



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Efecto de la complejidad y la duración del Enriquecimiento ambiental sobre la ansiedad: relación con la neurogénesis del hipocampo de roedores macho adulto de la cepa *BALB/c*.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**Bióloga**

**P R E S E N T A :**

**Beatriz Gutiérrez Vera**



**DIRECTOR DE TESIS:**

**Dr. Gerardo Bernabé Ramírez Rodríguez**

**2015**



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.

*¿Y si un trozo de madera descubre que es un violín?*

Arthur Rimbaud

*Dedicada a mi familia, les voy a estar eternamente agradecida.*

## Agradecimientos

Quiero agradecer principalmente a la mayor casa de estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme la oportunidad de estudiar una de la más gratificante y maravillosa carrera que es la Biología, porque sin esta oportunidad y apoyo no sería la persona y la profesionista que soy ahora.

Por otra parte doy las gracias a mis padres, esas maravillosas personas que me ayudaron a llegar hasta el final del camino, que me dieron esperanzas y la motivación que tanto necesite. En especial quiero agradecer a mi madre, por su dedicación, convicción y calidad de ser humano, la cual es mi inspiración y modelo a seguir, muchas gracias mami, te quiero tanto!. También quiero agradecer a mi abuela y segunda madre porque sin ella, esta titulación no hubiera podido llevarse a cabo, le agradezco infinitamente todo el apoyo incondicional que tuvo hacia mi persona y sus grandes consejos.

A mi fantástica hermana y una de mis mejores amigas Gaby, por todo el apoyo que siempre me ha brindado, por su gran sentido del humor que hace amenos mis días difíciles, porque estuvo y está en las buenas y en las malas, por sus consejos, por tenerme la paciencia siempre que necesite de alguien, porque siempre creyó en mí y me dio siempre esperanza para llegar al final.

A Gerardo, mi persona favorita, mi mejor amigo, compañero de vida, increíble persona, porque es la familia que la vida te da. Le agradezco ser tan comprensivo, tan alegre y lleno de vida que contagia cada uno de mis días, porque amo su empeño y su dedicación, su complicidad, su sinceridad, esas lagrimas que compartimos y la sensación de felicidad de los mejores momentos en la facultad a su lado, por ser mi maestro en esas clases tan difíciles y el mejor compañero que se pueda tener en una carrera tan comprometedor y única, por brindarme su tiempo y su espacio solo para mí, por último gracias por Arayuyin que fue la mejor sincronía, par, ente, uno, entidad, persona, ser, único, mente.

Agradezco también a mis hermanos por apoyarme incondicionalmente durante toda la carrera, porque son grandes personas, grandes amigos y compañeros de vida, a Carlos por ser un gran maestro y a Paty es una excelente persona y amiga que ha compartido tan buenos momentos conmigo y que sin ella la tesis y mis estudios no hubieran tenido ese sentido tan bueno en mi vida, porque ella siempre me motivo y lucho a mi lado y sus palabras siempre han sido un consuelo para mí.

Quiero agradecer al Doctor Gerardo por brindarme esa oportunidad de poder trabajar en un excelente grupo de trabajo, con buenos amigos y grandes personas, gracias por su comprensión en mis malos momentos y su tiempo dedicado para este proyecto y porque en ese laboratorio encontré todo lo que necesitaba para forjarme como Bióloga. Gracias a Leonardo porque las horas de trabajo fueron más ligeras gracias a sus consejos, porque tuvo la paciencia de sentarse conmigo a

explicarme las cosas y porque sencillamente hace un trabajo estupendo como químico y amigo. También hago mención a Ariadna, simplemente la estimo mucho porque me dedico todo el tiempo necesario para los experimentos, para ser una amiga, le agradezco todas esas risas que me hicieron el día.

Por último y no menos importante por todas las personas que estuvieron a mi lado durante mi formación, que me dieron esos maravillosos días y que supieron estar en los peores también, gracias a Gaby, Paty, Laura eres una gran maestra para mí y una valiosa amiga, Ángel, Fernando, Carmen y Alberto.



## Índice

1. Abreviaturas.....	8
2. Resumen.....	10
3. Introducción.....	11
3.1. Neurogénesis en adultos.....	12
3.2. Hipocampo.....	12
3.3. Zona subgranular del giro dentado.....	13
3.4. Factores que regulan la neurogénesis.....	14
3.5. Ansiedad y Neurogénesis.....	18
3.6. Eje hipotálamo-pituitario-adrenal.....	20
3.7. Modelo de ansiedad.....	22
3.8. Enriquecimiento ambiental.....	22
3.9. Marcadores para analizar la neurogénesis.....	24
4. Justificación y objetivos.....	26
5. Métodos.....	27
5.1 Diseño experimental.....	27
5.2 Marcaje permanente con BrdU.....	27
5.3 Grupos experimentales.....	27
5.4 Prueba conductual.....	34
5.5 Sacrificio y tratamiento de tejido.....	35
5.6 Inmunohistoquímica.....	35
5.7 Inmunofluorescencia.....	36
5.8 Análisis Citológico.....	37
5.9 Análisis estadístico.....	38
6. Resultados.....	39
6.1 Laberinto en cruz elevado.....	39
6.2 Ki-67.....	41
6.3 Supervivencia celular (BrdU).....	43
6.4 Doblecortina.....	45
6.5 BrdU/NeuN.....	48
6.6 Arc.....	49
6.7 BrdU/Arc.....	51
7. Discusión.....	52
8. Conclusiones.....	55
9. Referencias.....	56

## 1. Abreviaturas.

ANOVA: Análisis de varianza

BDNF: Factor de crecimiento derivado del cerebro (Brain Derived Neurotrophic Factor).

