



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

**Papel de la Neurogénesis en la reorganización
estructural del Giro Dentado de la rata
después de una lesión excitotóxica**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
LICENCIADA EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA**

**PRESENTA:
Gabriela Michel Chávez**

**Tutora: Dra. Clorinda Arias Álvarez
Cotutora: Dra. Angélica Zepeda Rivera**

MEXICO, D.F

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**Papel de la Neurogénesis en la reorganización
estructural del Giro Dentado de la rata
después de una lesión excitotóxica**

Gabriela Michel Chávez

Tutora: Dra. Clorinda Arias Álvarez

Cotutora: Dra. Angélica Zepeda Rivera

A mis papás
Gabriela y Roberto

Agradecimientos

A la Dra. Clorinda Arias, por permitirme hacer la tesis en su laboratorio, por toda la confianza y la dedicación.

A la Dra. Angélica Zepeda, por la orientación a lo largo de esta tesis.

A mis papás, por darme todo, creer en mí y apoyarme siempre.

A mis hermanos: Diego y Joan por darle color a mi vida.

A Philip, por todo el amor, el cariño y el ánimo.

A los que fueron mis Maestros: Herr Bühlmann, Dr. Luis Servín, Dr. Tapia y Dr. Gamba por sus sabias enseñanzas y consejos.

Al Dr. Taylor, por abrirme las puertas de su laboratorio.

A todos mi amigos, por ser el impulso para seguir.

A la técnico académico Patricia Ferrera, por todo el apoyo en el laboratorio.

A Eduardo Martínez, por toda la guía a lo largo de este camino.

A Karina Hernández, por todo el tiempo dedicado a mi aprendizaje.

A Mariana Schulte-Sasse, por su entusiasmo para aprender.

A todos los miembros del laboratorio.

Al Dr. Chimal y a todo su equipo, por toda su disponibilidad.

A los sinodales, por tomarse el tiempo para enriquecer este trabajo.

Índice

Abreviaturas	6
Resumen	7
1. Introducción	9
1.1 Neurogénesis en el cerebro adulto	9
1.2 Zonas neurogénicas	11
1.2.1 Zona Subventricular	13
1.2.2 Zona Subgranular del Giro Dentado del hipocampo	14
1.3 Neurogénesis en la zona Subgranular	16
1.4 Importancia del Giro Dentado	19
1.5 Daño en el Giro Dentado	19
2. Objetivo General	22
3. Objetivos Particulares	22
4. Material y Métodos	23
4.1 Tinción de Nissl	24
4.2 Inmunohistoquímicas	24
4.3 Análisis de las imágenes	28
4.4 Análisis estadístico	29

5. Resultados	30
5.1 Secciones histológicas con tinción de Nissl	30
5.2 Inmunohistoquímicas para doblecortina y calretinina	31
5.3 Inmunohistoquímicas para doblecortina y núcleos neuronales	32
5.4 Inmunohistoquímicas para la proteína de unión a lípidos en el cerebro y para el antígeno nuclear de células en proliferación	33
5.5 Inmunohistoquímicas para la proteína ácida fibrilar glial y núcleos neuronales	43
5.6 Análisis estadístico	47
6. Discusión	51
7. Conclusiones Generales	58
8. Bibliografía	59

Abreviaturas

AK Ácido Kaínico

AMPA α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionato

BF Buffer de Fosfatos

Blbp Proteína de unión a lípidos en el cerebro

BrdU bromodeoxiuridina

CA1 *Cornu ammonis* 1

CA2 *Cornu ammonis* 2

CA3 *Cornu ammonis* 3

CA4 *Cornu ammonis* 4

CalR Calretinina

CMNs Células madre neurales

DCX Doblecortina

GD Giro dentado

GFAP Proteína ácida fibrilar glial

NeuN Núcleos Neuronales

PCNA Antígeno nuclear de células en proliferación

SNC Sistema Nervioso Central

ZSG Zona subgranular

ZSV Zona subventricular

Resumen

La idea de que la neurogénesis es parte del desarrollo postnatal era impensable durante el siglo XX. En 1965 esta idea cambió cuando J. Altman y G. Das publicaron por primera vez la existencia de nuevas neuronas en el cerebro adulto pero esta hipótesis no tuvo muchos seguidores. La neurogénesis hoy, es un fenómeno aceptado y se sabe que la producción continua de células gliales y neuronas en el Sistema Nervioso Central (SNC) ocurre a lo largo de la vida, en el cerebro adulto de vertebrados, particularmente en dos zonas: la Zona Subventricular (ZSV) en la pared de los ventrículos laterales y en la Zona Subgranular (ZSG) del Giro Dentado (GD) del hipocampo. Esta última región contiene progenitores neurales que proliferan y se diferencian a neuronas continuamente y cuya tasa de producción se modula bajo diferentes situaciones tales como el estrés, la exposición a un ambiente enriquecido, la depresión etc. Algunos trabajos demuestran que después de una lesión el GD es capaz de reestructurarse. Además es una de las zonas más sensibles al envejecimiento. Todas estas características hacen del GD un modelo muy interesante para estudiar la reestructuración después de un daño. A pesar de estas características, no se ha hecho un curso temporal de la activación de la neurogénesis subsecuente a una lesión incluyendo un análisis de las diferentes etapas de maduración neuronal.

El objetivo de este trabajo fue inducir una lesión excitotóxica en la región del GD de ratas adultas y evaluar la capacidad de regeneración y reestructuración de esta zona 24 horas, 7 días y 2 meses después de la lesión. Se analizaron los cambios histológicos por medio de la tinción de Nissl a los distintos tiempos y se estudió por inmunohistoquímica la expresión de marcadores de diferentes etapas de la

maduración neuronal: doblecortina (DCX), calretinina (CalR), proteína ácida fibrilar glial (GFAP), núcleos neuronales (NeuN), antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) y la proteína de unión a lípidos en el cerebro (Blbp). Finalmente, se hizo un análisis estadístico del número de células positivas a cada marcador en tres diferentes tiempos post-lesión.

En conclusión pudimos observar un incremento de la tasa de neurogénesis después del daño, ya que las células analizadas fueron positivas a distintos marcadores neuronales. La morfología del GD en ratas tratadas con ácido kaínico (AK) es similar a las ratas control, después de 2 meses de inducir la lesión lo que sugiere una reorganización de la capa de células granulares, en esta zona.

1. Introducción

1.1 Neurogénesis en el cerebro adulto

Durante muchos años la idea de la regeneración cerebral era inimaginable. Se creía entonces que las células del Sistema Nervioso Central (SNC), neuronas y glía, se generaban únicamente durante el desarrollo ontogénico y que una vez perdidas, la pérdida era irremplazable; las células muertas no podían ser sustituidas.

Una cita que describe muy bien lo que se pensaba a principio del siglo XX es la del célebre ganador del premio Nóbel, Santiago Ramón y Cajal en su obra “Degeneración y regeneración en el sistema nervioso”:

“La especialización funcional del cerebro impone a las neuronas dos grandes lagunas: incapacidad de proliferación e irreversibilidad de la diferenciación intraprotoplasmática. Es por esta razón que, una vez terminado el desarrollo, las fuentes de crecimiento y regeneración de los axones y dendritas se secan irrevocablemente. En los cerebros adultos las vías nerviosas son algo fijo, terminado, inmutable. Todo puede morir, nada puede regenerarse.”

No fue sino hasta 1965 que este dogma central de la neurobiología se puso en duda cuando se publicó por primera vez la presencia de figuras mitóticas en el cerebro adulto (Altman y Das 1965; Altman y Das 1966). Sin embargo, debido a dificultades metodológicas, los resultados no se replicaron y se mantuvieron en la oscuridad por algunos años. El tema fue retomado años después por otro grupo, que observó por primera vez que las figuras mitóticas eran neuronas. (Kaplan y Hinds 1977).

Sin embargo, este hallazgo no lo comprobó el grupo de Pasko Rakic (Rakic 1985a; Rakic 1985b) especializado en el estudio de primates, quien era muy influyente en aquella época; por lo que la idea de “no nuevas neuronas” se mantuvo. Nuevamente pasó más de una década y el tema finalmente se reivindicó cuando comenzó a utilizarse en el SNC el análogo de la timidina, la bromodeoxiuridina (BrdU) que había sido utilizado con éxito para detectar la proliferación celular en tumores. La BrdU no sólo podía detectarse por radiografía, sino que también por medio de inmunohistoquímica (Miller y Nowakowski 1988), y se utilizó para describir por primera vez la proliferación específica de una población específica de células, las intrahilares en el Giro Dentado (GD) (Nowakowski et al. 1989).

El estudio en esta área empezó a cobrar más interés cuando se observó por primera vez proliferación neuronal en el cerebro de monos tití (Gould et al. 1998) y sobre todo cuando se demostró en humanos (Eriksson et al. 1998). La neurogénesis postnatal es hoy un fenómeno fisiológico aceptado. Se sabe que la producción de células gliales y neuronas continúa a lo largo de la vida en el cerebro de vertebrados (Alvarez-Buylla et al. 1994; Garcia-Verdugo et al. 1989; Goldman y Nottebohm 1983; Lois y Alvarez-Buylla 1994).

Para que una célula pueda producir los distintos linajes celulares en el SNC tiene que tener un potencial proliferativo, capacidad de auto-renovación y ser multipotente. Una célula que presenta estas características es considerada una célula madre. Un progenitor es una célula con un potencial más restringido para producir células de distintos linajes. Un precursor es una célula que está parcialmente diferenciada.

Las células madre neurales (CMNs) son células proliferativas con capacidad limitada de auto renovación que se pueden diferenciar en dos tipos celulares: glía y neuronas (Gage et al. 1995). En el cerebro adulto de vertebrados las CMNs se producen específicamente en dos zonas: la Zona Subventricular y la Zona Subgranular.

1.2 Zonas neurogénicas

En el cerebro adulto de vertebrados, se han descrito dos zonas neurogénicas principales: la Zona Subventricular (ZSV) en la pared lateral de los ventrículos laterales (Lois y Alvarez-Buylla 1994) (Figura 1A y 1B) y la Zona Subgranular (ZSG) del GD del hipocampo (Cameron et al. 1995) (Figura 1C y 1D) .

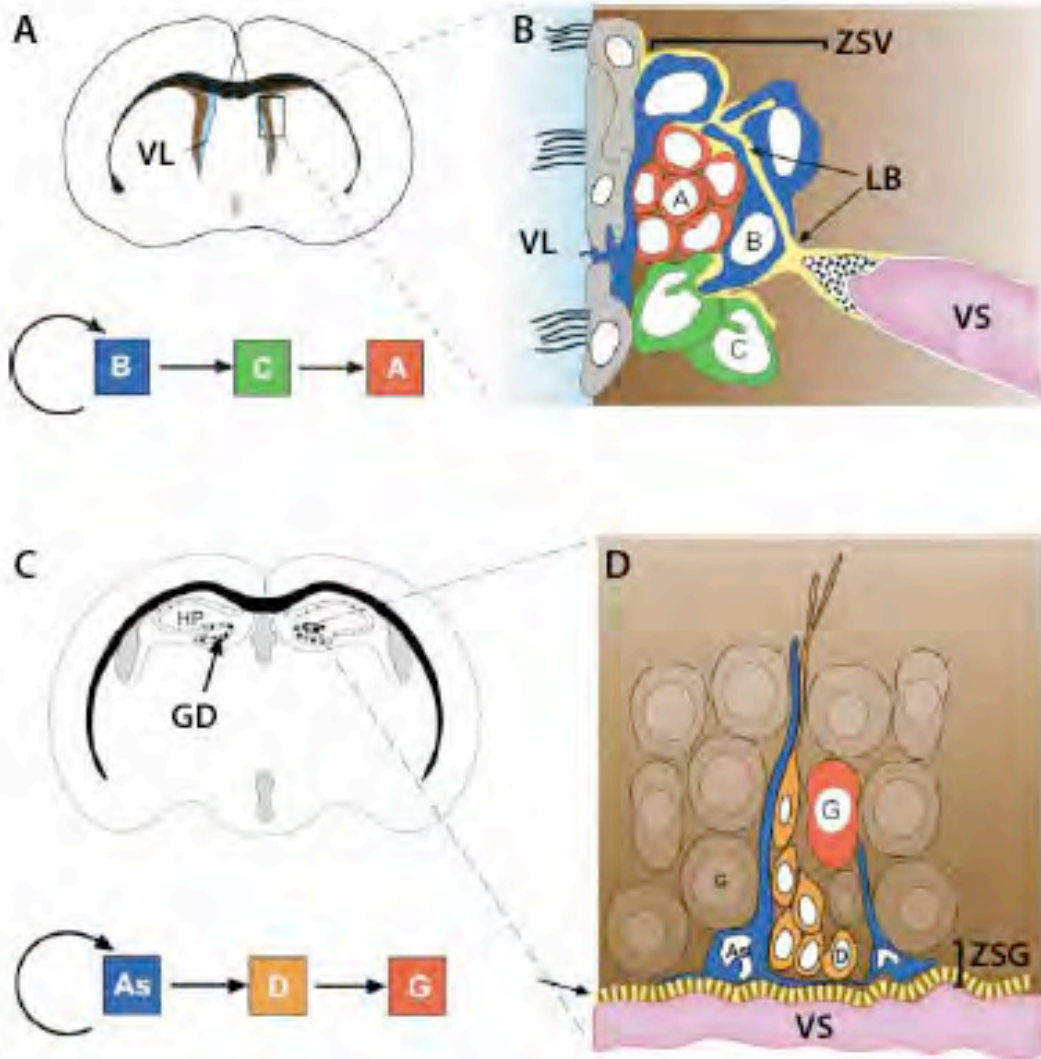


Figura 1: Esquema de la Neurogénesis adulta en la ZSV y la ZSG. (A) Sección coronal del cerebro adulto de ratón. En color azul claro se muestra el ventrículo lateral (VL). El área en el cuadro se encuentra ampliada en (B). (B) Arquitectura de la ZSV: células B (azul oscuro) son los astrocitos que son las células madre y sirven como nicho celular. Las células C (verde) se dividen rápidamente, son células transientes amplificadoras derivadas de las células B. Las células C dan lugar a las células A (rojo) que son neuroblastos que migran al bulbo olfatorio donde se diferencian a interneuronas. Los vasos sanguíneos (VS) y la lámina basal (LB) también están representadas. (C) Sección coronal al nivel del hipocampo (HP). El GD se indica con la flecha. El GD está ampliada en (D). (D) Arquitectura de la ZSG. Los astrocitos (As) de color azul oscuro dan lugar a los progenitores D (células de color naranja) que maduran a nuevas células granulares (células de color rojo). Estas nuevas células granulares se integran a la capa de células granulares del GD (células G de color café). Los vasos sanguíneos (VS) se encuentran en la proximidad de la ZSG y cerca de la lámina basal (LB). ((Alvarez-Buylla y Lim 2004).

La existencia de otras zonas neurogénicas es aún controversial (Gould 2007). Desde el descubrimiento de la neurogénesis se observó a un gran número de células en proliferación en la Zona Subcallosa localizada entre el hipocampo y el cuerpo calloso en el cerebro adulto de roedores (Altman y Das 1965). Se ha demostrado *in vivo* que en esta zona se producen oligodendrocitos que migran al cuerpo calloso, y también se ha descrito la formación de neuroesferas en cultivo a partir de células de esta zona que generan neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (Seri et al. 2006).

Otras zonas en las cuales se ha observado proliferación celular son el cerebelo y el núcleo coclear ventral. Estas regiones sólo se mencionaron en los trabajos pioneros de la neurogénesis (Altman y Das 1965). Sin embargo, desde aquella época no se ha publicado más al respecto. Otras zonas propuestas son, la corteza cerebral y el estriado, sin embargo hasta ahora no ha podido ser completamente verificado.

A pesar de que exista mucha información relacionada con la ZSV en esta tesis sólo se abordará a detalle la ZSG.

1.2.1 Zona Subventricular

Las células que nacen en la ZSV migran a través de una red compleja de vías paralela a la pared del ventrículo lateral para unirse al flujo rostral migratorio que lleva al bulbo olfatorio. En esta zona, las neuronas jóvenes maduran a neuronas granulares e interneuronas periglomerulares. Se ha observado que en el área SV

una población del tipo de glía radial son las células madre neurales responsables de la neurogénesis en el bulbo olfatorio (Doetsch et al. 1999).

1.2.2 Zona Subgranular del Giro Dentado del hipocampo

La formación hipocampal está integrada por seis estructuras: el subículo, el presubículo, el parasubículo, la Corteza Entorrinal, el hipocampo subdividido en *Cornu ammonis* 1 (CA1), CA2 y CA3 y el GD.

El hipocampo pertenece al sistema de memoria del lóbulo temporal medial. Esta estructura fue nombrada así, debido a que presenta un curvatura similar a la que presenta un caballo de mar (o hipocampo). Está integrada por dos giros, el Cuerno de Amón o en latín *Cornu ammonis* (CA), cuyo nombre fue inspirado por los cuernos del dios Egipto Amón. El segundo giro que integra esta estructura es el Giro dentado (GD).

