



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

EVALUACIÓN DE LAS DIFERENCIAS EN LA NEUROGÉNESIS  
HIPOCAMPAL INDUCIDA POR CRISIS EPILÉPTICAS LEVES Y CRISIS  
SEVERAS AGUDAS EN EL RATÓN JOVEN

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**Maestra en Ciencias**

PRESENTA  
Psic. Diana Laura López Ibarra

TUTOR PRINCIPAL  
Dra. Angélica Zepeda Rivera  
[Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
Dra. Lourdes Massieu Trigo  
[Instituto de Fisiología Celular, UNAM](#)

Dra. Magdalena Guerra Crespo  
[Facultad de Medicina, UNAM](#)

Dra. Mariela Fernanda Trincherio (tutor invitado)  
[Fundación Instituto Leloir, Buenos Aires, Argentina](#)

Ciudad de México. Enero, 2025



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.



**PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y  
HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL  
(Graduación con trabajo escrito)**

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la Institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado:

**EVALUACIÓN DE LAS DIFERENCIAS EN LA NEUROGÉNESIS HIPOCAMPAL INDUCIDA POR CRISIS  
EPILEPTICAS LEVES Y CRISIS SEVERAS AGUDAS EN EL RATÓN JÓVEN**

que presenté para obtener el grado de **MAESTRA** es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por mi programa de posgrado, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, aceptó que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de graduación.

**Atentamente**

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Diana Laura López Ibarra'.

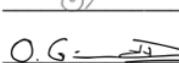
**Diana Laura López Ibarra  
313095375**

**SINODALES DESIGNADOS**  
**Presente**

Estimado académico:

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria **de septiembre de 2024**, conocieron la solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **Maestra en Ciencias** del/la estudiante **LÓPEZ IBARRA DIANA LAURA**, con la tesis "**Evaluación de las diferencias en la neurogénesis hipocampal inducida por crisis epilépticas leves y crisis severas agudas en el ratón joven**", dirigida por el/la Dr(a). **ZEPEDA RIVERA ANGÉLICA**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado en el que se encuentra usted incluido:

			ACEPTA	FECHA	FIRMA
ESCOBAR RODRÍGUEZ MARTHA LILIA	PMDCBQ	PRESIDENTE	SI <input checked="" type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>	27 / 09 / 24	
FLEURY AGNÈS ODILE MARIE	PMDCBQ	SECRETARIO	SI <input checked="" type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>	27 / 09 / 2024	
GEVORGYAN GOHAR	PMDCBQ	VOCAL	SI <input checked="" type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>	27/09/24	
MORÁN ANDRADE JULIO	PMDCBQ	VOCAL	SI <input checked="" type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>	27 / 09 / 2024	
OSORIO GÓMEZ DANIEL	PMDCBQ	VOCAL	SI <input checked="" type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>	27 / 09 / 24	O.G. 

Una vez firmado este documento, favor de enviarlo a la Coordinación al correo [ipalacios@posgrado.unam.mx](mailto:ipalacios@posgrado.unam.mx)

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
**Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 20 de septiembre de 2024**



**Coordinadora**  
**Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz**

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, bajo la asesoría de la Dra. Angélica Zepeda Rivera. Los experimentos de electroencefalografía fueron realizados en colaboración con el laboratorio de la Dra. Lourdes Massieu Trigo en el Instituto de Fisiología Celular.

La elaboración de este proyecto fue posible gracias al apoyo financiero otorgado por la Beca de Maestría CONAHCYT 1225758, y al proyecto PAPIIT IN207123.

Se extiende el agradecimiento al apoyo económico otorgado por el Instituto de Investigaciones Biomédicas para la presentación de este trabajo en el V Congreso de Neurobiología de la Sociedad Mexicana de Bioquímica que se llevó a cabo en Morelia, México el mes de abril 2024. Adicionalmente, al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) en la modalidad “Asistencia a Congreso Internacional” para la presentación formato póster de los resultados de este trabajo en el Federation of European Neuroscience Societies Forum 2024 (FENS 2024) que se llevó a cabo en Viena, Austria el mes de junio 2024.

## **Agradecimientos académicos**

A la **Dra. Angélica Zepeda Rivera**, por su confianza y respaldo a lo largo de este trabajo, su guía fue fundamental para la realización del proyecto.

A mi comité tutor compuesto por **la Dra. Lourdes Massieu Trigo, la Dra. Magdalena Crespo y la Dra. Mariela Trincherro**, por sus comentarios y valiosas aportaciones, que fortalecieron y enriquecieron los resultados obtenidos.

A la **Biol. Teresa Montiel**, por su apoyo incondicional en la caracterización del modelo empleado en los experimentos de electroencefalografía y por sus contribuciones a la discusión de este trabajo.

A la **Dra. Clorinda Arias**, por sus aportaciones críticas y sugerencias durante el desarrollo del proyecto, las cuales ayudaron a ampliar varios aspectos de esta investigación.

A la **Dra. Karina Hernández Mercado**, por su mentoría en las técnicas de laboratorio y en el mantenimiento de la colonia de animales transgénicos. Asimismo, a la **Dra. María Evangelina Ávila Muñoz**, por haber iniciado y establecido la colonia de animales transgénicos Ascl1/Tom, sentando las bases para el desarrollo de este trabajo.

A la **QFB. Patricia Ferrera Boza**, por su apoyo técnico, y al **Dr. Miguel Tapia**, por su colaboración en la captura de imágenes mediante microscopía confocal, que fueron fundamentales para este estudio.

A la **Unidad de Animales Biológicos de IIB**, y en especial a la **Dra. Georgina**, por su apoyo en el mantenimiento de los animales utilizados en este proyecto, garantizando las condiciones necesarias para su desarrollo.

## **Agradecimientos personales**

A mis papás, **Vero y Enrique**, por acompañarme en cada paso que doy, por su amor y apoyo incondicional, y por creer siempre en mí. Gracias por impulsarme a cumplir mis sueños. Esto es por y para ustedes.

A **Sam**, mi compañera de vida, por estar a mi lado en cada momento, incluso en las noches de desvelo. Todo es mejor contigo. Gracias por tu complicidad. A mi perrito **Picket**, por recordarme que la vida se compone por momentos simples y llenos de alegría.

A mi **tía Lupe y Alexa**, por creer siempre en mí y brindarme su respaldo incondicional. Las quiero y admiro.

A **Kari Hernandez**, este trabajo no habría sido posible sin tu mentoría y amistad. Gracias por tu apoyo constante, que fue fundamental para lograrlo.

A **Vero Gaytan**, mi primera alumna oficial, por todo tu apoyo en los experimentos y por confiar en mí como guía en tu proceso de licenciatura. Lo logramos juntas.

A **Diana y Suri**, mis amigas incondicionales, gracias por las tardes de distracción, risas y pláticas profundas. Su compañía fue una parte esencial de este proceso.

A **Jess, Vale y Ana**, porque la ciencia también se construye con los lazos que creamos. Gracias por inspirarme como mujer científica. Sigamos creciendo juntas.

A mis compañeros del laboratorio: **Ceci, Manu, César, Itzel, Saúl, Pola, Liz e Itzel**, gracias por crear un espacio de apoyo. La ciencia es mejor cuando se construye en equipo.

A los **ratoncitos de la ciencia**, porque su sacrificio nos permite avanzar en el entendimiento de la vida.

# Contenido

Resumen .....	10
Resumen gráfico .....	11
1. Antecedentes. ....	12
El hipocampo: anatomía y conectividad. ....	13
El giro dentado (GD) .....	15
El proceso neurogénico en el hipocampo adulto.....	16
1.1. Epilepsia .....	20
Modelos de SE .....	22
1.2. Neurogénesis en un contexto de hiperexcitabilidad.....	25
2. Planteamiento del problema.....	29
2.1. Objetivos generales.....	29
2.2. Objetivos particulares .....	29
2.3. Hipótesis.....	30
3. Metodología.....	30
3.1. Animales.....	30
3.2. Modelo transgénico ASCL1/TOM.....	30
3.3. Genotipificación .....	31
3.4. Administración de Tamoxifeno (TAM).....	31
3.5. Modelo de ácido kaínico (AK) .....	31
3.6. Registros electroencefalográficos (EEG).....	32
3.7. Protocolos conductuales.....	34
3.7.1. Habitación al cuarto de experimentación y al experimentador .....	34
3.7.2. Campo abierto.....	34
3.7.3. Memoria de localización de objetivo (OLM). ....	35
donde A representa el tiempo de exploración del objeto A y B representa el tiempo de exploración del objeto B. ....	35
3.7.4. Condicionamiento de miedo al contexto (CFC).....	35
3.8. Procesamiento histológico.....	36
3.8.2. Inmunofluorescencia:.....	36
3.9. Estrategia experimental .....	37
3.10. Microscopia y análisis de imágenes.....	39
3.11. Análisis estadístico.....	40
4. Resultados.....	42

<b>4.1. Análisis conductual de la inducción de crisis por la administración sistémica de ácido kaínico.....</b>	<b>42</b>
<b>4.2. Análisis de los patrones de actividad electroencefalográfica inducidos por la administración de AK.....</b>	<b>44</b>
<b>4.3. Diferencias en el proceso neurogénico por la inducción de dos perfiles de hiperexcitabilidad.....</b>	<b>47</b>
<b>4.3.1. Análisis del número estimado de células nacidas en cada contexto de hiperexcitabilidad. ....</b>	<b>48</b>
<b>4.3.2. Análisis de la distribución y posicionamiento de las nuevas células nacidas en cada contexto de hiperexcitabilidad.....</b>	<b>50</b>
<b>4.4.3. Análisis morfológico de las nuevas células nacidas en distintos contextos de hiperexcitabilidad. ....</b>	<b>53</b>
<b>4.4. Evaluación del desempeño en tareas de memoria en distintas condiciones de hiperexcitabilidad.....</b>	<b>55</b>
<b>4.4.1. Evaluación de locomoción y comportamiento relacionado con ansiedad en distintos contextos de hiperexcitabilidad. ....</b>	<b>55</b>
<b>4.4.2. Evaluación del desempeño cognitivo en una tarea de memoria de localización del objeto (OLM).....</b>	<b>57</b>
<b>4.4.3. Evaluación del desempeño cognitivo en una tarea de condicionamiento de miedo al contexto (CFC).....</b>	<b>59</b>
<b>5. Discusión.....</b>	<b>62</b>
<b>5.1. Impacto del nivel de hiperexcitabilidad en el número de nuevas células.....</b>	<b>63</b>
<b>5.2. Impacto del nivel de hiperexcitabilidad en la migración y posicionamiento de las nuevas células.....</b>	<b>65</b>
<b>5.3. Diferencias del fenotipo celular en los distintos contextos de hiperexcitabilidad como indicador de maduración neuronal.....</b>	<b>68</b>
<b>5.4. El impacto de nuevas neuronas nacidas en dos contextos de hiperexcitabilidad a nivel conductual.....</b>	<b>72</b>
<b>5.5. Papel de las nuevas neuronas nacidas en un contexto de hiperexcitabilidad.....</b>	<b>74</b>
<b>6. Conclusión .....</b>	<b>75</b>
<b>7. Referencias.....</b>	<b>76</b>

## Abreviaturas

**NHA:** Neurogénesis hipocampal adulta

**CTNs:** Células troncales neurales

**ZSG:** Zona subgranular

**CPNs:** Células progenitoras neurales

**GD:** Giro Dentado

**NB:** Neuroblasto

**AK:** Ácido Kaínico

**BrdU:** Bromodesoxiuridina

**CL:** Crisis leves

**DCX:** Doblecortina

**CS:** Crisis severas

**SE:** Estatus Epiléptico

**Ascl1:** Achaete-scute homolog 1

**GABA:** ácido gamma-aminobutírico

**Tom:** Proteína fluorescente Td-Tomato

**KAR:** Receptor kainato

**CGL:** Capa granular

**TAM:** Tamoxifeno

**OLM:** Object Localization Memory

**EEG:** Electroencefalografía

**CFC:** Contextual Fear Conditioning

**Infra:** Zona Infrapiramidal

**SVZ:** Zona Subventricular

**Supra:** Zona Suprapiramidal

**ML:** Capa Molecular

**H:** Hilus

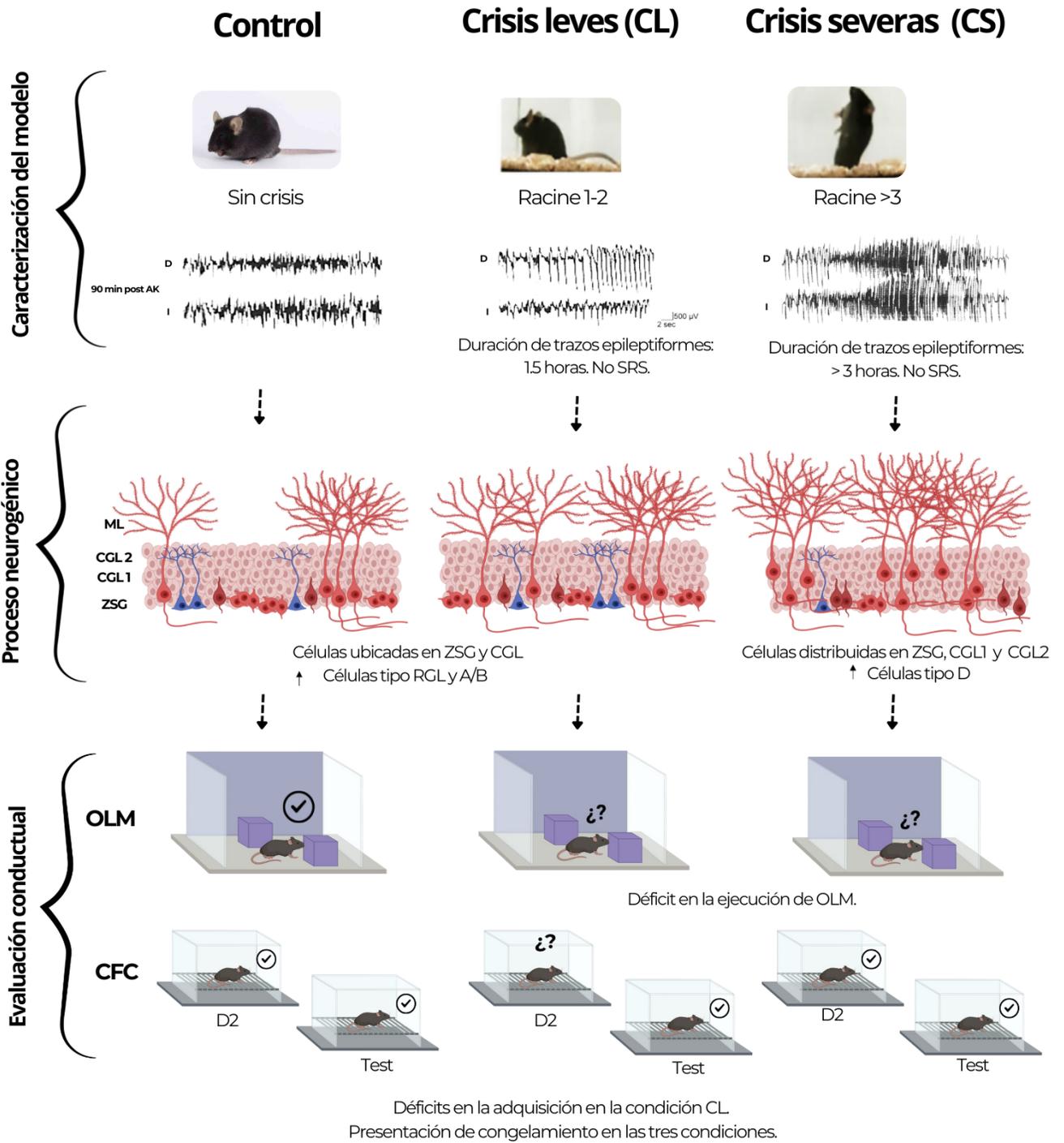
**RGL:** Radial glial like-cell

## Resumen

La neurogénesis hipocampal adulta (NHA) es un mecanismo de plasticidad neuronal que se mantiene a lo largo de la vida de diversos organismos, incluyendo a los roedores. Este proceso ocurre específicamente en la zona subgranular (ZSG) del giro dentado (GD), donde las nuevas células tienen la capacidad de madurar e integrarse al circuito hipocampal, teniendo así un rol importante en procesos de aprendizaje y memoria. La NHA puede ser modulada por distintos factores tales como el ejercicio y el enriquecimiento ambiental, pero también en condiciones patológicas como el daño cerebral y en condiciones de hiperexcitabilidad asociadas a la presentación de crisis epilépticas. Existe evidencia que indica que hay un incremento aberrante en la neurogénesis en modelos de epilepsia crónica; sin embargo, falta por determinarse el impacto de otros niveles de hiperexcitabilidad, como la presentación de crisis epilépticas agudas en el proceso neurogénico y su posible efecto sobre el desempeño en tareas de memoria. Para abordar este planteamiento, en este proyecto administramos intraperitonealmente (i.p.) una dosis baja (5mg/kg) o una dosis alta (25 mg/kg) de ácido kaínico (AK) para la inducción de crisis leves (CL) y crisis severas (CS) agudas, respectivamente, a ratones *Ascl1/Tom* jóvenes (6-8 semanas), un modelo transgénico que permite el marcaje y seguimiento del proceso de maduración de las nuevas células. Nuestros resultados indican que el número de nuevas células es similar tras la inducción con CL y CS. En cuanto al posicionamiento de las nuevas células, una mayor proporción se localizó en la ZSG en las condiciones control y CL, mientras que en la condición CS se observó una mayor distribución dentro de la CGL. En términos de maduración, ante la inducción de CS, hay un mayor número de células con morfología de neuronas maduras (Tipo D) en comparación con la condición CL y el grupo control, y un menor número de células precursoras (Tipo A y B) en comparación con el grupo control y CL. Estos hallazgos sugieren que la inducción de una CS altera el posicionamiento celular y acelera la maduración neuronal. Sin embargo, en ninguna condición se observó neurogénesis aberrante definida como neuronas con un fenotipo distinto al descrito en la literatura. Con el objeto de evaluar el impacto de los diferentes tipos de crisis en tareas asociadas al funcionamiento hipocampal, se evaluó a los sujetos de ambas condiciones en la ejecución de: memoria de miedo al contexto (CFC, por sus siglas en inglés, *contextual fear conditioning*) y memoria de localización del objeto (OLM, por sus siglas en inglés, *object localization memory*). Se observaron déficits en el día 2 de condicionamiento de CFC en el grupo CL en comparación con los grupos CS y control; sin embargo, no hubo deterioro en el día de la prueba en ninguna de las condiciones. En cuanto a la tarea de OLM, se evidenció un deterioro de la memoria en CL y CS en contraste con el desempeño del grupo control. En conjunto, estos resultados sugieren que el posicionamiento y la maduración de las nuevas neuronas dependen de la severidad de la hiperexcitabilidad y de las crisis asociadas, y que estos distintos niveles de hiperexcitabilidad impactan de manera negativa en la ejecución de tareas de memoria.

**Palabras clave:** plasticidad, neurogénesis hipocampal adulta, hiperexcitabilidad, crisis leves, crisis severas, ácido kaínico, memoria.

# Resumen gráfico



## **1. Antecedentes.**

Los organismos están expuestos a un ambiente que está en constante cambio, lo que les ha permitido generar diferentes estrategias de adaptación que aseguren su supervivencia. La plasticidad neuronal es uno de los mecanismos que permiten al sistema nervioso modificar la estructura y funcionalidad de sus circuitos como resultado de la experiencia e interacción con el ambiente (Ruge et al., 2012; Sweatt, 2016; Von Bernhardi et al., 2017). La plasticidad neuronal puede manifestarse a diferentes niveles y varía dependiendo de la edad y exposición del organismo a diferentes eventos. Los cambios a nivel estructural están mayoritariamente involucrados en las primeras etapas del desarrollo en la formación de circuitos (Kolb et al, 2017); sin embargo, durante la adultez ocurren cambios importantes que constantemente permiten la remodelación de circuitos neuronales preexistentes (Hübener y Bonhoeffer, 2014).

A nivel funcional, las neuronas tienen la capacidad de modificar la fuerza y eficiencia con la que forman conexiones con otras neuronas a través de mecanismos moleculares que son dependientes de su actividad, a esta manifestación plástica se le conoce como plasticidad sináptica (Citri y Malenka, 2008; Magee y Grienberger, 2020). Adicionalmente a los cambios funcionales y estructurales que ocurren en las células que forman los circuitos preexistentes, se ha propuesto que la generación de nuevas neuronas, proceso conocido como neurogénesis, es un tipo alternativo de manifestación plástica que tiene relevancia estructural y funcional.

### **Neurogénesis en el hipocampo adulto.**

La neurogénesis adulta (Altman y Das, 1965) es un proceso dinámico mediante el cual se generan nuevas neuronas que se integran a circuitos neuronales específicos. Actualmente está bien aceptado que este proceso puede continuar en la etapa adulta en diversas especies (Charvet y Finlay, 2018). En este sentido, la neurogénesis ha sido estudiada desde diferentes perspectivas que van desde el potencial de células neurales troncales para producir neuronas toda la vida, la integración de neuronas generadas en la etapa adulta, su contribución funcional y conductual y su papel potencial en condiciones patológicas (Obernier y Alvarez-Buylla, 2019).

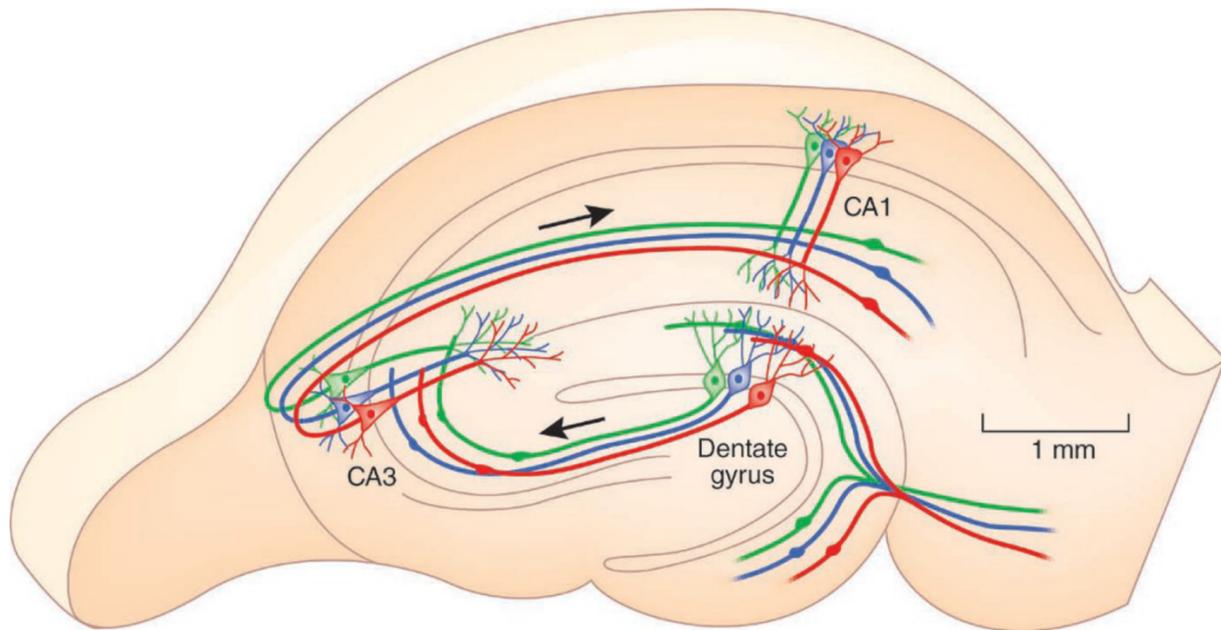
En roedores, se ha reportado que la neurogénesis se encuentra restringida a dos regiones en el sistema nervioso central (Altman y Das, 1965b): la zona subventricular de las paredes de los ventrículos laterales (ZSV) (Alvarez-Buylla et al., 1990) y la zona subgranular del giro dentado (ZSG), región donde ocurre la neurogénesis del hipocampo (Gonçalves et al., 2016). Para este proyecto, el interés se centrará en el proceso neurogénico en el hipocampo, estructura que se describirá con mayor detalle en la próxima sección y que está relacionada con diversos procesos de aprendizaje y memoria, particularmente de tipo espacial (Deng et al., 2010).

### **El hipocampo: anatomía y conectividad.**

El hipocampo es una estructura subcortical que integra información de diversas modalidades sensoriales. Ha recibido especial atención debido a su implicación en procesos de aprendizaje espacial y en la evocación de ciertos tipos de memoria. (Burgess et al., 2002; Opitz, 2014). De manera más específica, se ha reportado que el hipocampo está involucrado en memorias asociadas a la navegación espacial (Eichenbaum, 2017; Maguire et al., 2000), memorias asociadas a contextos, separación de patrones (Leutgeb et al., 2007) y en la memoria declarativa (en humanos) o episódica (en animales) (Squire, 1992; Voss et al., 2017), entre otras (Knierim, 2015). Así, el hipocampo es considerado una estructura altamente plástica debido a los cambios en la plasticidad sináptica y estructural inducidos por condiciones de aprendizaje y memoria (Cain et al., 1993; Ramírez-Amaya et al., 1999, 2001).

El hipocampo además es una estructura ampliamente conservada en la filogenia (Strange et al., 2014). En humanos el hipocampo se aprecia como una estructura larga que se ubica en la profundidad del lóbulo temporal. En roedores, es una estructura relativamente larga y está por debajo de la neocorteza correspondiente al lóbulo temporal. Se pueden distinguir dos regiones principales: la formación hipocampal y la parahipocampal. La formación hipocampal se constituye por la denominada asta de Amón, dividido a su vez en las subregiones: CA1, CA2, CA3 y el giro dentado (GD) (Schultz y Engelhardt, 2014). Mientras que la formación parahipocampal comprende a la corteza entorrinal (CE) y perirrinal (Riley y Moore, 1981). Además, el hipocampo tiene una estructura trilaminar que se divide en la capa molecular, piramidal y plexiforme.

Se ha descrito que el hipocampo forma múltiples conexiones (Moser, 2011a), siendo de particular interés el microcircuito denominado como circuito trisináptico, donde la mayor entrada de información proviene de la corteza entorrinal (CE). Son las células de las capas II y III de la CE que proyectan sus axones hacia el GD a través de la denominada vía perforante. A su vez, las células granulares del GD envían sus proyecciones (fibras musgosas) a las células piramidales de CA3. Las células piramidales de CA3 proyectan sus axones hacia las neuronas piramidales de CA1 mediante las colaterales de Schaffer, mientras que las neuronas de CA1 envían sus proyecciones de regreso hacia la CE, formando un circuito (Moser, 2011a) (Figura 1). En la próxima sección, describiré a nivel anatómico y funcional al GD, área descrita como nicho neurogénico durante la etapa adulta.



**Figura 1. Anatomía y conectividad de hipocampo.** Se muestran las conexiones principales entre el giro dentado (DG) y las áreas CA3 y CA1 de la formación hipocampal. Las flechas indican la dirección de las conexiones a lo largo de la vía trisináptica. El giro dentado (GD) recibe proyecciones provenientes de la corteza entorrinal (CE). Las fibras de la región del GD proyectan a través de las fibras musgosas hacia CA3, mientras que las neuronas de CA3 establecen conexiones con CA1 a través de las colaterales de Schaffer. Las neuronas de CA1, a su vez, proyectan fuera del hipocampo hacia otras áreas corticales. (Tomado de Moser, 2011).

## **El giro dentado (GD)**

### **Anatomía**

El GD es, como se mencionó anteriormente, una de las subregiones del hipocampo y es la estructura donde se encuentra el nicho neurogénico de la ZSG. El GD es una estructura trilaminar que comprende (en una organización dorso-ventral) a: 1) la capa molecular (ML, por sus siglas en inglés), en donde se aprecian las prolongaciones dendríticas provenientes de las células granulares glutamatérgicas, interneuronas y fibras axónicas que componen a la vía perforante; 2) la capa granular (CGL) formada por los somas de las neuronas granulares y que se divide en la lámina supra piramidal, la lámina infra piramidal y la cresta donde se integran las dos láminas mencionadas y; 3) el hilus (H), que es la región que se encuentra entre la lámina suprapiramidal e infrapiramidal, donde se encuentran tanto los axones de las neuronas granulares que forman las fibras musgosas que proyectan hacia CA3, como una gran variedad de interneuronas gabaérgicas (Amaral et al., 2007). La conectividad del GD le ha conferido propiedades funcionales particulares, que se describen a continuación.

### **Relevancia funcional**

El GD es una estructura que recibe información vestibular, olfatoria, visual, auditiva y somatosensorial; así como información proveniente de las cortezas perirrinal y entorrinal (Kesner, 2017). La vía perforante del GD dorsal puede dividirse en un componente medial y lateral. En la actualidad, se conoce que el componente medial está involucrado en el procesamiento de información espacial, mientras que la parte lateral procesa otro tipo de información no espacial como la codificación de objetos (Hargreaves et al., 2005). En este sentido, se ha determinado que específicamente el GD dorsal está implicado en el proceso de integración de información entre el espacio y el objeto, conocido como codificación conjunta (O'Reilly y McClelland, 1994).

Al GD se le han atribuido algunas funciones como la separación de patrones (Kesner, 2017), la cual es la capacidad que tiene un organismo para distinguir entre eventos o estímulos que tienen características similares (Leutgeb et al., 2007). Algunos trabajos reportan que lesiones en el GD dorsal interfieren en la separación de patrones; por ejemplo, disminuye la ejecución en una tarea en la que un animal debe discriminar entre dos lugares muy similares y cercanos entre sí para obtener una recompensa (Morris et al., 2012). Por

otra parte, se ha propuesto que la neurogénesis en el GD juega un rol importante en la separación de patrones, ya que la ablación de este proceso en una tarea en donde deben discriminar entre dos lugares con características similares tiene como consecuencia un mal desempeño en la tarea (Clelland et al., 2009).

