



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE PSICOLOGÍA

**LA ACTIVACIÓN DE LAS NUEVAS
NEURONAS DEL GIRO DENTADO DEL
HIPOCAMPO DE ROEDORES ADULTOS
ES DEPENDIENTE DE SU EDAD Y DE LA
COMPLEJIDAD DEL AMBIENTE**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN PSICOLOGÍA:**

PRESENTA:

MARÍA DEL ÁNGEL OCAÑA FERNÁNDEZ



**DIRECTOR: DR. GERARDO BERNABÉ RAMÍREZ RODRÍGUEZ
REVISORA: DRA. MARTHA LILIA ESCOBAR RODRÍGUEZ**

MÉXICO, D.F. 2014.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se desarrolló en el laboratorio de Neurogénesis. División de Investigaciones Clínicas, Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz. Durante el desarrollo de este trabajo fui beneficiaría de una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. (CONACYT-SEP 101316)

DEDICATORIA

A mi mamá y a mi papá que son mis raíces.

Por su amor incondicional, su apoyo y su confianza. Por la fortaleza que me dan para volar.

A mis hermanos Carlos, Mariana y Miranda porque ellos hacen que la vida sea divertida y son mis personas preferidas.

A mi familia que son las personas con quienes más disfruto la vida.

A mis amigos Rocio, Janintzitic y Erik que tuve la suerte de conocer y que sé me acompañarán por mucho tiempo.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por su apoyo para la realización de esta Tesis.

A nuestra máxima casa de estudios la Universidad Nacional Autónoma de México por muchos años de formación y aprendizajes. Por todas las oportunidades de crecimiento que nos brinda y un mundo de experiencias.

Al Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz por su valiosa contribución en mi formación académica.

A mis papas, por su trabajo incansable para vernos felices y grandes. Les agradezco su amor, su tiempo, sus palabras, su fortaleza y su sabiduría.

Al Doctor Gerardo Ramírez Rodríguez por su invaluable orientación y apoyo. Por su tiempo dedicado y su confianza en mí. Gracias por su guía y presencia incondicional en mi desarrollo académico y profesional.

Gracias a la Dra. Martha Escobar, la Dra. Carolina Escobar, el Dr. Rodrigo Pedroza y la Dra. Israela Balderas por sus sugerencias y observaciones que contribuyeron a mejorar mi tesis.

A Leonardo Ortiz por sus continuas y pacientes explicaciones. Gracias por compartir conmigo tu tiempo y experiencia.

A mis amigos del laboratorio; a los viejos y a los nuevos que han llenado este camino de experiencias y diversión. Gracias por ayudarme cuando lo necesité. A Ariadna, Berenice, Beto, Beatriz, Carmen, Fernando, Gerardo Laura, Luis, y Pepe. Especialmente a Laura. Gracias por escucharme siempre.

ÍNDICE	PAG.
ABREVIATURAS.....	1
1. RESUMEN.....	2
2. ANTECEDENTES.....	4
2.1 Hipocampo.....	4
2.1.1 Giro dentado.....	6
2.1.2 Papel del hipocampo en la conducta.....	8
2.1.2.-a Hipocampo como mapa cognitivo.....	8
2.1.2.-b Hipocampo y conductas con componentes emocionales.....	11
2.1.3 Disociación funcional a lo largo del eje septo-temporal del hipocampo.....	12
2.2 Neurogénesis.....	15
2.2.1 Características de las nuevas neuronas en el cerebro adulto.....	19
2.2.2 Neurogénesis y codificación de la información.....	21
2.2.3 Neurogénesis y conducta emocional.....	23
2.3 Activación neuronal determinada por la expresión de la proteína asociada al citoesqueleto (Arc).....	25
3. JUSTIFICACIÓN.....	27
4. OBJETIVOS.....	28
4.1 Objetivos generales.....	28
4.2 Objetivos específicos.....	28
5. HIPÓTESIS.....	29
6. MÉTODO.....	29
6.1 Sujetos.....	29
6.2 Diseño experimental.....	30
6.2.1 Marcaje de dos poblaciones celulares.....	30
6.2.2 Experimento 1.....	31
6.2.3 Experimento 2.....	33
6.3 Sacrificio de roedores.....	35
6.4 Inmunohistoquímicas.....	36

6.5 Inmunofluorescencias.	37
6.6 Cuantificación.	38
6.7 Análisis estadístico.	39
7. RESULTADOS.	40
7.1 Células de nueva generación de 6, 3 semanas de edad y DCX+.	40
7.2 Células granulares activadas por la exposición a Diferentes ambientes (Arc).	43
7.3 Porcentaje de activación de nuevas neuronas de 6 y 3 semanas de edad (CldU/Arc) y (IdU/Arc).	50
7.4 Porcentaje de activación de neuronas inmaduras (DCX/Arc).	52
7.5 Análisis de prueba de nado forzado.	55
8. DISCUSIÓN.	56
8.1 Expresión de la proteína Arc en las células granulares en el giro dentado del hipocampo debido a exploración ambiental y nado forzado.	56
8.2 Expresión de la proteína Arc en las nuevas células granulares en el giro dentado del hipocampo debido a exploración ambiental y nado forzado.	62
8.3 Análisis del tiempo de inmovilidad en la tarea de nado forzado.	66
9. CONCLUSIONES.	68
10. REFERENCIAS.	69

“Una vez que el desarrollo ha terminado las fuentes de crecimiento y regeneración de los axones y de las dendritas se secan irrevocablemente. En los centros adultos los caminos de los nervios son algo fijo, terminado e inmutable. Todo puede morir, nada se puede regenerar. Es para las ciencias del futuro cambiar, si es posible, éste duro decreto”.
Santiago Ramón y Cajal

ABREVIATURAS.

CA	Cuerno de Amón
EC	Corteza entorrinal
DG	Giro dentado
Sub	Subiculum
Para	Parasubiculum
Pre	Presubiculum
gcl	Capa granular
ml	Capa molecular
pl	Capa polimórfica
catFISH	Análisis celular de compartimiento de la actividad temporal por hibridación in-situ fluorescente.
HPA	Hipotálamo-pituitaria-adrenal
BST	Núcleo del lecho de la estría terminal
PVN	Núcleo paraventricular
OB	Bulbo olfatorio
RMS	Cadena rostral migratoria
LV	Ventrículos laterales
SGZ	Zona subgranular
SVZ	Zona subventricular
DCX	Doblecortina
LTP	Potenciación a largo plazo
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
RNA	Ácido ribonucleico
CldU	5-cloro-2'-desoxiuridina
IdU	5-Iodo-2' desoxiuridina

RESUMEN

El giro dentado es una región del hipocampo en el cerebro adulto en la que se lleva a cabo la generación de nuevas neuronas. Estas nuevas neuronas son fuertemente influenciadas por diversos estímulos ambientales. Específicamente, se ha reportado que el ambiente enriquecido regula positivamente el proceso neurogénico. Adicionalmente, se ha observado que éste tiene efectos benéficos sobre la conducta. Por otra parte, las nuevas neuronas han sido involucradas en procesos de aprendizaje y memoria, y con conductas afectivas. Recientemente se propuso que debido a una mayor plasticidad en un periodo específico de su desarrollo, las nuevas neuronas pueden contribuir de forma diferente de las neuronas maduras en la codificación de información. Con el objetivo de estudiar si la integración de las nuevas neuronas en circuitos funcionales es influenciada por su edad y el ambiente (tareas de procesamiento espacial o asociadas a conductas emotivas), en este trabajo se midió la expresión de la proteína Arc (marcador de activación celular) en nuevas neuronas de diferentes edades en respuesta a tareas conductuales distintas (exploración ambiental o nado forzado). Para tal fin, en este trabajo se realizaron dos experimentos. En el primer experimento roedores adultos de la cepa BalbC fueron mantenidos durante seis semanas en alojamiento estándar, en el día 42 del experimento fueron sometidos a una o dos exploraciones ambientales. En el segundo experimento, los roedores se mantuvieron durante 6 semanas en alojamiento estándar (AE) o en enriquecimiento ambiental (ENR), finalmente en el día 42 del experimento fueron sometidos a la prueba de nado forzado. Con el objetivo de marcar dos poblaciones celulares de nueva generación a diferentes edades, al inicio de ambos experimentos todos los roedores recibieron una dosis del análogo de timidina CldU (para marcar células de 6 semanas). Tres semanas después se les aplicó una dosis del análogo de timidina IdU (para marcar células de 3 semanas). Los grupos fueron en el experimento uno: 1) alojamiento estándar/control (CTR); 2) roedores expuestos al ambiente A (A); 3) roedores expuestos dos veces al ambiente A (A-A); 4) roedores expuestos al ambiente A seguido de una exposición al ambiente B (A-B). En el experimento dos los grupos fueron: 5) roedores alojados en AE sometidos a nado forzado (AE/NF); 6) enriquecimiento ambiental/control (ENR); 7) roedores alojados en enriquecimiento expuestos a nado forzado (ENR/NF). Treinta minutos después de finalizada cada tarea los roedores fueron sacrificados y el tejido se procesó para inmunohistoquímicas. A través de la técnica de inmunohistoquímica por el método del complejo avidina-biotina-peroxidasa se cuantificó el número de nuevas células de tres y seis semanas de edad (células positivas a IdU y CldU respectivamente). Se analizó la expresión de la proteína Arc (marcador de activación celular) en la población total de células granulares y se realizó una doble tinción para marcar las células positivas a doblecortina (proteína expresada en neuronas inmaduras) que expresaron la proteína Arc. A través de

inmunofluorescencias se analizó la expresión de la proteína Arc en las nuevas células de tres y seis semanas de edad positivas para CldU e IdU respectivamente.

Los resultados muestran un incremento significativo en el número de células granulares en el giro dentado que expresaron la proteína Arc en los roedores que fueron expuestos a dos ambientes de exploración (A-A) y (A-B), así como en los grupos que fueron sometidos a la prueba de nado forzado (AE/NF) y (ENR/NF). La condición de alojamiento AE o ENR no produjo diferencias significativas en la activación de las células granulares del giro dentado en respuesta a la exposición al nado forzado. De manera interesante, se observó una reducción en el tiempo de inmovilidad en la prueba de nado forzado en los roedores que fueron alojados en enriquecimiento ambiental. Así mismo, en estos grupos de ENR se encontró un incremento significativo en el número de células de 6 y 3 semanas de edad y en el número de neuronas inmaduras que expresan la proteína doblecortina (DCX). El análisis de las células de nueva generación que expresaron la proteína Arc sugiere que neuronas más maduras tienen mayor probabilidad de ser activadas en una tarea de exploración ambiental, mientras que neuronas más jóvenes tienen mayor probabilidad de ser activadas en una tarea con componentes emocionales y de mayor exigencia para los roedores como es la tarea de nado forzado.

Este estudio indica el involucramiento del giro dentado y de neuronas de nueva generación en tareas de procesamiento espacial y en una situación con un nivel de estrés moderado. Así mismo, los resultados reflejan la influencia positiva del enriquecimiento ambiental en el proceso neurogénico y en el afrontamiento de una situación estresante. Sin embargo el enriquecimiento no tiene efecto en el número de células granulares activadas en respuesta a ésta situación. Por otro lado nuestros resultados sugieren que la activación de las nuevas neuronas es dependiente tanto de su edad como de las características del ambiente. En una situación ambiental con un nivel moderado de estrés las células de nueva generación, en un estado de madurez menor, podrían tener un papel diferente al de la población de células granulares maduras. En este sentido, uno de los mecanismos a través del cual el ambiente enriquecido tiene un efecto positivo en la tarea de nado forzado, podría ser la incorporación de nuevas neuronas en circuitos funcionales, específicamente aquellas en un periodo de maduración menor.

ANTECEDENTES

HIPOCAMPO

El hipocampo es parte de un grupo de estructuras relacionadas entre sí que juntas comprenden un sistema funcional llamado formación hipocámpica. Este sistema incluye a la corteza entorrinal, el giro dentado, el complejo subicular que se compone del subiculum, el parasubiculum y el presubiculum y el hipocampo también llamado cornu ammonis (CA) o “cuerno de Amón”, el cual a su vez tiene tres subdivisiones, nombradas CA1, CA2 y CA3 (Amaral & Lavenex, 2007; Gluck & Myers, 2001).

En la mayoría de las especies la formación hipocámpica es una estructura elongada con su eje largo, conocido como septotemporal, extendiéndose con una forma de C desde la línea media del cerebro cerca del núcleo septal (rostródorsalmente) sobre y detrás el tálamo en el lóbulo temporal (Leranth & Hajszan 2007; Amaral & Lavenex, 2007).

Fig.1

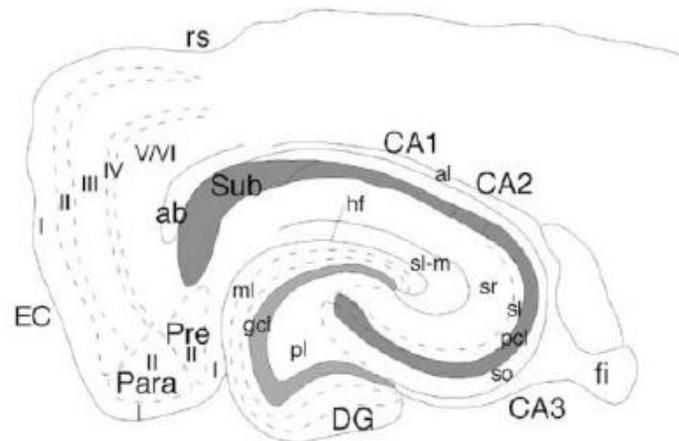


Fig. 1. Ilustración de la formación hipocámpica de roedor. Representación esquemática de las diferentes estructuras que conforman la formación hipocámpica: corteza entorrinal, complejo subicular, giro dentado y el hipocampo dividido en CA1, CA2 y CA3. Tomado de Amaral et al., 2007.

La formación hipocámpica es una de las pocas regiones del cerebro que recibe información sensorial multimodal altamente procesada de una gran variedad de fuentes de la neocorteza, esto le da la habilidad de integrar información de varias modalidades sensoriales. A diferencia de la neocorteza cuyas conexiones entre

regiones son reciprocas, las conexiones entre las estructuras de la formación hipocámpica se establecen en una sola dirección (Amaral & Lavenex, 2007).

El circuito principal de procesamiento de la información, nombrado circuito trisináptico, es unidireccional y glutamatérgico (Leranth & Hajszan, 2007). La información que proviene de la neocorteza en su mayoría entra al hipocampo por la corteza entorrinal. A través de la vía perforante las neuronas de la capa II de la corteza entorrinal mandan sus proyecciones al giro dentado y al área CA3. El área CA1 y el subiculum reciben proyecciones de la capa III de la corteza entorrinal a través de la vía perforante y el camino alvear (Amaral & Lavenex, 2007). Las células principales del giro dentado, las células granulares, conectan con las células piramidales del al área CA3 del hipocampo a través de la fibra musgosa. Las neuronas piramidales del área CA3 proyectan al área CA1 por medio de las colaterales de Schaffer. A su vez, las células piramidales de CA1 mandan proyecciones directas a la corteza entorrinal así como al subiculum cuyos axones posteriormente entran también a la corteza entorrinal en capas más profundas, así como al presubiculum y el parasubiculum (Amaral & Lavenex, 2007).

Fig.2

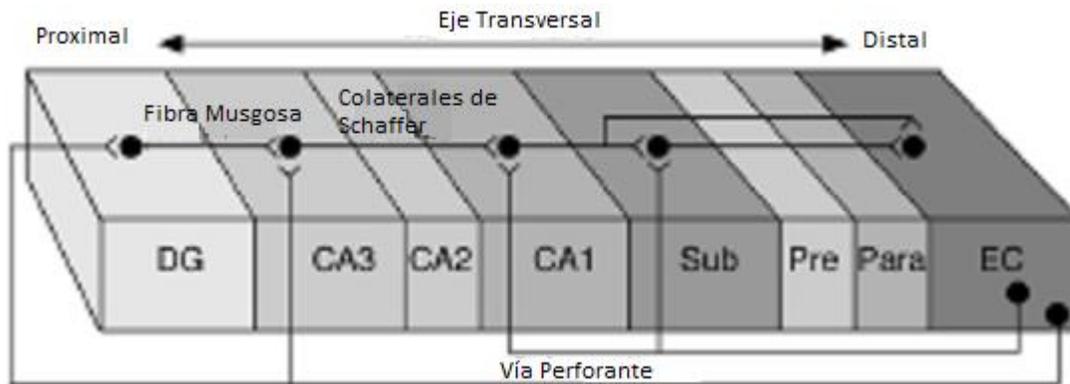


Fig. 2. Esquemización del circuito trisináptico en el hipocampo. La corteza entorrinal manda proyecciones a través de la vía perforante al giro dentado, cuyo axones conectan con las células piramidales de CA3. Estas células a través de las colaterales de Schaffer a su vez mandan proyecciones a las células piramidales de CA1, que posteriormente proyectan sus axones a la corteza entorrinal y al subículo. Finalmente el subiculum envía proyecciones a la corteza entorrinal, que manda la información de regreso a la neocorteza. Tomado de Amaral & Lavenex, 2007.

Adicionalmente de la información proveniente de la neocorteza, la formación hipocámpica también procesa información proveniente de estructuras

subcorticales que en su mayoría entran por el subiculum a través del camino fimbria-fornix (Amaral & Lavenex, 2007). Estas aferencias y la actividad de interneuronas GABAérgicas locales de diferente tipo regula la activación del circuito ya mencionado (Leranth & Hajszan, 2007).

Giro dentado

Debido a la localización dentro de la formación hipocámpica, así como sus características específicas, el giro dentado tiene una gran importancia en la funcionalidad del hipocampo. Es una estructura cortical trilaminar con una característica forma de U o V. Las tres capas que lo conforman son la capa molecular, la capa granular y la capa polimórfica (Amaral & Lavenex, 2007).

La capa molecular está relativamente libre de células, ya que su área está ocupada principalmente por la dendritas de las células granulares de la capa granular así como por las fibras de la vía perforante. Se pueden encontrar en esta capa algunas interneuronas y axones provenientes de diferentes regiones (Amaral et al., 2007).

La capa granular está formada principalmente por células granulares densamente empaquetadas, cuyas dendritas están orientadas radialmente hacia la capa molecular del giro dentado. Los axones de las células granulares, las fibras musgosas, mandan proyecciones a las células piramidales del área CA3. Así mismo estas proyecciones entran al giro dentado donde dan lugar a colaterales que forman conexiones con las células canasta, las cuales son células inhibitorias localizadas en el borde de la capa granular y la capa polimórfica (Leranth & Hajszan, 2007; Amaral et al., 2007). Adicionalmente, en esta región se generan células con la capacidad de proliferar y de diferenciarse en diferentes estirpes celulares, incluyendo el neuronal. Lo anterior le confiere al giro dentado la capacidad distintiva de generar nuevas neuronas (Altman & Das, 1965; Cameron & McKay, 2001). En la capa polimórfica, también llamada hilus, se localizan diferentes tipos de células, uno de las más prominentes son las células musgosas (Amaral et al., 2007).

Fig.3

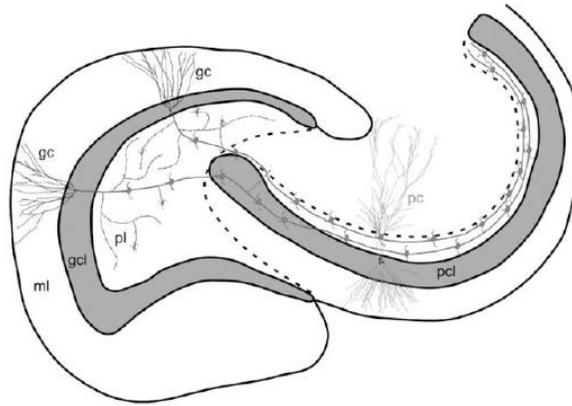


Fig. 3. Ilustración del giro dentado. Se observan las tres capas que componen al giro dentado: capa molecular, capa granular y capa polimórfica. Esquematización de una célula granular que manda sus proyecciones dendríticas a la capa molecular y su axón al área CA3. Tomada de Amaral et al., 2007.

Mulders y colaboradores (1997) reportaron que aproximadamente 112,000 células piramidales de la capa II de la corteza entorrinal medial y lateral mandan proyecciones al giro dentado, el cual se compone aproximadamente de 1,200,000 neuronas granulares (Rapp & Gallagher, 1996). En función de la población celular se dice que existe una divergencia de la entrada de la información de la corteza entorrinal al giro dentado, seguido por una convergencia al área CA3, ya que la población celular del área CA3, se reduce de acuerdo a lo reportado por Rapp y Gallagher (1996) a aproximadamente a 250,000 células piramidales (Schmidt et al. 2012).

Debido a la anatomía del giro dentado y a las conexiones que éste forma con otras estructuras se le ha conferido a éste un papel específico en la codificación de cierto tipo de información (Amaral et al., 2007). Se ha considerado que un papel del giro dentado en los procesos de memoria es su participación en la separación de patrones. La separación de patrones es la formación de diferentes representaciones a partir de las mismas entradas de información, lo cual implica la habilidad de diferenciar y codificar cambios pequeños o débiles en las entradas de información. Esto podría ser logrado a través de la dispersión de la información en un mayor número de células en el giro dentado (Lee & Solivan, 2010).

Adicionalmente a las conexiones que la corteza entorrinal establece con el giro dentado, éste recibe conexiones de estructuras subcorticales. Aferencias originadas del núcleo septal medial y la banda diagonal de Broca proyectan aferencias colinérgicas y GABAérgicas. Adicionalmente, el giro dentado recibe fibras serotoninérgicas del núcleo medio del rafe, aferencias noradrenérgicas del núcleo pontino y el locus coeruleus y conexiones dopaminérgicas del área tegmental ventral (Leranth & Hajszan, 2007).

Papel del hipocampo en la conducta

La función exacta de la región hipocámpica y de cada una de sus estructuras continua siendo objeto de un continuo debate y de estudio. Sin embargo, el circuito neuronal formado entre éstas, así como su anatomía ha llevado a proponer un posible papel en la codificación de la memoria (Gluck & Myers, 2001; Schmidt et al. 2012).

En ese sentido, se cree que el hipocampo es una estructura involucrada en la adquisición y consolidación de nuevas memorias de tipo declarativo (Eichenbaum, 2004). También se ha indicado que una función determinante de esta estructura es la de actuar como entrada y filtro para la información, determinando que episodios y hechos particulares son procesados para posteriormente ser almacenados en la memoria de largo plazo en la corteza (Gluck & Myers, 2001). Otros estudios han sugerido que el hipocampo es una estructura crítica para la codificación del contexto de una experiencia y la configuración de los estímulos, dando cada parte de la formación hipocámpica una aportación fundamental para lograr la formación de diferentes representaciones (Morris, 2007; Gluck & Myers, 2001).

Hipocampo como mapa cognitivo

Entre otras teorías o hipótesis que se han estructurado para explicar el papel del hipocampo se encuentran aquellas que lo involucran en la construcción de mapas del ambiente, procesando y guardando la información espacial (Kryukov, 2008; Gluck & Myers, 2001). La teoría del mapa cognitivo propone la existencia de un

sistema neuronal que provee las bases para la representación integrada y la construcción de mapas espaciales del ambiente, mismos que posteriormente el animal utiliza para navegar en su espacio (Morris, 2007; Kryukov, 2008). En 1948 Tolman planteo las bases de la teoría del mapa cognitivo al sugerir que la navegación espacial es guiada por mapas cognitivos internos que flexiblemente representan las relaciones espaciales en su totalidad entre marcas del ambiente. Posteriormente O'Keefe y Nadel en 1978 propusieron que las células de lugar son los elementos básicos para la representación de estos mapas (Moser et al. 2008).

Las células de lugar son neuronas en el hipocampo que exhiben actividad eléctrica cuando el animal se encuentra en una región específica del ambiente. Estas células disparan cuando el roedor se encuentre en un lugar determinado del espacio, llamado el campo de lugar de la célula, las células de lugar vecinas disparan en diferentes lugares, de esta manera el ambiente entero se representa en el hipocampo a través de la actividad de la población local de células (O'Keefe & Dostrovsky, 1971; Moser et al., 2008).