El GD en particular está formado por tres capas: la capa molecular, la capa granular y la capa polimórfica también llamada hilus o CA4 (Amaral y Witter, 1995). La zona en la que acaba el giro en forma de V o U en el eje septotemporal se conoce como cresta.

La capa molecular: está ocupada principalmente por las dendritas de varias células; de canasta, granulares y polimórficas. También se encuentran terminales axónicas de origen diverso. Al menos dos tipos celulares están presentes en esta zona; las células de cuerpo multipolar o de cuerpo triangular (un tipo de célula de canasta) y la célula chandalier o axo-cónica.

La capa polimórfica: las principales células de esta zona, son las células musgosas glutamatérgicas. También se pueden encontrar células multipolares de tipo GABAérgico y células fusiformes.

La capa granular: es la capa principal del GD. Está conformada por columnas densas de células de forma esférica llamadas granulares, que tienen árboles dendríticos abundantes pero unipolares las cuales son glutamatérgicas y representan las principales neuronas excitadoras en el GD (West et al. 1988). En la parte más profunda de esta capa se localizan las células de canasta que son en su mayoría GABAérgicas y algunas otras que son reactivas a parvalbúmina (Amaral y Witter 1995). Los progenitores de las nuevas neuronas formadas en el hipocampo residen en la capa subgranular del GD. Esta lámina de separación o interfase entre la capa granular y la capa polimórfica es la que es considerada neurogénica. (ver Figura 2(A) y 2(B)).

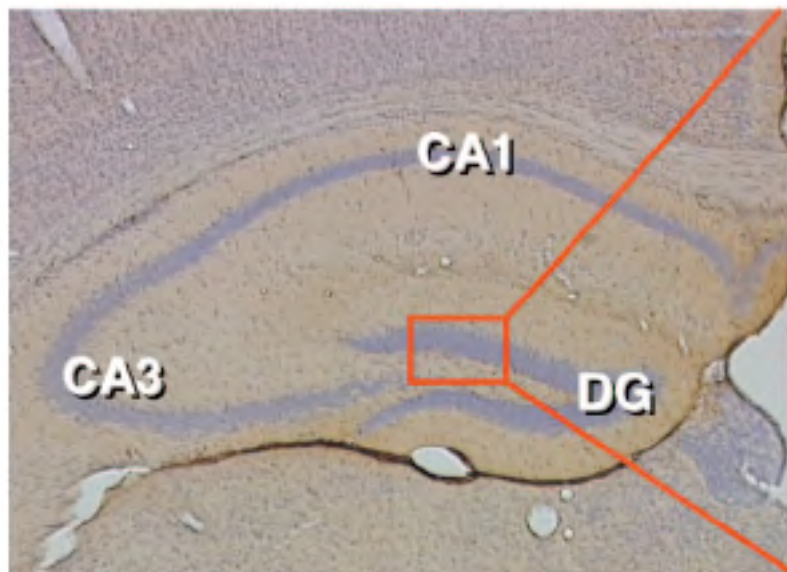


Figura 2A: Sección histológica coronal del hipocampo teñido con violeta de cresilo. En el recuadro se marca una zona del GD. Para un aumento de las capas que integran al GD ver Figura 2B. (Abrous et. al. 2005)

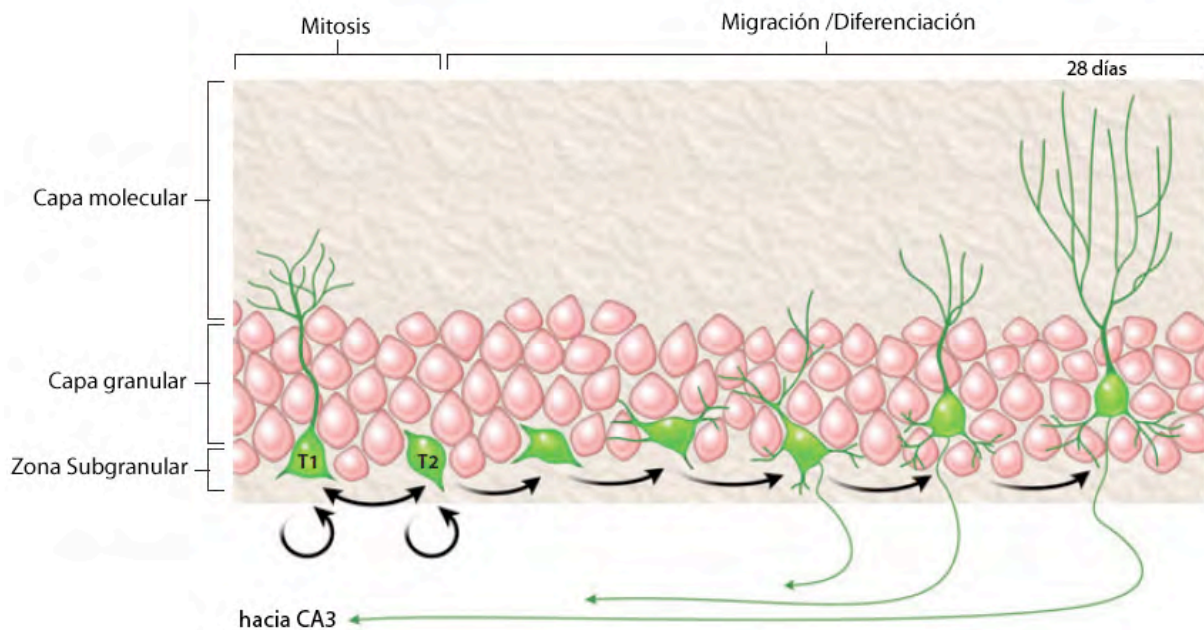


Figura 2B: Las Células madre neurales (CMNs) adultas en la ZSG. Las CMNs adultas están localizadas en la ZSG del GD del hipocampo. Los dos tipos de CMNs presentes en esta zona son: tipo 1 (T1) de forma radial y tipo 2 (T2) de forma no radial (ver el texto para una información más detallada). Las CMNs proliferan y dan origen a las neuronas granulares que se integran en el circuito. Estas neuronas son excitadoras y conectan al GD, a CA3 y a las interneuronas del hilus. Las neuronas en diferenciación están en color verde y las neuronas granulares en rosa. (Suh et al. 2009).

1.3 Neurogénesis en la zona Subgranular

La neurogénesis en el GD del hipocampo adulto ocurre de la siguiente forma: un precursor celular localizado en la ZSG en división da lugar a dos células hija que migran a la capa de células granulares, es decir, a su sitio de diferenciación donde empiezan a extender sus dendritas. Ya diferenciadas a células granulares proyectan sus axones hacia la región CA3 del hipocampo (Markakis y Gage 1999; Stanfield y Trice 1988). Estos axones reciben el nombre de fibras musgosas al no haber mielina en ellos. Antes de proyectar a CA3, envían colaterales a las células

musgosas y de canasta de la capa polimórfica. Después de 4-7 semanas las células se integran al circuito neuronal.

Con el objetivo de caracterizar los estadios celulares de esta zona, el grupo de Gerd Kempermann empleó marcadores celulares y por medio de técnicas de inmunohistoquímica, determinó lo siguiente (Kempermann et al. 2004):

Las células madre que son los precursores primarios de esta zona, tienen un soma de tipo triangular, con procesos apicales largos y fuertes que alcanzan la capa granular. Estas células tienen apariencia del tipo de glía radial con propiedades astrocíticas. Son positivas a los marcadores: proteína ácida fibrilar glial (GFAP), proteína de unión a lípidos en el cerebro (Blbp) y nestina, y además generan nuevas neuronas en condiciones normales (Seri et al. 2001). Son nombradas células del tipo 1. Estas células dan lugar a los estadios 2-4 que son células progenitoras transientes amplificadoras posiblemente del linaje neuronal. Estos estadios difieren en su potencial de proliferación y diferenciación. La célula hija llamada célula del tipo 2 es también nestina positiva, pero GFAP y Blbp negativa y es altamente proliferativa. Tiene una forma esférica con procesos orientados de forma tangencial y un núcleo denso. Las hay de dos tipos; aquellas negativas o positivas a doblecortina (DCX). Son nombradas 2A y 2B respectivamente. Las células del tipo 3 son positivas a DCX y negativas a nestina. El núcleo de estas células es esférico. La expresión de DCX persiste hasta el estadio 5 donde las células granulares se vuelven postmitóticas. En este punto las conexiones se establecen y la selección de supervivencia a largo plazo ocurre. También son positivas a calretinina (CalR) (Brandt et al. 2003) y esto finalmente lleva al estadio 6 formado por células granulares ya diferenciadas positivas a calbindina.

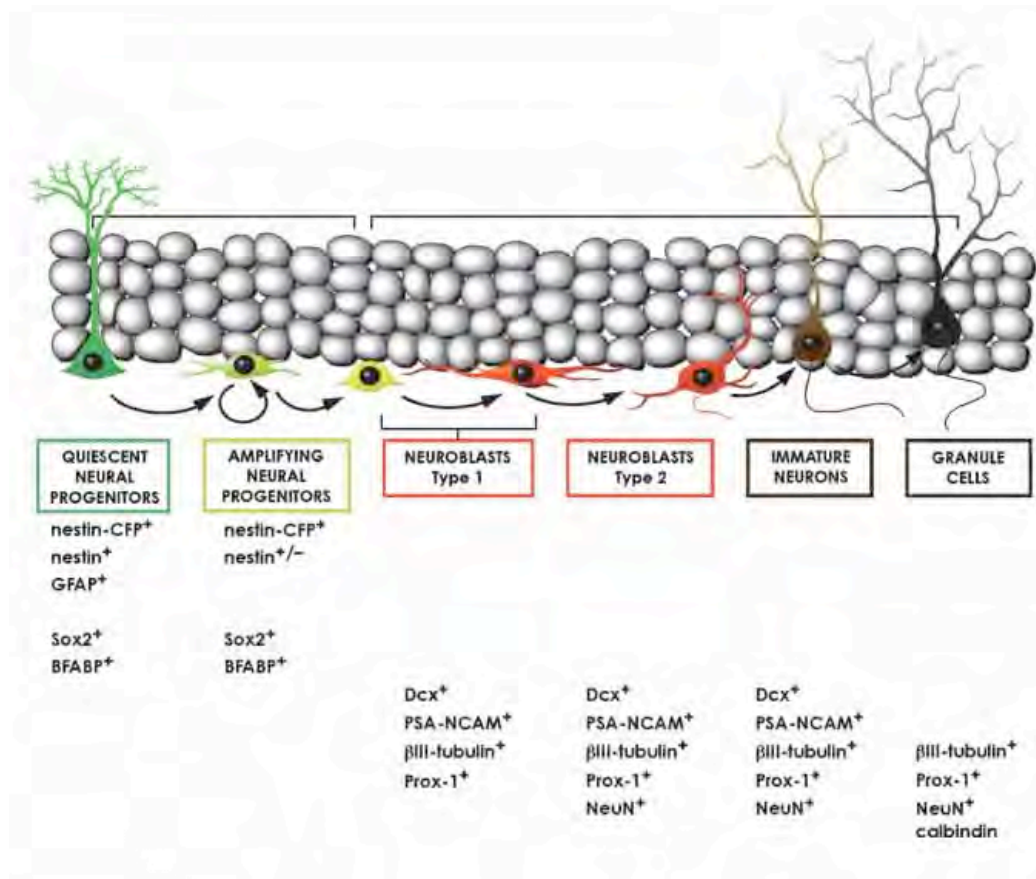


Figura 3: Resumen esquemático de la cascada de diferenciación neuronal en el GD. Los progenitores neurales quiescentes generan a través de divisiones asimétricas a los progenitores neurales amplificadores que después de varios procesos de división simétrica, salen del ciclo celular (1-3 días) y se vuelven neuroblastos del tipo 1. Durante los siguientes 15-21 días, los neuroblastos del tipo 1 maduran a neuroblastos de tipo 2 que a su vez se tornan en neuronas inmaduras que tienen procesos apicales y axones basales. Su soma está localizado en la capa de células granulares. Las características de las células granulares maduras son árboles dendríticos extensos que envían largos procesos axonales, formando a las fibras musgosas. (Encinas et al. 2006)

1.4 Importancia del Giro Dentado

La función de la neurogénesis en el hipocampo participa directamente en procesos de memoria y aprendizaje. (Barnea y Nottebohm 1996; Gould et al. 1999; Shors et al. 2001). Llama mucho la atención que el GD es una de las últimas estructuras del cerebro anterior en formarse y es una de las más sensibles a procesos de envejecimiento (Barnes 1993).

1.5 Daño en el Giro Dentado

Ha llamado la atención que el hipocampo es capaz de regenerar algunas zonas en respuesta a un daño. En dos trabajos se demostró que el GD fue capaz de reconstruir/regenerar la capa de células granulares (Ogita et al. 2005); (Hernandez-Ortega et al. 2007). También se ha visto regeneración en la zona de CA1 (Nakatomi et al. 2002).

Un modelo muy importante de daño, ha sido el que utiliza ácido kaínico (AK) que es un agonista de los receptores AMPA/Kainato. El AK se une a receptores de kainato que son una familia separada de los receptores ionotrópicos del glutamato. Esta potente neurotoxina se ha usado principalmente para desarrollar modelos clásicos de epilepsia del lóbulo temporal, que en ratas tiene un correlato conductual al inducir convulsiones epilépticas caracterizadas por las llamadas “sacudidas de perro mojado” cuando se inyecta sistémicamente o intrahipocampalmente. El hipocampo es especialmente sensible a la acción epileptogénica del AK, en particular las células piramidales de la región de CA3

pues es la zona más abundante en receptores a AK, (Ben-Ari y Cossart 2000; Lothman et al. 1991), aunque también la región de CA1 y el GD son sensibles al daño excitotóxico. Este daño es producto de una estimulación excesiva de los receptores glutamatérgicos debido, entre otra cascada de eventos, a la entrada masiva de calcio en las neuronas. Este tipo de muerte que induce el AK es aparentemente de tipo apoptótica y necrótica (Wang et al. 2005).

La epilepsia asociada con la administración intracerebroventricular de AK, induce incremento de la neurogénesis sobre todo en el lado ipsilateral a la inyección pero también se ha observado en el contralateral en un modelo de epilepsia del lóbulo temporal (Gray y Sundstrom 1998). En otro modelo de daño por AK en la Corteza Entorrinal, la respuesta neurogénica también ha sido descrita en el GD ipsilateral (Gama Sosa et al. 2004).

En un trabajo previo, realizado en el laboratorio, se demostró que al inducir una lesión excitotóxica con AK, en el GD del hipocampo, hay una reducción en el área de la lesión a los 30 días de la operación, lo que sugirió una repoblación de la capa celular granulares (Hernandez-Ortega et al. 2007).

En conclusión, estos trabajos sugieren que los progenitores neurales en el GD proliferan y se diferencian a neuronas en respuesta a un daño hipocampal lo que abre la posibilidad de que la neurogénesis que existe en el cerebro adulto, puede promover la reestructuración del área, aunque las implicaciones funcionales de dicha reorganización aun no son claras [para una revisión ver (Zepeda et al. 2010)].

La capacidad neurogénica del GD, la presencia de progenitores neurales y las características que se han observado con respecto a su capacidad regenerativa, hacen del GD un modelo muy interesante para estudiar los mecanismos que subyacen a la reestructuración morfológica de una región cerebral en el animal adulto.

Aunque la reestructuración del hipocampo se reportó previamente por Ogita (2005) y en el laboratorio (Hernandez-Ortega et al. 2007) hasta el momento no se ha evaluado la aparición temporal de diversos marcadores de diferenciación neuronal en el GD después de una lesión excitotóxica.

2. Objetivo General

El objetivo de este trabajo es inducir una lesión excitotóxica en el Giro Dentado (GD) de ratas adultas y evaluar el papel de la neurogénesis durante la reestructuración de esta zona por medio de un análisis de marcadores de diferenciación por inmunohistoquímica.

3. Objetivos Particulares

- Realizar una lesión excitotóxica unilateral por medio de la inyección con ácido kaínico (AK) (grupo experimental) o con buffer de fosfatos (BF) (grupo control) en el Giro Dentado (GD) de la rata.
- Analizar los cambios histológicos en ratas después 24 horas, 7 días y 60 días por tinción de Nissl (violeta de cresilo).
- Estudiar por inmunohistoquímica la expresión de la proteína de unión a lípidos en el cerebro (Blbp), calretinina (CalR), doblecortina (DCX), proteína ácida fibrilar glial (GFAP), núcleos neuronales (NeuN) y el antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) después de 24 horas, 7 y 60 días post-lesión.

4. Material y Métodos

Para los siguientes experimentos se utilizaron ratas macho, adultas, de la cepa Wistar, con un peso de 250 – 300 g. Se mantuvieron siempre en cajas de acrílico con comida y agua *ad libitum* en un bioterio, con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas y se siguieron las reglas sobre manejo y cuidado de animales del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Los animales se anestesiaron con isoflurano en una mezcla de 95% O₂ y 5% CO₂. Una vez dormidos, se colocaron en un aparato estereotáxico.