BMP: Proteínas morfogenéticas óseas (Bone Morphogenetic Proteins)

BO: Bulbo olfatorio

BrdU: 5-bromo-2'-desoxiuridina

CA: Asta de Amón (Cornu Ammonis)

CCK4: Colecistoquinina

CFR: Corticotropina

CMR: Camino migrador rostral

DCX: Doblecortina (Doublecortin)

EGF: Factor de crecimiento epidérmico (Epidermal Growth Factor).

FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos (Fibroblast Growth Factor)

GABA: Ácido gamma aminobutírico (Gamma aminobutyric acid)

GD: Giro dentado

HPA: Eje hipotálamo pituitaria adrenal

IGF: Factor de crecimiento similar a la insulina (Insuline Growth Factor).

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas (Platelet Derived Growth Factor).

PEDF: Factor Derivado del Epitelio Pigmentado.

PVN: Núcleo paraventricular

TBS: Tampón trifosfato salino (Triphosphate buffer saline)

VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular (Vascular Endothelial Growth Factor).

ZSG: Zona subgranular

ZSV: Zona subventricular



## 2. Resumen.

A principios del siglo XX, científicos postulaban que el cerebro adulto era incapaz de generar nuevas neuronas. Los primeros datos sobre neurogénesis en mamíferos adultos, proceden de investigaciones que se realizaron hace más de tres décadas en roedores, donde se demostró la existencia de dos zonas diferenciadas en las que las células se dividían, lo que sugería la producción de nuevas neuronas (Altman, 1962, 1969).

Actualmente podemos definir a la neurogénesis como un proceso de generación de neuronas funcionales a partir de células madre, que proliferan para dar lugar a los precursores que se diferenciarán en neuronas, mismas que madurarán para integrarse a los circuitos (Ming y Song, 2005). En el cerebro adulto se han descrito principalmente dos zonas responsables de la neurogénesis constitutiva que son: la zona subventricular, bulbo olfatorio y la zona subgranular del giro dentado del hipocampo (Lois et al., 1994).

El hipocampo no solo está implicado en funciones cognitivas, sino que también es una estructura clave en las respuestas emocionales. Esta estructura cerebral juega un papel importante en la regulación de los estados afectivos y ha sido particularmente asociada con la modulación de la ansiedad, empero, la ansiedad excesiva se vuelve patológica cuando es exagerada o persistente, o cuando ya no indica un peligro (Revest et al., 2009).

En este sentido se sabe que el enriquecimiento ambiental reduce el temor, si bien es cierto se ha demostrado que la exposición corta o prolongada a un ambiente enriquecido promueve efectos benéficos a nivel celular y conductual.

En el presente proyecto se evidenciaron los efectos positivos generados por el enriquecimiento en los ratones de la cepa *BALB/c* favoreciendo la generación de neuronas. A través de un diseño experimental en el cual se aumentó gradualmente el enriquecimiento ambiental en cinco diferentes grupos experimentales, posteriormente se realizó la prueba conductual para la evaluación de la ansiedad, arrojando como resultado una diferencia en el comportamiento animal en cada grupo experimental pudiendo relacionar que este ambiente enriquecido confiere la capacidad de adaptación y mitigación ante situaciones ansiogénicas. En un segundo bloque se llevaron a cabo diversas pruebas histológicas inmunohistoquímicas e inmunofluorescencias para observar un incremento en la tasa neurogénica, reforzando la hipótesis de que la neurogénesis influye de una manera positiva y directa sobre el comportamiento ansiogénico.

### 3. Introducción.

El sistema nervioso de los animales es complejo y versátil ya que funciona detectando cambios en el ambiente externo y en el medio interno produciendo respuestas apropiadas para el correcto funcionamiento del sistema (Crossman, 2007).

La unidad básica estructural y funcional del sistema nervioso es la neurona ó también conocida como célula nerviosa. Las funciones de la neurona son recibir e integrar la información procedente de receptores sensitivos u otras neuronas y transmitir esa información a otras células u órganos efectores. Cada neurona es una célula independiente, la información se transmite entre neuronas a través de estructuras especializadas denominadas sinapsis (Figura 1). Existe una amplia diversidad de formas y tamaños en las neuronas de las diferentes partes del sistema nervioso, constan de un cuerpo celular único del cual emergen un número variable de dendritas que se ramifican. La mayoría de estas dendritas tienen función receptora, estas poseen especializaciones sinápticas; una de las prolongaciones que abandona el cuerpo celular denominado axón, transporta información fuera del cuerpo celular. Los axones son variables en longitud y pueden dividirse en varios ramos a través de los cuales la información puede distribuirse a varios destinos diferentes simultáneamente. En el extremo del axón se encuentran especializaciones llamados botones terminales los cuales transmitirán la información a las otras neuronas (Crossman, 2007).

Las células de la neuroglia, o glía, constituyen el otro componente celular principal del sistema nervioso. A diferencia de las neuronas, la neuroglia no tiene un papel directo en el procesamiento de la información, pero realiza diversas tareas auxiliares esenciales para el funcionamiento de las células nerviosas.

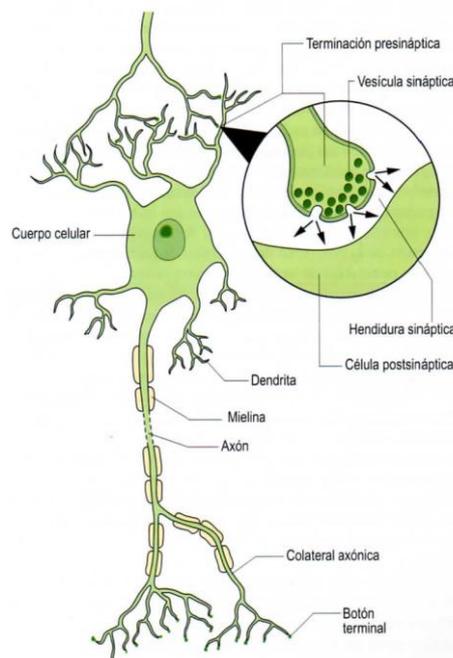


Figura 1: Representación esquemática de neurona y sinapsis (Tomado de Crossman, 2007).