Tras una exploración ambiental la formación de campos de lugar implica una actividad intensa de células. Se ha observado que la misma actividad induce no solamente una fuerte expresión de algunos genes de expresión temprana como Arc (proteína asociada a citoesqueleto regulada por actividad) en neuronas del hipocampo, sino que el porcentaje de neuronas que presentan activación de estos genes es comparable con estudios electrofisiológicos (Guzowski et al., 1999). Estos estudios realizados por Guzowski y colaboradores en 1999 utilizando la técnica catFISH (análisis celular de compartimiento de la actividad temporal por hibridación in-situ fluorescente), permitió la discriminación y cuantificación de diferentes poblaciones neuronales que fueron activadas por dos experiencias. Lo anterior demostró que la expresión de Arc en neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo está relacionada con procesos de codificación neuronal y el establecimiento de representaciones internas del mundo exterior. En ese trabajo se observó que ratas expuestas a un ambiente de exploración presentaron una activación del 40 % de las células del área CA1 del hipocampo. Al exponer a los

animales nuevamente al mismo ambiente el porcentaje de células activadas correspondió a un 90 % de las células activadas en el primer ambiente. Sin embargo, cuando las ratas fueron expuestas a un nuevo ambiente, entonces un grupo diferente de células fue activado (Guzowski et al., 1999).

Las células granulares del giro dentado también exhiben campos de lugar, aunque son significativamente más pequeños que los del área CA1. Así mismo, la expresión de Arc en el giro dentado reproduce el patrón de actividad observado en el área CA1 y CA3 (Chawla et al., 2005). En relación a esto, pero a través de la expresión de zif268 otro gen de expresión temprana, en un estudio de Marrone y colaboradores (2011) se observó que cuando ratas eran expuestas dos veces a un mismo ambiente, cerca del 70% de las células en el giro dentado que se activaron en el primer ambiente se volvieron a activar en el segundo. Sin embargo, cuando las ratas fueron expuestas a dos ambientes diferentes, entonces sólo alrededor del 30% de células se reactivó en el segundo ambiente. A pesar de que dos poblaciones celulares diferentes se activaron cuando los animales fueron expuestos a ambientes diferentes, el porcentaje de células que se activó repetidamente en ambos ambientes fue mayor en el giro dentado que el encontrado en otras áreas de la formación hipocámpica como CA1. Por otra parte, en el mismo estudio, Marrone y colaboradores mostraron que la cantidad de células que se activan repetidamente en los dos ambientes iguales disminuye en roedores viejos en comparación con la activación observada en roedores jóvenes. Esta diferencia no fue encontrada cuando la exploración ambiental se dio en ambientes distintos. Tal diferencia podría estar dada por la implicación del giro dentado en la separación de patrones y el requerimiento de éste en codificar dos ambientes altamente similares (Marrone et al., 2011). El procesamiento espacial provoca actividad en una población muy pequeña de células granulares en el giro dentado, sin embargo la mayoría de las células de esta población responden a múltiples ambientes. La probabilidad de que una célula granular en el giro dentado sea reclutada en dos ambientes diferentes es mayor a la dada por el azar (Leutgeb et al., 2007; Marrone et al., 2011).

Hipocampo y conductas con componentes emocionales

Aunado a lo anterior, también se ha establecido que el hipocampo está íntimamente relacionado a la conducta emocional (Fanselow & Dong, 2010). Se sabe que el hipocampo ejerce una regulación negativa sobre el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA, por sus siglas en inglés). El HPA es el sistema responsable del inicio de las respuestas de glucocorticoides al estrés en todos los animales vertebrados, el cual maximiza el potencial de sobrevivencia del animal en situaciones que amenazan el bienestar físico o psicológico (Jankord & Herman 2008, Dranovsky & Leonardo, 2012; Dedovic et al., 2009). A pesar del papel crítico que tiene el estrés en la adaptación y sobrevivencia del individuo, una exposición prolongada a un estresor puede provocar importantes disfunciones metabólicas, inmunológicas y psicológicas. Debido a lo anterior se requiere que la secreción de glucocorticoides sea un proceso altamente regulado (Jankord & Herman, 2008; Radley, 2012).

En el hipocampo se expresan receptores de glucocorticoides y mineralcorticoides, alcanzando la máxima expresión en el giro dentado. Debido a expresión la formación hipocámpica detecta en un rango amplio los cambios en los niveles de glucocorticoides en el sistema, dando lugar a una regulación negativa a través de la inhibición de la respuesta del eje HPA (Jankord & Herman, 2008; Dranovsky & Leonardo, 2012). Se ha observado que lesiones del fórnix, lo cual elimina la comunicación entre el hipocampo y el hipotálamo, prolonga la respuesta del eje HPA a algunos estresores. Aquellas fibras que provienen de regiones ventrales del hipocampo están especialmente involucradas (Sapolsky et al., 1989; Herman et al., 1992). Herman y colaboradores (1998) reportaron que la lesión del subiculum ventral, provocó una hipersecreción de glucocorticoides tras la exposición a diferentes estresores. En el mismo sentido Dunn y Orr (1984) y Rubin y colaboradores (1966) reportaron que la estimulación del hipocampo disminuye la secreción de glucocorticoides en ratas y en seres humanos (Ulrich-Lai & Herman, 2009). Se ha observado que en seres humanos la disminución del volumen hipocámpico correlaciona con una respuesta más pronunciada del sistema de glucocorticoides (Pruessner et al., 2005).

Aunado a lo anterior se ha reportado que el aumento en la complejidad del ambiente, como es el paradigma de ambiente enriquecido, favorece las respuestas de afrontamiento ante situaciones con componentes estresantes, promoviendo al mismo tiempo cambios plásticos en el hipocampo (Sequeira-Cordero et al., 2014; Nithianantharajah & Hannan, 2006). En este sentido, se ha observado que el ambiente enriquecido tiene efectos positivos en la conducta de desesperanza y en la reducción de ansiedad. Se ha observado disminución en el tiempo de inmovilidad en la prueba de nado forzado, así como un incremento en la exploración de espacios abiertos en roedores alojados en ambientes enriquecidos (Llorens-Martín et al., 2007; Brenes et al., 2006). A su vez se ha reportado que tras la exposición a un protocolo de ambiente enriquecido existe una disminución significativa en los niveles basales de las hormonas adrenocorticotropina (ACTH) y corticoesterona (CORT), las cuales están involucradas en la respuesta del eje HPA (Belz et al., 2003). Por otro lado, diversos reportes indican que el aumento en la complejidad del ambiente provoca amplios cambios estructurales y bioquímicos en el hipocampo, como son un incremento en la expresión del receptor de serotonina 1A (5-HT1A), un aumento en los niveles del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF por sus siglas en inglés) y una regulación positiva del proceso neurogénico, entre otros. Estos cambios se ha asociado fuertemente a la regulación de conductas tipo depresivas y de ansiedad (Sequeira-Cordero et al., 2014; Berumen et al., 2012; Ramirez-Rodriguez et al., 2014; Shirayama et al., 2002; Leuner & Gould, 2010).

Disociación funcional a lo largo del eje septo-temporal del hipocampo

Considerando que el hipocampo se extiende desde el núcleo septal hasta el lóbulo temporal, por lo que es llamado eje septo-temporal, se ha establecido una disociación anatómica y funcional a lo largo de este eje en dos regiones: el área dorsal y el área ventral, cada una asociada a diferentes conductas (Tanti & Belzug, 2013; Bannerman et al., 2004). El hipocampo dorsal está fuertemente implicado en conductas con componentes cognitivos y de aprendizaje y memoria. Por otro lado

se piensa que el hipocampo ventral está involucrado de manera más importante en procesos con componente emocionales (Bannerman et al., 2004; Fanselow & Dong, 2010).

Diferentes evidencias respaldan esta hipótesis. Por ejemplo, algunos estudios han mostrado que lesiones en el área dorsal provocan un déficit en la adquisición y el rendimiento en tareas de memoria espacial como son aprendizajes en el laberinto de Morris y en el laberinto radial. Sin embargo, lesiones en el área ventral no tienen este efecto en el aprendizaje y la memoria (Pothuizen et al., 2004; Moser et al., 1995). De manera interesante lesiones del área ventral del hipocampo producen un efecto ansiolítico sobre la conducta de los animales, efecto reflejado en una disminución en la latencia de acercamiento a un objeto novedoso y un incremento en el tiempo que pasan los roedores en espacios abiertos. Dichos efectos no se observan cuando la lesión se provoca en el área dorsal (Bannerman et al., 2002; Kjelstrup et al. 2002).

Así mismo, existen diferencias importantes en las conexiones aferentes y eferentes que se establecen entre el área dorsal y el área ventral con otras estructuras cerebrales (Fanselow & Dong, 2010).

Las cortezas sensoriales primarias a través de las cortezas de asociación y de la corteza entorrinal proveen de información viso-espacial específicamente al hipocampo dorsal (Bannerman et al., 2004). Así mismo, las proyecciones más prominentes del área CA1 dorsal y el complejo subicular dorsal son dirigidas la corteza retrosplenial y la corteza cingulada anterior, regiones involucradas principalmente en el procesamiento cognitivo de la información espacial, la memoria y la exploración ambiental. Adicionalmente, sólo el área dorsal del complejo subicular manda un gran número de proyecciones al núcleo mamilar medial y lateral y al complejo talámico anterior, estructuras relacionadas con la navegación espacial (Fanselow & Dong, 2010).

Por otro lado, se ha reportado ampliamente que el hipocampo ventral comparte conexiones bidireccionales con diversos núcleos de la amígdala (Fanselow & Dog, 2010; Bannerman et al., 2004). La amígdala es una estructura altamente asociada con respuestas emocionales, por ejemplo es importante para la detección rápida

de señales que indican alguna amenaza. Así mismo, se piensa que esta estructura tiene un papel importante en la formación de memorias emocionales (Soudrya et al., 2011).

Las proyecciones de las regiones ventrales de CA1 y del subiculum en conjunto con algunas proyecciones de la amígdala, llegan al área anteromedial del núcleo del lecho de la estría terminal (BST, por sus siglas en inglés), que posteriormente manda proyecciones al núcleo paraventricular (PVN por sus siglas en inglés) del hipotálamo (Fanselow & Dog, 2010). El PVN resalta por ser el principal integrador de las señales de estrés en el hipotálamo, iniciando la respuesta del eje HPA ante situaciones estresantes (Ulrich-Lai & Herman, 2009). El BST es la única estructura cerebral conocida que manda proyecciones directas a las neuronas del PVN, por lo que las proyecciones del hipocampo ventral al BST son sumamente importantes en la regulación negativa de la respuesta del eje HPA a situaciones estresantes (Fanselow & Dog, 2010).

NEUROGÉNESIS

A principios del siglo XX Santiago Ramón y Cajal estableció la conclusión que dicta: “Todo puede morir, nada se puede regenerar”. Conclusión que se convirtió en el Dogma central de las neurociencias y que por mucho tiempo y muy fuertemente influyó la concepción sobre la plasticidad estructural del cerebro (Colucci –D’ Amato et al., 2006). También otros importantes científicos como Koelliker y His, denotaron la incapacidad del sistema nervioso central de producir nuevas células nerviosas, terminado el periodo de desarrollo de éste (Gross, 2000). Sin embargo, y a pesar del escepticismo con el que en un inicio se recibió esta idea hoy es generalmente aceptado que nuevas neuronas son agregadas de manera constitutiva en el cerebro adulto de mamíferos (Deng et al., 2010).

En 1912 Allen mostró evidencia de la existencias de células en división en el sistema nervioso central postnatal (Allen, 1912), mientras que en 1965 Altman y Das reportaron la generación de nuevas células en el cerebro adulto de ratas a través del uso de timidina tritiada (Altman & Das, 1965). Sin embargo, los resultados de Altman fueron ignorados o descartados como no importantes. Posteriormente en los años 70’s otros estudios demostraron que las nuevas neuronas generadas en el hipocampo sobreviven por un periodo largo de tiempo y que estas células son capaces de formar contactos sinápticos (Kaplan & Hinds, 1977; Kaplan & Bell, 1983). Es en los años 80’s que la neurogénesis en el cerebro adulto empieza a ser estudiada con mayor atención gracias a los trabajos de Nottebohm y colaboradores (Goldman & Nottebohm, 1983; Paton & Nottebohm, 1984). Ellos demostraron que el núcleo de control vocal del cerebro de canarios muestra neurogénesis de acuerdo a la estación del año, con un incremento dramático de nuevas neuronas durante la estación de canto y con la muerte de éstas neuronas con el final de la estación (Nottebohm, 1985).

Estudios posteriores que datan de los años 90’s y que fueron desarrollados utilizando tecnología novedosa ayudaron a establecer la realidad de la neurogénesis en el cerebro adulto. Uno de estos desarrollos fue la introducción del análogo sintético de la timidina: BrdU (5-bromo-3’-deoxiuridina). Como la timidina, el BrdU y otros análogos como el CldU (5-cloro-2’-desoxiuridina) y el IdU (5-iodo-

2'-desoxiuridina) son incorporados por la célula durante la fase –S del ciclo celular y se utilizan como marcadores de células en proliferación y su progenie (Kuhn et al., 1996). Posteriormente, un gran número de trabajos se han publicado implicando la existencia de las nuevas neuronas en el cerebro adulto de casi todos los mamíferos conocidos (Koehl & Abrous 2011), incluyendo los seres humanos (Erikson et al. 1998; Boldrini et al., 2009). Así mismo se ha estudiado ampliamente la regulación de la neurogénesis y la implicación funcional de éstas nuevas neuronas (Deng et al. 2010; Vukovic et al. 2011; Ming & Song 2005).

Fig.4

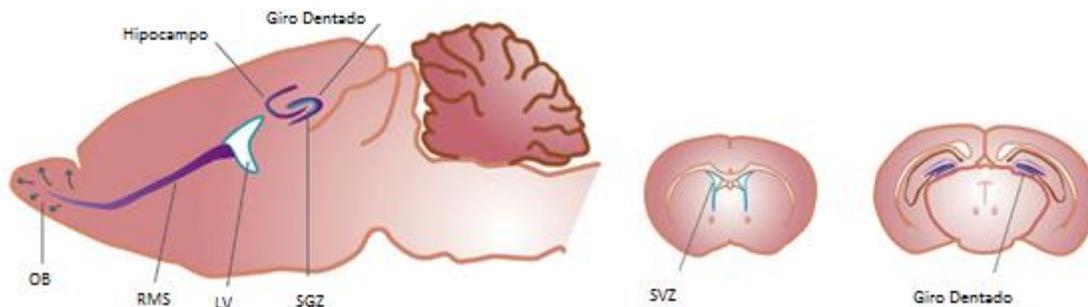


Fig. 4. Ilustraciones de las zonas en el cerebro donde se presenta neurogénesis constitutiva. La zona subgranular del giro dentado y la zona subventricular de los ventrículos laterales son dos nichos neurogénicos donde proliferaran nuevas células que migran y se convierten en células granulares en el giro dentado y en neuronas granulares y periglomerulares en el bulbo olfatorio. Tomado y modificado de Vukovic et al., 2011.

La neurogénesis adulta, término que nombra el proceso de generación de nueva neuronas en el cerebro postnatal, se presenta constitutivamente en regiones discretas del sistema nervioso central. Se han identificado dos áreas principalmente. La zona subventricular de los ventrículos laterales cuyas células migran a través de la cadena rostral migratoria al bulbo olfatorio en donde las nuevas neuronas se convierten en neuronas granulares y periglomerulares (Alvarez-Buylla & Garcia-Verdugo, (2002); Ming & Song, 2005). La otra zona neurogénica se encuentra en la zona subgranular del giro dentado de la formación hipocámpica donde aquellas células que proliferan, migran una corta distancia hasta la capa granular del giro dentado para convertirse en células granulares (Deng et al. 2010; Vukovic et al. 2011; Ming & Song 2005).

El proceso neurogénico compromete diferentes etapas (Kempermann et al., 2004). Una primera fase implica la proliferación de células madres y células progenitoras que dan lugar posteriormente a través de procesos de diferenciación, migración e integración sináptica, a las nuevas neuronas (von Bohlen & Halbach, 2007). Las células madres se caracterizan por dos propiedades importantes, su capacidad de auto renovación que es la habilidad que tiene la célula de generar una célula hija idéntica a ella y la multipotencialidad que se traduce en la capacidad de generar diferentes tipos de células (Riquelme et al., 2008). En ambas regiones neurogénicas se ha dado a un subgrupo de astrocitos el papel de células madre (Alvarez-Buylla et al., 2001; Morrens et al., 2012). Dentro de la zona subgranular las células que actúan como células madre es un subgrupo de astrocitos, células tipo-1 (GFAP+/Nestina+) que se dividen para generar células amplificadoras intermedias, células tipo-2 (GFAP-/Nestina+) (Riquelme et al. 2008, Ming & Song 2005; Kempermann et al., 2004). A su vez estas células dan origen a neuroblastos que se comprometen con un linaje celular, células tipo-3 (GFAP-/Nestina-/DCX+). Posteriormente se diferencian en neuronas inmaduras e inician un proceso de migración. Las nuevas neuronas aún inmaduras proyectan sus dendritas y axones a la capa molecular y al área CA3 del hipocampo respectivamente para poder integrarse finalmente a las redes neuronales (von Bohlen & Halbach, 2007, Riquelme et al. 2008; Kempermann et al., 2004).

Fig.5

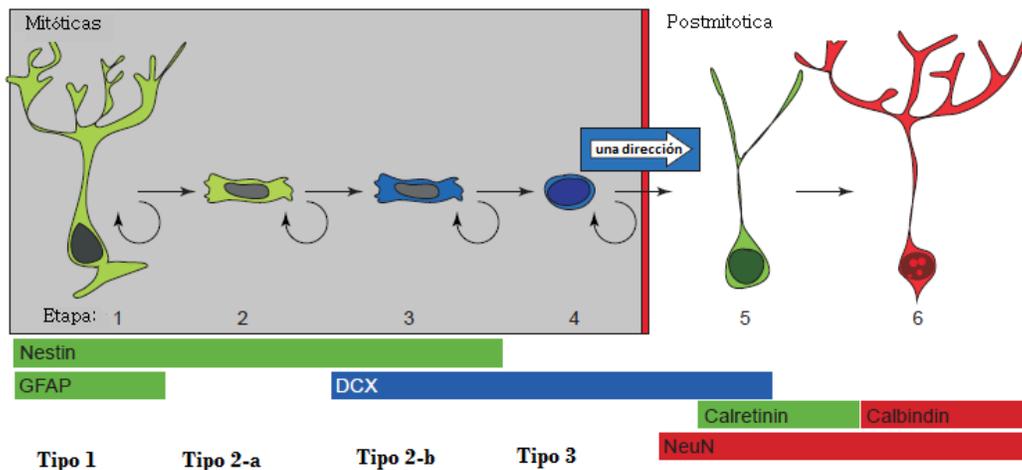


Fig. 5. Etapas del proceso neurogénico en el giro dentado del hipocampo. En la zona subgranular células progenitoras proliferan y dan lugar a células de amplificación rápida que generan a su vez neuroblastos, células comprometidas con un linaje celular que maduran y migran, integrándose finalmente a las redes neuronales. Tomada y modificada de Kempermann et al., 2004.

Se ha identificado la producción de nuevas neuronas en otras zonas del sistema nervioso central, sin embargo los niveles de éstas son extremadamente limitados. Algunas de estas zonas son la neocorteza reportado por Gould y colaboradores. (1999) en donde se ha observado neurogénesis constitutiva limitada en la corteza prefrontal, la corteza temporal inferior y la corteza parietal posterior en el macaco adulto. La amígdala específicamente en los núcleos medial y central (Bernier et al. 2002; Fowler et al. 2003). De la misma manera Yoshimi y colaboradores en el año 2005 reportaron neurogénesis en la sustancia negra y en el 2004 Van kampen y colaboradores indicaron la existencia de nuevas neuronas en el núcleo estriado (von Bohlen & Halbach, 2007). Por otro lado también se ha observado que tras lesiones cerebrales existe un incremento en la proliferación de células progenitoras en la zona subgranular y en la zona subventricular y en ocasiones se ha observado migración de éstas nuevas neuronas a los sitios lesionados. Así mismo, algunas lesiones de tipo específico también parecen provocar neurogénesis de progenitores endógenos donde la neurogénesis adulta es limitada o no existente (Ming & Song, 2005).

Dado que la neurogénesis es un proceso muy complejo y dinámico su regulación es dirigida por una amplia gama de factores, como son el nicho neurogénico y factores tanto extrínsecos como intrínsecos (Ramírez-Rodríguez et al., 2007). Los estímulos ambientales pueden afectar tanto positiva como negativamente la proliferación y sobrevivencia de las nuevas neuronas en el sistema nervioso central (Dranovsky & Leonardo, 2012; Ming & Song, 2005). Sin embargo, aunque el ambiente tenga un efecto modulador sobre ambas regiones neurogénicas: giro dentado y bulbo olfatorio, diferentes condiciones afectan cada una de estas regiones (Bordey, 2006).

Entre los factores que modulan negativamente la neurogénesis se han observado los paradigmas de estrés físico y psicosocial que llevan a un decremento en la proliferación celular en la zona subgranular (Dranovsky & Leonardo, 2012; Ming &

Song, 2005). También se ha señalado que un grupo amplio de drogas de abuso como el alcohol y el tolueno reducen la proliferación y sobrevivencias de las nuevas neuronas en el giro dentado (Ming & Song 2005; Paez-Martínez et al., 2013). Así mismo, se ha señalado que el envejecimiento tiene un efecto negativo sobre la proliferación de las nuevas neuronas en la zona subgranular (Kuhn et al., 1996).

Algunos de los factores que modulan positivamente la neurogénesis son el ambiente enriquecido, el cual promueve la sobrevivencia de las nuevas neuronas en el giro dentado. El ejercicio voluntario por otra parte no sólo promueve la sobrevivencia celular sino también provoca un incremento en la proliferación de las nuevas neuronas en la misma región (Kempermann et al., 1997; van Praag et al., 2000; Ramírez-Rodríguez et al., 2014). Por otra parte, de manera interesante dado el papel que tienen la formación hipocámpica en la formación de memorias se ha observado que actividades que implican un aprendizaje asociativo tienen un efecto positivo sobre la neurogénesis en el giro dentado (Gould et al., 1999).

Características de las nuevas neuronas en el cerebro adulto:

Se considera que la plasticidad sináptica es un correlato importante del funcionamiento de capacidades como el aprendizaje y la memoria, por tal motivo las características morfológicas, electrofisiológicas y la conectividad de las nuevas neuronas son de especial importancia.

Las nuevas neuronas formadas en el cerebro adulto empiezan a extender sus axones al hilus y sus procesos dendríticos hacia la capa molecular dos semanas después de la división celular (Toni & Sultan, 2011). Alrededor del día 10 de edad las dendritas apicales de las nuevas neuronas llegan a la capa molecular interna, mientras que a los 21 días de edad se observa que sus dendritas alcanzan el borde de la capa molecular en donde la mayoría de las sinapsis se forman. Por otro lado, los axones de las nuevas neuronas pueden ser detectados 10 días después de la división celular, sin embargo las proyecciones que mandan estas células llegan al área CA3 alrededor del día 16 (Zhao et al., 2006).

En este periodo de tiempo y en paralelo a los cambios morfológicos de las nuevas neuronas se observa un incremento en su excitabilidad y la aparición de aferencias GABAérgicas (Esposito et al., 2005). La estimulación de los receptores GABAérgicos resulta en la despolarización de la membrana celular, que es crucial para la maduración futura de las nuevas neuronas (Toni & Sultan, 2011). Al final de la segunda semana de edad las nuevas neuronas reciben sus primeras conexiones glutamatergicas, y durante la tercera semana las conexiones GABAérgicas cambian de ser despolarizantes a hiperpolarizantes (Ge et al., 2006; Toni & Sultan, 2011).