La localización del Giro Dentado (GD) del hipocampo se ubicó siguiendo las coordenadas con referencia al bregma en el atlas de Paxinos y Watson (1986): eje anteroposterior (AP) -4.1, eje lateromedial (LM) -2.4 y eje dorsoventral (DV) -3.3.

La lesión excitotóxica se indujo unilateralmente al inyectar 1 µl de ácido kaínico (AK) (1 nmola) durante 1 minuto con una bomba de microinyección. Los animales controles se inyectaron con el buffer de fosfatos (BF) pH= 7.4, en el que fue disuelto el AK. A las ratas tratadas con BF también se les denomina sham.

Los animales se mantuvieron durante el experimento a un nivel medio de anestesia (~2% de isoflurano). Después de 2 minutos de finalizar la inyección, se retiró la aguja, se suturó la piel y la anestesia se suspendió. Las ratas se colocaron en sus cajas y se observaron durante las siguientes horas y diariamente después de la operación.

Después de 24h, 7 días y 60 días, los animales se anestesiaron profundamente con una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (1ml) y se perfundieron

intracardiamente con 250ml de 0.9% de solución salina, seguido de 250 ml de 4% paraformaldehído. Al terminar, los cerebros se removieron y se fijaron durante 24h en la solución de paraformaldehído. Después se transfirieron a 20% y 30% de sacarosa (48h en cada solución).

Se obtuvieron secciones coronales de 40 μm en un criostato y se procesaron para a) histología convencional con tinción de nissl (violeta de cresilo), b) para inmunohistoquímica.

4.1 Tinción de Nissl

Se utilizó para observar la morfología de la lesión del área dañada y evaluar la neurotoxicidad inducida por AK (Werner y Brauer 1984).

4.2 Inmunohistoquímicas

La inmunohistoquímica se utilizó para poder visualizar células positivas a los marcadores; proteína de unión a lípidos en el cerebro (Blbp), calretinina (CalR), doblecortina (DCX), proteína ácida fibrilar glial (GFAP), núcleos neuronales (NeuN) y para el antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA).

El procedimiento para la inmunohistoquímica fue el siguiente: después de obtener las secciones coronales de hipocampo, éstas se sumergieron en PBS 1x. Se bloquearon en suero de caballo (50 μl de suero por 1ml de 0.3% PB tritón) por dos horas. Después se agregaron los anticuerpos primarios a la concentración deseada

toda la noche a 4º C (ver tabla 1). Al días siguiente se lavaron con 0.3% PB tritón 5 minutos, 10 minutos y media hora. Se agregó el anticuerpo secundario acoplado a un fluoróforo y se mantuvo 2h a temperatura ambiente. Los fluoróforos utilizaron fueron FITC (excitación 450- 490 nm, emisión 515nm), CY3 (excitación 546 nm y emisión 590 nm) y CY5 (excitación 633 nm y emisión 650 nm) Al finalizar, los cortes se lavaron nuevamente por 5 minutos, 10 minutos y media hora. Después de esto, las secciones se montaron cuidadosamente con DAKO, que evita el desvanecimiento de la señal, en laminillas superfrost y se cubrieron con un cubre objetos.

A continuación se presentan las características de los anticuerpos utilizados para los experimentos de esta tesis:

Tabla 1:

Anticuerpo	Animal huésped	Dilución	Compañía	Anticuerpo secundario	Animal huésped	Fase de expresión
anti-Blbp	conejo	1:500	Chemicon	CY3	burro	progenitores
anti-CalR	conejo	1:500	Swant	CY3	burro	postmitosis
anti-DCX	cabra	1:400	Santa Cruz	FITC	burro	migración
anti-GFAP	conejo	1:1000	DAKO	FITC	cabra	progenitores
anti-NeuN	ratón	1:800	Sigma	CY5	burro	células maduras
anti-PCNA	ratón	1:1000	DAKO	FITC	cabra	proliferación

Anticuerpos utilizados para los experimentos, el animal huésped, la dilución utilizada, la compañía, el anticuerpo secundario y la fase en la cual se expresa.

Doblecortina (DCX)

La DCX es una proteína citoplásmica que promueve la polimerización de microtúbulos (Francis et al. 1999). Es expresada por células inmaduras; neuroblastos en migración y neuronas jóvenes (Gleeson et al. 1998; Gleeson et al. 1999). Todas las células que son positivas a doblecortina expresan antígenos tempranos de neuronas pero no marcan antígenos de glía, células no diferenciadas o células apoptóticas. Estas características la convierten en un buen marcador para neurogénesis en el hipocampo adulto. Algunos autores la utilizan en lugar del marcaje de la bromodeoxiuridina (BrdU)/NeuN.

Calretinina (CalR)

La CalR es una proteína de unión a calcio. En el desarrollo de células granulares este marcador está restringido a una ventana corta de tiempo en la postmitosis temprana (Brandt et al. 2003). Es un marcador conocido para neuronas GABAérgicas no piramidales en el hipocampo adulto. En fases tardías de la neurogénesis, neuronas nuevas expresan CalR y DCX o NeuN. En fases muy desarrolladas, ya integradas al circuito, las neuronas dejan de expresar CalR y comienzan a expresar calbindina.

Antígeno de células nucleares en proliferación (PCNA)

Es una proteína auxiliar de la DNA polimerasa delta que se expresa sobre todo durante la fase G1 y S del ciclo celular. El pico de su expresión es durante la interfase entre G1/S y G2 pero ya no en M. Se localiza en el núcleo.

Núcleos neuronales (NeuN)

Se utiliza para el marcaje de núcleos neuronales para detectar neuronas en estado postmitótico y neuronas diferenciadas en el Sistema Nervioso Central (SNC) y en el Sistema Nervioso Periférico a excepción de las células de Purkinje en el cerebelo.

Hasta hace poco se desconocía qué clase de proteína era. En un trabajo reciente se descubrió que NeuN es el producto génico de Fox-3 (Kim et al. 2009) que es un regulador del splicing alternativo de pre-mRNA. Fox-3 pertenece a la familia de genes Fox-1 de factores de transcripción.

Proteína ácida fibrilar glial (GFAP)

Es el principal filamento intermedio de astrocitos maduros que constituye al citoesqueleto. Esta proteína ha probado ser el marcador más específico para células con origen astrocítico. Además se considera que esta proteína le da movilidad, forma y estabilidad estructural a los procesos de los astrocitos. Es un buen marcador para identificar astrocitos en el SNC dentro de condiciones normales y patológicas. En condiciones de daño los astrocitos proliferan y muestran hipertrofia tanto en el cuerpo celular como en los procesos. En estas

condiciones de daño hay un aumento en los niveles de GFAP. Los astrocitos tienen figura de estrella con núcleo pequeño e irregular con un cuerpo celular pequeño y procesos delgados. La glía radial, que es la precursora neural en la ZSG también expresa GFAP.

Proteína de unión a lípidos en el cerebro (Blbp)

Esta proteína pertenece a una familia de proteínas citoplásmicas, altamente conservada que se unen a cadenas de ácidos grasos y a otros ligandos hidrofóbicos. Juegan un papel importante en el metabolismo de ácido grasos. Se ha demostrado que Blbp se requiere para el establecimiento de la glía radial en el cerebro en desarrollo (Feng et al. 1994). Debido a esto se puede utilizar como marcador progenitores neurales en el SNC (Schmidt et al. 2007). Su incremento indica incremento de las células progenitoras.

DAPI

Es un marcador de DNA y tiene la capacidad de permear a través de las membranas celulares y por lo tanto se usa para marcar núcleos en general.

4.3 Análisis de las imágenes

Para analizar las secciones inmunohistoquímicas, se utilizaron el microscopio confocal Zeiss LSM5 y el microscopio confocal operado por una unidad de disco

giratorio (DSU) de Olympus. En ambos casos, los microscopios filtran la luz del plano focal y cuentan con filtros para la detección de los fluoróforos empleados en el presente trabajo (Ver la sección de Inmunohistoquímicas).

Las imágenes obtenidas tanto en el microscopio confocal (Figs. 5-9) como en el DSU (Fig. 10) se importaron al programa Image J. Por medio de este programa se asignó un color correspondiente al RGB de forma que se pudiera evaluar simultáneamente la presencia de los tres fluoróforos en la misma sección. Una vez que se empalmaron los tres canales; rojo, verde y azul, las imágenes se importaron a Adobe Photoshop.

Las imágenes de la Fig. 10 son montajes de alta resolución que se adquirieron utilizando el módulo de rebanada virtual del programa Stereo Investigator (MBF Bioscience).

4.4 Análisis estadístico

Se realizó un conteo de células positivas a cada marcador. Los resultados representan el promedio de 2-4 experimentos independientes + el error estándar (ES). Un experimento representa un cerebro. Y de cada cerebro se contaron 2-3 secciones por laminilla y esto fue analizado por medio de la prueba estadística de la t de Student.

5. Resultados

El único efecto notorio sobre el comportamiento después de la administración de AK fueron “sacudidas de perro mojado” que comenzaron 30 minutos después de que las ratas se recuperaron de la anestesia y duraron aproximadamente 3 horas. Después de ese tiempo los animales mostraron una conducta normal hasta los dos meses posteriores a la lesión.

5.1 Secciones histológicas con tinción de Nissl

En la Fig. (5A) podemos observar una sección de hipocampo teñida con violeta de cresilo que proviene de una rata representativa que no fue tratada. En los cerebros de los sujetos infundidos con BF (ratas sham) sólo se observa un ligero desarreglo en la parte del trayecto de la aguja (flecha) Fig. 6 (A). A las 24 horas de la inyección de 10nmolas de AK, en el GD ipsilateral Fig. 7 (A) se observa la presencia de núcleos picnóticos, un adelgazamiento de la capa granular observado de forma cualitativa, así como núcleos picnóticos en la capa polimórfica (ver cuadros). En la sección contralateral no se observan dichas características Fig. 7 (B). A los 7 días en las secciones ipsilaterales Fig. 8 (A) es muy evidente el desarreglo de la capa polimórfica (ver cuadro), también se observan núcleos picnóticos, adelgazamiento de la capa de células granulares y una disminución en el tamaño del GD comparado con el lado contralateral Fig. 8 (B). A los dos meses la morfología del GD es similar al control Figuras 9 (A) y 9 (B), la única diferencia evidente es la región CA3 (no detallado en esta tesis) que siguió mostrando daño celular. A excepción de esta observación el grosor y tamaño de la capa granular del

GD y la capa polimórfica son muy similares. No hay un desarreglo de esta capa y tampoco se observa la presencia de núcleos picnóticos.

Lo que se detalla a continuación es el resultado de las observaciones de la microscopía confocal que está representado en las imágenes. Cada resultado de los conteos de los marcadores se presenta en las gráficas.

5.2 Inmunohistoquímicas para doblecortina y calretinina

En las ratas control Figuras 5 (B) y (C) , se observa la presencia de células positivas a DCX y a CalR. En las secciones de las ratas sham, el número de células observado es muy similar al control Fig. 6 (B) y (C). Sin embargo 24 horas después del AK hay un aumento en los cúmulos de células positivas a DCX en el lado ipsilateral a la inyección y también se observa que los procesos de estas neuronas son más extensos. El número de neuronas positivas a CalR también aumenta durante este tiempo Fig. 7 (C) y (D). A las 24 horas en el lado contralateral, el número de células positivas a DCX es similar al control, además el largo de los procesos es corto y similar al de los controles. También podemos observar que a este tiempo el número de neuronas positivas a CalR es similar a los controles Fig. 7 (E) y (F). A los siete días, el incremento en los cúmulos de células positivas a DCX tanto en el lado ipsilateral como en el contralateral aumentó significativamente, pero sobre todo en la cresta del GD. También se observó un importante aumento en el número de células positivas a CalR que tienen neuritas más alargadas Fig. 8 (C-F). Este aumento en células positivas a CalR es mucho más evidente en la cresta

8 (D) y (F). A los sesenta días se observa una disminución muy clara de células positivas a DCX, semejante a los controles sin tratamiento alguno, tanto en el lado ipsilateral como en el contralateral Fig. 9 (C-F). Se observa además un número significativo, con respecto al control, de células y procesos CalR.

5.3 Inmunohistoquímicas para doblecortina y núcleos neuronales

Los resultados con respecto a la DCX son similares a los observados en la inmunohistoquímica para DCX y CalR. Sin embargo el marcaje con NeuN, que sugiere neuronas maduras, permitió generar conclusiones acerca de la estructura del GD en las ventanas de tiempo evaluadas en este estudio. En las ratas controles, se observa el doble marcaje de DCX y NeuN en condiciones normales Fig. 5 (D) y (E). En la rata sham se nota un ligero desarreglo de la capa de células granulares Fig. 6 (D). En la cresta del GD Fig. 6 (E) no hay diferencia con el control. En el lado ipsilateral de las ratas tratadas con AK a las 24 horas se observa que los núcleos que conforman a la capa granular están dispersos y reducidos en volumen. Se observan pocas células presentes a lo largo de la capa polimórfica Fig. 7 (G). También se aprecia un adelgazamiento de la cresta Fig. 7 (H). Sin embargo, estas observaciones no son visibles en el lado contralateral Fig. 7 (I) y (J). A los 7 días el desarreglo de la capa polimórfica es muy evidente. No se observan células positivas a NeuN Fig. 8 (G). En la cresta del lado ipsilateral se observa una ligera disminución en el grosor de la capa Fig. 8 (H). El lado contralateral a los 7 días es similar al control Fig. 8 (I) y 8 (J).

5.4 Inmunohistoquímicas para la proteína de unión a lípidos en el cerebro y para el antígeno nuclear de células en proliferación

En las ratas sham se observan pocas células positivas a los marcadores Blbp y PCNA Fig. 6 (F) y (G). A las 24 horas se observa un aumento en células positivas a estos marcadores tanto en el lado ipsilateral Fig. 7 (K) como en el lado contralateral (L). A los 7 días es muy notable el aumento en células positivas a Blbp en el lado ipsilateral Fig. 8 (K) y (L). También hay un aumento masivo de células positivas a PCNA en la zona de la capa polimórfica del GD que no se observa en la cresta Fig. 8 (K) y (L) respectivamente. En el GD contralateral a este tiempo, se observan pocas células positivas a PCNA pero sí se observan varias positivas a Blbp en el GD Fig. 8 (M) y (N). A los dos meses se aprecian más células en el GD ipsilateral, tanto en células positivas a Blbp como a PCNA, con respecto al lado contralateral Fig. 9 (G) y (H), esto último sugiere que el aumento en la proliferación de precursores se mantiene.

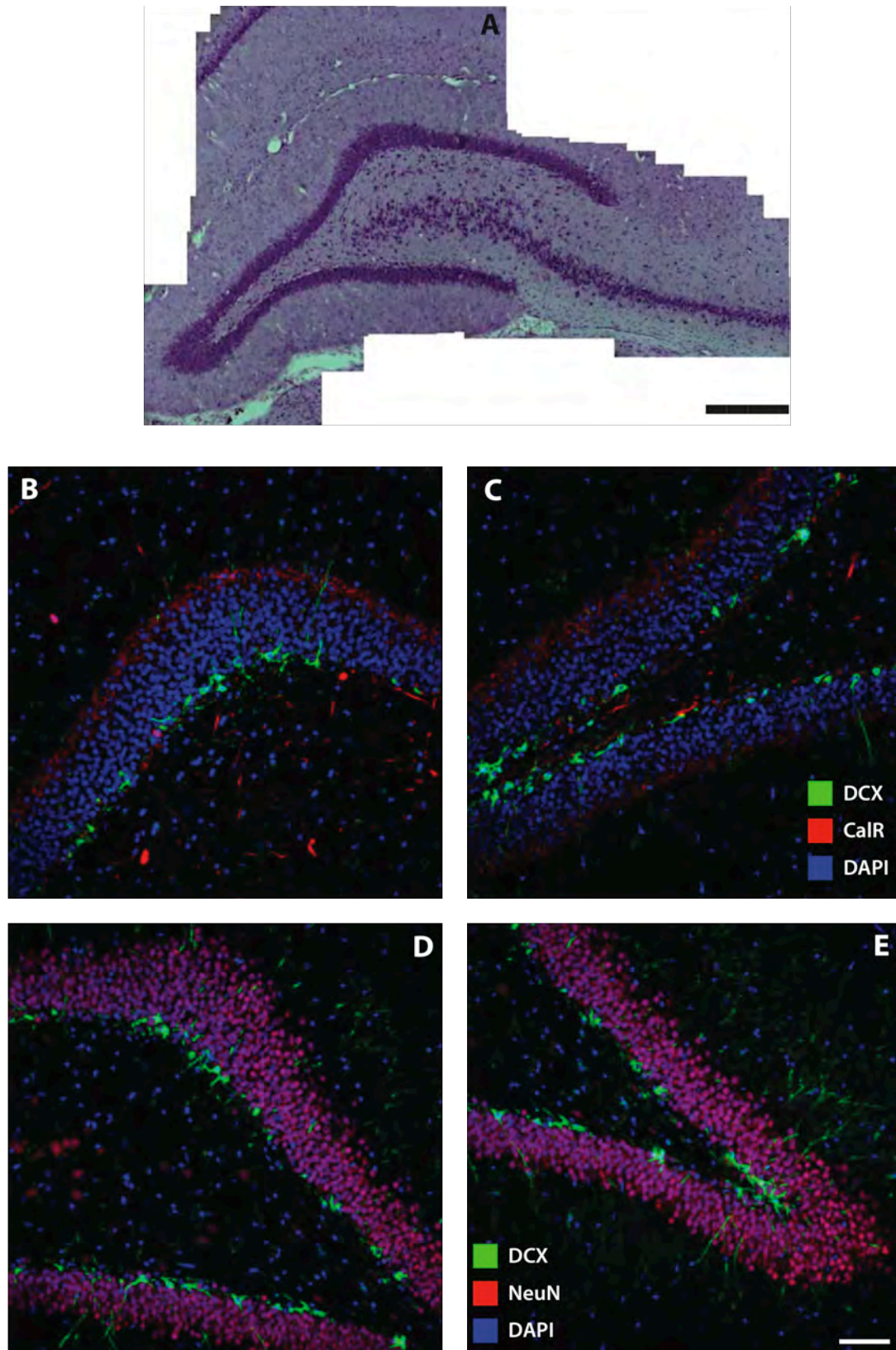


Figura 5: Rata control. (A) Sección histológica teñida con violeta de cresilo (escala=400 μ m). (B) y (C) Secciones coronales del GD, en azul DAPI, en verde DCX y en rojo CalR. (C) Cresta del GD. (D) y (E) secciones coronales del GD, en azul DAPI, en verde DCX y en rojo NeuN. (D) Sección del GD. (E) cresta del GD. Escala de B-E = 40 μ m.

