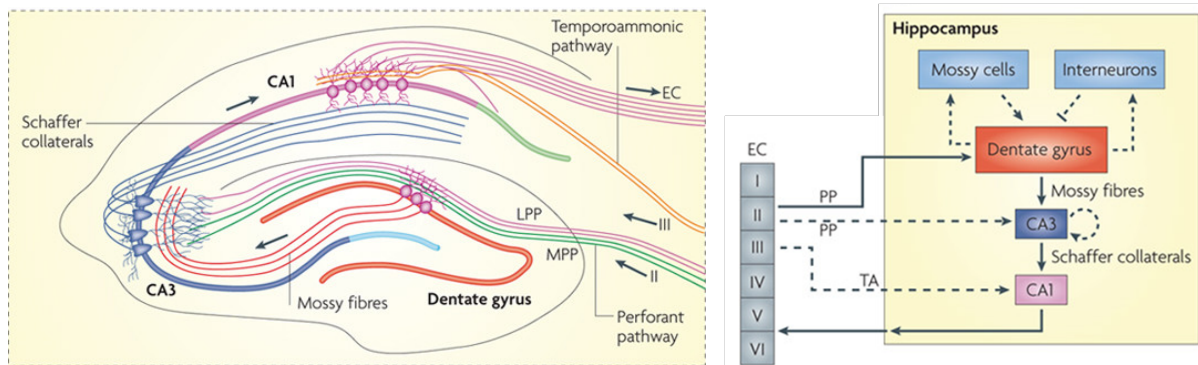


Fig. 4. Diagrama esquemático de la circuitería trisináptica del hipocampo. Abreviaciones: CA cornu ammonis, EC, corteza entorrinal LPP/MPP vía perforante lateral/medial, TA, vía temporammónica(modificado de [32])

La región CA2 representa una porción muy pequeña y comúnmente ignorada al considerar la función hipocámpica, aunque es notable que esta región parece inusualmente resistente a condiciones que normalmente causan extensivo daño celular, como la epilepsia. [33]. A pesar de ser ampliamente aceptado que cada una de estas regiones tiene un único papel funcional en el procesamiento de la información en el hipocampo, a la fecha se sabe

poco de la contribución funcional individual de las regiones. La vía perforante, que acarrea información proveniente de la corteza entorrinal, es la aferencia principal de información al giro dentado del hipocampo. Su análisis fue fundamental para dilucidar los mecanismos de plasticidad de corto y largo plazo, al ser un área idónea para la realización de los mismos debido a la relativa simplicidad de su arquitectura y organización. [34]

La corteza entorrinal recibe fibras de asociación de la neocorteza del lóbulo temporal, el cual a su vez se comunica con diversas zonas neocorticales, incluidas entre ellas las áreas de asociación sensitiva. A través de estas y otras conexiones, entre las que se incluyen aferencias de cortezas adyacentes como la perirrinal y la parahipocampal, (estructuras encargadas de acarrear información accesoria de áreas de procesamiento multimodal), la vía perforante mantiene “informado” al hipocampo. Estas particularidades estructurales le conceden al hipocampo una capacidad de procesamiento ordenado y simplificado de la información [35]; la cual resulta conveniente para su estudio. Es importante mencionar también que la inervación subcortical al hipocampo es abundante, contando con aferencias del tallo cerebral (innervación serotoninérgica) [36] y de estructuras límbicas como la amígdala [37]

Por su versatilidad, el hipocampo ha sido pilar de la investigación en neurociencias. En esta estructura se han realizado experimentos trascendentales para entender el funcionamiento del cerebro, como los de Bliss y Lomo, pioneros en el estudio de la potenciación sináptica a largo plazo que lograron confirmar la existencia de la “*teoría de la plasticidad Hebbiana*” (Bliss and Lomo 1970; Bliss and Gardner-Medwin 1973) y los de Altman y Das, quienes demostraron por primera vez la existencia de proliferación neuronal en el cerebro adulto, postulando así un nuevo paradigma en el funcionamiento cerebral: la existencia de un fenómeno plástico capaz de provocar la incorporación de nuevas neuronas en el hipocampo del cerebro adulto [38], [39].

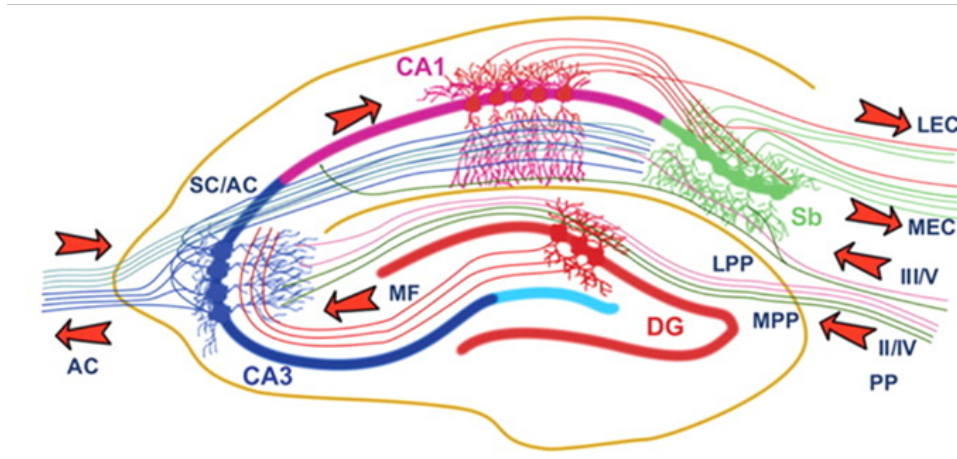


Fig. 5. Diagrama de la red hipocampal. El hipocampo forma principalmente una red unidireccional, con aferencias de la corteza entorrinal (EC) que forma las conexiones entre el giro dentado (DG) y las neuronas piramidales de CA3 mediante la vía perforante (PP). Los axones de la PP se originan principalmente en las capas II y III de la EC, con contribuciones menores de capas profundas, como la IV y la V. La PP puede ser dividida en medial y lateral (MPP y LPP, respectivamente), dependiendo de si las fibras se originan de la corteza entorrinal medial o lateral (MEC y LEC, respectivamente). Las neuronas de CA3 también reciben aferencias del DG a través de las fibras musgosas (MF). Las neuronas de CA3 envían axones a neuronas piramidales del CA1 ipsilateral mediante las colaterales de Schaffer (SC) y a las neuronas del CA1 contralateral a través de la vía de asociación comisural (AC). Las neuronas de CA1 también reciben aferentes directas de la PP y envían axones al subículo (Sb). Las neuronas de CA1 envían la eferencia hipocampal principal de vuelta a la corteza entorrinal, formando un bucle. Abreviaturas: CA, cornu ammonis; DG, giro dentado; EC, corteza entorrinal; IML, capa molecular interna; SO, stratum oriens; SP, stratum pyramidale; SR, stratum radiatum; SL, stratum lacunosum moleculare; VS/DS, subículo ventral/dorsal. Tomada de [22]

LA NEUROGÉNESIS EN EL CEREBRO ADULTO

UNA PERSPECTIVA HISTÓRICA

El conocimiento científico, en un punto específico del tiempo, puede definirse como el conjunto particular de modelos y teorías en los que una comunidad científica se basa para intentar explicar la serie de acontecimientos observados en la naturaleza. Los esfuerzos inherentes a generar este conocimiento frecuentemente derivan en ideas novedosas que atraviesan una ardua serie de etapas que, en ocasiones, conllevan a su aprobación final.

Aceptar que nuevas neuronas son generadas en el cerebro adulto de todos los mamíferos ha sido un proceso lento que se ha visto acompañado desde sus inicios de escepticismo e incertidumbre. El hecho de que grandes neuroanatomistas como Santiago Ramón y Cajal consideraran al cerebro como una estructura "rígida" y por lo tanto incapaz de regenerarse abatió durante muchos años el brío científico de refutar esta teoría. No obstante, en la década de los sesentas, unos cuantos años después del ascenso del modelado

computacional de la circuitería cerebral, Joseph Altman, biólogo de formación e investigador independiente del Massachusetts Institute of Technology realizó la primera propuesta original de neurogénesis en el adulto, al demostrar la existencia de marcaje neuronal y de neuroblastos en dos regiones cerebrales muy primitivas del cerebro de la rata, el sistema olfatorio y el giro dentado del hipocampo [38]. A pesar de su conclusión y de que sus resultados fueron tomados con discreción y reserva, sus aportaciones dieron pie a la emergencia de una nueva teoría, la *“teoría de plasticidad estructural cerebral”*.

Algunos años más tarde, diversos trabajos enfocaron su estudio en proporcionar evidencias sobre los procesos de reestructuración del sistema nervioso, como la elongación axonal y la reorganización sináptica en el cerebro lesionado de la rata adulta. [40], [41], [42]. En esa misma época, algunos otros investigadores observaron que en las ratas, la progeñe que se criaba desde el destete en entornos complejos mostraba una mayor proporción de sinapsis corticales occipitales, concluyendo que la experiencia por sí misma era capaz de promover cambios en elementos pre y postsinápticos [43]

Ya en la década de los ochentas, las contribuciones de Steven Goldman y de Fernando Nottebohm, quienes mostraron la existencia de precursores neuronales en la zona ventricular de la parte caudal del hiperstriado ventral del canario adulto [44] fueron recibidas con mayor aceptación. Sin embargo, ya que sus resultados fueron descritos en una estructura cerebral aviar, estos hechos se consideraron poco amenazantes para el dogma científico que declaraba improbable la posibilidad de regeneración celular cerebral en los mamíferos.

Un poco más adelante, la indisposición de la comunidad científica para admitir la neurogénesis en el cerebro adulto se vio vulnerada por la aparición de evidencias que mostraban la supervivencia y diferenciación de células provenientes de injertos de tejido fetal después de una lesión en el cerebro adulto y en la médula espinal [45]. Estos datos fueron aún más persuasivos y permitieron abrir gradualmente un nuevo camino en torno al entendimiento y aceptación de la existencia de este fenómeno.

A pesar de todos los esfuerzos realizados entre 1960 y finales de la década de 1980 con la finalidad de explicar la neurogénesis y sustentar la teoría de la plasticidad cerebral, estos estudios representaron un serio problema para el entendimiento de la época, debido a su incompatibilidad con la idea que había prevalecido durante casi 20 años del modelado conceptual de la función cerebral a partir de analogías con sistemas computacionales. El inconveniente más grande enfrentado al considerar la adición de nuevos componentes celulares al sistema nervioso era el problema práctico que representaba el origen de nuevas

neuronas, células característicamente complejas, grandes, con dendritas altamente ramificadas, combinaciones axonales polisinápticas y “pos-mitóticas” [46]. Al analizar las propiedades neuronales, pudo determinarse que las probabilidades de que las nuevas células generadas se originaran de una neurona previamente formada eran prácticamente nulas, y llevó a los científicos a investigar de dónde es que podían provenir estas nuevas células y a intentar encontrar él o los precursores involucrados en la génesis de las mismas.

Este problema fue resuelto en la primera mitad de la década de 1990, con la realización de trabajos en los que se descubrió que la zona subventricular de los ventrículos laterales y la zona subgranular del giro dentado del hipocampo contienen células troncales autorrenovables, una potencial fuente de origen de las células recién formadas [7], [47]. Por lo tanto, la complejidad que implicaba el hecho de incorporar nuevas neuronas a la circuitería resultó menos problemática de lo que originalmente se había pensado, ya que, hasta la fecha, solamente se ha mostrado la existencia de neurogénesis en dos regiones del cerebro, y el hipocampo (giro dentado) parece estar más involucrado en la formación de nuevas memorias que en su almacenaje. [48]

El campo de estudio de la neurogénesis ha crecido dramáticamente durante los últimos 15 años. Este crecimiento se ha visto amplificado con evidencias de regulación positiva y negativa de la neurogénesis en el cerebro adulto a través de ambientes enriquecidos y de la actividad física [49], así como por una larga lista de especies que pueden presentarla [50], entre ellos los primates [51], e inclusive los seres humanos [48, 52]

La complejidad que representa este fenómeno por sí mismo ha logrado captar el interés de un gran número de investigadores, que actualmente intentan dilucidar los mecanismos implicados tanto en el cerebro sano como en el enfermo, todo con la finalidad lograr incorporar el potencial regenerativo neuronal a la terapia cerebral, agregando así una estrategia nueva a la búsqueda de la “auto-reparación” cerebral.

EL HIPOCAMPO Y LA NEUROGÉNESIS EN EL CEREBRO ADULTO

El término “neurogénesis en el cerebro adulto”, se refiere a la formación de nuevas neuronas en el cerebro adulto de determinadas especies. Estas células son formadas a partir de células progenitoras ubicadas en localizaciones circunscriptas y son capaces de migrar, diferenciarse y madurar hasta lograr convertirse en células potencialmente funcionales. Este proceso ha mostrado ser persistente a lo largo de la vida en dos áreas específicas del cerebro, la zona

subventricular de los ventrículos laterales y la zona subgranular del giro dentado del hipocampo [7], [47].

La neurogénesis en el giro dentado del hipocampo es un suceso persistente a lo largo de la vida que acontece cuando las células progenitoras localizadas en el hilus se comprometen y diferencian en neuronas granulares, con la finalidad de integrarse a la capa granular del giro dentado. Este fenómeno puede verse influenciado por diversos factores tróficos [53] y moléculas neuroactivas [54].

La neurogénesis en el cerebro adulto es un fenómeno preservado a lo largo de la evolución animal. La red hipocámpica, como otros circuitos corticales, es altamente dinámica y tiene la capacidad de modificar su conectividad, alterando el número y la fortaleza de sus contactos sinápticos en una forma actividad-dependiente. Las conexiones sinápticas pueden ser añadidas, fortalecidas, debilitadas o eliminadas en respuesta a la actividad neuronal, dando pie a un fenómeno denominado “plasticidad sináptica”. La plasticidad de ciertas sinapsis hipocámpicas juega un rol significativo en la formación de nuevas memorias y en el aprendizaje hipocampo-dependiente [55, 56]. El giro dentado del hipocampo cuenta con la capacidad adicional de modificar su circuitería al agregar nuevas neuronas. Por lo tanto, la remodelación de la red no se encuentra estrictamente restringida a las sinapsis, sino que también involucra la incorporación de nuevas unidades funcionales (neuronas), proveyendo así una dimensión adicional de plasticidad a la circuitería hipocámpica preexistente [57, 58]. Todo este proceso puede ser modulado por diversas condiciones, tanto fisiológicas como patológicas y, dependiendo del estímulo, este fenómeno puede ser influenciado positiva o negativamente. La estimulación, el aprendizaje hipocampo-dependiente, la respuesta ante un ambiente enriquecido y la restricción dietética aumentan la neurogénesis, mientras que la edad, el estrés, el aislamiento social y el consumo de alcohol la disminuyen [49]. Ciertas perturbaciones metabólicas, como la hipoglucemia, producen un aumento inicial en la tasa neurogénica, seguida de una subsecuente extensiva pérdida neuronal debido a la disminución de células progenitoras [59].

Miles de neuronas nacen día con día. Estas nuevas neuronas formadas son funcionales [60, 61] y aunque una gran cantidad de ellas muere después de su nacimiento, otro tanto logra incorporarse continuamente a los circuitos neurales bajo la influencia de factores exógenos que permiten su supervivencia y posterior diferenciación a neuronas granulares en el giro dentado.

La glía, contrario a lo que se pensaba inicialmente, juega un rol regulatorio particular en la neurogénesis y en la supervivencia celular tanto en la zona subventricular [62] como en el hipocampo [63]. Las investigaciones enfocadas a dilucidar los mecanismos mediante los cuales el microambiente es capaz de determinar el destino de las células progenitoras neurales estableció que los astrocitos adultos son capaces de regular la neurogénesis, incitando a los progenitores a adoptar un destino neuronal. Esto pone en evidencia el rol regulatorio activo de estas células en la generación, diferenciación y supervivencia de nuevas neuronas [63]. Por otro lado, la observación de astrocitos en la zona subgranular del giro dentado del hipocampo, identificados por su peculiar morfología y sus características ultraestructurales (presencia de abundantes gránulos de glucógeno, gruesos filamentos intermedios y uniones de tipo hendidura [64] lleva a pensar que estas células podrían, al igual que en la zona subventricular, estar funcionando como precursores primarios in vivo [65]. Sin embargo, la habilidad de estas células para actuar como células progenitoras autorrenovables y multipotenciales está aún por determinarse.

Enfatizando lo ya mencionado, queda claro que la astrogía es capaz de mediar la proliferación de los precursores neurales y su posterior diferenciación. Estas propiedades, que hasta hace no muchos años habían pasado prácticamente desapercibidas, favorecen el potencial regenerativo neuronal, al tiempo que proveen un sustrato esencial del entendimiento de los fundamentos celulares de la plasticidad cerebral.

El estudio de la neurogénesis en el cerebro adulto se ha ido ampliando críticamente a lo largo de las últimas dos décadas, sin embargo hasta la fecha se desconoce el significado funcional de la neurogénesis y cómo es que una red neural funcional preexistente es capaz de incorporar nuevos elementos a su sistema [66]. Lo que se ha logrado esclarecer hasta ahora es que las nuevas células generadas en el hipocampo exhiben morfología neuronal y pueden desplegar propiedades pasivas de membrana, potenciales de acción y aferencias sinápticas similares a aquellas presentadas por las células granulares maduras, demostrando así la capacidad de estas nuevas células para madurar hasta lograr convertirse en neuronas funcionales en el hipocampo del cerebro adulto [60].

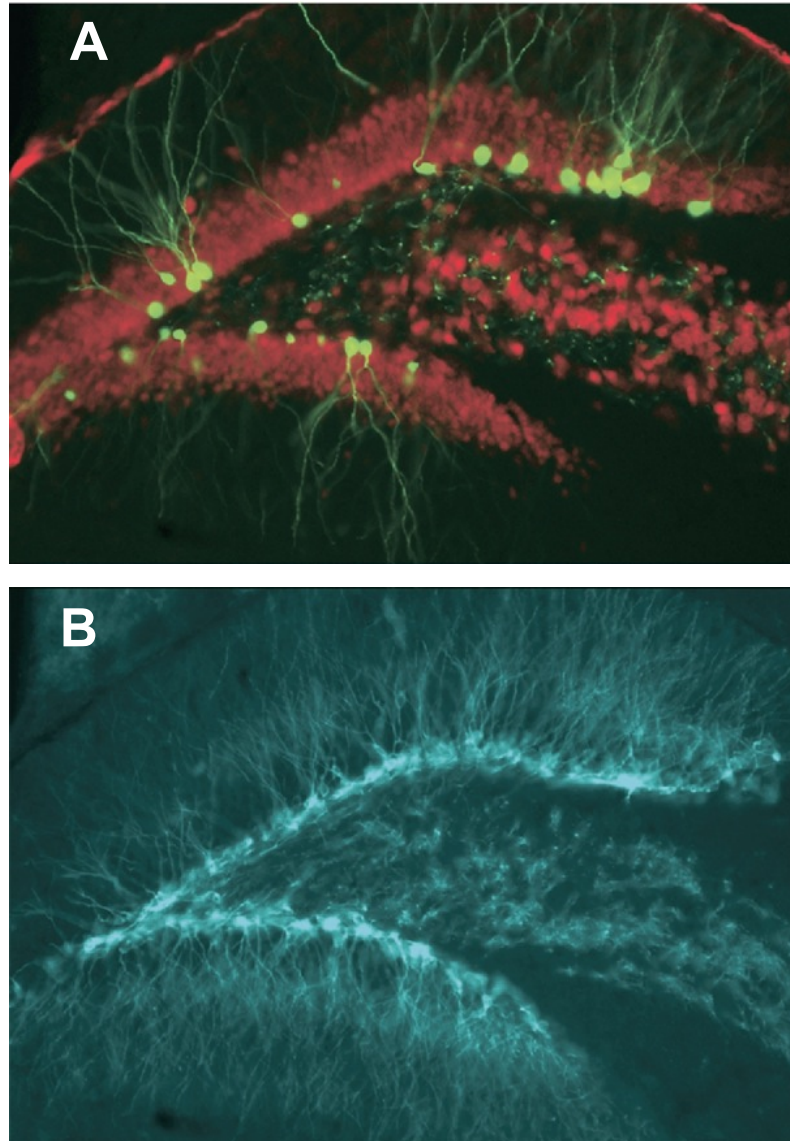


Fig. 6. Células recién nacidas incorporadas al giro dentado del ratón adulto. A) Las nuevas células granulares (verdes) fueron transducidas utilizando vectores retrovirales que expresan proteína verde fluorescente (GFP). Todos los cuerpos neuronales están teñidos contra la proteína específica de núcleo neuronal NeuN (rojo). B) Células granulares jóvenes teñidas contra doblecortina (DCX), un marcador común de neuronas inmaduras. Tomado de [67].