El tiempo en que se forman las espinas dendríticas refleja una transición importante en la fisiología y la funcionalidad de las neuronas ya que las espinas dendríticas son el mayor sitio post-sináptico de las células granulares para recibir conexiones glutamatérgicas y la cantidad y la forma de estas son indicativo de la conectividad de estas células (Zhao et al., 2006). La formación de espinas dendríticas se observa a partir del día 16 de edad de las nuevas neuronas pero su aparición es más clara a partir del día 21. Sin embargo, entre los días 21 y 28 de edad, existe un marcado aumento en la densidad espinosa, especialmente de espinas dendríticas maduras (Zhao et al., 2006; Toni et al., 2007).

Durante el desarrollo neuronal en el hipocampo del cerebro adulto se ha descrito que una gran fracción de nuevas neuronas mueren alrededor de la tercera semana edad después de la división celular, y su sobrevivencia puede ser regulada por la actividad neuronal (Kempermann et al., 2004). En este sentido, las neuronas de nueva generación atraviesan un periodo crítico para su sobrevivencia. Dado que la mayoría de las espinas dendríticas se forman en este periodo es probable que la formación de sinapsis y la transmisión glutamatérgica mediada por la activación de los receptores NMDA sea necesaria para la permanencia de estas neuronas (Toni & Sultan, 2011). Así mismo, la selección dependiente de actividad en este periodo crítico de sobrevivencia y las evidencias morfológicas antes descritas apoyan la hipótesis de que las nuevas neuronas podrían ser funcionales en etapas muy tempranas de su desarrollo (Zhao et al., 2006), particularmente teniendo en cuenta sus características electrofisiológicas.

Entre 4 y 6 semanas de edad las nuevas neuronas de ratones adultos poseen un umbral menor para la inducción de LTP así como una mayor amplitud de este en comparación con neuronas maduras. Sin embargo, estas propiedades de plasticidad sináptica aumentada no se mantienen cuando las nuevas neuronas han alcanzado la maduración. Alrededor de los 4 meses de edad, las neuronas de nueva generación son funcionalmente y morfológicamente indistinguibles de las neuronas ya existentes nacidas durante la embriogénesis (Ge et al., 2007; Toni & Sultan, 2011).

La plasticidad sináptica aumentada se asocia con una mayor magnitud de modificaciones estructurales. La naturaleza transitoria de esta plasticidad sináptica aumentada, podría proveer al cerebro adulto de una capacidad más amplia de modificar circuitos neuronales a partir de la experiencia, en momentos crítico de madurez de las nuevas neuronas (Ge et al., 2007).

Neurogénesis y codificación de la información

La relación existente entre el proceso neurogénico y la formación de memorias dependientes de hipocampo es apoyada por diferentes evidencias, entre estas es el efecto positivo que ejercen algunas tareas de aprendizaje sobre la sobrevivencia de las nuevas neuronas (Koehl & Abrous, 2011). Además, se han observado correlaciones positivas y negativas entre la tasa de neurogénesis y el rendimiento en algunas tareas de aprendizaje y memoria. En este sentido, se ha encontrado que animales expuestos a ambiente enriquecido o que desempeñan actividad física voluntaria presentan un aumento en la tasa de neurogénesis que correlaciona con un mejor rendimiento en tareas de aprendizaje, como es el laberinto de Morris (Kempermann et al., 1997; Deng et al., 2010). En caso contrario durante el envejecimiento se observa una disminución de las nuevas neuronas y por lo tanto una disminución en el rendimiento en tareas de aprendizaje (Drapeau et al., 2003). También en algunos modelos animales en los que la neurogénesis hipocámpica se ve abolida, se ha observado la ejecución errónea en tareas que requieren al hipocampo, indicando el requerimiento de la neurogénesis para un rendimiento óptimo en este tipo de tareas (Shors et al.,

2002; Garthe et al., 2009). Adicionalmente, se ha reportado la integración funcional de las nuevas neuronas en las redes neuronales en tareas que involucran procesos de aprendizaje y memoria. Kee y colaboradores en el año 2007 a través de la expresión de c-fos y Arc, visualizaron el reclutamiento de nuevas neuronas en una tarea de aprendizaje en el laberinto de Morris. Los autores encontraron que alrededor de las 4 a 8 semanas de edad las nuevas neuronas son casi dos veces más propensas a ser reclutadas en los circuitos neuronales, en comparación con las células granulares maduras (Kee et al., 2007). Por otro lado Ramírez-Amaya y colaboradores reportaron que las nuevas neuronas, con una edad de 5 meses, son más propensas a ser activadas en respuesta a una exploración ambiental, en comparación con la población de células granulares ya existente (Ramírez-Amaya et al., 2006).

En este sentido se han desarrollado diferentes teorías que tratan de explicar el papel específico de las nuevas neuronas en procesos de aprendizaje y memoria (Deng et al., 2010).

Conforme al papel que se le ha conferido al giro dentado en la separación de patrones se piensa que las neuronas que se originan en esta región durante la edad adulta son importantes para un desarrollo óptimo de esta función. Estas nuevas neuronas podrían estar involucradas principalmente en tareas que requieren un procesamiento más fino de la información debido a la similitud de los elementos que son procesados. Esto se puede lograr a través de la agregación continua de células y la concomitante dispersión de la información (Clelland et al., 2009; Sahay et al., 2011)

Contrario a la idea de que las nuevas neuronas podrían estar implicadas en la separación de entradas de información, Aimone y colaboradores (2006) proponen, que éstas nuevas neuronas en un periodo específico de su crecimiento y dadas sus características distintivas podrían codificar entradas de información de manera conjunta. El patrón de actividad del giro dentado se volvería menos esparcido conforme existieran una amplia cantidad de nuevas neuronas que fueran responsivas a una amplia cantidad de estímulos. Debido a la existencia, en un momento específico, de una población de nuevas neuronas más responsivas a

los estímulos y con una mayor capacidad de disparo, existiría mayor probabilidad de que dos eventos diferentes que ocurren en un mismo tiempo sean codificados de manera conjunta por un grupo específico de células, población de células que posteriormente y debido al continuo recambio y la maduración de las nuevas neuronas serían cambiadas (Aimone et al., 2010).

Fig.6

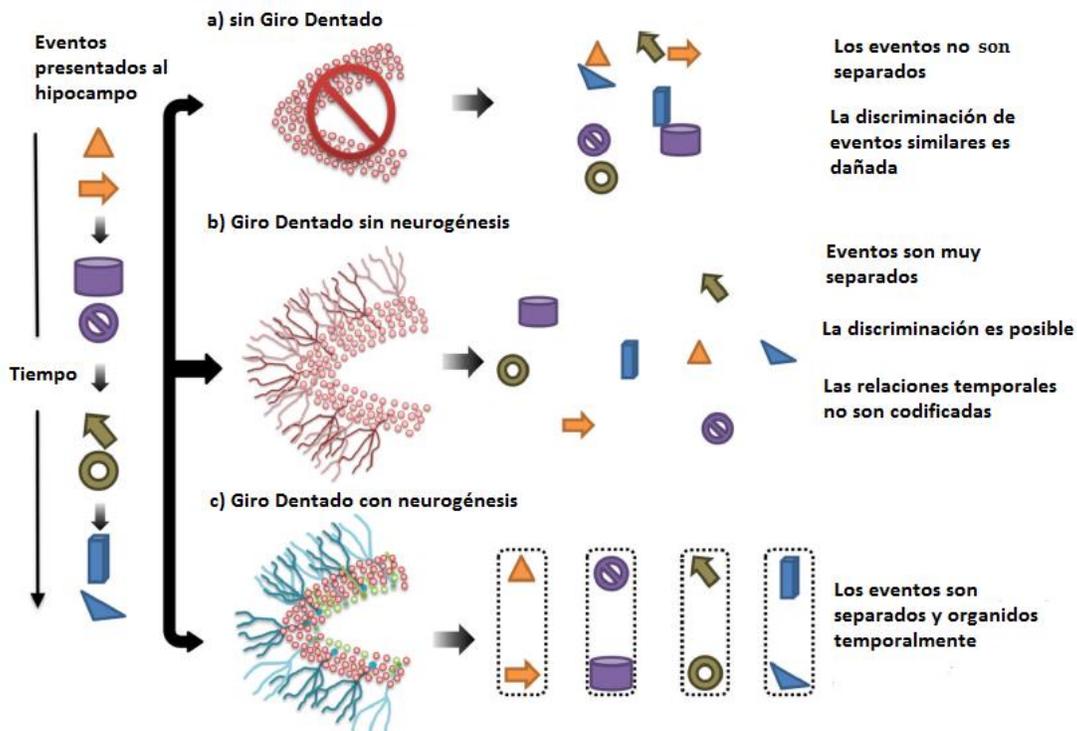


Fig. 6. En el modelo de Aimone y colabores se propone que un posible papel de las nuevas neuronas, en contraste a la separación de patrones, es el de codificar la información de manera conjunta en espacios temporales determinados. Tomada y modificada de Aimone et al., 2010

Neurogénesis y conducta emocional

Las nuevas neuronas originadas en el cerebro adulto no sólo han sido involucradas en tareas de aprendizaje y memoria sino también en conductas con componentes emocionales. Se ha reportado ampliamente la regulación negativa del estrés físico y psicosocial sobre el proceso neurogénico (Leuner & Gould, 2010). El hecho de que el estrés, que predispone a algunos individuos a desarrollar estados de ansiedad y depresión inhiba a la neurogénesis hipocámpica y que los fármacos antidepresivos no sólo tengan un efecto positivo sobre algunos

síntomas conductuales de estos padecimientos, sino que también estimulen la neurogénesis, ha llevado a pensar que el proceso neurogénico está asociado con el decremento de síntomas de estados de depresión y ansiedad. La idea anterior es conocida como hipótesis neurogénica de la depresión (Leuner & Gould, 2010). Otra evidencia importante que apoya esta hipótesis es que el efecto positivo observado en la conducta de los animales debido a la aplicación crónica de algunos fármacos antidepresivos en modelos de depresión en roedores es bloqueada si la neurogénesis hipocámpica es eliminada. Estos resultados indican la necesidad del proceso neurogénico en la acción de estos antidepresivos (Santarelli et al., 2003; Surget et al., 2008; Wang et al., 2008).

Así mismo se sabe que algunos factores externos como el ambiente enriquecido no sólo promueven positivamente el aumento de la neurogénesis sino también tienen un efecto tipo antidepresivo en la conducta de roedores. Se ha observado que el enriquecimiento ambiental disminuye la inmovilidad en la prueba de nado forzado (Llorens-Martín et al. 2011).

En este sentido, se piensa que las nuevas neuronas originadas en el cerebro adulto, debido a su alta sensibilidad al estrés y a los glucocorticoides, son importantes en la regulación negativa que ejerce el hipocampo sobre el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA), sistema responsable del inicio de la respuesta de glucocorticoides al estrés (Leuner & Gould, 2010). Se ha reportado que ratones que tienen una pérdida específica de la neurogénesis hipocámpica presentan mayores niveles de corticosterona tras ser sometidos a un estresor moderado, en comparación a animales cuya neurogénesis no ha sido eliminada (Schloesser et al., 2009; Snyder et al., 2011). Adicionalmente Snyder y colaboradores (2011) también observaron un aumento en el tiempo de inmovilidad en la prueba de nado forzado en los ratones con neurogénesis abolida. Los autores concluyen que el proceso neurogénico podría amortiguar el efecto negativo de situaciones con componentes estresantes.

ACTIVACIÓN NEURONAL DETERMINADA POR LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA ASOCIADA AL CITOESQUELETO (ARC)

La inmensa capacidad que tiene el cerebro de obtener constantemente información del espacio que nos rodea y de almacenar esta información en la memoria se cree que depende de la plasticidad de las conexiones del sistema nervioso. Los patrones de actividad neuronal son traducidos en cambios permanentes en la conectividad sináptica, a través de la expresión de genes y la síntesis de proteínas (Bramham et al., 2010). Uno de los mecanismos celulares a través de los cuales se modifican las respuestas sinápticas a largo plazo para mantener y estabilizar los ensamblajes neuronales es la activación de genes de expresión temprana, que se definen como genes cuya transcripción no depende de la síntesis de proteínas o alguna otra activación previa de otros genes, sino que son activados por un patrón de actividad sináptica (Miyashita et al., 2008).

El gen de expresión temprana Arc/ARg3.1 (proteína asociada a citoesqueleto regulada por la actividad) se expresa en respuesta a la activación de los receptores de glutamato (NMDA), dada por la actividad neuronal, así como por la activación de los receptores muscarínicos acetilcolinérgicos. La transcripción de Arc también se produce tras la administración de BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro), y en respuesta a la potenciación a largo plazo (por sus siglas en inglés LTP) (Korb y Finkbeiner, 2011; Bramham et al., 2010; Bramham et al., 2008).

La expresión de diversos genes regulados por actividad entre ellos Arc, son cruciales para inducir plasticidad sináptica. Se ha reportado que Arc aumenta la densidad de las espinas dendríticas *in vitro* e *in vivo* y también ejerce una regulación positiva sobre la fuerza de las sinapsis (Miyashita et al., 2008).

Conductualmente se ha observado que la expresión de Arc es necesaria para la realización de diferentes tareas de memoria y aprendizaje (Korb & Finkbeiner, 2011). Adicionalmente se ha establecido una fuerte asociación entre la expresión de Arc y la actividad neuronal específicamente vinculada al procesamiento de información (Bramham et al., 2010). A través de hibridación *In situ* Guzowski y

colaboradores (1999) mapearon la activación de poblaciones neuronales, observando que la doble exploración del mismo ambiente induce la activación de Arc en ensambles de neuronas altamente similares, mientras que la exploración de diferentes ambientes induce la expresión de Arc en diferentes ensambles. Los autores concluyen que la expresión de Arc en neuronas piramidales refleja específicamente la codificación de la información del contexto.

En el mismo sentido, se ha observado que la activación de Arc en CA1 y CA3 es consistente cuantitativamente y cualitativamente con estudios electrofisiológicos (Miyashita et al., 2008). Adicionalmente, Miyashita y colaboradores en el año 2009 mostraron que la inactivación del núcleo septal inhibía la expresión de Arc en una tarea de exploración en una pista rectangular. Dicha inhibición del núcleo septal interfiere con la inducción de la LTP en el hipocampo y con el aprendizaje y la memoria dependiente de hipocampo. Sin embargo, tras la inhibición del núcleo septal los disparos de las células de lugar de CA1 y la mitad de los disparos de las células de lugar de CA3 se mantienen, lo que indica que la expresión de Arc está altamente relacionada con la actividad neuronal específicamente asociada con la plasticidad sináptica y la memoria (Miyashita et al., 2009)

JUSTIFICACIÓN

El proceso neurogénico consiste en generar nuevas neuronas en el giro dentado del hipocampo durante la etapa adulta. Recientemente, se ha propuesto que las nuevas neuronas tienen un papel importante para la codificación de la información proveniente del exterior. Estas nuevas neuronas han sido asociadas tanto a tareas de aprendizaje espacial como a conductas con componentes emocionales. Adicionalmente se cree que debido a una plasticidad incrementada en un periodo específico de su desarrollo, las nuevas neuronas podrían tener un papel diferente al de las neuronas maduras en la codificación de información.

Dado que se desconoce si las neuronas generadas en el cerebro adulto contribuyen diferencialmente en tareas de aprendizaje espacial o en conductas con componentes emotivos así como si el estado de maduración de estas nuevas neuronas influye en su involucramiento en este tipo de tareas, en el presente trabajo se buscó dilucidar si la activación de las nuevas neuronas es influenciada por su edad y la tarea a la cual se ven enfrentados los roedores.

Por otra parte, se ha observado que la neurogénesis está fuertemente influenciada por diversos factores ambientales. Se ha reportado ampliamente que el ambiente enriquecido regula positivamente el proceso neurogénico y que además tiene efectos benéficos en la conducta de roedores. Debido a que se ha observado una asociación entre la disminución de la inmovilidad en la prueba de nado forzado y un incremento en el número de nuevas células en roedores alojados en enriquecimiento ambiental, en este trabajo adicionalmente se estudió si el ambiente enriquecido ejerce un efecto en el número de células de nueva generación que son incorporadas en los circuitos neuronales en respuesta a la tarea de nado forzado.

OBJETIVOS

Objetivo General:

- Estudiar la expresión de la proteína Arc (marcador de activación celular) en nuevas neuronas en distintas etapas de su maduración en el giro dentado del hipocampo adulto, en roedores expuestos a tareas de exploración espacial o a una tarea con componentes emotivos. Adicionalmente, estudiar el efecto del enriquecimiento ambiental en la expresión de la proteína Arc en estas células, en roedores sometidos a una tarea con componentes emotivos.

Objetivos Específicos:

- Identificar y cuantificar 3 poblaciones de células de nueva generación de diferentes edades en el giro dentado del hipocampo adulto a través de los análogos de timidina CldU e IdU y la proteína doblecortina (proteína asociada a migración celular).
- Cuantificar el número de células granulares en el giro dentado que expresan la proteína Arc (marcador de activación celular) debido a la exposición a uno o dos ambientes de exploración espacial.
- Cuantificar el número de células granulares en el giro dentado que expresan la proteína Arc (marcador de activación celular) en respuesta a la exposición a una situación con un nivel de estrés moderado (prueba de nado forzado) en roedores alojados en enriquecimiento ambiental o en condiciones estándar.
- Analizar el número de células granulares que expresan la proteína Arc a lo largo del eje septo-temporal en respuesta a las diferentes tareas conductuales.
- Analizar el porcentaje de células de nueva generación (positivas a CldU, IdU y DCX) que expresan la proteína Arc en respuesta a una o dos exploraciones ambientales.
- Analizar el porcentaje de células de nueva generación (positivas a CldU, IdU y DCX) que expresan la proteína Arc en respuesta a una situación con

un nivel de estrés moderado (prueba de nado forzado) en roedores alojados en ambiente enriquecido o en condiciones estándar.

- Analizar el tiempo de inmovilidad en la prueba de nado forzado en roedores alojados en ambiente enriquecido o en condiciones estándar.

HIPÓTESIS:

1. El número de células granulares positivas a la proteína Arc en el giro dentado debido a la exploración de un sólo ambiente será similar al número de células que expresan la proteína Arc provocado por dos exploraciones del mismo ambiente. Sin embargo, la exposición a dos ambientes diferentes provocará un aumento significativo en el número de células positivas a Arc.
2. La exposición de roedores a una condición estresante provoca un aumento en el número de células granulares del giro dentado que expresan la proteína Arc.
3. Las neuronas de nueva generación en diferentes edades de roedores adultos (positivas para los análogos de la timidina CldU, IdU y la proteína DCX) expresan diferencialmente la proteína Arc dependiendo de su edad y el ambiente al cual son expuestos los roedores
4. El número de células de nueva generación (CldU⁺, IdU⁺ y DCX⁺) que expresan la proteína Arc en el giro dentado en roedores expuestos a una condición estresante es mayor en el grupo alojado en ambiente enriquecido en comparación al grupo de alojamiento estándar.

MÉTODO

Sujetos:

Se utilizaron 39 ratones hembra de la cepa Balb/c de 10 semanas de edad. Los animales se alojaron en grupos de 5 a 8 animales en el bioterio del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz con acceso libre a agua y alimento. Los roedores fueron mantenidos con un ciclo luz-oscuridad de 12 horas

a una temperatura de 23 ± 1 °C. Todas las regulaciones legales e institucionales con respecto al cuidado y uso ético de animales fueron seguidas para los experimentos de este proyecto (NOM-062-ZOO-1999).

Diseño Experimental:

El propósito de este trabajo fue estudiar la activación de las nuevas neuronas generadas en el giro dentado del hipocampo adulto en respuesta a tareas conductuales diferentes. Para tal fin, en este trabajo se realizaron dos experimentos. La duración de los experimentos fue de 6 semanas. Al inicio de los experimentos 39 roedores fueron asignados aleatoriamente a uno de siete grupos.

Marcaje de dos poblaciones celulares:

Con el objetivo de marcar dos poblaciones celulares de nueva generación a diferentes edades, se administraron a los roedores de ambos experimentos dos análogos de timidina (CldU e IdU). Ambos análogos se incorporan en el DNA de las células que se encuentran en la fase S del ciclo celular. El día 1 del experimento todos los animales recibieron una administración del análogo de timidina 5-cloro-2'-desoxiuridina (CldU) por vía intraperitoneal a una dosis de 42.5 mg/kg disuelto en 100 µl de NaCl (marcaje de células de 6 semanas). Tres semanas después de haber iniciado el protocolo se administró una dosis de (57.5 mg/kg) del análogo de timidina 5-Iodo-2' desoxiuridina (IdU) disuelto en una solución de 100 µl (0.2 NaOH/NaCl) por vía intraperitoneal (marcaje de células de 3 semanas) (Vega y Peterson, 2005).

Seis semanas después de iniciados los experimentos, los roedores fueron expuestos en el día 42 a una tarea específica de su grupo.

Experimento 1:

- 1) CTR: Alojamiento estándar/Control (n=5)
- 2) A: Ambiente A (n=5)
- 3) A-A: Ambiente A + Ambiente A (n=5)
- 4) A-B: Ambiente A + Ambiente B (n=5)

Los roedores asignados al experimento uno fueron alojados durante el curso del experimento en cajas estándar (18 x 28 x 16 cm).

Grupo control:

En el día 42 del experimento los roedores del grupo 1 (CTR), fueron sacrificados directamente de su caja sin ser expuestos a ninguna condición experimental.

Exploración ambiental

Los roedores de los grupos 2, 3 y 4: Ambiente A ("A"), Ambiente A + Ambiente A ("A-A") y Ambiente A + Ambiente B ("A-B") fueron expuestos en el día 42 del experimento en una o dos ocasiones a ambientes de exploración ambiental.

"A". El grupo A fue expuesto 5 minutos a una exploración ambiental en el ambiente A.

El ambiente A consistió en una plataforma de 30 cm de largo x 30 cm de ancho con paredes de 8.5 cm de alto que se localizó en un cuarto de 2 m x 1.5m con pistas espaciales únicas (cartulinas de diferentes formas y colores). La plataforma se dividió en 9 cuadrantes, cada uno con un área de 100 cm². En las paredes de la plataforma se colocaron placas de fomi de color blanco y papel corrugado en dos cuadros del área de la plataforma.

Fig.7

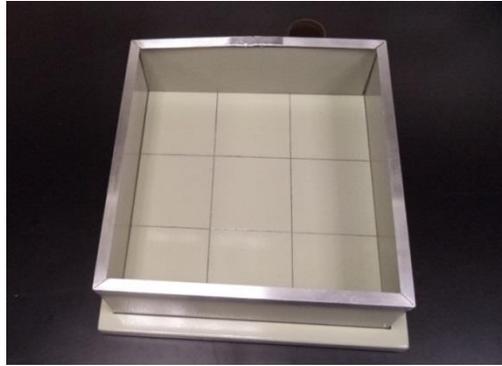


Fig. 7. Imagen del ambiente de exploración "A"

"A-A". El grupo A-A tuvo una primera exploración ambiental de 5 minutos en el ambiente A, separada por 20 minutos de una segunda exploración de 5 minutos nuevamente en el ambiente A.

"A-B". El grupo A-B mantuvo una exploración en el ambiente A de 5 minutos separada por 20 minutos de una exploración de 5 minutos en el ambiente B.

El ambiente B consistió en una plataforma de 25 cm de ancho x 36 cm de largo que se dividió en 8 rectángulos con un área de 112.5 cm^2 cada uno, con paredes de 8.5 cm. Este ambiente se localizó en un cuarto diferente al del ambiente A, que tenía pistas espaciales únicas (cartulinas de diferentes formas y colores). En las paredes del ambiente B se pegó fomi de color azul y tres rectángulos de papel corrugado en la base de la plataforma.