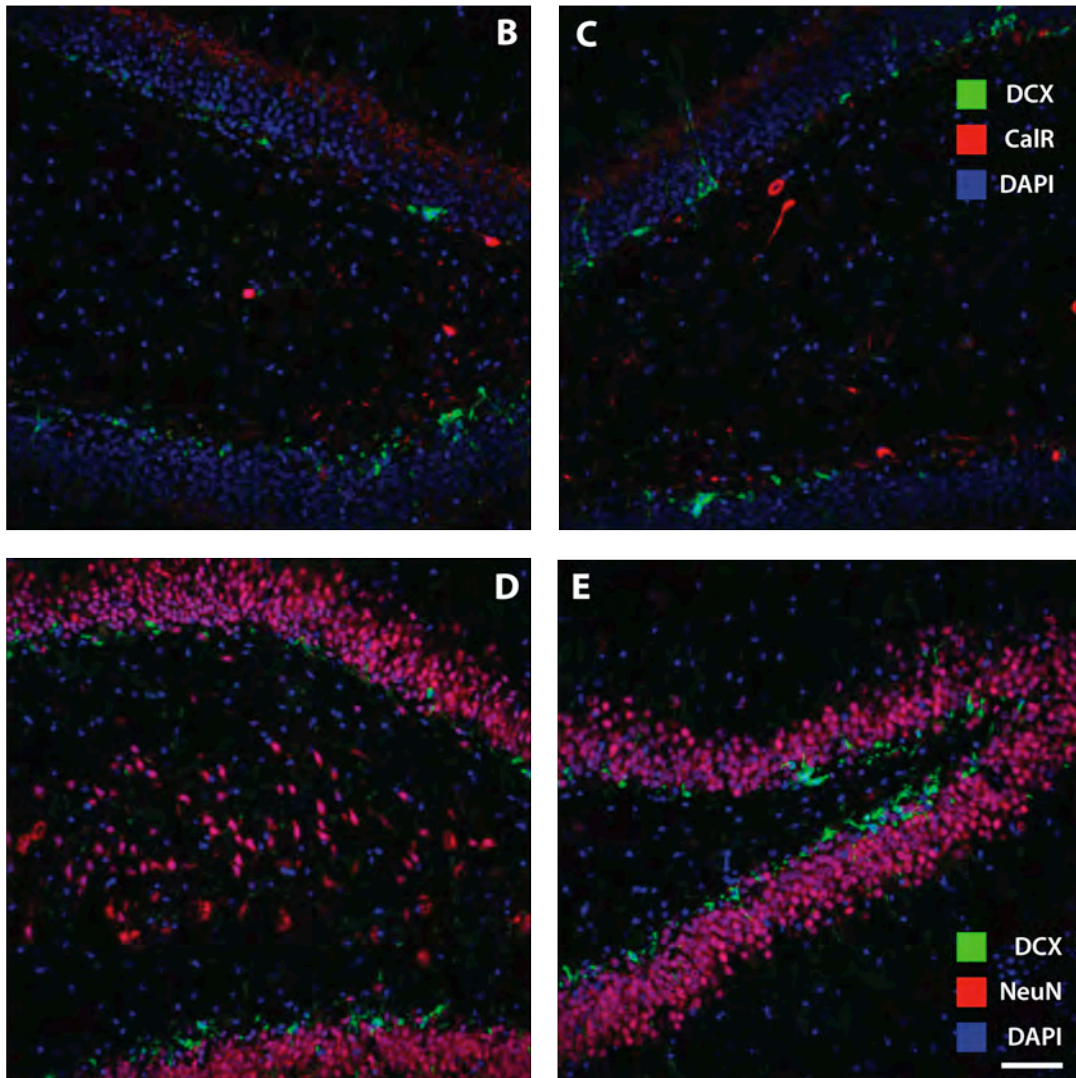
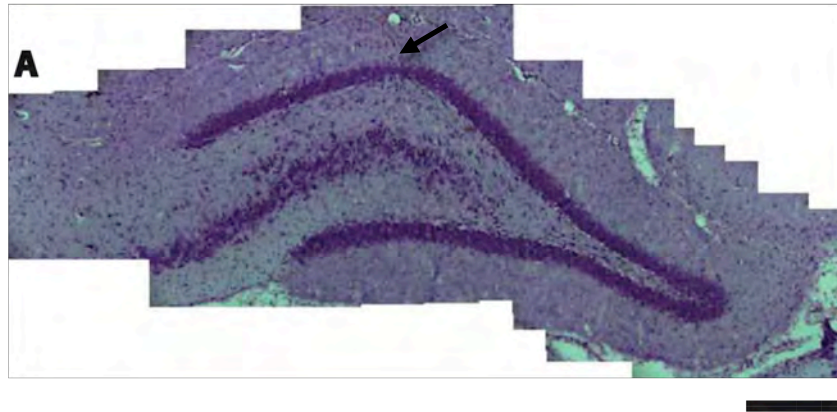
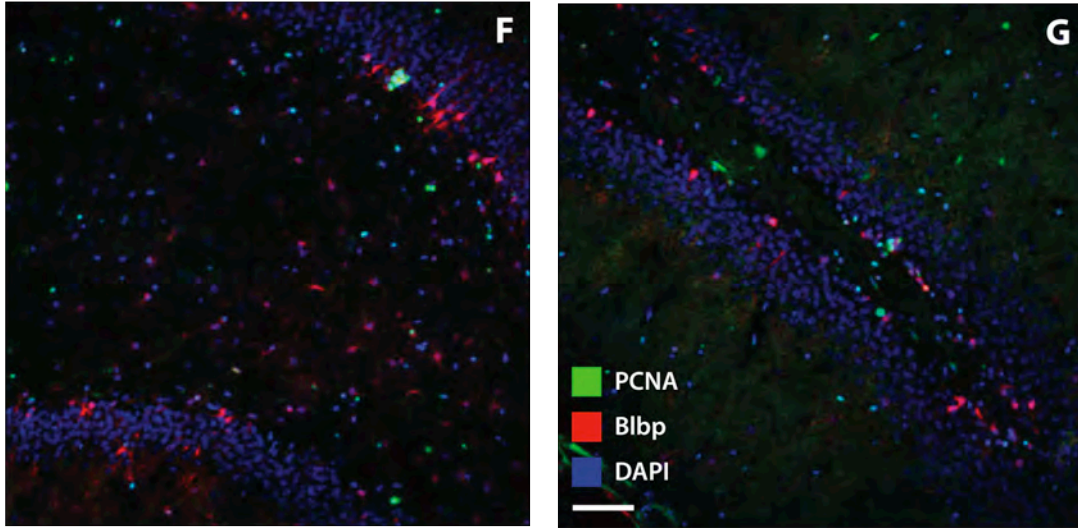


Figura 6: Rata tratada con BF. (A) Sección histológica ipsilateral teñida con violeta de cresilo (escala = 400 μ m). (B y C) Secciones coronales del GD, en azul DAPI, en verde DCX y en rojo CalR. (B) GD ipsilateral. (C) GD contralateral. (D y E) Secciones de GD; en azul núcleos celulares, neuronas inmaduras en verde (DCX) y en color rojo núcleos de neuronas maduras (NeuN). (E) cresta del GD ipsilateral. Escala de B-E = 40 μ m.



Continúa Figura 6: (F) y (G) Secciones coronales del lado ipsilateral. En azul DAPI, en rojo Blbp y PCNA en verde. (G) Cresta del GD ipsilateral. Escala de F-G = 40 μ m.

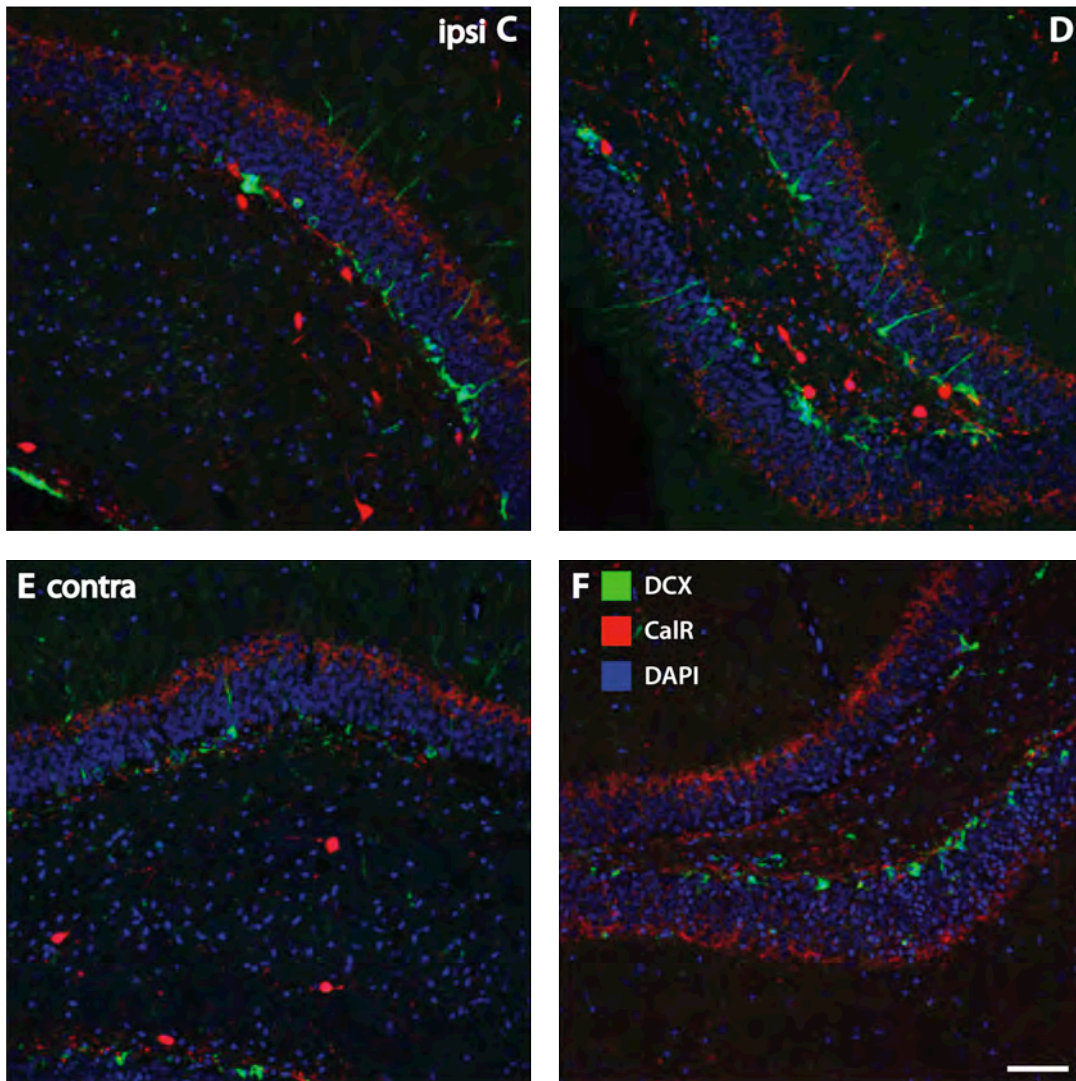
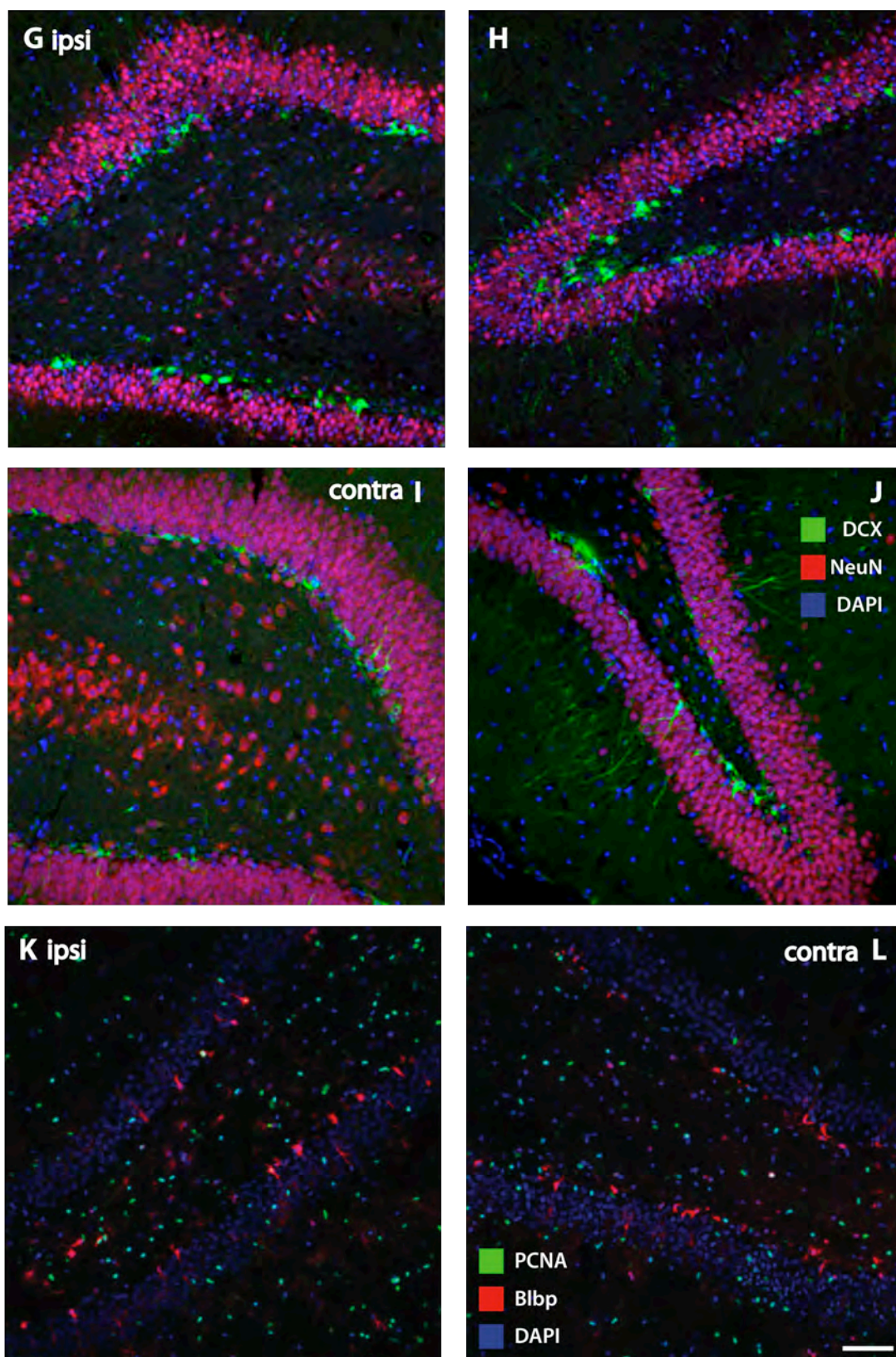


Figura 7: Secciones coronales del GD de una rata representativa tratada con AK, sacrificada a las 24 horas. (A) y (B) Sección histológicas teñida con violeta de cresilo. (A) Sección ipsilateral. (B) Sección contralateral. Escala de A y B = 400 μ m. (C-F) Secciones del GD en azul DAPI, en verde DCX y en rojo CalR. (C) y (D) GD ipsilateral. (D) Cresta ipsilateral. (E) y (F) GD contralateral. (F) Cresta del lado contralateral. Escala de C-F = 40 μ m.