LA GLÍA

UNA PERSPECTIVA HISTÓRICA

El 3 de abril de 1858, Rudolf Virchow, uno de los patólogos más prominentes del siglo XIX, propuso el entonces novedoso concepto **neuroglía**, durante su participación en un seminario en el Instituto de Patología de la Universidad de Berlín. Su plática, titulada *La médula espinal y el cerebro*, le permitió hacer públicos sus pensamientos iniciales acerca del tejido conectivo

cerebral (*nervenkitt*), denominado por él mismo **“neuroglía”**, concepto que fuera originalmente acuñado y mencionado anteriormente en 1856 con la finalidad de nombrar un tejido con funciones contrapuestas a la de los entonces denominados “elementos nerviosos”, al cual se le adjudicaba el papel casi exclusivo de elemento de soporte o de “pegamento” del sistema nervioso.

En esta misma época, considerada por los estudiosos del campo como el periodo dorado de la histología celular, otros distinguidos científicos como Camillo Golgi, Otto Deiters y Gustav Retzius realizaron las primeras descripciones y publicaciones de imágenes de células gliales. En 1893, Michael von Lenhoseek propuso por primera vez el término **“astrocito”** y poco después Ko’l liker y Andriezen dividieron esos astrocitos en fibrosos (sustancia blanca) y protoplasmáticos (sustancia gris) [68]. La glía fibrosa estaba coformada por células estelares, con prolongaciones delgadas, largas y poco ramificadas. La glía protoplásmica estaba constituida por células con abundantes prolongaciones, cortas y ramificadas

En 1897, Santiago Ramón y Cajal escribió un capítulo enteramente dedicado a la neuroglía para su monumental tratado “Histología del Sistema Nervioso” [69]. Al momento de finalizar esta porción del libro, los oligodendrocitos y la microglía aún no habían sido descritos, así que se enfocó casi enteramente al estudio de los astrocitos, discutiendo abiertamente sobre el razonamiento previo de la función de los mismos.



Fig.7. Dibujos originales de Gustav Retzius, que ilustran diversas poblaciones gliales. Tomado de [68]

Finalmente en 1919, gracias a las contribuciones de Pío del Río-Hortega, los oligodendrocitos y la microglía (células de Hortega) fueron reconocidos como tipos celulares distintos y aceptados por vez primera bajo la categoría de neuroglía [68]. Además de lo anterior, también fue el primero en teñir y describir otro tipo de células gliales, los

oligodendrocitos, entonces conocidos como glía interfascicular. Al mismo tiempo, en 1924, Penfield presentó un estudio sobre la oligodendroglía, sin embargo no fue sino hasta 1954 que la mielina, término introducido también por Virchow fuera reconocida como parte de una célula de Schwann [70]

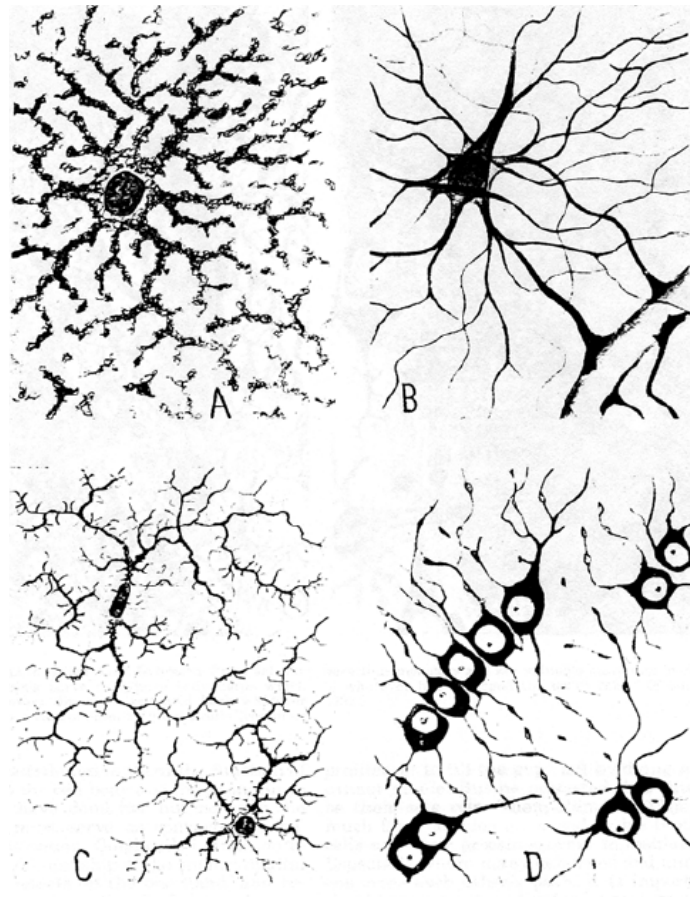


Fig. 8. Dibujos originales de Pio del Rio-Hortega, que ilustran los principales tipos de células gliales del SNC humano: A: astrogía protoplasmática B: astrogía fibrosa C: microglía, D: oligodendrocitos [71]

ASPECTOS GENERALES

La idea sostenida por Virchow y sus colegas de que la neuroglía no era más que una red de soporte neuronal prevaleció durante algunos años, hasta que Santiago Ramón y Cajal y Pío del Río-Hortega lograron el desarrollo de las técnicas de impregnación argéntica, mismas que permitieron lograr un avance notable en el estudio de la neuroglía [64]. A partir de estos estudios, se determinó la división de la neuroglía en los siguientes grupos:

- Macroglía
 - Astrocitos
 - Protoplasmáticos
 - Fibrosos
 - Oligodendrocitos
- Interfasciculares
 - Perineuronales
 - Ependimocitos (Tanicitos)
 - Células de Müller
- Microglía

A pesar de que este grupo celular supera cuantiosamente al neuronal y del advenimiento de numerosas evidencias recientes que destacan sus profundas y novedosas funciones, tanto en condiciones normales como patológicas, la idea de que la neuroglía cumple exclusivamente funciones de sostén y nutrición para el tejido neural aún prevalece en la mente de muchos científicos, probablemente debido a la forma tan sutil e indirecta de operar de este conjunto celular, la cual entorpece el camino y enlentece el brío de los neurocientíficos para participar en esta área de las neurociencias [72].

ASTROGLÍA

La astrogliá, conformada por elementos estelares denominados astrocitos, es una de las poblaciones celulares más abundantes del cerebro adulto [73], constituyendo más del 50% de la totalidad celular en la corteza cerebral Santiago Ramón y Cajal describió a este grupo como células estelares cuyo soma emitía una serie diversa de prolongaciones en sentido radial. En la actualidad, las diversas técnicas de tinción que han sido desarrolladas para abordar el estudio de este conjunto celular han permitido demostrar que los astrocitos de la sustancia blanca (astrocitos fibrosos) cuentan con diversos procesos altamente ramificados que irradian desde el cuerpo celular [74], mientras que los astrocitos de la sustancia gris (astrocitos protoplasmáticos) tienen procesos vellosos profusos que les conceden una morfología esponjiforme característica [75].

Los astrocitos son generados a partir de la glía radial, el primer tipo de célula glial que aparece durante el periodo embrionario [76]. En el adulto, los astrocitos extienden sus

procesos y recubren las superficies externas del sistema nervioso central, brindando aislamiento a las neuronas y los oligodendrocitos al rodear nodos de Ranvier y vasos sanguíneos mediante *pies terminales* especializados. Así mismo, ayudan a la formación de la denominada *glía limitans* o membrana limitante glial, la capa más superficial de tejido nervioso que subyace a la pía madre [64].

Los astrocitos, como grupo celular, comparten ciertas características citológicas e inmunológicas distintivas. Algunas de las características citológicas que los distinguen, además de su figura estelar y la formación de pies terminales, son la presencia de abundantes gránulos de glucógeno, de gruesos filamentos intermedios formados de proteína ácida glial fibrilar (GFAP) y de uniones de tipo hendidura, que a través de ciertas proteínas denominadas conexinas, permiten la comunicación entre los astrocitos, al concederles un fuerte acoplamiento que a la vez asegura el libre tránsito de iones y pequeñas moléculas [77]. Inmunológicamente, son capaces de expresar diversos marcadores, de entre ellos destacan GFAP [78], GLT-1, GLAST [79], la proteína S-100 [80], glutamina sintetasa [81] y la enolasa no neuronal [82, 83]

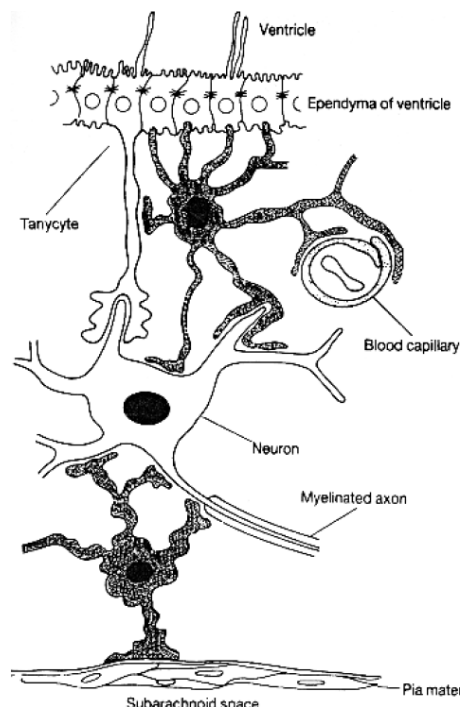


Fig. 9. Esquema que muestra las diversas interacciones de los astrocitos en el tejido cerebral [83]

A pesar de conformar un conjunto aún más numeroso que el de las neuronas (a una razón aproximada de 2:1), la función que le ha sido adjudicada a lo largo de los años ha sido principalmente la de sostén del tejido neural, al contribuir tanto al soporte estructural como

al metabólico, mediante la recaptura de neurotransmisores, la homeostasis iónica, la modulación de la transmisión sináptica y la formación de la barrera hematoencefálica

Estudios recientes han revelado que los astrocitos pueden realizar funciones mucho más diversas y complejas que las que tradicionalmente les han sido adjudicadas. Basados en el conocimiento actual, la interacción que tienen los astrocitos con las neuronas parece ser un proceso involucrado en la mayoría de los procesos cerebrales. Algunas funciones destacadas de este grupo celular se resumen en la Fig. 9 y se exponen brevemente a continuación:

Formación y mantenimiento de la integridad de la barrera hematoencefálica (BHE): En especies inferiores en la escala filogenética, los astrocitos forman parte de la BHE, sin embargo en especies elevadas, los astrocitos inducen la formación y mantenimiento de uniones estrechas entre las células endoteliales que la forman. [84]. Así mismo, juegan un rol importante en el mantenimiento de su integridad, así como en la liberación de agentes químicos que aumentan su permeabilidad [85]

Homeostasis iónica: La composición del fluido extracelular cerebral fluctúa constantemente con la actividad neural. La salida de K^+ necesaria para la repolarización inmediatamente después de un potencial de acción único aumenta instantáneamente la concentración de K^+ extracelular alrededor del 25% del valor normal. La astrogliá ha sido capaz de desarrollar mecanismos eficientes de secuestro transitorio y redistribución de este ión en el espacio extracelular, previniendo así que su acumulación perturbe el funcionamiento neural normal [86]

Remoción de neurotransmisores y sustancias tóxicas: Los astrocitos también son capaces de remover neurotransmisores de la hendidura sináptica con la finalidad de modular la actividad sináptica mediante canales iónicos y receptores/transportadores membranales para varios neurotransmisores, entre ellos glutamato [87]. Así mismo, son capaces de participar en la detoxificación del sistema nervioso central (SNC), secuestrando metales como el hierro [88] y una gran variedad de sustancias de origen endógeno que pueden ser neurotóxicas a ciertas concentraciones, como el amonio [89]. Igualmente, proveen a las neuronas de altos niveles de

glutación y otras enzimas necesarias para la reducción de especies reactivas del oxígeno, así como de moléculas con funciones antioxidantes muy potentes, como el ascorbato [90].

Funciones tróficas: Los astrocitos producen un gran número de factores tróficos y citocinas capaces de modular tanto la morfología como la génesis, migración, orientación y supervivencia de poblaciones neuronales y gliales, probablemente a través de una interacción recíproca neurona-glía mediada por factores tróficos [91]. Estas interacciones tróficas tienen implicaciones obvias para el desarrollo, pero también podrían estar jugando un papel crucial en el mantenimiento de sinapsis a lo largo de la vida y promoviendo la plasticidad sináptica necesaria para la memoria y el aprendizaje [92].

Metabolismo energético neuronal: El glucógeno se encuentra exclusivamente en los astrocitos, y en ellos puede ser metabolizado, generando lactato que puede ser distribuido a elementos neurales adyacentes en periodos de baja disponibilidad de glucosa [93]

Señalización: Si la astrogía es estimulada, genera ondas de Ca^+ intracelulares que pueden ser propagadas de un astrocito a otro a través de sus uniones tipo hendidura [94]. Las neuronas a menudo modifican su comportamiento cuando las ondas de Ca^+ astrocíticas pasan por la proximidad, lo cual podría poner de manifiesto un acoplamiento fisiológico entre la actividad glial y la neuronal [95].

Table 1.1. Classification of astrocyte-neuron interactions

<u>Interaction Categories</u>	<u>Physiological Events</u>	
	Neurons	Astrocytes
A. Homeostatic or Supportive		
1. K ⁺ sequestration or redistribution	K ⁺ release	K ⁺ uptake or redistribution
2. Neurotransmitter uptake	Glutamate release	Glutamate uptake
3. Water homeostasis	H ₂ O from glucose oxidation	H ₂ O removal (aquaporins)
B. Metabolic		
1. Glutamate-glutamine cycle	Glutamine uptake	Glutamine synthesis
2. Ammonium fixation	Ammonium release	Ammonium fixation
3. Glycogen & neuron energy metabolism	Lactate uptake for energy metabolism	Glycogen breakdown to lactate
4. Detoxification of brain free radicals	Free radical generation & release	Free radical scavenging
C. Signaling		
1. Astrocyte Ca ²⁺ waves	Activate glutamate receptors (modulation of EPSPs and IPSPs)	Glutamate release
2. Blood flow control	Glutamate release	Glutamate-mediated cyclooxygenase product release (vasodilation)
D. Trophic		
1. Trophic factor secretion (bFGF, GDNF, etc)	Trophic effects	Release of factors
2. Regulation of synaptogenesis	Synapse formation	Release of factors
3. Axonal guidance	Directed growth	Expression of aversive or attractive molecules

Fig. 10. Clasificación de las interacciones astrocito-neurona (Modificado de Hatton & Parpura, 2004)

ACTIVACIÓN ASTROCÍTICA (ASTROGLIOSIS)

Una vez puesto en contexto el análisis funcional de la astrogliá, expondré el proceso conocido como *activación "astrocítica"* o *"astrogliosis"*. La astrogliosis es un fenómeno característico de estas células que ocurre en respuesta a todo tipo de estresor capaz de modificar la homeostasia del sistema nervioso, como lo son el trauma, la hipoxia, la hipoglucemia y diversas enfermedades neurodegenerativas. Se caracteriza por la sobreexpresión de proteínas de filamento intermedio (PFI), que junto con los filamentos de actina y los microtúbulos, son el conjunto principal de componentes del citoesqueleto. En los humanos, han sido identificados 65 tipos diferentes de PFI hasta ahora [96] y de todas ellas, GFAP es la proteína más expresada en los astrocitos sanos [97], lo cual la vuelve un marcador inmunológico específico y confiable [78].