### **3.1. Neurogénesis en adultos**

Uno de los dogmas fundamentales sustentado en las neurociencias fue el propuesto por Santiago Ramón y Cajal en el año 1914, quien determinó que la neurogénesis se limitaba al desarrollo embrionario y postnatal temprano y que la población neuronal del individuo adulto no podía ser remplazada. Aunque se habían detectado figuras mitóticas en el cerebro de animales adultos, siempre se relacionaron con la generación de células gliales. La heterogeneidad celular y la complejidad estructural del SNC parecían explicar la ausencia de recambio neuronal en el cerebro adulto. Hasta apenas el siglo pasado sostenía que la regeneración del sistema nervioso no puede ocurrir en etapas de la vida adulta. Sin embargo, a partir de los trabajos de Joseph Altman en la década de los sesenta, utilizando la técnica de autorradiografía con timidina tritiada para marcar células en división. Estas observaciones fueron corroboradas más tarde por Kaplan, combinando la autorradiografía con la microscopía electrónica (Kaplan & Hinds, 1977; Kaplan, 1985) de tal modo que con los avances tecnológicos de los 90s, a la fecha se ha demostrado la existencia de la neurogénesis en algunas áreas del cerebro posnatal y adulto de roedores. Este proceso se lleva a cabo específica y constitutivamente en el bulbo olfatorio y el giro dentado en el hipocampo.

### **3.2. Hipocampo**

El hipocampo es una arquicorteza derivada del palio medial y forma parte de las allocortezas trilaminares. Se encuentra constituida por:

El giro dentado (GD) (Figura 2), está formado por una capa de somas pequeños densamente empaquetados en columnas, donde residen las células granulares. Estas neuronas son de naturaleza glutamatérgica y poseen axones basales denominados fibras musgosas. En la capa más cercana a la fisura hipocámpica siendo la capa molecular, se localizan las prolongaciones dendríticas apicales de las neuronas granulares, algunas interneuronas y células gliales. La capa más profunda del giro dentado, es el denominado hilus, caracterizado por su capacidad polimórfica, compuesta por una gran variedad de tipos celulares. Entre la capa molecular y el hilus se puede distinguir una fina capa, la capa subgranular, compuesta por precursores neuronales los cuales poseen actividad neurogénica durante la vida adulta (Zhao, 2006).

El cuerno de Amón se divide en tres áreas: CA1 (cuerno de Amón 1), CA2 (cuerno de Amón 2) y CA3 (cuerno de Amón 3). La zona más distal designada CA1 se caracteriza por estar formada por células piramidales pequeñas (Figura 2), mientras la zona más proximal, formada por la CA2 y CA3, es rica en células piramidales de mayor tamaño.

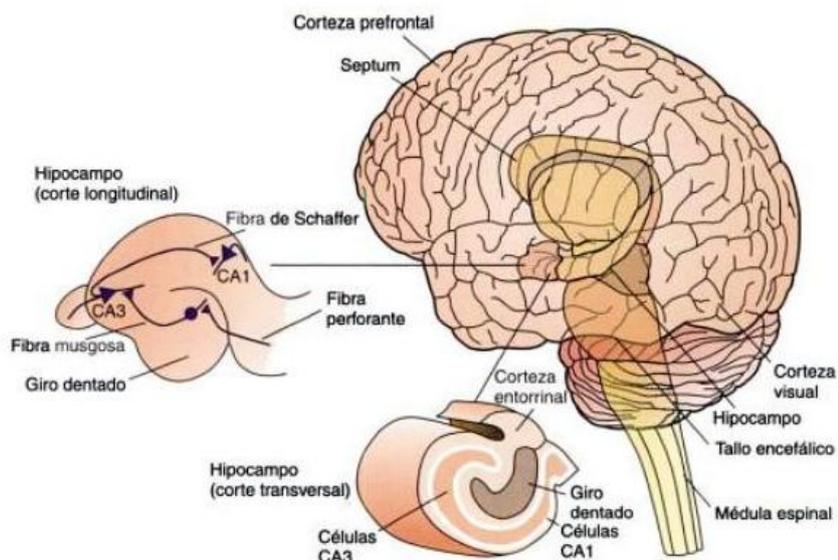


Figura 2: Anatomía del hipocampo y sus circuitos neuronales básicos (Tomado de Cardinali 2007).

### 3.3. La zona subgranular del giro dentado

En la ZSG se generan neuroblastos que migran hasta integrarse en la capa granular del GD donde extienden procesos y se diferencian en neuronas granulares (Christie & Cameron, 2006).

En la ZSG se ha determinado que las células madre generadoras de los precursores neuronales también tienen características de glia radial (Seri y cols., 2001). Estas células dan lugar a las neuronas granulares a través de una serie de precursores intermedios de complejidad morfológica creciente.

Las células madre residentes en la SGZ se dividen para dar lugar a dos células hijas. Estas células madre se caracterizan por la expresión de GFAP, nestina y SOX2. Las células de amplificación transitoria ya no expresan GFAP, pero continúan expresando nestina y SOX2, una vez que se dividen dan lugar a células hijas que corresponden a los neuroblastos, los cuales expresan a la proteína doblecortina (DCX). Una vez que los neuroblastos salen del ciclo celular, las neuronas inmaduras siguen expresando DCX (Figura 4) y la forma modificada de la molécula de adhesión neuronal (PSA- NCAM). Finalmente las neuronas expresan calretinina en conjunto con DCX para que en su etapa de diferenciación terminal solo expresen la proteína nuclear NeuN.