Adicionalmente, se ha reportado que el GD dorsal y el proceso neurogénico están implicados en procesos como la memoria y el aprendizaje dependientes de un contexto; por ejemplo, en el condicionamiento de miedo al contexto (Hernández-Mercado y Zepeda, 2022). El condicionamiento de miedo al contexto es un paradigma experimental que consiste en colocar a un animal en un contexto novedoso mientras de forma contigua se da un estímulo aversivo como un choque eléctrico, lo que provoca la inmovilidad o “congelamiento” del individuo. Es así como a su regreso al contexto sin el choque eléctrico, el animal suele desplegar la conducta de inmovilidad, manifestando así que ha asociado el estímulo aversivo al contexto, proceso denominado como memoria del miedo al contexto (Curzon et al., 2009).

### **El proceso neurogénico en el hipocampo adulto**

La neurogénesis adulta en el roedor comprende 4 fases generales: Proliferación celular, diferenciación, supervivencia y maduración e integración (Kempermann et al., 2015). Las diferentes fases del proceso neurogénico son reguladas por distintos mecanismos de señalización, tanto intrínsecos como extrínsecos. A continuación, se describirá cada una de las fases y algunos de los mecanismos moleculares implicados.

La proliferación da inicio con la activación de las células troncales neurales (CTNs) (células tipo 1) ubicadas en la zona subgranular del GD (Gonçalves et al., 2016b). Estas células poseen propiedades de célula troncal, son multipotentes, es decir, tienen la capacidad de generar una célula idéntica, pero también tienen la capacidad de diferenciarse en astrocitos o en neuronas (Bonaguidi et al., 2011), siendo mayor la proporción de diferenciación hacia neurona. En el GD del roedor, las CTNs muestran una morfología radial, extienden un proceso apical, tienen procesos pequeños orientados horizontalmente (Espósito et al., 2005a) y expresan proteínas que están presentes en astrocitos como la proteína ácido fibrilar glial (GFAP) o vimentina, por lo que a estas células también se les ha denominado como células tipo glía radial (RGL) (Seri et al., 2001). Además, expresan marcadores asociados en células troncales como factores de transcripción por ejemplo

SOX1, Nestina, Pax6 y Ascl 1 (del inglés Achaete-scute homolog 1) (Filippov et al., 2003; Kim et al., 2011a; Nacher et al., 2005). Ascl 1 es un factor de transcripción involucrado en la diferenciación neuronal y está presente en las células tipo 1 y tipo 2 (células precursoras, derivadas de las tipo 1 y con un mayor grado de compromiso neuronal); además, se expresa en las células progenitoras que están en división y promueven su diferenciación hacia neuronas en el GD (Kim et al., 2011a; S. M. Yang et al., 2015a). Esta característica ha permitido el desarrollo de ratones genéticamente modificados para el estudio y seguimiento longitudinal de la neurogénesis adulta, tales como los ratones Ascl1/Tom, modelo murino que fue empleado en este proyecto.

Las CTNs tienen la capacidad de autorrenovarse a través de la división simétrica, pero por lo regular se encuentran en un estado quiescente (Urbán et al., 2019). Sin embargo, pueden dividirse de forma asimétrica generando células progenitoras neurales (CPNs), también denominadas células progenitoras de amplificación transitoria (células tipo 2a y 2b). Éstas poseen una morfología distinta a la CTNs, por lo general presentan un soma circular y carecen del proceso apical característico de las células tipo 1 (Espósito et al., 2005a). Se pueden identificar dos subtipos de CPNs, cuya diferencia radica en la expresión de marcadores moleculares. Por lo general, las células 2a expresan marcadores asociados a las CTNs, mientras que las células 2b pueden expresar tanto los marcadores de las células 2a como algunos adicionales, como PSA-NCAM, NeuroD1 y doblecortina (DCX). Por lo que se propone que las células tipo 2b están más comprometidas con la adquisición de un linaje neuronal (Gleeson et al., 1999a). No obstante, hay reportes que indican que estas CPNs pueden ser manipuladas por factores genéticos (Song et al., 2012) o inclusive por factores extrínsecos como la hiperexcitabilidad del sistema (Moura et al., 2020). Esta última alternativa se discutirá más adelante.

Finalmente, en la fase de proliferación, los progenitores 2b pueden dar lugar a neuroblastos (NB) o células tipo 3 (Espósito et al., 2005b). Anteriormente se había propuesto que los NB podían entrar en una última ronda de división celular; sin embargo, los neuroblastos ya no contribuyen a la expansión del número de células, sino que continúan su propia maduración (Rasetto et al., 2024). Los NB son células ovoides con procesos horizontales, y a medida que maduran, adquieren un soma más redondeado y sus procesos se alargan, orientándose verticalmente hacia la capa molecular (Zhao et al.,

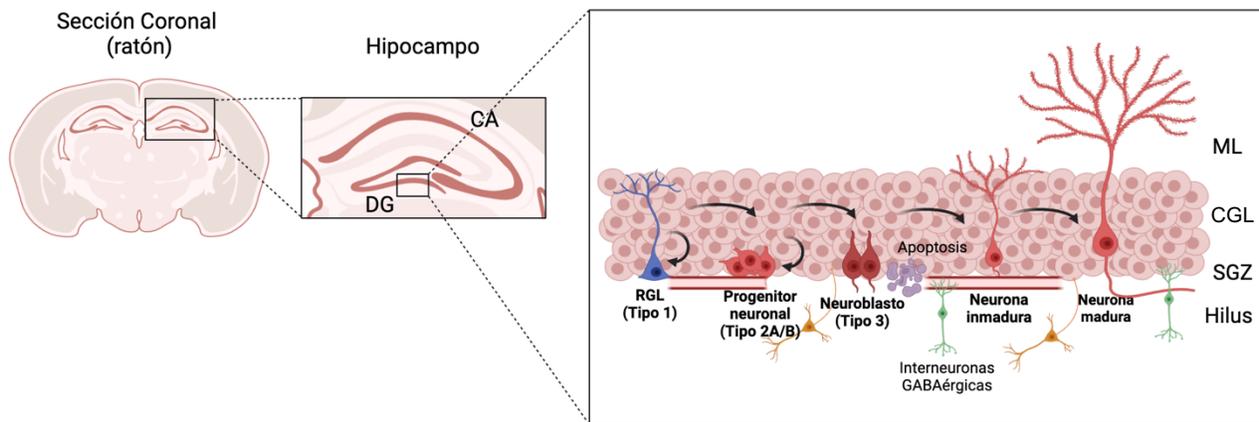
2006a). Durante esta fase, los NB continúan expresando marcadores como NeuroD, Prox1 y DCX (Gleeson et al., 1999b; Karalay et al., 2011).

Los precursores neuronales inician su fase de migración en la ZSG mientras están en su etapa de células tipo 2b y continúan migrando o internalizándose a la CGL como NB. Su migración inicia de forma paralela a la ZSG, es decir de forma tangencial, guiados por los vasos sanguíneos del GD, para posteriormente migrar de forma radial hacia la CGL. Es en esta fase, donde ocurre la primera poda neuronal, que se refiere a la muerte de una proporción importante de nuevas células y a la supervivencia y consecuente maduración, aproximadamente el 30% de ellas (Dayer et al., 2003).

La correcta migración y posicionamiento de las nuevas neuronas es fundamental para su adecuada integración en los circuitos del hipocampo. Se ha propuesto que el posicionamiento de estas nuevas neuronas dentro de la capa granular requiere de varias proteínas, incluyendo a los receptores GABA (Duveau et al., 2011) y los receptores NMDA (Namba et al., 2011). Entre las cascadas de señalización intrínseca que participan en este proceso se encuentra la liberación de moléculas quimiotácticas como las netrinas, las semaforinas y proteínas de matriz extracelular como la reelina (Ayala et al., 2007). La reelina, es una glicoproteína de matriz que se ha reportado como un factor clave en la migración y posicionamiento de las nuevas células a través de la modulación de la laminación del GD (Del Río et al., 1997; Santana y Marzolo, 2017) . Esta proteína es liberada por las células de Cajal-Retzius y por las interneuronas ubicadas en el hilus (Del Río et al., 1997), por lo que una afectación en estas poblaciones celulares altera el proceso de migración.

Los NB, pueden dar origen a neuronas granulares inmaduras. Estas nuevas neuronas se caracterizan por tener procesos muy cortos, morfología redonda y orientación vertical. Su patrón de migración es radial, tomando su posición en la CGL (Espósito et al., 2005a). Estas neuronas pasan a la fase de maduración, donde inicia el crecimiento de sus procesos, la extensión de sus dendritas a través de la CGL y sus proyecciones hacia CA3 (Zhao et al., 2006b). Durante la primera semana posterior a su diferenciación, las nuevas neuronas inmaduras reciben conexiones gabaérgicas y es a partir del día 7-14 aproximadamente después del nacimiento que la célula comienza a recibir conexiones glutamatérgicas (Espósito et al., 2005a; Markwardt et al., 2009). Una alta proporción de neuronas inmaduras tendrán un proceso de apoptosis; sin embargo, las neuronas que

sobreviven adquieren un fenotipo de neurona madura aproximadamente a las 8 semanas de edad (Espósito et al., 2005a; Zhao et al., 2006b). Uno de los marcadores moleculares que indican que se trata de una neurona granular madura es la proteína de unión a  $Ca^{2+}$ , calbindina (Brandt et al., 2003). Sus propiedades electrofisiológicas y morfológicas, así como la complejidad dendrítica y la densidad de espinas, son similares a las presentes en neuronas preexistentes, lo que les permitirá su incorporación a circuitos establecidos (Laplagne et al., 2006). A continuación, se muestra un esquema del proceso neurogénico descrito (Figura 2):



**Figura 2. Esquema del proceso neurogénico y los componentes que conforman el nicho neurogénico del hipocampo.** En el primer panel, se presenta un corte coronal de ratón, donde se señala la localización del hipocampo. En el panel central, se destaca el giro dentado (GD), donde se encuentra el nicho neurogénico. La ampliación del panel izquierdo ilustra el proceso neurogénico, mostrando las distintas morfologías celulares según su fase de maduración. En morado, se observan las células en apoptosis. En el hilus, se resalta la presencia de interneuronas gabaérgicas, relevantes para la regulación del proceso neurogénico. Adicionalmente, en rojo se muestra la vasculatura implicada en la correcta migración de las nuevas células. CA: Cuerno de Amón, GD: Giro dentado, ML: Capa molecular, CGL: Capa granular, SGZ: Zona subgranular, RGL: Célula tipo glía radial. (Imagen creada con Biorender.com).

### Modulación de la neurogénesis hipocampal

La neurogénesis adulta puede modularse por diversas condiciones que afectan la composición del nicho neurogénico, entendido como el ambiente celular y molecular presente en la ZSG. Debido a las interacciones con factores celulares y moleculares, es posible que haya modificaciones en las diferentes fases del proceso neurogénico a lo largo de la vida de los individuos (Bergami et al., 2015). Así, por ejemplo, tanto la presencia de

células microgliales o de astrocitos reactivos o activos, así como la acción de moléculas como citocinas o factores de crecimiento, pueden activar cascadas de señalización que incidan en las diferentes fases del proceso neurogénico (para una revisión ver Pérez-Domínguez et al., Rev Neurosci, 2017).

La disminución de la neurogénesis se ha reportado principalmente por factores como el consumo de ciertas sustancias (Morris et al., 2010) y estrés (Snyder et al., 2011), entre otros. También hay eventos fisiológicos que modulan negativamente la neurogénesis, como es el envejecimiento. En roedores, se ha reportado que el número de células troncales neurales y nuevas neuronas decrementa de manera exponencial a lo largo de la edad, y que podría estar asociado al declive cognitivo (Boldrini et al., 2018). También, algunos padecimientos neurodegenerativos pueden modular a la baja el proceso neurogénico. Por ejemplo, hay estudios que sugieren que en modelo de la enfermedad de Alzheimer hay una reducción en la fase de proliferación y supervivencia de las nuevas neuronas (Tobin et al., 2019).

Por otra parte, hay eventos que estimulan la neurogénesis. En roedores, se ha reportado que el ejercicio incrementa la proliferación de células neurales troncales; de manera similar, el enriquecimiento ambiental favorece la supervivencia de nuevas neuronas (Olson et al., 2006). De manera interesante, hay otros eventos que promueven la neurogénesis, tales como el daño al sistema nervioso asociado a lesiones por isquemia (Tang et al., 2022), lesiones excitotóxicas (Aguilar-Arredondo y Zepeda, 2018a; Zepeda et al., 2013a) y crisis epilépticas (Parent et al., 1997a).

### **1.1. Epilepsia**

Como fue descrito en la sección anterior, se ha reportado que la epilepsia es un factor que incrementa la proliferación de nuevas neuronas (Parent et al., 1997a). La epilepsia es un grupo de desórdenes neurológicos que se caracteriza por la presencia de crisis convulsivas recurrentes y que como consecuencia puede tener consecuencias a nivel funcional (Fisher et al., 2017). Su etiología puede ser resultado de mutaciones en ciertos genes, denominada epilepsia genética o primaria. Alternativamente puede originarse por anomalías en el sistema nervioso central, como tumores, traumatismos craneoencefálicos, infecciones o malformación durante el desarrollo, y se conocen como epilepsias

sintomáticas o secundarias (Trinka et al., 2015). A nivel celular, las características que definen a las crisis convulsivas se relacionan con la hiperexcitabilidad, que se manifiesta cuando una neurona tiende a disparar ráfagas múltiples de potenciales de acción. Mientras que la hipersincronización se refiere a un reclutamiento masivo de neuronas que están disparando de manera sincrónica (Fisher et al., 2005). A nivel neuroquímico, se reporta que esta condición es resultado de un desequilibrio entre la actividad excitatoria que está mediada en el sistema nervioso por el glutamato que se encuentra exacerbado, mientras que la actividad inhibitoria, mediada principalmente por el ácido gamma-aminobutírico (GABA), se encuentra disminuida (Kourdougli et al., 2017).

Una crisis epiléptica se presenta como un cambio transitorio y breve en el comportamiento del individuo, donde pueden manifestarse síntomas como pérdida de conocimiento, rigidez muscular y, sacudidas involuntarias causadas por la hiperexcitabilidad del sistema (Devinsky et al., 2018a). Debido a la diversidad de manifestaciones, la Liga Internacional Contra la Epilepsia (ILAE) estableció una clasificación de las crisis epilépticas. Esta clasificación se organiza en tres categorías principales según el tipo de inicio: inicio focal, inicio generalizado e inicio desconocido. Tanto las crisis de inicio focal como las de inicio generalizado e inicio desconocido pueden incluir manifestaciones motoras y no motoras. Las crisis focales también pueden progresar a crisis tónico-clónicas bilaterales. Además, esta clasificación distingue entre crisis bilaterales (que se propagan a ambos hemisferios) y crisis generalizadas (que se originan simultáneamente en ambos hemisferios) (Fisher et al., 2017). En general, las crisis epilépticas son transitorias y sin efectos graves; sin embargo, aquellas provocadas por SE (del latín, *status epilepticus*) pueden tener impacto en el sistema nervioso. En SE, la actividad epiléptica continua o repetitiva se prolonga durante más de cinco minutos o se presenta sin que el paciente recupere la conciencia entre las crisis, lo que desencadena una serie de mecanismos de daño celular. La actividad sostenida en SE provoca estrés celular, sobrecarga de calcio y liberación excesiva de neurotransmisores excitatorios, activando procesos de muerte celular como la apoptosis, necroptosis y ferroptosis (para un revisión ver, Du et al., 2022).

Para el estudio de las distintas manifestaciones relacionadas con hiperexcitabilidad, se han desarrollado diferentes modelos que se enfocan en evaluar las alteraciones celulares y moleculares inducidas por diferentes eventos eléctricos y químicos que resultan en la

inducción de estas crisis (Villalpando Vargas et al., 2019). Debido a la gravedad del SE, su relación con el desarrollo de epileptogénesis y los daños neuronales asociados, esta manifestación ha sido la más estudiada en investigaciones previas. Sin embargo, queda por explorar en mayor profundidad el impacto de otras presentaciones de crisis epilépticas transitorias y agudas, ya que estas pueden tener efectos distintos en la plasticidad cerebral, incluyendo la neurogénesis, que es el interés principal de este proyecto.

En este contexto, las crisis epilépticas agudas se definen como eventos transitorios que ocurren en respuesta inmediata a un evento como traumatismo craneoencefálico, desequilibrios metabólicos o infecciones del sistema nervioso central, y que no necesariamente indican una predisposición a desarrollar epilepsia crónica (Devinsky et al., 2018; Villalpando Vargas et al., 2019). Esta diferenciación es relevante, ya que mientras la mayoría de los estudios se centran en crisis crónicas y su relación con la epileptogénesis, nuestro enfoque busca evaluar los efectos de crisis epilépticas agudas en procesos plásticos como la neurogénesis.

### **Modelos de epilepsia e hiperexcitabilidad**

Los modelos animales están desarrollados a partir de las alteraciones que se han reportado en pacientes con epilepsia. Entre las principales alteraciones se encuentran la esclerosis hipocampal (Blümcke et al., 2012), la desorganización de las fibras musgosas del hipocampo (Buckmaster, 2012), las alteraciones en la regulación de la transmisión sináptica (Kourdougli et al., 2017), la dispersión granular (Silva et al., 2007), la gliosis reactiva (Ortinski et al., 2010) y la disfunción en la barrera hematoencefálica (Van Vliet et al., 2016).

Actualmente, se utilizan diferentes tipos de inducción de crisis epilépticas: por inducción química con moléculas como pilocarpina (Scorza et al., 2009) y ácido kaínico (AK) (Rusina et al., 2021a), por inducción eléctrica o por inducción física como hipertermia (Ullal et al., 1996).

El AK es una toxina análoga de L-glutamato que se comporta como agonista de los receptores ionotrópicos sensibles kainato (KARs) (Davies, 2007). Su uso como modelo para inducir epilepsia fue propuesta por Ben Ari y colaboradores (Ben-Ari et al., 1980). Uno de los primeros reportes fue a través de una administración intra-amígdala en ratas, en donde

se observó la presencia de convulsiones focales que evolucionaron a una conforme la dosis se aumentaba (Ben-Ari et al., 1979). En varios de estos experimentos, la evaluación histológica revela que la inducción por AK produce varias marcas patológicas como la degeneración neuronal y gliosis en CA3 principalmente (Blümcke et al., 2012).

El AK actúa en sus receptores que se encuentran distribuidos en todo el cerebro; por ejemplo, en corteza entorrinal (Cunningham et al., 2003), ganglios basales (Jin y Smith, 2011), y una cantidad considerable en el hipocampo, mayoritariamente en CA1 (Bloss y Hunter, 2010). Los KARs pertenecen a una familia de receptores ionotrópicos glutamatérgicos (Jane, 2007). Además de activar a los KARs en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo, el AK también influye en las interneuronas gabaérgicas, específicamente a través de los receptores GluR5. Aunque la activación inicial de estas interneuronas provoca una liberación tónica de GABA, esto no es suficiente para contrarrestar la excitación que se produce en las neuronas piramidales de CA3, debido a la activación de sus propios receptores de kainato, lo que impide que haya un balance en la señal inhibitoria-excitatoria, favoreciendo así la inducción de crisis (Ben-Ari y Cossart, 2000).

Debido a estos efectos y su mecanismo de acción, se conoce que la administración de AK conduce a las neuronas a experimentar daño severo, y que puede conducir a la muerte celular por la sobreestimulación inducida por neurotransmisores excitatorios como el glutamato, proceso conocido como daño excitotóxico (Dong et al., 2009). Este daño es ocasionado por interacciones moleculares que producen un desbalance osmótico que puede llevar a la ruptura de las membranas, ocasionada principalmente por el incremento exacerbado de  $Ca^{2+}$ , que a su vez impacta en la mitocondria y retículo endoplásmico (Mattson, 2019). Otro mecanismo implicado es el estrés oxidativo, inducido por el exceso de glutamato que produce la formación de especies reactivas de oxígeno provocando daño a nivel molecular (Gano et al., 2018).

Adicionalmente, el daño inducido por estos modelos de epilepsia en el hipocampo tiene un impacto a nivel cognitivo. Por ejemplo, en modelos de epilepsia inducida por AK, se ha reportado un déficit en la ejecución de tareas de memoria espacial. Estos déficits se reflejan en pruebas como el laberinto de agua de Morris y las pruebas de memoria de reconocimiento de objetos y localización novedosa (Pearson et al., 2014). No solo se observan afectaciones a nivel cognitivo, sino que también se reporta un impacto en la hiperlocomoción y en la manifestación de conductas ansiosas en este modelo. Estas

comorbilidades, tanto la hiperlocomoción como las conductas ansiosas, están relacionadas con el daño en áreas cerebrales específicas inducido por las crisis epilépticas (Inostroza et al., 2011). Por lo tanto, la localización y extensión de la lesión causada por las crisis parecen jugar un papel crucial en el desarrollo de estas manifestaciones. Aún queda por indagar cómo otros niveles de hiperexcitabilidad y el daño asociado impactan en estas conductas.

La administración de AK puede ser a través de diferentes vías, y la forma de administración también tiene un impacto diferencial. Las rutas más empleadas son la intranasal, la intracerebral y la sistémica (Rusina et al., 2021a).

La administración intranasal, surge como modelo de administración para vencer la resistencia que los ratones de la cepa C57BL/6 presentan al AK (Z. Chen et al., 2002). Existen evidencias que indican que la absorción por el epitelio nasal distribuye al AK al sistema nervioso central por las vías olfatorias a través de las conexiones del bulbo olfatorio a diferentes zonas del cerebro provocando crisis epilépticas focales que progresan a un SE generalizado (Z. Chen et al., 2002). Respecto al daño, se ha reportado que esta administración solo causa daño evidente en el bulbo olfatorio y en el hipocampo, específicamente CA3 (Zhang et al., 2008).

La administración intracerebral, a su vez puede dividirse en intra-ventricular, intra-hipocampal e intra-amigdalal (Rusina et al., 2021a). La principal ventaja de estos modelos es la entrada directa al tejido, y favorece el estudio de daño focal. El análisis histológico indica que esta administración crea una lesión focal en el hipocampo, dañando de manera importante CA3 ipsilateral, y CA1 en el modelo intra-hipocampal (Raedt et al., 2009). En estos modelos se ha reportado también la desorganización de las fibras musgosas (Zeidler et al., 2018), mientras que solo en la administración intrahipocampal se reporta el fenómeno de dispersión granular (Pallud et al., 2011).

Los primeros reportes de la administración sistémica de AK surgen en los años 80 en donde las primeras observaciones reportaron que esta toxina podía inducir daño axonal en rata (Schwob et al., 1980). Las manifestaciones conductuales en ratas incluyen las llamadas “sacudidas de perro mojado” presentes de 30 a 90 minutos posteriores a la administración y evolucionan a convulsiones tónico-clónicas generalizadas (Sperk et al., 1983).

En el ratón, las manifestaciones conductuales producidas por la administración de AK han bien sido caracterizadas. Se ha reportado que la primera manifestación conductual (automatismos faciales) ocurre de 15 – 30 minutos después de la inyección, sin exceder las 6 horas (Sharma et al., 2018). Para definir las manifestaciones conductuales, se ha utilizado la escala de Racine, que tiene como objetivo organizar cualitativa y cuantitativamente las crisis observadas en el comportamiento (Racine, 1972). No obstante, se ha reportado que las manifestaciones son diferentes entre ratas y ratones, por lo que esta escala ha sido modificada. Para ratón, las crisis se han caracterizado por niveles de severidad y se han dividido en dos subgrupos: i) Crisis no convulsivas (CNC) que comprende: Fase 1- Crisis de ausencia, inmovilidad; Fase 2 – Movimientos faciales y; ii) Crisis convulsivas (CC): Fase 3 -Movimiento de cabeza, movimientos límbicos de corta duración, Fase 4 – Movimientos límbicos sostenidos, pérdida de equilibrio y Fase 5 – convulsiones tónico-clónico generalizadas (Sharma et al., 2018).

Con respecto al daño histopatológico que está asociado a la administración sistémica de AK, hay reportes que indican que éste induce daño bilateral, especialmente en CA1, CA3 y CA4. En rata, los daños comprenden necrosis de células piramidales, gliosis y, desorganización de fibras musgosas dentro de la capa molecular del giro dentado (Tauck y Nadler, 1985). En ratón, las áreas más afectadas son CA3 y CA1, con daños similares a los de rata (Benkovic et al., 2004a).

Por otra parte, como se mencionó previamente, hay reportes que indican que hay neurogénesis incrementada asociada a esta condición, por lo que a continuación, se amplían los hallazgos más relevantes sobre la neurogénesis en un contexto de hiperexcitabilidad.

## **1.2. Neurogénesis en un contexto de hiperexcitabilidad**

La hiperexcitabilidad del sistema nervioso no solo genera daño en los circuitos preexistentes, sino que además parece impactar a las CTNs que forman parte del nicho neurogénico del GD (Parent et al., 1997a), incidiendo así en las diferentes etapas del proceso neurogénico.

La inducción de crisis epilépticas de manera prolongada incrementa la proliferación celular en el GD, mediada por las células tipo glía radial (Parent et al., 1997a) y provoca la dispersión de células progenitoras (Jessberger et al., 2005a). La proliferación celular tiene

una duración aproximada de 3 a 4 semanas después de la inducción del SE, regresando a la línea basal en días posteriores (Parent et al., 1997a). Se ha propuesto que el incremento en la actividad neuronal favorece la proliferación y diferenciación celular, ya que las células troncales neurales pueden detectar y responder a la actividad eléctrica a través de canales de calcio y receptores específicos, lo cual desencadena cambios en la expresión génica (Deisseroth et al., 2004a) y activar algunas vías de señalización como Notch, Sonic hedgehog y Wnt, y que participan de forma constitutiva en este proceso (Sibbe et al., 2012). Por otra parte, se ha propuesto que la hiperexcitabilidad puede llevar a la expresión de factores neurotróficos como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), incrementando la proliferación celular (Isackson et al., 1991).

Siguiendo con la progresión dentro del proceso neurogénico, hay evidencia de que la inducción de crisis convulsivas acelera la maduración funcional e integración de nuevas neuronas granulares (Enikolopov et al., 2015). Sin embargo, la morfología y migración de estas células parece estar alterada (Jessberger y Parent, 2015). En condiciones normales, las células granulares se conforman por una dendrita única que surge de la porción apical del soma y proyecta hacia la capa molecular. En contraste, en condiciones de hiperexcitabilidad las células granulares extienden una dendrita basal adicional hacia el hilus (Shapiro y Ribak, 2006a). Además, en etapas posteriores de desarrollo, estas dendritas basales están cubiertas con abundantes espinas con morfología inmadura (Shapiro y Ribak, 2006a). No obstante, a pesar de esta morfología aberrante, parece ser que varias de estas nuevas células se integran de forma exitosa al circuito del GD (Kron et al., 2010), teniendo como consecuencia cambios en la conectividad de circuitos preexistentes.

Además de la morfología aberrante, se ha reportado que la inducción de SE altera la migración de las nuevas neuronas. En ratas, se ha reportado que una proporción considerable de nuevas células granulares migran de manera ectópica hacia el hilus y hacia el borde entre el hilus y CA3, en donde maduran y se integran. A pesar de su localización ectópica, su perfil electrofisiológico es similar a las neuronas nacidas en condiciones normales y reciben conexiones provenientes de la vía perforante (Scharfman et al., 2000a).

En cuanto a la contribución funcional de las nuevas neuronas inducidas por SE, se ha propuesto que la ablación de estas neuronas interrumpe la epileptogénesis y reduce la frecuencia de crisis espontáneas (Jung et al., 2006a). Sin embargo, no solo se ha reportado

que la neurogénesis aberrante contribuye a la epilepsia, sino que también ha sido asociado al declive cognitivo (Cho et al., 2015a). Por otra parte, se ha reportado que la neurogénesis adulta podría estar protegiendo al hipocampo ante la inducción de crisis epilépticas severas (Jain et al., 2019). Se necesitan más estudios para determinar si estas nuevas neuronas generadas están favoreciendo la formación del circuito epileptogénico o si es un mecanismo de reparación.

Desde un punto de vista clínico, y como se revisó en la sección de epilepsia, las crisis pueden clasificarse por su grado de severidad, y la mayor parte de la literatura se centra en el estado más grave del padecimiento que comprende crisis tónico-clónicas generalizadas y su impacto en la neurogénesis; sin embargo, hay pocos reportes que evalúen otros grados de severidad (Mohapel et al., 2004a; F. Yang et al., 2008). Algunos de estos hallazgos sugieren que hay diferencias entre convulsiones no severas y convulsiones tónico-clónicas generalizadas; no obstante, hay diversidad en los resultados. En el trabajo de Mohapel y colaboradores (2004), donde evalúan diferentes tipos de intensidad del SE por inducción eléctrica en rata, se reporta que no hay diferencia en la etapa de proliferación celular, pero en estados más graves se encuentra disminuido el número de neuronas que han sobrevivido (Mohapel et al., 2004a). En contraste, en el estudio de Yang y colaboradores (2008), donde también se evaluó el proceso neurogénico en respuesta a la inducción de CL y CS por la administración de AK i.p., reportan que, si bien hay proliferación en ambas condiciones, dicha proliferación se ve más exacerbada en las convulsiones graves, mientras que en condiciones leves existe una mayor integración de neuronas nuevas (F. Yang et al., 2008).