Continúa Figura 7: (G-J) Secciones del GD, en azul DAPI, en verde DCX y en rojo NeuN. (G) y (H) GD ipsilateral. (H) cresta del GD ipsilateral. (I) y (J) GD contralateral. (J) Cresta contralateral. (K) y (L) Secciones coronales del GD, en azul DAPI, en verde Blbp y en rojo PCNA en verde. (K) Sección ipsilateral. (L) Sección contralateral. Escala de G-L = 40 μ m.

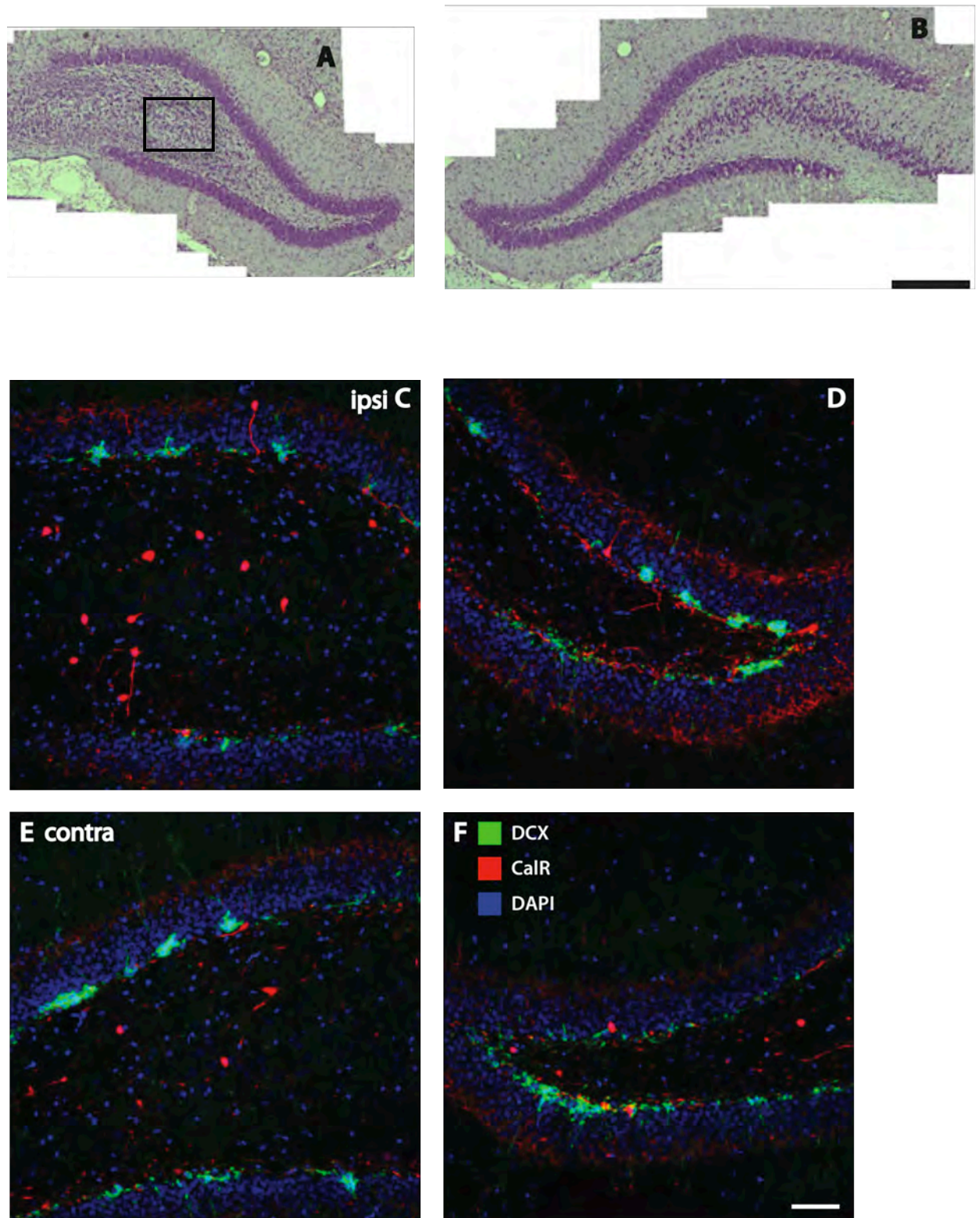
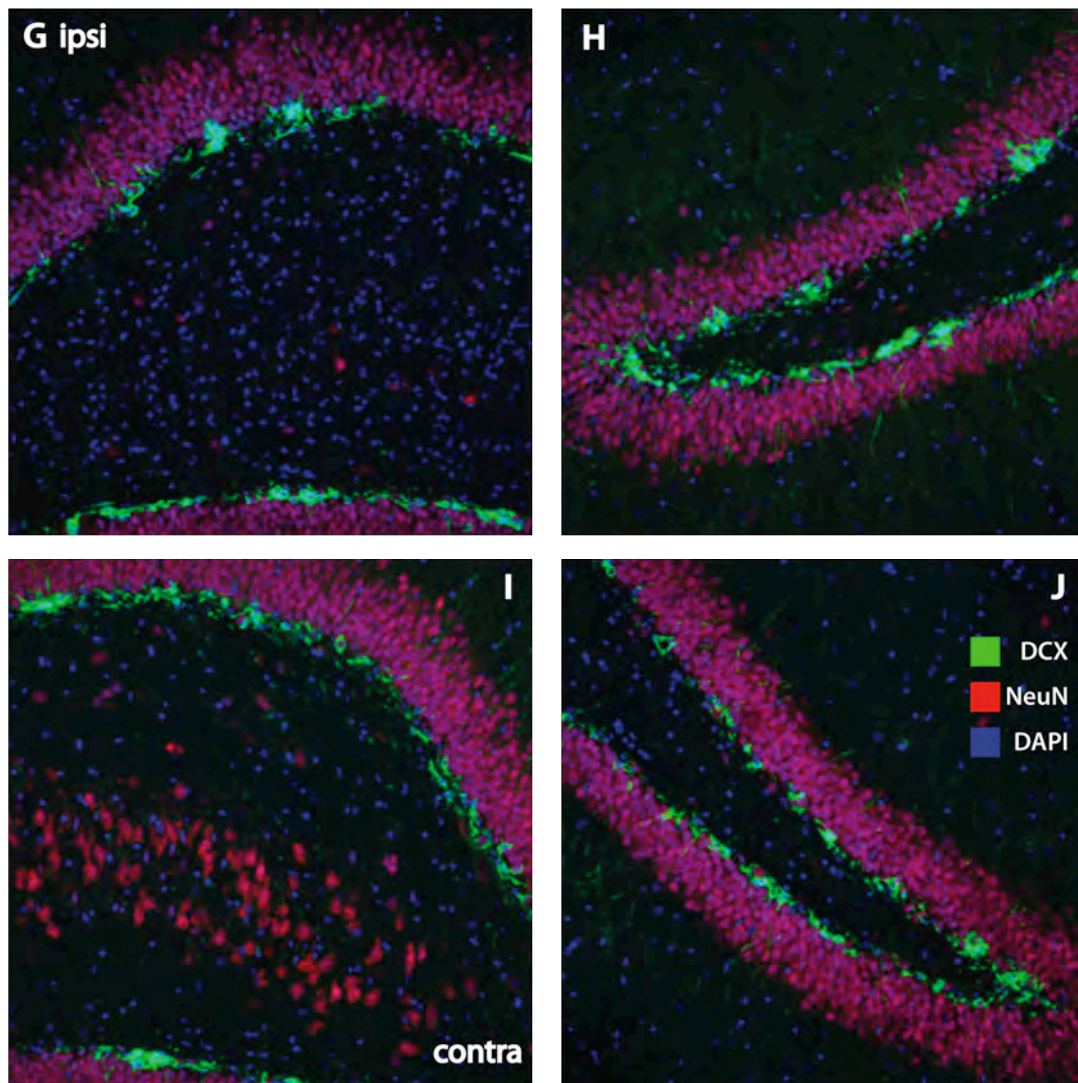
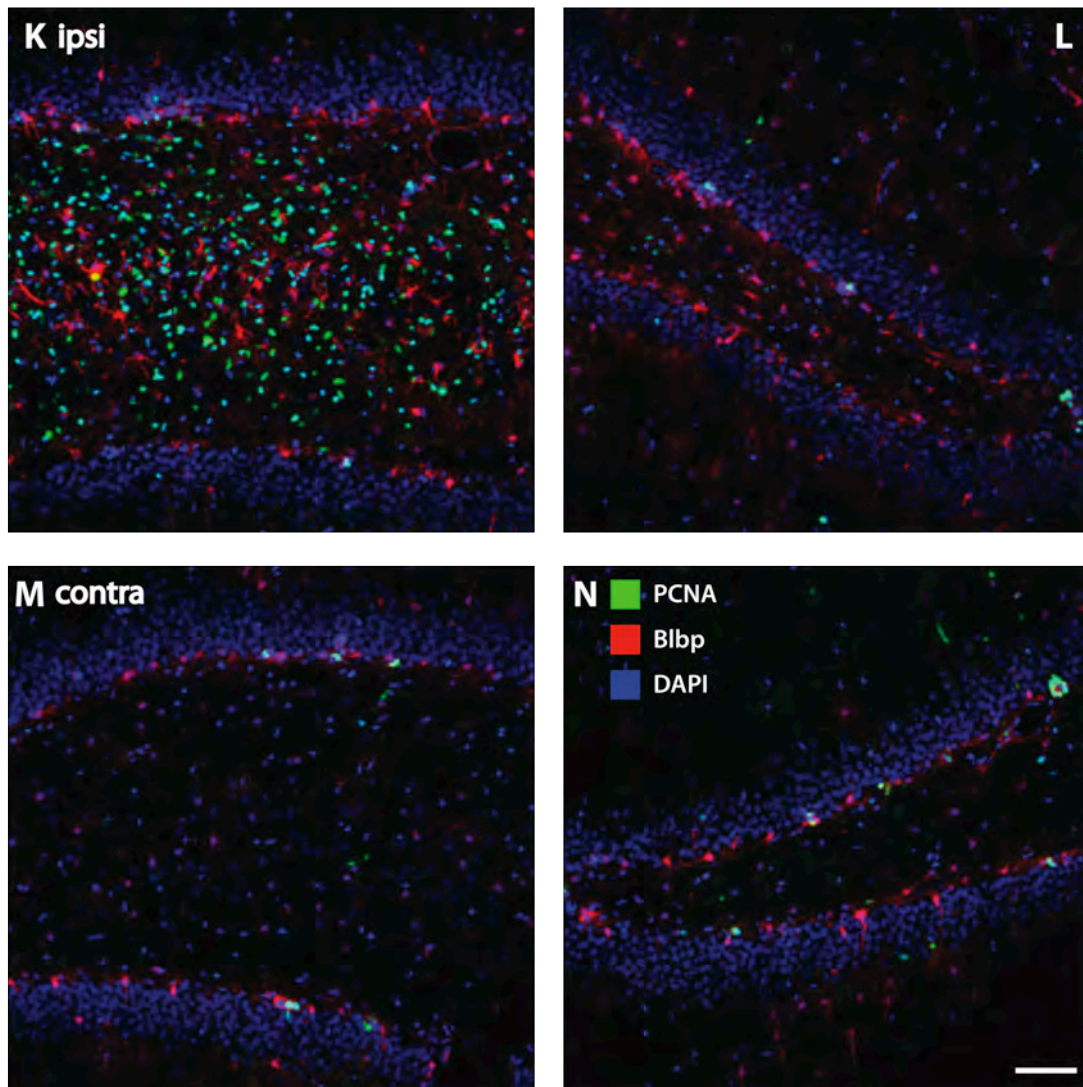


Figura 8: Secciones coronales del GD de una rata representativa tratada con AK, sacrificada a las 7 días. (A) y (B) Sección histológicas teñida con violeta de cresilo. (A) Sección ipsilateral. (B) Sección contralateral. Escala de A y B = 400 μ m. (C-F) Secciones del GD en azul DAPI, en verde DCX y en rojo CalR. (C) y (D) GD ipsilateral. (D) Cresta ipsilateral. (E) y (F) GD contralateral. (F) Cresta del lado contralateral. Escala de C-F = 40 μ m.



Continúa Figura 8: (G-J) Secciones del GD, en azul DAPI, en verde DCX y en rojo NeuN. (G) y (H) GD ipsilateral. (H) cresta del GD ipsilateral. (I) y (J) GD contralateral. (J) Cresta de GD contralateral. Escala de G-J = 40 μ m.



Continúa Figura 8: (K-M) Secciones coronales del GD, en azul DAPI, en verde Blbp y en rojo PCNA en verde. (K) y (L) secciones ipsilaterales del GD. (L) Cresta del GD ipsilateral. (M) y (N) GD contralateral. (N) Cresta del GD contralateral. Escala de K-N = 40 μ m.

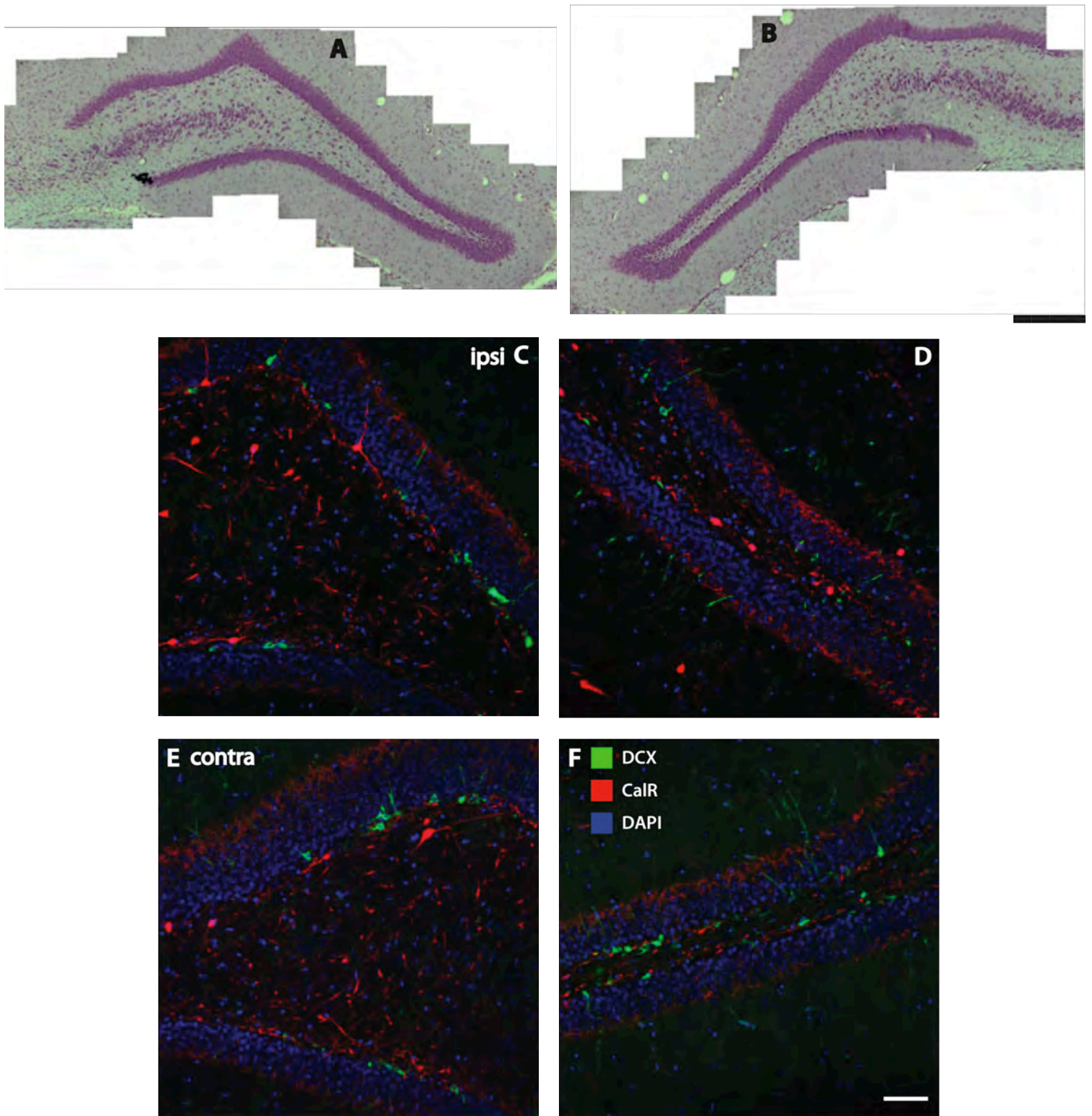
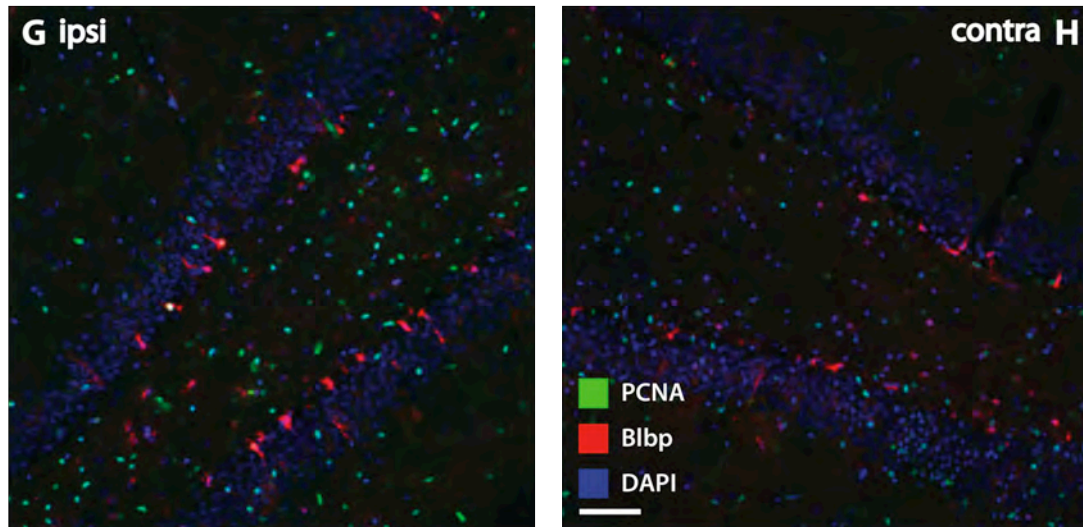


Figura 9: Secciones coronales del GD de una rata representativa tratada con AK, sacrificada a los 60 días. (A) y (B) Sección histológicas teñida con violeta de cresilo. (A) Sección ipsilateral. (B) Sección contralateral. Escala de A y B = 400 μ m. (C-F) Secciones del GD en azul DAPI, en verde DCX y en rojo CalR. (C) y (D) GD ipsilateral. (D) Cresta ipsilateral. (E) y (F) GD contralateral. (F) Cresta del lado contralateral. Escala de C-F = 40 μ m.