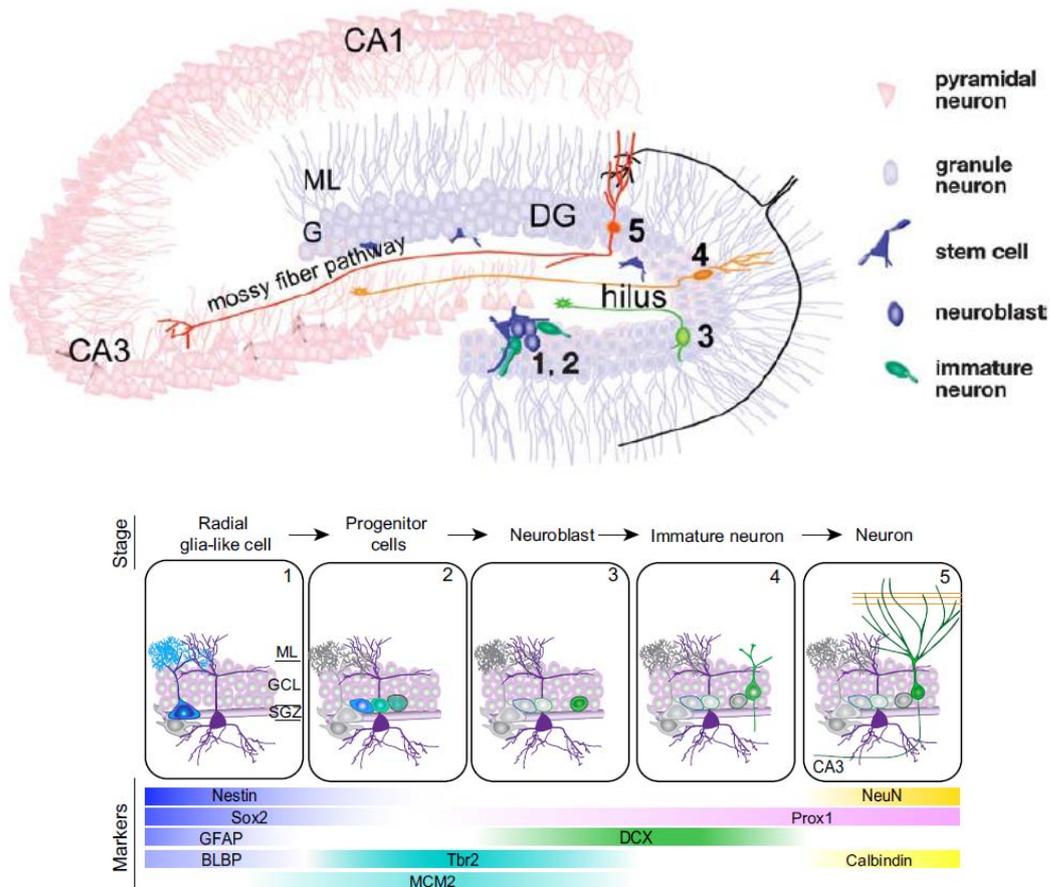


Figura 3. Generación de nuevas neuronas granulares en el giro dentado del hipocampo a partir de células madre neuronales en la zona subgranular (Tomado de Guo-li Ming and Hongjun Song 2005 & 2011).

### 3.4. Factores que regulan la neurogénesis

La neurogénesis en el cerebro adulto está regulada de manera positiva o negativa por diversos mecanismos, como factores internos y externos que participan en dicha regulación. Entre los factores internos se encuentran la expresión de genes, moléculas, factores de crecimiento, hormonas y neurotransmisores. Entre los factores externos pueden mencionarse los estímulos ambientales y los farmacológicos (Ramírez Rodríguez, 2007).

### *Factores internos*

Existen factores genéticos que inducen neurogénesis y morfogénesis embrionaria, en los que encontramos la expresión de los genes Notch, BMP, Eph/ephrins, Noggin y Shh. Estos genes participan también regulando la proliferación y la diferenciación celular en zonas neurogénicas del cerebro adulto. Durante el desarrollo, un gran número de genes pro-neurales regulan la determinación y diferenciación celular de las células troncales. Algunos de estos genes, se expresan en diferentes niveles en las regiones germinativas del cerebro adulto como respuesta a estímulos externos o lesiones en dicha zona (Arias, 2007).

Además, se ha demostrado, la participación de algunas moléculas de adhesión que modulan la proliferación de las células pluripotenciales, por ejemplo encontramos a la molécula de adhesión celular neural que agiliza la neurogénesis en el hipocampo adulto.

Igualmente la señalización por diversos factores de crecimiento, como por ejemplo, BDNF, IGF-I, FGF-2, VEGF, EGF, entre otros, se encuentran implicados en el proceso de diferenciación celular pudiendo determinar la tasa del linaje tanto neuronal como glial (Figura 4). Los factores de crecimiento pueden participar como neuroprotectores o factores inductores durante la generación y diferenciación de las nuevas células que remplazaran a las células dañadas (Kempermann et al., 1997).

Se ha demostrado el efecto positivo de los factores FGF, EGF, neuregulinas, VEGF y PDGF, durante el proceso de neurogénesis tanto in vivo como in vitro. Además en un estudio de Zigova en el año 1998, se demostró que la administración intracerebroventricular del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) incrementa la neurogénesis en el bulbo olfatorio, además de que, ya es sabido que el BDNF es necesario para mantener la tasa de neurogénesis en el hipocampo de ratones adulto según lo documentado (Lee et al. 2002).

Aunado a lo anterior se conocen diversos neurotransmisores que participan como reguladores de la neurogénesis en el cerebro adulto específicamente en el hipocampo. El glutamato provee un efecto dual, sobre algunas etapas del proceso para la formación de neuronas nuevas dependiendo del tipo de receptor sobre el cual actué este neurotransmisor (Ramírez, 2007); cuando el glutamato activa los receptores NMDA, se ve afectada la división celular (Yoshimizu, 2004), empero, cuando actúa a través de los receptores AMPA, la respuesta induce un aumento en la proliferación celular (Bai et al., 2003).