El sello distintivo de este fenómeno es la hipertrofia característica de los procesos celulares de los astrocitos y la sobreexpresión de las PFI GFAP y vimentina, así como la reexpresión de nestina, todas ellas proteínas encargadas de la formación de la red de filamentos intermedios. En la activación astrocítica, esta red se vuelve muy prominente, en particular en el soma astrocítico y sus procesos [75]

La astrogliosis también puede ser observada en patologías como la demencia asociada al SIDA, encefalopatías espongiiformes asociadas a priones, enfermedades desmielinizantes, lesiones cerebrales traumáticas agudas y procesos neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer. A pesar de que el rol exacto de este proceso como respuesta a la lesión en el sistema nervioso aún no se ha dilucidado, su observación en diferentes patologías y la rapidez con que se entabla indican que los astrocitos reactivos cumplen con funciones diversas e importantes en el sistema nervioso [97]

Inicialmente, el papel de los astrocitos reactivos fue empañado al evidenciarse que estas células son partícipes esenciales de la denominada “escara glial”, un proceso de “cicatrización” instaurado en el sistema nervioso después de una lesión con la finalidad de limitar la extensión del daño e intentar restablecer la integridad física y química del SNC. La escara glial, al tiempo que limita la diseminación del daño celular y promueve la revascularización capilar, evita que las neuronas extiendan sus axones a través del área lesionada, tanto por medios químicos como mecánicos. Un ejemplo de esto es la formación de una densa red de uniones tipo de hendidura entre los astrocitos, que, junto con la secreción de diversas moléculas inhibitoras del crecimiento, impiden la regeneración axónica. [98]

Estudios más recientes arrojan evidencia de que, en ciertas condiciones, la astrogliosis es capaz de actuar como un factor promotor de la recuperación funcional, proveyendo de energía, citocinas y factores tróficos requeridos para la diferenciación, migración y supervivencia neuronal, así como la sinaptogénesis [99]

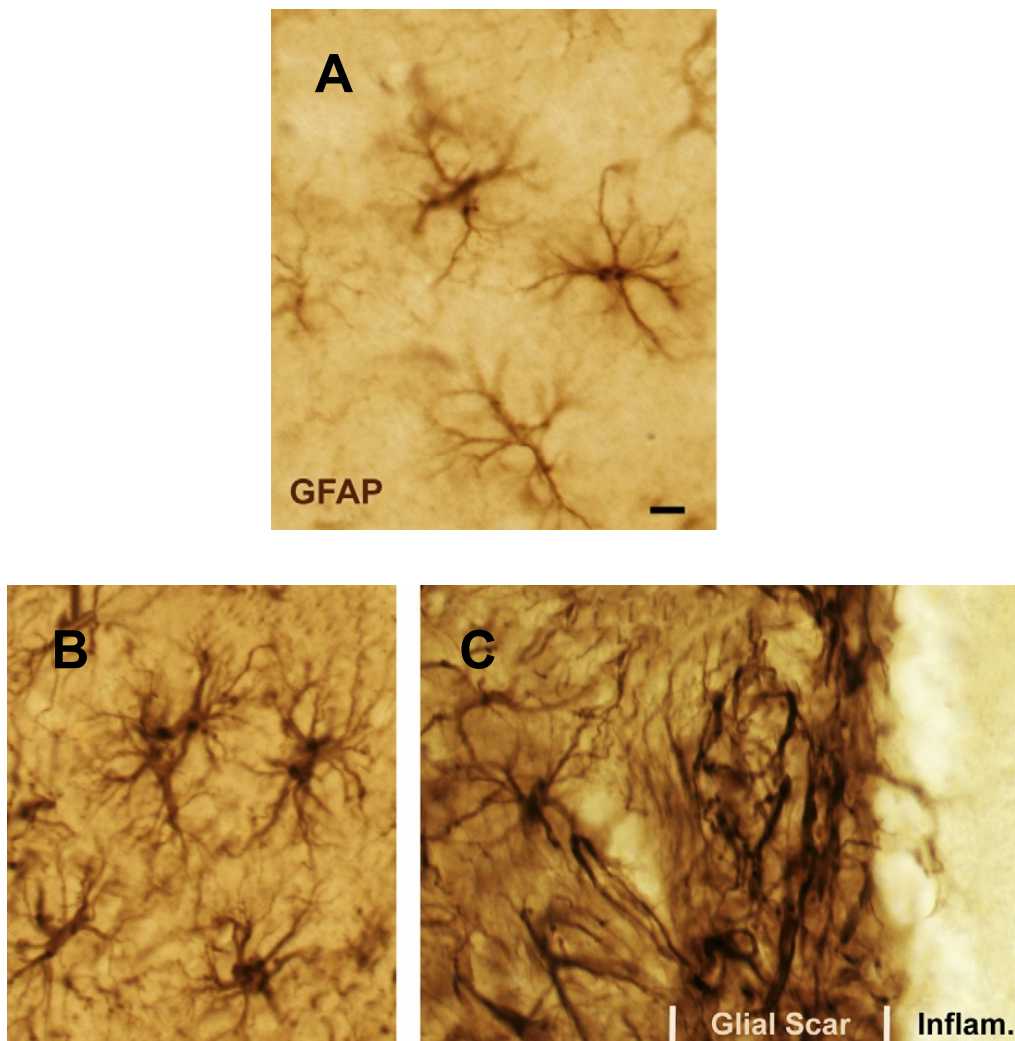


Fig. 11. Microfotografías de astrocitos sanos y con diversos grados de astrogliosis y formación de escaras gliales después de insultos cerebrales de distinto tipo y severidad. A) Apariencia de astrocitos sanos de la corteza cerebral de ratón. B) Astrogliosis reactiva moderada en respuesta a la administración intracerebral de lipopolisacárido, uno de los principales antígenos bacterianos. Nótese que los procesos astrocíticos no se sobrelapan. C) Astrogliosis reactiva severa y formación de una escara glial adyacente a una región que presentó lesión traumática severa e inflamación (Inflam.). Nótese el sobrelape y la interdigitación de los procesos astrocíticos que conforman la escara glial (Glial Scar). Tomado de [100].

MICROGLÍA

La microglía representa aproximadamente del 10-20% de la población glial total. Se encuentra distribuida ubicuamente en el SNC y está funcionalmente relacionada con células pertenecientes al linaje monocítico, como los macrófagos en los tejidos periféricos. En la actualidad, se considera que la microglía residente tiene un origen mesodérmico (hematopoyético), y que una vez originadas proceden a invadir el SNC en etapas tempranas

del desarrollo embrionario, estableciéndose dentro de su parénquima y dando lugar a la morfología típica de las células microgliales residentes. [101]. A pesar de la existencia de estudios *in vitro* que sugieren que el origen de la microglía es neuroectodérmico [102], esta idea parece cada vez menos factible [103].

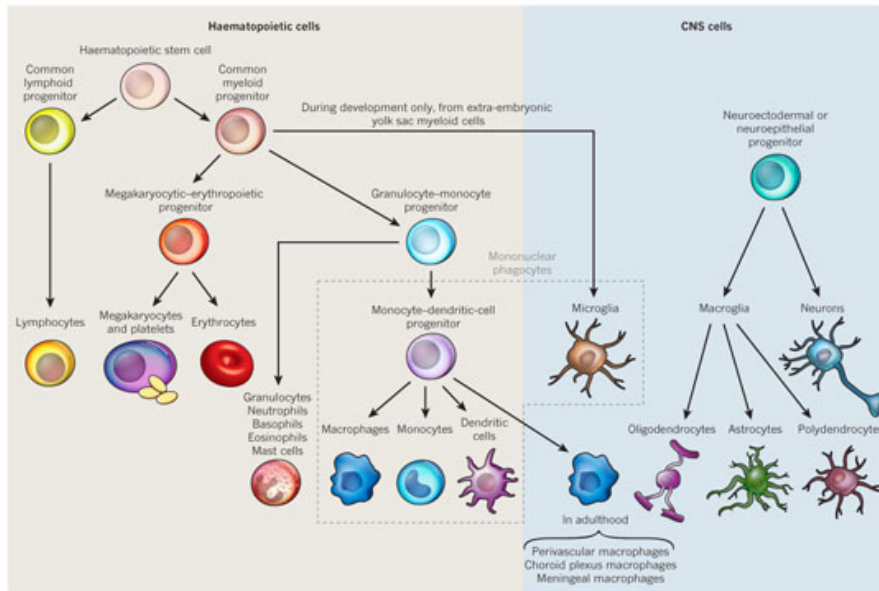


Fig. 12. Relación de la microglía con células hematopoyéticas y del SNC. En esta figura se ilustran las células del sistema hematopoyético y del SNC, con flechas que indican la relación de linaje. La microglía es el único grupo celular hematopoyético encontrado en el SNC. Nótese que el origen de los macrófagos perivascular, del plexo coroideo y de las meninges a partir del progenitor del monocito y las células dendríticas es especulativo y que la célula sanguínea de la cual derivan es desconocida en la actualidad. Tomado de [104]

En el SNC en desarrollo, la mayoría de las células microgliales son ameboides. Esta morfología se modifica gradualmente durante la maduración, hasta que en los inicios del periodo postnatal, la microglía adapta su forma altamente ramificada. Algunas evidencias sugieren que la microglía ameboides encontrada principalmente en áreas de la sustancia blanca (cuerpo calloso supraventricular) durante el periodo perinatal está constituida por macrófagos cerebrales que facilitan la eliminación de detritos celulares y de axones transitorios. Sin embargo, evidencias que muestran que la microglía ameboides está prácticamente ausente en la sustancia gris [105], defienden la idea de que esta apariencia inicial de la microglía puede reflejar un estado “primitivo”, de indiferenciación e inmadurez.

La microglía en estado de reposo se caracteriza por poseer ramificaciones largas, que en la sustancia blanca se encuentran orientadas en paralelo a las fibras nerviosas y en la sustancia gris adquieren una forma estelar [101]

MICROGLIOSIS

Al igual que ocurre con la astrogliá, después de una lesión al SNC se produce la activación microglial. Este fenómeno está caracterizado por la presencia de cambios morfológicos, inmunofenotípicos y funcionales en esta población celular que pueden asociarse a proliferación, migración y fagocitosis. Morfológicamente, las células microgliales responden engrosando sus ramificaciones proximales y disminuyendo las distales al tiempo que incrementan el tamaño de su soma, adquiriendo una morfología ameboide, similar a la de los macrófagos [105]. A nivel molecular, las células microgliales activadas son capaces de organizar en una forma distinta su citoesqueleto y la presentación de antígenos, además de poder secretar moléculas de adhesión celular. Algunos de los cambios inmunofenotípicos más destacados son la expresión *de novo* de moléculas como el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), moléculas que solo se observan en el sistema inmune. Funcionalmente, la microglía activada responde mediante la liberación de sustancias mediadoras, tales como factores de crecimiento y moléculas citotóxicas como el óxido nítrico, proteasas, especies reactivas de oxígeno y citocinas proinflamatorias como interleucina-1, interferón γ y factor de necrosis tumoral- α [101]. En una fase inicial de activación, la microglía se encuentra activa pero no tiene funciones fagocíticas. En una siguiente fase, si existe un proceso degenerativo en el parénquima del SNC, la microglía puede adoptar funciones y morfología fagocítica. [105]

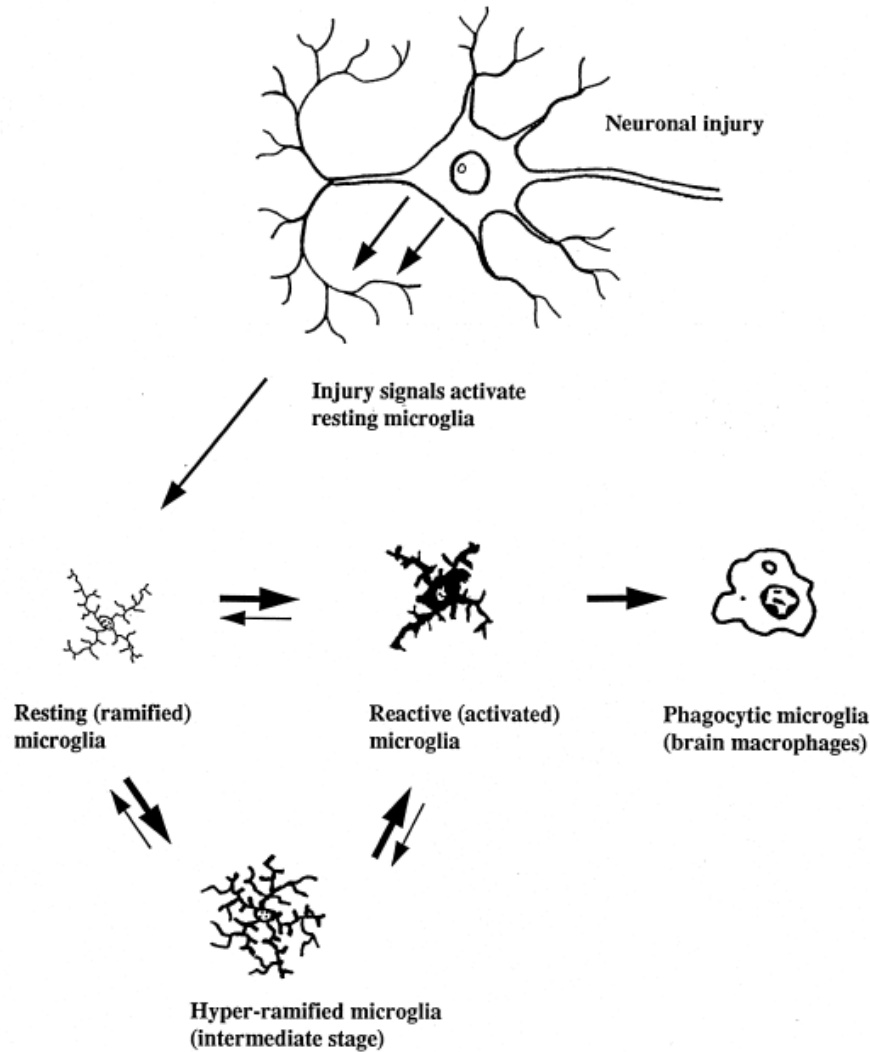


Fig. 13. Plasticidad funcional de la microglía. Las neuronas enfermas o lesionadas ocasionan que la microglía en reposo se active mediante la emisión de señales de lesión. El grado de activación microglial varía dependiendo de la severidad de la lesión neuronal. Tomado de [105]

Habitualmente se hace referencia a la microglía como los “macrófagos residentes” del SNC. Ante esto, es importante mencionar que las células microgliales poseen las propiedades necesarias para convertirse en fagocitos al resultar pertinente, sin embargo la microglía en reposo no es la encargada llevar a cabo la actividad fagocítica en el SNC. La única población en el SNC que puede representar a macrófagos constitutivos es aquella conformada por los pericitos, mientras que la microglía representa simplemente una población facultativa de macrófagos [105].

En la actualidad, existen diversos marcadores empleados para la identificación inmunohistoquímica de las células microgliales, principalmente anticuerpos y lectinas [106],

[107]. Los anticuerpos han sido desarrollados preferentemente contra antígenos específicos de macrófagos, y por lo tanto reconocen principalmente las formas reactiva y ameboides de las células microgliales. Sin embargo, anticuerpos como el CD11b (también llamado OX-42 o MAC-1) son capaces de marcar tenuemente la microglía en estado de reposo. *In vitro*, todos los anticuerpos contra microglía son capaces de reconocer tanto la forma quiescente como la activada. A pesar de que las lectinas pueden reaccionar marcando vasos sanguíneos y plexos coroideos, dentro del SNC son consideradas marcadores específicos de microglía, pues reconocen selectivamente los residuos de D-galactosa en cualquiera de las formas microgliales [107].

V. ANTECEDENTES DIRECTOS

INTERRELACIÓN ENTRE LA CONDICIÓN DE DAÑO POR GLUCOPENIA Y ASTROGLIOSIS / NEUROGÉNESIS

La hipoglucemia transitoria ocurre frecuentemente en la clínica al administrar insulina o hipoglucemiantes orales para el control de la diabetes; dependiendo de la severidad de este trastorno metabólico pueden haber repercusiones autonómicas, neuroendocrinas y conductuales, ya sea temporales o persistentes [108] La glucosa es la fuente más importante de energía para el metabolismo cerebral. La reducción en la utilización de la glucosa celular (glucoprivación) aumenta los niveles de aspartato y glutamato durante y después del insulto glucopénico, al inducir la activación sostenida de receptores glutamatérgicos, misma que resulta en una neuropatología excitotóxica en la que ciertas neuronas mueren selectivamente [109, 110]. La muerte neuronal inducida por la hipoglucemia ocurre predominantemente en la formación hipocámpica, las capas superficiales de la corteza y en el estriado [110], contribuyendo probablemente a secuelas neurológicas tales como el deterioro cognitivo. Estudios diversos han reportado que los déficits en memoria y aprendizaje observados en la clínica se correlacionan significativamente con la frecuencia con la que los pacientes sufren de hipoglucemia, tanto en los diagnosticados con diabetes tipo I como en la fracción joven de pacientes que sufre de diabetes tipo II [111]. A pesar de la alta incidencia de esta complicación durante el control de la diabetes, los cambios fisiopatológicos específicos derivados del insulto cerebral glucopénico y los mecanismos que contribuyen a la reparación cerebral no han sido bien descritos.

Se ha demostrado que las células gliales participan en una extensa cantidad de transacciones cerebrales, tanto normales como patológicas, ejerciendo un rol prominente en los procesos de reparación neural, al responder a todas las formas de insulto al sistema nervioso [112]. La astrogliá se vuelve reactiva (astrogliosis) después de un insulto particular, incrementando la síntesis de la principal proteína del citoesqueleto astrocítico, la proteína ácida glial fibrilar (GFAP), lo cual resulta en la observación de somas hipertróficos y procesos astrocíticos gruesos y prolongados al realizar una evaluación inmunohistoquímica anti-GFAP [112-114]. Existe una vasta cantidad de información referente a las moléculas capaces de inducir astrogliosis reactiva y acerca de los cambios en el patrón de expresión molecular durante la activación glial. No obstante, el curso temporal de este proceso después de una lesión y las funciones específicas ejercidas por el mismo no están bien definidas.

Por otra parte, la neurogénesis en el adulto ha sido implicada en procesos que conducen a la regeneración neural después de lesiones o enfermedades del sistema nervioso. En un modelo animal de hipoglucemia inducida por insulina, Suh et al. [59] reportaron un aumento transitorio en la proliferación de células progenitoras en el giro dentado (GD) subsecuente a una extensiva pérdida neuronal, lo que sugiere que impulsar la regeneración neuronal endógena es un proceso crucial para intentar aligerar la lesión cerebral. Los experimentos realizados por este grupo tuvieron como objetivo determinar diversos aspectos de las consecuencias a corto y a largo plazo de un solo insulto glucopéxico. El primer objetivo fue determinar los cursos temporales y la interrelación de la astrogliosis reactiva y la proliferación celular en el DG del hipocampo después de un insulto neuroglucopéxico moderado. El segundo objetivo fue investigar si la proliferación celular alterada tiene un impacto en la tasa de generación de neuroblastos y averiguar qué proporciones de esta población logran convertirse en neuronas maduras. Con la finalidad de establecer un modelo de neuroglucopenia capaz de inducir un insulto cerebral específico, restringiendo la liberación adrenal de epinefrina y la cortical de glucocorticoides como respuestas fisiológicas a la hipoglucemia sistémica, utilizamos el análogo de la glucosa 2 deoxi-D-Glucosa (2-DG). La 2-DG tiene el grupo 2-hidroxilo reemplazado por hidrógeno. Por lo tanto, no puede avanzar en la vía glucolítica. Brevemente, la 2-DG es introducida a la célula a través de los transportadores de glucosa [115] y es fosforilada por la glucosa hexoquinasa para producir 2-deoxi-D-Glucosa-6-Fosfato. El hecho de que esta molécula no puede ser metabolizada por la vía glucolítica, ocasiona su acumulación gradual dentro de la célula, seguida de la inhibición de la glucosa-6-fosfato isomerasa y el bloqueo subsecuente de la conversión de glucosa-6-fosfato a fructosa-6-fosfato, un paso crucial de esta vía metabólica [116]. Esta propiedad intrínseca de la 2-DG ha sido aplicada en la farmacología para el tratamiento de dos enfermedades frecuentemente observadas en la práctica clínica, el cáncer y la epilepsia, estados fisiopatológicos en los que existen elevadas demandas metabólicas. Además, la 2-DG atraviesa la barrera hematoencefálica (BHE), lo que le permite ser utilizada en la inducción de neuroglucopenia experimental.

La activación glial contribuye directamente al aumento de la neurogénesis en la zona subgranular de la formación hipocámpica posterior a un insulto cerebral. Este fenómeno está mediado por el aumento de la proliferación de las células gliales radiales en la zona, las cuales tienen contactos funcionales tanto con el sistema ventricular remanente como con las neuronas granulares recién generadas.

ASTROGLIOSIS Y NEUROGÉNESIS EN LA CONDICIÓN DE DAÑO POR PILOCARPINA

El insulto excitotóxico producido por el agente quimioconvulsivo pilocarpina induce estatus epiléptico (SE) en ratas, cuando se administra una dosis de 380 ± 20 mg/kg [137-139]. Este procedimiento conlleva a una epileptogénesis tardía, caracterizada por la aparición de crisis convulsivas espontáneas recurrentes (SRS) después de un periodo “silente” relativamente prolongado, en el cual los trazos electroencefalográficos y las manifestaciones conductuales se encuentran aparentemente normalizados [140, 141]. La capacidad de la pilocarpina para inducir SE parece depender de la activación de los receptores muscarínicos M1 [142]. Sin embargo, los factores que contribuyen al desarrollo de las SRS después del periodo silente no están bien descritos.