En estudios previos de nuestro grupo de investigación, se reportó que las nuevas neuronas, generadas por un daño focal excitotóxico inducido por la administración intrahipocampal de AK en rata, pasan por un proceso de proliferación exacerbada, seguida de una morfología inicial aberrante de las células jóvenes que tiende a la normalidad con el paso del tiempo y que las nuevas células pueden activarse en respuesta de una tarea de memoria, dependiente del giro dentado pero no ante una tarea independiente de él (Aguilar-Arredondo y Zepeda, 2018a; Zepeda et al., 2013a). De manera interesante y como antecedente directo de este proyecto, esta administración de AK producía algunas manifestaciones epileptogénicas como sacudidas características de crisis no convulsivas,

lo que nos permite sugerir que el proceso neurogénico podría estar variando según la intensidad de las crisis, así como su impacto en el desempeño en una tarea de memoria.

En un estudio realizado por Sierra y colaboradores (2015), que marca un antecedente directo a este proyecto, se evaluó cómo distintos niveles de hiperexcitabilidad afectan de manera particular a las diferentes fases de la neurogénesis adulta. Una dosis baja de AK no produjo manifestaciones conductuales evidentes, pero sí mostró actividad epileptiforme en el EEG, mientras que una dosis alta de AK indujo crisis epilépticas severas y recurrentes. Además, en el grupo donde las crisis no eran evidentes, se aceleró la activación de las células gliales radiales (RGL) y provocó el aumento en la proliferación de astrocitos. Esto contrasta con los resultados obtenidos en animales que presentaron crisis epilépticas crónicas y severas, donde las RGL se dividieron de manera simétrica, y tanto las células progenitoras como su progenie se diferenciaron en astrocitos reactivos. Como consecuencia de la disminución de los progenitores, se identificó una reducción en el número de nuevas neuronas a largo plazo en ambas condiciones, siendo más evidente en la de mayor severidad (Sierra et al., 2015). Es relevante destacar que si bien, este estudio mostró que distintos niveles de hiperexcitabilidad influyen en la neurogénesis, no se indagó sobre la maduración de las nuevas neuronas. Esto destaca la importancia de nuestra investigación, que busca comprender cómo otros niveles de hiperexcitabilidad impactan en distintas fases del proceso neurogénico y en particular en el proceso de maduración de las células sobrevivientes al evento de hiperexcitabilidad.

## **2. Planteamiento del problema.**

La neurogénesis adulta es un mecanismo de plasticidad neuronal que es susceptible de ser modulado por diferentes eventos, incluyendo condiciones patológicas como la hiperexcitabilidad asociada a trastornos neurológicos como la epilepsia. La epilepsia es un trastorno caracterizado por hiperexcitabilidad e hipsincronía neuronal que induce una actividad convulsiva continua. Sin embargo, la mayoría de los reportes que buscan caracterizar si el proceso neurogénico se altera en condiciones de hiperexcitabilidad están enfocados en la forma más severa y crónica asociada a modelos de epilepsia. Hallazgos previos han sugerido que la intensidad del estímulo epileptogénico puede influir en el proceso neurogénico. No obstante, aún se desconoce si la diferencia entre un modelo de crisis epilépticas leves (CL) y de crisis epilépticas severas (CS) agudas tiene un impacto en el posicionamiento y maduración de las nuevas neuronas y si la presentación de las diferentes crisis podría estar relacionado con alteraciones en la ejecución de tareas de memoria dependientes de hipocampo. Por lo que, en este proyecto, se planteó responder a las siguientes preguntas:

- ¿Qué diferencias hay en el proceso neurogénico del giro dentado en términos de número de nuevas células, su maduración y su posicionamiento en el contexto de la inducción de crisis epilépticas leves y crisis severas agudas?
- ¿Existen diferencias en la ejecución de tareas de memoria dependientes de hipocampo en individuos que experimentan crisis epilépticas leves en comparación con aquellos que experimentan crisis severas agudas?

### **2.1. Objetivo general**

Evaluar las diferencias en el número de células y la maduración de las neuronas nacidas en el contexto de crisis epilépticas leves y de crisis severas agudas y su posible relación con la ejecución de tareas de memoria.

### **2.2. Objetivos particulares**

- Evaluar el impacto de la inducción de crisis epilépticas leves y crisis severas agudas en el número de células y maduración de las nuevas neuronas.

- Evaluar las diferencias en la ejecución de una tarea de memoria dependiente del hipocampo y giro dentado en la condición de crisis leves y crisis severas agudas.

### 2.3. Hipótesis

Los diferentes grados de hiperexcitabilidad impactarán diferencialmente en el número de células nuevas y en su maduración lo cual repercutirá en la ejecución de tareas de memoria dependientes de hipocampo.

## 3. Metodología

### 3.1. Animales

El protocolo de esta tesis se desarrolló de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 y fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Se utilizaron ratones hembra y machos transgénicos jóvenes de entre 2-4 meses de edad. Los animales fueron alojados en cajas de acrílico con ciclos controlados 12h luz / 12h oscuridad, las manipulaciones fueron llevadas a cabo durante el periodo de luz, temperatura entre 22° a 24° y acceso a comida y agua *ad libitum*.

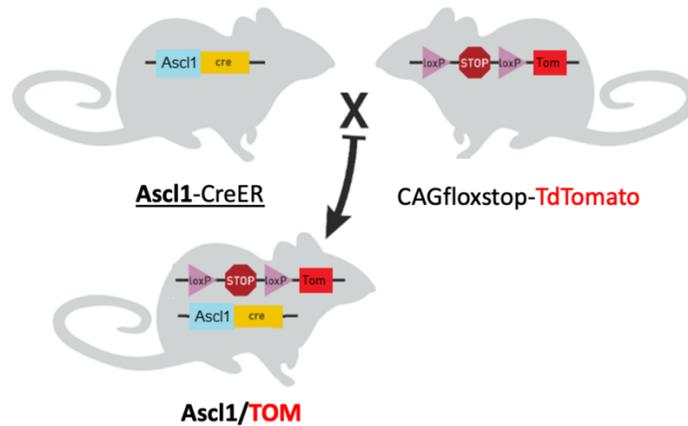
### 3.2. Modelo transgénico ASCL1/TOM.

Para el modelo transgénico utilizado, se emplearon las siguientes líneas:

- **Ascl1<sup>CreERT2</sup> (Ascl1<sup>tm1(Cre/ERT2)Jejo/J</sup>):** Esta línea permite la expresión de la enzima Cre-recombinasa bajo el control del promotor del factor de transcripción proneural Ascl1. La recombinasa Cre se expresa únicamente en las células que expresan Ascl1 (células tipo 1 y tipo 2) y su actividad es inducida por la administración de tamoxifeno (TAM), que facilita la translocación de Cre al núcleo.
- **Línea reportera condicional CAG<sup>floxStop</sup>-tdTomato (clon Ai14) (B6;129S6-Gt(ROSA)26Sor<sup>tm14(CAG-tdTomato)Hze/J</sup>):** Esta línea permite la expresión de la proteína fluorescente roja tdTomato en células donde se ha eliminado el casete de stop, floxeado por una enzima Cre recombinasa.

Los animales Ascl1<sup>CreERT2</sup> se cruzaron con ratones de la línea reportera condicional CAG<sup>floxStop-tdTomato</sup> para generar ratones Ascl1/Tom (Figura 3). Esto permite marcar con la proteína fluorescente roja tdTomato a todas las células que expresan el factor de

transcripción *Ascl1*, lo cual facilita la identificación de nuevas células y el análisis de su maduración a lo largo del proceso neurogénico (Kim et al., 2011b; S. M. Yang et al., 2015b).



**Figura 3. Representación del modelo transgénico *Ascl1/Tom*.** Los ratones *Ascl1-CreER* expresan la recombinasa CreER bajo el control del promotor *Ascl1*. Los ratones CAG-flox-stop-TdTomato contienen el gen reportero TdTomato, precedido por una secuencia de STOP flanqueada por sitios LoxP. Al cruzar estos ratones, la recombinasa Cre elimina la secuencia STOP en presencia de tamoxifeno, permitiendo la expresión de TdTomato en las células que expresan *Ascl1*, generando el ratón *Ascl1/TOM*.

### 3.3. Genotipificación

Para identificar a los ratones *Ascl1/Tom*, se realizó la extracción de ADN a partir de una porción de la cola de ratones de 3 a 4 semanas de edad. Se utilizó el kit Phire™ Tissue Direct PCR (Thermo Fisher Scientific). La PCR se llevó a cabo para amplificar ambas secuencias de interés, las secuencias de oligómeros utilizados para la PCR son Cre reverso 5' GGTTTCCCGCAGAACCTGAA y Cre hacia adelante 5'AGCCTGTTTTGCACGTTCCACC. Una vez obtenidos los productos de la PCR, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% con el tinte fluorescente de ácidos nucleicos GelRed para determinar el genotipo de los ratones mediante el análisis en el fotodocumentador.

### 3.4. Administración de tamoxifeno (TAM)

Con el objetivo de promover la expresión de td-Tomato (Tom) en la progenie de las células que expresan *Ascl1*, se administró a los sujetos tamoxifeno (TAM, Sigma Aldrich; >99%) i.p. (120 µg/g) mediante 4 inyecciones en 2 días consecutivos en un intervalo de 8 horas, dos días previos a la administración de AK. Antes de la administración, los animales fueron pesados para ajustar la dosis.

El volumen de inyección para cada animal se calculó con la siguiente operación:

$$\text{Volumen de inyección } (\mu\text{l}) = \text{Peso del animal (kg)} \times \left( \text{Dosis } \frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right) \times \left( \text{Stock } \frac{1000\mu\text{l}}{30 \text{ mg}} \right)$$

Durante y después de la administración del tamoxifeno, se realizó un monitoreo continuo del bienestar de los animales para garantizar que no experimentaran efectos adversos.

### 3.5. Modelo de ácido kaínico (AK)

Para inducir la hiperexcitabilidad, se administró ácido kaínico (AK, Sigma Aldrich; 0.75 mM) disuelto en buffer de NaOH (pH 7.4) a una concentración de 3 mg/ml por vía intraperitoneal (i.p.) a los ratones. Antes de la administración, los animales fueron pesados para ajustar la dosis. En este estudio, se emplearon dos dosis de AK para inducir crisis epilépticas con diferentes grados de severidad, definidos según las manifestaciones conductuales observadas y clasificadas con base en la escala de Racine. La dosis de 5 mg/kg generó predominantemente crisis clasificadas como Racine 1 y 2, definidas en este estudio como crisis leves agudas (CL), mientras que la dosis de 25 mg/kg produjo crisis clasificadas como Racine 3, 4 y 5, las cuales denominamos crisis severas agudas (CS).

El volumen de inyección para cada animal se calculó con la siguiente operación:

$$\text{Volumen de inyección } (\mu\text{l}) = \text{Peso del animal (kg)} \times \left( \text{Dosis } \frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right) \times \left( \text{Stock } \frac{1000\mu\text{l}}{3 \text{ mg}} \right)$$

Por ejemplo para un ratón de 20 g se hicieron los siguientes cálculos:

- Para la dosis de 5 mg/kg:

$$0.020\text{kg} \times \left( \frac{5\text{mg}}{1\text{kg}} \right) \times \left( \frac{1000\mu\text{l}}{3 \text{ mg}} \right) = 33.3 \mu\text{l}$$

- Para la dosis de 25 mg/kg:

$$0.020\text{kg} \times \left( \frac{25\text{mg}}{1\text{kg}} \right) \times \left( \frac{1000\mu\text{l}}{3 \text{ mg}} \right) = 166.7 \mu\text{l}$$

El comportamiento de los animales se registró en video desde el momento de la administración del AK hasta tres horas después, y las manifestaciones conductuales asociadas a las crisis epilépticas fueron clasificadas utilizando la escala de Racine modificada para ratón. Las **crisis leves (CL)** se definieron como aquellas pertenecientes a

la Fase 1 (inmovilidad) y Fase 2 (movimientos masticatorios y automatismos faciales). Las **crisis severas (CS)** incluyeron Fase 3 (movimientos exacerbados de extremidades superiores), Fase 4 (pérdida de postura, brincos espontáneos y pérdida de equilibrio) y Fase 5 (convulsiones tónico-clónicas generalizadas) (Sharma et al., 2018). Posteriormente, los animales permanecieron en monitoreo y seguimiento. Cabe destacar que, en ninguna de las condiciones experimentales, se observó desarrollo de epileptogénesis, lo que indica que estas crisis representan un modelo experimental de eventos agudos en lugar de un modelo de epilepsia recurrente. Aunque estas manifestaciones pueden asociarse parcialmente con crisis epilépticas leves (Racine 1 y 2) y estatus epiléptico (SE) (Racine 3, 4 y 5), en este trabajo se optó por clasificarlas según su severidad, basándonos en sus características conductuales y motoras observadas, más que en los criterios estrictos de diagnóstico clínico. Este enfoque nos permitió explorar las diferencias en la intensidad de las manifestaciones agudas en un contexto experimental. Esto será detallado en la sección de resultados.

### **3.6. Registros electroencefalográficos (EEG)**

Con el objetivo de conocer el patrón electroencefalográfico y la evolución de la actividad epileptiforme en respuesta a la administración de los distintos tratamientos, se llevó a cabo un registro EEG. Siete días previos al ensayo experimental, se realizó la implantación de electrodos epidurales de forma bilateral en las siguientes coordenadas: desde Bregma (mm): +2 anterior, -3 posterior, +1.5 hemisferio derecho y -1.5 hemisferio izquierdo. El ensayo experimental comenzó con 30 minutos de habituación a los cables de registro asegurando que el animal se encontrara en vigilia tranquila para evitar posibles artefactos de movimiento en el registro. Posteriormente, se obtuvo un registro inicial de 30 minutos, para determinar la actividad basal del sujeto. Después de finalizar el registro inicial, se llevó a cabo la administración de los tratamientos: 15 mg/kg de solución salina, 5 mg/kg de AK o 25 mg/kg de AK, y se registró a los animales durante 3 horas continuas. Simultáneamente, se realizó un registro conductual para evaluar los comportamientos asociados a la administración de los distintos tratamientos como fue descrito en la sección anterior.

Para dar seguimiento a la evolución de la actividad electroencefalográfica, se realizaron registros de seguimiento, los cuales consistieron en el registro de la actividad

durante 60 minutos 1 día y 1, 2 y 3 semanas posteriores al registro EEG inicial para determinar la posible duración y presencia de actividad epileptiforme en la ventana de evaluación de este proyecto.

Para el análisis de los registros, se segmentaron las 3 horas de registros en intervalos de 30 minutos para medir la duración de cada trazo epileptogénico. Se definió como trazo epileptogénico a la actividad en donde se presentaban descargas rítmicas sostenidas o complejos espiga-onda de alta amplitud. El inicio de cada trazo epileptogénico se identificó en el momento en el que aparecía la actividad rítmica sostenida y de alta amplitud, mientras que el final del trazo se estableció cuando la actividad mostraba una reducción en la amplitud y frecuencia, volviendo a niveles basales o con una disminución clara en la intensidad de las descargas. La duración de cada trazo epileptogénico fue medido y contabilizado dentro de cada intervalo de 30 minutos, permitiendo evaluar tanto la intensidad como la dinámica temporal de las descargas epileptogénicas a lo largo del registro. Posteriormente, los datos obtenidos fueron utilizados para comparar las características de la actividad epileptiforme inducida por diferentes dosis de AK (5 mg/kg y 25 mg/kg), en términos de severidad y progresión temporal.

### **3.7. Protocolos conductuales**

#### **3.7.1. Habitación al cuarto de experimentación y al experimentador**

Tres semanas después de la última inyección de TAM, se inició la manipulación de los animales por 3 días consecutivos dentro del cuarto de experimentación. Con ello se procura que los animales atiendan a las tareas y no al cuarto o al experimentador.

Con el objetivo de evaluar las diferencias en la ejecución de los animales en una tarea de memoria en ambas condiciones, se entrenó y evaluó a los sujetos en las tareas de reconocimiento de lugar y condicionamiento aversivo contextual ambas relacionadas con el funcionamiento del hipocampo.

#### **3.7.2. Campo abierto**

Para evaluar los niveles de ansiedad y el desempeño motor de los animales, se expuso a los animales a la tarea de campo abierto 20 días después de la administración de AK. Se colocó de manera individual a cada sujeto en la arena de campo abierto, y se le permitió explorarla durante 10 minutos. Se contabilizó el número de cruces totales y el

tiempo de exploración en el centro y periferia como indicador de ansiedad y actividad locomotora.

### 3.7.3. Memoria de localización de objetivo (OLM).

El día 22 y 23 después de la administración de AK se realizó la tarea de OLM. Este procedimiento se llevó a cabo en una caja de acrílico blanca (40 cm de ancho × 40 cm de largo × 25 cm de alto). En una de las paredes se colocó una tira rectangular con rayas blancas y negras que fungió como una pista contextual. Se utilizaron dos objetos idénticos contruidos con piezas de lego. Esta tarea se realizó en 2 fases:

- **Fase de adquisición:** En el primer día, los animales fueron colocados en la caja, donde se les permitió explorar libremente durante 10 minutos dos objetos idénticos ubicados a una distancia equidistante entre sí. En esta fase, se espera que los animales exploren ambos objetos durante un tiempo similar, lo que indicaría que no hay una preferencia por alguno de los objetos.
- **Fase de memoria:** Se realizó la prueba de memoria a largo plazo 24 horas después de la fase de adquisición, durante la cual uno de los objetos fue movido a una nueva localización. Se espera que los animales, debido a su tendencia a explorar lo novedoso, dediquen más tiempo a explorar el objeto en la nueva localización (LN) en comparación con el objeto en la localización familiar (LF). Se permitió a los animales explorar libremente durante 10 minutos.

Para el análisis, se consideró como comportamiento exploratorio el acercamiento de la nariz al objeto. El escalar o subirse a los objetos no se consideró como conducta exploratoria. El índice de reconocimiento se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Índice de reconocimiento} = \frac{A}{(A+B)}$$

donde A representa el tiempo de exploración del objeto en la localización A y B representa el tiempo de exploración del objeto en la localización B.

### 3.7.4. Condicionamiento de miedo al contexto (CFC).

Esta tarea consiste en dos fases:

- **Fase de condicionamiento:** Esta fase se llevó a cabo dos días antes del sacrificio, en el día 28 y 29 posterior a la administración de AK. La tarea consistió en colocar al sujeto de manera individual en una cámara de condicionamiento, que es una caja de acrílico transparente con una rejilla en el piso de 25 cm de ancho × 25 cm de largo y 20 cm de alto (San Diego Instruments, San Diego, CA, EE. UU). Se permitió al animal explorar libremente durante 2 minutos antes de recibir un choque eléctrico en las patas (0.75 mA, 2 segundos de duración), tras lo cual se retiró al animal de la caja. El segundo día fue idéntico al primero, pero se evaluó el porcentaje de tiempo que el animal mostró la conducta de congelamiento antes del choque eléctrico.
- **Test de memoria:** Después del segundo día de condicionamiento (en el día 30 posterior a la administración de AK), se llevó a cabo la fase de prueba de memoria de miedo al contexto. Esta sesión consistió en exponer a los animales al mismo contexto de condicionamiento, sin el choque eléctrico, durante 180 segundos. Se registró el tiempo de congelamiento de los animales en respuesta al contexto, lo cual refleja su memoria contextual. Los animales fueron sacrificados 30 minutos después de finalizar la prueba (día 30 post administración de AK).

### **3.8. Procesamiento histológico.**

Para obtener el tejido para el análisis histológico, los animales fueron anestesiados con una sobredosis letal de pentobarbital y por medio de una perfusión cardiaca, con 50 ml de NaCl 0.9%, seguido de 50 ml paraformaldehído al 4% diluido en PBS, pH 7.4 se extrajo el tejido para su posterior análisis.

El tejido se almacenó en paraformaldehído a 4°C por 24 horas, y se transfirió a soluciones al 15% y 30% de sacarosa por un periodo aproximado de 48 horas para su crioprotección. Se obtuvieron cortes de secciones coronales de hipocampo de 40 micras de grosor por medio de un criostato (Microm HM550, Thermo Scientific, Waltham, MA, EU). Se obtuvieron series de 4 secciones que se almacenaron en solución crioprotectora (25% etilenglicol, 25% glicerol y PB 0.1M, pH7.4) para su análisis inmunohistoquímico.

#### **3.8.2. Inmunofluorescencia**

Para identificar las células generadas, así como su morfología, después de la CL y CS, se llevaron a cabo inmunofluorescencias en el tejido recolectado para identificar las células

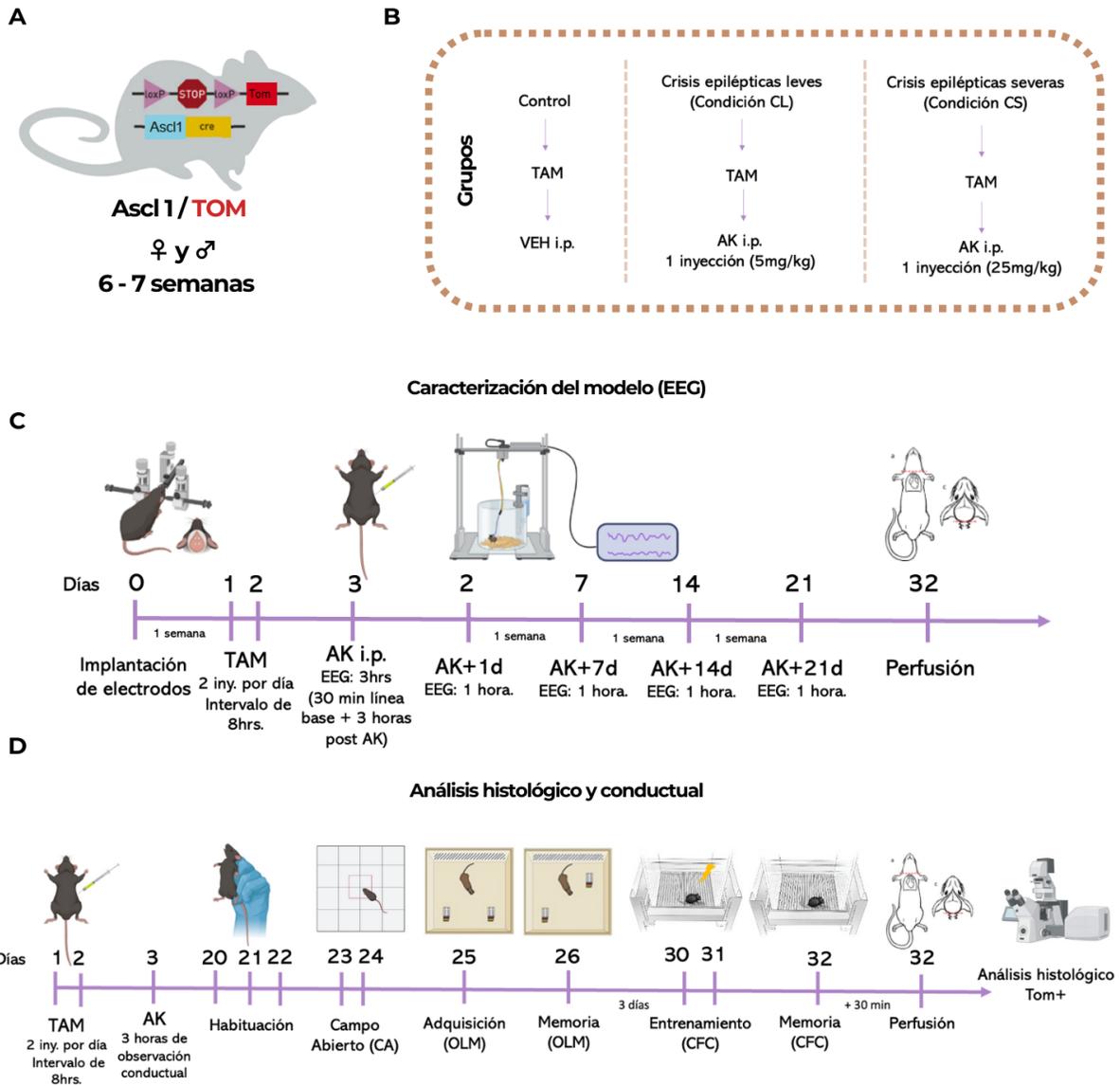
nuevas marcadas por Ascl1/Tom+. Se tomaron cortes seriados (1 de cada 4 secciones) con 120 micras de separación.

Los cortes seleccionados fueron sometidos a 3 lavados en PBS (0.1 M, 0.9% NaCl, pH 7.4) con una duración de 10 minutos cada uno, seguido del paso de permeabilización con PBS-Tx (Tritón 0.3%) durante 30 minutos. Posteriormente, se llevó a cabo el paso de bloqueo donde los cortes fueron sumergidos en solución de bloqueo (5% de suero normal de caballo, Vector Laboratories, Burlingame, CA; en PBS-Tx 0.3%) a temperatura ambiente. Se incubó el anticuerpo primario para detectar Tom (anti-RFP conejo, 1:1000) durante 48 horas a 4°C. Después de la incubación el anticuerpo primario, se llevaron a cabo 3 lavados PBS de 10 minutos y se incubó en anticuerpo secundario (Alexa Fluor 546 anti-conejo Invitrogen; Daylight 594 anti-cabra, Jackson Immunoresearch por 24 horas a temperatura ambiente. Para marcar los núcleos, los cortes fueron expuestos a DAPI (1:350) durante 10 minutos seguido de 3 lavados con PBS de 10 minutos cada uno. Finalmente, los cortes fueron montados en laminillas silanizadas Superfrost Plus utilizando el medio de montaje para fluorescencia (Dako; Carpintería, EUA.) para ser almacenados a 4°C.

### **3.9. Estrategia experimental**

Para llevar a cabo los procedimientos previamente descritos, se planteó la siguiente estrategia experimental (Figura 4):

## Estrategia experimental



**Figura 4. Descripción esquemática de los procedimientos experimentales.** a) Esquema del modelo transgénico Ascl1/TOM: Visualización de los constructos genéticos. b) Grupos experimentales: Se presentan las diferentes condiciones experimentales, dividiendo a los sujetos en grupos según la severidad de las crisis epilépticas inducidas por AK. c) Línea del tiempo detallada de los registros EEG en los diferentes grupos experimentales. d) Línea del tiempo de los procedimientos previos para la inducción de la recombinación, la administración de AK y las pruebas de memoria. El análisis EEG y los protocolos conductuales se realizaron en grupos de sujetos independientes. Se incluye el análisis mediante técnicas histológicas. TAM: Tamoxifeno, AK: ácido kaínico, EEG: electroencefalograma, CA: campo abierto, OLM: memoria de localización de objeto, CFC: memoria de condicionamiento de miedo al contexto. (Imagen creada con Biorender.com).

### 3.10. Microscopía y análisis de imágenes.

#### Adquisición de imágenes

Se obtuvieron las imágenes analizadas a partir de 5 cerebros de la condición control, 6 cerebros de la condición CL y 6 cerebros de la condición CS. Se analizó la región correspondiente al GD dorsal, de 4 secciones seriadas que se capturaron mediante microscopía confocal (Nikon A1R + STORM). Las imágenes se capturaron en el eje z, utilizando un objetivo de inmersión en aceite de 40x, con un total de 25 a 29 cortes ópticos adquiridos a intervalos de 1.5 µm entre cada plano focal, en modo serial. Se analizó de manera aleatoria una región de interés (ROI) de la cresta, dos de la capa suprapiramidal y una de la infrapiramidal.

#### Estimación semiestereológica del número total de células

Se llevó a cabo la estimación del número total de nuevas células por mm<sup>3</sup> en todo el GD y sus subregiones. La estimación se basó en la ecuación del fraccionador óptico reportada por Keuker et al (Keuker et al., 2001):

$$N = \Sigma Q * \frac{1}{ssf} * \frac{1}{asf} * \frac{1}{tsf}$$

donde: N es el número total de células estimado, Q es el conteo total de células, *ssf* es la fracción de muestreo de la sección (section sampling fraction), *asf* es la fracción del área de la muestra (area sampling fraction), y *tsf* es la fracción del grosor de la muestra (thickness sampling fraction). El volumen analizado (mm<sup>3</sup>) del giro dentado fue estimado con base en el principio de Cavalieri.

$$V = T * \Sigma A_i$$

donde V es el volumen estimado, T es el inverso de la fracción de muestreo de la sección multiplicado por el grosor de la sección, y *A<sub>i</sub>* es el área analizada de cada sección.

#### Clasificación para el análisis de posición y maduración de las nuevas neuronas (Tom+)

La identificación de células Tom+ se llevó a cabo mediante el plugin Weka Segmentation 3D y las herramientas 3D counter y analyze particles en Fiji.

Para el análisis del posicionamiento, se siguió el método reportado por Esposito et al (Espósito et al., 2005b). Se realizó un conteo del número de células ubicadas en la zona

subgranular (ZSG), en la capa granular (CGL), la cual se dividió en dos: CGL1 (cerca al hilus) y CGL 2 (más cercana a la zona molecular), y en el hilus (H) del GD.

Para el análisis de maduración de las células, se aplicó el criterio reportado por Esposito et al (Espósito et al., 2005b) con algunas modificaciones:

- **RGL** (Radial Glia-Like, por sus siglas en inglés): Caracterizadas por el despliegue de una dendrita larga con prolongaciones muy cortas.
- **Tipo A/B**: Corresponde a la morfología de progenitor neuronal, caracterizado por un soma alargado, con o sin prolongaciones a los costados que van paralelos a la CGL.
- **Tipo C**: Caracterizadas por desplegar un árbol dendrítico apical sin espinas, que se extiende por la CGL, alcanzando la capa molecular medial.
- **Tipo D**: Células con fenotipo de neurona madura, con un soma redondeado y el despliegue del árbol y espinas dendríticas hacia la capa externa de la capa molecular.