Fig.8

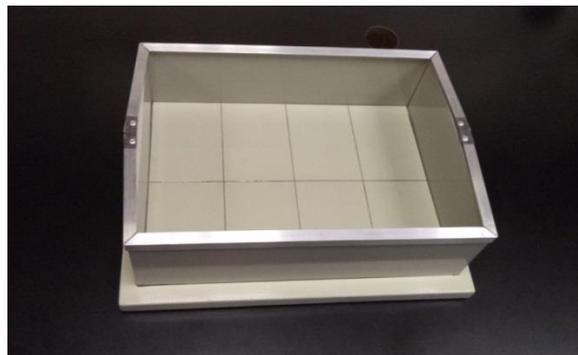


Fig. 8. Imagen del ambiente de exploración "B"

La exploración ambiental consistió en tomar al roedor de la cola y liberarlo en forma aleatoria en las divisiones del ambiente A o del ambiente B cada 15 segundos durante un periodo de 5 minutos, tratando de producir una exposición completa y uniforme del ambiente.

Siete días previos a la exploración espacial los animales de los grupos 1, 2, 3 y 4 fueron manejados por el experimentador durante 3 minutos al día para disminuir el estrés causado por la manipulación durante la prueba. El día anterior a la prueba los animales se mantuvieron en sus cajas estándar sin ninguna manipulación.

Fig. 9

Experimento 1:

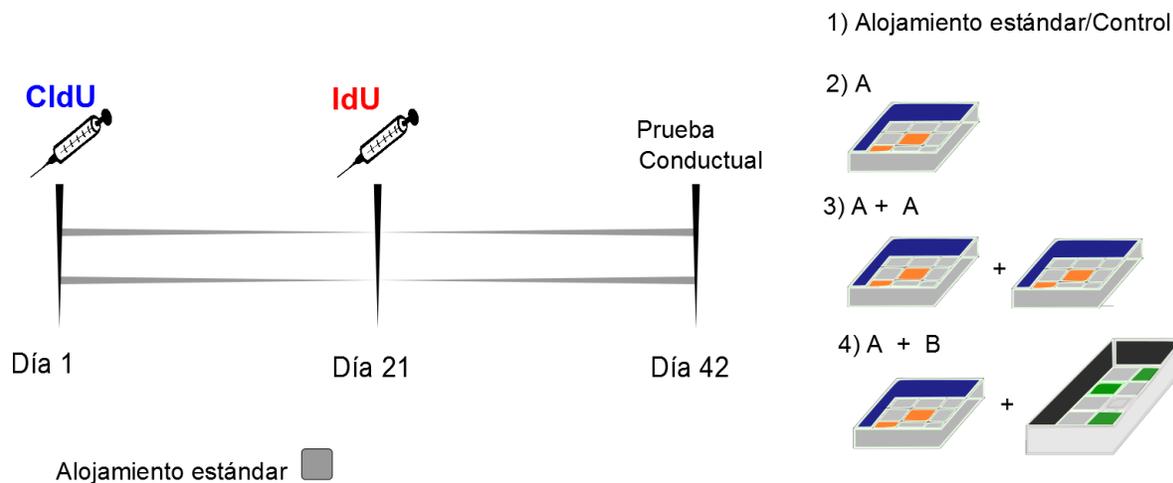


Fig. 9. Diseño del experimento 1.

Experimento 2:

- 1) CTR: Alojamiento estándar/Control (n=5)
- 5) AE/NF: Alojamiento estándar/Nado forzado (n=7)
- 6) ENR: Enriquecimiento/Control (n=5)
- 7) ENR/NF: Enriquecimiento/Nado forzado (n=7)

Durante el curso del experimento dos, los roedores de los grupos 6 (ENR) y 7 (ENR/NF) fueron alojados en ambientes enriquecidos, en grupos de 5 a 8 roedores. Los ambientes enriquecidos consistieron en cajas de alojamiento de mayor tamaño (34 x 44 x 20 cm), en las cuales se mantuvieron juguetes, tubos, túneles y una rueda de correr durante toda la duración del experimento. Para evitar habituación y aumentar la complejidad del ambiente dos veces por semana

los juguetes se cambiaron de lugar, y cada semana se agregó un juguete nuevo. Se inició con 3 juguetes y una rueda de correr.

Fig. 10



Fig. 10. Fotos representativas del incremento en la complejidad del enriquecimiento ambiental a lo largo del curso del experimento. Para evitar habituación e incrementar la complejidad del ambiente cada semana se agregó un objeto nuevo. Así mismo 2 veces por semana se cambió la posición de los objetos.

Los roedores de los grupos 1(CTR) y 5 (AE/NF) fueron mantenidos en cajas estándar (18 x 28 x 16 cm) sin ningún cambio en su ambiente.

Grupos control:

En el día 42 del experimento los roedores del grupo 6 (ENR) fueron sacrificados directamente de su caja, sin ser expuestos a ninguna condición experimental.

Grupo nado forzado:

Los roedores de los grupos 5 (AE/NF) y 7 (ENR/NF) en el día 42 del experimento, fueron expuestos a la prueba de Posolt.

La prueba de Porsolt o prueba de nado forzado permite evaluar la conducta tipo desesperanza (Ramírez Rodríguez et al., 2009). Los roedores son forzados a nadar en cilindros pequeños de los cuales no pueden escapar. Inicialmente los animales tienen una respuesta de actividad vigorosa que es sustituida por una

respuesta de desesperanza en la cual han aprendido que el escape no es posible, convirtiendo su respuesta en inmovilidad (Porsolt et al. 1977).

Cilindros de vidrio de 18 cm. de diámetro fueron llenados a una altura de 15 cm. con agua a temperatura ambiente. Los ratones fueron colocados en los cilindros por seis minutos y su actividad fue grabada en video. Los primeros dos minutos de la prueba sirvieron como un periodo de habituación. En los cuatro minutos restantes se midió el tiempo en el que el animal se mantuvo inmóvil (el tiempo en el que el roedor no exploró activamente el cilindro o trató de escapar de él). En el tiempo de inmovilidad se incluyeron los periodos cortos de actividad leve en los que el animal sólo hizo los movimientos necesarios para mantener la cabeza fuera del agua. Terminada la prueba los ratones fueron secados gentilmente y regresados a sus alojamientos, donde fueron mantenidos cubiertos hasta que se sacrificaron (Porsolt et al. 1977; Ramírez Rodríguez et al., 2009).

Fig.11

Experimento 2:

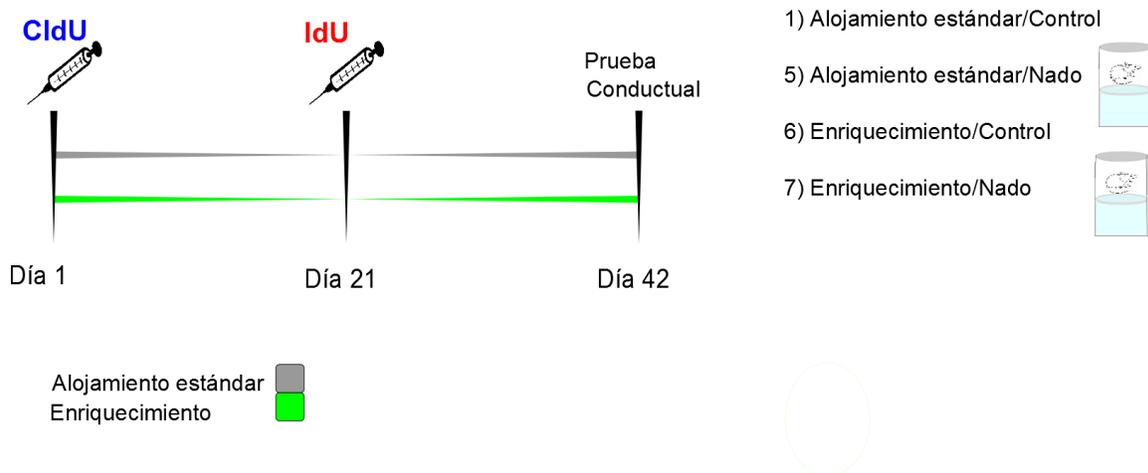


Fig. 11. Diseño del experimento 2.

Sacrificio de los roedores y seccionamiento:

Treinta minutos después de terminada cada condición experimental en ambos experimentos, los roedores fueron sacrificados por una sobredosis de ketamina y xilacina. Los roedores fueron decapitados y el cerebro se obtuvo para realizar la

fijación en una solución de paraformaldehído al 4 %. Posteriormente, los cerebros fueron colocados en una solución de sacarosa al 30%.

Los cerebros se seccionaron para obtener cortes coronales de 40 μm con un micrótopo (Leica). Las secciones fueron guardadas a -4°C en una solución crioprotectora (25% de glicol etileno y 25% de glicerol en una solución amortiguadora de fosfatos al 0.05M).

Inmunohistoquímicas:

Posteriormente se realizaron inmunohistoquímicas con el método del complejo avidina-biotina-peroxidasa para visualizar las células de nueva generación en el giro dentado positivas para los análogos de timidina IdU y CldU. Así como la expresión de la proteína Arc en las células granulares del giro dentado. Se realizó también un doble marcaje para identificar la colocación de las proteínas doblecortina, (DCX por sus siglas en inglés), y la proteína Arc. La proteína doblecortina se expresa en neuronas inmaduras que se encuentran en proceso de migración.

Finalmente, se hicieron inmunofluorescencias para comarcar las células de nueva generación positivas para los análogos CldU e IdU que expresaron la proteína Arc.

Los marcajes de Arc, CldU, IdU y DCX/Arc se visualizaron con el método del complejo avidina-biotina-peroxidasa (Kempermann et al, 2003). Las secciones se incubaron por 30 minutos en una solución 0.6% H_2O_2 en TBS. Para los marcajes de CldU e IdU las secciones fueron pre-tratadas con HCL por 30 minutos a una temperatura de 37°C , seguido por dos lavados en buffer de Boratos (pH 8.5). El tejido para la doble tinción DCX y ARC fue sometido a dos horas de incubación en una solución de Citratos pH. 6.0, a una temperatura de 50°C y posteriormente a dos lavados en frío con la solución de Citratos pH. 6.0.

Después de los lavados con una solución amortiguadora de tris buffer salina, por sus siglas en inglés TBS, a un pH 7.5, el tejido se permeabilizó y bloqueó con la solución de bloqueo que contenía para el marcaje de Arc; 10% de suero de burro y 0.1 % de Tritón X-100 para CldU; 5 % de suero de burro y 0.1 % de Tritón X-100

para IdU; 5 % de suero de burro y 0.5 % de tritón X-100 y y para DCX/Arc; 3 % de suero de burro y 1% de tritón X-100.

Los anticuerpos primarios se diluyeron en la solución de bloqueo y fueron incubados toda la noche a 4°C, o a temperatura ambiente en el caso de la tinción DCX/Arc. Posterior a los lavados en TBS, el tejido se incubó con los anticuerpos secundarios durante dos horas a temperatura ambiente. Los anticuerpos secundarios biotinilados fueron anticonejo que reconoce a la proteína Arc, antirata que reconoce a la CldU, antiratón que reconoce a la IdU, y anticabra que reconoce a DCX. Para revelar la reacción se utilizó el sistema ABC y como sustrato la diaminobencidina (DAB). En el caso de la doble tinción ambos anticuerpos primarios se colocaron al mismo tiempo. El primer anticuerpo secundario que se utilizó fue el anticonejo correspondiente a Arc. Se procedió con el protocolo normal utilizando el sistema DAB con níquel, dando como resultado una coloración negra. Después de los lavados correspondiente se hizo la incubación del segundo anticuerpo secundario; anti cabra que reconoce DCX. Se continuó el procedimiento y se reveló la preparación con el sistema DAB sin níquel dando una coloración café clara.

Inmunofluorescencia:

Doble marcaje CldU/Arc e IdU/Arc.

Para ambos marcajes se el tejido fue pre-tratado con HCL, por 30 minutos para CldU/Arc y por 15 minutos para IdU/Arc a una temperatura de 37 °C. Se aplicó el paso del bloqueo con TBS-Plus con las mismas concentraciones y el mismo tiempo utilizados en las inmunohistoquímicas.

Para el marcaje de CldU/Arc las secciones se incubaron con una mezcla de los dos anticuerpos primarios; anti-BrdU (rata) y anti-Arc (conejo) durante toda la noche a una temperatura de 4 °C. Después de lavar con TBS se aplicaron los anticuerpos secundarios acoplados a diferentes fluorocromos (FITC anti-rata y TRITC anti-conejo). Estos se incubaron por cuatro horas a temperatura ambiente y las secciones se lavaron nuevamente.

Para el marcaje de IdU/Arc se incubaron los anticuerpos primarios anti-BrdU (ratón) y anti-Arc (conejo). Se continuó el procedimiento de la misma manera que en el marcaje para CldU/Arc, los anticuerpos secundario utilizados fueron (FITC anti-ratón y TRITC anti-conejo). Las secciones se lavaron y se montaron en un medio de montaje apropiado para fluorescencia.

Cuantificación:

Inmunohistoquímicas: El número de células marcadas para IdU, CldU y Arc en las inmunohistoquímicas se determinaron en secciones coronales, en un promedio de 8 cortes por roedor. Las células positivas a estos marcadores se contaron a lo largo de la extensión del eje septo-temporal de la capa granular con un objetivo 40x en un microscopio óptico Leica. Las cuantificaciones totales se normalizaron con respecto al número de hipocampos (se dividió el número de células positivas encontradas entre el número de hipocampos de los cuales se obtuvo cada cuantificación). Las coordenadas usadas para distinguir al área dorsal y el área ventral del hipocampo fueron: -1.06 mm a -2.54 mm para el hipocampo dorsal, y -2.80 mm a -3.84 para el hipocampo ventral relativo a Bregma de acuerdo a los atlas de Paxino y Franklin.

La cuantificación de las células positivas para DCX que colocalizaban con la proteína Arc se analizó en secciones coronales en todos los animales. Se cuantificó el total de células positivas a DCX a lo largo de la extensión del eje septo-temporal de la capa granular con un objetivo 40x. Posteriormente se contaron las células positivas a DCX que colocalizaban con la proteína Arc, para obtener el porcentaje correspondiente. La colocalización se determinó tras una serie de lineamientos. Las células positivas para ambos marcadores debían mostrar un soma con una coloración sólida (sin espacios vacíos) y oscura (entre café y negro), con una morfología dendrítica delgada y larga, que alcanzara la capa molecular y con más de un nodo de bifurcación. El número total de células positivas se normalizó con respecto al número de hipocampos.

Inmunofluorecencias: Se utilizó un microscopio de inmunofluorecencia Nikon Eclipse Ti para analizar el número de células positivas para CldU e IdU que comarcaban con la proteína Arc. Se determinó el porcentaje de células positivas a CldU/Arc e IdU/Arc.

Análisis estadístico:

El análisis estadístico se realizó usando el programa Sigma Plot 10.0. En el análisis de las células de nueva generación positivas a CldU e IdU se utilizó la prueba U de Mann-Whitney debido a que el supuesto de normalidad no se cumplió. El número de células DCX+ se analizó a través de la prueba t de Student. Se utilizó la prueba ANOVA de un factor seguida de la prueba post hoc de Tukey en el análisis de la expresión de la proteína Arc en los grupos de exploración ambiental. La prueba ANOVA de 2 factores seguida por la prueba post hoc de Tukey fue utilizada en el análisis de las células granulares que expresaron la proteína Arc en los grupos de nado forzado, y en el análisis de la expresión de la proteína Arc a lo largo del eje septo-temporal en los grupos de exploración ambiental y en los grupos de nado forzado. El análisis de las células DCX+/Arc+ en los grupos expuesto a exploración ambiental se realizó a través de la prueba ANOVA de un factor en rangos con la prueba Kruskal-Wallis, debido a que el supuesto de normalidad falló. El análisis de las células DCX+/Arc+ en la tarea de nado forzado se realizó con la prueba ANOVA de dos factores. Finalmente la prueba t de Student se utilizó para hacer el análisis del tiempo de inmovilidad en la prueba de nado forzado. Las diferencias significativas se consideraron con un nivel de significancia de $p \leq 0.05$.

RESULTADOS.

Células de nueva generación de 6, 3 semanas de edad y DCX⁺

Los roedores alojados en caja estándar o en ambiente enriquecido fueron mantenidos en sus respectivas condiciones de la misma manera hasta 35-36 minutos antes de su sacrificio. Este lapso de tiempo es muy pequeño para que las diferentes pruebas conductuales a la que fueron sometidos los roedores en el día 42 del experimento puedan tener un efecto diferencial en la tasa de sobrevivencia de las células marcadas. Por lo anterior, las cuantificaciones de las células CldU positivas, las células IdU positivas y las células positivas a la proteína DCX se analizaron comparando únicamente la condición de alojamiento estándar con la condición de enriquecimiento ambiental.

El día uno del experimento se aplicó una dosis del análogo de la timidina CldU. Al final del experimento las células de 6 semanas de edad que incorporaron el análogo se cuantificaron. Las cuantificaciones totales se normalizaron con respecto al número de hipocampos. En la figura 12 se observan imágenes representativas de células positivas a CldU en el giro dentado del hipocampo. Los datos se analizaron con la prueba U de Mann-Whitney. Se observó un aumento significativo en el número de células positivas a CldU en los grupos alojados en ambiente enriquecido (AE= 2.97, ENR=6.927, $p < 0.001$) (Fig. 13).

Fig. 12

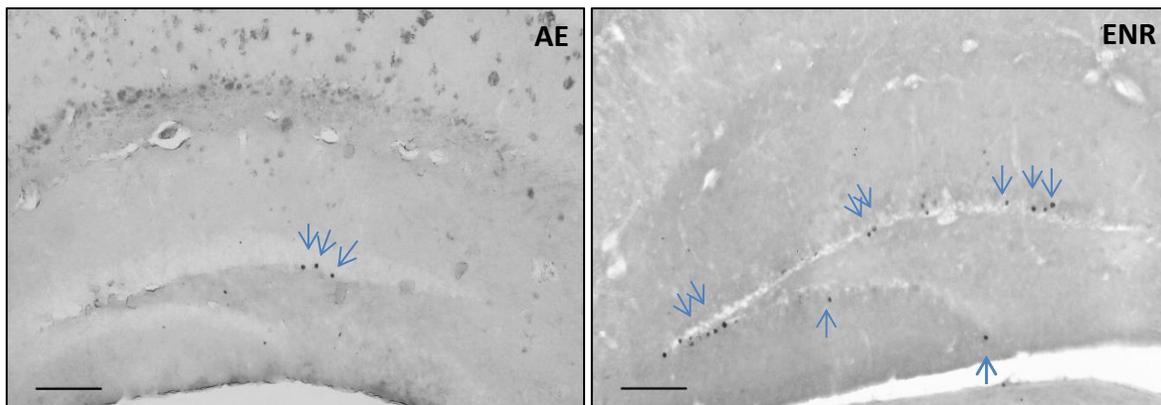


Fig. 12. Células de seis semanas de edad en el giro dentado del hipocampo, marcadas con el análogo de timidina CldU, en grupos que habitaron en alojamiento estándar (AE) o en enriquecimiento ambiental (ENR). Células positivas a CldU indicadas con flechas azules. Barra de escala: 150 μm .

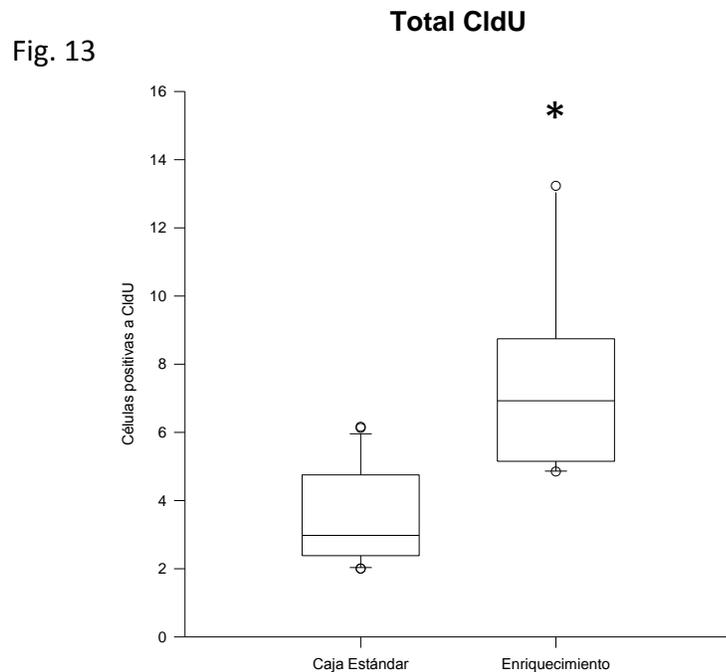


Fig. 13. Cuantificación de células marcadas para CldU por corte de hipocampo. Se observa un aumento en el número de células de 6 semanas de edad en los grupos que habitaron en ambientes enriquecidos en comparación con los grupos que fueron alojados en cajas estándar ($p < 0.001$). Los datos se analizaron con la prueba U de Mann-Whitney. $N = 5$ roedores por grupo.

Tres semanas después de iniciado el experimento se aplicó en los mismos ratones una dosis del análogo de la timidina IdU con la finalidad de marcar una población celular de 3 semanas de edad. Las cuantificaciones totales se normalizaron con respecto al número de hipocampos. Imágenes representativas de células positivas a IdU de los grupos control y grupos enriquecimiento se muestran en la figura 14.

Fig. 14

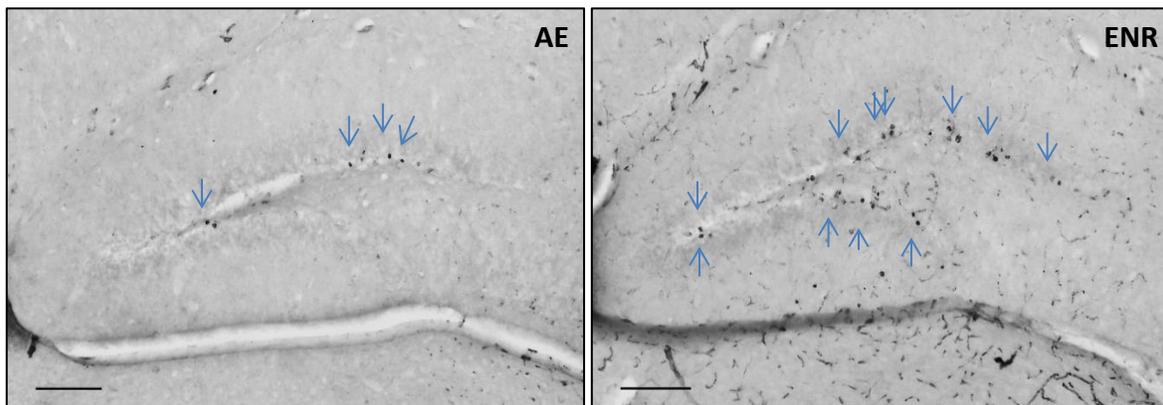


Fig. 14. Marcaje de células de tres semanas de edad, positivas para el análogo de timidina IdU, en grupos que habitaron en alojamiento estándar (AE) o en enriquecimiento ambiental (ENR). Células positivas a IdU indicadas con flechas azules. Barra de escala: 150 μm .

Los datos se analizaron con la prueba U de Mann-Whitney. El incremento en el número de células en los grupos que habitaron en ambientes enriquecidos fue significativo (AE= 3.09, ENR= 6.81, $p < 0.001$) (Fig. 15).