Continúa Figura 9: (G) y (H) Secciones coronales del GD, en azul DAPI, en verde Blbp y en rojo PCNA en verde. (G) GD ipsilateral. (H) GD contralateral. Escala de G y H = 40 μ m.

5.5 Inmunohistoquímicas para la proteína ácida fibrilar glial y núcleos neuronales

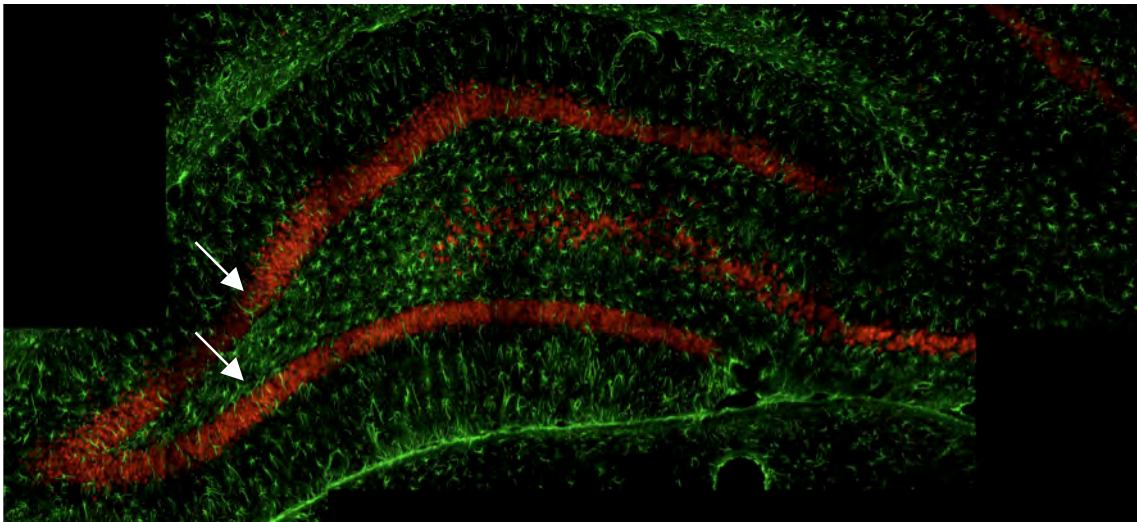
Con el análisis de inmunohistoquímica que se realizó con el microscopio DSU podemos observar núcleos neuronales de color rojo, positivos a NeuN y células positivas a GFAP en color verde. En estas figuras se utilizó la rebanada virtual.

En una rata control se observa la glía radial (flecha) Fig. 10 (A). También se observa que tanto la capa granular, como la capa polimórfica aparecen intactas. En una rata inyectada con BF se puede observar el tracto de la aguja rodeada de glía reactiva Fig. 10 (B), aún así se observa que la capa polimórfica está intacta a excepción de la zona de entrada de la aguja. En el lado contralateral de la rata tratada con BF no se observa ninguna diferencia con el control Fig. 10 (C). A las 24 horas parece que hay una disminución en la glía radial tanto del lado ipsilateral Fig. 10 (D) como del lado contralateral Fig. 10 (E). Esto es comparable con el

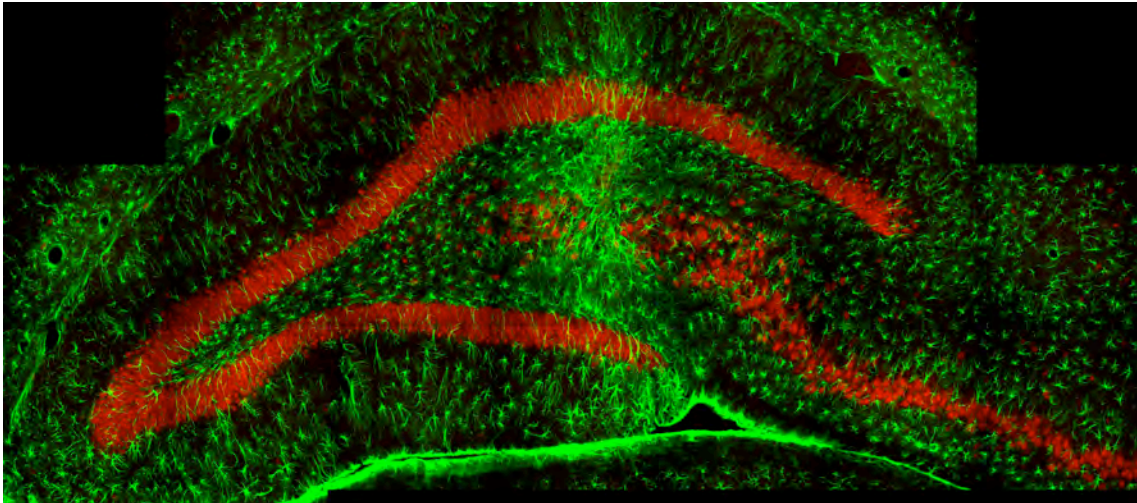
análisis para Blbp que también marca glía radial. En el lado ipsilateral la glía muestra un morfología anormal y se puede observar un adelgazamiento de la capa granular y pocas células en la capa polimórfica. En el lado contralateral no se observan estas características. A los 7 días Fig. 10 (F) en el lado de la inyección con AK, se observa la ausencia de la capa polimórfica. La glía radial se puede observar pero no en grandes cantidades como en el control. En el lado contralateral Fig. 10 (G) ya se observa la glía radial en un mayor nivel que el lado contralateral.

Figura 10

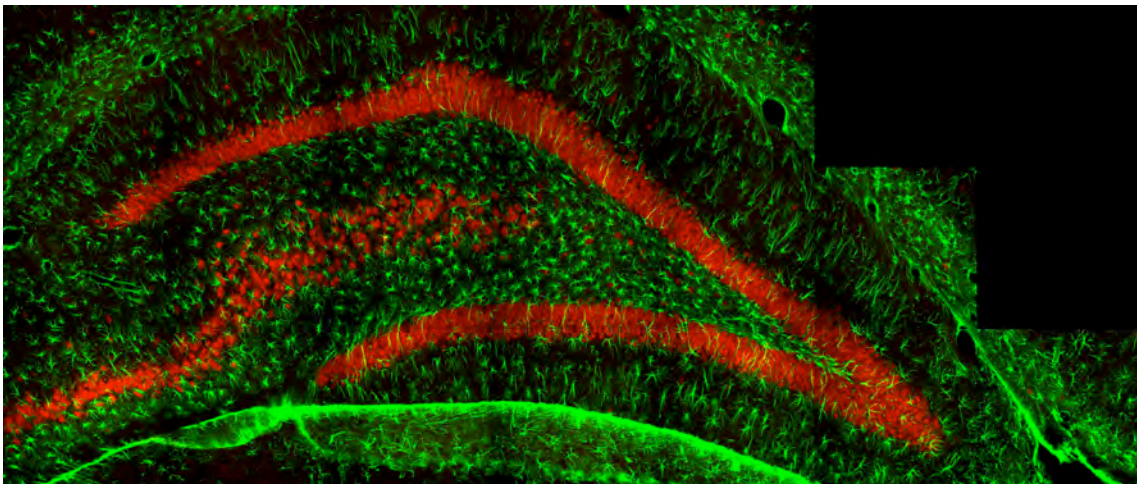
(A) Rata control



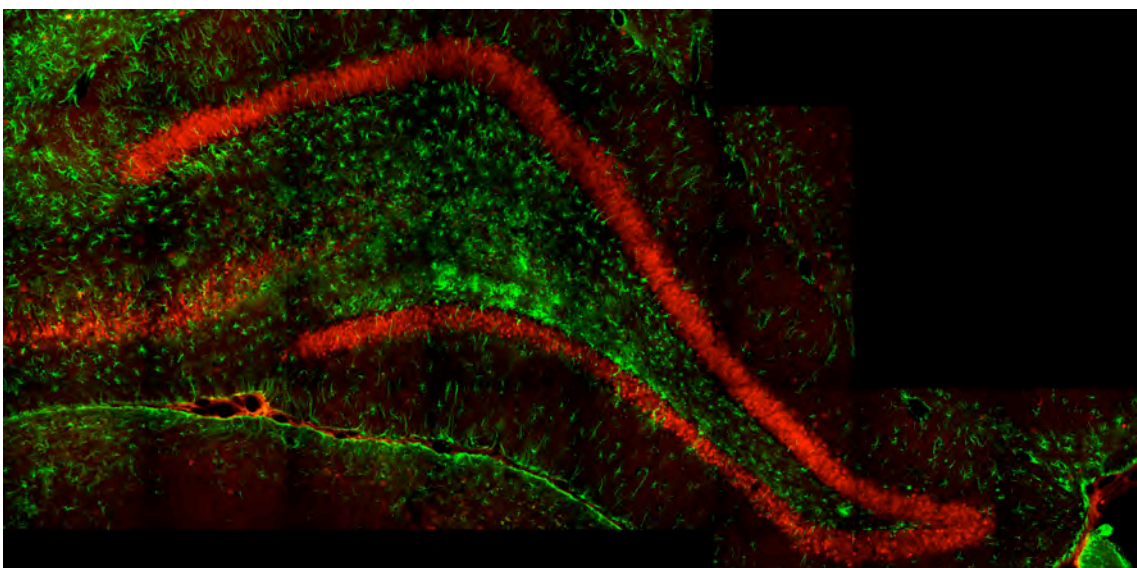
(B) Rata tratada con BF: GD ipsilateral



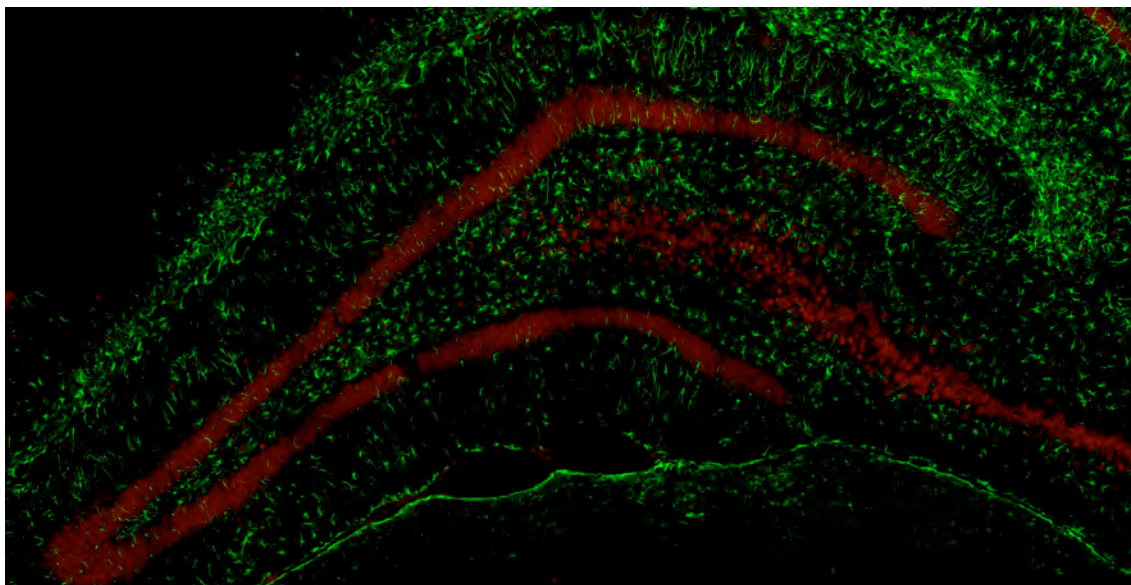
(C) Rata trata con BF: GD contralateral



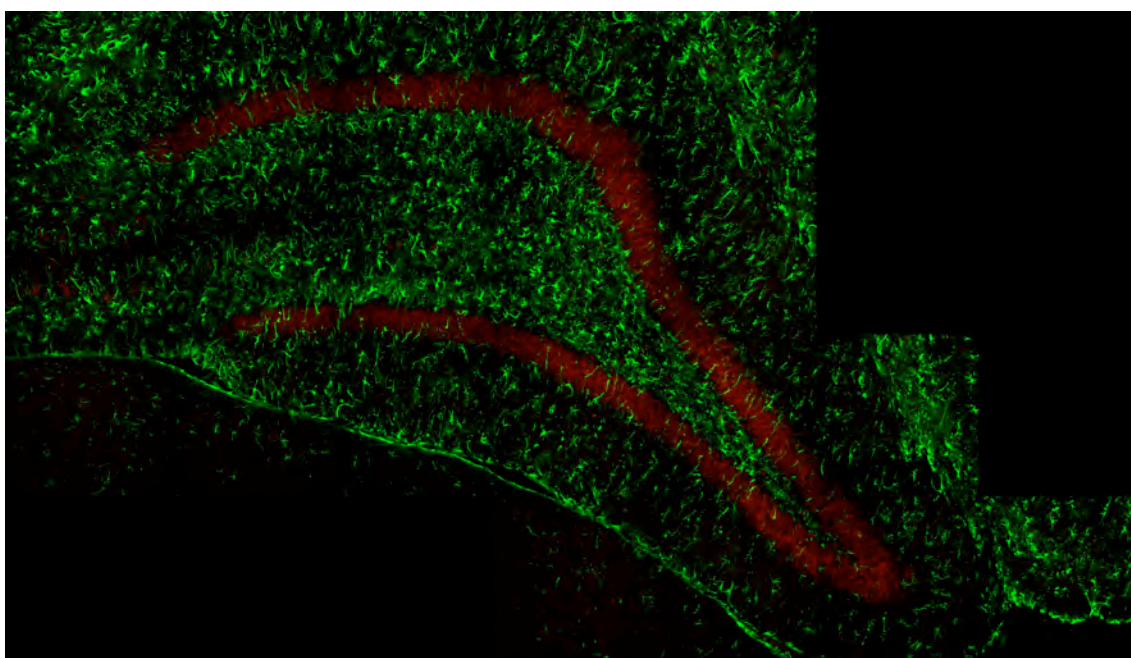
(D) Rata tratada con AK a las 24 h: GD ipsilateral



(E) Rata tratada con AK a las 24 h: GD contralateral



(F) Rata tratada con AK a los 7 días: GD ipsilateral



(G) Rata tratada con AK a los 7 días: GD contralateral

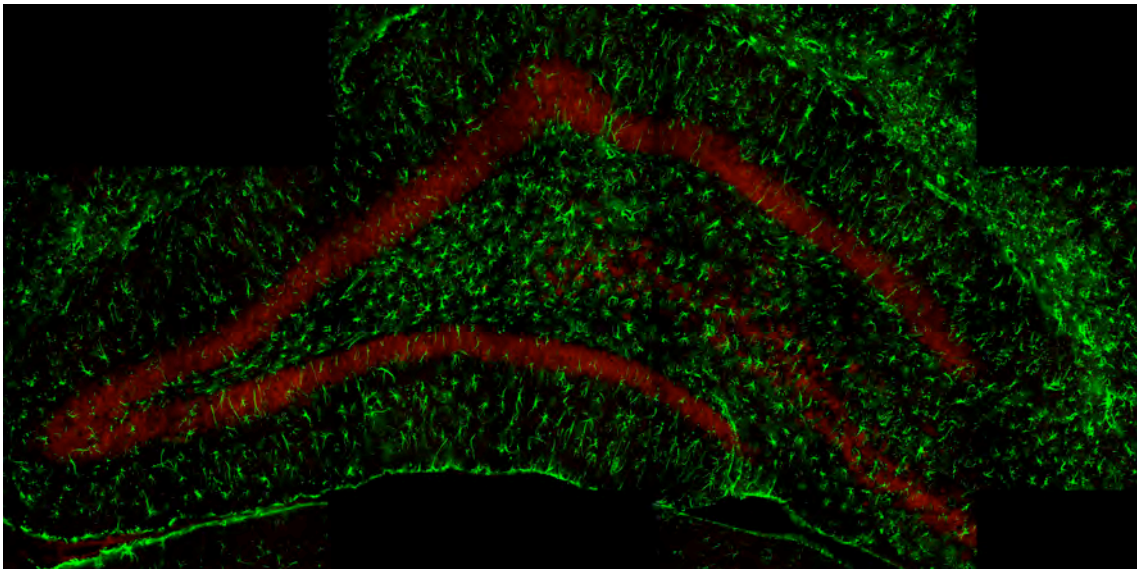


Figura 10: Inmunohistoquímicas en secciones coronales para NeuN (rojo) y GFAP (verde). (A) GD de una rata no tratada. (B) GD de una rata inyectada con BF, lado ipsilateral. (C) Lado contralateral de la rata tratada con BF. (D) GD ipsilateral de una rata tratada con AK a las 24 horas. (E) Lado contralateral a las 24 horas. (F) GD ipsilateral de una rata tratada con AK a los 7 días de la operación. (G) GD contralateral de la rata a los 7 días.