### 3.11. Análisis estadístico.

Los datos obtenidos de la cuantificación de las células Tom+ en los distintos grupos pasaron la prueba de normalidad Shapiro-Wilk para verificar su distribución normal ( $p > 0.05$ ). Para comparar la estimación del número total de células Tom+, la proporción de células ubicadas en las distintas zonas GD (SGZ, CGL1, CGL2 e hilus), y la proporción de células según su clasificación fenotípica y fase de maduración (RGL, tipo A/B, tipo C y tipo D) entre los distintos grupos experimentales, se aplicó un análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de una prueba de Tukey para comparaciones múltiples.

Para el análisis de actividad EEG global entre condiciones (5mg/kg de AK y 25 mg/kg de AK) se llevó a cabo una prueba de t de Student para comparar la actividad epileptiforme global. Para analizar el número de cruces en la prueba de CA y el porcentaje de tiempo de inmovilidad en la fase de memoria de la prueba de CFC, se utilizó un ANOVA de una vía, seguido de una prueba de Tukey para comparaciones múltiples entre cada una de las condiciones experimentales. Para el análisis de la prueba de OLM, se aplicó la prueba t de Student para muestras pareadas para comparar los índices de exploración entre las localizaciones (L1/LF y L2/LN) en cada grupo experimental, tanto en la fase de adquisición como en la fase de memoria.

Se consideró como estadísticamente significativo un valor de  $p < 0.05$ . Los datos fueron analizados utilizando el software GraphPad Prism 10.1.1.

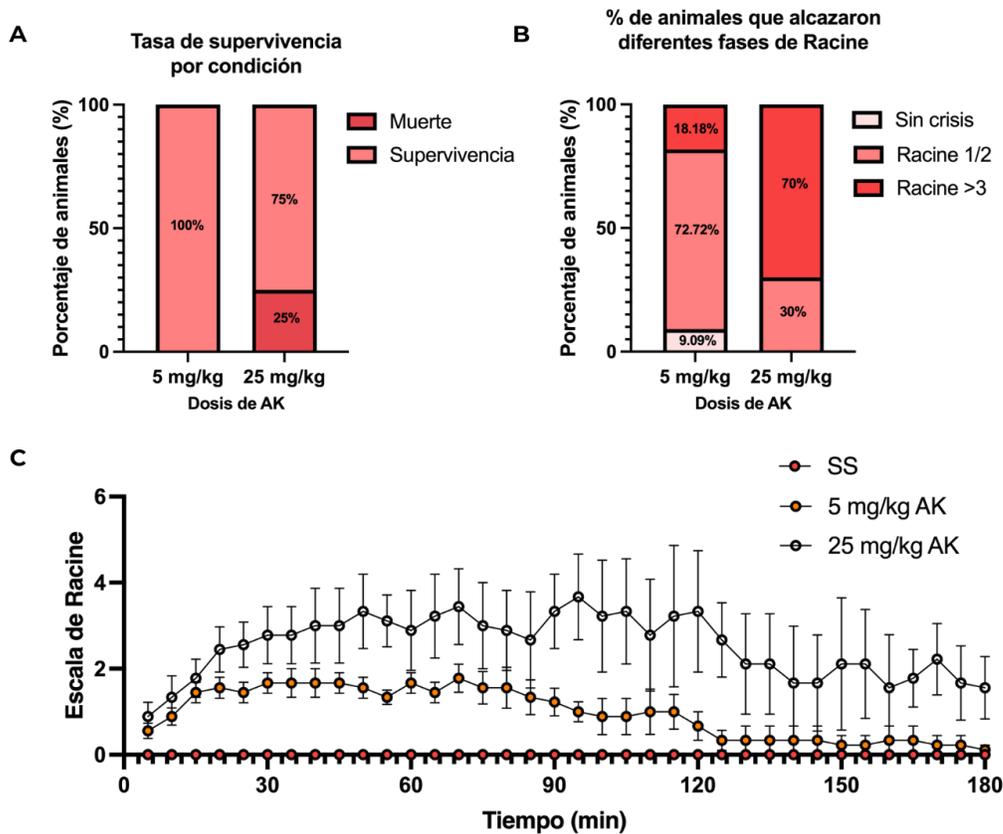
## **4. Resultados.**

### **4.1. Análisis conductual de la inducción de crisis por la administración sistémica de ácido kaínico.**

Para caracterizar nuestro modelo experimental, realizamos un análisis conductual tras la administración de dos dosis distintas de AK. Este análisis permitió clasificar a los grupos experimentales según la severidad de las crisis inducidas. La administración i.p. de AK, está asociada con una alta tasa de mortalidad, lo cual concuerda con nuestros resultados (Rusina et al., 2021b). En nuestros resultados, observamos que aproximadamente el 25% de los animales tratados con una dosis alta de AK (25mg/kg) presentaron crisis epilépticas tónico-clónico generalizadas que culminaron en la muerte, mientras que los animales tratados con una dosis baja (5mg/kg) no presentaron crisis tónico-clónicas generalizadas y, en consecuencia, no se registraron muertes experimentales (Figura 5a).

Por otro lado, se evidenció una considerable variabilidad entre sujetos. Aunque los animales recibieron la misma dosis, la intensidad de las crisis epilépticas fue distinta entre ellos, lo que va en concordancia con otros trabajos (Benkovic et al., 2004b). En el grupo con una dosis baja de AK (5mg/kg), el 72.72% de los animales experimentaron crisis epilépticas con manifestaciones motoras correspondientes a la escala de Racine 1/2 mientras que, en el grupo con una dosis alta de AK (25mg/kg), el 70% de los sujetos (incluyendo a los animales que no sobrevivieron) presentaron crisis epilépticas con manifestaciones motoras correspondientes a la escala de Racine >3. Para el análisis histológico y conductual se clasificaron los grupos experimentales en función de la severidad de las crisis epilépticas observadas en ambas condiciones experimentales (Figura 5b). Para evaluar el efecto conductual de la administración de 5 mg/kg AK y 25 mg/kg AK, se observó el comportamiento de los diferentes grupos durante un período de 3 horas después de la administración i.p. de AK (Figura 5c). La contabilización de las manifestaciones conductuales se llevó a cabo describiendo el tipo de comportamiento observado en intervalos de 5 minutos, utilizando la escala de Racine modificada para ratones descrita en la metodología. Este enfoque permitió clasificar y registrar de manera sistemática las respuestas conductuales inducidas por la administración de AK en cada grupo.

En el grupo administrado con 5 mg/kg de AK, se observaron manifestaciones conductuales y motoras correspondientes a las fases 1 (inmovilidad) y 2 (movimientos masticatorios), las cuales se mantuvieron durante aproximadamente 1 a 1.5 horas antes de que los animales retornaran a una actividad basal. Estas características llevaron a definir este grupo como **crisis leves (CL)**. Por otro lado, en el grupo que recibió 25 mg/kg de AK, los animales presentaron comportamientos motores, correspondientes a la fase 3 (movimientos de extremidades) y la fase 4 (pérdida de equilibrio y crisis tónico-clónicas), principalmente durante la primera y segunda hora, con la persistencia de las fases 1 y 2 hasta por 3 horas. Este grupo se definió como **crisis severas (CS)**. Si bien estas manifestaciones pueden asociarse con un modelo de crisis epilépticas transitorias (Racine 1 y 2) y con un modelo de estatus epiléptico (SE) (Racine 3, 4 y 5), respectivamente, optamos por clasificar las condiciones experimentales en función de la severidad de las manifestaciones motoras observadas. Este enfoque no solo permitió establecer dos modelos de crisis agudas con diferente intensidad y duración, sino que también sirvió como base para los análisis posteriores sobre neurogénesis que serán detallados en las siguientes secciones.



**Figura 5. Caracterización conductual del modelo tras la administración intraperitoneal (i.p.) de dos dosis distintas de AK.** a) Porcentaje de animales que sobrevivieron tras la administración de 5 mg/kg y 25 mg/kg de AK, en relación con el número total de animales tratados. b) Porcentaje de animales que alcanzaron las distintas fases (Sin crisis, Fase 1/2 y Fase >3) en función de la dosis administrada de AK. c) Representación gráfica de la fase alcanzada a lo largo del tiempo tras la administración de AK. El gráfico muestra el tiempo transcurrido desde el inicio de la administración. Las muestras representativas son: solución salina (SS, n=9, círculos azules), 5 mg/kg AK (n=10, círculos naranjas) y 25 mg/kg AK (n=9, círculos rojos).

#### **4.2. Análisis de los patrones de actividad electroencefalográfica inducidos por la administración de AK.**

Con el objetivo de identificar el patrón de actividad electroencefalográfica y establecer su relación con las manifestaciones motoras de las crisis epilépticas previamente descritas, se realizó un registro electroencefalográfico (EEG) en cada condición experimental el día de la administración, utilizando solución salina para el grupo control y con una dosis de 5mg/kg y 25 mg/kg de AK para los grupos CL y CS respectivamente durante 3 horas post-AK. Previamente a la administración, se evaluó la actividad electroencefalográfica en los estados de vigilia activa y vigilia tranquila y se obtuvo una línea basal de actividad electroencefalográfica por 30 minutos. Posteriormente, se llevó a cabo un seguimiento semanal (1, 7, 14, 21 días post AK) por 1 hora para evaluar la actividad EEG en periodos posteriores a la administración del tratamiento (Figura 6a).

Se muestran un muestrario de los trazos representativos en cada una de las condiciones experimentales: grupo control (Figura 6b), Grupo CL (Figura 6c) y CS (Figura 6d). Se observó que los animales de la condición CL presentaron una duración más corta de los trazos de la actividad electroencefalográfica en comparación con el grupo de CS, en el cual la duración de los trazos fue prolongada. En contraste, en el grupo CS, los trazos eran continuos. Además, se identificó una asociación entre la duración e intensidad de la actividad y la severidad de las manifestaciones motoras de acuerdo a la escala de Racine.

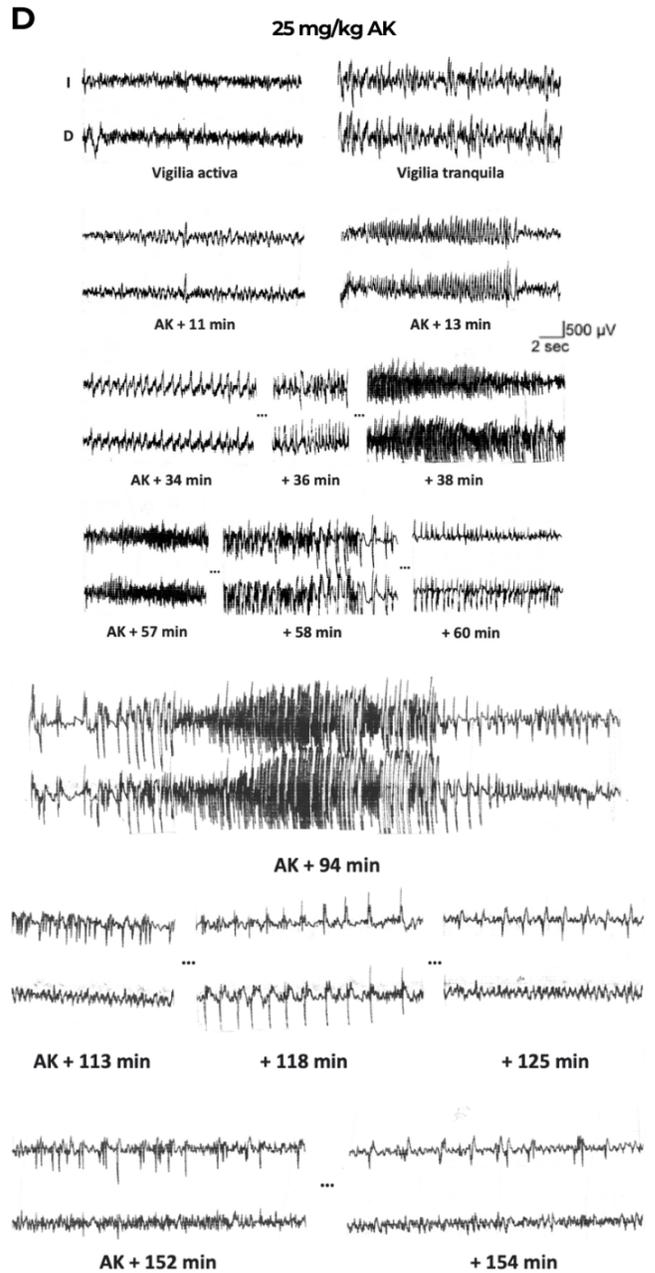
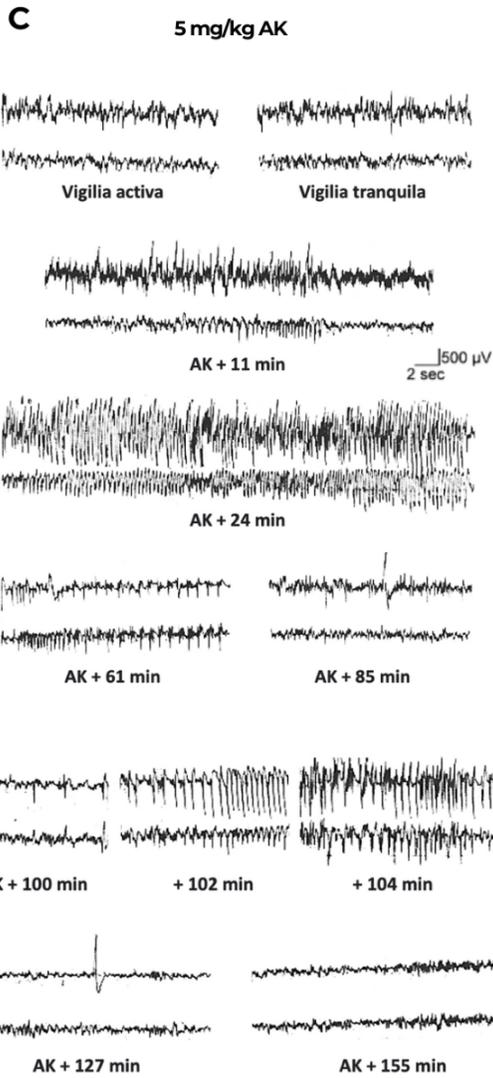
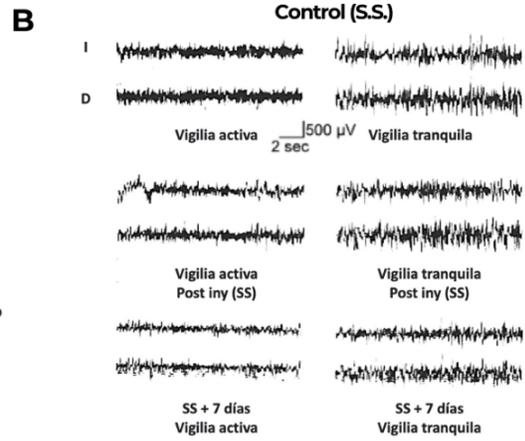
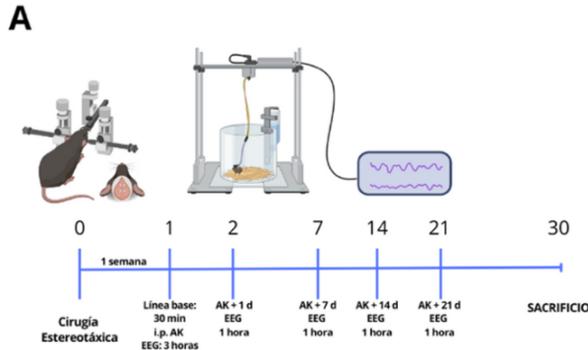
La latencia de la primera crisis fue en promedio de 11 minutos post-administración de AK en los animales del grupo CL, mientras que en los animales del grupo CS el promedio fue de 6 minutos post-AK, lo que sugiere un inicio más tardío de la actividad con la dosis de 5 mg/kg de AK en comparación con la dosis de 25 mg/kg de AK. En el grupo CL, se observó una disminución gradual de la actividad hacia las 3 horas, mientras que en el grupo CS, la actividad no cesó y se mantuvo exacerbada. Es importante destacar que esta

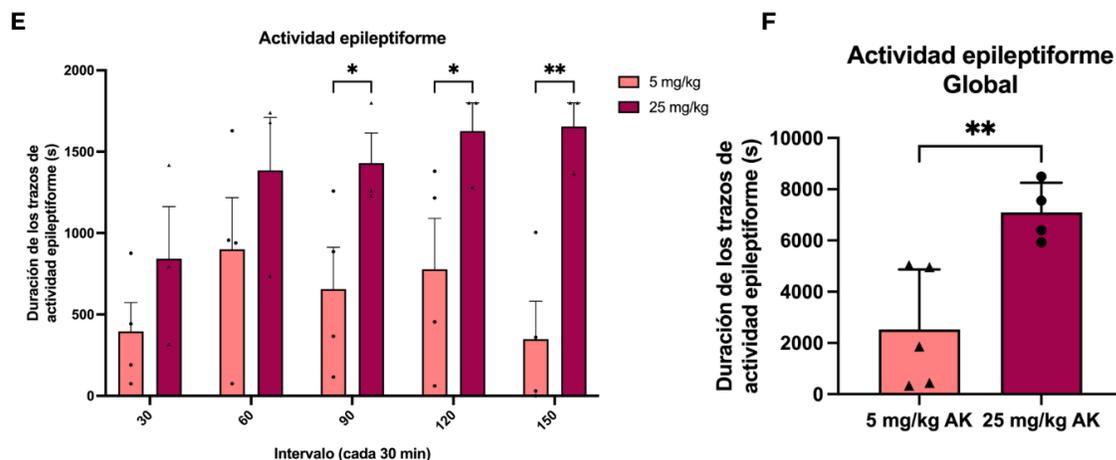
actividad estuvo limitada exclusivamente al día de la administración, ya que en el seguimiento posterior no se observaron crisis espontáneas recurrentes (SRS, *spontaneous recurrent seizures*, por sus siglas en inglés).

Se realizó un análisis de la duración de los trazos epileptiformes registrados a intervalos de 30 minutos a lo largo de las 3 horas de registro (Figura 4e). El análisis consideró tres factores principales: tiempo (intervalos de 30, 60, 90, 120 y 150 minutos), tratamiento (grupo CL vs. CS) e interacción entre estos dos factores. En general, el grupo CL mostró trazos epileptiformes de menor duración en comparación con el grupo CS. Durante los primeros 30 y 60 minutos, aunque no se observaron diferencias significativas entre grupos, la duración de los trazos fue mayor en el grupo CS (media $\pm$ SEM) (30min: 814 $\pm$ 227.5; 60min: 1396 $\pm$ 230.1), que en el grupo CL (30min: 324 $\pm$ 155.1; 60min: 759.8 $\pm$ 283.5), manteniéndose esta tendencia con el tiempo. A los 90 minutos, la diferencia fue más evidente, con el grupo CL presentando una menor duración de los trazos (90min: 538 $\pm$ 231.5) en contraste con el grupo CS (90min: 1522 $\pm$ 160.66) (ANOVA de dos vías:  $F_{(2,45)}= 56.30$ , \*\* $p<0.01$ ), diferencia que persistió hasta el final del registro (CL: 120min: 629.6 $\pm$ 283.9; 150min: 278.8 $\pm$ 193.6); (CS: 120min: 1670 $\pm$ 130; 150min:1691 $\pm$ 109).

En términos generales, se registró una actividad de mayor duración en el grupo CS (media $\pm$  SD) (7093  $\pm$  1160) en comparación con el grupo CL (2530  $\pm$  2337); ( $t(7)=3.538$ , \*\* $p<0.001$ ) (Figura 6f) (expresado en segundos).

La evaluación conductual, junto con el análisis electroencefalográfico, nos permitió establecer un modelo experimental que refleja las diferencias en las manifestaciones de las crisis epilépticas y los patrones de actividad epileptogénica tras las distintas administraciones de AK. Esto nos permitió clasificar a los sujetos experimentales en dos grupos: crisis leves (CL) y crisis severas (CS) agudas. Estas observaciones facilitaron la clasificación precisa de los grupos experimentales según la severidad de las crisis, permitiendo llevar a cabo los análisis que se describen en las siguientes secciones de resultados.





**Figura 6. Representación del patrón electroencefalográfico en las condiciones control, 5 mg/kg de AK y 25 mg/kg de AK.** a) Esquema del protocolo experimental de Registros EEG. b) Muestrario de la evolución de la actividad electroencefalográfica de un sujeto control. Se señala un trazo representativo durante la etapa de vigilia activa (panel izquierdo) y vigilia tranquila (panel derecho). d) Muestrario de la evolución temporal de la actividad electroencefalográfica en un sujeto administrado con una dosis de 5 mg/kg de AK (Grupo CL). En el panel izquierdo, se presenta un trazo representativo durante la etapa de vigilia activa, mientras que en el panel derecho se muestra la actividad durante la vigilia tranquila previa a la administración de AK. A continuación, se presenta un trazo correspondiente al periodo de latencia de inicio de la primera crisis, y los trazos posteriores a la administración están señalados con el periodo de tiempo después de la misma. e) Muestrario de la evolución temporal de la actividad electroencefalográfica en un sujeto administrado con una dosis de 25 mg/kg de AK. e) Gráfico que detalla la duración en segundos en la cual el sujeto exhibió actividad epileptiforme. f) Gráfico de la duración de la actividad epileptiforme en los grupos CL y CS durante todo el registro (3hrs). El eje horizontal representa intervalos de 30 minutos, mientras que el eje vertical indica la duración acumulativa de la actividad epileptiforme en segundos. D: hemisferio derecho. I: hemisferio izquierdo. La barra de escala representa 500 mV/ 2s.

### 4.3. Diferencias en el proceso neurogénico por la inducción de dos perfiles de hiperexcitabilidad.

Con el objetivo de analizar posibles diferencias en el proceso neurogénico en términos de número total de células nuevas, posicionamiento en la CGL y maduración morfológica, se realizaron capturas utilizando microscopía confocal en animales con crisis leves (CL, Fases 1-2) y crisis severas (CS, Fase >3) inducidas de manera aguda por la administración i.p. de AK. Cabe aclarar que para este análisis, las condiciones experimentales se definieron exclusivamente con base en el patrón de actividad EEG y la severidad de las manifestaciones conductuales observadas, sin considerar la dosis administrada (modelos

definidos en la sección anterior). Para el análisis, se obtuvo una captura panorámica del giro dentado (20x) para examinar el proceso neurogénico de manera global y se analizaron regiones de interés (ROI) de la cresta, 2 campos de la capa suprapiramidal y una de la capa infrapiramidal en cada condición experimental (Figura 7A, 7B, 7C).

#### **4.3.1. Análisis del número estimado de células nacidas en cada contexto de hiperexcitabilidad.**

Para determinar posibles diferencias en el número estimado de células nacidas en cada condición, se llevó a cabo un conteo semiestereológico de células Tom+ en todas las condiciones experimentales. Los resultados indican que no hay diferencias significativas en el número de células Tom+ en todo el GD entre las diferentes condiciones experimentales. Se realizó un análisis separado de las regiones anteriormente descritas, y tampoco se observaron diferencias en el número de células entre las condiciones experimentales (Figura 7D).

Para evaluar si había diferencias en el número de células entre sexos, se llevó a cabo un análisis donde se separaron machos y hembras (n=3 en cada grupo). En el grupo de hembras, se observó una tendencia de un mayor número de células Tom+ en la condición CS ( $162780 \pm 12061$  células por  $\text{mm}^3$ ) en comparación con el grupo CL ( $98545 \pm 30822$  células por  $\text{mm}^3$ ) en el GD completo (ANOVA de una vía:  $F_{(2,8)} = 3.390$ ,  $p=0.0784$ ). Asimismo, las hembras del grupo control mostraron un mayor número de células en comparación con CL en el GD completo ( $146397 \pm 13896$  células por  $\text{mm}^3$  vs  $98545 \pm 30822$  células por  $\text{mm}^3$ ) sin embargo, no es estadísticamente significativo (Figura 7E). Es decir, en hembras, en el grupo control y CS hay una tendencia a un mayor número de células Tom+ que en la condición de CL. Sin embargo, la dispersión de los datos sugiere la necesidad de incrementar el número de sujetos experimentales. En los machos, no se encontraron diferencias en el número de células en ninguna de las condiciones (Figura 7F). En términos globales, parece no haber diferencias significativas en la estimación del número de nuevas células entre los distintos perfiles de hiperexcitabilidad en esta ventana de 30 días post-inducción de crisis.

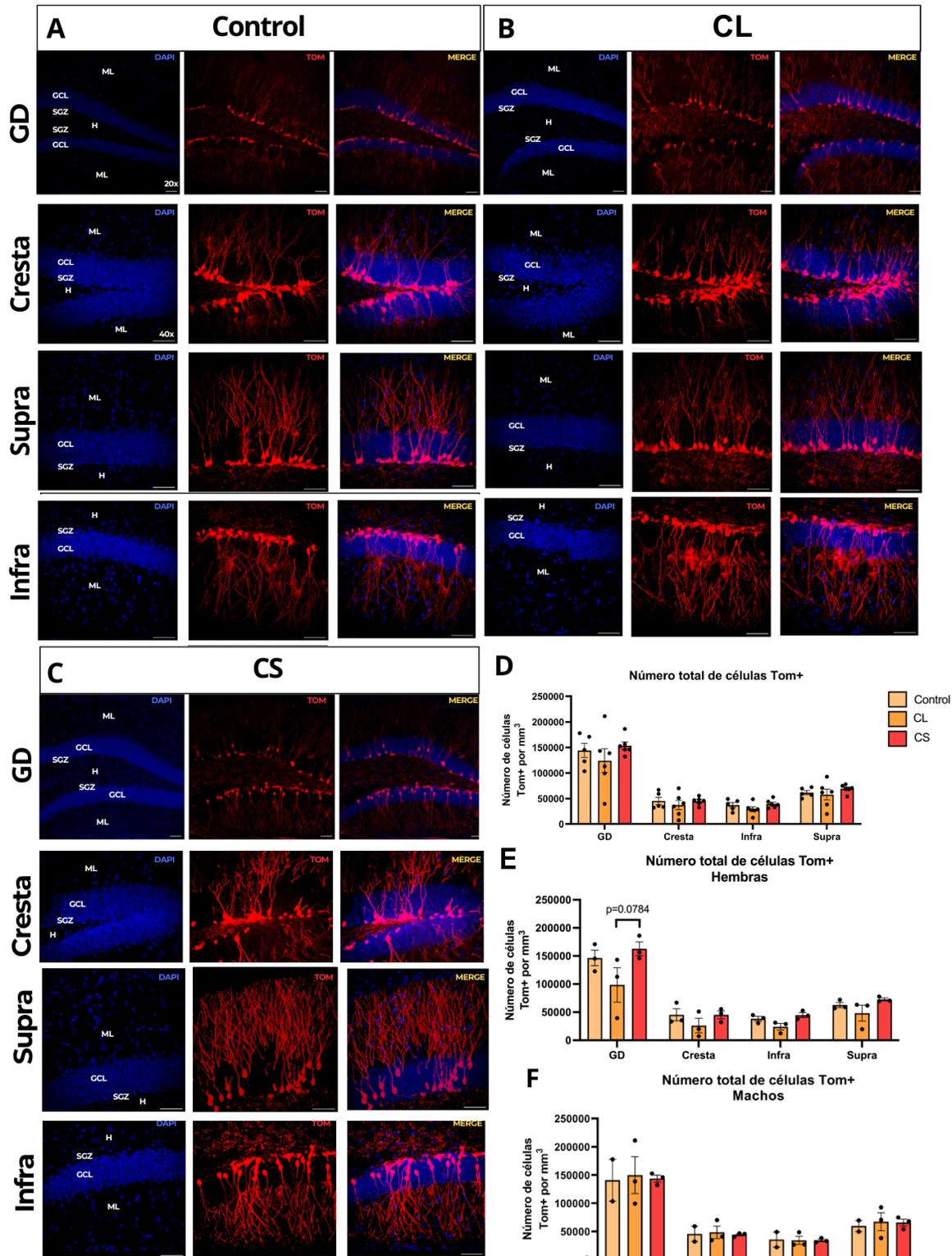


Figura 7. Estimación del número de células nuevas Tom+ en el GD de la condición control, CL y CS. a) Imágenes representativas de las nuevas células Tom+ (rojo) y las células granulares preexistentes (azul) en el GD de un sujeto del grupo control. b) Imágenes representativas del GD de un sujeto del grupo CL. c) Imágenes representativas del GD de un sujeto del grupo CS. Cada conjunto de imágenes por condición

presenta una vista global del GD (panel superior), la cresta (segundo panel), la capa infrapiramidal (tercer panel) y la capa suprapiramidal (panel inferior). Las capas del GD (SGZ, CGL, ML e H) están indicadas con leyendas blancas. Las imágenes son proyecciones máximas obtenidas de z-stacks provenientes de una magnificación a 40x. d) Número total estimado de células Tom+ por mm<sup>3</sup> en el GD completo, la cresta, la zona suprapiramidal (supra) y la zona infrapiramidal (infra) en todas las condiciones. e) Número total estimado de células Tom+ por mm<sup>3</sup> en el GD completo, la cresta, la zona suprapiramidal (supra) y la zona infrapiramidal (infra) en todas las condiciones en hembras. f) Número total estimado de células Tom+ por mm<sup>3</sup> en el GD completo, la cresta, la zona suprapiramidal (supra) y la zona infrapiramidal (infra) en todas las condiciones en machos. DAPI (azul), Tom+ (rojo). \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, p<0.0001. ANOVA de una vía seguido de una prueba *post hoc* Tukey. Escala: 50 µm.