Fig. 15

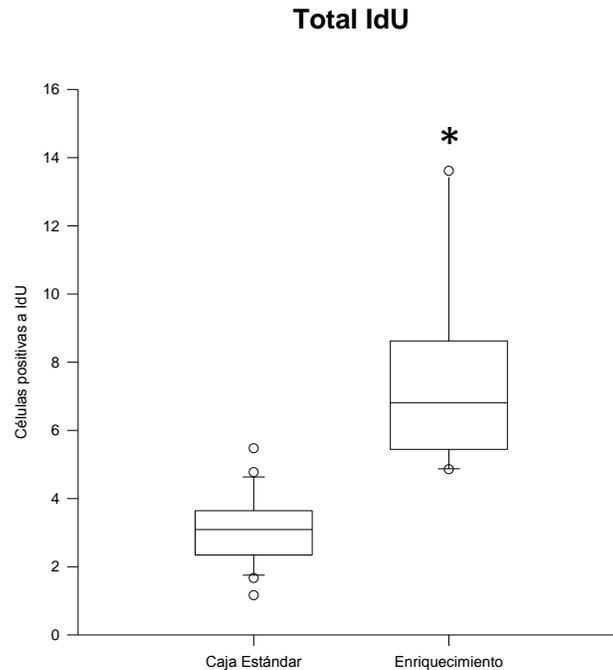


Fig. 15. Cuantificación de células de 3 semanas de edad por corte de hipocampo. La gráfica muestra un aumento estadísticamente significativo en el número de células IdU positivas en los grupos que habitaron en ambientes enriquecidos en comparación con los grupos control ($p < 0.001$). Los datos se analizaron con la prueba U de Mann-Whitney. N= 5 roedores por grupo.

Lo anterior indica que en los mismos roedores se encuentran dos poblaciones de células de nueva generación con diferentes edades. Un primer grupo de células de 6 semanas de edad y un segundo grupo de células de 3 semanas de edad. En ambas edades se observa un aumento en el número de células en los grupos expuestos a enriquecimiento ambiental.

El análisis del número total de células positivas a la proteína DCX se hizo de igual manera, comparando los grupos de acuerdo a su condición de alojamiento a través de la prueba t de Student. Las cuantificaciones totales se normalizaron con respecto al número de hipocampos. Se observó un aumento significativo de las células positivas a DCX en los roedores sometidos a ambiente enriquecido en

comparación con los roedores que habitaron en alojamiento estándar ($t = -12.885$, $gl = 32$, $p < 0.001$) ($AE = 55.22 \pm 2.33$, $ENR = 113.41 \pm 4.82$). (Fig. 16).

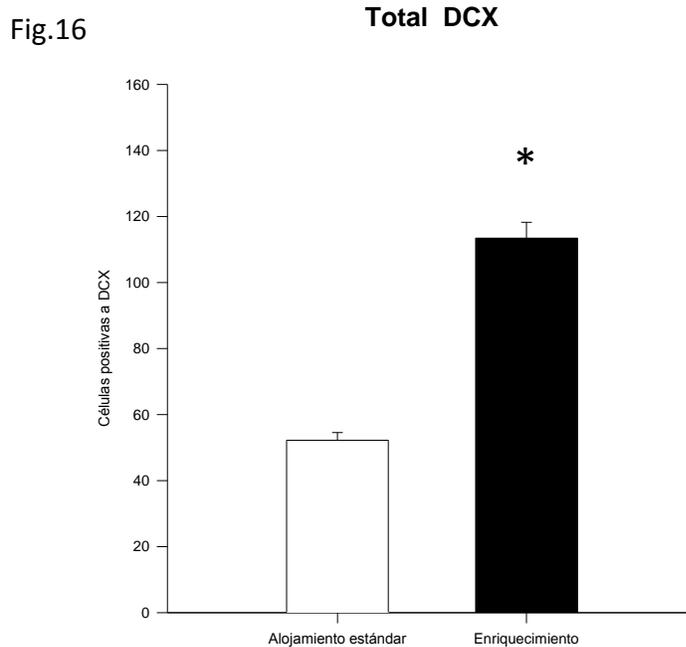


Fig.16. Cuantificación del número de células positivas para doblecortina en la capa granular del giro dentado en los grupos mantenidos en alojamiento estándar o en enriquecimiento ambiental. Se observó un aumento significativo en las células DCX+ en los grupos alojados en enriquecimiento ambiental ($p < 0.001$). Barras de error representan el error estándar. Los datos se analizaron con la prueba t de Student. N= 10-20 roedores por grupo.

Células granulares activadas por la exposición a diferentes ambientes (Arc)

Previamente se ha reportado que entre 30 y 60 minutos posteriores a la estimulación conductual se observa el punto máximo de expresión de la proteína Arc en el giro dentado de roedores (Ramírez-Amaya et al., 2005). Con el objetivo de validar que los niveles de expresión de la proteína Arc en el giro dentado de ratones hembra fuesen similares después de un periodo de 30 minutos y 1 hora de la exposición conductual, y por lo tanto los tiempos seleccionados correctos, se analizó la expresión de la proteína en estos dos puntos de tiempo. Los resultados se analizaron con la prueba ANOVA de 1 factor. No se encontraron diferencias significativas ($F(2,12) = 1.63$; $p = 0.237$) ($CTR = 1106.4 \pm 130.6$, $30\text{min.} = 1378.8 \pm 63.39$, $1\text{hr.} = 1255.2 \pm 114.74$,) (Fig. 17).

Fig.17

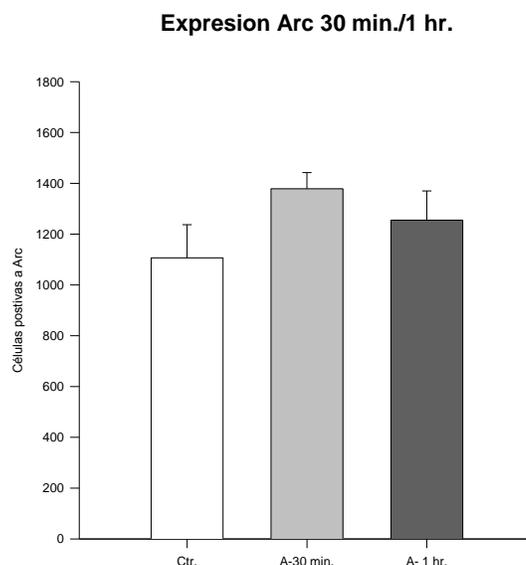


Fig.17. Cuantificación del número de células granulares del giro dentado que expresaron la proteína Arc pasados 30 minutos y 1 hora después de la exposición al ambiente de exploración A. Los datos se analizaron con la prueba ANOVA de 1 factor. No se encontraron diferencias significativas ($p= 0.237$). N= 5 roedores por grupo.

El día 42 del experimento se expuso a los roedores a diferentes tareas conductuales para inducir la expresión de la proteína Arc.

En los grupos de exploración ambiental el análisis se realizó con la prueba ANOVA de 1 factor. Los resultados reflejaron diferencias significativas entre los grupos ($F(3,14) = 15.973$, $p < 0.001$). Imágenes representativas de células granulares del giro dentado que expresan la proteína Arc en respuesta a la tarea de exploración ambiental se observan en la figura 18. El análisis post-hoc empleando la prueba de Tukey no reflejó diferencias significativas entre el grupo control y el grupo A ($p= 0.709$). Por el contrario, el grupo A-A mostró un incremento estadísticamente significativa en el número de células granulares que expresaron la proteína Arc en comparación con el grupo control ($p=0.001$) y con el grupo A ($p= 0.006$). También se observó un aumento significativo en el grupo A-B en comparación al grupo control ($p < 0.001$), y al grupo A ($p=0.002$). (CTR= 9.617 ± 1.33 , A= 11.87 ± 0.625 , A-A= 20.92 ± 1.61 , A-B= 22.06 ± 2.57). Se encontró un aumento del 117.59 % y del 129.42% en los grupos A-A y A-B respectivamente en comparación al grupo control, en el número de células activadas en respuesta a la exploración ambiental (Fig. 19).

Fig.18

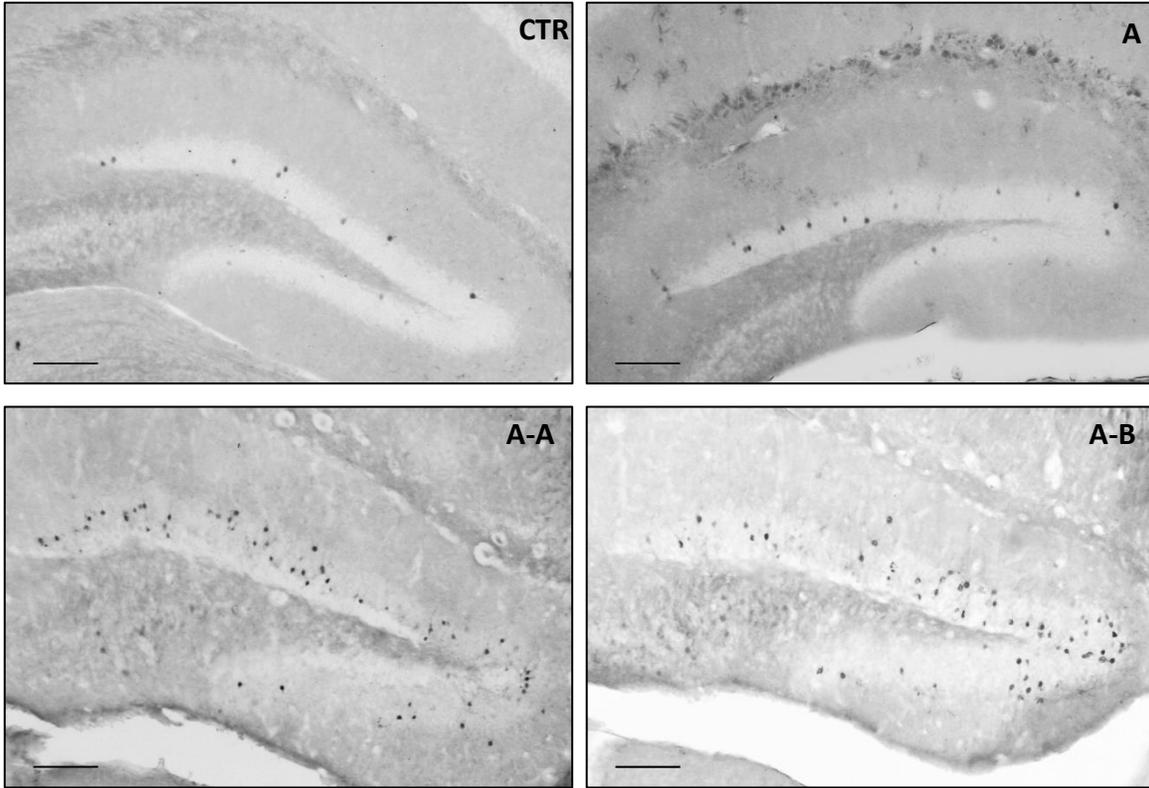


Fig. 18. Expresión de la proteína Arc en células granulares del giro dentado del hipocampo en roedores expuestos a una o dos exploraciones ambientales. Barra de escala= 150 μ m.

Fig.19

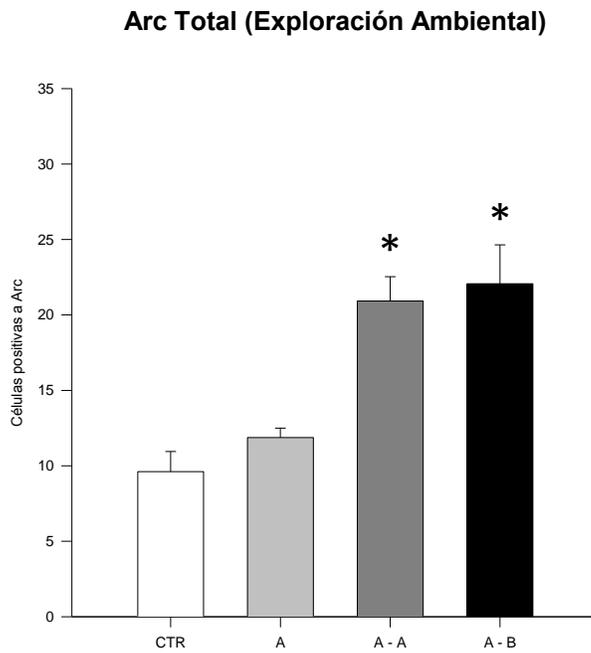


Fig. 19. Cuantificación total de células granulares que expresan la proteína Arc en el giro dentado en animales expuestos a exploración ambiental. Barras de error representan el error estándar. Los datos se analizaron con la prueba ANOVA de 1 factor seguido de la prueba post hoc de Tukey ($p < 0.001$). Barras de error representan el error estándar. N= 5 roedores por grupo.

La activación de las células granulares en los grupos expuestos a nado forzado o que no tuvieron ninguna exposición ambiental previa al sacrificio y que se alojaron en ambiente enriquecido o cajas estándar se analizó con la prueba ANOVA de 2 factores. Imágenes representativas se observan en la figura 20. No se encontró una interacción significativa entre la condición de alojamiento y la exposición a la tarea de nado forzado ($F(1,16) = 0.0136$, $p = 0.908$). Se observó que la condición de alojamiento no tiene un efecto significativo en la activación de las células granulares ($F(1,16) = 0.0396$, $p = 0.845$).

No se encontró diferencia en la expresión de Arc entre los grupos de alojamiento estándar y enriquecimiento que fueron expuestos a la tarea de nado forzado, así como tampoco en los grupos que fueron sacrificados directo de sus cajas.

Por otro lado, la condición de nado forzado mostró un efecto significativo en la expresión de la proteína Arc en las células granulares del giro dentado tanto en los grupos de alojamiento estándar como en los grupos de enriquecimiento ambiental ($F(1,16) = 20.342$, $p < 0.001$). El análisis post-hoc con la prueba de Tukey mostró un incremento significativo en los grupos expuestos a la tarea de nado forzado ($p < 0.001$) (CTR.= 9.61, AE/NF= 17.69, ENR/CTR= 9.036, ENR/NF= 17.54 ± 1.83) Se observó un aumento del 84 % y del 82.43 % en el número de células activadas en los roedores sometidos a la tarea de nado forzado que habitaron en alojamiento estándar o en ambiente enriquecido respectivamente (Fig. 21).

Fig.20

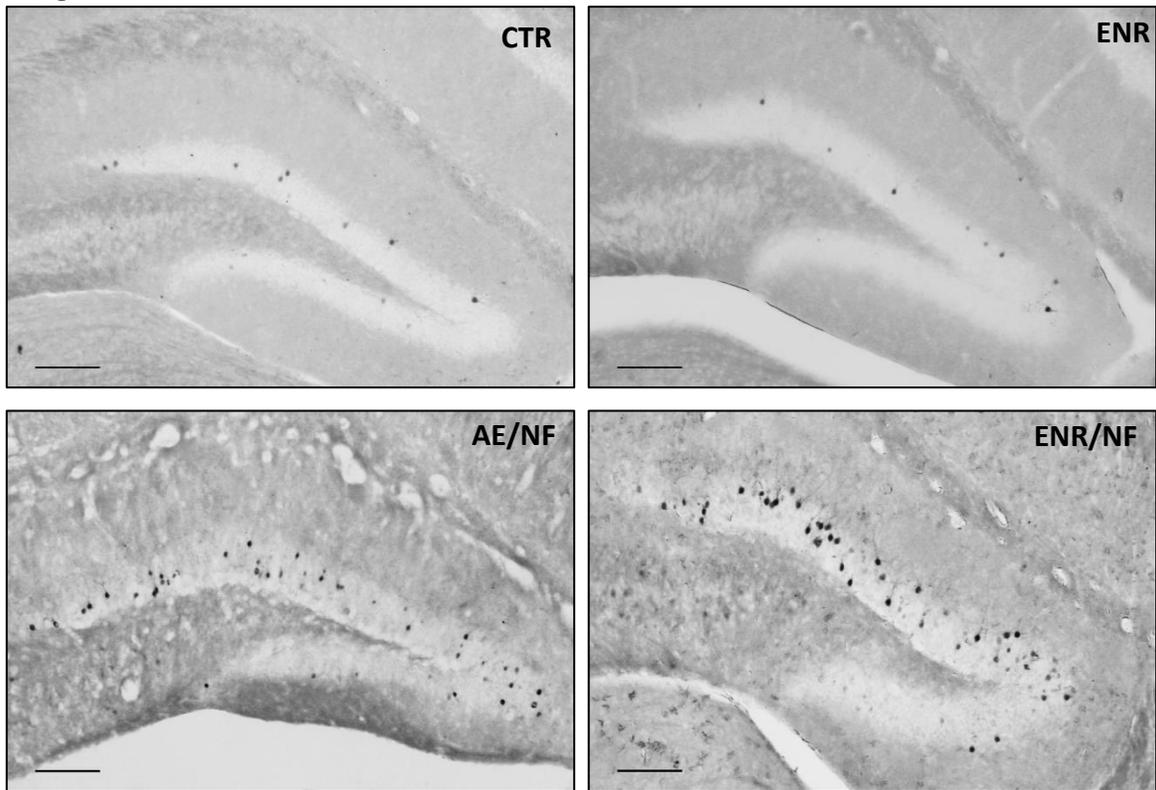


Fig. 20 Células granulares positivas a la proteína Arc en el giro dentado del hipocampo en roedores que habitaron en alojamiento estándar (AE) o en ambiente enriquecido (ENR) y que fueron expuestos a nado forzado (NF) o sacrificados directamente de su caja (CTR). Barra de escala= 150 μ m

Fig.21

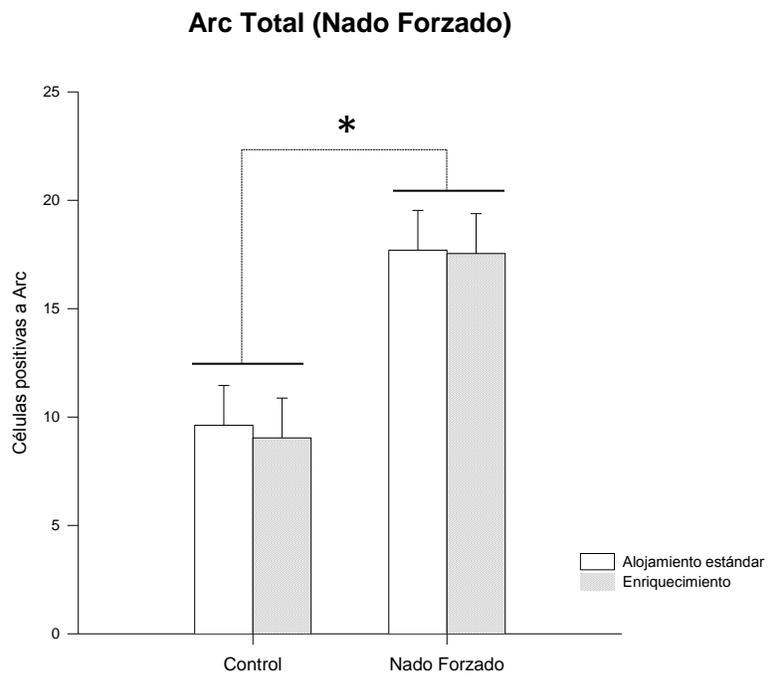


Fig. 21. Cuantificación de células granulares en el giro dentado que expresaron la proteína Arc en roedores expuestos a la prueba de nado forzado después de habitar en alojamiento estándar o en enriquecimiento ambiental. Los datos se analizaron con la prueba ANOVA de 2 factor seguido de la prueba post hoc de Tukey. Se encontraron diferencias significativas entre los grupos expuestos a nado forzado y los grupos control ($p < 0.001$). Barras de error representan el error estándar. $N = 5$ roedores por grupo.

Posteriormente, se analizó la expresión de la proteína Arc a lo largo del eje septotemporal del hipocampo en los diferentes grupos.

Se analizaron los datos de los grupos de exploración ambiental en el área dorsal y ventral a través de una ANOVA de 2 factores. No se encontró interacción significativa entre la exploración ambiental y el área del giro dentado donde se expresa la proteína Arc ($F(3,28) = 1.439$, $p = 0.253$). Sin embargo, existe un efecto significativo del área del hipocampo en el número de células granulares activadas ($F(1,28) = 73.325$, $p < 0.001$). También se observó un efecto significativo de la condición de exploración ambiental en la expresión de la proteína Arc en las células granulares ($F(3,28) = 18.732$, $p < 0.001$). La prueba post-hoc de Tukey reflejó que en todos los grupos se observó un mayor número de células positivas a Arc en el área dorsal del giro dentado ($p < 0.001$). Por otra parte el análisis de los datos en el área dorsal muestra un patrón activación de las células similar al observado en la cuantificación total. En la comparación del grupo A con el grupo control no se encontraron diferencias significativas ($p = 0.575$). En los grupos A-A y A-B se observó un aumento significativo del número de células que expresaron la proteína Arc en comparación al grupo control y al grupo A ($p < 0.001$). (CTR = 12.53 ± 1.60 , A = 15.46 ± 1.60 , A-A = 24.27 ± 1.79 , A-B = 25.90 ± 1.79). En el análisis del área ventral sólo se encontraron diferencias significativas en la comparación del grupo expuesto a dos ambientes diferentes (A-B) con el grupo control ($p = 0.008$) y con el grupo A ($p = 0.021$). La comparación del grupo A-A con el grupo control no mostró diferencias significativas ($p = 0.142$), así como tampoco con el grupo A ($p = 0.295$). No se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo A ($p = 0.969$). (CTR = 5.53 ± 1.60 , A = 6.55 ± 1.60 , A-A = 10.87 ± 1.79 , A-B = 14.01 ± 1.79). (Fig. 22).

Fig.22

Giro Dentado Dorsal vs Giro Dentado Ventral (Exploración Ambiental)

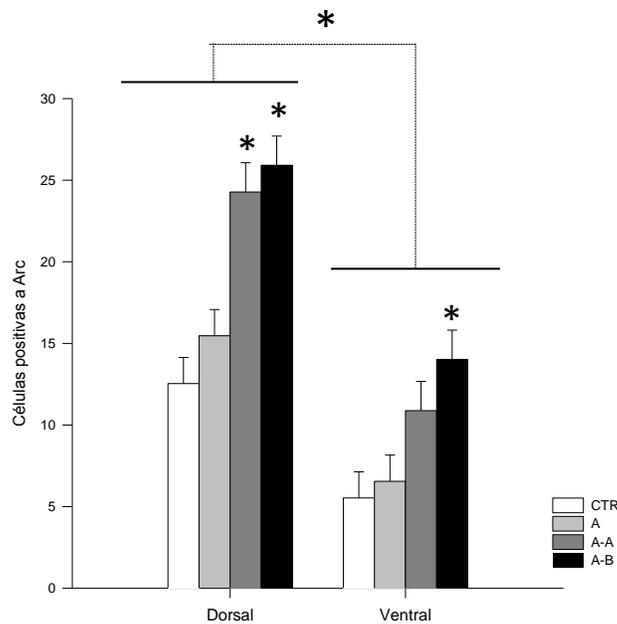


Fig. 22 Cuantificación de las células que expresaron la proteína Arc a lo largo del eje septotemporal del giro dentado en los grupos expuestos a exploración ambiental. Los datos se analizaron con la prueba ANOVA de 2 factor seguido de la prueba post hoc de Tukey. Barras de error representan el error estándar. N= 5 roedores por grupo.

El análisis de la activación celular a lo largo del eje septo-temporal del hipocampo de los grupos expuestos a nado forzado se hizo a través de la prueba ANOVAs de 2 factores separando los datos del área dorsal y los datos del área ventral. El análisis en el área dorsal no reveló interacción entre las condición de alojamiento y la condición de nado forzado ($F(1,16) = 0.254$, $p = 0.621$). De la misma manera el análisis en el área ventral no mostró interacción entre ambas variables ($F(1,16) = 1.906$, $p = 0.186$). Se encontró un efecto significativo de la condición de nado forzado tanto en el área dorsal ($F(1,16) = 11.718$, $p = 0.003$) como en el área ventral ($F(1,16) = 16.647$, $p < 0.001$). Por otro lado se observó que la condición de alojamiento no tiene un efecto sobre la expresión de la proteína Arc en el área dorsal ($F(1,16) = 0.0808$, $p = 0.780$) o en el área ventral ($F(1,16) = 0.376$, $p = 0.549$). Si los animales habían habitado en alojamiento estándar o en ambiente enriquecido no influyó significativamente en la expresión de la proteína Arc en los

grupos expuestos a nado forzado o los animales sacrificados directo de su caja. La prueba post-hoc de Tukey reflejó que la mayor activación que se observó, tanto en el área dorsal como en el área ventral, fue debido a la tarea de nado forzado ($CTR_{Dorsal}=12.53$, $AE/NF_{Dorsal}=20.59$, $ENR/CTR_{Dorsal}=10.35$, $ENR/NF_{Dorsal}=21.20$, $p=0.004$) (Fig. 23A). ($CTR_{Ventral}=5.53$, $AE/NF_{Ventral}=11.52$, $ENR/CTR_{Ventral}=6.3$, $ENR/NF_{Ventral}=9.33$, $p<0.001$) (Fig. 23B).