El hipocampo es una estructura cerebral comúnmente involucrada en la epilepsia límbica y del lóbulo temporal, tanto en humanos como en modelos de roedores, mismos que han sido ampliamente estudiados [141]. Actualmente, existe una controversia respecto al rol de la reorganización neuronal en la generación de SRS. La “hipótesis de excitación recurrente” propone que después de un insulto epileptogénico, los axones de las células granulares (fibras musgosas) se reorganizan y establecen un circuito excitatorio recurrente anormal que genera las SRS mediante el establecimiento de asas de retroalimentación positiva entre las células granulares [143]. En contraste, la “hipótesis de inhibición recurrente” propone que después de un insulto, las fibras musgosas establecen sinápsis preferencialmente con interneuronas inhibitorias y no con células granulares [144]. Dada esta evidencia, la reorganización neuronal parece representar un mecanismo homeostático que permite controlar la hiperexcitabilidad producida por los insultos epileptogénicos. Recientemente, Buckmaster y cols. administraron rapamicina a un modelo animal de epilepsia del lóbulo temporal, logrando inhibir el brote de las fibras musgosas sin alterar la frecuencia de SRS, lo cual sugiere que este fenómeno no es pro ni anti-convulsivo [145]. Por lo tanto, los principales mecanismos que contribuyen a la epileptogénesis tardía continúan siendo poco claros.

En la actualidad, existe un interés creciente en estudiar el rol de la activación glial y la inflamación cerebral en la epileptogénesis [139, 146-149]. Es bien sabido que la neuroglia juega un rol esencial para el metabolismo cerebral, la homeostasis iónica extracelular, la integridad de la barrera hematoencefálica, la función inmune y el mantenimiento del espacio extracelular, ejerciendo influencias clave en las funciones neuronales [150]. El alargamiento astrocítico y el incremento en la expresión de proteína ácida glial fibrilar (GFAP) son

indicadores de astrogliosis reactiva. Los astrocitos reactivos que sobreexpresan GFAP podrían ejercer una función protectora en el sistema nervioso lesionado, participando en diversos procesos biológicos [151, 152]. Estudios recientes han demostrado que los astrocitos y la microglia se activan rápidamente después de la administración de pilocarpina [153] y que la activación de la microglia conlleva a la muerte astrocítica [139], sugiriendo que las respuestas gliales después del SE podrían estar contribuyendo a la epileptogénesis.

Dadas la controversia y la serie de evidencias expuestas anteriormente, hipotetizamos que existe un límite funcional para la activación de las redes neuronales “impuesto” por la regulación homeostática glial. Una vez que este límite es sobrepasado, la red neuronal se hiperactiva, llevando al sistema a la inestabilidad. En este caso, la desregulación glial, iniciada por la aparición de anomalías morfológicas astrocíticas progresivas y sinergizada por la pérdida de la densidad astrogliar ocasiona el debilitamiento de las propiedades homeostáticas gliales, provocando la hiperactivación de la red neural. Para examinar esta hipótesis, realizamos evaluaciones morfométricas cuantitativas individuales de la hipertrofia citoesquelética astrogliar y la pérdida de la densidad poblacional en el hipocampo de la rata después de la administración de pilocarpina, en una relación dosis-respuesta, tanto a mediano como a largo plazo.

La pérdida de la resiliencia glial en los animales sometidos a la administración de altas dosis de pilocarpina juega un rol prominente en la aparición de crisis convulsivas espontáneas recurrentes en este modelo animal.

VI. HIPOTESIS

La activación glial contribuye directamente al aumento de la neurogénesis en la zona subgranular de la formación hipocámpica posterior a un insulto cerebral. Este fenómeno está mediado por el aumento de la proliferación de las células gliales radiales en la zona, las cuales tienen contactos funcionales tanto con el sistema ventricular remanente como con las neuronas granulares recién generadas.

La pérdida de la resiliencia glial en los animales sometidos a la administración de altas dosis de pilocarpina juega un rol prominente en la aparición de crisis convulsivas espontáneas recurrentes en este modelo animal.

VII. OBJETIVOS

1. Contribuir al entendimiento de los mecanismos implicados en la reparación neural post-insulto cerebral

Utilizando el modelo de neuroglucopenia inducida por la administración de 2-deoxi-D-glucosa (2DG)

- 1.1. Caracterizar el curso temporal de la astrogliosis reactiva secundaria al insulto neuroglucopénico en el giro dentado del hipocampo.
 - 1.2. Caracterizar el curso temporal de la proliferación celular inducida por la administración de 2DG en la zona subgranular del giro dentado del hipocampo.
 - 1.3. Determinar la probable existencia de una correlación temporal entre ambos fenómenos después de un insulto.
2. Evaluar la repercusión de una sola inyección de diferentes dosis de pilocarpina sobre la población glial del hilio del giro dentado (DG) del hipocampo de la rata adulta

Utilizando el modelo de insulto inducido por la administración del quimioconvulsivo pilocarpina:

- 2.1. Caracterizar el comportamiento temporal de la astrogliosis reactiva en el hipocampo de los grupos control y experimental.
- 2.2. Evaluar los aspectos morfológicos astrocíticos de los grupos control y experimental mediante reconstrucción celular.
- 2.3. Evaluar los efectos de la administración de pilocarpina sobre la densidad de la población astrocítica del hilio del DG.
- 2.4. Caracterizar el comportamiento temporal de la microgliosis reactiva en los grupos control y experimental.
- 2.5. Cuantificar el número de células microgliales activadas en el hilio del DG de los grupos control y experimental.

VIII. MATERIAL Y MÉTODOS

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

CORRELACIÓN TEMPORAL DE ASTROGLIOSIS Y NEUROGÉNESIS EN EL HIPOCAMPO DE LA RATA ADULTA DESPUÉS DE UN INSULTO GLUCOPÉNICICO

1. Generación de animales con insulto neuroglucopénico mediante la aplicación de 2DG
2. Marcaje de la proliferación celular mediante la administración de 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU).
3. Realización de experimentos de inmunohistoquímica anti proteína ácida glial fibrilar (GFAP) para evaluar la activación glial entre 1 y 14 días post-insulto.
4. Realización de inmunohistoquímica doble:
5. A los 7 días post-insulto: BrdU y Doblecortina (DCX)
6. A los 28 días post-insulto: BrdU y Núcleo Neuronal (NeuN)
7. Análisis de los resultados y determinación de la distribución, temporalidad y tasa de proliferación y sobrevivencia tanto de los neuroblastos como de las neuronas maduras generadas por el insulto (mediante comparación con los respectivos controles).
8. Estudiar los aspectos ultraestructurales de contacto y sinaptología de las células tipo glía radial, neuroblastos y neuronas granulares generados después del insulto (a través de su marcaje con BrdU y otros marcadores específicos).

PÉRDIDA DE LA RESILIENCIA GLIAL Y NEUROGÉNESIS ABERRANTE EN EL MODELO ANIMAL DE PILOCARPINA

1. Generación de animales con insulto mediante la aplicación de clorhidrato de pilocarpina.
2. Realización de experimentos de inmunohistoquímica anti proteína ácida glial fibrilar (GFAP) para evaluar la activación astrocítica a las 2, 4 y 8 semanas post-insulto.
3. Realización de reconstrucciones astrocíticas en el hipocampo (stratum radiatum de CA1 y CA3 e hilio del giro dentado) mediante la utilización de una cámara lúcida integrada a un microscopio de luz.

4. Realización de conteos astrocíticos en el hipocampo (stratum radiatum de CA1 y CA3 e hilio del giro dentado).
5. Realización de experimentos de inmunohistoquímica anti CD11b (OX42) para evaluar la activación microglial a las 2, 4 y 8 semanas post-insulto.
6. Realización de conteos de células microgliales activadas en el hilio del giro dentado.
7. Análisis y comparación de las alteraciones en la población glial y su correlación con la aparición de crisis convulsivas espontáneas recurrentes en este modelo animal.

ANIMALES Y PROCEDIMIENTOS

CORRELACIÓN TEMPORAL DE ASTROGLIOSIS Y NEUROGÉNESIS EN EL HIPOCAMPO DE LA RATA ADULTA DESPUÉS DE UN INSULTO GLUCOPÉNICO

92 ratas Wistar machos de 300 ± 10 g fueron utilizadas en este estudio. Todos los procedimientos fueron aprobados por los comités de Bioética y Bioseguridad de la Facultad de Medicina de la UNAM. Los animales se mantuvieron bajo un ciclo artificial de luz-oscuridad (luz encendida a las 18:00 h y apagada a las 6:00 h), alojados en un cuarto con una temperatura que oscilaba entre los 20 y los 24° C, con ventilación adecuada y acceso *ad libitum* a agua y alimento, salvo que se especifique lo contrario. La Fig. 14 ilustra el diseño experimental general de los tres experimentos.

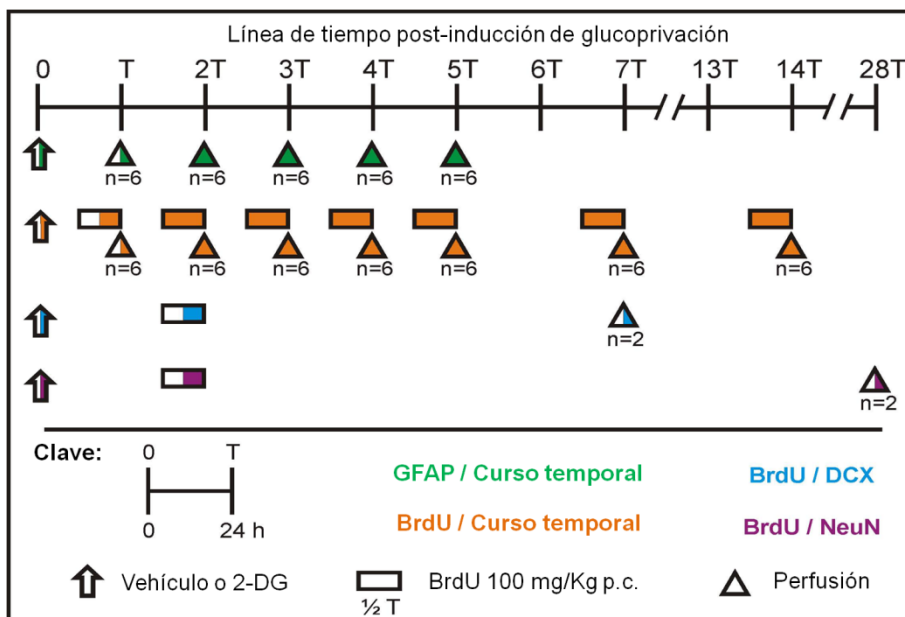


Fig.14 Diseño experimental general. La línea de tiempo correlaciona los experimentos realizados post-glucoprivación (GI). Cada intervalo de tiempo (T) representa un periodo de 24 horas. La glucoprivación fue inducida mediante la inyección de 2-deoxi-D-glucosa en el tiempo 0, indicado con una flecha abierta

(al grupo control le fue administrada solución salina). Los símbolos semi-rellenos indican puntos temporales en los cuales se obtuvieron datos del grupo control. El color verde indica la caracterización del curso temporal de la astrogliosis reactiva reflejado en la inmunorreactividad anti-GFAP; el color naranja indica la caracterización del curso temporal de la proliferación alterada de células progenitoras producida por GI en la SGZ. Los colores azul y morado indican la evaluación de las tasas neurogénicas reflejadas en conteos de neuroblastos (BrdU/DCX) y neuronas maduras (BrdU/NeuN) doblemarcadas respectivamente. Los triángulos indican los puntos temporales de perfusión y los rectángulos denotan el tiempo de exposición a BrdU (12h). Un total de 92 ratas Wistar macho fueron utilizadas, el número de animales por grupo incluido en cada punto temporal está indicado debajo del punto de perfusión. SGZ: zona subgranular; GFAP: proteína ácida glial fibrilar; BrdU: 5-bromo-deoxiuridina; DCX: doblecortina; NeuN proteína nuclear neuronal.[117]

PÉRDIDA DE LA RESILIENCIA GLIAL Y NEUROGÉNESIS ABERRANTE EN EL MODELO ANIMAL DE PILOCARPINA

67 ratas Wistar machos de 220 ± 20 g fueron utilizadas en este estudio. Todos los procedimientos fueron aprobados por los comités de los comités locales de investigación y ética (Comisiones de Investigación y Ética de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México), con el número de aprobación 063-2011, de acuerdo con los principios expuestos en el Manual para el Uso de Animales para la Investigación en Neurociencias (Society for Neuroscience, Washington, D.C. 1991). Los animales se mantuvieron bajo un ciclo artificial de luz-oscuridad (luz encendida a las 18:00 h y apagada a las 6:00 h), alojados en un cuarto con una temperatura que oscilaba entre los 20 y los 24° C, con ventilación adecuada y acceso ad libitum a agua y alimento.

Una dosis epileptógena comúnmente utilizada (380 mg/kg) y sus fracciones de 1/10, 1/4 y 1/2 fueron utilizadas en este estudio. Los sujetos experimentales fueron distribuidos en 10 grupos (n=6), control, “38 mg/kg”, “95 mg/kg”, “190 mg/kg” para los puntos temporales 2- y 4- semanas y “380 mg/kg” para los puntos temporales 2-,4-, y 8-semanas (2W, 4W, 8W).

Al inicio de este estudio, inyectamos metilbromuro de atropina (5 mg/kg, Sigma, St. Louis, MO) vía intraperitoneal para minimizar los efectos periféricos de la pilocarpina. Veinte minutos después, inyectamos clorhidrato de pilocarpina (Sigma, St. Louis, MO) disuelta en solución salina al 0.9%, utilizando las dosis correspondientes a cada uno de los grupos experimentales. La dosis de 380 mg/kg fue inyectada a 25 ratas, de las cuales 18 sobrevivieron al insulto, arrojando una tasa de supervivencia del 72%. Las ratas supervivientes fueron subdivididas en grupos de 2-,4-, y 8-semanas (2W, 4W y 8W respectivamente). El momento en que el animal sufrió una crisis convulsiva motora tipo 4 de la escala de Racine [154] fue considerado como el punto de inicio del estatus epilepticus (SE). Una hora después del inicio del SE, se administró una dosis de 5 mg/kg de diazepam, la cual fue seguida de dosis subsecuentes de 2.5 mg/kg en intervalos de 30 minutos durante las dos siguientes horas.

Resulta importante mencionar que con este esquema de tratamiento, el intervalo entre la inducción del SE y el inicio de las crisis convulsivas espontáneas recurrentes (SRSs) es alrededor de 4 semanas (datos no publicados), lo cual es comparable con datos de la literatura [155-157], sin embargo, en este estudio no realizamos un monitoreo adecuado de este parámetro. Tomando en cuenta estos datos y la extensiva serie de estudios publicados en la literatura respecto a los fenómenos de astrogliosis y microgliosis durante los primeros días después del insulto de pilocarpina, consideramos que los mejores puntos a evaluar en este estudio serían 2W, 4W y 8W.

Para el procesamiento de tejidos, las ratas fueron anestesiadas profundamente con una sobredosis de pentobarbital y perfundidas transcárdialmente en los puntos temporales correspondientes con solución salina al 0.9%, seguida de solución fijadora con 4% de paraformaldehído en buffer de fosfato sódico 0.1M (PB, pH 7.4), con 15% v/v de ácido pícrico saturado, durante 15 minutos. Los cerebros fueron removidos y lavados vigorosamente con PB 0.1 M. Posteriormente, se obtuvieron rebanadas coronales de 70 mm, utilizando un vibratomo Leica VT 1000 (Heidelberg, Alemania). Para realizar las inmunotinciones, se incubaron conjuntos de una de cada seis rebanadas de Bregma -3.2 mm a -3.8 mm, utilizando buffer Tris (pH 7.4 a 20°C) más solución salina al 0.9% (TBS), Tritón X-100 (Sigma, T-7878) al 0.3% y suero de caballo normal (Laboratorios Vector, Burlingame, CA) al 20% en TB por una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se llevaron a cabo inmunorreacciones convencionales utilizando los siguientes anticuerpos primarios: ratón anti-GFAP (Chemicon MAB360, Temecula, CA, 1:2000), ratón anti-CD11b (OX42) (Serotec MCA275G, Oxford, UK, 1:2000) y los anticuerpos secundarios Alexa 488 IgG burro anti-ratón (InVitrogen, Carlsbad, CA, 1:1000) e IgG biotilada cabra anti-ratón. (Laboratorios Vector, Burlingame, CA, 1:1000). Para esta última reacción, las secciones fueron posteriormente incubadas en complejo avidina-biotina-peroxidasa (Kit Elite ABC, Laboratorios Vector) por una hora a temperatura ambiente. La peroxidasa fue detectada utilizando diaminobenzidina al 0.05% como cromógeno y peróxido de hidrógeno (H₂O₂ al 0.01% v/v) como substrato.

Los procedimientos inmunohistoquímicos para BrdU, DCX, CD11 y NeuN son los que fueron escritos en el experimento previo.

Para los análisis morfométricos, las secciones inmunoteñidas de los hipocampos fueron analizadas utilizando un microscopio de luz Nikon Eclipse 50i equipado con fluorescencia y un tubo de dibujo. Se analizaron dos variables astrocíticas, la densidad celular y los cambios morfológicos en el hipocampo, particularmente en el stratum radiatum (str. Rad.)

de CA1 y CA3 y el hilio del giro dentado (DG). Con la finalidad de determinar la densidad celular, todos los somas encontrados en la región fueron dibujados a baja magnificación (10x) y posteriormente digitalizados y analizados utilizando ImageJ (Institutos Nacionales de Salud, EE. UU.). Para evaluar el arreglo citoplásmico tridimensional astrocítico, se escogieron 4 astrocitos aleatoriamente en cada una de las regiones evaluadas (i.e. str. rad. para CA1 y CA3 e hilio para el DG) en dos rebanadas similares de cada sujeto experimental. Los dibujos fueron elaborados a 100X en el microscopio de luz y 10X en el tubo de dibujo, variando los planos focales para lograr reconstrucciones celulares más completas. Para comparar el tamaño relativo de la hipertrofia citoesquelética astrocítica, el grosor de los filamentos fue cuantificado utilizando dibujos digitalizados. La sumatoria de las longitudes de las intersecciones dentro de los anillos concéntricos de Sholl [158] fueron analizados como se describió previamente [113]. Brevemente, la retícula estereológica consiste en siete círculos concéntricos que representan 5 μm de distancia real entre cada círculo (bajo los parámetros ópticos previamente especificados). Los somas astrocíticos, identificados por la presencia de una cavidad nuclear, fueron colocados en el centro de la retícula. El grosor de cada intersección se midió con ImageJ y se analizó la suma de la longitud total de las intersecciones de cada astrocito.

Los resultados cuantitativos fueron expresados como la media como la media \pm el error estándar de la media; los grupos fueron analizados en busca de diferencias realizando un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías (factores: puntos temporales vs. dosis de pilocarpina), seguidos de pruebas de Bonferroni, utilizando Prism (Graph Pad Software Incorporation, La Jolla, CA). Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas en un valor $P < 0.05$ (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

INDUCCIÓN DE NEUROGLUCOPENIA (GI)

Los sujetos experimentales recibieron una sola inyección i.p. de una dosis (500 mg/kg) de 2-deoxi-D-Glucosa (2-DG, Sigma-Aldrich) disuelta en solución salina al 0.9%; los grupos control fueron inyectados con vehículo únicamente. La inyección fue realizada a las 10:00h, periodo denotado como tiempo 0 (Fig. 14, indicado con una flecha), con 4 horas de restricción alimenticia antes y después de la inyección.