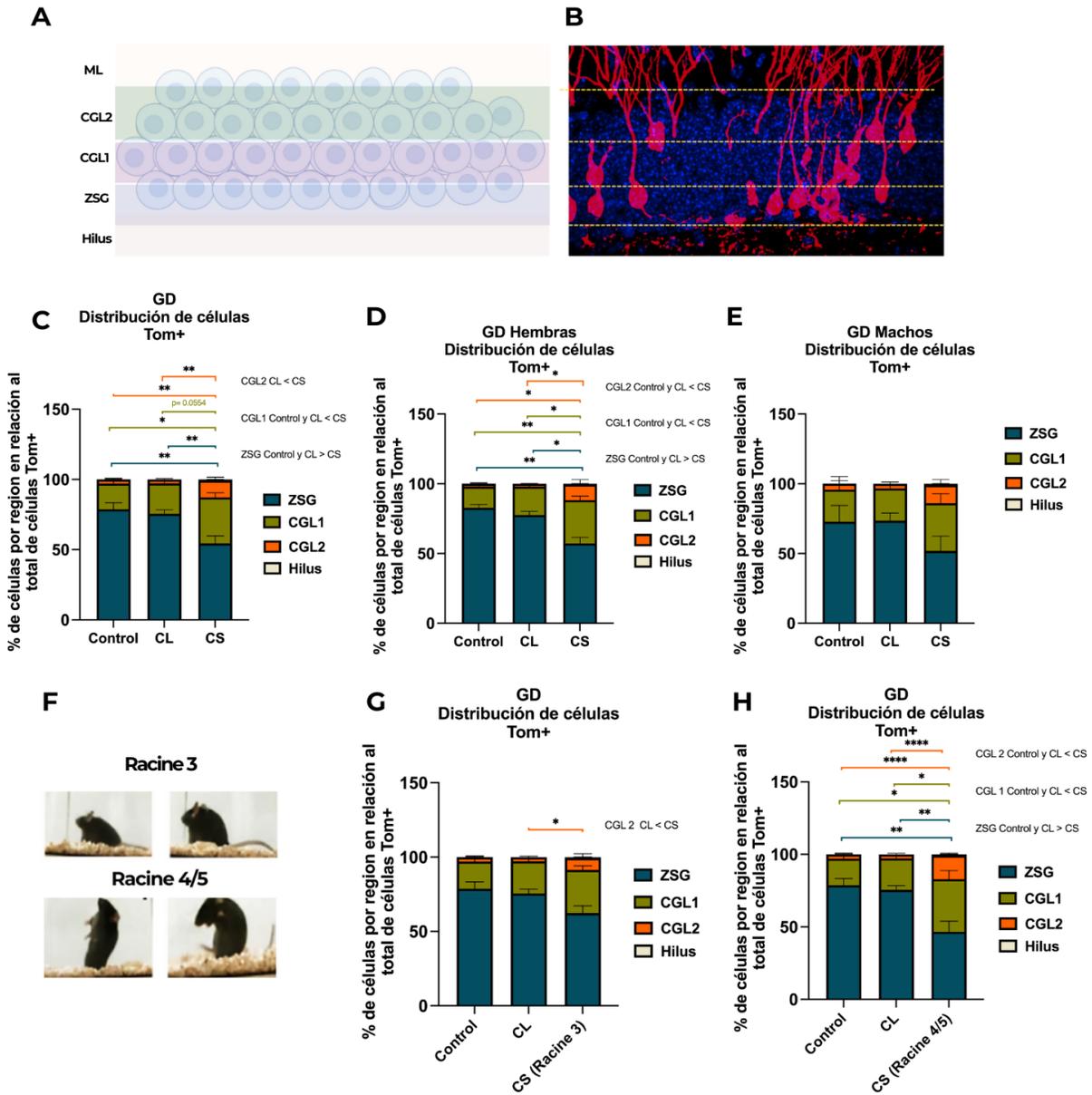
#### **4.3.2. Análisis de la distribución y posicionamiento de las nuevas células nacidas en cada contexto de hiperexcitabilidad.**

El posicionamiento adecuado de las nuevas células dentro de la capa granular es crucial para el establecimiento de conexiones con las neuronas preexistentes del circuito hipocampal, además de ser un indicador de la fase de maduración (Espósito et al., 2005b). Por ello, se buscó determinar si había diferencias en términos de posicionamiento y migración de las nuevas células nacidas en los distintos contextos de hiperexcitabilidad. Para ello, evaluamos la distribución de las células Tom+ dentro de la ZSG, la CGL y el hilus (H) del GD (Figura 8 a,b). El análisis muestra que hay una mayor proporción de células ubicadas en la ZSG en las condiciones control (78.65% ± 10.23 de células Tom+; \*\*p<0.01) y CL (76.05% ± 7.405) en contraste con la condición CS (55.56% ± 13.708; ANOVA de una vía:  $F_{(2,14)} = 9.275$ , \*\*p<0.01). En concordancia, hay una mayor proporción de células en la condición CS ubicadas en CGL 1 (32.77% ± 8.183) y CGL 2 (12.45% ± 6.025), en comparación con el grupo control (CGL 1: 18.24% ± 8.15; \*p<0.05; CGL 2: 2.81 ± 2.29: \*\*p<0.01), y CL (CGL 1: 21.91% ± 5.64; ANOVA de una vía:  $F_{(2,14)} = 5.83$ ; CGL 2: 2.75% ± 1.65; ANOVA de una vía:  $F_{(2,14)} = 11.83$ , \*\*p<0.01). No se observaron diferencias entre los grupos de control y CL (Figura 8c).

Para determinar si el sexo podría estar determinando diferencias en la distribución, se realizó un análisis separado de hembras y machos (n=3 por grupo). En el análisis de hembras, se refuerzan las observaciones anteriores, ya que se encontraron diferencias significativas en todas las comparaciones (Figura 8d). En el caso de los machos, se observa una tendencia similar a la hembras en la proporción de células ubicadas en la SGZ, con un

mayor número de células en las condiciones control y CL en comparación con la condición CS. Sin embargo, estas diferencias no son estadísticamente significativas (Figura 8e).

Para obtener mayor claridad sobre cómo la severidad de las crisis impacta directamente en el proceso de maduración, se realizó una división entre animales de la condición CS que pasaron la mayor parte del tiempo presentando crisis de escala Racine 3 (movimiento exacerbado de extremidades) y aquellos con crisis tónico-clónicas generalizadas correspondientes a las fases 4 y 5 (pérdida de postura) (n=3 por cada grupo) (Figura 8f). En el análisis de animales del grupo CS Racine 3, no se observaron diferencias significativas en la proporción de células ubicadas en ZSG y CGL1 entre los grupos control, CL y CS Racine 3. Sin embargo, en la región CGL2, se encontró una mayor proporción de células en el grupo CS ( $8.04 \pm 4.91$ ) en comparación con el grupo CL ( $2.75\% \pm 1.65$ ; ANOVA de una vía:  $F_{(2,11)} = 4.311$ ;  $*p < 0.05$ ) (Figura 8g). En concordancia con lo anterior, el análisis de CS Racine 4/5 remarca los efectos descritos anteriormente con respecto al posicionamiento de las células. Se observaron diferencias significativas en la proporción de células ubicadas en la ZSG, con el grupo CS Racine 4/5 mostrando una menor proporción ( $46.61\% \pm 12.63$ ) en comparación con los grupos control ( $78.65\% \pm 10.23$ ; ANOVA de una vía:  $F_{(2,11)} = 12.25$ ;  $**p < 0.01$ ) y CL ( $76.05\% \pm 7.405$ ;  $**p < 0.01$ ). En la región CGL1, también se encontraron diferencias significativas, con el grupo CS Racine 4/5 presentando una mayor proporción de células ( $36.32\% \pm 10.25$ ) en comparación con los grupos control ( $F_{(2,11)} = 12.25$ ;  $*p < 0.05$ ) y CL ( $F_{(2,11)} = 12.25$ ;  $*p < 0.05$ ). En la región CGL2, esta tendencia se acentuó aún más, observándose una mayor proporción de células en el grupo CS Racine 4/5 ( $16.23\% \pm 2.90$ ) en comparación con el grupo CL ( $F_{(2,11)} = 45.84$ ;  $****p < 0.0001$ ) y control ( $F_{(2,11)} = 45.84$ ;  $****p < 0.0001$ ) (Figura 8h). De manera global, hay una mayor proporción de células ubicadas en la ZSG en los grupos de control y CL, mientras que hay una mayor proporción de células distribuidas en CGL 1 y CGL 2 en el grupo CS a los 30 días post-inducción de crisis.



**Figura 8. Evaluación de la distribución de células nuevas Tom+ en el GD en las condiciones de control, CL y CS.** a) Diagrama esquemático representativo de las subdivisiones del GD (ZSG, CGL 1, CGL 2 e Hilus) para el análisis de distribución. b) Imagen representativa de las subdivisiones del GD para el análisis de distribución. c) Porcentaje de las células Tom+ distribuidas en el GD completo en relación con el número total de Tom+ en las condiciones de control, CL y CS (ANOVA). d) Porcentaje de las células Tom+ distribuidas en el GD completo en relación con el número total de Tom+ en las condiciones de control, CL y CS en el grupo de hembras. e) Porcentaje de las células Tom+ distribuidas en el GD completo en relación con el número total de Tom+ en las condiciones de control, CL y CS en el grupo de machos. f) Fotografías representativas de las crisis conductuales correspondientes a la fase Racine 2/3 (panel superior) y Racine 4/5 (panel inferior). g) Porcentaje de las células Tom+ distribuidas en el GD completo en relación con el número total de Tom+ en las condiciones de control, CL y CS Racine 3. h) Porcentaje de las células Tom+ distribuidas en el GD

completo en relación con el número total de Tom+ en las condiciones de control, CL y CS Racine 4/5. Todos los resultados están expresados como promedio  $\pm$  error estándar (SEM). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ . ANOVA de una vía seguido de una prueba *post hoc* Tukey.  $n = 6$  animales por grupo.

#### **4.4.3. Análisis morfológico de las nuevas células nacidas en distintos contextos de hiperexcitabilidad.**

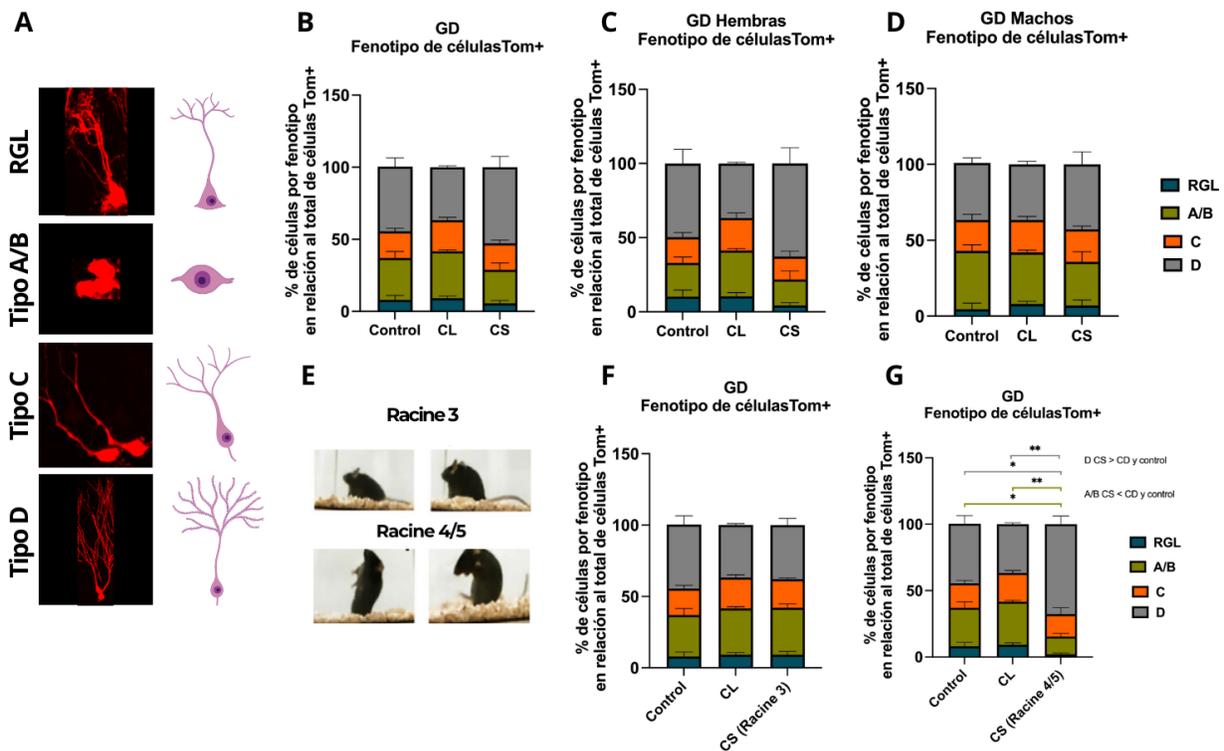
Además del posicionamiento y migración como indicadores de la fase de maduración de las nuevas células, la morfología de las nuevas células está igualmente asociada al estado de maduración (Esposito et al., 2005). Para detallar con mayor precisión la morfología de las células generadas en cada condición, se realizó una clasificación de las distintas morfologías correspondientes a las diferentes fases del proceso neurogénico, basada en la clasificación realizada en el trabajo de Espósito (Espósito et al., 2005b) (Figura 9a).

Las células se clasificaron como:

- **RGL** (Radial Glia-Like, por sus siglas en inglés): Caracterizadas por el despliegue de una dendrita larga con prolongaciones muy cortas.
- **Tipo A/B**: Corresponde a la morfología de progenitor neuronal, caracterizado por un soma alargado, con o sin prolongaciones a los costados que van paralelos a la CGL.
- **Tipo C**: Caracterizadas por desplegar un árbol dendrítico apical sin espinas, que se extiende por la CGL, alcanzando la capa molecular medial.
- **Tipo D**: Células con fenotipo de neurona madura, con un soma redondeado y el despliegue del árbol y espinas dendríticas hacia la capa externa de la capa molecular.

A partir de la clasificación, se obtuvo la proporción de células tipo RGL, A/B, C y D en relación con el total de células Tom+ en el GD. No se encontraron diferencias significativas en la proporción de estos tipos celulares (RGL, A/B, C y D) entre los grupos CS (RGL:  $7.99\% \pm 6.86$ , A/B:  $29.008\% \pm 10.27$ , C:  $18.39\% \pm 4.95$  y D:  $45.109\% \pm 13.57$ ) y CL (RGL:  $9.219\% \pm 3.57$ , A/B:  $32.552\% \pm 2.903$ , C:  $21.756 \pm 4.729$  y D:  $37.102 \pm 2.171$ ), ni en comparación con el grupo control (RGL:  $5.6\% \pm 23.039$ , A/B:  $23.039\% \pm 11.71$ , C:  $18.265\% \pm 6.007$  y D:  $52.75\% \pm 18.268$ ) (Figura 9b). Para determinar si el sexo podría influir en las proporciones de tipos celulares, se realizó un análisis separado para hembras y machos ( $n = 3$  por grupo). No se observaron diferencias significativas entre las distintas condiciones, tanto en hembras (Figura 9c) como en machos (Figura 9d). Para evaluar si la

severidad de las CS influye en el fenotipo de las células, se realizó un análisis dividiendo a los animales del grupo CS en CS Racine 3 y Racine 4/5, como se describió anteriormente (Figura 9e). En el análisis de los animales CS Racine 3, no se observaron diferencias significativas en las proporciones de las células entre las distintas condiciones (Figura 9f). Sin embargo, el análisis del grupo Racine 4/5 mostró una mayor proporción de células tipo D en el grupo CS Racine 4/5 (67.66%  $\pm$  10.68), en comparación con el grupo control (D: 52.75%  $\pm$  18.268, ANOVA de una vía:  $F_{(2,11)} = 10.69$ , \* $p < 0.05$ ) y el grupo CL (D: 37.102  $\pm$  2.171,  $F_{(2,11)} = 10.69$ , \*\* $p < 0.01$ ). Adicionalmente, se observó un menor número de células tipo A/B en la condición CS Racine 4/5 (13.335%  $\pm$  4.25135153) en comparación con el grupo CL (A/B: 32.552%  $\pm$  2.903, ANOVA de una vía:  $F_{(2,11)} = 8.32$ , \*\* $p < 0.01$ ) y el grupo control (A/B: 23.039%  $\pm$  11.71,  $F_{(2,11)} = 8.32$ , \* $p < 0.05$ ) (Figura 9g). Estos resultados sugieren que la morfología, como indicador de maduración, varía dependiendo del nivel de hiperexcitabilidad asociado con la severidad de las crisis.



**Figura 9. Evaluación de la morfologías de células nuevas Tom+ en el GD en las condiciones de control, CL y CS.** a) Imágenes representativas de las distintas morfologías analizadas (Tipo RGL, A/B, C, D) junto con un esquema de cada morfología. b) Porcentaje de células por fenotipo (Tipo RGL, A/B, C, D) en relación al número total de células Tom+ en el GD de cada condición experimental. c) Porcentaje de células Tom+ por fenotipo en relación al número total de células Tom+ en el GD de cada condición experimental en hembras.

d) Porcentaje de células Tom+ por fenotipo en relación al número total de células Tom+ en el GD de cada condición experimental en machos. e) Fotografías representativas de las crisis conductuales correspondientes a las fases Racine 2/3 (panel superior) y Racine 4/5 (panel inferior). f) Porcentaje de células Tom+ por fenotipo en el GD completo en relación al número total de Tom+ en las condiciones de control, CL y CS Racine 3. g) Porcentaje de células Tom+ por fenotipo en el GD completo en relación al número total de Tom+ en las condiciones de control, CL y CS Racine 4/5. Todos los resultados están expresados como promedio  $\pm$  error estándar (SEM). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ,  $p < 0.0001$ . ANOVA de una vía seguido de una prueba *post hoc* Tukey.  $n = 6$  animales por grupo.

#### **4.4. Evaluación del desempeño en tareas de memoria en distintas condiciones de hiperexcitabilidad.**

La NHA juega un papel importante en diversos procesos de aprendizaje y aprendizaje (Cameron y Glover, 2015; Dupret et al., 2007; Kempermann et al., 1997), especialmente debido a la capacidad de las nuevas neuronas de madurar e integrarse en el circuito hipocampal. Por lo tanto, una perturbación en el proceso neurogénico podría tener efectos significativos a nivel funcional (Jessberger et al., 2009). Estudios previos han mostrado que en modelos de epilepsia se observan afectaciones en los procesos de memoria (Pearson et al., 2014). Por esta razón, con los experimentos presentados en este trabajo, buscamos determinar si la inducción de crisis epilépticas de distinta severidad podría impactar diferencialmente en el desempeño de tareas dependientes de neurogénesis y del hipocampo. A continuación, se describen nuestros hallazgos.

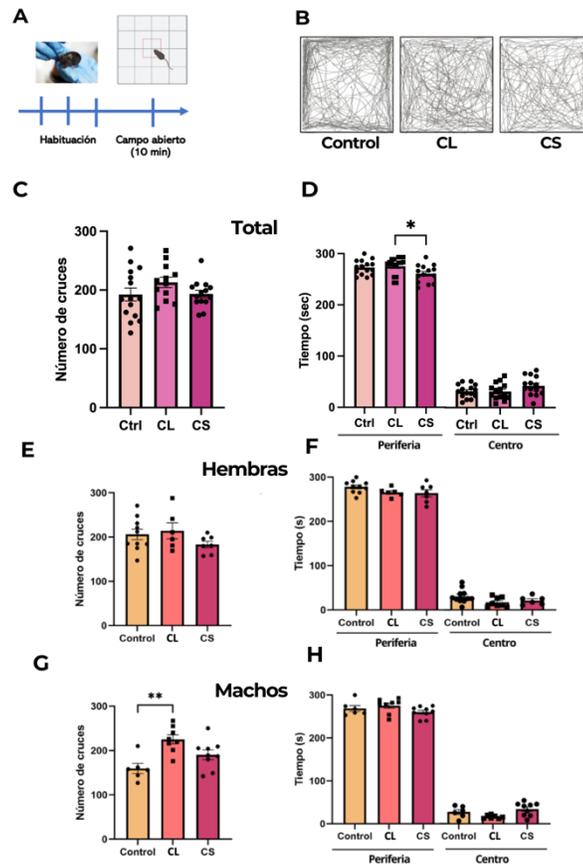
##### **4.4.1. Evaluación de locomoción y comportamiento relacionado con ansiedad en distintos contextos de hiperexcitabilidad.**

Con el fin de evaluar posibles diferencias en la locomoción y comportamiento asociado a ansiedad en los ratones de las diferentes condiciones, se realizó una prueba de campo abierto (CA). Para el análisis de la actividad locomotora, se contabilizaron los cruces que cada sujeto realizó de un cuadrante a otro durante la prueba (Figura 10a). Adicionalmente, se muestra una imagen representativa de las trayectorias recorridas por un sujeto en la caja de CA, que sugiere que los animales de la condición control se concentran más en los cuadrantes centrales con respecto a la condición CL y CS (Figura 10b). A nivel global (machos y hembras), no se observan diferencias en el número de cruces entre condiciones (Figura 10c). No obstante, vemos que los animales de la condición CL, pasan más tiempo por la periferia en contraste con CS. Por otro lado, no se encontraron diferencias

significativas en el número de cruces entre las condiciones en el grupo de hembras (Figura 10e).

Mientras que se observó un incremento significativo en el número de cruces en la condición CL en comparación con el grupo control en el grupo de machos (ANOVA de una vía:  $F_{(2,20)} = 8.186$ ,  $**p < 0.01$ ) (Figura 10g). Cabe mencionar que, aunque hay una tendencia de un mayor número de cruces en la condición CS, esta diferencia no alcanza significancia estadística (ANOVA de una vía:  $F_{(2,20)} = 8.186$ ,  $p = 0.0715$ ) con respecto al grupo control.

Para el análisis del comportamiento asociado a conductas ansiosas, se contabilizó el tiempo que los sujetos pasaban en el centro y la periferia de la caja. No se observaron diferencias significativas en el tiempo transcurrido en los cuadrantes centrales y periféricos en ninguno de los dos grupos, ni en hembras (Figura 10f) ni en machos (Figura 10h).

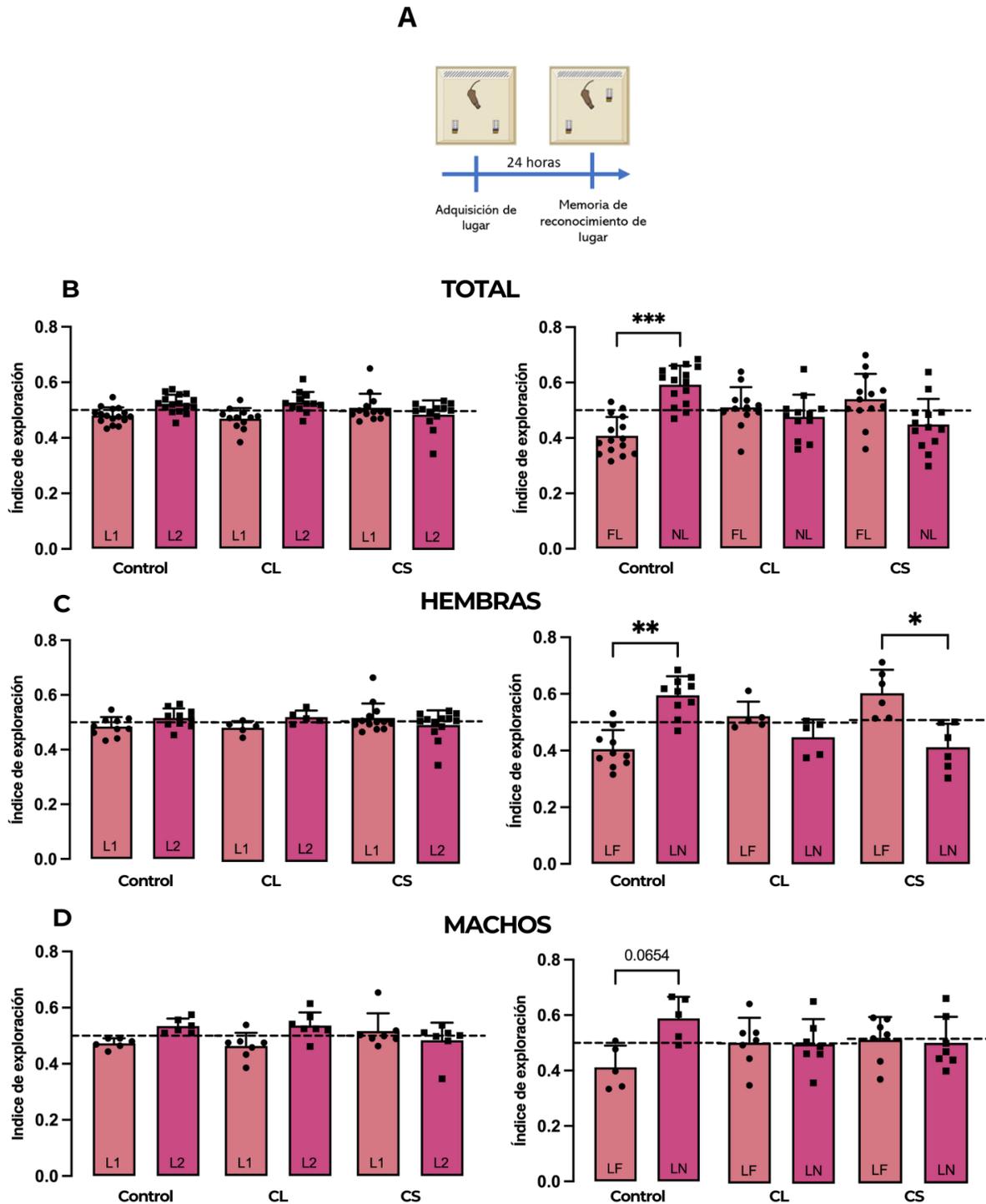


**Figura 10. Análisis de la prueba de Campo Abierto (CA).** a) Esquema del protocolo conductual de CA. b) Trayectoria recorrida por un sujeto representativo de cada condición experimental durante los 10 minutos de la sesión. c) Número de cruces durante la evaluación de campo abierto del total de animales (machos y hembras) de cada condición experimental. d) Tiempo que el total de animales se desplazaron por los cuadrantes periféricos y centrales de la arena. e) Número de cruces durante la evaluación de campo abierto

en hembras de cada condición experimental. f) Tiempo que las hembras se desplazaron por los cuadrantes periféricos y centrales de la arena. g) Número de cruces durante la evaluación de campo abierto en machos de cada condición experimental. h) Tiempo que las machos se desplazaron por los cuadrantes periféricos y centrales de la arena. Todos los resultados están expresados como promedio  $\pm$  error estándar (SEM). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ,  $p < 0.0001$ . ANOVA de una vía seguido de una prueba *post hoc* Tukey. Hembras control  $n=10$ , Hembras CL  $n= 6$ , Hembras CS  $n= 7$ . Machos Control  $n=6$ , Machos CL  $n= 8$ , Machos CS  $n= 8$ .

#### **4.4.2. Evaluación del desempeño cognitivo en una tarea de memoria de localización del objeto (OLM)**

Con el propósito de analizar si la inducción de CL y CS por la administración de AK tiene un impacto en el desempeño en una tarea dependiente del hipocampo, se llevó a cabo una prueba de memoria de localización de objeto (OLM) (Figura 11a). En la primera fase de la prueba, los animales fueron expuestos a dos objetos idénticos y se registró el tiempo que dedicaron a explorar cada objeto en machos (Figura 11b; panel izquierdo) y hembras (Figura 11c; panel izquierdo). 24 horas después, se realizó la fase de memoria, en la cual se movió uno de los objetos a una nueva ubicación, denominada "localización novedosa" (LN) (Figura 11a). Se contabilizó el tiempo que los animales dedicaron a explorar cada uno de los objetos en esta nueva configuración. Los resultados sugieren que los animales en la condición control, tanto machos (Figura 11b; panel derecho) como hembras (Figura 11c; panel derecho) ( $t = 2.981_{(4)}$ ,  $p < 0.05$ ), muestran un aumento significativo en el tiempo de exploración del objeto de la localización novedosa, que es la conducta esperada. En contraste, tanto en machos como en hembras de la condición CL, no se observa un recuerdo evidente, ya que exploran de manera similar ambos objetos (Figura 11b, c; panel derecho). En las condiciones CS y CL, los machos exploran ambos objetos durante la misma cantidad de tiempo, lo que indica que no reconocen la LN (Figura 11b, panel derecho). De manera interesante, en la condición CS se observó un incremento significativo en el tiempo de exploración del objeto familiar por parte de las hembras (Figura 11d) ( $t_{(5)} = 2.981$ ,  $p < 0.05$ ). Estos resultados sugieren que tanto en la condición CL como en CS hay un déficit cognitivo.