La participación de otro neurotransmisor modulador de la formación de nuevas neuronas, es la serotonina, esta aumenta la proliferación de las células pluripotenciales en el giro dentado y en la zona subgranular, a través de la activación del receptor 5HT<sub>1A</sub> (Santarelli L. et al., 2003), sin embargo, la serotonina también puede regular la neurogénesis a través de otros subtipos de receptores, como el 5-HT<sub>2a</sub> o el 5-HT<sub>7</sub> (Duman, 1997).

En cuanto al sistema noradrenérgico, se ha comprobado que, al inhibir la liberación de noradrenalina, se disminuye la proliferación, pero no se ve afectada la

diferenciación o la supervivencia de las nuevas células en el hipocampo (Kulkarni et al., 2003).

La dopamina es un regulador de la neurogénesis tanto de la zona subventricular (ZSV) como del hipocampo del cerebro adulto mediante los receptores dopaminérgicos presentes en las células progenitoras neuronales. Se ha confirmado en un estudio que la disminución de dopamina aminora la generación de nuevas neuronas, tanto en la ZSV como en el giro dentado del hipocampo (Hoglinger et al., 2004)

Por otro lado numerosos estudios han demostrado que las hormonas tiroideas (HT) también son esenciales para la neurogénesis y la gliogénesis durante el desarrollo, pero hay muy pocos trabajos que hayan analizado su función en el cerebro adulto. Shingo y colaboradores en el 2003, demuestran que la tasa de neurogénesis en ratas se incrementa un 65% cuando se encuentran preñadas y alcanza su punto máximo justo antes del parto, el cual coincide con los niveles de prolactina. Igualmente los estrógenos en el sistema nervioso central modulan la síntesis, liberación y metabolismo de neurotransmisores, neuropéptidos y neuroesteroides, además de actuar como moduladores en procesos relacionados con la plasticidad sináptica, el desarrollo neuronal y como reguladores de ciertas funciones cerebrales tal como la conducta, la memoria y la cognición (Estrada Camarena et al., 2012). Por ejemplo, el estradiol tiene la capacidad de aumentar la proliferación celular en el GD de roedores hembra adultos, así como de inducir un incremento tanto en las sinapsis como en el número de espinas dendríticas en las neuronas del hipocampo (Lee SJ et al., 2004)

Otra hormona implicada en la neurogénesis hipocampal como la hormona de crecimiento por ejemplo, que puede inducir la formación de nuevas neuronas y los corticoides (Lichtenwalner R. et al., 2006).

En un estudio reciente de nuestro laboratorio se encontró que un tratamiento crónico con melatonina aumentó el número de neuronas positivas-CR en el área ventral del hipocampo, esto mediante el análisis de los efectos de la melatonina exógena sobre el número de neuronas positivas para calretinina (CR) con unión a calcio en el giro dentado durante el envejecimiento en ratones de la cepa BalB/C, basados en que la melatonina de acuerdo a estudios anteriores, es considerada una molécula implicada en el desarrollo neuronal (Ramírez Rodríguez, 2014).

Entre los factores internos reguladores de la neurogénesis, también podemos encontrar que la edad del individuo es uno de los factores más importantes en la regulación de la neurogénesis en el cerebro adulto. Los antecedentes muestran que el número de células positivas a BrdU disminuyen en el giro dentado conforme las ratas envejecen e incluso se ha visto en primates, no obstante, esta disminución no se ha observado en la zona subventricular de ratas viejas (Kuhn et al., 1996).