Fig.23

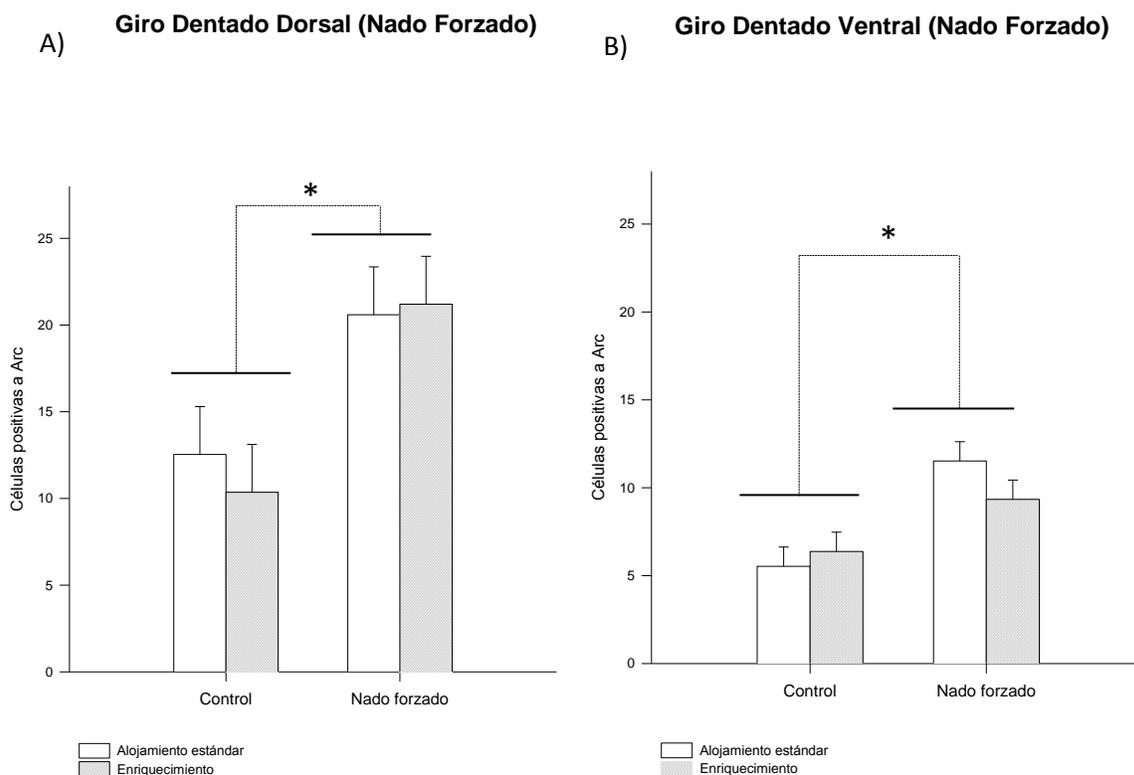


Fig. 23. Cuantificación a lo largo del eje septotemporal del giro dentado de la expresión de la proteína Arc en los grupos expuestos a nado forzado después de habitar en alojamiento estándar o en enriquecimiento ambiental. Los datos del giro dentado dorsal y del giro dentado ventral se analizaron por separado con la prueba ANOVA de 2 factor seguido de la prueba post hoc de Tukey. Se encontraron diferencias significativas entre los grupos expuestos a nado forzado y los grupos control en ambas regiones ($p < 0.001$). Barras de error representan el error estándar. $N=5$ roedores por grupo.

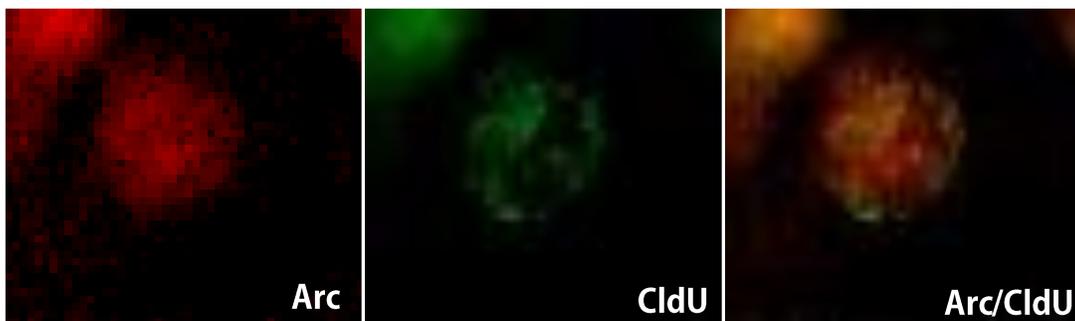
Porcentaje de activación de nuevas neuronas de 6 y 3 semanas de edad (CldU/Arc) y (IdU/Arc)

Posteriormente se hizo el análisis de las células de nueva generación, marcadas a 6 y 3 semanas de edad, que fueron activadas (expresión de la proteína Arc) debido a la exposición de las diferentes condiciones conductuales.

En el análisis de las células positivas a CldU se observó que éstas células de 6 semanas de edad, sólo se activaron cuando los roedores fueron expuestos a exploración ambiental, ya fuera la exposición a un ambiente o a dos. En la figura 24-A se pueden observar imágenes representativas de una células CldU⁺ que colocaliza con la proteína Arc. Se encontró un porcentaje de 2.53, 2.49 y 1.88 de células marcadas para CldU positivas para la proteína Arc, en los grupos A, A-A y A-B respectivamente. Sin embargo, en los grupos control y en los grupos expuestos a nado forzado no se encontró ninguna célula CldU⁺/Arc⁺ (Fig. 24-B).

Fig.24

A)



B)

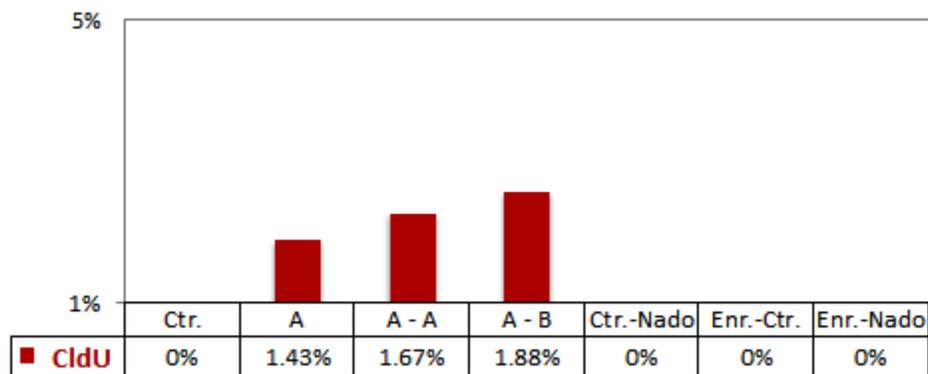


Fig. 24. Células CldU⁺/Arc⁺. A) Imágenes representativas de una célula de nueva generación de 6 semanas de edad co-marcada con la proteína Arc (marcador de activación) en animales expuestos a la tarea de exploración ambiental. B) Representación gráfica de la media del porcentaje de células CldU⁺/Arc⁺. Sólo se observó activación en los animales expuestos a exploración ambiental.

Por otro lado al analizar las células de 3 semanas de edad marcadas con el análogo de la timidina IdU, encontramos activación de éstas nuevas células sólo en el grupo alojado en ambiente enriquecido que fue expuesto a la tarea de nado

la figura 26 se pueden observar imágenes representativas de células DCX+, células Arc+ y la colocalización de ambos marcadores.

Fig.26

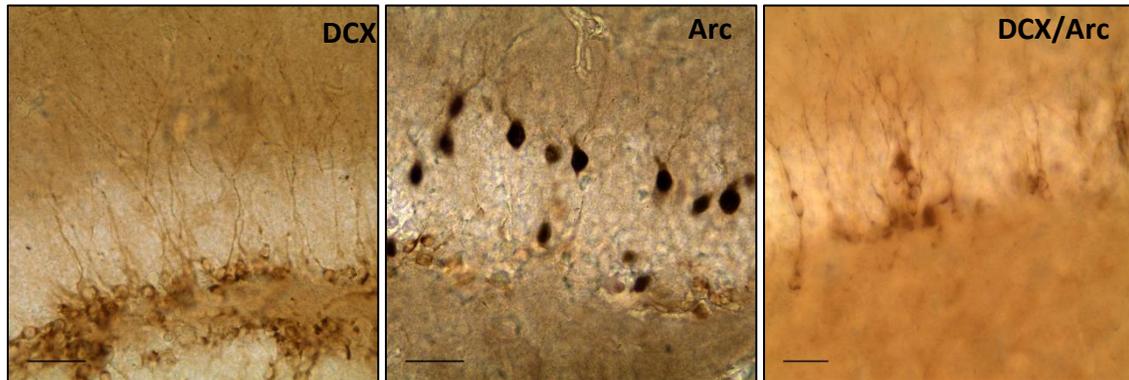


Fig.26. Expresión de la proteína Arc en neuronas inmaduras marcadas con la proteína DCX. Imágenes representativas de la doble tinción contra DCX y Arc. Se observan de izquierda a derecha; células positivas para DCX con dendritas llegando a la capa molecular y al menos dos nodos de bifurcación con una coloración café claro, células positivas para Arc con un soma de mayor tamaño y una coloración café oscuro , y células positivas DCX/Arc. Barra de escala= 30 μ m.

El análisis del número de células DCX+/Arc+ en los grupos de exploración ambiental se realizó a través del análisis de varianza de un factor en rangos con la prueba Kruskal-Wallis. No se encontraron diferencias significativas (Ctr.=11.96, A= 11.97, A-A=11.96, A-B=11.96, $p= 0.924$) (Fig. 27).

Fig.27

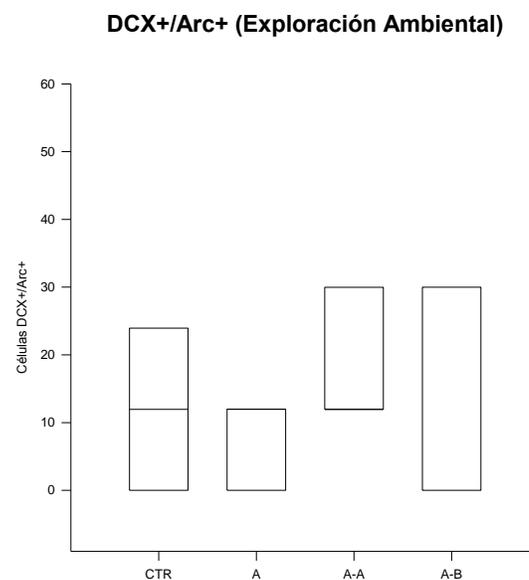


Fig.27 Cuantificación del número de células DCX+ que co-expresaron la proteína Arc en roedores expuestos a una o dos exploraciones ambientales. Los datos se analizaron con la prueba ANOVA de un factor. No se encontraron diferencias significativas ($p = 0.924$). $N= 5$ roedores por grupo.

El análisis de las células DCX+/Arc+ en los grupos sometidos a la prueba de nado forzado que fueron mantenidos en alojamiento estándar o en enriquecimiento ambiental se realizó a través de la prueba ANOVA de dos factores. El análisis no reveló interacción significativa entre la condición de alojamiento y la tarea de nado forzado ($F(1,16) = 1.451$, $p = 0.246$). No se encontraron diferencias significativas entre los grupos expuestos a nado forzado o aquellos sacrificados directo de sus cajas ($F(1,16) = 2.693$, $p = 0.120$). El análisis de la condición de alojamiento tampoco reflejó diferencias significativas en el número de células DCX+/Arc+ ($F(1,16) = 2.020$, $p = 0.174$). (Ctr.= 11.974, Ctr./NF=16.760, ENR./Ctr. = 14.351, ENR/NF= 45.545 \pm 10.962) (Fig. 28).

Fig.28

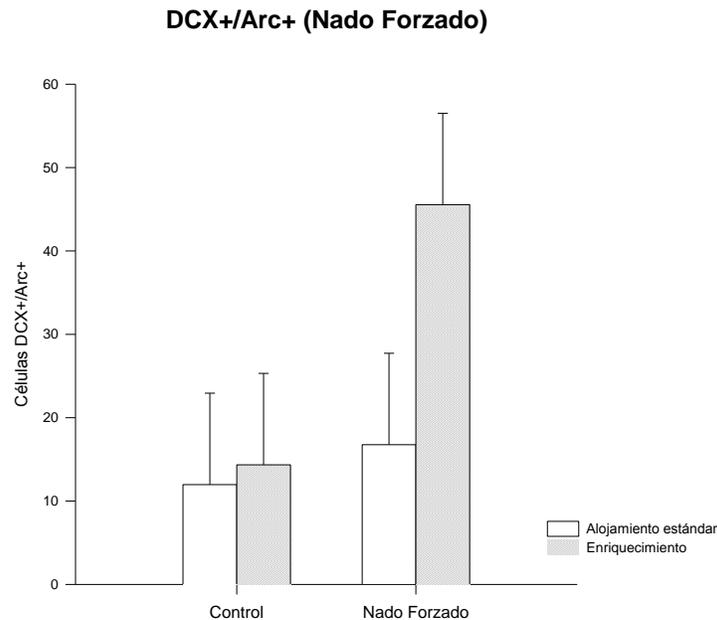


Fig. 28. Cuantificación del número de células DCX⁺ que expresaron la proteína Arc en roedores expuesto a la tarea de nado forzado que habitaron en alojamiento estándar o en enriquecimiento ambiental. Los datos se con la prueba ANOVA de 2 factor. No se encontraron diferencias significativas ($p=0.246$). Barras de error representan el error estándar. $N= 5$ roedores por grupo.

Análisis de prueba de nado forzado

Finalmente se analizó el tiempo de inmovilidad en la prueba de nado forzado en roedores que fueron alojados en ambiente enriquecido o en condiciones estándar. Este análisis se realizó a través de la prueba t de Student. Se encontró una disminución estadísticamente significativa en la inmovilidad en los grupos alojados en ambiente enriquecido ($t= 2.244$, $gl= 12$, $p= 0.044$) (Ctr./NF= 132.57 ± 18.36 , ENR./NF= 73.28 ± 18.99) (Fig. 29)

La disminución en el tiempo de inmovilidad observada en el grupo de enriquecimiento fue del 44.7%. Lo anterior refleja una disminución en la conducta de desesperanza en los animales que fueron alojados en ambientes enriquecidos.

Fig.29

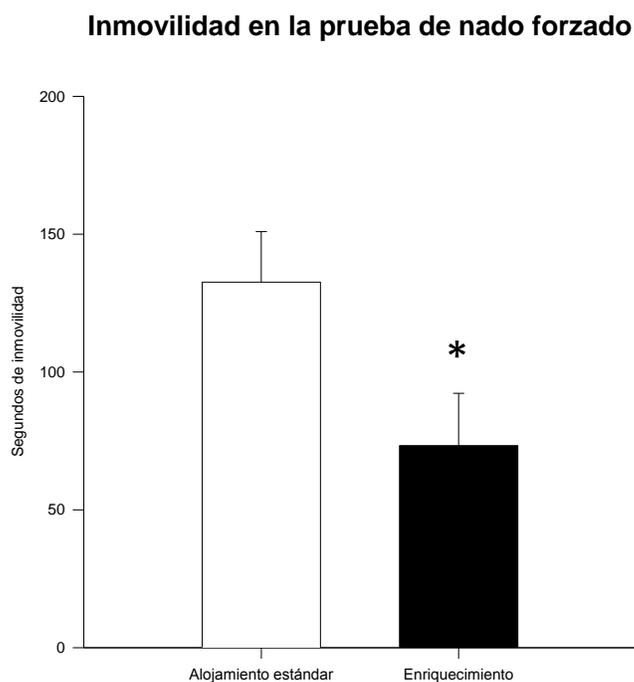


Fig. 29. Tiempo de inmovilidad en la prueba de nado forzado en animales de alojamiento estándar o ambiente enriquecido. Se observa una reducción en el tiempo de inmovilidad en los grupos alojados en ambiente enriquecido ($p = 0.044$). Barras de error representan error estándar. Los datos se analizaron con la prueba t de Student. N= 7 roedores por grupo.

DISCUSIÓN:

Expresión de la proteína Arc en las células granulares en el giro dentado del hipocampo debido a exploración ambiental y nado forzado

La exploración ambiental, en la que los roedores crean una representación de su ambiente, provoca la activación de circuitos neuronales en el hipocampo. El gen de expresión temprana Arc refleja la activación de las neuronas que se ven involucradas en dichos circuitos. En este sentido, al analizar la expresión de la proteína Arc causada por las exploraciones ambientales encontramos que la exploración de un sólo ambiente en ratones hembra de la cepa Balb-C no provocó un aumento significativo en la expresión de la proteína Arc. Estos datos contrastan con lo reportado en ratas machos, en los que la exposición a un ambiente de exploración produce un aumento significativo en la expresión de la proteína Arc en células del giro dentado comparadas con animales sacrificados directo de sus cajas (Ramírez-Amaya et al., 2005). Sin embargo nuestros resultados son similares a los reportados por Snyder y colaboradores que indican que la exposición de ratones macho a la tarea de laberinto de Morris después de un periodo de 42 días en alojamiento estándar no incrementó significativamente los niveles de la expresión de la proteína zif268 comparado con el grupo sacrificado directo de su caja (Snyder et al., 2012). Nuestro trabajo indica que en el giro dentado la exposición de un solo ambiente de exploración en ratones hembra no provoca un incremento significativo en la expresión de la proteína Arc comparado con animales que no fueron expuestos a ninguna experiencia, sin embargo la exposición a dos ambientes sean estos iguales o diferentes provocó un incremento significativo en la expresión de la proteína Arc.

Chawla y colaboradores (2005) y Marrone y colaboradores (2011) a través de la activación de dos genes de expresión temprana Arc y zif268 observaron que cuando ratas eran expuestas dos veces a la exploración del mismo ambiente el mismo ensamble de células se activaban, sin embargo cuando dos ambientes diferentes eran explorados una nueva población de células era activada en el segundo ambiente, lo anterior medido por la expresión del RNAm de Arc. En base a esto una hipótesis inicial de este trabajo fue que el número de células positivas a

la proteína Arc, cuando los animales eran expuestos dos veces al mismo ambiente no aumentaría en comparación al grupo de animales que estuvieron expuestos a un solo ambiente, dado que la mayor parte del grupo de células que se activó en el primer ambiente se activaría nuevamente cuando los animales fuesen expuestos al mismo ambiente. Por otro lado, esperábamos que cuando los animales eran expuestos a dos ambientes diferentes, los niveles de la proteína Arc aumentaran considerablemente ya que poblaciones diferentes de células se activarían en cada ambiente para codificar las nuevas características de este. Sin embargo, observamos que el número de células que expresaron la proteína Arc en el grupo expuesto dos veces al mismo ambiente aumentó considerablemente, alcanzando niveles muy similares a los del grupo de roedores expuestos a dos ambientes diferentes. Encontramos un aumento del 117.59 % en el grupo A-A en comparación al grupo control, en contraste el grupo A sólo hubo un aumento un 23.5 %. Por otro lado, el nivel de expresión que encontramos en A-A es muy similar al encontrado en el grupo A-B, un aumento del 129.42 % en comparación al grupo control. Las diferencias entre los trabajos antes mencionados y el nuestro pueden deberse a la metodología usada ya que en nuestro caso no podemos medir el grado en que células activas vuelven a activarse en un segundo ambiente. Sin embargo, la diferencia en el nivel de la proteína entre los grupos A-A y A-B y los grupos control y A podría indicarnos que la exposición a dos ambientes sin importar si son iguales o diferentes provoca la expresión de la proteína Arc en una nueva población de células debido a la exposición del segundo ambiente.

De igual manera que la exploración ambiental, la exposición a un evento estresante involucra la codificación de la memoria acerca de la situación, permitiendo al animal hacerle frente de una mejor manera si ésta se presenta nuevamente (Ons et al., 2004). Lo anterior implica que existe una activación neuronal de las regiones que se ven involucradas en el procesamiento de dicha información. Nuestros resultados indican que existe activación de las células del giro dentado, medido a través de la expresión de la proteína Arc, como resultado de la exposición de roedores a 6 minutos de nado forzado. El nado forzado es un

estresor de intensidad media que involucra un mayor nivel de actividad para el animal que una exploración ambiental.

La expresión de Arc está relacionada con la actividad neuronal específicamente asociada con la plasticidad sináptica y la memoria (Miyashita et al., 2009). Como muestran Nallor y colaboradores en 2012, los niveles de la expresión de Arc en las áreas CA1y CA3 del hipocampo no están correlacionadas con la actividad locomotora, sino con un procesamiento de la información que involucra plasticidad a largo plazo.

En nuestro estudio encontramos que los grupos sometidos a nado forzado cuyo alojamiento había sido estándar o en un ambiente enriquecido tenían un aumento significativo en el número de células que expresaron Arc, comparados con el grupo control. Recientemente Schoenfeld y colaboradores (2013) reportaron que ratones macho sedentarios c57BL/6, sometidos a nado forzado por 5 minutos, mostraron un incremento en la expresión de las proteínas c-Fos y Arc en la capa granular del giro dentado ventral. En este sentido Johnson y colaboradores encontraron que lesiones selectivas del giro dentado disminuyen la respuesta de corticoesterona a un estresor de novedad (Johnson et al., 1980), lo cual señala el involucramiento del giro dentado en el procesamiento de información referente a una situación estresante. En contraste a nuestros resultados Ons y colaboradores encontraron en el año 2004 que ratas macho después de 30 minutos de nado forzado o 30 minutos de inmovilización, un estresor fuerte, no mostraron un incremento significativo en los niveles de RNAm de Arc o del RNAm de c-fos en la formación hipocámpica en comparación al grupo control. Sin embargo, sí observaron un incremento significativo en los niveles de ambos IEGs después de 30 minutos de exploración ambiental en la formación hipocámpica, aumento especialmente marcado en el giro dentado. En otro estudio se reportó que ratas macho sometidas a un protocolo de inmovilidad por 2 horas, un estresor fuerte, mostraron un aumento significativo en la expresión de RNAm o de la proteína Arc en la corteza. Sin embargo, la medición en los subcampos del hipocampo no mostró diferencias en comparación al grupo control (Benekareddy et al., 2013).

El ambiente enriquecido aumenta la estimulación cognitiva, sensorial y motora y tiene una variedad de efectos positivos sobre la conducta y diferentes procesos moleculares y celulares. Muchos de estos cambios celulares son consistentes con alteraciones en la expresión de genes involucrados en la función de las sinapsis y la plasticidad sináptica, incluyendo por ejemplo el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), que tiene un papel integral en la señalización celular. El enriquecimiento, además induce alteraciones en la expresión de las subunidades de los receptores NMDA y AMPA, que son esenciales para la integración de señales glutamatérgicas, lo cual es consistente con que el enriquecimiento ambiental resulta en un incremento de la plasticidad sináptica (Nithianantharajah & Hannan, 2006). En este estudio no encontramos diferencias en la expresión de la proteína Arc en células granulares entre los grupos de alojamiento estándar y los grupos de ambiente enriquecido en respuesta a la tarea de nado forzado. Adicionalmente, el análisis de la expresión de Arc en los grupos sacrificados directo de sus cajas que habían habitado en alojamiento estándar o en ambiente enriquecido tampoco mostró diferencias significativas. Lo anterior nos indica que nuestro protocolo de ambiente enriquecido mantenido por 6 semanas no tuvo un efecto significativo en el número de células que expresaron la proteína Arc ya fuera en el nivel basal o en respuesta a la exposición de nado forzado. En relación a esto Pinaud y colaboradores reportaron que ratas macho sometidas durante tres semanas a un protocolo de ambiente enriquecido, mostraron un aumento significativo aunque moderado de la expresión de RNAm de Arc en el giro dentado, en comparación a animales sacrificados directo de sus cajas y animales que eran manipulados diariamente por 5 min. (Pinaud et al., 2001). Lo anterior podría indicarnos la existencia de habituación cognitiva al enriquecimiento ambiental que es mantenido constantemente por un tiempo largo. Sin embargo en este experimento logramos observar otros efectos positivos del ambiente enriquecido como es el aumento en la tasa de neurogénesis y la disminución en el tiempo de inmovilidad en ratones sometidos a nado forzado.