5.6 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó por el conteo de células positivas a los marcadores DCX, CalR, PCNA y Blbp, tanto en el lado ipsilateral como el contralateral con respecto a las ratas sham. La prueba estadística realizada fue la t de Student. Los asteriscos en las gráficas indican un nivel de significancia $p < 0.05$ con respecto al sham (ver gráficas en la página 49).

El curso temporal de la expresión de DCX muestra que hay un aumento significativo en el lado ipsilateral a las 24 horas y a los 7 días después de la lesión. A los 60 días post-lesión el nivel de expresión de esta proteína es muy similar a los

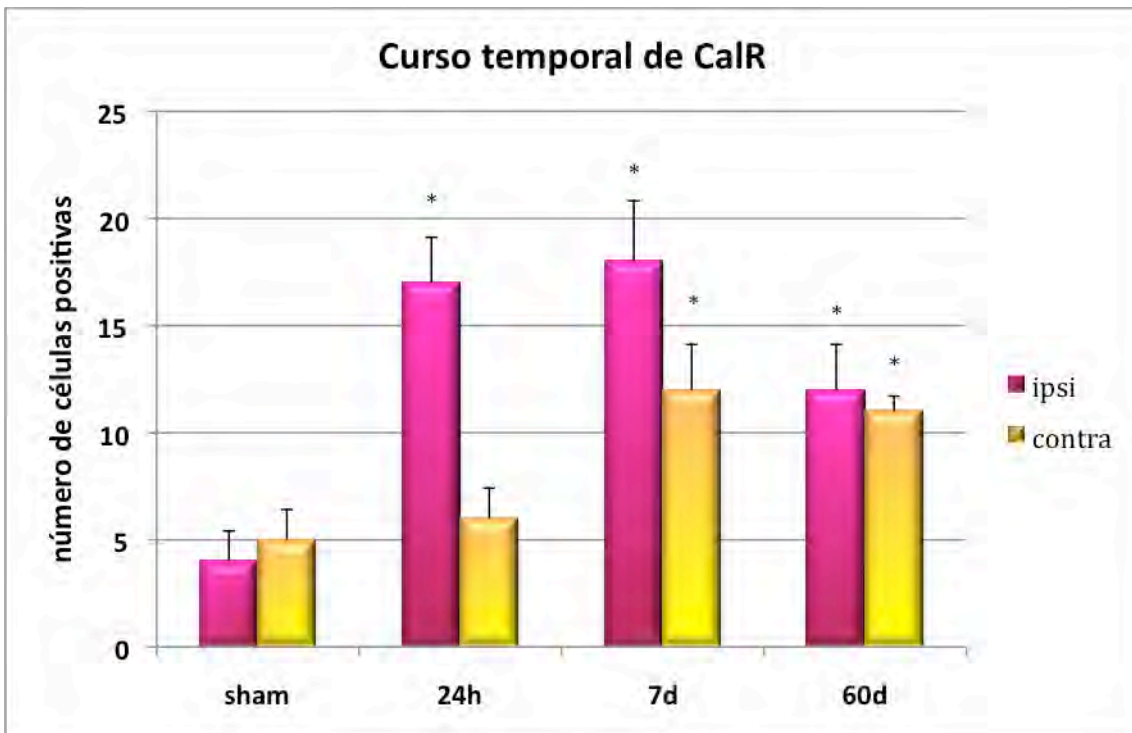
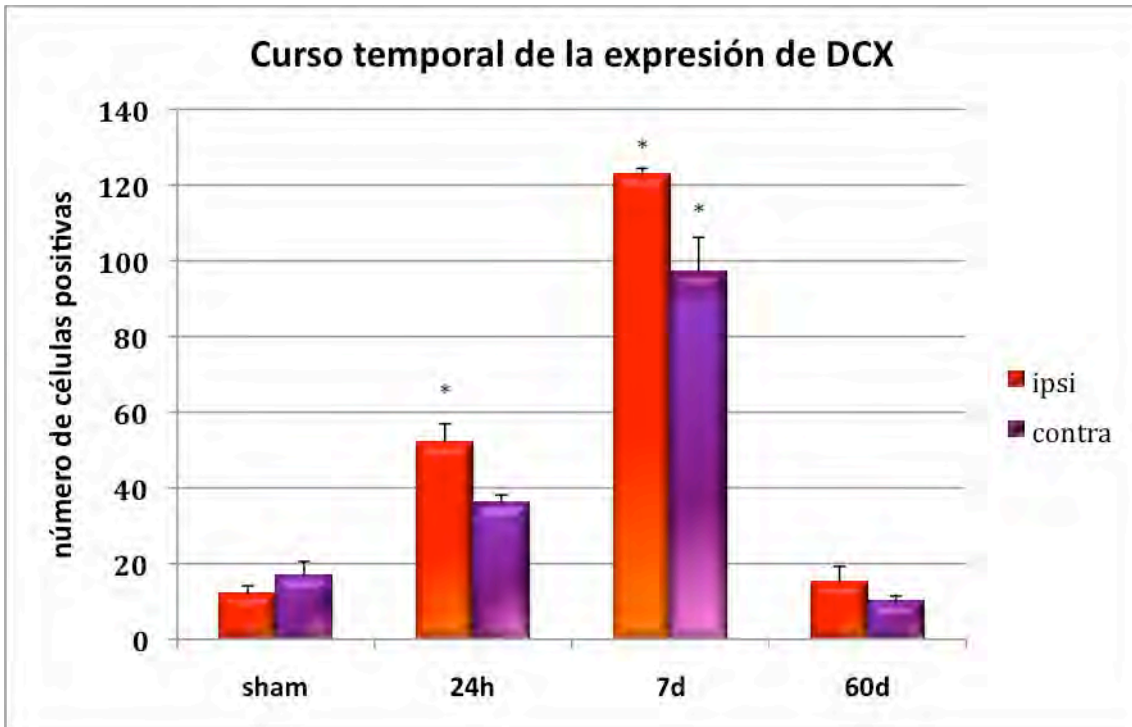
controles. A estos tiempos analizados, el lado contralateral no muestra un aumento significativo.

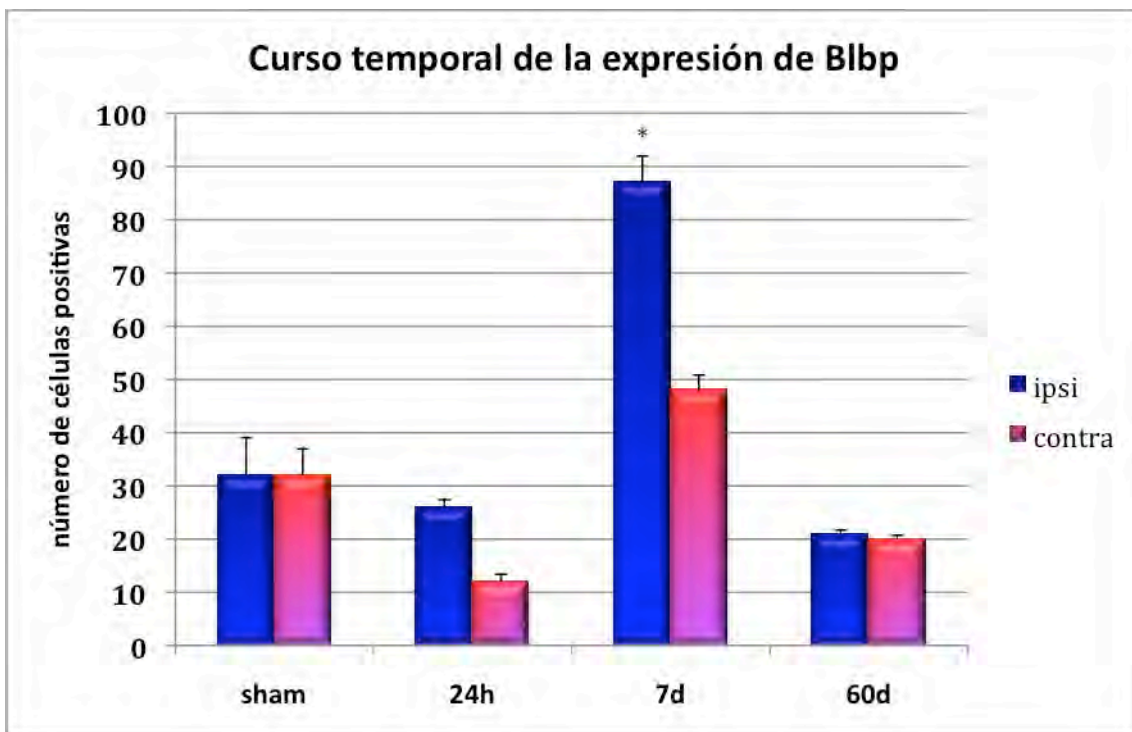
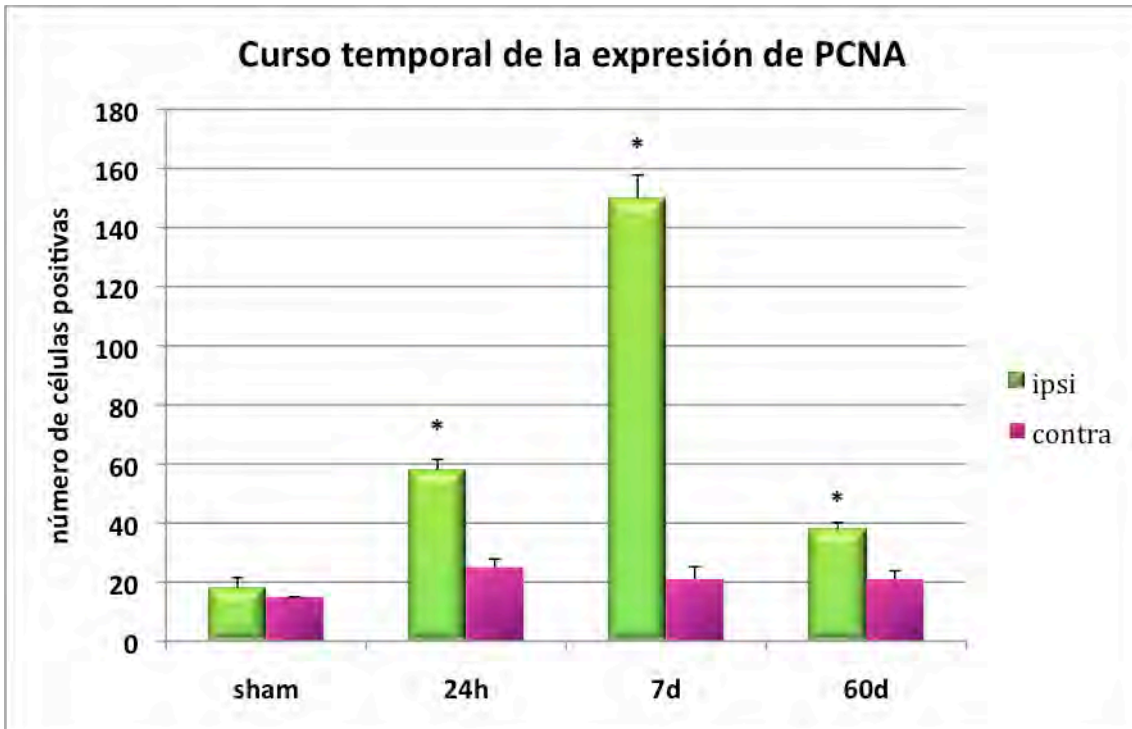
La expresión de CalR aumenta desde las 24 horas y el pico de la expresión es a los 7 días. A los 60 días disminuye la expresión pero aún así se mantiene aumentada de forma significativa si se compara con el control. El lado contralateral también aumenta significativamente a los 7 y 60 días.

Por otro lado la expresión de PCNA también mantiene un comportamiento similar al de CalR, en donde la expresión aumenta a las 24 horas y el pico de la expresión también es a los 7 días. A los 60 días hay también una disminución con respecto a 24 horas y 7 días pero aún así está aumentado con respecto al control. Sin embargo, el lado contralateral no muestra ninguna variación.

La Blbp sólo aumenta de manera significativa a los 7 días en el lado ipsilateral.

De estas gráficas se puede concluir que en los tiempos analizados la expresión máxima de los marcadores que se utilizaron en este trabajo es a los 7 días y de forma significativa.





6. Discusión

Aunque en un principio la existencia de la neurogénesis postnatal era vista con ojos escépticos por parte de la comunidad científica, actualmente es un evento fisiológico demostrado y muy estudiado que ocurre en condiciones normales en el Sistema Nervioso Central (SNC). Una estructura que presenta esta característica es el hipocampo. Esta región es blanco de diversos procesos patológicos que llegan a alterar su estructura y función. Sin embargo también tiene la capacidad de generar nuevas neuronas. Aunque existen pocos trabajos que lo documentan, el Giro Dentado puede reestructurarse después de ciertos tipos de daño (Ogita et al. 2005); (Hernandez-Ortega, Ferrera et al. 2007). El Giro Dentado (GD) es motivo de gran interés pues está involucrado en procesos cognitivos como la memoria y el aprendizaje y es una de las regiones que se daña inicialmente en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer.

Hasta el momento no existen estudios detallados sobre cómo las neuronas nuevas pueden participar en la reorganización del GD después de un proceso de daño.

En el presente trabajo se estudiaron las características temporales de esta reestructuración por medio de un análisis histológico convencional en secciones teñidas con Nissl. También, por medio de la inmunohistoquímica, analizamos la expresión de diversos marcadores neuronales (Fig. 5-9) y astrocíticos (Fig. 10) con el fin de evaluar si nuevas células se generaron en la zona de daño a lo largo del tiempo.

Los tiempos analizados fueron 24 horas, 7 días y 60 días. El primer tiempo representa los cambios inmediatos después de la lesión y la respuesta neurogénica

temprana. A los 7 días el daño es más evidente y a los 60 días es cuando el GD ya debería estar reestructurado.

En cada experimento se trató a las ratas controles con buffer de fosfatos (BF) y a excepción de una ligera dispersión en la zona del trayecto de la aguja, no se observó ningún daño mecánico muy evidente que pudiera afectar los resultados de estos experimentos.

Los resultados morfológicos del GD a través de tinciones con violeta de cresilo y utilizando el marcador de núcleos neuronales (NeuN) (Fig. 5-8) Demuestran que el GD es capaz de reestructurar la capa de células granulares a lo largo del tiempo como se ha demostrado en otros trabajos. (Hernandez-Ortega et al. 2007; Ogita et al. 2005). Es importante mencionar que en el presente estudio observamos una reestructuración de la capa polimórfica (CA4). Esta última observación no ha sido reportado hasta el momento en otros trabajos.