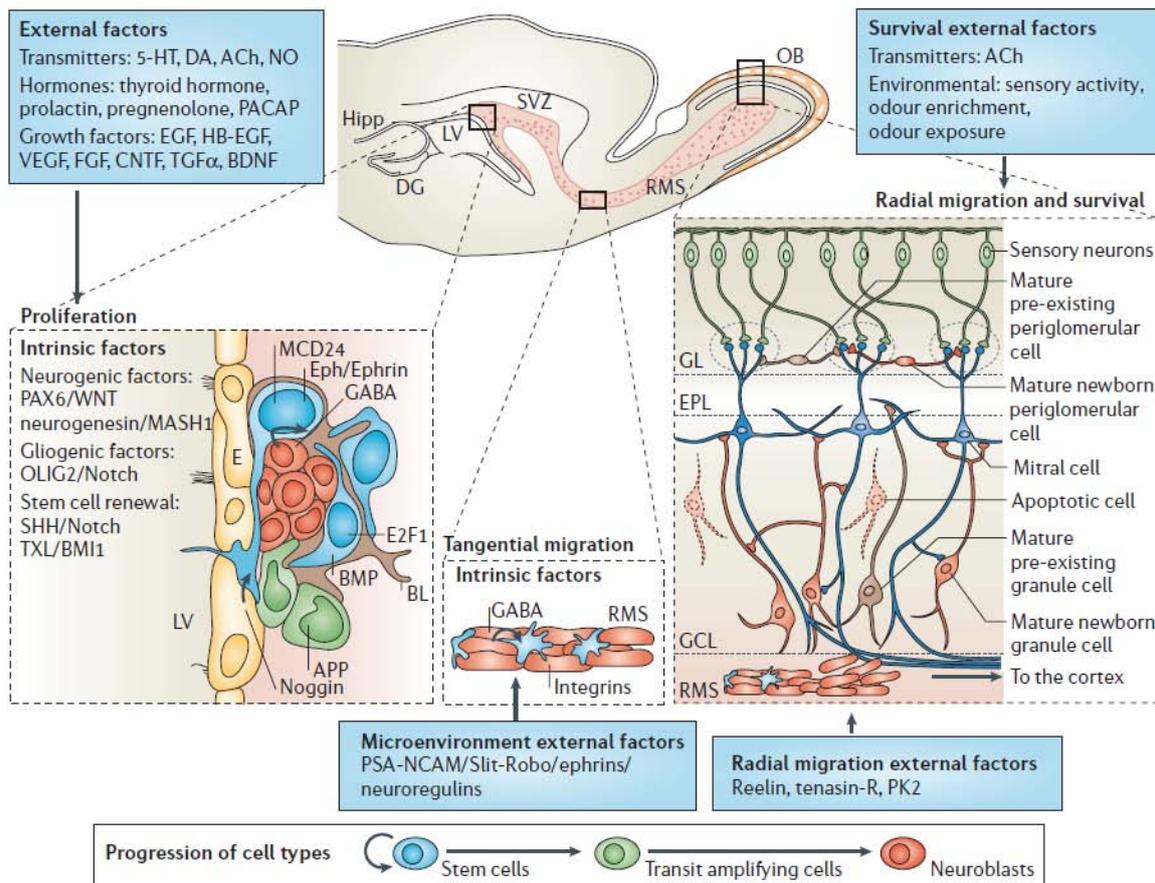


Figura 4: Factores internos reguladores de la neurogénesis adulta en la zona subventricular. Varios factores intrínsecos expresados por las células madre y progenitoras son reguladores de las tasas de proliferación y destino celular de las células recién generadas (Tomado de Pierre Lledo, Mariana Alonso and S. Grubb, 2006).

### Factores externos

La neurogénesis como un proceso dinámico, depende de la variabilidad de la tasa neurogénica y de los estímulos externos del ambiente. Un ejemplo de esto es la actividad física que promueve la sobrevivencia de las nuevas neuronas en el giro dentado, el cual, se encuentra ampliamente vinculado con la memoria espacial (Van Praag et al., 1999). Igualmente, los animales que viven en un ambiente enriquecido presentan un incremento en la neurogénesis de la capa subgranular del giro dentado (Kempermann et al., 1997).

Por último, el estrés y la falta de sueño reducen la proliferación celular (Mirescu, 2006); el aislamiento social, la posición social, el consumo de alcohol y las malas experiencias durante las primeras etapas de la vida, como la privación del contacto materno o el estrés postnatal, disminuyen la formación de nuevas neuronas. De igual manera, las alteraciones en el eje hipotálamo hipófisis suprarrenal, inducidas por situaciones persistentes de estrés durante el desarrollo, disminuyen la generación de nuevas células en el giro dentado (Lenington JB, 2003).

A menudo, el sistema nervioso es afectado por anomalías hereditarias o del desarrollo, por procesos patológicos y por traumatismos. La prevención, diagnóstico y tratamiento de los trastornos neurológicos son, por lo tanto, de inmensa importancia socioeconómica.

### **3.5. Ansiedad y Neurogénesis**

Un paso importante en la elaboración inicial de la clasificación moderna de las enfermedades mentales fue establecer la diferencia entre la alteración de las facultades cognitivas denominadas como trastorno del pensamiento y la alteración de la emoción o un trastorno de estado de ánimo. En las referencias clínicas de los estados emocionales el término de “estado de ánimo” hace referencia a un estado emocional mantenido durante semanas o un periodo de tiempo relativamente largo, mientras que el término clínico para “afecto o respuesta afectiva” hacen referencia a un estado emocional inmediato o transitorio de una persona. La respuesta afectiva responde directamente a estímulos externos.

Las respuestas afectivas cumplen importantes funciones biológicas y pueden ir desde, la euforia, alegría, placer, sorpresa, ira, ansiedad, desilusión, tristeza, pena e incluso depresión. Algunas de estas respuestas afectivas como la euforia, depresión y la ansiedad pueden llegar a ser tan alteradas, constantes y dominantes que terminan convirtiéndose en una enfermedad.

La ansiedad es una respuesta normal a una situación que supone una amenaza. Las amenazas percibidas que generan ansiedad pueden ser activas y directas o indirectas; por otro lado la ansiedad es adaptativa, ya que, indica un peligro potencial y puede contribuir a dominar una situación difícil. Por otra parte la ansiedad excesiva, no es adaptativa, ya sea porque es demasiado intensa o bien por ser provocada de manera inadecuada por acontecimientos que no presentan un peligro real, por lo tanto, la ansiedad, es patológica cuando es excesiva o persistente, o cuando ya no indica un peligro (Kandel R., 2001).

Una manifestación de trastorno de ansiedad, conlleva un aumento del temor acompañado de manifestaciones subjetivas y objetivas. Las manifestaciones subjetivas van desde un alto grado de alerta a un miedo intenso a un desastre o la muerte inminente. Las manifestaciones objetivas son aceleraciones de la frecuencia cardíaca, conducta de evitación y signos de inquietud, exageración de las respuestas, palpitaciones, temblor, sudor, aumento de la tensión arterial, sequedad de boca y deseo de escapar (Kandel R., 2001).

Los trastornos de ansiedad son los trastornos psiquiátricos más frecuentes, ya que afectan al 10-30% de la población en general. Según las características clínicas y la respuesta a los psicofármacos, los trastornos de ansiedad se pueden subdividir en varios tipos:

- Trastorno de angustia

Las crisis de angustia son breves episodios inesperados y recurrentes llenos de terror sin una clara causa identificable. Cuando las crisis de angustia se repiten, el síndrome resultante se denomina trastorno de angustia. Una proporción significativa de personas con trastornos de angustia tienen predisposición genética. La mitad de los pacientes con crisis de angustia padecen también depresión, un hallazgo que ha llevado a sugerir que la crisis de angustia puede ser una variante de la enfermedad depresiva o un precursor de ella.

- Trastorno por estrés postraumático

El trastorno por estrés pos-traumático se produce después de un acontecimiento muy estresante. Se manifiesta por episodios recurrentes de miedo, normalmente desencadenados por los recuerdos del trauma inicial. Se cree que el sistema noradrenérgico por estímulos reactivadores durante la acción traumática, permite que el recuerdo de la experiencia traumática permanezca fijo durante largos periodos de tiempo y se reactiva con facilidad por diversos estímulos y factores estresantes.