El análisis de la expresión de Arc a lo largo del eje septo-temporal del giro dentado reflejó que el aumento observado de la proteína en las diferentes condiciones

experimentales se dio mayormente en el área dorsal tanto en los grupos de exploración ambiental como en los grupos de nado forzado. Sin embargo, también se observó activación significativa en el área ventral principalmente en los grupos expuestos a nado forzado. En relación a esto, se ha reportado ampliamente la disociación funcional que sufre el hipocampo a lo largo de su eje septo-temporal. En general se piensa que el hipocampo dorsal está involucrado en procesos de memoria y aprendizaje, y se le ha dado al área ventral un papel en conductas con componentes emocionales (Fanselow & Dong, 2010; Thompson et al., 2008). Nuestro análisis refleja que tras dos exploraciones ambientales, en donde se produce una codificación del ambiente, la expresión de Arc se sitúa principalmente en el área dorsal, dichos resultados reflejan el involucramiento del área dorsal en la exploración espacial y la codificación del contexto. Previamente se ha reportado que en el área dorsal existe un mayor número de células de lugar, las cuales codifican las características del ambiente, comparadas con el área temporal (Jung et al., 1994). Al analizar el área ventral en la exposición a ambientes de exploración encontramos que solo el grupo que había explorado dos ambientes diferentes tuvo un aumento significativo en el número de células que expresaron Arc, comparado con los grupos restantes. No se observó aumento significativo en el número de células activadas en esta área en el grupo expuesto a dos ambientes iguales, incremento sí observado en el área dorsal. Lo anterior podría indicar una disminución en el involucramiento del área ventral en la codificación de los aspectos espaciales y cognitivos de la información.

El nado forzado es un paradigma de escape que se ha utilizado ampliamente para medir conductas tipo depresivas (Porsolt et al. 1977), así mismo es por si solo un estresor de intensidad moderada. Se ha reportado que tras la exposición a 5 minutos de nado forzado las concentraciones de corticoesterona en suero aumentan significativamente, alcanzando el punto máximo pasados 30 minutos de la exposición (Connor et al., 1997). La liberación de glucocorticoides en el sistema es la respuesta del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA) cuando se ve enfrentado a una situación estresante (Jankord & Herman 2008). Así mismo el área ventral del hipocampo está altamente relacionada a la regulación del eje HPA

y con la conducta que involucra componentes emocionales (Herman et al., 1998; Jankord & Herman 2008). Debido a lo anterior esperábamos una activación mayor en el área ventral debido a la exposición de los roedores al nado forzado, sin embargo nuestros resultados reflejan que en respuesta a la tarea de nado forzado la mayor activación en el giro dentado se da en el área dorsal. Lo anterior podría implicar que la expresión de Arc en la población total de células granulares en los grupos de nado forzado reflejaría muy fuertemente la codificación del ambiente. En este sentido Lonergan y colaboradores en el año 2010 reportaron que la expresión de Arc está vinculada más específicamente con la codificación del contexto. Al estudiar la expresión de las proteínas zif268 y Arc en la tarea de condicionamiento al miedo, los autores observaron que la expresión de Arc aumentó cuando ratas eran expuestas al aprendizaje del condicionamiento de miedo, así como cuando eran expuestas solamente al contexto sin el choque. Sin embargo, la entrega del choque no produjo un incremento significativo en Arc. Por otro lado, los niveles de zif268 aumentaron únicamente en el entrenamiento de la tarea, sin encontrar un incremento debido a la exposición únicamente del contexto, o en la entrega del choque (Lonergan et al., 2010).

Nuestros resultados, también reflejan un aumento significativo en el número de células activadas debido a la exposición del nado forzado en el área ventral. Adicionalmente se observa en el área ventral una disminución en el número de células activadas tras la exposición al nado forzado en roedores que fueron alojados en ambiente enriquecido. Esta disminución no es significativa, sin embargo es interesante que ésta disminución no se observe en el área dorsal. En este sentido Schoenfeld y colaboradores (2013) observaron que en ratones que habían tenido acceso a una rueda de correr no reflejaron incremento en los niveles de las proteínas c-Fos y Arc en la capa granular del giro dentado debido a la exposición a la prueba de nado forzado, aumento que sí se observó en ratones sedentarios. El ejercicio voluntario promueve de la misma manera que el ambiente enriquecido un conjunto de procesos moleculares y celulares involucrados con la plasticidad sináptica (Olson et al., 2006). Lo anterior podría indicarnos un mayor involucramiento del área ventral en tareas con componentes emocionales.

Expresión de la proteína Arc en las nuevas células granulares en el giro dentado del hipocampo debido a exploración ambiental y nado forzado

Las nuevas neuronas generadas en el hipocampo adulto son capaces de integrarse a los circuitos neuronales en ésta estructura, esto se ve reflejado por la activación de genes de expresión temprana altamente relacionados con plasticidad sináptica y la formación de memorias (Jessberger & Kempermann, 2003). Diferentes estudios han reportado la activación estos genes: c-fos, zif268 o Arc en respuesta a distintas tareas conductuales en las nuevas neuronas (Ramírez-Amaya et al., 2006; Kee et al., 2007; Clark et al., 2012). Nuestros resultados reflejan así mismo expresión de Arc en las nuevas neuronas del hipocampo. Sin embargo, la baja frecuencia de expresión de Arc en el giro dentado y una población muy pequeña de células marcadas por ambos análogos de la timidina en las inmunofluorescencias, no permitió observar un número suficiente de células Arc+/CldU+ y Arc+/IdU+ que posibilitara la comparación estadística. A pesar de eso, los resultados observados nos sugieren que existe una activación diferencial de las nuevas neuronas dependiente de la edad y del ambiente.

En el análisis de células de 6 semanas de edad encontramos en los tres grupos sometidos a exploración ambiental células de nueva generación que expresaron la proteína Arc en respuesta a la exploración, sin embargo en los grupos de nado forzado o los animales sacrificados directo de sus cajas no se encontraron células CldU⁺/Arc⁺. En el análisis de las células de 3 semanas de edad, no se encontraron células positivas al análogo de la timidina IdU que expresaran la proteína Arc en los grupos expuestos a exploración ambiental. Lo anterior confirma reportes previos en donde se observó que en respuesta a tareas que implican un aprendizaje espacial, el punto de expresión más alto de c-fos o Arc en las nuevas neuronas es en un periodo de mayor madurez (Kee et al., 2007; Sandoval et al., 2011).

Por otro lado, en nuestro estudio encontramos células de 3 semanas de edad que expresaron la proteína Arc únicamente en el grupo sometido a nado forzado que fue alojado en ambiente enriquecido. No encontramos células de 3 semanas de

edad activas en los grupos restantes. Debido al mayor número de células encontradas en los grupos de ambiente enriquecido, la activación observada en las células de 3 semanas de edad en el grupo de enriquecimiento-nado puede estar dada por una población más grande de células, sin embargo dicha activación no se encontró en el grupo enriquecimiento-control, así como tampoco se observó activación en los roedores expuestos a nado forzado que fueron alojados en ambiente enriquecido en las células de 6 semanas de edad. Nuestros resultados sugieren que las neuronas de 3 semanas de edad, neuronas en una etapa de madurez menor, tienen mayor probabilidad de ser activadas en una tarea que exija un mayor nivel de actividad, y que implique un nivel de estrés moderado para el animal. Surget y colaboradores en 2011 analizaron la expresión de c-fos en células de nueva generación de 4 semanas de edad. En su estudio ratones machos fueron sometidos a irradiación de rayos X previo a la exposición de un protocolo de estrés crónico, dos semanas después de iniciado el protocolo se les administró diariamente una dosis del antidepresivo fluoxetina (fármaco que tiene efectos positivos sobre la tasa de neurogénesis y la conducta tipo depresiva de roedores) o una solución vehículo. Finalmente los roedores fueron sometidos a infusiones intrahipocampales del agonista del receptor de glucocorticoides DEX o una solución vehículo y fueron expuestos a ambiente novedoso. Los autores reportan que no se encontraron diferencias entre el grupo control que no fue sometido a estrés y el grupo estrés-vehículo. Sin embargo en el grupo estrés-fluoxetina se encontró un aumento en el número de células positivas para c-fos/NeuN /Brdu, así como un incremento en el porcentaje de expresión de c-fos en células NeuN⁺/ Brdu⁺, en comparación con las células NeuN⁺/ Brdu⁺.

Contrario a nuestros resultados Snyder y colaboradores observaron que la exposición de ratas al laberinto de Morris indujo un incremento en el número de células PSA-NCAM⁺ (3-4 semanas de edad) que colocalizaron con c-fos, preponderantemente en el área ventral. La activación de estas nuevas neuronas no se observó cuando los animales fueron sometido a nado en la misma arena espacial, en la ausencia de la plataforma (Snyder et al., 2009). Por otra lado Stone y colaboradores reportaron que roedores expuestos a la tarea de

condicionamiento de miedo al contexto una semana después o seis semanas después de marcar células de nueva generación con el análogo de timidina BrdU, muestran durante el test de retención (cuatro semanas después del entrenamiento de la tarea) un incremento en el número de células de seis semanas de edad que expresaron la proteína c-fos (marcador de activación celular) en comparación a la células de 1 semana de edad. El condicionamiento de miedo al contexto es una tarea con componentes tanto emocionales como de procesamiento espacial. Los autores concluyen que las neuronas de nueva generación contribuyen la formación de memorias de condicionamiento de miedo por contexto y que su integración a las redes neuronales depende de su estado de maduración (Stone et al., 2011). Sin embargo, debido a que en el trabajo de Stone y colaboradores no se estudió la activación de neuronas mayores a una semana de edad no podemos descartar que neuronas en otros estados de maduración también estén involucradas en esta tarea.

En conjunto el análisis de la activación de las dos poblaciones de células de nueva generación marcadas en el mismo animal en nuestro estudio sugiere que la activación de estas nuevas neuronas depende de su edad y del ambiente. Mostrando las neuronas con mayor madures mayor probabilidad de ser activadas en una tarea que implica un aprendizaje espacial. Por otro lado las neuronas en una etapa de madures menor tendría mayor probabilidad de activación en tareas con un grado de actividad mayor y que implican un estrés moderado.

Aunado a lo anterior decidimos analizar la activación de las nuevas neuronas en una etapa de menor madurez a tres semanas de edad. Las células granulares inmaduras que empiezan un proceso de migración, de crecimiento dendrítico y de contacto con otras células expresan la proteína doblecortina (DCX) (Spampanato et al., 2012). Dicha proteína se expresa aproximadamente en las tres primeras semanas de vida de las nuevas neuronas (Plümpe et al., 2006). A través de un doble marcaje contra células DCX⁺ y Arc⁺ encontramos que células inmaduras DCX⁺ son capaces de expresar la proteína Arc, marcador de activación celular. Sin embargo, la exposición a las diferentes condiciones conductuales ya fueran forzado o exploración ambiental no produjo un incremento significativo en el

número de células DCX+/Arc+ en comparación a los animales que fueron sacrificados directo de sus cajas. Contrario a esto Vukovic y colaboradores mostraron en 2013 que roedores sometidos al aprendizaje de evitación activa de lugar mostraron un incremento significativo en el número de neuronas inmaduras positivas a DCX, que expresaron la proteína Arc en comparación al grupo que no fue sometido al aprendizaje. Sin embargo, es importante mencionar que de acuerdo a los criterios de análisis que seguimos, las células DCX⁺/Arc⁺ que fueron cuantificadas, fueron aquellas células DCX⁺ cuyos procesos dendríticos han alcanzado la capa molecular y que pueden tener dos o más nodos de bifurcación. En contraste Vukovic y colaboradores no discriminan en la población de células DCX⁺, en cuya población es posible encontrar células que se encuentran aún en estado de proliferación (Plümpe et al., 2006). Plümpe y colaboradores (2006) señalan que es en esta fase tardía de expresión de DCX, en la cual el árbol dendrítico muestra una arborización delicada y algunas ramificaciones mayores, cuando las nuevas células son seleccionadas para sobrevivir a largo plazo. Por otro lado Epp y colaboradores reportaron que ratas de la cepa Sprague–Dawley mostraron un incremento en el número de células DCX+ que expresaron la proteína zif268 debido al entrenamiento en el laberinto de Morris, sin embargo no encontraron una diferencia en el número de células DCX+/Arc+ en la cepa de ratas Long-Evans (Epp et al., 2011). De manera interesante en el grupo de exposición a un solo ambiente encontramos un número menor de células DCX+/Arc+ en comparación al grupo que fue sacrificado directo de su caja, sin que esta diferencia fuese significativa. En este sentido Snyder y colaboradores encontraron igualmente que la exposición de ratones macho al laberinto de Morris después de un periodo en alojamiento estándar provocó una disminución en las células DCX+ que expresaron zif268 comparado al grupo que no fue expuesto a ninguna condición (Snyder et al., 2012).

Al comparar la activación de estas neuronas inmaduras entre los grupo de nado forzado encontramos un aumento en el número de células DCX⁺ /Arc⁺ en el grupo de ambiente enriquecido-nado. Dicho aumento no fue significativo, sin embargo el

incremento encontrado podría indicar que una población más grande de células aumentaría la probabilidad de que más neuronas inmaduras sean activadas.

Análisis del tiempo de inmovilidad en la tarea de nado forzado

Previamente Llorens-Martín y colaboradores reportaron que ratones hembra alojados en ambientes enriquecidos sometidos a nado forzado muestran una reducción en el tiempo de inmovilidad en ésta tarea, así como un incremento en el número de células DCX⁺. No encontraron por otro lado un incremento en el número de células de 2 semanas de edad marcadas con BrdU, sin embargo los autores reportan una correlación negativa entre el número de células BrdU⁺, DCX⁺ y la inmovilidad en la prueba de nado forzado (Llorens-Martín et al., 2007). En este trabajo encontramos de igual manera una reducción en el tiempo de inmovilidad en los animales que fueron alojados en ambiente enriquecido, así como un aumento en el número de células CldU⁺, IdU⁺ y DCX⁺. Llorens-Martín y colaboradores señalan que el incremento en la tasa de neurogénesis producido por el alojamiento en ambiente enriquecido podría conferir a los animales neuroprotección en el desarrollo de la conducta de desesperanza en la tarea de nado forzado. Ellos señalan específicamente a las neuronas inmaduras como posibles responsables de este proceso. En este sentido se ha reportado una asociación entre la disminución de células inmaduras y la existencia de una conducta de desesperanza en la prueba de nado forzado en animales con alteración de la tiroides (Montero-Pedrazuela et al., 2006). Adicionalmente, se ha reportado que las nuevas neuronas del giro dentado ejercen una regulación negativa sobre el eje HPA. Estudios donde se elimina el proceso neurogénico en roedores muestran un incremento en la respuesta de glucocorticoides después de la exposición a una situación estresante (Schloesser et al., 2009; Snyder et al., 2011). De manera interesante, nuestros resultados podrían sugerir de la misma forma, que las nuevas neuronas específicamente las de menor madurez podrían estar involucradas en el afrontamiento de una situación estresante. Nuestros datos reflejan que las nuevas células del giro dentado de roedores alojados en ambiente enriquecido que fueron sometidos a nado forzado muestran una mayor

probabilidad de activación en una edad de 3 semanas. Así mismo se observó una población más grande de células DCX+ que expresaron Arc en éste grupo, aunque dicho aumento en la población no fue significativo.

Previamente se ha reportado que lesiones selectivas del giro dentado disminuyen la respuesta de corticoesterona a un estresor (Johnson et al. 1980). Sin embargo, de manera interesante en nuestro estudio la activación de la población general de células granulares en el giro dentado en la exposición al nado forzado en los animales de ambiente enriquecido no reflejó la disminución en el tiempo de inmovilidad observado en estos animales. Dicha activación en las células granulares maduras podría estar asociada más fuertemente a la codificación del contexto. El análisis de las neuronas de 6 semanas de edad en nuestro trabajo apoya esta hipótesis, ya que nuestros resultados sugieren que estas neuronas con un nivel de maduración mayor se activan preferencialmente en una tarea de exploración ambiental. En este sentido, las características de las nuevas neuronas son muy importantes ya que es en el periodo de inmadurez de las nuevas neuronas cuando éstas muestran características de mayor plasticidad (Aasebø et al., 2011), lo que podría conferirles características específicas para un reclutamiento preferencial en tareas con componentes emocionales y un nivel mayor de estrés como es el nado forzado. Por otro lado las nuevas neuronas en un estado de maduración mayor se verían involucradas en tarea que involucren una codificación de las pistas del ambiente y del contexto.

CONCLUSIONES

La exposición a dos ambientes de exploración espacial, fueran los ambientes iguales o diferentes, y la exposición a una situación ambiental con un nivel moderado de estrés en la prueba de nado forzado provocó un aumento significativo en la activación de las células granulares del giro dentado. Esto indica el involucramiento de esta estructura en diferentes tareas conductuales con componente cognitivos y emocionales. Se observó que la activación en el giro dentado se encuentra principalmente en el área dorsal en las diferentes condiciones ambientales, sugiriendo que la expresión de Arc en la población total de células granulares podría estar más asociada a la codificación de componentes cognitivos y de información espacial. La condición de alojamiento en los roedores sometidos a nado forzado no influyó de manera positiva en la activación de las células granulares. Sin embargo, se observó una disminución en el tiempo de inmovilidad en la prueba de nado forzado en los roedores que fueron alojados en ambiente enriquecido, así como un aumento en el número de células de seis y tres semanas de edad y en células en un estadio de maduración menor que expresan la proteína doblecortina (DCX). Lo anterior indica que las células de nueva generación podrían tener un papel diferente al de la población de células granulares maduras en el involucramiento del giro dentado en situaciones con un nivel moderado de estrés. Aunado a esto, nuestros resultados sugieren que las neuronas con una maduración menor tienen más probabilidad de ser activadas en situaciones con componentes emocionales y de mayor exigencia para el animal, en comparación con las nuevas neuronas de mayor maduración que se activan principalmente en tarea con componentes cognitivos.

REFERENCIAS

- Aasebø, E.J., Blankvoort, S. & Tashiro, A. (2011). Critical maturational period of new neurons in adult dentate gyrus for their involvement in memory formation. *European Journal of Neuroscience*, 33, 1094-1100.
- Aimone, B.J., Wiles, J. & Gage, H.F. (2006). Potential role for adult neurogenesis in the encoding of time in new memories. *Nature Neuroscience*, 9 (6), 723-727.
- Aimone, B.J., Deng, W. & Gage, H.F. (2010). Adult neurogenesis: integrating theories and separating functions. *Trends in Cognitive Sciences*, 14(7), 325–337.
- Altman, J. & Das, G.D. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *The Journal of Comparative Neurology*, 124 (3), 319-335.
- Alvarez-Buylla, A. & Garcia-Verdugo, J.M. (2002), Neurogenesis in adult subventricular zone. *The Journal of Neuroscience*, 22(3), 629-634.
- Alvarez-Buylla, A. & Garcia-Verdugo, J.M. & Tramontin, A.D. (2001). A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nature Reviews. Neuroscience*, 2(4), 287-293.
- Amaral, D. & Lavenex, P. (2007), Hippocampal neuroanatomy. En Andersen, P., Morris, R., Amaral, D., Bliss, T. & O'keefe J. (Ed.), *The Hippocampus Book*, (37-114), New York, Oxford University Press.
- Amaral, G.D., Scharfman, E.H. & Lavenex, P. (2007). The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Progress in Brain Research*, 163, 3-22.
- Bannerman, D.M., Grubb, M., Deacon, R.M., Yee, B. K., Feldon, J., & Rawlins, J. N. (2002). Ventral hippocampal lesions affect anxiety but not spatial learning. *Behavioural Brain Research*, 139 (1-2), 197–213.
- Bannerman D.M., Rawlins J.N., McHugh S.B., Deacon, R.M. Yee. B.K., Bast, T., Zhang, W.N., Pothuizen H.H. & Feldon, J. (2004), Regional dissociations within the hippocampus—memory and anxiety. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 28(3), 273–283.
- Belz, E.E., Kennell, J.S., Czambel, R.K., Rubin, R.T. & Rhodes, M.E. (2003), Environmental enrichment lowers stress-responsive hormones in singly housed male and female rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 76(3-4), 481– 486.
- Benekareddy, M., Nair, A.R., Dias, B.G., Suri, D., Autry, A.E., Monteggia, L.M. & Vaidya, V.A. (2013). Induction of the plasticity-associated immediate early gene arc by stress and hallucinogens: role of brain-derived neurotrophic factor. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 16(2), 405-415.
- Bernie, P.J, Bedard, A, Vinet, J, Lévesque, M. & Parent, A. (2002). Newly generated neurons in the amygdala and adjoining cortex of adult primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(17), 11464–11469.

- Berumen, L.C., Rodriguez, A., Miledi, R. & Garcia-Alcoert, G. (2012). Serotonin receptors in hippocampus. *The Scientific World Journal*, 2012 (823493)
- von Bohlen, & Halbach, O. (2007). Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus. *Cell and Tissue Research*, 329(3), 409-420.
- Boldrini, M., Underwood, M.D., Hen, R., Rosoklija, G.B., Dwork, A.J., Mann, J.J. & Arango, V. (2009), Antidepressants increase neural progenitor cells in the human hippocampus. *Neuropsychopharmacology*, 34(11), 2376-2389.
- Bordey, A. (2006). Adult neurogenesis: basic concepts of signaling. *Cell Cycle*, 5(7), 722-728.
- Bramham, C.R., Alme, M.N., Bittins, M., Kuipers, S.D., Nair, R.R., Pai, B., Panja, D., Schubert, M., Soule, J., Tiron, A. & Wibrand, K. (2010). The Arc of synaptic memory. *Experimental Brain Research*, 200(2), 125–140.
- Bramham, C.R., Worley, P.F., Moore, M.J. & Guzowski, J.G. (2008). The immediate early gene arc/arg3.1: regulation, mechanisms, and function. *The Journal of Neuroscience*, 28(46), 11760-11767.
- Brenes, J.C., Rodriguez, O. & Fornaguera, J. (2006). Factor analysis of forced swimming test, sucrose preference test and open field test on enriched, social and isolated reared rats. *Behavioural Brain Research*, 169, 57-65.
- Cameron, H.A. & McKay, R.D. (2001). Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *The Journal of Comparative Neurology*, 435(4), 406-17.
- Chawla, M.K., Guzowski, J.F., Ramirez-Amaya, V., Lipa, P., Hoffman, K.L., Marriott, L.K., Worley, P.F., McNaughton, B.L., Barnes, C.A. (2005). Sparse, environmentally selective expression of Arc RNA in the upper blade of the fascia dentata by brief spatial experience. *Hippocampus*, 15(5), 579-586.
- Clark, P.J., Bhattacharya T.K., Miller, D.S., Kohman, R.A., DeYoung, E.K., Rhodes, J.S. (2012). New neurons generated from running are broadly recruited into neuronal activation associated with three different hippocampus-involved tasks. *Hippocampus*, 22(9), 1860-1867.
- Clelland, C.D., Choi, M., Romberg, C., Clemenson, G.D. Jr., Fagniere, A., Tyers, P., Jessberger, S., Saksida, L.M., Barker, R.A., Gage, F.H. & Bussey, T.J. (2009). A functional role for adult hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation. *Science*, 325(5937), 210-213.
- Colucci –D' Amato, L., Bonavita, V. & di Porzio, U.(2006). The end of the central dogma of the neurobiology: stem cells and neurogenesis in adult CNS, *Neurological Sciences*, 27(4), 266-270.
- Connor, T.J., Kelly, J.P., & Leonard B.E. (1997). Forced swim test-induced neurochemical, endocrine, and immune changes in the rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 58 (4), 961–967.
- Drapeau, E., Mayo, W., Aourousseau, C., Moal, M., Piazza, P.V. & Abrous, D.N. (2003). Spatial memory performances of aged rats in the water maze predict levels of hippocampal neurogenesis. *Proceedings of the National*

Academy of Sciences of the United States of America, 100(24), 14385–14390.