**Figura 11. Índices de exploración en la tarea de memoria de localización de objetos.** a) Esquema representativo del protocolo experimental de OLM. b) Gráficas que representan el índice de exploración en la fase de adquisición (panel izquierdo) e índice de exploración en la fase de memoria (panel derecho) en las tres condiciones experimentales en el total de animales (machos y hembras). c) Gráficas que representan el índice de exploración en la fase de adquisición (panel izquierdo) e índice de exploración en la fase de memoria (panel derecho) en las tres condiciones experimentales en el grupo de hembras. d) Gráficas que representan

el índice de exploración en la fase de adquisición (panel izquierdo) e índice de exploración en la fase de memoria (panel derecho) en las tres condiciones experimentales en el grupo de machos. \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$ . Hembras control  $n=10$ , Hembras CL  $n= 6$ , Hembras CS  $n= 7$ . Machos Control  $n=6$ , Machos CL  $n= 8$ , Machos CS  $n= 8$ .

#### **4.4.3. Evaluación del desempeño cognitivo en una tarea de condicionamiento de miedo al contexto (CFC)**

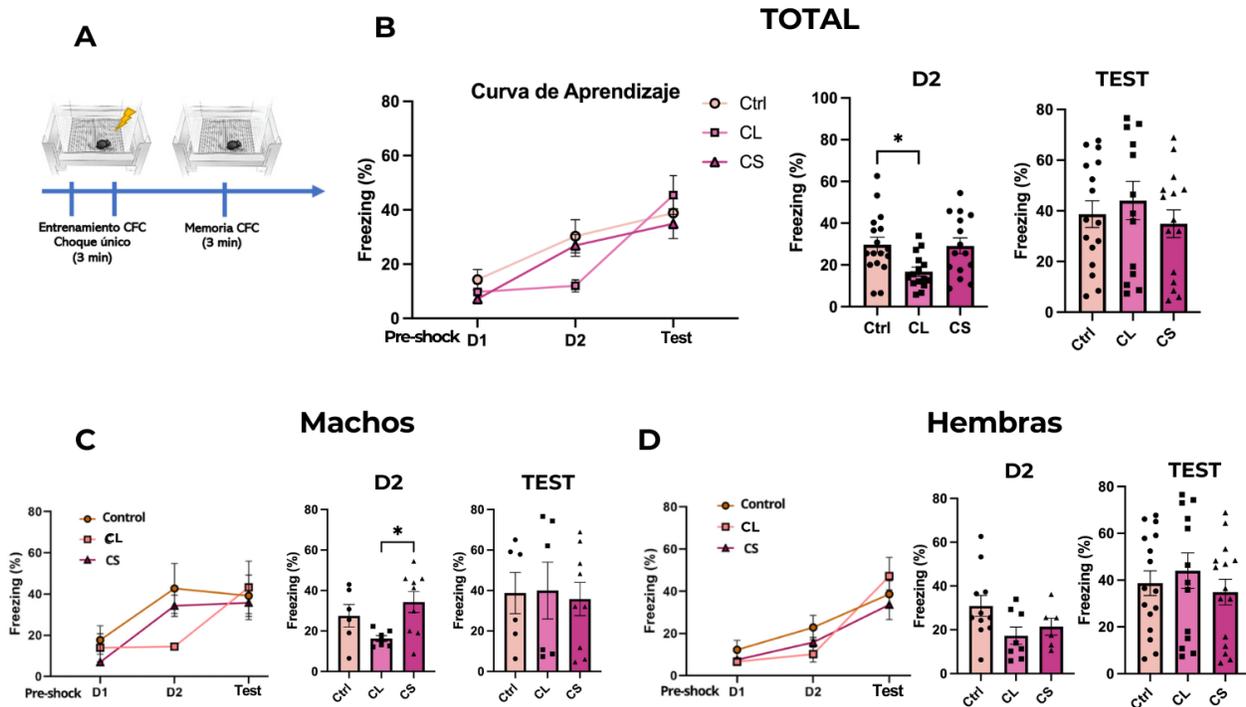
Con el objetivo de evaluar el efecto de la administración sistémica de AK en el rendimiento cognitivo en una tarea que depende principalmente del giro dentado y está relacionada con el proceso de neurogénesis, se analizó el desempeño de los animales en una tarea de miedo al contexto (Figura 12a).

Se realizó un análisis de la curva de aprendizaje, observando un aumento progresivo en la conducta de congelamiento a lo largo de los días en todas las condiciones experimentales (machos y hembras). De manera interesante, en el grupo CL, no se observaron cambios en el porcentaje de congelamiento durante el segundo día de condicionamiento, lo que podría sugerir una demora en el recuerdo del contexto aversivo (Figura 12b, panel izquierdo). En el análisis del porcentaje de congelamiento en el segundo día (Figura 12b, panel central), se observó que el grupo CL presentó un menor porcentaje de congelamiento ( $16.82\% \pm 2.13$ ) en comparación con los grupos control ( $29.71\% \pm 3.58$ ) y CS ( $29.16\% \pm 3.76$ ), que mostraron porcentajes muy similares (ANOVA de una vía:  $F_{(2,44)} = 4.839$ ,  $p < 0.05$ ). Finalmente, el análisis del tercer día (Figura 12b, panel derecho) no mostró diferencias significativas entre las condiciones (Control:  $36.68\% \pm 2.13$ ; CL:  $44.07\% \pm 7.59$ ; CS:  $34.90 \pm 5.49$ ). Sin embargo, la alta variabilidad observada en los datos limita a mostrar un dato concluyente.

En cuanto al análisis del grupo de machos, se observó un patrón similar durante los tres días de evaluación. En el día 2, los animales presentaron un menor porcentaje de congelamiento al del día 1, y para el día 3, todos alcanzaron un nivel similar de congelamiento (Figura 12c, panel izquierdo). El análisis del porcentaje de congelamiento en el día 2 muestra un menor porcentaje en el grupo CL ( $16.24\% \pm 1.49$ ) en comparación con el grupo CS ( $34.31\% \pm 5.17$ ,  $p < 0.05$ ) y mostrando una tendencia en comparación del grupo control ( $27.52\% \pm 5.57$ ) (Figura 12c, panel central). Para el día 3, tampoco se encontraron diferencias significativas entre los grupos, con todos los animales mostrando

porcentajes de congelamiento similares (Control:  $38.74\% \pm 10.17$ ; CL:  $39.96\% \pm 14.02$ ; CS:  $35.75 \pm 8.19$ ) (Figura 12c, panel derecho).

En el grupo de hembras, se observó un comportamiento similar al de los machos en el grupo CL, con porcentajes de congelamiento similares entre los días 1 y 2. No obstante, tanto el grupo control como el CS mostraron un porcentaje de congelamiento más discreto en el día 2, alcanzando niveles similares entre las condiciones para el día 3 (Figura 12d, panel izquierdo). El análisis del segundo día tampoco mostró diferencias significativas, aunque se observó una tendencia hacia un menor porcentaje de congelamiento en los grupos CL y CS (Control:  $30.90\% \pm 4.78$ ; CL:  $17.32\% \pm 3.91$ ; CS:  $21.44\% \pm 3.88$ , n.s.) (Figura 12d, panel central). Finalmente, para el día 3, no hubo diferencias significativas en el porcentaje de congelamiento entre las condiciones (Control:  $38.65\% \pm 6.31$ ; CL:  $47.14\% \pm 8.88$ ; CS:  $33.61 \pm 7.05$ , n.s) (Figura 12d, panel derecho).



**Figura 12. Porcentaje de congelamiento en una tarea de condicionamiento de miedo al contexto (CFC).** a) Esquema representativo del protocolo experimental de condicionamiento de miedo al contexto (CFC). b) Curva de aprendizaje durante la fase de condicionamiento y de la prueba de memoria en el grupo compuesto por machos y hembras (panel izquierdo). En el panel central, se muestra el porcentaje de tiempo de congelamiento exhibido por los grupos control, CL y CS durante el día 2 de condicionamiento. En el panel, derecho, se muestra el porcentaje de tiempo de congelamiento exhibido en cada condición en la prueba de memoria. c) Curva de aprendizaje durante la fase de condicionamiento y de la prueba de memoria en el grupo

compuesto por machos (panel izquierdo). En el panel central, se muestra el porcentaje de tiempo de congelamiento exhibido por los grupos control, CL y CS durante el día 2 de condicionamiento. En el panel, derecho, se muestra el porcentaje de tiempo de congelamiento exhibido en cada condición en la prueba de memoria. d) Curva de aprendizaje durante la fase de condicionamiento y de la prueba de memoria en el grupo compuesto de hembras (panel izquierdo). En el panel central, se muestra el porcentaje de tiempo de congelamiento exhibido por los grupos control, CL y CS durante el día 2 de condicionamiento. En el panel, derecho, se muestra el porcentaje de tiempo de congelamiento exhibido en cada condición en la prueba de memoria. \*\*  $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ . Hembras control  $n=10$ , Hembras CL  $n= 6$ , Hembras CS  $n= 7$ . Machos Control  $n=6$ , Machos CL  $n= 8$ , Machos CS  $n= 8$ .

## 5. Discusión

La neurogénesis hipocampal adulta es un mecanismo de plasticidad neuronal que continúa a lo largo de la vida en varias especies, incluidos los roedores, y que tiene un papel importante en procesos de aprendizaje y memoria. Este proceso es modulable, y se ha reportado que hay condiciones patológicas que pueden incrementarla, como ocurre con la hiperexcitabilidad asociada con trastornos neurológicos como la epilepsia. Desde una perspectiva clínica, las crisis epilépticas se pueden clasificar en diferentes tipos según sus características (Devinsky et al., 2018b), como la presentación de crisis parciales y generalizadas, que se relacionan con diferentes niveles de severidad y, por lo tanto, con diversas manifestaciones y alteraciones. El estudio de las implicaciones de esta enfermedad ha llevado al desarrollo de varios modelos experimentales. La mayoría de los reportes se han centrado en estudiar las implicaciones celulares y estructurales de las manifestaciones más severas asociadas a la epilepsia. Sin embargo, debido a la variedad de niveles de severidad de crisis epilépticas, es relevante desarrollar modelos que abarquen otros niveles de hiperexcitabilidad y sus posibles efectos en el sistema nervioso.

En este trabajo evaluamos el impacto de la inducción de dos niveles de hiperexcitabilidad en el proceso neurogénico y su posible relación con el desempeño en tareas de memoria. Para ello, se estableció un modelo de inducción de crisis epilépticas con dos niveles de hiperexcitabilidad, mediante la administración de AK, generando CL y CS agudas, es decir, sin la presentación espontánea y recurrente que ocurre en los modelos clásicos de epilepsia. En términos generales, observamos que la inducción de crisis con distinta severidad no altera el número de neuronas nuevas a 30 días después de la administración de AK, pero sí impacta de manera diferencial en el posicionamiento y maduración de las nuevas células. Asimismo, en ambas condiciones (CL y CS) se observan alteraciones en el desempeño de tareas de memoria asociadas al circuito hipocampal. En conjunto, estos resultados sugieren que el posicionamiento y la maduración de las nuevas neuronas dependen de la severidad de la hiperexcitabilidad y de las crisis asociadas, y que las alteraciones en las tareas de memoria podrían estar impactando la conectividad del circuito hipocampal, reflejándose como alteraciones nivel conductual.

### **5.1. Impacto del nivel de hiperexcitabilidad en el número de nuevas células.**

Esta investigación muestra que la inducción de CL y CS agudas no genera un aumento significativo en el número de células nuevas en el hipocampo a los 30 días posteriores a la inducción. Este hallazgo es consistente con algunos estudios previos (Parent, 2007; Parent et al., 1997). Sin embargo, contrasta con otros que han reportado resultados contrarios (Lybrand et al., 2021; Mohapel et al., 2004b; Sierra et al., 2015).

Estudios anteriores han demostrado que la proliferación celular puede estar incrementada en modelos de epilepsia (Parent et al., 1997b). Sin embargo, este incremento no es sostenido, lo cual está acorde a nuestros datos (Mohapel et al., 2004b). En varios modelos, se ha observado un aumento transitorio en la proliferación celular a los 7 y 14 días post-inducción, que regresa a niveles basales a los 30 días (L. Chen et al., 2023) en modelos donde no hay crisis recurrentes. Este incremento transitorio sugiere que el efecto de la hiperexcitabilidad sobre la neurogénesis puede ser temporal y dependiente de los cambios en el microambiente. Los mecanismos implicados en el aumento del número de células nuevas en contextos de hiperexcitabilidad podrían incluir la expresión de factores neurotróficos como BDNF (Botterill et al., 2015) y VEGF (Jin et al., 2002). Además, las células progenitoras, pueden detectar la actividad eléctrica, activando cascadas de señalización como Notch y Wnt, que están implicadas en la proliferación celular (Deisseroth et al., 2004b). Estos mecanismos podrían contribuir al incremento observado en algunos modelos de epilepsia, donde la estimulación continua inducida por las crisis recurrentes, podrían inducir la liberación de factores y activación de vías implicadas en el incremento de la proliferación celular.

En contraste, en otros trabajos donde se ha trabajado con modelos de epilepsia crónica, se ha reportado una disminución en el número de células nuevas a 50 días, posiblemente debido a la severidad de las crisis y como ellos reportan, al agotamiento de las células progenitoras (Sierra et al., 2015). En estos modelos, la constante división y diferenciación de las células progenitoras en astrocitos reactivos puede llevar a un agotamiento de las células progenitoras, que se ve reflejado en el número total de nuevas neuronas.

En nuestro modelo, no observamos un incremento en el número de nuevas células a los 30 días post-inducción, lo cual podría estar relacionado con la ausencia de crisis recurrentes presentes en los modelos clásicos de epilepsia. Este patrón sugiere que la

hiperexcitabilidad podría afectar temporalmente la proliferación celular, por lo que se necesitarían experimentos en tiempos más cortos para determinar si hay un aumento inicial en la proliferación que luego vuelve a niveles control. La estimulación continua asociada con crisis recurrentes podría, en algunos modelos, mantener la activación de estas vías de señalización y promover un aumento sostenido en el número de células nuevas. Sin embargo, en nuestro modelo, la ausencia de crisis recurrentes parece limitar la activación de estos mecanismos, lo que explicaría por qué no observamos un aumento en la neurogénesis en la ventana de 30 días.

Por otro lado, tampoco se observó una disminución en el número de nuevas células, lo que podría sugerir que los niveles de hiperexcitabilidad en nuestro modelo no son lo suficientemente altos como para causar un agotamiento de la población de células que proliferan. Esto podría deberse a la menor severidad de las crisis o al hecho de que la hiperexcitabilidad en nuestro modelo no es lo suficientemente prolongada o intensa como para causar ese agotamiento.

Con respecto a las diferencias observadas entre machos y hembras, es importante resaltar que, en el grupo de hembras, se observa una tendencia de un mayor número de células Tom+ en las condiciones de control y CS en comparación con la condición CL. Una posible hipótesis es que las hormonas estén modulando los distintos niveles de hiperexcitabilidad. Además, la fase estral de las hembras podría influir en el microambiente neuronal, ya que el estrógeno y la progesterona parecen afectar la susceptibilidad a la excitabilidad del sistema (Reddy, 2013). En la condición CL, el estímulo de hiperexcitabilidad podría ser insuficiente para activar la proliferación y supervivencia de nuevas neuronas como ocurre en CS, mientras que en el grupo control, donde no hay afectación, esta reducción no se observa. Estos cambios en el microambiente podrían estar impactando directamente el proceso neurogénico y promoviendo las diferencias observadas. Esto podría sugerir una interacción compleja entre los niveles de excitabilidad neuronal y las influencias hormonales en la regulación de la neurogénesis.

Por otro lado, es importante considerar que nuestro modelo experimental utiliza la administración de tamoxifeno, un modulador selectivo del receptor de estrógeno que podría estar afectando de manera diferencial a machos y hembras en cuanto a la proliferación celular (Smith et al., 2022). Aunque todos los animales recibieron la misma dosis de tamoxifeno, en las hembras este tratamiento podría alterar el equilibrio hormonal de manera

más pronunciada debido a factores como el ciclo estral, especialmente en las fases donde los niveles de estrógeno son elevados. Esto podría estar promoviendo la proliferación o supervivencia celular en ciertas condiciones experimentales.

Además, algunos estudios han observado que la administración intraperitoneal (i.p.) de tamoxifeno puede impactar negativamente en la neurogénesis, reduciendo los niveles de proliferación celular (Smith et al., 2022). Sin embargo, otros estudios han reportado que el tamoxifeno no tiene efectos sobre la neurogénesis (Rotheneichner et al., 2017). Estos resultados contradictorios indican que aún se requiere de mayor investigación para entender mejor cómo el tamoxifeno afecta las distintas fases de la neurogénesis adulta.

Este posible efecto diferencial del tamoxifeno en hembras subraya la necesidad de tener un mejor control de la fase estral en futuros experimentos. La diversidad en los resultados entre distintos estudios y los presentados en esta investigación enfatiza la importancia de entender la hiperexcitabilidad como un fenómeno complejo, cuyos efectos pueden variar según su intensidad, duración y contexto experimental.

## **5.2. Impacto del nivel de hiperexcitabilidad en la migración y posicionamiento de las nuevas células.**

Durante el proceso neurogénico, las nuevas células migrarán inicialmente de manera tangencial desde la célula progenitora de la que provienen, guiadas principalmente por la vasculatura del GD; posteriormente, esta migración comenzará una migración radial hacia la internalización en la capa granular (Sun et al., 2015). El posicionamiento adecuado de las nuevas células dentro de la capa granular es fundamental para el establecimiento de conexiones con las neuronas preexistentes del circuito hipocampal. Durante la primera semana, las células nuevas se localizan en la ZSG. Una semana después, la mayoría de las células ya estarán localizadas en la CGL, cerca de la ZSG. Para la semana 4, las células se habrán establecido en su posición final, ubicada en la zona interna e intermedia de la CGL. En esta fase, en la que las nuevas células ya han madurado, empiezan a recibir aferencias glutamatérgicas, terminando así su ciclo de maduración e integración al circuito hipocampal (Espósito et al., 2005b). Es por los eventos descritos anteriormente, que el mal posicionamiento de las células podrían afectar distintos procesos e impactar de manera funcional en los circuitos. Consistente con nuestro resultado principal sobre la distribución

atípica en la condición de CS, en contraste con el grupo CL y el control, se ha descrito en estudios previos que en modelos de epilepsia crónica se genera una dispersión en la distribución de las nuevas células dentro de la capa granular (Jessberger et al., 2005b; Moura et al., 2021). Esta distribución atípica corresponde a células inmaduras y neuroblastos (Dcx+) (Jessberger et al., 2005b).

En otro estudio, se observó que, con una aproximación diferente que consistía en la administración intrahipocampal de pilocarpina, las nuevas neuronas, en una ventana temporal de 30 días (etapa en la que ya presentan una morfología madura), estaban distribuidas a lo ancho de la capa granular (Lybrand et al., 2021). Esta distribución atípica, encontrada en modelos de epilepsia crónica y en nuestro modelo de crisis agudas severas, podría estar relacionado con los patrones de migración. Nuestros hallazgos sugieren que la inducción de CS agudas impacta en el posicionamiento de las células nacidas en este contexto de hiperexcitabilidad.

Se han propuesto algunos mecanismos moleculares que podrían estar implicados en esta desregulación de la distribución de las nuevas neuronas, pero aún quedan por determinarse. Se ha sugerido que esta distribución atípica puede deberse a la fosforilación de DCX, una proteína del citoesqueleto asociada con el proceso de migración, fosforilada por la quinasa dependiente de ciclina 5 (Cdk5). La fosforilación disminuye la afinidad por los microtúbulos y afecta la estabilidad de DCX, lo que puede resultar en una mayor motilidad del citoesqueleto, favoreciendo así la distribución anormal (Tanaka et al., 2004).

Otro mecanismo que se ha propuesto en el posicionamiento anormal de las células es la participación de vías de señalización inducidas por proteínas extracelulares como las netrinas, semaforinas y reelina. En modelos knock-out de reelina, se ha reportado migración y mal posicionamiento de las células (Del Río et al., 1997). Esto podría deberse a que en modelos de epilepsia hay un daño a las interneuronas de tipo canasta que liberan reelina. Aunque este efecto se ha reportado en modelos de epilepsia crónica, podría ser similar en nuestro modelo, donde la presentación aguda de crisis severas es suficiente para generar una desregulación en este tipo de proteínas que permiten la migración adecuada de las nuevas células.

En relación con la sección anterior, se propone que las diferencias en la migración observadas entre CL y CS podrían deberse a la afectación diferencial de las interneuronas GABAérgicas como resultado de la administración de AK. El AK se une a las interneuronas

a través de los receptores GABA, lo que provoca una excitación que induce la liberación masiva de GABA. Sin embargo, esta liberación no es suficiente para inhibir la actividad epileptiforme, debido a la intensa excitación de las neuronas piramidales en la región CA3 del hipocampo. Esto sugiere que, más allá de una simple falta de inhibición, las crisis podrían deberse a la incapacidad de generar una inhibición efectiva y por lo tanto a la presencia exacerbada de  $Ca^{2+}$  que generará efectos excitotóxicos (Ben-Ari y Cossart, 2000).

Las interneuronas GABAérgicas son particularmente vulnerables al daño por excitotoxicidad, lo que podría explicar las diferencias en los efectos entre los dos niveles de hiperexcitabilidad. Es posible que las interneuronas en CS sufran un mayor daño en comparación con CL y el grupo control, lo que podría estar relacionado con la alteración en la migración celular. Queda por determinar si estos efectos están asociados con la disminución de conexiones provenientes de las interneuronas. Una evaluación próxima podría incluir el uso de marcadores específicos de interneuronas GABAérgicas para investigar si una posible reducción de esta población contribuye al posicionamiento atípico dentro de la CGL.

Por otro lado y en contraste con los reportes en modelos de epilepsia crónica respecto a la migración ectópica (Parent et al., 1997b) no encontramos migración de manera significativa de las nuevas neuronas hacia el hilus. Posiblemente, este fenómeno no ocurre debido a que las crisis no son recurrentes, como se ha descrito en otros modelos. Sin embargo, quedan abiertas preguntas sobre los mecanismos por los cuales la presentación aguda de crisis severas genera cambios en los patrones de migración dentro de la capa granular (CGL), pero no provoca una migración ectópica hacia el hilus.

Con respecto a las diferencias entre sexos, tanto en machos como en hembras se observan las mismas tendencias, con un mayor número de células ubicadas en ZSG y CGL1. Esto sugiere que el sexo posiblemente no influye directamente en el posicionamiento de las nuevas células, sino que otros factores podrían estar modulando el proceso de migración. Este posicionamiento atípico observado en ambos sexos podría indicar que es un efecto de los niveles de hiperexcitabilidad. Estos hallazgos sugieren que la hiperexcitabilidad podría estar alterando los patrones de migración celular de forma similar en ambos sexos.

El posicionamiento de las nuevas células en las capas más internas de la capa granular ha sido interpretado por algunos autores como un indicador de maduración acelerada inducida por la inducción de crisis epilépticas. Sin embargo, en nuestro estudio, observamos que en los sujetos control, las células nuevas tienden a concentrarse predominantemente en el primer tercio de la capa granular, esto respaldado por otros estudios en donde el límite en condiciones fisiológicas no va más allá de esta sección (Espósito et al., 2005b). A partir de esta observación, proponemos que el posicionamiento celular por sí solo no es suficiente para afirmar una maduración acelerada, ya que esta hipótesis debe ser respaldada por el uso de marcadores específicos que identifiquen el estado de maduración celular o por el análisis del fenotipo de las nuevas neuronas. La incorporación de marcadores como DCX o calbindina, que permiten evaluar el estadio del desarrollo neuronal, podría proporcionar información más precisa sobre si estas células están en una fase temprana o madura del proceso neurogénico. En este estudio, utilizamos como indicador de maduración la clasificación basada en el fenotipo celular, lo cual nos permite inferir el estadio de desarrollo de las células. Este criterio será abordado con mayor detalle en la siguiente sección.

### **5.3. Diferencias del fenotipo celular en los distintos contextos de hiperexcitabilidad como indicador de maduración neuronal.**

Durante el proceso neurogénico, las células pasarán por diferentes etapas, adquiriendo características morfológicas que reflejan su grado de maduración (Denoth-Lippuner y Jessberger, 2021; Espósito et al., 2005b). Estas características permiten clasificar a las células en distintos estadios del proceso neurogénico, y la proporción de células en cada uno de estos estadios puede ser un indicador del estado de maduración en distintos contextos.

Para determinar en qué fase de maduración se encontraban las nuevas células en nuestro estudio, se clasificaron en diferentes tipos según su morfología. Los resultados muestran que, aunque en todas las condiciones experimentales había un predominio de neuronas maduras (Tipo D), se observó una mayor proporción de estas en la condición de crisis severas CS, en comparación con las otras condiciones. Por otro lado, las condiciones control y CL encontramos una mayor proporción de RGLs y células progenitoras neurales (Tipo A/B).

En estudios previos, se ha observado que las crisis epilépticas pueden acelerar la maduración de las nuevas células granulares, especialmente en cuanto a la complejización y extensión de sus dendritas. Estas crisis inducen un desarrollo morfológico más rápido, lo que permite que las dendritas se extiendan a través de la capa molecular (ML) del hipocampo. Este crecimiento se ha registrado a las dos semanas posteriores a la inducción y tras la aparición de crisis recurrentes (Overstreet-Wadiche et al., 2006).

Nuestros hallazgos podrían alinearse con esta evidencia, ya que en la condición de CS observamos una mayor proporción de células maduras (Tipo D), lo que sugiere que la hiperexcitabilidad aguda podría acelerar la maduración celular. Sin embargo, a diferencia de los modelos de crisis recurrentes, nuestro modelo se basa en la presentación de crisis agudas, lo que indica que incluso sin crisis recurrentes, la hiperexcitabilidad generada por una sola presentación puede tener un impacto en la maduración. La mayor proporción de neuronas maduras en la condición CS sugiere que la intensidad de la hiperexcitabilidad es suficiente para inducir cambios en las nuevas neuronas, aún en ausencia de crisis recurrentes.

La aceleración en la maduración neuronal observada en nuestras condiciones experimentales podría estar relacionada con la actividad directa en las nuevas células o por alteraciones en el ambiente celular que influyen en su desarrollo. Un posible mecanismo es la despolarización mediada por la entrada de GABA a través de receptores GABAA en estas células, proceso que promueve su maduración (Ge et al., 2006). Otra propuesta es el cambio en el microambiente local, como el aumento en la liberación de neurotrófinas, que podría promover el rápido desarrollo de las células granulares nuevas. Un factor clave en este proceso es la participación del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF). Se ha reportado que tanto a nivel de mRNA como la proteína de BDNF se acumulan en las dendritas proximales tras la actividad epiléptica aguda, lo que sugiere que BDNF tiene un papel relevante en la maduración neuronal en respuesta a la hiperexcitabilidad (Tongiorgi et al., 2004).

En el análisis entre sexos, si bien no hay diferencias significativas en la proporción de células con morfología tipo D (neuronas maduras) entre machos y hembras, se observa una tendencia hacia un mayor número en hembras en todas las condiciones. Este resultado es interesante, ya que existen reportes contradictorios sobre las diferencias de sexo en la maduración de las nuevas neuronas.

Por un lado, algunos estudios han propuesto que, en machos, las nuevas neuronas (marcadas con BrdU/NeuN) maduran a un ritmo más rápido que en hembras (Yagi et al., 2020). Sin embargo, es importante señalar que NeuN no es un marcador exclusivo de neuronas maduras, lo que limita las conclusiones del estudio debido al uso de este marcador.

Por otro lado, otros estudios sugieren que no existen diferencias significativas en la tasa de maduración neuronal entre sexos. En un estudio realizado en ratones, no se encontraron diferencias significativas en el número de células expresando varios marcadores de neurogénesis (como DCX) entre machos y hembras (Tsao et al., 2023). No obstante, este estudio no utilizó un marcador de neuronas maduras, lo que limita la capacidad de evaluar diferencias en la tasa de maduración.

Considerando estos hallazgos contradictorios, nuestros resultados ofrecen una visión adicional al mostrar una tendencia hacia una mayor proporción de células maduras en las hembras en todas las condiciones, aunque sin diferencias significativas. Estos datos resaltan la importancia de estudiar las influencias específicas del sexo en la neurogénesis hipocampal adulta y sugieren que futuros estudios deberían explorar más a fondo cómo las condiciones experimentales influyen en la maduración de las nuevas células.

En otros estudios, además de encontrar mayores proporciones de células maduras, se ha reportado que estas presentan características morfológicas aberrantes, como el desarrollo de dendritas basales (Parent, 2007), una angulación anormal de la dendrita primaria cercana a 180° (Lybrand et al., 2021), e hipertrofia del soma, resultando en una morfología del soma alargada (Moura et al., 2021). Aunque no realizamos un análisis morfológico detallado, nuestros hallazgos no mostraron indicios de morfología atípica en las células observadas; por el contrario, estas exhibieron una morfología normal. Sin embargo, de forma cualitativa, detectamos árboles dendríticos más complejos en las células maduras. Entre las perspectivas para profundizar en este hallazgo, se encuentra la realización de un análisis más detallado de la morfología y complejidad dendrítica para identificar posibles diferencias. Acorde con los hallazgos previos, es posible que en nuestro modelo de crisis agudas no se aprecien alteraciones morfológicas debido a la ausencia de crisis recurrentes que podrían estar afectando de forma continua la maduración de las células..