CARACTERIZACIÓN DEL CURSO TEMPORAL DE LA ASTROGLIOSIS REACTIVA

El sacrificio de animales fue realizado en los siguientes periodos de tiempo post GI: 24 h(T) (punto T; T denota un periodo de 24 h), 48h (2T), 72h (3T), 96h (4T) y 120h (5T), n=6 para cada grupo en cada periodo de tiempo (Fig. 14, grupo verde), mediante perfusión transcardial con solución salina al 0.9%, seguida de solución fijadora con 4% de paraformaldehído en buffer de fosfato sódico 0.1M (PB, pH 7.4), con 15% v/v de ácido pícrico saturado, durante 15 minutos. Los cerebros fueron removidos y lavados vigorosamente con PB 0.1 M. Posteriormente, se obtuvieron rebanadas coronales de 50 mm, utilizando un vibratomo. Para realizar las inmunotinciones, conjuntos de una de cada seis rebanadas de Bregma -3.2 mm a -3.8 mm fueron procesadas. Los anticuerpos ratón anti-GFAP (1:1000, Chemicon) y pollo anti-ratón Alexa fluor 594 (1:1000, Molecular Probes) fueron utilizados como anticuerpos primario y secundario respectivamente, mediante técnicas inmunohistoquímicas convencionales. Posteriormente se fotografió el hilio del DG y se realizó la medición de la densidad óptica utilizando el programa Fovea Pro 4.0 (Reindeer Graphics).

CARACTERIZACIÓN DEL CURSO TEMPORAL DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR SECUNDARIA AL GI EN LA ZONA SUBGRANULAR (SGZ)

Se preparó e inyectó 5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU, Sigma, 50 mg/kg/12 h, dividida en tres inyecciones) y posteriormente se realizó inmunohistoquímica anti-BrdU, tal y como se encuentra descrito en otros protocolos [118]. Con la finalidad de obtener una tasa de proliferación relativamente precisa y cercana a los distintos puntos temporales, las inyecciones de BrdU cubrieron solamente las 12 h inmediatas previas a las perfusiones en los puntos temporales *T*, *2T*, *3T*, *4T*, *5T*, *7T* y *14T* (Fig. 14, grupo naranja). Las rebanadas utilizadas fueron seleccionadas con los mismos criterios empleados en el experimento descrito anteriormente. Los anticuerpos rata anti-BrdU (1:1000, Accurate Scientific) e IgG cabra anti-rata (Alexa Fluor 488, 1:1000, Invitrogen) fueron utilizados como anticuerpos primarios y secundarios, respectivamente. Posteriormente, se realizó un conteo de los núcleos inmunorreactivos presentes en el hilio de la SGZ. Para evaluar la tasa de neurogénesis post-GI en el punto temporal en el cual se observó la mayor proliferación celular, las ratas de las condiciones control y experimental (n= 4) fueron inyectadas con BrdU 12h previo al periodo *2T*. La mitad de cada grupo fue perfundida en el punto *7T* con la finalidad de realizar la detección de neuroblastos marcados con BrdU, mediante la utilización del marcador doblecortina (DCX) (Fig.

14, grupo azul), y la otra mitad fue perfundida en el punto 28T para detectar neuronas maduras marcadas con BrdU, a través del marcaje de una proteína nuclear neuronal (NeuN) específica (Fig. 14, grupo morado). Los procesos de perfusión, corte y selección de rebanadas se relizaron tal y como se describió anteriormente. Los siguientes anticuerpos primarios fueron utilizados para las inmunorreacciones correspondientes: rata anti-BrdU (1:1000, Accurate Scientific), cabra anti-DCX (1:1000, Santa Cruz Biotechnology) y ratón anti-NeuN (1:1000, Chemicon); anticuerpos secundarios: Alexa 488 IgG burro anti-rata, Alexa 594 IgG conejo anti-cabra e IgG burro anti-ratón (Molecular Probes). Dos experimentalistas realizaron conteo celular "ciego", bajo microscopía de fluorescencia en la SGZ adyacente al hilio. Realizando el cambio de filtros para visualizar los fluorocromos Alexa 488 y 594, se pudieron identificar claramente las células doblemente marcadas, tanto BrdU/DCX como BrdU/NeuN.

Para evaluar los aspectos morfológicos de los procesos de las células tipo glía radial, utilizamos una versión modificada de los anillos de Sholl [113], retícula estereológica con círculos concéntricos de 10 μm de distancia entre ellos. El soma celular, con sus ramificaciones visibles, fue colocado en el centro de la retícula para posteriormente contar el número de intersecciones (NoI) entre la retícula y las proyecciones de los procesos de las células tipo glía radial.

Los resultados cuantitativos se expresaron como la media \pm el error estándar de la media. La diferencia intergrupar fue evaluada utilizando un análisis de varianzas de una vía seguido, cuando fue pertinente, por la prueba post-hoc de Dunnet, utilizando el programa Prism (GraphPad Software Inc.). Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas en un valor $P < 0.05$.

IX. RESULTADOS

CORRELACIÓN TEMPORAL DE ASTROGLIOSIS Y NEUROGÉNESIS EN EL HIPOCAMPO DE LA RATA ADULTA DESPUÉS DE UN INSULTO GLUCOPÉNICO

La astrogliosis reactiva después de un insulto neuroglucopénico único muestra un pico en su expresión a las 48h PI y se mantiene significativamente distinta con respecto al control por los siguientes 3 días consecutivos. 1 día después de la administración de 2-DG, las células de la astrogliosis aparentaban ser normales bajo observación general; las mediciones realizadas en el hilio del hipocampo no mostraron diferencias al ser comparadas contra el control. Sin embargo, la densidad óptica en el periodo 2T mostró un aumento de aproximadamente el doble de la inmunorreactividad contra GFAP, misma que se mantuvo elevada durante los siguientes 2 días, regresando a los niveles del control aproximadamente hasta el punto 5T (Fig. 15C, densidad óptica del control Ctrl = 7.50 ± 0.28 ; T = 7.24 ± 0.40 ; 2T = 12.78 ± 0.71 ; 3T = 10.89 ± 0.59 ; 4T = 10.07 ± 0.69 ; 5T 7.34 ± 0.57). Durante el análisis morfológico en el periodo 2T, se observó un aumento en la longitud (mayor número de intersecciones) de los procesos de las células tipo glía radial. Estos procesos surgen de somas inmunorreactivos a GFAP localizados en el borde entre el hilio y la capa de células granulares (GCL), mismos que se extienden a la CCG a una distancia mayor que la del control (Fig. 15)

Un insulto glucopénico inducido mediante la administración de 2-DG alteró la proliferación de los progenitores de la SGZ en una dinámica tiempo-dependiente, mostrando un pico a las 48 h PI; los marcajes inmunohistoquímicos evidenciaron una elevación de los núcleos BrdU+ en los puntos temporales 2T (26.7 ± 3.5), 3T (19.2 ± 0.8) y 4T (21.9 ± 1.9), mostrando el valor más elevado en el punto 2T post GI, que coincide con el pico de inmunorreactividad anti-GFAP. De 5T a 14T, no se observó diferencia significativa en el conteo de núcleos BrdU+ entre los grupos control y experimental (15.5 ± 1.7) (Fig.16).

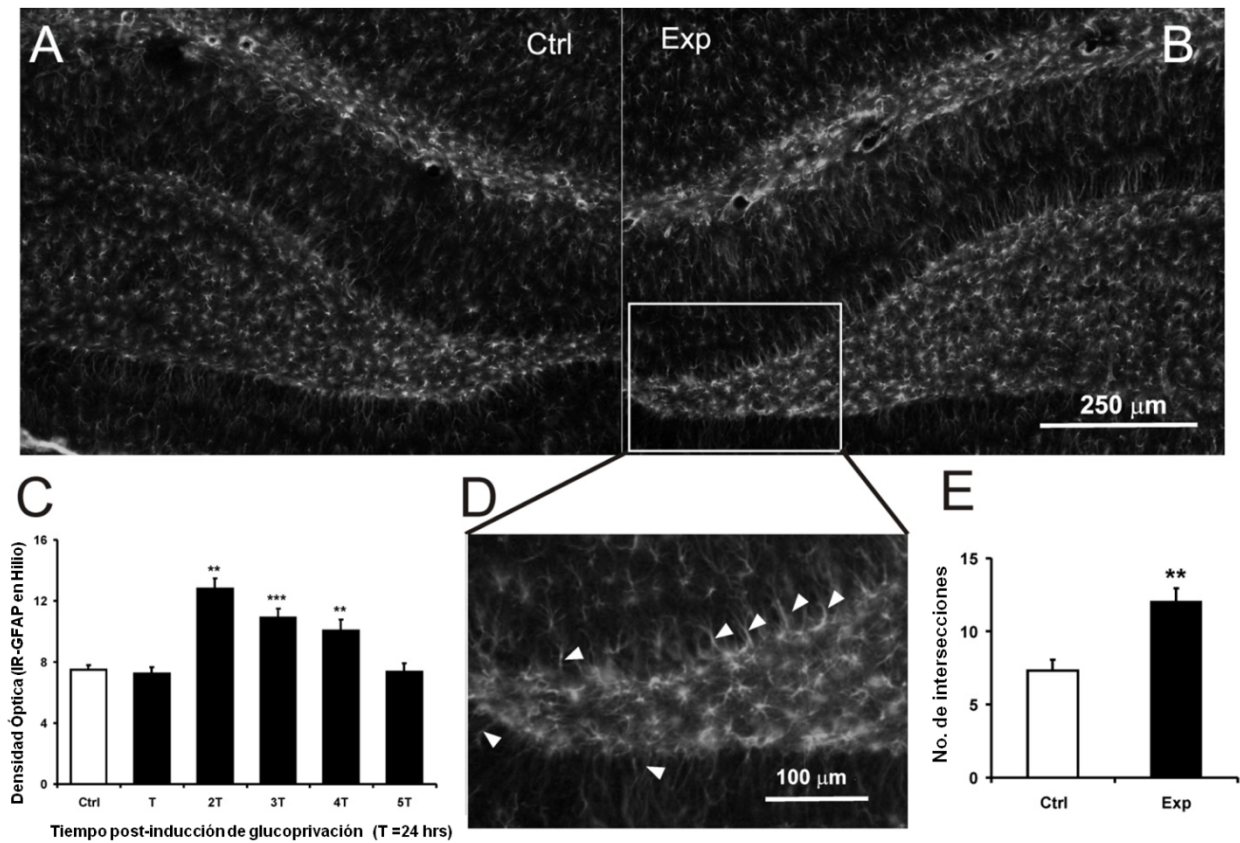


Fig. 15 Efecto de la glucoprivación transitoria sobre la astroglia en el hilio del giro dentado. Microfotografías representativas de inmunohistoquímica anti-GFAP en el DG de los grupos control (A) y experimental (B) perfundidos 48 después de inducir la glucoprivación (GI). El inserto (D) muestra la región hiliar adyacente a la zona de fusión de las capas de células granulares dorsal y ventral (GCL) con una magnificación más alta. Algunos procesos tipo radial inmunoreactivos a GFAP extendiéndose dentro de la GCL se indican con flechas. (C) Histograma que muestra el curso temporal de la reactividad astrocítica medido mediante el análisis de la densidad óptica en el hipocampo post GI. T= 24 h. (E) Cuantificación del número de intersecciones de los procesos citoesqueléticos de las células tipo glía radial mediante el uso de los anillos de Sholl modificados en el punto 2T. **P < 0.01, ***P < 0.001.[117]

Se revelaron modificaciones a largo plazo en la tasa neurogénica, al encontrarse cifras elevadas de neuronas recién formadas transformándose en neuroblastos en el periodo 7T, así como neuronas maduras en el periodo 28T en los animales experimentales: el número de células BrdU+/DCX+ fue significativamente mayor en los animales inyectados con 2DG (13.63±1.4) que en el control (5.5±1.1; Fig. 17) Estas células fueron frecuentemente observadas en agrupaciones a lo largo de la SGZ. Para estudiar si los neuroblastos formados alcanzan su diferenciación y se convierten en neuronas maduras, se realizó perfusión en el periodo 28T PI, con la finalidad de realizar inmunotinciones contra BrdU y NeuN (Fig. 14, Gpo. Morado). Se observó un incremento de aproximadamente el doble en el número de núcleos BrdU+/NeuN+ en el grupo 2DG con respecto al control (5.0±0.5 vs 2.5±0.2, respectivamente; Fig. 17).

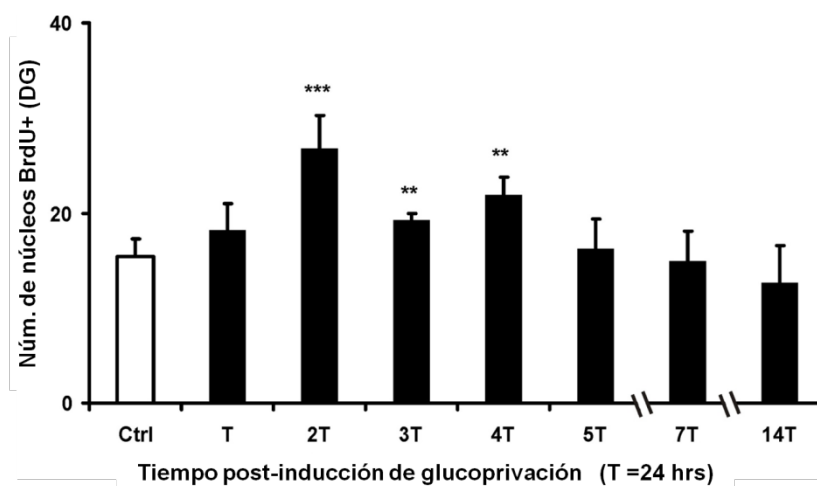


Fig. 16 Curso temporal de la proliferación celular en el DG post GI. Se observó el efecto temporal de una sola dosis de 2-DG (500 mg/kg) sobre el número de nucleosinmunoreactivos a BrdU durante los primeros cinco días. Nótese que el pico en el marcaje de BrdU coincide con el pico de la expresión de GFAP en el hilio en el periodo 2T (Fig.15. T= 24h.)**P < 0.01, ***P < 0.001. Los conteos fueron obtenidos de los números totales de núcleos BrdU positivos por zona subgranular de cada rebanada.[117]

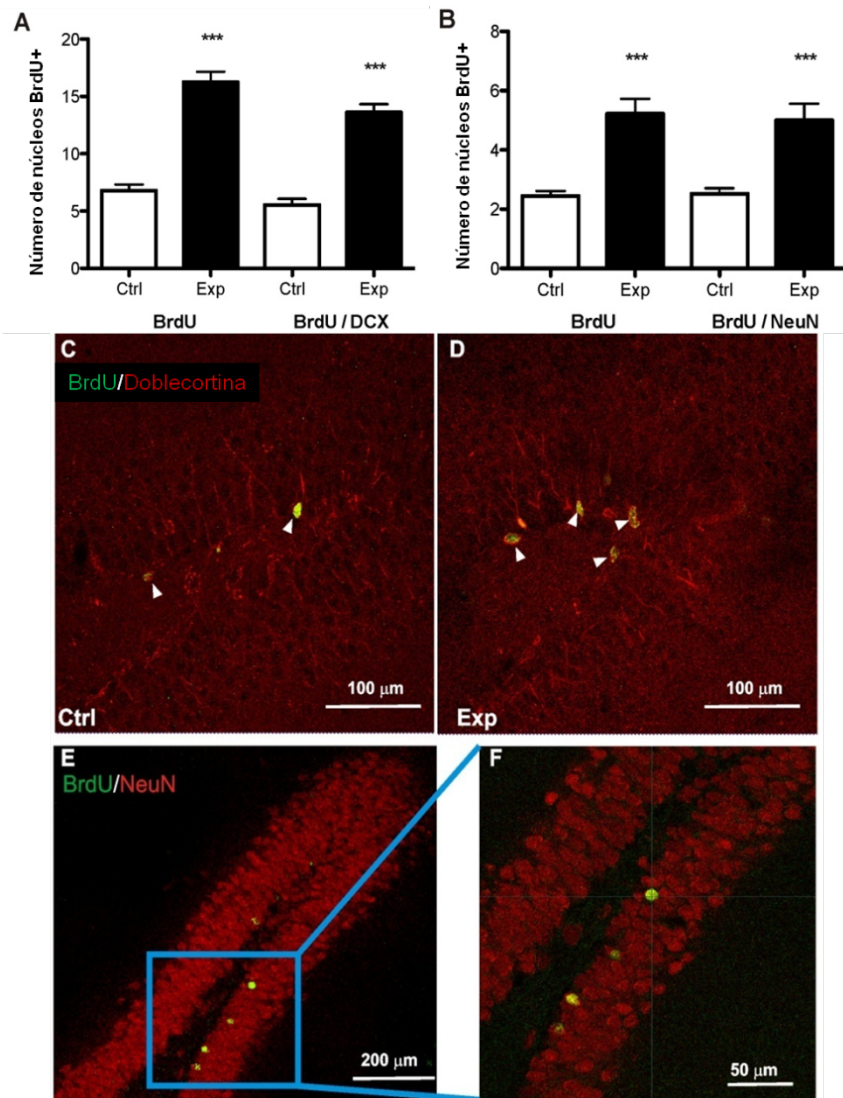


Fig. 17 Efecto de la glucoprivación transitoria sobre la neurogénesis en la capa de células granulares del hilio del giro dentado. A) Histograma que muestra el número de núcleos BrdU+ y el número de células BrdU+/DCX+ en los animales control (Ctrl) y experimental (Exp). Para analizar la naturaleza de las neuronas recién formadas tras el insulto inducido por la administración de 2-DG, se inyectó BrdU dos días después de la dosis de 2-DG, tomando en cuenta el pico de proliferación celular mostrado en la Fig. 16. (C y D) Microfotografías representativas de inmunohistoquímica doble anti BrdU/NeuN. (F) Inserto de E. ***P<0.001. Los conteos fueron obtenidos del número total de células doblemarcadas (A) y núcleos (B) por zona subgranular hiliar de cada sección.[117]

PÉRDIDA DE LA RESILIENCIA GLIAL Y NEUROGÉNESIS ABERRANTE EN EL MODELO ANIMAL DE PILOCARPINA

Las alteraciones producidas por la administración sistémica de pilocarpina presentaron una dinámica dosis-dependiente. En los grupos experimentales con las dosis de 38 mg/kg, 95 mg/kg y 190 mg/kg de pilocarpina, los animales mostraron signos leves de estimulación colinérgica. A la dosis de 380 mg/kg de pilocarpina, las ratas desarrollaron crisis límbicas motoras, aproximadamente 15 ó 20 minutos después de la inyección, las cuales se transformaron progresivamente en un SE.

Utilizando el marcaje con GFAP y el análisis de las longitudes de las intersecciones con los anillos de Sholl como parámetro operacional para la hipertrofia citoesquelética astrocítica, observamos dinámicas dosis-dependientes de los cambios morfológicos en CA1, CA3 y DG. La administración sistémica de pilocarpina indujo hipertrofia citoesquelética con las dosis de 95 mg/kg y superiores a las 2W (Fig. 18, G,H,I, barras rojas). Sin embargo, este fenómeno se revirtió en la evaluación a las 4W en los grupos que no desarrollaron SRSs (Fig. 18, G,H,I, barras azules de los grupos 38 mg/kg, 95 mg/kg y 190 mg/kg). En contraste, en el grupo de 380 mg/kg este fenómeno, evaluado a las 4W, se encontraba exacerbado y aun mostraba diferencia significativa contra el control a las 8W (Fig. 18, G,H,I, barras azules y negra). Se observaron abundantes astrocitos con edema celular y nuclear (para referencias morfológicas revisar [146]) en los grupos de dosis total a las 2W y 4W (Fig. 18 E y F).