- Deng, W., Aimone, J.B. & Gage, F.H. (2010), New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nature Reviews Neuroscience*, 11(5), 339-50.
- Dedovic, K., Duchesne, A., Andrews, J., Engert, V. & Pruessner, J.C. (2009). The brain and the stress axis: the neural correlates of cortisol regulation in response to stress. *NeuroImage*, 47(3), 864-871.
- Dranovski A. & Leonardo E.D. (2012), Is there a role for young hippocampal neurons in adaptation to stress? *Behavioural Brain Research*, 227(2), 371–375. doi: 10.1016/j.bbr.2011.05.007.
- Dunn, J.D. & Orr, S.E. (1984). Differential plasma corticosterone responses to hippocampal stimulation. *Experimental Brain Research*, 54, 1–6.
- Eichenbaum, H. (2004). Hippocampus: cognitive processes and neural representation that underlie declarative memory formation: a review of anatomical data. *Neuron*, 44(1), 109–120.
- Epp, J.R., Scott, N.A. & Galea, L.A. (2011). Strain differences in neurogenesis and activation of new neurons in the dentate gyrus in response to spatial learning, *Neuroscience*, 172, 342–354.
- Eriksson, P.S., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, A.M., Nordborg, C., Peterson, D.A. & Gage, F.H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature Medicine*, 4, 1313-1317.
- Esposito M.S., Piatti, V.C., Laplagne, D.A., Morgenstern, N.A., Ferrari, C.C., Pitossi, F.J. & Schinder, A.F. (2005). Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. *The Journal of Neuroscience*, 25(44), 10074-10086.
- Fanselow, M.S. & Dong, H.W. (2010). Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures?. *Neuron*, 65(1), 7-19.
- Fowler, C.D., Freeman, M.E. & Wang, Z. (2003). Newly proliferated cells in the adult male amygdala are affected by gonadal steroid hormones. *Journal of Neurobiology*, 57(3), 257–269.
- Garthe A., Behr, J., Kempermann, G. (2009). Adult-generated hippocampal neurons allow the flexible use of spatially precise learning strategies. *PLoS ONE* 4(5): e5464.
- Ge, S., Goh, E.L., Sailor, K.A., Kitabatake, Y., Ming, G.L. & Song, H. (2006). GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature*, 439(7076), 589–593.
- Ge S., Yang, C.H., Hsu, K.S., Ming, G.L., & Song, H. (2007). A critical period for enhanced synaptic plasticity in newly generated neurons of the adult brain. *Neuron*, 54 (4), 559–566.
- Gluck M.A. & Myers C.E. (2001). Gateway to memory: an introduction to neural network modeling of the hippocampus and learning, Massachusetts, MIT Press Cambridge.
- Goldman S.A. & Nottebohm F. (1983). Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 80, 2390–2394.

- Gould, E., Beylin, A., Tanapat, P., Reeves, A. & Shors, T.J. (1999). Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nature Neuroscience*, 2(3), 260 – 265.
- Gould, E., Reeves, A.J., Graziano, M.S & Gross, C.G. (1999). Neurogenesis in the neocortex of adult primates. *Science*, 286(5439), 548–552.
- Guzowski, J.F., McNaughton, B.L., Barnes, C.A., Worley, P.F. (1999). Environment-specific expression of the immediate-early gene arc in hippocampal neuronal ensembles. *Nature Neuroscience*, 2(12), 1120–1124.
- Gross C.G. (2000). Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. *Nature Reviews Neuroscience*, 1(1), 67-73.
- Herman, J. P., Cullinan, W.E., Young, E.A., Aki, H. & Watson, S.J. (1992). Selective forebrain fiber tract lesions implicate ventral hippocampal structures in tonic regulation of paraventricular nucleus corticotropin-releasing hormone (CRH) and arginine vasopressin (AVP) mRNA expression. *Brain Research*, 592(1-2), 228-238.
- Herman, J.P., Dolgas, C.M. & Carlson, S.L. (1998). Ventral Subiculum Regulates Hypothalamo–Pituitary–Adrenocortical and Behavioural Responses To Cognitive Stressors. *Neuroscience*, 86(2), 449–459.
- Jankord R. & Herman J.P. (2008). Limbic regulation of hypothalamo-pituitary-adrenocortical function during acute and chronic stress limbic regulation of hypothalamo-pituitary-adrenocortical function during acute and chronic stress. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1148, 64-73.
- Jessberger, S. & Kempermann G. (2003). Adult-born hippocampal neurons mature into activity-dependent responsiveness. *European Journal of Neuroscience*, 18(10), 2707-2712.
- Johnson, L.L. & Moberg, G.P. (1980). Adrenocortical response to novelty stress in rats with dentate gyrus lesions. *Neuroendocrinology*, 30(3),187–192.
- Jung, M.W., Wiener, S.I., & McNaughton, B.L. (1994). Comparison of spatial firing characteristics of units in dorsal and ventral hippocampus of the rat. *The Journal of Neuroscience*, 14(12), 7347-7356.
- Kaplan, M.S. & Hinds, J.W. (1977), Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science*, 197(4308), 1092-1094.
- Kaplan, M.S., Bell, D.H. (1983). Neuronal proliferation in the 9-month-old rodent-radioautographic study of granule cells in the hippocampus. *Experimental Brain Research*, 52(1), 1-5.
- Kee, N., Teixeira, C.M., Wang, A.H. & Frankland, P.W. (2007). Preferential incorporation of adult generated granule cells into spatial memory networks in the dentate gyrus. *Nature Neuroscience*, 10(3), 355-362.
- Kempermann, G., Jessberger, S., Steiner, B., & Kronenberg, G. (2004). Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends in Neurosciences*, 27(8), 447-452.

- Kempermann, G., Gast, D., Kronenberg, G., Yamaguchi, M. & Gage, F.H. (2003). Early determination and long-term persistence of adult generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development*, 130(2), 391–399.
- Kempermann, G., Kuhn, H.G. & Gage, F.H. (1997). More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*, 386(6624), 493 – 495.
- Kjelstrup, K.G., Tuvnes, F.A., Steffenach, H.A., Murison, R., Moser, E.I., & Moser, M.B. (2002). Reduced fear expression after lesions of the ventral hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(16), 10825–10830.
- Koehl, M. & Abrous. D.N. (2011). A new chapter in the field of memory: adult hippocampal neurogenesis. *European Journal of Neuroscience*, 33(6), 1101-1114.
- Korb, E. & Finkbeiner S. (2011). Arc in synaptic plasticity: from gene to behavior. *Trends in Neuroscience*, 34(11), 591-598.
- Kuhn, H.G., Dickinson-Anson, H. & Gage, F.H. (1996). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neural progenitor proliferation. *The Journal of Neuroscience*, 16(6), 2027-2033.
- Kryukov, V.I. (2008), The role of the hippocampus in long-term memory: is it memory store or comparator? *Journal of Integrative Neuroscience*, 7(1), 117-84.
- Lee, L. & Solivan, F. (2010). Dentate gyrus is necessary for disambiguating similar object-place representations. *Learning & Memory*, 17(5), 252–258.
- Leranth, C. & Hajszan, T. (2007). Extrinsic afferent systems to the dentate gyrus. *Progress in Brain Research*, 163, 63–84.
- Leuner, B. & Gould, E. (2010). Structural plasticity and hippocampal function. *Annual Review of Psychology*, 61, 111-140.
- Leutgeb, J.K., Leutgeb, S., Moser, M.B. & Moser, E.I. (2007), Pattern separation in the dentate gyrus and ca3 of the hippocampus. *Science*, 315(5814), 961-966.
- Llorens-Martín, M.V., Rueda, N., Martínez-Cué, C. Torres-Alemán, I., Flórez, J. & Trejo, J.L. (2007). Both increases in immature dentate neurons numbers and decreases of immobility time in the forced swim test occurred in parallel after environmental enrichment of mice. *Neuroscience*, 147(3), 631-638.
- Llorens-Martín, M., Tejeda, G.S. & Trejo, J.L. (2011), Antidepressant and proneurogenic influence of environmental enrichment in mice: protective effects vs recovery. *Neuropsychopharmacology*, 36(12), 2460–2468.
- Lonergan, M.E., Gafford, G.M., Jarome, J.T. & Helmstetter, F.J. (2010). Time-dependent expression of arc and zif268 after acquisition of fear conditioning. *Neural Plasticity*, 2010, 139891. doi: 10.1155/2010/139891
- Marrone, D.F., Adams, A.A. & Satvat, E. (2011). Increased pattern separation in the aged fascia dentate. *Neurobiology of Aging*, 32(12), 23-32.
- Ming, G.L. & Song, H. (2005). Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annual Review of Neuroscience*, 28, 223-50.

- Miyashita, T., Kubik, S., Lewandowski, G. & Guzowski, J.F. (2008). Networks of neurons, networks of genes: an integrated view of memory consolidation. *Neurobiology of Learning and Memory*, 89(3), 269–284.
- Miyashita, T., Kubik, S., Haghghi, N., Steward, O. & Guzowski, J.F. (2009). Rapid activation of plasticity-associated gene transcription in hippocampal neurons provides a mechanism for encoding of one-trial experience. *The Journal of Neuroscience*, 29 (4), 898-906.
- Montero-Pedrazuela, A., Venero, C., Lavado-Autric, R., Fernández-Lamo, I., García-Verdugo, J.M., Bernal, J. & Guadaño-Ferraz, A. (2006). Modulation of adult hippocampal neurogenesis by thyroid hormones: implications in depressive-like behaviour. *Molecular Psychiatry*, 11(4), 361–371.
- Morrens, J., Van Den Broeck, W. & Kempermann, G. (2012). Glial cells in adult neurogenesis. *Glia*, 60(2), 159-74.
- Morris, R. (2007), Theories of Hippocampal Function. En Andersen, P., Morris, R., Amaral, D., Bliss, T. & O'keefe, J. *The Hippocampus Book*, (581-713), New York, Oxford University Press.
- Moser, I., Kropff, E., & Moser, M.B. (2008). Place cells, grid cells, and the brain's spatial representation system. *Annual Review of Neuroscience*, 31, 69-89.
- Moser, M.B., Moser, E.I., Forrest, E., et al., (1995), Spatial learning with a minilab in the dorsal hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 9697–9701.
- Mulders, W.H., West, M.J. & Slomianka, L. (1997). Neuron numbers in the presubiculum, parasubiculum, and entorhinal area of the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 385(1), 83–94.
- Nalloor, R., Bunting, K.M. & Vazdarjanova, A. (2012). Encoding of emotion-paired spatial stimuli in the rodent hippocampus. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 6(27).
- Nithianantharajah, J. & Hannan, A.J. (2006). Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(9), 697-709.
- Nottebohm, F. (1985). Neuronal replacement in adulthood. *Annals of the New York Academy of Science*, 457, 143-161.
- O'Keefe, J. & Dostrovsky, J. (1971). The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Research*, 34(1), 171–175.
- Olson, A.K., Eadie, A.D., Ernst, C. & Christie, B.R. (2006). Environmental enrichment and voluntary exercise massively increase neurogenesis in the adult hippocampus via dissociable pathways. *Hippocampus*, 16(3), 250–260.
- Ons, S., Martí, O. & Armario, A. (2004). Stress-induced activation of the immediate early gene arc (activity-regulated cytoskeleton-associated protein) is restricted to telencephalic areas in the rat brain: relationship to c-fos mRNA. *Journal of Neurochemistry*, 89(5), 1111–1118.
- Paez-Martinez, N., Flores-Serrano, Z., Ortiz-Lopez, L. & Ramirez-Rodriguez, G. (2013). Environmental enrichment increases doublecortin-

associated new neurons and decreases neuronal death without modifying anxiety-like behavior in mice chronically exposed to toluene. *Behavioural Brain Research*, 256, 432-40.

- Paton, J.A. & Nottebohm, F.N. (1984). Neurons generated in the adult brain are recruited into functional circuits. *Science*, 225(4666), 1046-1048.
- Pinaud, R., Penner, M.R., Robertson, H.A. & Currie, R.W. (2001). Upregulation of the immediate early gene arc in the brains of rats exposed to environmental enrichment implications for molecular plasticity. *Molecular Brain Research*, 91(1-2), 50-56.
- Plümpe, T., Ehninger, D., Steiner, B., Klempin, F., Jessberger, D., Brandt, M., Römer, B., Rodriguez, G.R., Kronenberg, G. & Kempermann, G. (2006). Variability of doublecortin-associated dendrite maturation in adult hippocampal neurogenesis is independent of the regulation of precursor cell proliferation. *BMC Neuroscience*, 7, 77.
- Porsolt, R.D., Bertin, A. & Jalfre, M. (1977). Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Archives Internationales Pharmacodynamie et de Thérapie*, 229(2), 327-36.
- Pothuizen, H.H., Zhang, W.N., Jongen-Re[^]lo, A.L., Feldon, J. & Yee, B.K. (2004). Dissociation of function between the dorsal and the ventral hippocampus in spatial learning abilities of the rat: a within-subject, within-task comparison of reference and working spatial memory. *The European Journal of Neuroscience*, 19(3), 705–712.
- van Praag H., Kempermann, G. & Gage, F.H. (2000). Neural consequences of environmental enrichment. *Nature Reviews Neuroscience*, 1(3), 191-8.
- Pruessner, J.C., Baldwin, M.W., Dedovic, K., Renwick, R., Mahani, N.K., Lord, C., Meaney, M. & Lupien, S. (2005). Self-esteem, locus of control, hippocampal volume, and cortisol regulation in young and old adulthood. *NeuroImage*, 28(4), 815–826.
- Radley, J.J. (2012). Toward a limbic cortical inhibitory network: implications for hypothalamic-pituitary-adrenal responses following chronic stress. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 6(7), 1-10.
- Ramírez-Amaya, V., Vazdarjanova, A., Mikhael, D., Rosi, S., Worley, P.F. & Barnes, C.A. (2005). Spatial exploration-induced arc mRNA and protein expression: evidence for selective, network-specific reactivation. *The Journal of Neuroscience*, 25(7), 1761–1768.
- Ramírez-Amaya V., Marrone, D.F., Gage, F.H., Worley, P.F. & Barnes, C.A. (2006). Integration of new neurons into functional neural networks. *The Journal of Neuroscience*, 26(47), 12237-12241.
- Ramírez-Rodríguez, G., Benítez-King, Gloria. & Kempermann, G. (2007). Formación de nuevas neuronas en el hipocampo adulto: neurogénesis. *Salud Mental*, 30(3).
- Ramirez-Rodriguez, G., Klempin, f., Babu, H., Benítez-King, G. & Kempermann, G. (2009). Melatonin modulates cell survival of new neurons in the hippocampus of adult mice. *Neuropsychopharmacology*, 34(9), 2180–2191.

- Ramirez-Rodriguez, G., Ocaña-Fernández, M.A., Vega-Rivera N.M., Torres-Pérez, O.M., Gómez-Sánchez, A., Estrada-Camarena, E. & Ortiz-López, L. (2014). Environmental enrichment induces neuroplastic changes in middle age female balbc mice and increases the hippocampal levels of BDNF, p-AKT and p-MAPK1/2. *Neuroscience*, 260, 158–170.
- Rapp, P.R. & Gallagher, M. (1996). Preserved neuron number in the hippocampus of aged rats with spatial learning deficits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(18), 9926–30.
- Riquelme, P.A., Drapeau, E. & Doetsch, F. (2008). Brain micro-ecologies: neural stem cell niches in the adult mammalian brain. *Philosophical Transactions of Royal Society of London*, 363(1489), 123-137.
- Rubin, R.T., Mandell, A.J. & Crandall, P.H. (1966). Corticosteroid responses to limbic stimulation in man: localization of stimulation sites. *Science*, 153(3737), 767-768.
- Sahay, A., Scobie, K.N., Hill, A.S., O’Carroll, C.M., Kheirbek, M.A., Burghardt, N.S., Fenton, A.A., Dranovsky, A. & Hen, R. (2011). Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. *Nature*, 472(7344), 466–470.
- Sandoval, C.J., Martínez-Claros, M., Bello-Medina, P.C., Pérez, O. & Ramírez-Amaya, V. (2011). When are new hippocampal neurons, born in the adult brain, integrated into the network that processes spatial information? *PLoSOne*, 6(3).
- Santarelli, L., Saxe, M., Gross, C., Surget, A., Battaglia, F., Dulawa, S., Weisslaub, N., Lee, J., Duman, R., Arancio, O., Belzug, C. & Hen, R. (2003). Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants, *Science*, 301(5634), 805-809.
- Sapolsky, R.M., Armanini M.P., Sutton, S.W. & Plotsky, P.M. (1989). Elevation of hypophysial portal concentrations of adrenocorticotropin secretagogues after fornix transection. *Endocrinology*, 125(6), 2881–2887.
- Schloesser J. Robert, Manji K. Husseini & Martinowich Keri. (2009), Suppression of Adult Neurogenesis Leads to an Increased HPA Axis Response, *Neuroreport*; 20(6): 553–557.
- Schmidt, B., Marrone, D.F. & Markus, E.J. (2012). Disambiguating the similar: the dentate gyrus and pattern separation. *Behavioral Brain Research*, 226(1), 56-65.
- Schoenfeld, T.J., Rada, P., Pieruzzini, P.R., Hsueh, B. & Gould, E. (2013). Physical exercise prevents stress-induced activation of granule neurons and enhances local inhibitory mechanisms in the dentate gyrus. *The Journal of Neuroscience*, 33(18), 7770-7777.
- Sequeira-Cordero, A., Mora-Gallegos, A., Cuenca-Berger, P. & Fornaguera-Trias, J. (2014). Individual differences in the forced swimming test and the effect of environmental enrichment: searching for an interaction. *Neuroscience*, 265, 95-107.
- Shirayama, Y., Chen, A.C., Nakagawa, S., Russell, D.S. & Duman, R.S. (2002). Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in

- behavioral models of depression. *The Journal of Neuroscience*, 22(8), 3251–3261.
- Shors, T.J., Townsend, D.A., Zhao, M., Kozorovitskiy, Y. & Gould, E. (2002). Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning. *Hippocampus*, 12 (5), 578-84.
 - Snyder, J.S., Radik, R., Wojtowicz, J.M. & Cameron, H.A. (2009). Anatomical gradients of adult neurogenesis and activity: young neurons in the ventral dentate gyrus are activated by water maze training. *Hippocampus*, 19(4), 360-370.
 - Snyder, J.S., Soumier, A., Brewer, M., Pickel, J. & Cameron, H.A. (2011). Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behavior. *Nature*, 476(7361), 458–461.
 - Snyder, J.S., Clifford, M.A., Jeurling, S.I & Cameron, H.A. (2012). Complementary activation of hippocampal–cortical subregions and immature neurons following chronic training in single and multiple context versions of the water maze. *Behavioural Brain Research*, 227(2), 330–339.
 - Snyder, J.S., Ferrante, S.C. & Cameron, H.A. (2012). Late maturation of adult-born neurons in the temporal dentate gyrus. *PLoS ONE*, 7(11).
 - Soudrya, Y., Lemognea, C., Malinvaud, D., Consoli, S.M. & Bonfis, P. (2011). Olfactory system and emotion: common substrates. *European Annals of Otorhinolaryngology, Head and Neck Diseases*, 128(1), 18-23.
 - Spanpanato, J., Sullivan, R.K., Turpin, F.R., Bartlett, P.F. & Sah, P. (2012). Properties of doublecortin expressing neurons in the adult mouse dentate gyrus. *PLoS ONE*, 7(9).
 - Stone, S.D., Teixeira, C.M., Zaslavsky, K., Wheeler, A.L., Martinez-Canabal, A., Wang, A.H., Sakaguchi, M., Lozano, A.M. & Frankland, P.W. (2011). Functional convergence of developmentally and adult-generated granule cells in dentate gyrus circuits supporting hippocampus-dependent memory. *Hippocampus*, 21, 1348-1362.
 - Surget, A., Saxe, M., Leman, S., Ibarquen-Vargas, Y., Chalon, S., Griebel, G., Hen, R. & Belzung, C. (2008). Drug-dependent requirement of hippocampal neurogenesis in a model of depression and of antidepressant reversal. *Biological Psychiatry*, 64(4), 293–301.
 - Surget, A., Tanti, A., Leonardo, E.D., Laugeray, A., Rainer, Q., Touma, C., Palme, R., Griebel, G., Ibarquen-Vargas, Y., Hen, R. & Belzung, C. (2011). Antidepressants recruit new neurons to improve stress response regulation. *Molecular Psychiatry*, 16(12), 1177–1188.
 - Tanti, A. & Belzung, C. (2013). Neurogenesis along the septo-temporal axis of the hippocampus: are depression and the action of antidepressants region-specific? *Neuroscience*, 252, 234–252.
 - Tashiro, A., Makino, H., & Gage, F.H. (2007). Experience-specific functional modification of the dentate gyrus through adult neurogenesis: a critical period during an immature stage. *The Journal of Neuroscience*, 27(12), 3252-3259.
 - Thompson, C.L., Pathak, S.D., Jeromin, A., Ng, L.L., MacPherson, C.R., Mortrud, M.T., Cusick, A., Riley, Z.L., Sunkin, S.M., Bernard, A., Puchalski,

- R.B., Gage, F.H., Jones, A.R., Bajic, V.B., Hawrylycz, M.J. & Lein, E.S. (2008). Genomic anatomy of the hippocampus. *Neuron*, 60(6), 1010–1021.
- Toni, N. & Sultan, S. (2011). Synapse formation on adult-born hippocampal neurons. *European Journal of Neuroscience*, 33(6), 1062–1068.
 - Toni N., Teng, E.M., Bushong, E.A., Aimone, J.B., Zhao, C., Consiglio, A., van Praag, H., Martone, M.E., Ellisman, M.H. & Gage, G.H. (2007). Synapse formation on neurons born in the adult hippocampus. *Nature Neuroscience* 10(6), 727 – 734.
 - Ulrich-Lai, Y.M. & Herman, J.P. (2009). Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(6), 397-409.
 - Van Kampen, J.M., Hagg, T. & Robertson, H.A. (2004). Induction of neurogenesis in the adult rat subventricular zone and neostriatum following dopamine D receptor stimulation. *European Journal of Neuroscience*, 19(9), 2377–2387.
 - Vukovic, J., Blackmore, D.G., Jhaveri, D. & Bartlett, P.F. (2011). Activation of neural precursors in the adult neurogenic niches. *Neurochemistry International*, 59(3), 341-346.
 - Vukovic, J., Borlikova, G.G., Ruitenber, M.J., Robinson, G.J., Sullivan, R.K., Walker, T.L. & Bartlett, P.F. (2013). Immature doublecortin-positive hippocampal neurons are important for learning but not for remembering. *The Journal of Neuroscience*, 33(15), 6603-6613.
 - Wang, J.W., David, D.J., Monckton, J.E., Battaglia, F. & Hen, R. (2008). Chronic fluoxetine stimulates maturation and synaptic plasticity of adult-born hippocampal granule cells. *The Journal of Neuroscience*, 28(6), 1374 –1384.
 - Yoshimi, K., Ren, Y.R., Seki, T., Yamada, M., Ooizumi, H., Onodera, M., Saito, Y., Murayama, S., Okano, H., Mizuno, Y. & Mochizuki, H. (2005). Possibility for neurogenesis in substantia nigra of parkinsonian brain. *Annals of Neurology*, 58(1), 31–40.
 - Zhao, C., Teng, E.M., Summers, R.G., Ming, G.L. & Gage, F.H. (2006). Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, 26(1), 3-11.