En relación con nuestro hallazgo de una mayor proporción de células RGL y progenitoras neurales (Tipo A/B) en las condiciones control y CL, en contraste con la condición CS, esto podría estar relacionado a un incremento en la proliferación de nuevas células, tanto en las RGL como en las progenitoras neurales. Este fenómeno es consistente con estudios previos que han demostrado que la actividad epileptiforme, incluso sin manifestaciones conductuales, puede incrementar de manera transitoria la proliferación celular, al menos durante una ventana de hasta 50 días (Sierra et al., 2015). En nuestros resultados, es posible que la severidad permita una proliferación continua en las condiciones control y CL, mientras que en la condición CS, se podría haber agotado hasta cierto grado la capacidad proliferativa, limitando el número de células progenitoras. Este agotamiento en CS podría ser resultado de la activación masiva inicial, que reduce la capacidad de proliferación sostenida en comparación con las condiciones de menor severidad. No obstante, es necesario el uso de otros marcadores que confirmen si la proliferación sigue ocurriendo de manera activa, por ejemplo, el uso del marcador Ki67, que se expresa específicamente en células en ciclo celular activo.

Otra posible explicación es que la expresión de *Ascl1* en nuestro modelo esté directamente relacionada con la administración de diferentes dosis de AK. La administración de AK induce la expresión de *Ascl1* en las células radiales gliales (RGL), lo que provoca su activación. En estudios previos, se ha observado un aumento significativo de células *Ascl1*<sup>+</sup> en las primeras 24 horas posteriores al tratamiento con AK, lo que sugiere que la hiperexcitabilidad inducida por AK genera cambios rápidos en el estado de activación de las RGL quiescentes (Andersen et al., 2014). Esta activación inicial parece estar asociada a una transición hacia un estado activo de las RGL, lo que contribuye a un incremento en la proliferación de nuevas células en los días posteriores.

Esto sugiere que en las condiciones de control y CL donde la activación es menos intensa, la expresión de *Ascl1* podría estar favoreciendo tanto la proliferación como el mantenimiento de las RGL. Sin embargo, en la condición de crisis severas (CS), la activación intensa podría estar interfiriendo con la expresión sostenida de *Ascl1*. Aunque inicialmente puede haber una activación rápida de las RGL en respuesta a la hiperexcitabilidad, como lo indica el aumento transitorio de *Ascl1*<sup>+</sup> en las primeras 24 horas (Andersen et al., 2014), la intensa estimulación en CS podría llevar a un agotamiento de las RGL debido a la aceleración de la maduración celular. Es importante seguir explorando en

diferentes ventanas temporales para determinar si los efectos sobre la proliferación y maduración de las RGL varían con el tiempo.

#### **5.4. El impacto de nuevas neuronas nacidas en dos contextos de hiperexcitabilidad a nivel conductual.**

El GD del hipocampo es una estructura clave en procesos de aprendizaje y memoria de tipo espacial (Hainmueller y Bartos, 2020) . Las nuevas células tienen la capacidad de integrarse en el circuito hipocampal, contribuyendo así a la plasticidad (Hainmueller y Bartos, 2020) y a la formación de nuevos recuerdos (Deng et al., 2010). La alteración en alguna fase del proceso neurogénico, puede impactar negativamente en la capacidad para resolver tareas de memoria. Estudios previos han mostrado que, en modelos clásicos de epilepsia, la presentación de crisis recurrentes se asocia con déficits cognitivos, particularmente en la ejecución de tareas dependientes de la memoria hipocampal (Pearson et al., 2014). En otros trabajos, se ha intentado comprender la relación entre la resolución de tareas cognitivas y la afectación del proceso neurogénico en modelos de epilepsia (Cho et al., 2015b). En el presente estudio, observamos un déficit en la ejecución de la tarea de reconocimiento de lugar (OLM) tanto en las condiciones CL como CS, lo que sugiere que la hiperexcitabilidad inducida por crisis puede estar alterando los mecanismos implicados en esta tarea. Esto es consistente con estudios previos que reportan que la ablación de la neurogénesis puede disminuir el deterioro cognitivo asociado a la epilepsia. La mejora en el desempeño de estas tareas se debe a que las neuronas generadas tras las crisis epilépticas parecen contribuir a la formación de circuitos aberrantes en el hipocampo, afectando tanto la memoria como otras funciones cognitivas (Cho et al., 2015b).

Sin embargo, aunque nuestros resultados indican una afectación en la ejecución de la tarea OLM, es importante considerar que esta tarea está más relacionada con el reclutamiento de otras áreas del hipocampo, como la región CA1 y CA3, además del GD (Benkovic et al., 2004b). Por lo tanto, no se puede descartar que el déficit observado en esta tarea no se deba únicamente a alteraciones en la neurogénesis del giro dentado, sino también a daños en otras áreas hipocampales o extrahipocampales que participan en la consolidación de tareas espaciales que queda por ser determinado.

Con respecto al análisis conductual entre sexos, cabe resaltar que en machos se observa una tendencia a aumentar el número de cruces tanto en las condiciones CL como CS, lo que podría sugerir un incremento en la movilidad. Este efecto no es tan evidente en

las hembras, ya que el número de cruces fue similar entre las distintas condiciones. El aumento en los cruces en machos coincide con estudios previos que reportan un incremento en la motricidad en modelos de AK (Hu et al., 1998).

En cuanto a la tarea de OLM, los resultados son consistentes en ambos sexos, ya que se observa un déficit en la ejecución de la tarea, en el que los animales no reconocen la nueva localización tanto en la condición CL como en CS. Sin embargo, de manera interesante, en el grupo de hembras se observa una preferencia por la exploración de la localización familiar. Esto podría estar relacionado con algún efecto del modelo de AK, ya que se ha reportado que la administración de este fármaco induce comportamientos ansiosos (Inostroza et al., 2011). Estos comportamientos ansiosos podrían estar asociados con la preferencia por localizaciones familiares en este paradigma, dado que, de manera natural, esta cepa tiende a preferir la novedad. Es posible que este comportamiento refleje el impacto del daño inducido por AK. Sería importante realizar mediciones más precisas con otros protocolos que permitan identificar el comportamiento ansioso en las distintas condiciones. Esto ayudaría a entender si dicho factor podría estar afectando la ejecución de tareas contextuales y su relación con factores inherentes al sexo.

A partir de los hallazgos previos en la neurogénesis, decidimos evaluar el desempeño en una tarea relacionada con la activación de las células de GD y neurogénesis, específicamente el condicionamiento de miedo al contexto (CFC).

Nuestros resultados mostraron que, a los 30 días post-inducción, se presentan alteraciones en el proceso de adquisición, particularmente en el grupo CL, donde se observó un menor porcentaje de congelamiento en el día 2 en comparación con los grupos control y CS. Sin embargo, de manera interesante, en el día de la prueba de memoria, todas las condiciones alcanzaron un porcentaje de congelamiento muy similar. No obstante, la alta variabilidad en los resultados dificulta una interpretación clara. Esto podría sugerir un posible impacto en la fase de adquisición, posiblemente inducido por alteraciones en el circuito. Queda por explorar en mayor detalle por qué específicamente en la condición CS se presentan estas alteraciones, lo que abre interrogantes sobre los mecanismos de adquisición de memoria que podrían estar afectados en modelos de hiperexcitabilidad.

Estudios previos de nuestro laboratorio muestran que una lesión focal del GD inducida por AK, inicialmente se asocia con déficits en la memoria contextual a los 10 días post-lesión. Sin embargo, a los 30 días, se observa una recuperación de la memoria contextual,

acompañada de un aumento notable en la activación de neuronas nuevas maduras (Aguilar-Arredondo y Zepeda, 2018b). En ratones, la dispersión granular también ha sido identificada como un mecanismo plástico en la recuperación de la memoria en la ventana temporal de 30 días (Hernández Mercado et al., 2022). Estos hallazgos subrayan que, a pesar de las alteraciones estructurales y posibles déficits en la fase de adquisición inicial, la posible reorganización del GD permiten restaurar la función de la memoria en otras ventanas temporales. A futuro, se propone explorar en detalle los mecanismos que permiten esta plasticidad funcional y cómo la hiperexcitabilidad impacta específicamente en la fase de adquisición, consolidación y recuperación de la memoria.

Nuestros hallazgos contribuyen a una área aún poco explorada de la relación entre la neurogénesis y los déficits en tareas cognitivas tras la presentación aguda de crisis epilépticas. La contribución de las nuevas neuronas a nivel de circuito será discutido en la próxima sección.

#### **5.5. Papel de las nuevas neuronas nacidas en un contexto de hiperexcitabilidad.**

El estudio de la neurogénesis en contextos de hiperexcitabilidad ha generado interés sobre el papel que desempeñan las nuevas neuronas nacidas en estas condiciones. Existen reportes que sugieren un rol proepileptogénico de estas células. Por ejemplo, se ha reportado que las neuronas generadas en estos contextos pueden formar circuitos locales que favorecen la propagación de actividad excitatoria recurrente, contribuyendo a la disfunción sináptica y desarrollo de epileptogénesis (Shapiro y Ribak, 2006b) . Además, algunas de estas células migran a posiciones ectópicas, y algunos estudios han mostrado que estas neuronas pueden sincronizarse con las ráfagas de las células piramidales del área CA3, lo que podría facilitar la hiperexcitabilidad (Scharfman et al., 2000b). En línea con estos hallazgos, la inhibición o ablación de estas nuevas células ha demostrado reducir la frecuencia de crisis epilépticas, sugiriendo que desempeñan un papel directo en la generación y propagación de la actividad epileptiforme (Jung et al., 2006b).

Otra propuesta es la relacionada con un impacto positivo como mecanismo compensatorio o como un mecanismo de reparación funcional. Por ejemplo, en un modelo de estimulación eléctrica, se reportó que las nuevas células generadas en este contexto, presentan una reducción en la entrada excitatoria y un aumento en la entrada inhibitoria, lo que resulta en una menor excitabilidad en comparación con las células nacidas en

contextos como el ejercicio físico (Jakubs et al., 2006). Por otra parte, en estudios previos de nuestro laboratorio, se ha reportado que la generación de una lesión focal del giro dentado inducida por AK dentro de una ventana temporal de 30 días, favorece la activación de nuevas neuronas y una mejora en el desempeño de tareas asociadas con la memoria, lo que sugiere un mecanismo de reorganización funcional (Aguilar-Arredondo y Zepeda, 2018b; Zepeda et al., 2013b). Si la generación de nuevas neuronas en este contexto es beneficiosa o no sigue siendo un tema de debate.

Hasta el momento, no podemos determinar con precisión el papel de las nuevas neuronas en los dos contextos de hiperexcitabilidad analizados. Aunque encontramos que su posicionamiento atípico podría contribuir a un mal desempeño en la tarea de OLM, no podemos descartar la posibilidad de daño en otras regiones. Además, no observamos crisis recurrentes en nuestro modelo, lo que sugiere que estas nuevas neuronas no están contribuyendo significativamente a la propagación de actividad epiléptica en esta ventana temporal. Como perspectiva futura, para entender el posible rol de las nuevas neuronas, sería importante estudiar las propiedades funcionales de éstas y su conectividad dentro del circuito hipocampal.

## **6. Conclusión**

En este trabajo, mostramos evidencia de cómo diferentes grados de hiperexcitabilidad impactan de manera diferencial al proceso neurogénico y la ejecución de tareas de memoria. Nuestros hallazgos muestran que la presentación de crisis severas agudas inducidas por AK de manera sistémica afecta el posicionamiento de las nuevas células y acelera su maduración bajo esta condición. Además, observamos que las diferencias entre sexos podrían modular la proliferación y maduración de las nuevas neuronas, lo que sugiere una interacción compleja entre la hiperexcitabilidad y los factores inherentes al sexo. Este estudio establece un precedente para resaltar la importancia de desarrollar otros modelos que permitan comprender la complejidad de la hiperexcitabilidad y su influencia en procesos plásticos. Aunque aún no se ha determinado con precisión el rol de estas nuevas células y sus implicaciones, este trabajo abre nuevas líneas de investigación para examinar los efectos de distintos niveles de hiperexcitabilidad en diversas condiciones patológicas.

## 7. Referencias.

- Aguilar-Arredondo, A., y Zepeda, A. (2018a). Memory retrieval-induced activation of adult-born neurons generated in response to damage to the dentate gyrus. *Brain structure y function*, 223(6), 2859–2877. <https://doi.org/10.1007/S00429-018-1664-7>
- Aguilar-Arredondo, A., y Zepeda, A. (2018b). Memory retrieval-induced activation of adult-born neurons generated in response to damage to the dentate gyrus. *Brain structure y function*, 223(6), 2859–2877. <https://doi.org/10.1007/S00429-018-1664-7>
- Altman, J., y Das, G. D. (1965a). Post-Natal Origin of Microneurons in the Rat Brain. *Nature 1965 207:5000*, 207(5000), 953–956. <https://doi.org/10.1038/207953A0>
- Altman, J., y Das, G. D. (1965b). Post-Natal Origin of Microneurons in the Rat Brain. *Nature 1965 207:5000*, 207(5000), 953–956. <https://doi.org/10.1038/207953A0>
- Alvarez-Buylla, A., Theelen, M., y Nottebohm, F. (1990). Proliferation “hot spots” in adult avian ventricular zone reveal radial cell division. *Neuron*, 5(1), 101–109. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(90\)90038-H](https://doi.org/10.1016/0896-6273(90)90038-H)
- Amaral, D. G., Scharfman, H. E., y Lavenex, P. (2007). The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Progress in brain research*, 163. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(07\)63001-5](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(07)63001-5)
- Andersen, J., Urbán, N., Achimastou, A., Ito, A., Simic, M., Ullom, K., Martynoga, B., Lebel, M., Göritz, C., Frisé, J., Nakafuku, M., y Guillemot, F. (2014). A Transcriptional Mechanism Integrating Inputs from Extracellular Signals to Activate Hippocampal Stem Cells. *Neuron*, 83(5), 1085–1097. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.08.004>
- Ayala, R., Shu, T., y Tsai, L. H. (2007). Trekking across the brain: the journey of neuronal migration. *Cell*, 128(1), 29–43. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2006.12.021>
- Ben-Ari, Y., y Cossart, R. (2000). Kainate, a double agent that generates seizures: two decades of progress. *Trends in Neurosciences*, 23(11), 580–587. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(00\)01659-3](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(00)01659-3)
- Ben-Ari, Y., Lagowska, J., Tremblay, E., y Le Gal La Salle, G. (1979). A new model of focal status epilepticus: intra-amygdaloid application of kainic acid elicits repetitive secondarily generalized convulsive seizures. *Brain research*, 163(1), 176–179. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(79\)90163-X](https://doi.org/10.1016/0006-8993(79)90163-X)
- Ben-Ari, Y., Tremblay, E., Ottersen, O. P., y Meldrum, B. S. (1980). The role of epileptic activity in hippocampal and “remote” cerebral lesions induced by kainic acid. *Brain research*, 191(1), 79–97. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(80\)90316-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(80)90316-9)
- Benkovic, S. A., Patrick O’callaghan, J., y Bemis Miller, D. (2004a). *Sensitive indicators of injury reveal hippocampal damage in C57BL/6J mice treated with kainic acid in the absence of tonic-clonic seizures*. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.07.021>
- Benkovic, S. A., Patrick O’callaghan, J., y Bemis Miller, D. (2004b). *Sensitive indicators of injury reveal hippocampal damage in C57BL/6J mice treated with kainic acid in the absence of tonic-clonic seizures*. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.07.021>
- Bergami, M., Masserdotti, G., Temprana, S. G., Motori, E., Eriksson, T. M., Göbel, J., Yang, S. M., Conzelmann, K. K., Schinder, A. F., Götz, M., y Berninger, B.

- (2015). A critical period for experience-dependent remodeling of adult-born neuron connectivity. *Neuron*, 85(4), 710–717.  
<https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2015.01.001>
- Bloss, E. B., y Hunter, R. G. (2010). Hippocampal kainate receptors. *Vitamins and hormones*, 82, 167–184. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(10\)82009-6](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(10)82009-6)
- Blümcke, I., Coras, R., Miyata, H., y Özkara, C. (2012). Defining clinico-neuropathological subtypes of mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, 22(3), 402–411.  
<https://doi.org/10.1111/J.1750-3639.2012.00583.X>
- Boldrini, M., Fulmore, C. A., Tartt, A. N., Simeon, L. R., Pavlova, I., Poposka, V., Rosoklija, G. B., Stankov, A., Arango, V., Dwork, A. J., Hen, R., y Mann, J. J. (2018). Human Hippocampal Neurogenesis Persists throughout Aging. *Cell stem cell*, 22(4), 589-599.e5. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2018.03.015>
- Bonaguidi, M. A., Wheeler, M. A., Shapiro, J. S., Stadel, R. P., Sun, G. J., Ming, G. L., y Song, H. (2011). In vivo clonal analysis reveals self-renewing and multipotent adult neural stem cell characteristics. *Cell*, 145(7), 1142–1155.  
<https://doi.org/10.1016/J.CELL.2011.05.024>
- Botterill, J. J., Brymer, K. J., Caruncho, H. J., y Kalynchuk, L. E. (2015). Aberrant hippocampal neurogenesis after limbic kindling: Relationship to BDNF and hippocampal-dependent memory. *Epilepsy and Behavior*, 47, 83–92.  
<https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.04.046>
- Brandt, M. D., Jessberger, S., Steiner, B., Kronenberg, G., Reuter, K., Bick-Sander, A., Von Der Behrens, W., y Kempermann, G. (2003). Transient calretinin expression defines early postmitotic step of neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis of mice. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 24(3), 603–613. [https://doi.org/10.1016/S1044-7431\(03\)00207-0](https://doi.org/10.1016/S1044-7431(03)00207-0)
- Buckmaster, P. S. (2012). Mossy Fiber Sprouting in the Dentate Gyrus. *Epilepsia*, 51(SUPPL. 5), 39. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2010.02825.x>
- Burgess, N., Maguire, E. A., y O'Keefe, J. (2002). The human hippocampus and spatial and episodic memory. *Neuron*, 35(4), 625–641.  
[https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00830-9](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00830-9)
- Cain, D. P., Hargreaves, E. L., Boon, F., y Dennison, Z. (1993). An examination of the relations between hippocampal long-term potentiation, kindling, afterdischarge, and place learning in the water maze. *Hippocampus*, 3(2), 153–163.  
<https://doi.org/10.1002/HIPO.450030208>
- Cameron, H. A., y Glover, L. R. (2015). Adult neurogenesis: beyond learning and memory. *Annual review of psychology*, 66, 53–81.  
<https://doi.org/10.1146/ANNUREV-PSYCH-010814-015006>
- Charvet, C. J., y Finlay, B. L. (2018). Comparing Adult Hippocampal Neurogenesis Across Species: Translating Time to Predict the Tempo in Humans. *Frontiers in neuroscience*, 12(OCT). <https://doi.org/10.3389/FNINS.2018.00706>
- Chen, L., Xu, Y., Cheng, H., Li, Z., Lai, N., Li, M., Ruan, Y., Zheng, Y., Fei, F., Xu, C., Ma, J., Wang, S., Gu, Y., Han, F., Chen, Z., y Wang, Y. (2023). Adult-born neurons in critical period maintain hippocampal seizures via local aberrant excitatory circuits. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1).  
<https://doi.org/10.1038/s41392-023-01433-4>

- Chen, Z., Ljunggren, H. G., Bogdanovic, N., Nennesmo, I., Winblad, B., y Zhu, J. (2002). Excitotoxic neurodegeneration induced by intranasal administration of kainic acid in C57BL/6 mice. *Brain Research*, 931(2), 135–145. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(02\)02268-0](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(02)02268-0)
- Cho, K. O., Lybrand, Z. R., Ito, N., Brulet, R., Tafacory, F., Zhang, L., Good, L., Ure, K., Kernie, S. G., Birnbaum, S. G., Scharfman, H. E., Eisch, A. J., y Hsieh, J. (2015a). Aberrant hippocampal neurogenesis contributes to epilepsy and associated cognitive decline. *Nature Communications*, 6. <https://doi.org/10.1038/ncomms7606>
- Cho, K. O., Lybrand, Z. R., Ito, N., Brulet, R., Tafacory, F., Zhang, L., Good, L., Ure, K., Kernie, S. G., Birnbaum, S. G., Scharfman, H. E., Eisch, A. J., y Hsieh, J. (2015b). Aberrant hippocampal neurogenesis contributes to epilepsy and associated cognitive decline. *Nature Communications*, 6. <https://doi.org/10.1038/ncomms7606>
- Citri, A., y Malenka, R. C. (2008). Synaptic Plasticity: Multiple Forms, Functions, and Mechanisms. *Neuropsychopharmacology Reviews*, 33, 18–41. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301559>
- Clelland, C. D., Choi, M., Romberg, C., Clemenson, G. D., Fagniere, A., Tyers, P., Jessberger, S., Saksida, L. M., Barker, R. A., Gage, F. H., y Bussey, T. J. (2009). A functional role for adult hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation. *Science*, 325(5937), 210–213. [https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1173215/SUPPL\\_FILE/CLELLAND.SOM-.PDF](https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1173215/SUPPL_FILE/CLELLAND.SOM-.PDF)
- Cunningham, M. O., Davies, C. H., Buhl, E. H., Kopell, N., y Whittington, M. A. (2003). Gamma oscillations induced by kainate receptor activation in the entorhinal cortex in vitro. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 23(30), 9761–9769. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-30-09761.2003>
- Curzon, P., Rustay, N. R., y Browman, K. E. (2009). *Cued and Contextual Fear Conditioning for Rodents*. 19–37. <https://doi.org/10.1201/noe1420052343.ch2>
- Davies, J. A. (2007). Kainic acid. En *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference* (pp. 1–3). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.61978-6>
- Dayer, A. G., Ford, A. A., Cleaver, K. M., Yassaee, M., y Cameron, H. A. (2003). Short-term and long-term survival of new neurons in the rat dentate gyrus. *The Journal of comparative neurology*, 460(4), 563–572. <https://doi.org/10.1002/CNE.10675>
- Deisseroth, K., Singla, S., Toda, H., Monje, M., Palmer, T. D., y Malenka, R. C. (2004a). Excitation-neurogenesis coupling in adult neural stem/progenitor cells. *Neuron*, 42(4), 535–552. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(04\)00266-1](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(04)00266-1)
- Deisseroth, K., Singla, S., Toda, H., Monje, M., Palmer, T. D., y Malenka, R. C. (2004b). Excitation-neurogenesis coupling in adult neural stem/progenitor cells. *Neuron*, 42(4), 535–552. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(04\)00266-1](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(04)00266-1)
- Del Río, J. A., Heimrich, B., Borrell, V., Förster, E., Drakew, A., Alcántara, S., Nakajima, K., Miyata, T., Ogawa, M., Mikoshiba, K., Derer, P., Frotscher, M., y Soriano, E. (1997). A role for Cajal–Retzius cells and reelin in the development of hippocampal connections. *Nature*, 385(6611), 70–74. <https://doi.org/10.1038/385070a0>

- Deng, W., Aimone, J. B., y Gage, F. H. (2010). New neurons and new memories: How does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nature Reviews Neuroscience*, 11(5), 339–350. <https://doi.org/10.1038/nrn2822>
- Denoth-Lippuner, A., y Jessberger, S. (2021). Formation and integration of new neurons in the adult hippocampus. En *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 22, Número 4, pp. 223–236). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41583-021-00433-z>
- Devinsky, O., Vezzani, A., O'Brien, T. J., Jette, N., Scheffer, I. E., De Curtis, M., y Perucca, P. (2018a). Epilepsy. *Nature Reviews Disease Primers*, 4(May). <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.24>
- Devinsky, O., Vezzani, A., O'Brien, T. J., Jette, N., Scheffer, I. E., De Curtis, M., y Perucca, P. (2018b). Epilepsy. *Nature Reviews Disease Primers*, 4(May). <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.24>
- Dong, X. X., Wang, Y., y Qin, Z. H. (2009). Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta pharmacologica Sinica*, 30(4), 379–387. <https://doi.org/10.1038/APS.2009.24>
- Du, K., He, M., Zhao, D., Wang, Y., Ma, C., Liang, H., Wang, W., Min, D., Xue, L., y Guo, F. (2022). Mechanism of cell death pathways in status epilepticus and related therapeutic agents. En *Biomedicine and Pharmacotherapy* (Vol. 149). Elsevier Masson s.r.l. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112875>
- Dupret, D., Fabre, A., Döbrössy, M. D., Panatier, A., Rodríguez, J. J., Lamarque, S., Lemaire, V., Oliet, S. H. R., Piazza, P. V., y Abrous, D. N. (2007). Spatial learning depends on both the addition and removal of new hippocampal neurons. *PLoS biology*, 5(8), 1683–1694. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.0050214>
- Duveau, V., Laustela, S., Barth, L., Gianolini, F., Vogt, K. E., Keist, R., Chandra, D., Homanics, G. E., Rudolph, U., y Fritschy, J. M. (2011). Spatiotemporal specificity of GABAA receptor-mediated regulation of adult hippocampal neurogenesis. *The European journal of neuroscience*, 34(3), 362–373. <https://doi.org/10.1111/J.1460-9568.2011.07782.X>
- Eichenbaum, H. (2017). The role of the hippocampus in navigation is memory. *Journal of neurophysiology*, 117(4), 1785–1796. <https://doi.org/10.1152/JN.00005.2017>
- Enikolopov, G., Overstreet-Wadiche, L., y Ge, S. (2015). Viral and transgenic reporters and genetic analysis of adult neurogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(8). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018804>
- Espósito, M. S., Piatti, V. C., Laplagne, D. A., Morgenstern, N. A., Ferrari, C. C., Pitossi, F. J., y Schinder, A. F. (2005a). *Cellular/Molecular Neuronal Differentiation in the Adult Hippocampus Recapitulates Embryonic Development*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3114-05.2005>
- Espósito, M. S., Piatti, V. C., Laplagne, D. A., Morgenstern, N. A., Ferrari, C. C., Pitossi, F. J., y Schinder, A. F. (2005b). *Cellular/Molecular Neuronal Differentiation in the Adult Hippocampus Recapitulates Embryonic Development*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3114-05.2005>
- Filippov, V., Kronenberg, G., Pivneva, T., Reuter, K., Steiner, B., Wang, L. P., Yamaguchi, M., Kettenmann, H., y Kempermann, G. (2003). Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes. *Molecular*

and *Cellular Neuroscience*, 23(3), 373–382. [https://doi.org/10.1016/S1044-7431\(03\)00060-5](https://doi.org/10.1016/S1044-7431(03)00060-5)

- Fisher, R. S., Cross, J. H., French, J. A., Higurashi, N., Hirsch, E., Jansen, F. E., Lagae, L., Moshé, S. L., Peltola, J., Roulet Perez, E., Scheffer, I. E., y Zuberi, S. M. (2017). Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*, 58(4), 522–530. <https://doi.org/10.1111/epi.13670>
- Fisher, R. S., Van Emde Boas, W., Blume, W., Elger, C., Genton, P., Lee, P., y Engel, J. (2005). Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*, 46(4), 470–472. <https://doi.org/10.1111/J.0013-9580.2005.66104.X>
- Gano, L. B., Liang, L. P., Ryan, K., Michel, C. R., Gomez, J., Vassilopoulos, A., Reisdorph, N., Fritz, K. S., y Patel, M. (2018). Altered mitochondrial acetylation profiles in a kainic acid model of temporal lobe epilepsy. *Free radical biology y medicine*, 123, 116–124. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2018.05.063>
- Ge, S., Goh, E. L. K., Sailor, K. A., Kitabatake, Y., Ming, G. L., y Song, H. (2006). GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature*, 439(7076), 589–593. <https://doi.org/10.1038/NATURE04404>
- Gleeson, J. G., Peter T, L., Flanagan, L. A., y Walsh, C. A. (1999a). Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron*, 23(2), 257–271. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80778-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80778-3)
- Gleeson, J. G., Peter T, L., Flanagan, L. A., y Walsh, C. A. (1999b). Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron*, 23(2), 257–271. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80778-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80778-3)
- Gonçalves, J. T., Schafer, S. T., y Gage, F. H. (2016a). Adult Neurogenesis in the Hippocampus: From Stem Cells to Behavior. *Cell*, 167(4), 897–914. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2016.10.021>
- Gonçalves, J. T., Schafer, S. T., y Gage, F. H. (2016b). Adult Neurogenesis in the Hippocampus: From Stem Cells to Behavior. *Cell*, 167(4), 897–914. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2016.10.021>
- Hainmueller, T., y Bartos, M. (2020). Dentate gyrus circuits for encoding, retrieval and discrimination of episodic memories. *Nature Reviews Neuroscience* 2020 21:3, 21(3), 153–168. <https://doi.org/10.1038/s41583-019-0260-z>
- Hargreaves, E. L., Rao, G., Lee, I., y Knierim, J. J. (2005). Neuroscience: Major dissociation between medial and lateral entorhinal input to dorsal hippocampus. *Science*, 308(5729), 1792–1794. [https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1110449/SUPPL\\_FILE/HARGREAVES.SOM.PDF](https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1110449/SUPPL_FILE/HARGREAVES.SOM.PDF)
- Hernández Mercado, K., Martínez Moreno, A., Rodríguez Durán, L. F., Escobar, M. L., y Zepeda, A. (2022). Progression in Time of Dentate Gyrus Granule Cell Layer Widening due to Excitotoxicity Occurs along In Vivo LTP Reinstatement and Contextual Fear Memory Recovery. *Neural plasticity*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/7432842>
- Hernández-Mercado, K., y Zepeda, A. (2022). Morris Water Maze and Contextual Fear Conditioning Tasks to Evaluate Cognitive Functions Associated With Adult