- Trastorno de ansiedad generalizada

El síntoma fundamental del trastorno de ansiedad generalizada es un miedo excesivo y poco realista. El trastorno se produce a veces después de un episodio de depresión.

- Trastorno obsesivo-compulsivo

Son trastornos crónicos con obsesiones y compulsiones recurrentes. Se cree que los síntomas del trastorno obsesivo compulsivo representan la parte externa de un espectro continuo de conductas, e incluso una persona con este trastorno puede presentar también otras enfermedades mentales, como depresión, otros trastornos de ansiedad o fobias sociales.

En el área de las neurociencias se han propuesto desde modelos de tipo neuroquímico hasta modelos de tipo genético para dar una explicación al trastorno de ansiedad y sus variantes.

Un modelo basado en modificaciones de distintos sistemas de neurotransmisión que explican el fenómeno de ansiedad, involucra al neurotransmisor noradrenalina proveniente del núcleo locus coeruleus. La estimulación eléctrica o química con yohimbina (antagonista noradrenérgico) en el núcleo coeruleus, el cual presenta neuronas noradrenérgicas produce ataques de pánico. Clínicamente estos ataques de pánico son tratados con drogas que alteran el sistema noradrenérgico como antidepresivos tricíclicos o inhibidores de la monoaminooxidasa (Goddard & Charney, 1997).

Un segundo modelo involucra al neurotransmisor ácido-gama amino butírico (GABA); asumiendo que en la ansiedad el funcionamiento del receptor está alterado (Clement & Chapoutier, 1998; Nutt & Maliza, 2001).

El tercer modelo estudia la participación del neurotransmisor serotonina. En donde la ansiedad ha sido relacionada con aumento en la actividad serotoninérgica, demostrándose tanto en humanos como en ratones que los antagonistas serotoninérgicos tienen efectos ansiolíticos, no obstante, los efectos parecen ser dependientes de la afinidad a los diferentes subtipos de receptores serotoninérgicos (Graeff & Deakin, 1996).

Por último existe un cuarto modelo donde se ha propuesto que la participación del péptido colecistoquinina y su desregulación en la concentración produce ataques de pánico en los seres humanos a través de una inyección intravenosa de CCK4 y pentagastrina (Abelson, J.L et al., 1990; Bradwejn, J. et al., 1990) La evidencia de la participación de CCK en la ansiedad y/o miedo en roedores refuerza la hipótesis de que CCK desempeña un papel en la neurobiología de estos trastornos (Dauge & Lena, 1998).

### **3.6. Eje hipotálamo pituitario adrenal**

De acuerdo con lo sugerido por varios autores, la activación anormal del eje hipotálamo pituitario adrenal (HPA) ha sido implicada como una característica notable de los trastornos de ansiedad.

Los glucocorticoides principalmente el cortisol en los humanos y la corticosterona en los roedores son hormonas esteroides reguladoras de múltiples procesos fisiológicos, tanto en el cerebro como en el resto del organismo. Su secreción esta mediada por el eje (HPA), que es activado por el estrés a través de la hormona liberadora de corticotropina (CRF) en neuronas parvocelulares del núcleo paraventricular (PVN) del hipotálamo.

La hormona liberadora de corticotropina induce en la glándula pituitaria liberación de corticotropina a la sangre, que a su vez, en respuesta la glándula adrenal libere glucocorticoides. Sin embargo, los niveles de glucocorticoides se regularan por un mecanismo de retroalimentación negativa, mediada por receptores de glucocorticoides tanto en el núcleo paraventricular como en la pituitaria (Figura 5).

De esta manera la ansiedad y la depresión, podrían vincularse por medio de alteraciones constantes en la actividad del eje HPA. Por ejemplo, la activación del receptor tipo 1 en el PVN es responsable de la respuesta de huida o lucha, y en los corticotropos de la liberación de ACTH. El receptor de tipo 2, es el responsable de la respuesta adaptativa y recuperación a la situación de estrés. El aumento agudo en los niveles de cortisol activa un tipo de receptores de cortisol en la pituitaria e hipotálamo y de esta manera disminuye la liberación de ACTH y consecuentemente de cortisol. Ante situaciones de alto estrés, o de estrés crónico, se activa otro tipo de receptores de cortisol en el cerebro de los glucocorticoides, GR, estos receptores son los que estarían alterados en pacientes con depresión.

El receptor GR al tener menor afinidad, requiere una mayor concentración para su efecto, por lo cual se propone que el GR estaría involucrado en la respuesta de adaptación al estrés, cuando los niveles de glucocorticoides son mayores. (Cassano P. & Argibay P., 2010).