La densidad celular positiva al marcaje con GFAP sufrió una pérdida a mediano plazo, comenzando en el grupo de 95 mg/kg, observado a las 2W (Fig. 19 G, barras rojas). Sin embargo, se observaron recuperaciones a las 4W en los grupos de 95 mg/kg y 190 mg/kg, los cuales no desarrollaron SRSs antes de las 4W (Fig. 19 G, barras azules de 95 mg/kg). En el grupo de 190 mg/kg, no se observó recuperación absoluta a las 4W ($P < 0.001$ vs. control). Sin embargo, se observó una diferencia significativa respecto al punto temporal 2W en este mismo grupo ($P < 0.001$). No se observó recuperación en el grupo de 380 mg/kg, mismo que debió desarrollar SRSs alrededor de las 4W, (Fig. 19 G, grupo de 380 mg/kg, barras rojas y azules), ni siquiera a las 8W (Fig. 19 G, barra negra)

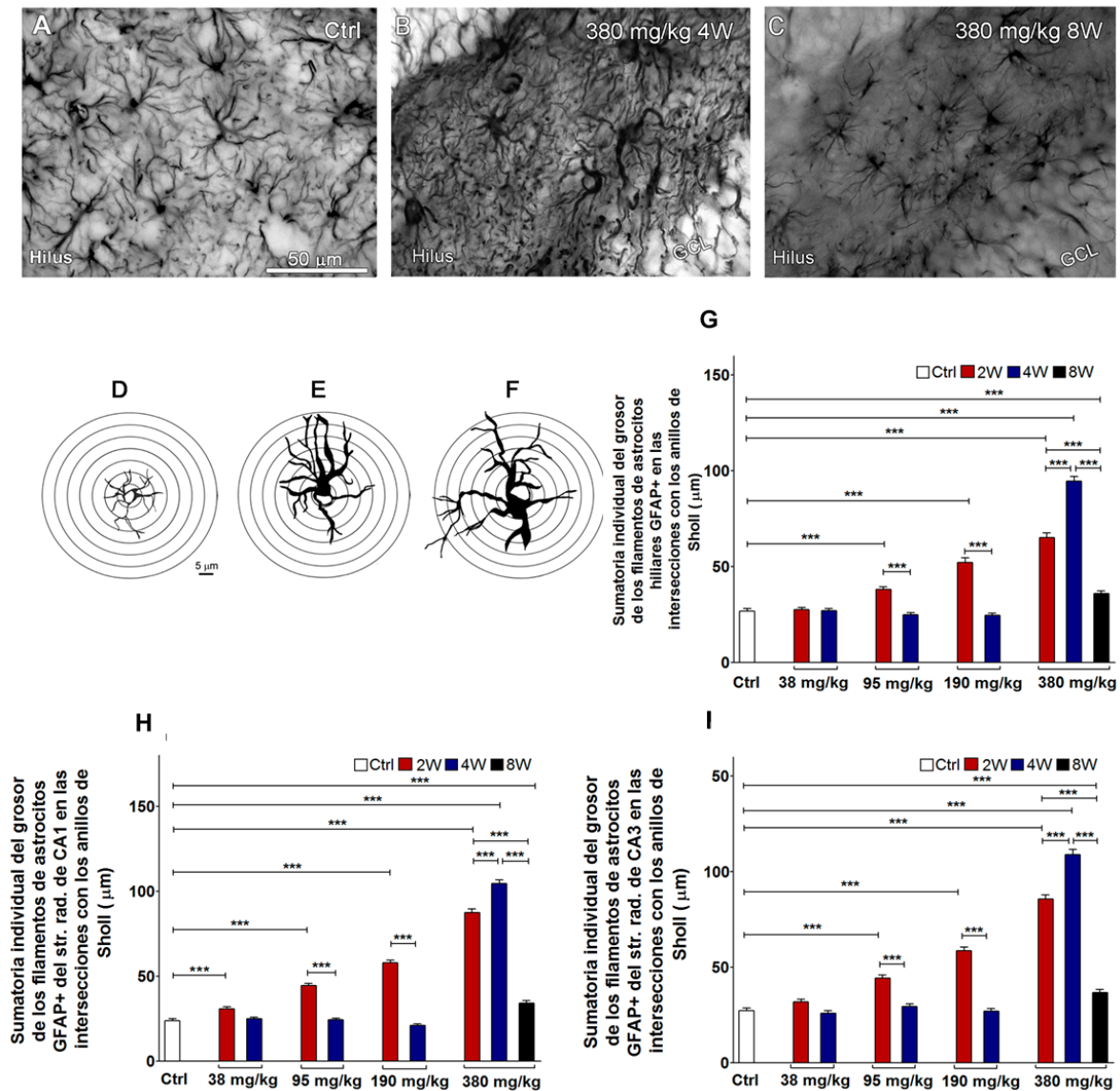


Fig. 18. Análisis morfométrico de la expresión de GFAP en las poblaciones astrocíticas. del stratum radiatum (str. rad.) de CA1 y CA3 y el hilus del giro dentado. A, B y C, son microfotografías de la inmunorreacción contra GFAP en el hilus de los grupos control (Ctrl) y 380 mg/kg a las 4- y 8-W, respectivamente. D, E y F son ejemplos de proyecciones bidimensionales digitalizadas de reconstrucciones citoesqueléticas astrocíticas tridimensionales de células presentes en el hilus del giro dentado. Estas imágenes corresponden a los grupos Ctrl (D) y 380 mg/kg 2-W (E) y 4W (F). G, H e I muestran el análisis de la sumatoria de las longitudes de las intersecciones de los procesos astrocíticos con los anillos de Sholl, el cual fue utilizado como parámetro operacional de la hipertrofia

citoesquelética astrocítica en el hilio del giro dentado (DG, G), str. rad. de CA1 (H) y CA3 (I). n=24. Los valores se muestran como la media \pm SEM. *** P<0.001.[159]

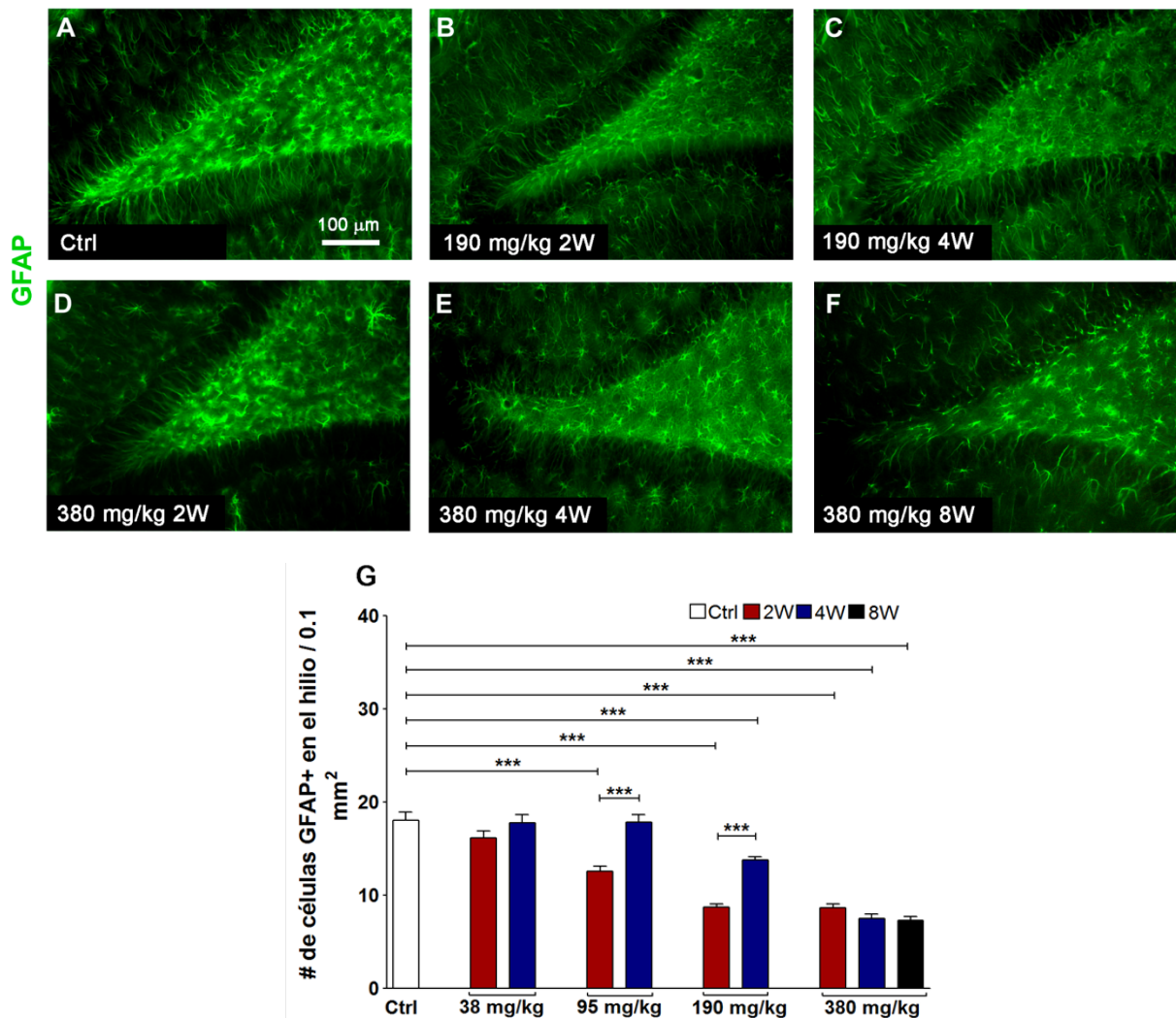


Fig. 19. Análisis de la densidad de los astrocitos hiliares. A-F: Microfotografías de inmunorreacciones contra GFAP en el hilio del giro dentado, mostrando una pérdida reversible de la densidad astrocítica en el grupo de 190 mg/kg (B, C) y una pérdida a largo plazo en el grupo de 380 mg/kg (D, E, F). G: Histograma que muestra las densidades astrocíticas en el hilio. *** P<0.001.[159]

Con la finalidad de comparar la activación microglial con los cambios en la morfología y la densidad astrocítica en este estudio, realizamos una inmunorreacción contra CD11b (Ox42), un marcador de microglia [160], en los mismos puntos temporales en los que se estudiaron las alteraciones astrocíticas. Muchas de las células marcadas con CD11b en el hilio a las 2-, 4- y 8W

eran pleomórficas, con procesos engrosados y puntos de ramificación aumentados, características indicativas de microgliosis reactiva. Las células microgliales activadas se encontraban intensamente marcadas y mostraban patrones de ramificación arboriformes (Fig. 20, F, L, M), siendo las más notorias a las 2W (Fig. 20, J). Esta población de células microgliales activadas no se observó en las ratas control (Fig. 20, A y E). La Fig. 20 muestra claramente que la activación microglial se localiza principalmente en el hipocampo, el tálamo y la corteza amígdalo/entorrinal en el grupo sometido a la dosis de 380 mg/kg. (Fig. 20, J y K). Esta activación tuvo su pico a las 2W (Fig. 20 J y F). Fue seguida de una recuperación lenta observada a las 8W, aunque aun pudo detectarse activación microglial parcial (Fig. 20, N y M).

La neurogénesis adulta es un proceso que ocurre en la mayoría de las especies de mamíferos. Por lo general, se lleva a cabo en la zona subventricular (con migración hacia el bulbo olfatorio a través del tracto migratorio rostral) y la zona subgranular (SGZ) del giro dentado de la formación hipocámpica. Aún no está claro si existe una relación causal entre los procesos de muerte celular y la proliferación celular. En los últimos años, algunos estudios han reportado daño isquémico inducido por la producción de nuevas células piramidales, células que normalmente no se piensa que puedan generarse en el cerebro adulto. Sin embargo, las condiciones experimentales precisas capaces de inducir este fenómeno aún no están claras. La neurogénesis aberrante en la SGZ ha sido ampliamente estudiada en el modelo de epilepsia del lóbulo temporal secundario a la administración de pilocarpina, en el cual se induce muerte celular masiva en la capa piramidal del hipocampo. Con el fin de investigar la posibilidad de un fenómeno neurogénico extra-giro dentado, se exploró la neurogénesis con la alternativa al protocolo de este modelo animal empleando marcadores ampliamente utilizados para la evaluación de neurogénesis en el cerebro adulto, como 5-bromo 2-deoxiuridina (BrdU), proteína nuclear neuronal (NeuN) específica (NeuN) y doblecortina (DCX).

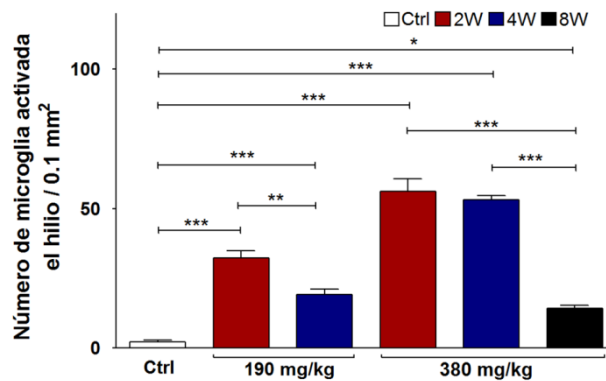
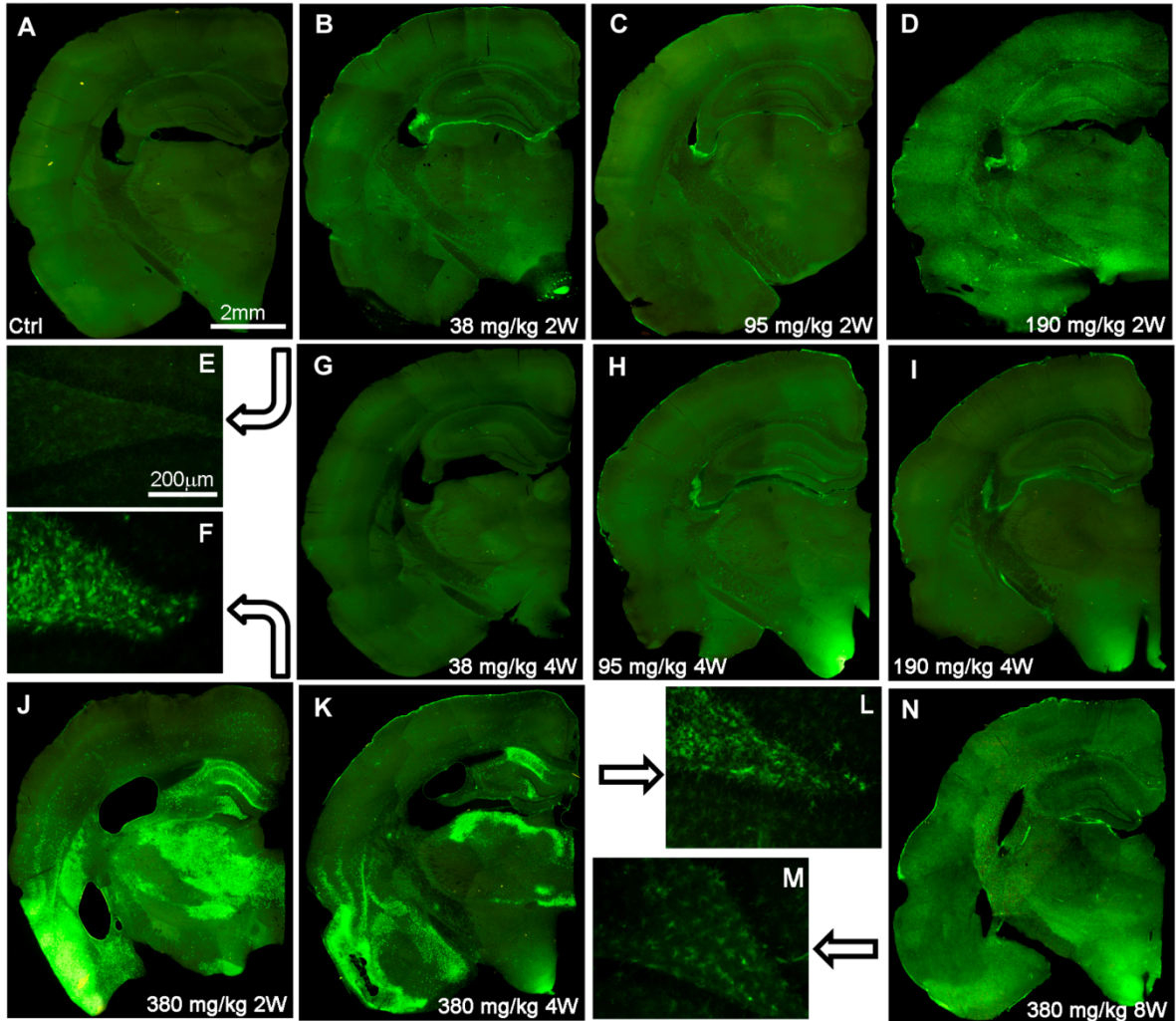


Fig. 20. Evolución temporal dosis-dependiente de la activación microglial. Microfotografías de bajo poder compuestas que muestran los patrones de activación microglial en grupos sometidos a distintas dosis de pilocarpina, excepto por E, F, L y M, que son microfotografías 20X de los hilos correspondientes. Los puntos temporales de 2-, 4-, y 8-semanas fueron denotados como 2W, 4W y 8W. O. Cuantificación de células microgliales activadas intensamente marcadas con Cd11b, las cuales muestran patrones de ramificación arboriformes en el hilo. *** $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.001$. [159]

X. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

CORRELACIÓN TEMPORAL DE ASTROGLIOSIS Y NEUROGÉNESIS EN EL HIPOCAMPO DE LA RATA ADULTA DESPUÉS DE UN INSULTO GLUCOPÉNICICO

La hipoglicemia es un factor de riesgo intrínseco a la terapia hipoglicemiante, tanto con insulina como con otros fármacos. Diversos estudios clínicos han revelado que los pacientes diabéticos tienen un grado mayor de deterioro en la función cognitiva [119], sin embargo, los mecanismos implicados en este proceso no están completamente dilucidados. En este estudio, los animales experimentales recibieron una inyección del análogo sintético no metabolizable de la glucosa 2-DG, una molécula empleada extensivamente como inhibidora del proceso de glucólisis, tanto en las bacterias como en los humanos. Las ratas pertenecientes al grupo experimental fueron inyectadas con una sola dosis de 500 mg/kg de 2-DG. Esta dosis es capaz de bloquear específicamente el metabolismo cerebral de la glucosa de una forma transitoria, sin producir efectos adversos conductuales, coma o convulsiones [120]. El cerebro, en comparación con otros tejidos, es particularmente vulnerable a la hipoglucemia, pues depende críticamente de la glucosa para funcionar adecuadamente. Diversos estudios han demostrado la posibilidad de inducir daño neuronal y muerte celular cuando se administran insulina o algunos otros fármacos hipoglucemiantes [121, 122]. Estudios realizados en humanos y aquellos llevados a cabo en modelos animales de daño cerebral hipoglucémico han mostrado que el giro dentado del hipocampo es particularmente vulnerable a este tipo de insulto, mientras que las células gliales parecen tolerarlo [123]. Evidencia de la literatura actual sugiere que la muerte neuronal estimulada por la hipoglucemia involucra un proceso de excitotoxicidad. La hipoglucemia induce despolarización neuronal y por lo tanto eleva las concentraciones extracelulares de glutamato y aspartato, promoviendo una activación sostenida de los receptores glutamatérgicos. Como consecuencia de lo anterior, se origina un incremento en el flujo intracelular de calcio, que altera la regulación del calcio mitocondrial y genera una excesiva producción de radicales libres, lo que ocasiona disfunción mitocondrial y daño en el ADN que finalmente conducen a la muerte celular [124, 125]. El incremento en la proliferación celular observado en este estudio después de la inyección de 2-DG concuerda con otros reportes, confirmando cómo diversos daños pueden ser capaces de estimular la

proliferación celular en la SGZ del DG [126, 127], contribuyendo probablemente en los procesos de reemplazo y reparación del tejido lesionado.