- Hippocampal Neurogenesis. *Frontiers in neuroscience*, 15. <https://doi.org/10.3389/FNINS.2021.782947>
- Hu, R. Q., Koh, S., Torgerson, T., y Cole, A. J. (1998). Neuronal stress and injury in C57/BL mice after systemic kainic acid administration. *Brain research*, 810(1–2), 229–240. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(98\)00863-4](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(98)00863-4)
- Hübener, M., y Bonhoeffer, T. (2014). Neuronal plasticity: Beyond the critical period. *Cell*, 159(4), 727–737. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2014.10.035>
- Inostroza, M., Cid, E., Brotons-Mas, J., Gal, B., Aivar, P., Uzcateg, Y. G., Sandi, C., y de la Prida, L. M. (2011). Hippocampal-dependent spatial memory in the water maze is preserved in an experimental model of temporal lobe epilepsy in rats. *PloS one*, 6(7). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0022372>
- Isackson, P. J., Huntsman, M. M., Murray, K. D., y Gall, C. M. (1991). BDNF mRNA expression is increased in adult rat forebrain after limbic seizures: temporal patterns of induction distinct from NGF. *Neuron*, 6(6), 937–948. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(91\)90234-Q](https://doi.org/10.1016/0896-6273(91)90234-Q)
- Jain, S., LaFrancois, J. J., Botterill, J. J., Alcantara-Gonzalez, D., y Scharfman, H. E. (2019). Adult neurogenesis in the mouse dentate gyrus protects the hippocampus from neuronal injury following severe seizures. *Hippocampus*, 29(8), 683–709. <https://doi.org/10.1002/hipo.23062>
- Jakubs, K., Nanobashvili, A., Bonde, S., Ekdahl, C. T., Kokaia, Z., Kokaia, M., y Lindvall, O. (2006). Environment matters: synaptic properties of neurons born in the epileptic adult brain develop to reduce excitability. *Neuron*, 52(6), 1047–1059. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2006.11.004>
- Jane, D. (2007). Kainate Glutamate Receptor. *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, 1–15. <https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.60375-7>
- Jessberger, S., Clark, R. E., Broadbent, N. J., Clemenson, G. D., Consiglio, A., Lie, D. C., Squire, L. R., y Gage, F. H. (2009). Dentate gyrus-specific knockdown of adult neurogenesis impairs spatial and object recognition memory in adult rats. *Learning y memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 16(2), 147–154. <https://doi.org/10.1101/LM.1172609>
- Jessberger, S., y Parent, J. M. (2015). Epilepsy and adult neurogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(12). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020677>
- Jessberger, S., Rö Mer B, B., Babu, H., y Kempermann, G. (2005a). *Seizures induce proliferation and dispersion of doublecortin-positive hippocampal progenitor cells*. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2005.08.010>
- Jessberger, S., Rö Mer B, B., Babu, H., y Kempermann, G. (2005b). *Seizures induce proliferation and dispersion of doublecortin-positive hippocampal progenitor cells*. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2005.08.010>
- Jin, K., Zhu, Y., Sun, Y., Mao, X. O., Xie, L., y Greenberg, D. A. (2002). Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(18), 11946–11950. <https://doi.org/10.1073/PNAS.182296499>
- Jin, X. T., y Smith, Y. (2011). Localization and functions of kainate receptors in the basal ganglia. *Advances in experimental medicine and biology*, 717, 27–37. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9557-5\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9557-5_3)

- Jung, K. H., Chu, K., Lee, S. T., Kim, J., Sinn, D. I., Kim, J. M., Park, D. K., Lee, J. J., Kim, S. U., Kim, M., Lee, S. K., y Roh, J. K. (2006a). Cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib, inhibits the altered hippocampal neurogenesis with attenuation of spontaneous recurrent seizures following pilocarpine-induced status epilepticus. *Neurobiology of disease*, 23(2), 237–246.  
<https://doi.org/10.1016/J.NBD.2006.02.016>
- Jung, K. H., Chu, K., Lee, S. T., Kim, J., Sinn, D. I., Kim, J. M., Park, D. K., Lee, J. J., Kim, S. U., Kim, M., Lee, S. K., y Roh, J. K. (2006b). Cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib, inhibits the altered hippocampal neurogenesis with attenuation of spontaneous recurrent seizures following pilocarpine-induced status epilepticus. *Neurobiology of disease*, 23(2), 237–246.  
<https://doi.org/10.1016/J.NBD.2006.02.016>
- Karalay, Ö., Doberauer, K., Vadodaria, K. C., Knobloch, M., Berti, L., Miquelajauregui, A., Schwark, M., Jagasia, R., Taketo, M. M., Tarabykin, V., Lie, D. C., y Jessberger, S. (2011). Prospero-related homeobox 1 gene (Prox1) is regulated by canonical Wnt signaling and has a stage-specific role in adult hippocampal neurogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(14), 5807–5812.  
<https://doi.org/10.1073/PNAS.1013456108>
- Kempermann, G., Kuhn, H. G., y Gage, F. H. (1997). More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*, 386(6624), 493–495.  
<https://doi.org/10.1038/386493A0>
- Kempermann, G., Song, H., y Gage, F. H. (2015). Neurogenesis in the adult hippocampus. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5(9).  
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018812>
- Kesner, R. P. (2017). *An analysis of dentate gyrus function (an update)*.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.07.033>
- Keuker, J. I. H., Vollmann-Honsdorf, G. K., y Fuchs, E. (2001). How to use the optical fractionator: an example based on the estimation of neurons in the hippocampal CA1 and CA3 regions of tree shrews. *Brain Research Protocols*, 7(3), 211–221.  
[https://doi.org/10.1016/S1385-299X\(01\)00064-2](https://doi.org/10.1016/S1385-299X(01)00064-2)
- Kim, E. J., Ables, J. L., Dickel, L. K., Eisch, A. J., y Johnson, J. E. (2011a). Ascl1 (Mash1) defines cells with long-term neurogenic potential in subgranular and subventricular zones in adult mouse brain. *PloS one*, 6(3).  
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0018472>
- Kim, E. J., Ables, J. L., Dickel, L. K., Eisch, A. J., y Johnson, J. E. (2011b). Ascl1 (Mash1) defines cells with long-term neurogenic potential in subgranular and subventricular zones in adult mouse brain. *PloS one*, 6(3).  
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0018472>
- Knierim, J. J. (2015). The hippocampus. *Current Biology*, 25(23), R1116–R1121.  
<https://doi.org/10.1016/J.CUB.2015.10.049>
- Kolb, B., Harker, A., y Gibb, R. (2017). Principles of plasticity in the developing brain. *Developmental medicine and child neurology*, 59(12), 1218–1223.  
<https://doi.org/10.1111/DMCN.13546>
- Kourdougli, N., Pellegrino, C., Renko, J. M., Khirug, S., Chazal, G., Kukko-Lukjanov, T. K., Lauri, S. E., Gaiarsa, J. L., Zhou, L., Peret, A., Castrén, E., Tuominen, R. K., Crépel, V., y Rivera, C. (2017). Depolarizing  $\gamma$ -aminobutyric acid contributes

- to glutamatergic network rewiring in epilepsy. *Annals of neurology*, 81(2), 251–265. <https://doi.org/10.1002/ANA.24870>
- Kron, M. M., Zhang, H., y Parent, J. M. (2010). The developmental stage of dentate granule cells dictates their contribution to seizure-induced plasticity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 30(6), 2051–2059. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5655-09.2010>
- Laplagne, D. A., Espósito, M. S., Piatti, V. C., Morgenstern, N. A., Zhao, C., Van Praag, H., Gage, F. H., y Schinder, A. F. (2006). Functional convergence of neurons generated in the developing and adult hippocampus. *PLoS biology*, 4(12), 2349–2360. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.0040409>
- Leutgeb, J. K., Leutgeb, S., Moser, M. B., y Moser, E. I. (2007). Pattern separation in the dentate gyrus and CA3 of the hippocampus. *Science (New York, N.Y.)*, 315(5814), 961–966. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1135801>
- Lybrand, Z. R., Goswami, S., Zhu, J., Jarzabek, V., Merlock, N., Aktar, M., Smith, C., Zhang, L., Varma, P., Cho, K. O., Ge, S., y Hsieh, J. (2021). A critical period of neuronal activity results in aberrant neurogenesis rewiring hippocampal circuitry in a mouse model of epilepsy. *Nature Communications* 2021 12:1, 12(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21649-8>
- Magee, J. C., y Grienberger, C. (2020). Synaptic Plasticity Forms and Functions. *Annual Review of Neuroscience*, 43, 95–117. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-090919-022842>
- Maguire, E. A., Gadian, D. G., Johnsrude, I. S., Good, C. D., Ashburner, J., Frackowiak, R. S. J., y Frith, C. D. (2000). Navigation-related structural change in the hippocampi of taxi drivers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(8), 4398–4403. <https://doi.org/10.1073/pnas.070039597>
- Markwardt, S. J., Wadiche, J. I., y Overstreet-Wadiche, L. S. (2009). Input-specific GABAergic signaling to newborn neurons in adult dentate gyrus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(48), 15063–15072. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2727-09.2009>
- Mattson, M. P. (2019). Excitotoxicity. *Stress: Physiology, Biochemistry, and Pathology Handbook of Stress Series, Volume 3*, 125–134. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813146-6.00011-4>
- Mohapel, P., Ekdahl, C. T., y Lindvall, O. (2004a). Status epilepticus severity influences the long-term outcome of neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Neurobiology of Disease*, 15(2), 196–205. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2003.11.010>
- Mohapel, P., Ekdahl, C. T., y Lindvall, O. (2004b). Status epilepticus severity influences the long-term outcome of neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Neurobiology of Disease*, 15(2), 196–205. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2003.11.010>
- Morris, A. M., Churchwell, J. C., Kesner, R. P., y Gilbert, P. E. (2012). Selective lesions of the dentate gyrus produce disruptions in place learning for adjacent spatial locations. *Neurobiology of Learning and Memory*, 97(3), 326–331. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2012.02.005>
- Morris, S. A., Eaves, D. W., Smith, A. R., y Nixon, K. (2010). Alcohol inhibition of neurogenesis: a mechanism of hippocampal neurodegeneration in an adolescent

- alcohol abuse model. *Hippocampus*, 20(5), 596–607.  
<https://doi.org/10.1002/HIPO.20665>
- Moser, E. I. (2011a). The multi-laned hippocampus. *Nature Neuroscience* 2011 14:4, 14(4), 407–408. <https://doi.org/10.1038/nn.2783>
- Moser, E. I. (2011b). The multi-laned hippocampus. En *Nature Neuroscience* (Vol. 14, Número 4, pp. 407–408). <https://doi.org/10.1038/nn.2783>
- Moura, D. M. S., Brandão, J. A., Lentini, C., Heinrich, C., Queiroz, C. M., y Costa, M. R. (2020). Evidence of Progenitor Cell Lineage Rerouting in the Adult Mouse Hippocampus After Status Epilepticus. *Frontiers in Neuroscience*, 14. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.571315>
- Moura, D. M. S., de Sales, I. R. P., Brandão, J. A., Costa, M. R., y Queiroz, C. M. (2021). Disentangling chemical and electrical effects of status epilepticus-induced dentate gyrus abnormalities. *Epilepsy and Behavior*, 121. <https://doi.org/10.1016/J.YEBEH.2019.106575>
- Nacher, J., Varea, E., Blasco-Ibañez, J. M., Castillo-Gomez, E., Crespo, C., Martinez-Guijarro, F. J., y McEwen, B. S. (2005). Expression of the transcription factor Pax 6 in the adult rat dentate gyrus. *Journal of neuroscience research*, 81(6), 753–761. <https://doi.org/10.1002/JNR.20596>
- Namba, T., Ming, G. L., Song, H., Waga, C., Enomoto, A., Kaibuchi, K., Kohsaka, S., y Uchino, S. (2011). NMDA receptor regulates migration of newly generated neurons in the adult hippocampus via Disrupted-In-Schizophrenia 1 (DISC1). *Journal of neurochemistry*, 118(1), 34–44. <https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2011.07282.X>
- Obernier, K., y Alvarez-Buylla, A. (2019). Neural stem cells: origin, heterogeneity and regulation in the adult mammalian brain. *Development (Cambridge, England)*, 146(4). <https://doi.org/10.1242/DEV.156059>
- Olson, A. K., Eadie, B. D., Ernst, C., y Christie, B. R. (2006). Environmental enrichment and voluntary exercise massively increase neurogenesis in the adult hippocampus via dissociable pathways. *Hippocampus*, 16(3), 250–260. <https://doi.org/10.1002/HIPO.20157>
- Opitz, B. (2014). Memory function and the hippocampus. *Frontiers of neurology and neuroscience*, 34, 51–59. <https://doi.org/10.1159/000356422>
- O'Reilly, R. C., y McClelland, J. L. (1994). Hippocampal conjunctive encoding, storage, and recall: avoiding a trade-off. *Hippocampus*, 4(6), 661–682. <https://doi.org/10.1002/HIPO.450040605>
- Ortinski, P. I., Dong, J., Mungenast, A., Yue, C., Takano, H., Watson, D. J., Haydon, P. G., y Coulter, D. A. (2010). Selective induction of astrocytic gliosis generates deficits in neuronal inhibition. *Nature Neuroscience* 2010 13:5, 13(5), 584–591. <https://doi.org/10.1038/nn.2535>
- Overstreet-Wadiche, L. S., Bromberg, D. A., Bensen, A. S. L., y Westbrook, G. L. (2006). Seizures accelerate functional integration of adult-generated granule cells. *Journal of Neuroscience*, 26(15), 4095–4103. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5508-05.2006>
- Pallud, J., Häussler, U., Langlois, M., Hamelin, S., Devaux, B., Deransart, C., y Depaulis, A. (2011). Dentate gyrus and hilus transection blocks seizure propagation and granule cell dispersion in a mouse model for mesial temporal

- lobe epilepsy. *Hippocampus*, 21(3), 334–343.  
<https://doi.org/10.1002/HIPO.20795>
- Parent, J. M. (2007). Adult neurogenesis in the intact and epileptic dentate gyrus. En *Progress in Brain Research* (Vol. 163). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(07\)63028-3](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(07)63028-3)
- Parent, J. M., Yu, T. W., Leibowitz, R. T., Geschwind, D. H., Sloviter, R. S., y Lowenstein, D. H. (1997a). Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 17(10), 3727–3738. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-10-03727.1997>
- Parent, J. M., Yu, T. W., Leibowitz, R. T., Geschwind, D. H., Sloviter, R. S., y Lowenstein, D. H. (1997b). Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 17(10), 3727–3738. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-10-03727.1997>
- Pearson, J. N., Schulz, K. M., y Patel, M. (2014). Specific alterations in the performance of learning and memory tasks in models of chemoconvulsant-induced status epilepticus. *Epilepsy Research*, 108(6), 1032–1040. <https://doi.org/10.1016/j.epilepsyres.2014.04.003>
- Racine, R. J. (1972). Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalography and clinical neurophysiology*, 32(3), 281–294. [https://doi.org/10.1016/0013-4694\(72\)90177-0](https://doi.org/10.1016/0013-4694(72)90177-0)
- Raedt, R., Van Dycke, A., Van Melkebeke, D., De Smedt, T., Claeys, P., Wyckhuys, T., Vonck, K., Wadman, W., y Boon, P. (2009). Seizures in the intrahippocampal kainic acid epilepsy model: characterization using long-term video-EEG monitoring in the rat. *Acta neurologica Scandinavica*, 119(5), 293–303. <https://doi.org/10.1111/J.1600-0404.2008.01108.X>
- Ramírez-Amaya, V., Balderas, I., Sandoval, J., Escobar, M. L., y Bermúdez-Rattoni, F. (2001). Spatial long-term memory is related to mossy fiber synaptogenesis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 21(18), 7340–7348. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-18-07340.2001>
- Ramírez-Amaya, V., Escobar, M. L., Chao, V., y Bermúdez-Rattoni, F. (1999). Synaptogenesis of mossy fibers induced by spatial water maze overtraining. *Hippocampus*, 9(6), 631–636. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1063\(1999\)9:6<631::AID-HIPO3>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1063(1999)9:6<631::AID-HIPO3>3.0.CO;2-3)
- Rasetto, N. B., Giacomini, D., Bernardino, A. A., Waichman, T. V., Beckel, M. S., Di Bella, D. J., Brown, J., Davies-Sala, M. G., Gerhardinger, C., Lie, D. C., Arlotta, P., Chernomoretz, A., y Schinder, A. F. (2024). Transcriptional dynamics orchestrating the development and integration of neurons born in the adult hippocampus. *Science Advances*, 10(29). <https://doi.org/10.1126/SCIADV.ADP6039>
- Riley, J. N., y Moore, R. Y. (1981). Diencephalic and brainstem afferents to the hippocampal formation of the rat. *Brain research bulletin*, 6(5), 437–444. [https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(81\)80014-7](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(81)80014-7)

- Ruge, D., Liou, L. M., y Hoad, D. (2012). Improving the potential of neuroplasticity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 32(17), 5705–5706. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0430-12.2012>
- Rusina, E., Bernard, C., y Williamson, A. (2021a). The kainic acid models of temporal lobe epilepsy. *eNeuro*, 8(2). <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0337-20.2021>
- Rusina, E., Bernard, C., y Williamson, A. (2021b). The kainic acid models of temporal lobe epilepsy. *eNeuro*, 8(2). <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0337-20.2021>
- Santana, J., y Marzolo, M. P. (2017). The functions of Reelin in membrane trafficking and cytoskeletal dynamics: implications for neuronal migration, polarization and differentiation. *The Biochemical journal*, 474(18), 3137–3165. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160628>
- Scharfman, H. E., Goodman, J. H., y Sollas, A. L. (2000a). Granule-like neurons at the hilar/CA3 border after status epilepticus and their synchrony with area CA3 pyramidal cells: functional implications of seizure-induced neurogenesis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 20(16), 6144–6158. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-16-06144.2000>
- Scharfman, H. E., Goodman, J. H., y Sollas, A. L. (2000b). Granule-like neurons at the hilar/CA3 border after status epilepticus and their synchrony with area CA3 pyramidal cells: functional implications of seizure-induced neurogenesis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 20(16), 6144–6158. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-16-06144.2000>
- Schultz, C., y Engelhardt, M. (2014). Anatomy of the hippocampal formation. *Frontiers of neurology and neuroscience*, 34, 6–17. <https://doi.org/10.1159/000360925>
- Schwob, J. E., Fuller, T., Price, J. L., y Olney, J. W. (1980). Widespread patterns of neuronal damage following systemic or intracerebral injections of kainic acid: a histological study. *Neuroscience*, 5(6), 991–1014. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(80\)90181-5](https://doi.org/10.1016/0306-4522(80)90181-5)
- Scorza, F. A., Arida, R. M., Naffah-Mazzacoratti, M. da G., Scerni, D. A., Calderazzo, L., y Cavalheiro, E. A. (2009). The pilocarpine model of epilepsy: what have we learned? *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 81(3), 345–365. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652009000300003>
- Seri, B., García-Verdugo, J. M., McEwen, B. S., y Alvarez-Buylla, A. (2001). Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 21(18), 7153–7160. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-18-07153.2001>
- Shapiro, L. A., y Ribak, C. E. (2006a). Newly born dentate granule neurons after pilocarpine-induced epilepsy have hilar basal dendrites with immature synapses. *Epilepsy research*, 69(1), 53–66. <https://doi.org/10.1016/J.EPILEPSYRES.2005.12.003>
- Shapiro, L. A., y Ribak, C. E. (2006b). Newly born dentate granule neurons after pilocarpine-induced epilepsy have hilar basal dendrites with immature synapses. *Epilepsy research*, 69(1), 53–66. <https://doi.org/10.1016/J.EPILEPSYRES.2005.12.003>
- Sharma, S., Puttachary, S., Thippeswamy, A., Kanthasamy, A. G., y Thippeswamy, T. (2018). Status epilepticus: Behavioral and electroencephalography seizure correlates in kainate experimental models. En *Frontiers in Neurology* (Vol. 9, Número JAN, p. 23). <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00007>

- Sibbe, M., Häussler, U., Dieni, S., Althof, D., Haas, C. A., y Frotscher, M. (2012). Experimental epilepsy affects Notch1 signalling and the stem cell pool in the dentate gyrus. *The European journal of neuroscience*, 36(12), 3643–3652. <https://doi.org/10.1111/J.1460-9568.2012.08279.X>
- Sierra, A., Martín-Suárez, S., Valcárcel-Martín, R., Pascual-Brazo, J., Aelvoet, S. A., Abiega, O., Deudero, J. J., Brewster, A. L., Bernales, I., Anderson, A. E., Baekelandt, V., Maletić-Savatić, M., y Encinas, J. M. (2015). Neuronal hyperactivity accelerates depletion of neural stem cells and impairs hippocampal neurogenesis. *Cell Stem Cell*, 16(5), 488–503. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2015.04.003>
- Silva, A. V., Houzel, J. C., Croaro, I., Yacubian, E. M. T., Stavale, J. N., Centeno, R. S., y Cavalheiro, E. A. (2007). Granular cell dispersion and bilamination: two distinct histopathological patterns in epileptic hippocampi? *Epileptic disorders : international epilepsy journal with videotape*, 9(4), 438–442. <https://doi.org/10.1684/EPD.2007.0135>
- Snyder, J. S., Soumier, A., Brewer, M., Pickel, J., y Cameron, H. A. (2011). Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behaviour. *Nature*, 476(7361), 458–462. <https://doi.org/10.1038/NATURE10287>
- Song, J., Zhong, C., Bonaguidi, M. A., Sun, G. J., Hsu, D., Gu, Y., Meletis, K., Huang, Z. J., Ge, S., Enikolopov, G., Deisseroth, K., Luscher, B., Christian, K. M., Ming, G. L., y Song, H. (2012). Neuronal circuitry mechanism regulating adult quiescent neural stem-cell fate decision. *Nature*, 489(7414), 150–154. <https://doi.org/10.1038/NATURE11306>
- Sperk, G., Lassmann, H., Baran, H., Kish, S. J., Seitelberger, F., y Hornykiewicz, O. (1983). Kainic acid induced seizures: neurochemical and histopathological changes. *Neuroscience*, 10(4), 1301–1315. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(83\)90113-6](https://doi.org/10.1016/0306-4522(83)90113-6)
- Squire, L. R. (1992). Memory and the Hippocampus: A Synthesis From Findings With Rats, Monkeys, and Humans. *Psychological Review*, 99(2), 195–231. <https://doi.org/10.1037/0033-295X.99.2.195>
- Strange, B. A., Witter, M. P., Lein, E. S., y Moser, E. I. (2014). Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(10), 655–669. <https://doi.org/10.1038/nrn3785>
- Sun, G. J., Zhou, Y., Stadel, R. P., Moss, J., Yong, J. H. A., Ito, S., Kawasaki, N. K., Phan, A. T., Oh, J. H., Modak, N., Reed, R. R., Toni, N., Song, H., y Ming, G. L. (2015). Tangential migration of neuronal precursors of glutamatergic neurons in the adult mammalian brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(30), 9484–9489. <https://doi.org/10.1073/pnas.1508545112>
- Sweatt, J. D. (2016). Neural plasticity and behavior – sixty years of conceptual advances. *Journal of Neurochemistry*, 139, 179–199. <https://doi.org/10.1111/jnc.13580>
- Tanaka, T., Serneo, F. F., Tseng, H. C., Kulkarni, A. B., Tsai, L. H., y Gleeson, J. G. (2004). Cdk5 Phosphorylation of Doublecortin Ser297 Regulates Its Effect on Neuronal Migration. *Neuron*, 41(2), 215–227. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00852-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00852-3)

- Tang, H., Li, Y., Tang, W., Zhu, J., Parker, G. C., y Zhang, J. H. (2022). Endogenous Neural Stem Cell-induced Neurogenesis after Ischemic Stroke: Processes for Brain Repair and Perspectives. *Translational stroke research*.  
<https://doi.org/10.1007/S12975-022-01078-5>
- Tauk, D. L., y Nadler, J. V. (1985). Evidence of functional mossy fiber sprouting in hippocampal formation of kainic acid-treated rats. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 5(4), 1016–1022.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.05-04-01016.1985>
- Tobin, M. K., Musaraca, K., Disouky, A., Shetti, A., Bheri, A., Honer, W. G., Kim, N., Dawe, R. J., Bennett, D. A., Arfanakis, K., y Lazarov, O. (2019). Human Hippocampal Neurogenesis Persists in Aged Adults and Alzheimer's Disease Patients. *Cell stem cell*, 24(6), 974-982.e3.  
<https://doi.org/10.1016/J.STEM.2019.05.003>
- Tongiorgi, E., Armellin, M., Giulianini, P. G., Bregola, G., Zucchini, S., Paradiso, B., Steward, O., Cattaneo, A., y Simonato, M. (2004). Brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein are targeted to discrete dendritic laminae by events that trigger epileptogenesis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 24(30), 6842–6852.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5471-03.2004>
- Trinka, E., Cock, H., Hesdorffer, D., Rossetti, A. O., Scheffer, I. E., Shinnar, S., Shorvon, S., y Lowenstein, D. H. (2015). A definition and classification of status epilepticus--Report of the ILAE Task Force on Classification of Status Epilepticus. *Epilepsia*, 56(10), 1515–1523. <https://doi.org/10.1111/EPI.13121>
- Tsao, C. H., Wu, K. Y., Su, N. C., Edwards, A., y Huang, G. J. (2023). The influence of sex difference on behavior and adult hippocampal neurogenesis in C57BL/6 mice. *Scientific Reports*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-44360-8>
- Ullal, G. R., Satishchandra, P., y Shankar, S. K. (1996). Hyperthermic seizures: an animal model for hot-water epilepsy. *Seizure*, 5(3), 221–228.  
[https://doi.org/10.1016/S1059-1311\(96\)80040-9](https://doi.org/10.1016/S1059-1311(96)80040-9)
- Urbán, N., Blomfield, I. M., y Guillemot, F. (2019). Quiescence of Adult Mammalian Neural Stem Cells: A Highly Regulated Rest. *Neuron*, 104(5), 834–848.  
<https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2019.09.026>
- Van Vliet, E. A., Otte, W. M., Wadman, W. J., Aronica, E., Kooij, G., De Vries, H. E., Dijkhuizen, R. M., y Gorter, J. A. (2016). Blood-brain barrier leakage after status epilepticus in rapamycin-treated rats I: Magnetic resonance imaging. *Epilepsia*, 57(1), 59–69. <https://doi.org/10.1111/EPI.13246>
- Villalpando Vargas, F. V., Medina Ceja, L. G., Rodríguez Mercado, S., y Ventura Mejía, C. (2019). Clasificación y Modelos Animales de Status Epilepticus. *e-CUCBA*, 11, 54–68. <https://doi.org/10.32870/e-cucba.v0i11.130>
- Von Bernhardi, R., Eugenín-Von Bernhardi, L., y Eugenín, J. (2017). What Is Neural Plasticity? *Advances in experimental medicine and biology*, 1015, 1–15.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-319-62817-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-62817-2_1)
- Voss, J. L., Bridge, D. J., Cohen, N. J., y Walker, J. A. (2017). A Closer Look at the Hippocampus and Memory. *Trends in cognitive sciences*, 21(8), 577–588.  
<https://doi.org/10.1016/J.TICS.2017.05.008>

- Yagi, S., Splinter, J. E. J., Tai, D., Wong, S., Wen, Y., y Galea, L. A. M. (2020). Sex differences in maturation and attrition of adult neurogenesis in the hippocampus. *eNeuro*, 7(4), 1–14. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0468-19.2020>
- Yang, F., Wang, J. C., Han, J. L., Zhao, G., y Jiang, W. (2008). Different effects of mild and severe seizures on hippocampal neurogenesis in adult rats. *Hippocampus*, 18(5), 460–468. <https://doi.org/10.1002/HIPO.20409>
- Yang, S. M., Alvarez, D. D., y Schinder, A. F. (2015a). Reliable genetic labeling of adult-born dentate granule cells using ascl1CreERT2 and glastCreERT2 murine lines. *Journal of Neuroscience*, 35(46), 15379–15390. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2345-15.2015>
- Yang, S. M., Alvarez, D. D., y Schinder, A. F. (2015b). Reliable genetic labeling of adult-born dentate granule cells using ascl1CreERT2 and glastCreERT2 murine lines. *Journal of Neuroscience*, 35(46), 15379–15390. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2345-15.2015>
- Zeidler, Z., Brandt-Fontaine, M., Leintz, C., Krook-Magnuson, C., Netoff, T., y Krook-Magnuson, E. (2018). Targeting the Mouse Ventral Hippocampus in the Intrahippocampal Kainic Acid Model of Temporal Lobe Epilepsy. *eNeuro*, 5(4), 158–176. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0158-18.2018>
- Zepeda, A., Aguilar-Arredondo, A., Michel, G., Ramos-Languren, L. E., Escobar, M. L., y Arias, C. (2013a). Functional recovery of the dentate gyrus after a focal lesion is accompanied by structural reorganization in the adult rat. *Brain structure y function*, 218(2), 437–453. <https://doi.org/10.1007/S00429-012-0407-4>
- Zepeda, A., Aguilar-Arredondo, A., Michel, G., Ramos-Languren, L. E., Escobar, M. L., y Arias, C. (2013b). Functional recovery of the dentate gyrus after a focal lesion is accompanied by structural reorganization in the adult rat. *Brain structure y function*, 218(2), 437–453. <https://doi.org/10.1007/S00429-012-0407-4>
- Zhang, X. M., Zhu, S. W., Duan, R. S., Mohammed, A. H., Winblad, B., y Zhu, J. (2008). Gender differences in susceptibility to kainic acid-induced neurodegeneration in aged C57BL/6 mice. *NeuroToxicology*, 29(3), 406–412. <https://doi.org/10.1016/J.NEURO.2008.01.006>
- Zhao, C., Teng, E. M., Summers, R. G., Ming, G. L., y Gage, F. H. (2006a). Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(1), 3–11. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3648-05.2006>
- Zhao, C., Teng, E. M., Summers, R. G., Ming, G. L., y Gage, F. H. (2006b). Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(1), 3–11. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3648-05.2006>