Se hizo una caracterización de células positivas a distintos marcadores con el fin de explicar los diferentes estadios de maduración de neuronas nuevas en el GD en condiciones normales y después de una lesión (Kempermann et al. 2004). Basándonos en el estudio anterior, era importante evaluar las características de distintas etapas de maduración celular a lo largo del daño realizado en el GD del hipocampo para demostrar efectivamente que eran neuronas nuevas las que repoblaban el área de la lesión y que realmente estaban madurando e integrándose, y analizar la velocidad de incorporación de nuevas neuronas a la capa granular.

Los distintos marcadores que utilizamos en estos estudios demuestran diferentes etapas de maduración en las células.

En primer lugar es importante mencionar que lo que ocurre como efecto seguido a la lesión con ácido kaínico (AK) es muerte celular por excitotoxicidad que es un mecanismo conocido de algunas enfermedades neurodegenerativas (Corona y Tapia 2004; Lipton y Rosenberg 1994). La aplicación del AK puede ser el estímulo que acelere el nacimiento de nuevas neuronas. Esta idea está fundamentada, en el hecho que en los sistemas fisiológicos en general se tiende a mantener el estado de homeostasis. En el cerebro en particular debe haber una compensación entre el número de células que mueren y las células que nacen en una zona en particular. Varios estudios han demostrado que al nacer nuevas neuronas otras mueren para poder mantener un equilibrio. Esto se demostró en un trabajo realizado en canarios donde, a pesar de los procesos de neurogénesis, el tamaño del hiperestriado ventral permanece igual, lo que indica que la tasa de células nuevas se compensa con la tasa de muerte de otras (Nottebohm et al. 1994). Esta característica también se ha reportado para el GD, ya que se ha demostrado que las nuevas células no originan hipertrofia del GD y que también existe cierta tasa de muerte celular (Gould et al. 1991). En este mismo trabajo se indicó que el GD pasa por un periodo significativo de muerte celular natural durante el periodo temprano postnatal. Las células que nacen no necesariamente se conservan en la rata adulta.

Probablemente este equilibrio es lo que ocurre en el cerebro de las ratas después del procedimiento de la lesión; nuevas neuronas nacen en respuesta a un daño con

el fin de mantener esta homeostasis y por eso tal vez haya un aumento tan evidente de células después de daño como en este trabajo.

En este sentido se ha reportado que la muerte de células granulares estimula la proliferación de los precursores en el GD de la rata y resulta en un aumento de células marcadas con la bromodeoxiuridina (BrdU) (Gould y Tanapat 1997).

En el presente trabajo se observó un aumento en neuronas jóvenes o en migración, células positivas a doblecortina (DCX) desde las 24 horas y sobre todo a los 7 días. A los dos meses, el número de estas células se reduce (aunque no significativamente). A su vez hay un aumento en células positivas a calretinina (CalR). Sin embargo, es interesante ver que desde las 24 h aumentan las células DCX positivas lo cual podría sugerir que un número elevado de precursores puede rápidamente expresar marcadores neuronales ante un estímulo tóxico.

Como la proliferación celular es otro indicativo de que un proceso de génesis ocurre, en este trabajo se utilizó al antígeno nuclear de células en proliferación (positivas a PCNA) y se observó que la tasa de proliferación fue más activa a los siete días. Esta proliferación concuerda con el aumento de la presencia de cúmulos celulares de neuronas jóvenes (DCX) y con la expresión de células positivas a la proteína de unión a lípidos en el cerebro (Blbp), indicativo de precursores neurales, a lo largo de la capa subgranular. Estas observaciones pueden indicar que es a este tiempo donde hay una mayor producción celular para la reestructuración después del daño.

Cabe mencionar que la cresta del GD del hipocampo fue la región donde se encontró la tasa más alta en neuronas jóvenes tanto a las 24 horas como a los siete

días después del daño. A los 2 meses la presencia de estas células igual que en el resto del GD ha disminuido notablemente. Y también llama la atención que esta zona contiene siempre un número importante células positivas a todos los marcadores. Esta región del GD no es mencionada en trabajos recientes. Probablemente esta ausencia de mención se deba a que como también está formada por la capa molecular, celular y granular del GD, los trabajos anteriores no hacen hincapié en esta diferencia. La presencia de tantas células jóvenes después del daño podría implicar que esta zona del hipocampo es más reactiva y sensible para producir nuevas neuronas.

En varios trabajos se ha observado que las células en proliferación tienen en su mayoría las características de precursores gliales (Gould y Tanapat 1997). También se ha visto que estas células se dividen en la Zona Subgranular (ZSG) y el hilus del GD adulto pero siempre fue atribuido a un proceso de gliogénesis (Cameron et al. 1993; Palmer et al. 2000). Aunque por mucho tiempo se creyó que los astrocitos ya estaban completamente desarrollado, ahora se sabe que son las células madre de la Zona Subventricular (ZSV) y la ZSG (Doetsch et al. 1999; Seri et al. 2001).

En el presente trabajo se evaluaron cualitativamente los niveles de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y cuantitativamente los niveles de Blbp. Es clara una disminución de la glía radial a las 24 horas lo cual se correlaciona con la expresión disminuida de Blbp. A los 7 post-lesión días ocurre un aumento de la glía radial y ésta se alinea en la capa polimórfica al momento de que está desorganizada (observado utilizando GFAP). Este aumento de glía radial indicaría que en efecto los precursores son estimulados. El que una lesión induzca gliogénesis podría estar

implicado directamente en los mecanismos de proliferación después de una lesión. También es posible que las neuronas en proceso de degeneración liberen factores o señales que estimulan a los precursores celulares.

Otra observación importante en el presente trabajo es que después del daño, no sólo el lado donde se realizó la lesión, muestra un aumento en células positivas a los diversos marcadores, sino que el lado contralateral también responde con un aumento, (Gray y Sundstrom 1998). Estos resultados sugieren que las señales que se producen en un hipocampo llega a activar el hipocampo contralateral.

Aunque en el presente trabajo se hizo una caracterización de algunos eventos que activan a la reestructuración morfológica del GD, falta corroborar que funcionalmente las nuevas neuronas integradas efectivamente funcionan de manera adecuada.

De forma preliminar en nuestro laboratorio se ha encontrado que la pérdida de la memoria espacial después de la lesión del GD se recupera después de 60 días de la lesión.

Después del daño, es probable que los progenitores sean activados para generar nuevas neuronas. El poder trabajar con estos progenitores sería esencial para la postulación de nuevas terapias de regeneración para tratar algunas enfermedades neurológicas.

En este sentido se ha reportado en roedores que el GD contiene progenitores que se pueden expandir *in vitro* y ser transplantados en el cerebro. Así, en el cerebro adulto de humanos también se podrían realizar este procedimiento y se podrían

utilizar estos progenitores para estudios *in vivo* e *in vitro* de diferenciación celular y después realizar trasplantes.

Si la plasticidad es mejor entendida hay mayor esperanza de direccionar esta neurogénesis endógena a procesos de auto-reparación.

7. Conclusiones Generales

- La inyección de AK en el GD promueve muerte neuronal, desarreglo de la capa polimórfica y adelgazamiento y desarreglo de la capa de células granulares. También hay aparición de núcleos picnóticos.
- La presencia de células positivas a DCX y CalR en el lado ipsilateral, indica que nuevas neuronas se generaron después de la lesión.
- En el lado ipsilateral hay un aumento en la proliferación celular (células positivas a PCNA) sobre todo a los 7 días de la lesión.
- El aumento de células positivas a Blbp indicativo de glía radial y células madre también incrementa a los 7 días posteriores a la lesión en todo el GD.
- En el lado contralateral también hay un aumento de células positivas a los diversos marcadores posiblemente debido a que hay conexiones entre ambos hipocampos.
- De manera general la morfología del GD es reestructurada a los 60 días de la lesión.

8. Bibliografía

- Abrous DN, Koehl M, Le Moal M. 2005. Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *Physiol Rev* 85(2):523-569.
- Altman J, Das GD. 1965. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124(3):319-335.
- Altman J, Das GD. 1966. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. I. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in neonate rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions. *J Comp Neurol* 126(3):337-389.
- Alvarez-Buylla A, Lim DA. 2004. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron* 41(5):683-686.
- Alvarez-Buylla A, Ling CY, Yu WS. 1994. Contribution of neurons born during embryonic, juvenile, and adult life to the brain of adult canaries: regional specificity and delayed birth of neurons in the song-control nuclei. *J Comp Neurol* 347(2):233-248.
- Amaral, D. G. y Witter, M.P. Hippocampal Formation. The rat nervous system. Academic Press. U.S.A. 1995.
- Barnea A, Nottebohm F. 1996. Recruitment and replacement of hippocampal neurons in young and adult chickadees: an addition to the theory of hippocampal learning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(2):714-718.
- Barnes C. 1993. Electrophysiological changes in hippocampus of aged rodents: predictions for functional change in aged primate. *Neurobiol Aging* 14(6):645-646.
- Ben-Ari Y, Cossart R. 2000. Kainate, a double agent that generates seizures: two decades of progress. *Trends Neurosci* 23(11):580-587.
- Brandt MD, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G, Reuter K, Bick-Sander A, von der Behrens W, Kempermann G. 2003. Transient calretinin expression defines early postmitotic step of neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis of mice. *Mol Cell Neurosci* 24(3):603-613.
- Cameron HA, McEwen BS, Gould E. 1995. Regulation of adult neurogenesis by excitatory input and NMDA receptor activation in the dentate gyrus. *J Neurosci* 15(6):4687-4692.
- Cameron HA, Woolley CS, McEwen BS, Gould E. 1993. Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* 56(2):337-344.

- Corona JC, Tapia R. 2004. AMPA receptor activation, but not the accumulation of endogenous extracellular glutamate, induces paralysis and motor neuron death in rat spinal cord in vivo. *J Neurochem* 89(4):988-997.
- Doetsch F, Caille I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. 1999. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97(6):703-716.
- Encinas JM, Vaahokari A, Enikolopov G. 2006. Fluoxetine targets early progenitor cells in the adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(21):8233-8238.
- Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH. 1998. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4(11):1313-1317.
- Feng L, Hatten ME, Heintz N. 1994. Brain lipid-binding protein (BLBP): a novel signaling system in the developing mammalian CNS. *Neuron* 12(4):895-908.
- Francis F, Koulakoff A, Boucher D, Chafey P, Schaar B, Vinet MC, Friocourt G, McDonnell N, Reiner O, Kahn A, McConnell SK, Berwald-Netter Y, Denoulet P, Chelly J. 1999. Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons. *Neuron* 23(2):247-256.
- Gage FH, Coates PW, Palmer TD, Kuhn HG, Fisher LJ, Suhonen JO, Peterson DA, Suhr ST, Ray J. 1995. Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(25):11879-11883.
- Gama Sosa MA, Wen PH, De Gasperi R, Perez GM, Senturk E, Friedrich VL, Jr., Elder GA. 2004. Entorhinal cortex lesioning promotes neurogenesis in the hippocampus of adult mice. *Neuroscience* 127(4):881-891.
- Garcia-Verdugo JM, Llahi S, Ferrer I, Lopez-Garcia C. 1989. Postnatal neurogenesis in the olfactory bulbs of a lizard. A tritiated thymidine autoradiographic study. *Neurosci Lett* 98(3):247-252.
- Gleeson JG, Allen KM, Fox JW, Lamperti ED, Berkovic S, Scheffer I, Cooper EC, Dobyns WB, Minnerath SR, Ross ME, Walsh CA. 1998. Doublecortin, a brain-specific gene mutated in human X-linked lissencephaly and double cortex syndrome, encodes a putative signaling protein. *Cell* 92(1):63-72.
- Gleeson JG, Lin PT, Flanagan LA, Walsh CA. 1999. Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron* 23(2):257-271.
- Goldman SA, Nottebohm F. 1983. Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80(8):2390-2394.

- Gould E. 2007. How widespread is adult neurogenesis in mammals? *Nat Rev Neurosci* 8(6):481-488.
- Gould E, Beylin A, Tanapat P, Reeves A, Shors TJ. 1999. Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat Neurosci* 2(3):260-265.
- Gould E, Tanapat P. 1997. Lesion-induced proliferation of neuronal progenitors in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* 80(2):427-436.
- Gould E, Tanapat P, McEwen BS, Flugge G, Fuchs E. 1998. Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(6):3168-3171.
- Gould E, Woolley CS, McEwen BS. 1991. Naturally occurring cell death in the developing dentate gyrus of the rat. *J Comp Neurol* 304(3):408-418.
- Gray WP, Sundstrom LE. 1998. Kainic acid increases the proliferation of granule cell progenitors in the dentate gyrus of the adult rat. *Brain Res* 790(1-2):52-59.
- Hernandez-Ortega K, Ferrera P, Arias C. 2007. Sequential expression of cell-cycle regulators and Alzheimer's disease-related proteins in entorhinal cortex after hippocampal excitotoxic damage. *J Neurosci Res* 85(8):1744-1751.
- Kaplan MS, Hinds JW. 1977. Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science* 197(4308):1092-1094.
- Kempermann G, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G. 2004. Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci* 27(8):447-452.
- Kim KK, Adelstein RS, Kawamoto S. 2009. Identification of neuronal nuclei (NeuN) as Fox-3, a new member of the Fox-1 gene family of splicing factors. *J Biol Chem*.
- Lipton SA, Rosenberg PA. 1994. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med* 330(9):613-622.
- Lois C, Alvarez-Buylla A. 1994. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 264(5162):1145-1148.
- Lothman EW, Bertram EH, 3rd, Stringer JL. 1991. Functional anatomy of hippocampal seizures. *Prog Neurobiol* 37(1):1-82.
- Markakis EA, Gage FH. 1999. Adult-generated neurons in the dentate gyrus send axonal projections to field CA3 and are surrounded by synaptic vesicles. *J Comp Neurol* 406(4):449-460.

- Miller MW, Nowakowski RS. 1988. Use of bromodeoxyuridine-immunohistochemistry to examine the proliferation, migration and time of origin of cells in the central nervous system. *Brain Res* 457(1):44-52.
- Nakatomi H, Kuriu T, Okabe S, Yamamoto S, Hatano O, Kawahara N, Tamura A, Kirino T, Nakafuku M. 2002. Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell* 110(4):429-441.
- Nottebohm F, O'Loughlin B, Gould K, Yohay K, Alvarez-Buylla A. 1994. The life span of new neurons in a song control nucleus of the adult canary brain depends on time of year when these cells are born. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(17):7849-7853.
- Nowakowski RS, Lewin SB, Miller MW. 1989. Bromodeoxyuridine immunohistochemical determination of the lengths of the cell cycle and the DNA-synthetic phase for an anatomically defined population. *J Neurocytol* 18(3):311-318.
- Ogita K, Nishiyama N, Sugiyama C, Higuchi K, Yoneyama M, Yoneda Y. 2005. Regeneration of granule neurons after lesioning of hippocampal dentate gyrus: evaluation using adult mice treated with trimethyltin chloride as a model. *J Neurosci Res* 82(5):609-621.
- Palmer TD, Willhoite AR, Gage FH. 2000. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol* 425(4):479-494.
- Paxinos, G. Watson, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Sydney; Academic Press. 1986.
- Rakic P. 1985a. DNA synthesis and cell division in the adult primate brain. *Ann N Y Acad Sci* 457:193-211.
- Rakic P. 1985b. Limits of neurogenesis in primates. *Science* 227(4690):1054-1056.
- Schmidt A, Haas SJ, Hildebrandt S, Scheibe J, Eckhoff B, Racek T, Kempermann G, Wree A, Putzer BM. 2007. Selective targeting of adenoviral vectors to neural precursor cells in the hippocampus of adult mice: new prospects for in situ gene therapy. *Stem Cells* 25(11):2910-2918.
- Seri B, Garcia-Verdugo JM, McEwen BS, Alvarez-Buylla A. 2001. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci* 21(18):7153-7160.
- Seri B, Herrera DG, Gritti A, Ferron S, Collado L, Vescovi A, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. 2006. Composition and organization of the SCZ: a large germinal layer containing neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cereb Cortex* 16 Suppl 1:i103-111.

- Shors TJ, Miesegaes G, Beylin A, Zhao M, Rydel T, Gould E. 2001. Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature* 410(6826):372-376.
- Stanfield BB, Trice JE. 1988. Evidence that granule cells generated in the dentate gyrus of adult rats extend axonal projections. *Exp Brain Res* 72(2):399-406.
- Suh H, Deng W, Gage FH. 2009. Signaling in adult neurogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 25:253-275.
- Wang Q, Yu S, Simonyi A, Sun GY, Sun AY. 2005. Kainic acid-mediated excitotoxicity as a model for neurodegeneration. *Mol Neurobiol* 31(1-3):3-16.
- Werner L, Brauer K. 1984. Neuron types in the rat dorsal lateral geniculate nucleus identified in Nissl and deimpregnated Golgi preparations. *J Hirnforsch* 25(2):121-127.
- West MJ, Coleman PD, Flood DG. 1988. Estimating the number of granule cells in the dentate gyrus with the disector. *Brain Res* 448(1):167-172.
- Zepeda A, Michel G, Aguilar-Arredondo A, Arias C. 2010. Neurogenesis after brain stroke: is there a relationship with functional recovery? *Curr Trends Neurol*, en prensa.