Los astrocitos están involucrados en el funcionamiento cerebral normal y, mediante intensas interacciones con las neuronas, desempeñan un papel crucial en la regulación de la homeostasis cerebral y en diversos procesos de reparación después de una lesión. La evaluación de la astrogliosis reactiva en regiones neurogénicas resulta de gran importancia para el entendimiento de la respuesta integral a la lesión cerebral, así como sus mecanismos subyacentes. La reactividad glial observada poco después de la inyección de 2DG sugiere una modificación en la dinámica de interacción astrocito-neurona, que podría incluir cambios en la barrera hematoencefálica, difusión del espacio extrasináptico, secreción de factores neurotróficos y remoción de neurotransmisores [128]. A pesar de que las consecuencias de la reactividad astrocítica han generado controversia [129] existen evidencias sólidas que sugieren que una interacción neurona-glía alterada puede resultar beneficiosa [130]. Se ha demostrado que los astrocitos son capaces de reducir la vulnerabilidad neuronal a la excitotoxicidad, teniendo un rol importante en la recaptura de glutamato en el SNC [131]. Además, debido a sus altas demandas metabólicas y a sus limitados reservorios de energía, las neuronas son extremadamente y críticamente dependientes de una estrecha regulación de los mecanismos del metabolismo y suplemento de energía. Esta regulación metabólica de la energía en el cerebro es mediada por los astrocitos, ya que son los encargados de satisfacer las demandas neuronales de energía [132]. Existe evidencia que sugiere que el transportador de glucosa GLUT-2, expresado en las células gliales, juega un rol particular en la detección de niveles de glucosa en el SNC, lo cual le otorgaría un papel a los astrocitos de sensores hipoglucémicos [133]. Diversos datos experimentales sugieren que la glucosa podría inicialmente ser metabolizada por los astrocitos, generando lactato extracelular, que es transportado a las neuronas para ser usado como sustrato para la síntesis neuronal de piruvato [93]. Otras moléculas, como los ácidos grasos y los cuerpos cetónicos, también pueden ser usados como fuentes de energía para el cerebro bajo ciertas circunstancias y los astrocitos son el único tipo celular identificado capaz de realizar la oxidación de ácidos grasos en el cerebro y de utilizar los ácidos grasos como precursores para la síntesis de cuerpos cetónicos que son intercambiados con las neuronas [134].

En este estudio, observamos una relación entre el curso temporal de la astrogliosis en el hilio del DG, donde reside la SGZ – la capa germinal neurogénica en el hipocampo del cerebro adulto- y la tasa de variación de la proliferación celular de la misma capa post GI. Esta observación sugiere una interrelación intrínseca entre estos dos fenómenos. Además,

observamos claramente la hipertrofia citoesquelética de los astrocitos tipo glía radial hacia niveles profundos de la GCL. El fenotipo, las propiedades biológicas y el destino de las células capaces de expresar proteína acídica glial fibrilar en la SGZ representan áreas de gran interés en la actualidad, debido tanto a su función normal como a su potencial capacidad de aminorar lesiones cerebrales.

¿Acaso todos los astrocitos que expresan GFAP en la zona subgranular tienen multipotencialidad neurogénica? Para responder a esta pregunta adecuadamente, se requiere de conocimiento basto y detallado. Sin embargo, existen algunas explicaciones factibles para el fenómeno observado en este estudio. Por ejemplo, está bien documentado que los astrocitos participan activamente en la creación de un microambiente o “nicho”, capaz de estimular la neurogénesis [135]. En la ZSG de las ratas expuestas a 2-DG hubieron incrementos consistentes tanto en la reactividad a GFAP como en el conteo de células BrdU+/DCX+ en la región tipo nicho en donde se fusionan las partes dorsal y ventral de la GCL (Fig. 15 y 17, microfotografías). Este fenómeno sugiere que la astrogliosis en esta región tiene un rol activo en la neurogénesis. Por otro lado, Muller et al. [136] demostraron que el factor neurotrófico ciliar (CNTF) es necesario para regular la extensión de neuronas recién formadas en la ZSG del cerebro adulto. En el cerebro intacto, CNTF es expresado por los astrocitos a bajas concentraciones, mismas que pueden aumentar considerablemente después de una lesión. Por lo tanto la neurogénesis inducida por una lesión podría ser suscitada por un incremento transitorio en los niveles de CNTF, que estarían siendo promovidos por los astrocitos. Nuestro hallazgo de temporalidades similares entre la inmunorreactividad a GFAP y la proliferación celular en el GD apoya esta hipótesis

PÉRDIDA DE LA RESILIENCIA GLIAL Y NEUROGÉNESIS ABERRANTE EN EL MODELO ANIMAL DE PILOCARPINA

Estudios recientes han demostrado que los astrocitos y la microglia se activan rápidamente después del insulto por pilocarpina [153]. Sin embargo, hace falta evidencia tanto de las alteraciones a mediano y largo plazo producidas por este agente quimioconvulsivo, como de los efectos generados por la administración de dosis inferiores a 380 mg/kg sobre las poblaciones gliales. Este estudio provee las primeras evidencias cuantitativas dosis/curso temporal de las alteraciones producidas tanto en la morfología como en la densidad de los astrocitos y la microglia a mediano y largo plazo en el modelo de pilocarpina, así como su posible relación con el inicio de las SRSs. Encontramos que, con la dosis epileptógena, el hipocampo tuvo alteraciones significativas en la red de filamentos intermedios positivos a

GFAP, además de una marcada disminución en la densidad poblacional astrocítica. El valor más alto de la hipertrofia citoesquelética astrocítica y el valor más bajo de la densidad poblacional coincidieron con el punto temporal (4W), en el cual se observó el inicio de las SRSs en este modelo, que fue tratado farmacológicamente con pilocarpina y metilbromuro de atropina. En contraste, los grupos tratados con fracciones de la dosis epileptógena (190 mg/kg y 95 mg/kg) sufrieron estas alteraciones en la población astrocítica a las 2W, pero fueron capaces de restaurar los parámetros evaluados al nivel del grupo control a las 4W.

Se ha demostrado que la reactividad microglial crónica es capaz de inducir disfunción en la población astrogliar, incluyendo la muerte astrocítica, la retracción de los procesos de los pies astrocíticos y la pérdida de aquaporina-4 y conexinas, [146, 161, 162], las cuales son cruciales para la regulación de las oscilaciones neurales [72, 163]. En el grupo de 380 mg/kg, el pico de la activación microglial se observó a las 2W y a las 4W, seguido de una lenta recuperación a las 8W. Esto es consistente con la pérdida de la densidad astrocítica observada en el grupo sometido a la dosis de 380 mg/kg, en todos los puntos temporales.

Las redes aberrantes de filamentos intermedios positivos a GFAP y la pérdida de la densidad astrocítica modifican la capacidad reguladora glial, perturbando tanto el metabolismo hidroelectrolítico y de aminoácidos excitatorios en el cerebro, como el espacio extracelular [164]. Aparentemente, bajo los parámetros observados, el límite de la capacidad glial para regular el metabolismo fue sobrepasado, lo cual detonó la aparición de las SRSs. En un estudio de microscopía electrónica, Norenberg & Chu examinaron la corteza cerebral de la rata en el estado preictal después de la administración intraperitoneal de aminofilina, observando cambios morfológicos sólo en los astrocitos. Estos cambios consistían principalmente en alteraciones hidrópicas nucleares y citoplásmicas, aglutinación de la cromatina nuclear y un ligero incremento del glucógeno citoplásmico [165], apoyando nuestro estudio, en el cual observamos tumefacción astrocítica masiva antes de la ocurrencia esperada de las SRSs (Fig. 18 E y J). Por otra parte, Guo y cols. [166] midieron la tasa normalizada de utilización cerebral de glucosa con F-18 fluorodexiglucosa utilizando tomografía por emisión de positrones (PET) en animales sometidos a la administración sistémica de pilocarpina en el día 2 (fase inicial), día 7 (fase latente) y día 42 (fase crónica) después de la inducción del SE, encontrando cambios espacio-temporales específicos en la utilización de glucosa en las ratas durante el curso de la epileptogénesis. Resulta interesante mencionar que encontraron que en la fase temprana, las estructuras límbicas sufrieron la mayor disminución en la tasa de utilización de glucosa. La mayoría de las estructuras cerebrales se encontraban hipometabólicas aún en la fase latente y mostraron mejoría hasta la fase crónica. Sin embargo,

el hipocampo y el tálamo presentaron hipometabolismo persistente durante la epileptogénesis. A pesar de que en la actualidad solo disponemos de conocimiento fragmentario respecto a la relación entre la activación de un tipo celular específico y la tasa metabólica cerebral observada mediante PET y de que los datos de imagenología funcional son comúnmente interpretados en términos de la actividad neuronal subyacente, las células gliales son mucho más numerosas que las neuronas. Además, algunos estudios recientes implican que los astrocitos juegan un rol prominente en la regulación del abasto sanguíneo cerebral. Por lo tanto, al mediar procesos neurometabólicos y neurovasculares en todo el SNC, los astrocitos podrían proveer una base fisiológica común para las señales de neuroimagen. Por consiguiente, los resultados de Guo & cols. [166] apoyan nuestros datos, mostrando una pérdida masiva de la población astrocítica en el giro dentado del grupo tratado con la dosis epileptógena de pilocarpina.

El flujo sanguíneo cerebral y el metabolismo del oxígeno proveen las bases del funcionamiento cerebral normal. Algunos estudios recientes asocian la inflamación del CNS con ruptura de la barrera hematoencefálica (BHE), induciendo convulsiones y contribuyendo a su progresión [167]. Nuestros datos respecto a la pérdida de la densidad astrocítica y la morfología aberrante son coherentes con una posible ruptura de la BHE, que podría contribuir al desarrollo de SRSs.

En conclusión, en este estudio hemos provisto evidencia que muestra la pérdida gradual a largo plazo de la resiliencia glial en el grupo tratado con la dosis epileptógena de pilocarpina. La coexistencia espacio-temporal de patología astrocítica en el hipocampo, i.e. alargamiento astrocítico masivo, incremento dramático en la expresión individual de GFAP y una densidad astrocítica severamente disminuida al momento de la aparición de las SRSs plantea la posibilidad de una relación causal entre estos dos fenómenos.

XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Raivich, G., H. Bluethmann, and G.W. Kreutzberg, *Signaling molecules and neuroglial activation in the injured central nervous system*. Keio J Med, 1996. **45**(3): p. 239-47.
2. Deckert-Schluter, M., et al., *Rapid progress in the field of infectious and autoimmune disorders of the nervous system*. Neuropathol Appl Neurobiol, 1995. **21**(6): p. 548-51.
3. Raivich, G., et al., *Peptides in motoneurons*. Prog Brain Res, 1995. **104**: p. 3-20.
4. Eddleston, M. and L. Mucke, *Molecular profile of reactive astrocytes--implications for their role in neurologic disease*. Neuroscience, 1993. **54**(1): p. 15-36.
5. Kreutzberg, G.W., *Microglia: a sensor for pathological events in the CNS*. Trends Neurosci, 1996. **19**(8): p. 312-8.
6. Norenberg, M.D., *Astrocyte responses to CNS injury*. J Neuropathol Exp Neurol, 1994. **53**(3): p. 213-20.
7. Luskin, M.B., *Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone*. Neuron, 1993. **11**(1): p. 173-89.
8. Kaplan, M.S. and J.W. Hinds, *Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs*. Science, 1977. **197**(4308): p. 1092-4.
9. Lois, C., J.M. Garcia-Verdugo, and A. Alvarez-Buylla, *Chain migration of neuronal precursors*. Science, 1996. **271**(5251): p. 978-81.
10. Gould, E., et al., *Neurogenesis in the neocortex of adult primates*. Science, 1999. **286**(5439): p. 548-52.
11. Kirschenbaum, B., et al., *Adult subventricular zone neuronal precursors continue to proliferate and migrate in the absence of the olfactory bulb*. J Neurosci, 1999. **19**(6): p. 2171-80.
12. Cameron, H.A., P. Tanapat, and E. Gould, *Adrenal steroids and N-methyl-D-aspartate receptor activation regulate neurogenesis in the dentate gyrus of adult rats through a common pathway*. Neuroscience, 1998. **82**(2): p. 349-54.
13. Tanapat, P., et al., *Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat*. J Neurosci, 1999. **19**(14): p. 5792-801.
14. Gould, E. and P. Tanapat, *Stress and hippocampal neurogenesis*. Biol Psychiatry, 1999. **46**(11): p. 1472-9.
15. Gould, E., et al., *Neurogenesis in adulthood: a possible role in learning*. Trends Cogn Sci, 1999. **3**(5): p. 186-192.
16. Chen, G., et al., *Enhancement of hippocampal neurogenesis by lithium*. J Neurochem, 2000. **75**(4): p. 1729-34.
17. Gould, E. and P. Tanapat, *Lesion-induced proliferation of neuronal progenitors in the dentate gyrus of the adult rat*. Neuroscience, 1997. **80**(2): p. 427-36.
18. Parent, J.M., et al., *Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus*. J Neurosci, 1997. **17**(10): p. 3727-38.
19. Magavi, S.S., B.R. Leavitt, and J.D. Macklis, *Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice*. Nature, 2000. **405**(6789): p. 951-5.
20. Jackson, E.L. and A. Alvarez-Buylla, *Characterization of adult neural stem cells and their relation to brain tumors*. Cells Tissues Organs, 2008. **188**(1-2): p. 212-24.
21. Squire, L.R., *Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans*. Psychol Rev, 1992. **99**(2): p. 195-231.
22. Sharma, A.K., et al., *Mesial temporal lobe epilepsy: pathogenesis, induced rodent models and lesions*. Toxicol Pathol, 2007. **35**(7): p. 984-99.
23. Houser, C.R., *Interneurons of the dentate gyrus: an overview of cell types, terminal fields and neurochemical identity*. Prog Brain Res, 2007. **163**: p. 217-32.

24. Ribak, C.E., et al., *Dendritic growth cones and recurrent basal dendrites are typical features of newly generated dentate granule cells in the adult hippocampus*. Brain Res, 2004. **1000**(1-2): p. 195-9.
25. Frotscher, M., et al., *The mossy cells of the fascia dentata: a comparative study of their fine structure and synaptic connections in rodents and primates*. J Comp Neurol, 1991. **312**(1): p. 145-63.
26. Amaral, D.G., N. Ishizuka, and B. Claiborne, *Neurons, numbers and the hippocampal network*. Prog Brain Res, 1990. **83**: p. 1-11.
27. Amaral, D.G., *A Golgi study of cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat*. J Comp Neurol, 1978. **182**(4 Pt 2): p. 851-914.
28. Forster, E., S. Zhao, and M. Frotscher, *Laminating the hippocampus*. Nat Rev Neurosci, 2006. **7**(4): p. 259-67.
29. Burwell, R.D., M.P. Witter, and D.G. Amaral, *Perirhinal and postrhinal cortices of the rat: a review of the neuroanatomical literature and comparison with findings from the monkey brain*. Hippocampus, 1995. **5**(5): p. 390-408.
30. Bischofberger, J., et al., *Timing and efficacy of transmitter release at mossy fiber synapses in the hippocampal network*. Pflugers Arch, 2006. **453**(3): p. 361-72.
31. Shepherd, G.M., *The synaptic organization of the brain*. 4th ed. 1998, New York ; Oxford: Oxford University Press. x, 638 p.
32. Deng, W., J.B. Aimone, and F.H. Gage, *New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory?* Nat Rev Neurosci. **11**(5): p. 339-50.
33. Jones, M.W. and T.J. McHugh, *Updating hippocampal representations: CA2 joins the circuit*. Trends Neurosci. **34**(10): p. 526-35.
34. Bear, M.F. and W.C. Abraham, *Long-term depression in hippocampus*. Annu Rev Neurosci, 1996. **19**: p. 437-62.
35. Drachman, D.A. and J. Arbit, *Memory and the hippocampal complex. II. Is memory a multiple process?* Arch Neurol, 1966. **15**(1): p. 52-61.
36. Sotelo, C., *Immunohistochemical study of short- and long-term effects of DL-fenfluramine on the serotonergic innervation of the rat hippocampal formation*. Brain Res, 1991. **541**(2): p. 309-26.
37. Kemppainen, S., E. Jolkkonen, and A. Pitkanen, *Projections from the posterior cortical nucleus of the amygdala to the hippocampal formation and parahippocampal region in rat*. Hippocampus, 2002. **12**(6): p. 735-55.
38. Altman, J., *Are new neurons formed in the brains of adult mammals?* Science, 1962. **135**: p. 1127-8.
39. Altman, J. and G.D. Das, *Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats*. J Comp Neurol, 1965. **124**(3): p. 319-35.
40. Raisman, G., *Neuronal plasticity in the septal nuclei of the adult rat*. Brain Res, 1969. **14**(1): p. 25-48.
41. Moore, R.Y., A. Bjorklund, and U. Stenevi, *Plastic changes in the adrenergic innervation of the rat septal area in response to denervation*. Brain Res, 1971. **33**(1): p. 13-35.
42. Lynch, G., B. Stanfield, and C.W. Cotman, *Developmental differences in post-lesion axonal growth in the hippocampus*. Brain Res, 1973. **59**: p. 155-68.
43. Greenough, W.T., R.W. West, and T.J. DeVogd, *Subsynaptic plate perforations: changes with age and experience in the rat*. Science, 1978. **202**(4372): p. 1096-8.
44. Goldman, S.A. and F. Nottebohm, *Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(8): p. 2390-4.
45. Bjorklund, A. and F.H. Gage, *Neural grafting in animal models of neurodegenerative diseases*. Ann N Y Acad Sci, 1985. **457**: p. 53-81.
46. Gage, F.H., *Neurogenesis in the adult brain*. J Neurosci, 2002. **22**(3): p. 612-3.

47. Cameron, H.A., et al., *Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat*. Neuroscience, 1993. **56**(2): p. 337-44.
48. Aimone, J.B., W. Deng, and F.H. Gage, *Resolving new memories: a critical look at the dentate gyrus, adult neurogenesis, and pattern separation*. Neuron. **70**(4): p. 589-96.
49. Taupin, P., *Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system: functionality and potential clinical interest*. Med Sci Monit, 2005. **11**(7): p. RA247-252.
50. Amrein, I., et al., *Marked species and age-dependent differences in cell proliferation and neurogenesis in the hippocampus of wild-living rodents*. Hippocampus, 2004. **14**(8): p. 1000-10.
51. Gould, E., et al., *Adult-generated hippocampal and neocortical neurons in macaques have a transient existence*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(19): p. 10910-7.
52. Eriksson, P.S., et al., *Neurogenesis in the adult human hippocampus*. Nat Med, 1998. **4**(11): p. 1313-7.
53. Lee, E. and H. Son, *Adult hippocampal neurogenesis and related neurotrophic factors*. BMB Rep, 2009. **42**(5): p. 239-44.
54. Farrant, M. and Z. Nusser, *Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors*. Nat Rev Neurosci, 2005. **6**(3): p. 215-29.
55. Nakazawa, K., et al., *NMDA receptors, place cells and hippocampal spatial memory*. Nat Rev Neurosci, 2004. **5**(5): p. 361-72.
56. Whitlock, J.R., et al., *Learning induces long-term potentiation in the hippocampus*. Science, 2006. **313**(5790): p. 1093-7.
57. Song, E.Y., et al., *Role of active movement in place-specific firing of hippocampal neurons*. Hippocampus, 2005. **15**(1): p. 8-17.
58. Schinder, A.F. and F.H. Gage, *A hypothesis about the role of adult neurogenesis in hippocampal function*. Physiology (Bethesda), 2004. **19**: p. 253-61.
59. Suh, S.W., et al., *Hypoglycemia induces transient neurogenesis and subsequent progenitor cell loss in the rat hippocampus*. Diabetes, 2005. **54**(2): p. 500-9.
60. van Praag, H., et al., *Functional neurogenesis in the adult hippocampus*. Nature, 2002. **415**(6875): p. 1030-4.
61. Paton, J.A. and F.N. Nottebohm, *Neurons generated in the adult brain are recruited into functional circuits*. Science, 1984. **225**(4666): p. 1046-8.
62. Lim, D.A. and A. Alvarez-Buylla, *Interaction between astrocytes and adult subventricular zone precursors stimulates neurogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(13): p. 7526-31.
63. Song, H., C.F. Stevens, and F.H. Gage, *Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells*. Nature, 2002. **417**(6884): p. 39-44.
64. Peters, A., S.L. Palay, and H.d. Webster, *The fine structure of the nervous system : neurons and their supporting cells*. 3rd ed. 1991, New York ; Oxford: Oxford University Press. xviii, 494 p.
65. Seri, B., et al., *Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus*. J Neurosci, 2001. **21**(18): p. 7153-60.
66. Kempermann, G., *Why new neurons? Possible functions for adult hippocampal neurogenesis*. J Neurosci, 2002. **22**(3): p. 635-8.
67. Treves, A., et al., *What is the mammalian dentate gyrus good for?* Neuroscience, 2008. **154**(4): p. 1155-72.
68. Kettenmann, H. and A. Verkhratsky, *Neuroglia: the 150 years after*. Trends Neurosci, 2008. **31**(12): p. 653-9.
69. Ramon y Cajal, S., et al., *Histology of the nervous system of man and vertebrates*. History of neuroscience. 1995, New York ; Oxford: Oxford University Press.
70. Geren, B.B. and F.O. Schmitt, *The Structure of the Schwann Cell and Its Relation to the Axon in Certain Invertebrate Nerve Fibers*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1954. **40**(9): p. 863-70.

71. del Rio-Hortega, P., *Art and artifice in the science of histology*. 1933. *Histopathology*, 1993. **22**(6): p. 515-25.
72. Ransom, B., T. Behar, and M. Nedergaard, *New roles for astrocytes (stars at last)*. *Trends Neurosci*, 2003. **26**(10): p. 520-2.
73. Markiewicz, I. and B. Lukomska, *The role of astrocytes in the physiology and pathology of the central nervous system*. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 2006. **66**(4): p. 343-58.
74. Butt, A.M. and B.R. Ransom, *Morphology of astrocytes and oligodendrocytes during development in the intact rat optic nerve*. *J Comp Neurol*, 1993. **338**(1): p. 141-58.
75. Bushong, E.A., et al., *Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains*. *J Neurosci*, 2002. **22**(1): p. 183-92.
76. Cameron, R.S. and P. Rakic, *Glial cell lineage in the cerebral cortex: a review and synthesis*. *Glia*, 1991. **4**(2): p. 124-37.
77. Rose, C.R. and B.R. Ransom, *Gap junctions equalize intracellular Na⁺ concentration in astrocytes*. *Glia*, 1997. **20**(4): p. 299-307.
78. Ghandour, M.S., et al., *Double labeling immunohistochemical technique provides evidence of the specificity of glial cell markers*. *J Histochem Cytochem*, 1979. **27**(12): p. 1634-7.
79. Chaudhry, F.A., et al., *Glutamate transporters in glial plasma membranes: highly differentiated localizations revealed by quantitative ultrastructural immunocytochemistry*. *Neuron*, 1995. **15**(3): p. 711-20.
80. Rosengren, L.E., P. Kjellstrand, and K.G. Haglid, *Tetrachloroethylene: levels of DNA and S-100 in the gerbil CNS after chronic exposure*. *Neurobehav Toxicol Teratol*, 1986. **8**(2): p. 201-6.
81. Wu, Y., A.Q. Zhang, and D.T. Yew, *Age related changes of various markers of astrocytes in senescence-accelerated mice hippocampus*. *Neurochem Int*, 2005. **46**(7): p. 565-74.
82. Langley, O.K. and M.S. Ghandour, *An immunocytochemical investigation of non-neuronal enolase in cerebellum: a new astrocyte marker*. *Histochem J*, 1981. **13**(1): p. 137-48.
83. Gray, H., et al., *Gray's anatomy*. 35th ed. 1973, Edinburgh: Longman. xvi, 1471 p.
84. Wolburg, H., et al., *Modulation of tight junction structure in blood-brain barrier endothelial cells. Effects of tissue culture, second messengers and cocultured astrocytes*. *J Cell Sci*, 1994. **107 (Pt 5)**: p. 1347-57.
85. Abbott, N.J., *Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability*. *J Anat*, 2002. **200**(6): p. 629-38.
86. Ransom, B.R. and H. Sontheimer, *The neurophysiology of glial cells*. *J Clin Neurophysiol*, 1992. **9**(2): p. 224-51.
87. Danbolt, N.C., *Glutamate uptake*. *Prog Neurobiol*, 2001. **65**(1): p. 1-105.
88. Tulpule, K., et al., *Uptake of ferrous iron by cultured rat astrocytes*. *J Neurosci Res*. **88**(3): p. 563-71.
89. Norenberg, M.D., et al., *The glial glutamate transporter in hyperammonemia and hepatic encephalopathy: relation to energy metabolism and glutamatergic neurotransmission*. *Glia*, 1997. **21**(1): p. 124-33.
90. Chen, Y. and R.A. Swanson, *Astrocytes and brain injury*. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2003. **23**(2): p. 137-49.
91. Sepp, K.J. and V.J. Auld, *Reciprocal interactions between neurons and glia are required for Drosophila peripheral nervous system development*. *J Neurosci*, 2003. **23**(23): p. 8221-30.
92. Slezak, M. and F.W. Pfrieger, *New roles for astrocytes: regulation of CNS synaptogenesis*. *Trends Neurosci*, 2003. **26**(10): p. 531-5.
93. Pellerin, L., et al., *Evidence supporting the existence of an activity-dependent astrocyte-neuron lactate shuttle*. *Dev Neurosci*, 1998. **20**(4-5): p. 291-9.

94. Newman, E.A., *New roles for astrocytes: regulation of synaptic transmission*. Trends Neurosci, 2003. **26**(10): p. 536-42.
95. Giaume, C. and L. Venance, *Intercellular calcium signaling and gap junctional communication in astrocytes*. Glia, 1998. **24**(1): p. 50-64.
96. Strelkov, S.V., et al., *Intermediate filament protein structure determination*. Methods Cell Biol, 2004. **78**: p. 25-43.
97. Eng, L.F. and R.S. Ghirnikar, *GFAP and astrogliosis*. Brain Pathol, 1994. **4**(3): p. 229-37.
98. Stichel, C.C. and H.W. Muller, *Experimental strategies to promote axonal regeneration after traumatic central nervous system injury*. Prog Neurobiol, 1998. **56**(2): p. 119-48.
99. Chen, L.W., K.L. Yung, and Y.S. Chan, *Reactive astrocytes as potential manipulation targets in novel cell replacement therapy of Parkinson's disease*. Curr Drug Targets, 2005. **6**(7): p. 821-33.
100. Sofroniew, M.V., *Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation*. Trends Neurosci, 2009. **32**(12): p. 638-47.
101. Raivich, G., et al., *Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function*. Brain Res Brain Res Rev, 1999. **30**(1): p. 77-105.
102. Fedoroff, S., R. Zhai, and J.P. Novak, *Microglia and astroglia have a common progenitor cell*. J Neurosci Res, 1997. **50**(3): p. 477-86.
103. Guillemin, G.J. and B.J. Brew, *Microglia, macrophages, perivascular macrophages, and pericytes: a review of function and identification*. J Leukoc Biol, 2004. **75**(3): p. 388-97.
104. Ransohoff, R.M. and A.E. Cardona, *The myeloid cells of the central nervous system parenchyma*. Nature. **468**(7321): p. 253-62.
105. Streit, W.J., S.A. Walter, and N.A. Pennell, *Reactive microgliosis*. Prog Neurobiol, 1999. **57**(6): p. 563-81.
106. Thomas, W.E., *Brain macrophages: evaluation of microglia and their functions*. Brain Res Brain Res Rev, 1992. **17**(1): p. 61-74.
107. Acarin, L., et al., *Demonstration of poly-N-acetyl lactosamine residues in ameboid and ramified microglial cells in rat brain by tomato lectin binding*. J Histochem Cytochem, 1994. **42**(8): p. 1033-41.
108. *Effect of intensive diabetes treatment on the development and progression of long-term complications in adolescents with insulin-dependent diabetes mellitus: Diabetes Control and Complications Trial*. Diabetes Control and Complications Trial Research Group. J Pediatr, 1994. **125**(2): p. 177-88.
109. Auer, R.N., *Hypoglycemic brain damage*. Metab Brain Dis, 2004. **19**(3-4): p. 169-75.
110. Auer, R.N. and B.K. Siesjo, *Hypoglycaemia: brain neurochemistry and neuropathology*. Baillieres Clin Endocrinol Metab, 1993. **7**(3): p. 611-25.
111. Dey, J., et al., *Cognitive function in younger type II diabetes*. Diabetes Care, 1997. **20**(1): p. 32-5.
112. Sofroniew, M.V., *Reactive astrocytes in neural repair and protection*. Neuroscientist, 2005. **11**(5): p. 400-7.
113. Zhang, L., et al., *Dietary tryptophan restriction in rats triggers astrocyte cytoskeletal hypertrophy in hippocampus and amygdala*. Neurosci Lett, 2009. **450**(3): p. 242-5.
114. Wilhelmsson, U., et al., *Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(46): p. 17513-8.
115. Pelicano, H., et al., *Glycolysis inhibition for anticancer treatment*. Oncogene, 2006. **25**(34): p. 4633-46.
116. Horton, R.W., B.S. Meldrum, and H.S. Bachelard, *Enzymic and cerebral metabolic effects of 2-deoxy-D-glucose*. J Neurochem, 1973. **21**(3): p. 507-20.

117. Estrada, F.S., et al., *Astroglialosis is temporally correlated with enhanced neurogenesis in adult rat hippocampus following a glucoprivic insult*. *Neurosci Lett*, 2009. **459**(3): p. 109-14.
118. Zhang, L., et al., *Rats subjected to extended L-tryptophan restriction during early postnatal stage exhibit anxious-depressive features and structural changes*. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2006. **65**(6): p. 562-70.
119. Cukierman, T., H.C. Gerstein, and J.D. Williamson, *Cognitive decline and dementia in diabetes--systematic overview of prospective observational studies*. *Diabetologia*, 2005. **48**(12): p. 2460-9.
120. Breier, A., et al., *The effects of pharmacologic doses of 2-deoxy-D-glucose on local cerebral blood flow in the awake, unrestrained rat*. *Brain Res*, 1993. **618**(2): p. 277-82.
121. Cryer, P.E., *Hypoglycemia, functional brain failure, and brain death*. *J Clin Invest*, 2007. **117**(4): p. 868-70.
122. Zhou, D., et al., *Repetitive and profound insulin-induced hypoglycemia results in brain damage in newborn rats: an approach to establish an animal model of brain injury induced by neonatal hypoglycemia*. *Eur J Pediatr*, 2008. **167**(10): p. 1169-74.
123. Auer, R.N., *Hypoglycemic brain damage*. *Forensic Sci Int*, 2004. **146**(2-3): p. 105-10.
124. Friberg, H., T. Wieloch, and R.F. Castilho, *Mitochondrial oxidative stress after global brain ischemia in rats*. *Neurosci Lett*, 2002. **334**(2): p. 111-4.
125. Nellgard, B. and T. Wieloch, *Cerebral protection by AMPA- and NMDA-receptor antagonists administered after severe insulin-induced hypoglycemia*. *Exp Brain Res*, 1992. **92**(2): p. 259-66.
126. Kadam, S.D., et al., *Neurogenesis and neuronal commitment following ischemia in a new mouse model for neonatal stroke*. *Brain Res*, 2008. **1208**: p. 35-45.
127. Tonchev, A.B. and T. Yamashima, *"Transcribing" postischemic neurogenesis: a tale revealing hopes of adult brain repair*. *J Mol Med (Berl)*, 2007. **85**(6): p. 539-42.
128. Sykova, E., *Glia and volume transmission during physiological and pathological states*. *J Neural Transm*, 2005. **112**(1): p. 137-47.
129. Escartin, C., et al., *Activation of astrocytes by CNTF induces metabolic plasticity and increases resistance to metabolic insults*. *J Neurosci*, 2007. **27**(27): p. 7094-104.
130. Faulkner, J.R., et al., *Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury*. *J Neurosci*, 2004. **24**(9): p. 2143-55.
131. Rothstein, J.D., et al., *Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate*. *Neuron*, 1996. **16**(3): p. 675-86.
132. Voutsinos-Porche, B., et al., *Glial glutamate transporters mediate a functional metabolic crosstalk between neurons and astrocytes in the mouse developing cortex*. *Neuron*, 2003. **37**(2): p. 275-86.
133. Marty, N., et al., *Regulation of glucagon secretion by glucose transporter type 2 (glut2) and astrocyte-dependent glucose sensors*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(12): p. 3545-53.
134. Guzman, M. and C. Blazquez, *Is there an astrocyte-neuron ketone body shuttle?* *Trends Endocrinol Metab*, 2001. **12**(4): p. 169-73.
135. Zhu, H. and A. Dahlstrom, *Glial fibrillary acidic protein-expressing cells in the neurogenic regions in normal and injured adult brains*. *J Neurosci Res*, 2007. **85**(12): p. 2783-92.
136. Muller, S., et al., *Neurogenesis in the dentate gyrus depends on ciliary neurotrophic factor and signal transducer and activator of transcription 3 signaling*. *Stem Cells*, 2009. **27**(2): p. 431-41.
137. Turski, W.A., et al., *Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study*. *Behav Brain Res*, 1983. **9**(3): p. 315-35.

138. Liu, Z., et al., *Quantitative evaluation of neuronal loss in the dorsal hippocampus in rats with long-term pilocarpine seizures*. *Epilepsy Res*, 1994. **17**(3): p. 237-47.
139. Kang, T.C., et al., *Epileptogenic roles of astroglial death and regeneration in the dentate gyrus of experimental temporal lobe epilepsy*. *Glia*, 2006. **54**(4): p. 258-71.
140. Curia, G., et al., *The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy*. *J Neurosci Methods*, 2008. **172**(2): p. 143-57.
141. Scorza, F.A., et al., *The pilocarpine model of epilepsy: what have we learned?* *An Acad Bras Cienc*, 2009. **81**(3): p. 345-65.
142. Hamilton, S.E., et al., *Disruption of the m1 receptor gene ablates muscarinic receptor-dependent M current regulation and seizure activity in mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(24): p. 13311-6.
143. Tauck, D.L. and J.V. Nadler, *Evidence of functional mossy fiber sprouting in hippocampal formation of kainic acid-treated rats*. *J Neurosci*, 1985. **5**(4): p. 1016-22.
144. Frotscher, M., P. Jonas, and R.S. Sloviter, *Synapses formed by normal and abnormal hippocampal mossy fibers*. *Cell Tissue Res*, 2006. **326**(2): p. 361-7.
145. Buckmaster, P.S. and F.H. Lew, *Rapamycin suppresses mossy fiber sprouting but not seizure frequency in a mouse model of temporal lobe epilepsy*. *J Neurosci*. **31**(6): p. 2337-47.
146. Kim, J.E., et al., *Astroglial loss and edema formation in the rat piriform cortex and hippocampus following pilocarpine-induced status epilepticus*. *J Comp Neurol*. **518**(22): p. 4612-28.
147. Kim, D.S., et al., *Spatiotemporal characteristics of astroglial death in the rat hippocampo-entorhinal complex following pilocarpine-induced status epilepticus*. *J Comp Neurol*, 2008. **511**(5): p. 581-98.
148. Seifert, G., G. Carmignoto, and C. Steinhauser, *Astrocyte dysfunction in epilepsy*. *Brain Res Rev*. **63**(1-2): p. 212-21.
149. Yang, F., et al., *Roles of astrocytes and microglia in seizure-induced aberrant neurogenesis in the hippocampus of adult rats*. *J Neurosci Res*. **88**(3): p. 519-29.
150. Kettenmann, H. and B.R. Ransom, *Neuroglia*. 2nd ed. 2005, Oxford: Oxford University Press. xix, 601 p.
151. Middeldorp, J. and E.M. Hol, *GFAP in health and disease*. *Prog Neurobiol*. **93**(3): p. 421-443.
152. Otani, N., et al., *Enhanced hippocampal neurodegeneration after traumatic or kainate excitotoxicity in GFAP-null mice*. *J Clin Neurosci*, 2006. **13**(9): p. 934-8.
153. Shapiro, L.A., L. Wang, and C.E. Ribak, *Rapid astrocyte and microglial activation following pilocarpine-induced seizures in rats*. *Epilepsia*, 2008. **49 Suppl 2**: p. 33-41.
154. Racine, R.J., *Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure*. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 1972. **32**(3): p. 281-94.
155. Esclapez, M., et al., *Newly formed excitatory pathways provide a substrate for hyperexcitability in experimental temporal lobe epilepsy*. *J Comp Neurol*, 1999. **408**(4): p. 449-60.
156. Kobayashi, M. and P.S. Buckmaster, *Reduced inhibition of dentate granule cells in a model of temporal lobe epilepsy*. *J Neurosci*, 2003. **23**(6): p. 2440-52.
157. Kwak, S.E., et al., *Differential paired-pulse responses between the CA1 region and the dentate gyrus are related to altered CLC-2 immunoreactivity in the pilocarpine-induced rat epilepsy model*. *Brain Res*, 2006. **1115**(1): p. 162-8.
158. Sholl, D.A., *Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat*. *J Anat*, 1953. **87**(4): p. 387-406.
159. Estrada, F.S., et al., *Glial activation in a pilocarpine rat model for epileptogenesis: A morphometric and quantitative analysis*. *Neurosci Lett*. **514**(1): p. 51-6.

160. Robinson, A.P., T.M. White, and D.W. Mason, *Macrophage heterogeneity in the rat as delineated by two monoclonal antibodies MRC OX-41 and MRC OX-42, the latter recognizing complement receptor type 3*. Immunology, 1986. **57**(2): p. 239-47.
161. Faustmann, P.M., et al., *Microglia activation influences dye coupling and Cx43 expression of the astrocytic network*. Glia, 2003. **42**(2): p. 101-8.
162. Sharma, R., et al., *Inflammation induced by innate immunity in the central nervous system leads to primary astrocyte dysfunction followed by demyelination*. Acta Neuropathol. **120**(2): p. 223-36.
163. Nedergaard, M., B. Ransom, and S.A. Goldman, *New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain*. Trends Neurosci, 2003. **26**(10): p. 523-30.
164. Hatton, G.I., *Glial neuronal signaling*. 2004: Kluwer Academic Publishers. 26.
165. Norenberg, M.D. and N.S. Chu, *Aminophylline-induced preictal alterations in cortical astrocytes*. Exp Neurol, 1977. **54**(2): p. 340-51.
166. Guo, Y., et al., *In vivo mapping of temporospatial changes in glucose utilization in rat brain during epileptogenesis: an 18F-fluorodeoxyglucose-small animal positron emission tomography study*. Neuroscience, 2009. **162**(4): p. 972-9.
167. Marchi, N., et al., *In vivo and in vitro effects of pilocarpine: relevance to ictogenesis*. Epilepsia, 2007. **48**(10): p. 1934-46.