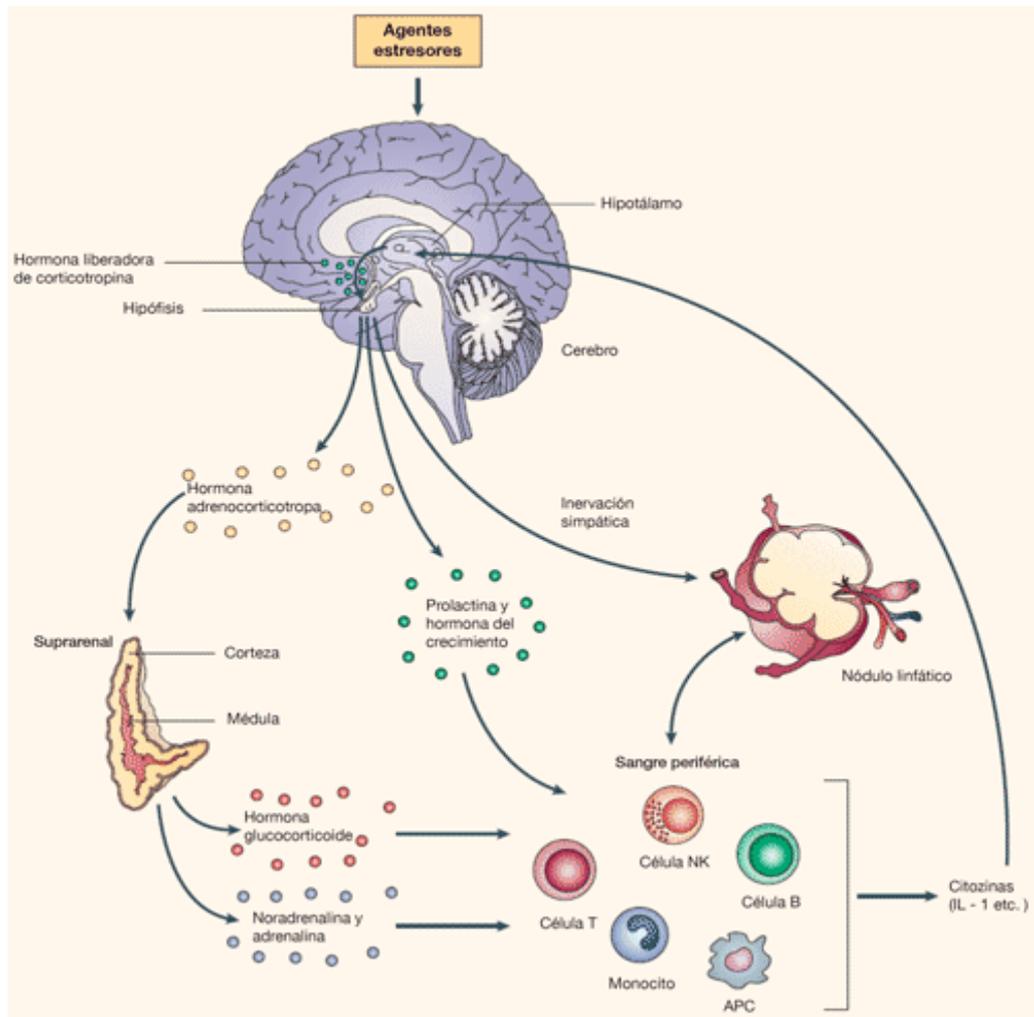


Figura 5: Esquema del eje hipotálamo pituitaria adrenal; la liberación de la hormona liberadora de corticotropina (CRF) por parte del hipotálamo estimula la liberación de ACTH (hormona adrenocorticotropa) por la hipófisis anterior, lo que estimula la liberación de cortisol por la glándula suprarrenal (Tomado de Glaser y Kiecolt-Glaser, 2005).

### **3.7. Modelo de ansiedad**

Existe una gran diversidad de modelos animales y conductuales para el estudio de la ansiedad, sin embargo en el presente estudio solo nos enfocaremos en uno.

El laberinto en cruz elevado, modelo que se basa en el miedo que tienen los roedores a los espacios abiertos y surge a partir de la idea de Montgomery en 1955 de un laberinto en Y con brazos abiertos y cerrados. En 1984 Handley y Mithani propusieron el laberinto en forma de X, que consistía en dos brazos cerrados y dos brazos abiertos conectados por una plataforma central, que se mantenían elevados del suelo, siendo válido para ratones y ratas. Su fundamento se basa en la actividad exploratoria y se miden diferentes parámetros, como el número de entradas en los brazos abiertos y cerrados, el tiempo de permanencia en brazos abiertos y cerrados y el número total de entradas que indican índices de diferentes componentes como ansiedad y actividad motora, entre otros.

Este modelo de ansiedad tan popular basado en la aversión natural que tienen los roedores a los espacios abiertos, ha sido acoplado a roedores expuestos a un ambiente enriquecido, mostrando una disminución de las conductas relacionadas con la ansiedad cuando a los ratones se les administra fármacos antidepresivos (Albrechet-Souza, et al., 2009).

### **3.8. Enriquecimiento ambiental**

La importancia del medio ambiente en la regulación del cerebro, el comportamiento y la fisiología, han sido reconocidos desde hace mucho tiempo en las ciencias sociales y biológicas. Desde los años 90 hasta la actualidad, se ha evaluado la capacidad del enriquecimiento ambiental y de la actividad física, sobre la neurogénesis del hipocampo adulto para generar o reforzar procesos de neuroplasticidad o efectos antagonistas de la degeneración neuronal.

El enriquecimiento ambiental se describe como un modelo en el que, mediante las condiciones de alojamiento, se facilita la estimulación sensorial, cognitiva y motora de los animales, en comparación a condiciones estándar de alojamiento; los animales con ambiente enriquecido son mantenidos en cajas grandes y en un grupo numeroso para dar oportunidad de mantener interacción social. El ambiente incluye objetos como juguetes y túneles que pueden variar en composición, forma, tamaño, textura y color. De manera adicional se les ofrece la oportunidad a los animales de poder realizar actividad física mediante ruedas para ejercicio voluntario (Nithianantharajah, 2006; Laviola G et al, 2008).

Donald Hebb realizó el primer reporte de la importancia del enriquecimiento en animales de laboratorio, el cual observó que aquellas ratas que él tenía como mascota y que exploraban libremente su casa rendían mejor en pruebas habilidades como resoluciones de problemas y aprendizaje en comparación con las ratas que permanecían en el laboratorio (Hebb HO, 1947). A partir de ese momento, hasta la fecha, se ha descrito que un desarrollo del individuo carente de estímulos

apropiados puede tener graves consecuencias sobre la maduración neuronal y producir problemas en el desarrollo cognitivo y emocional (Larsson et al., 2002).

Algunos autores, demostraron que la estimulación ambiental produce una serie de respuestas en el cerebro adulto, que pueden ir desde parámetros bioquímicos a un aumento en la complejidad dendrítica incluyendo un incremento en la ramificación y longitud dendrítica del hipocampo adulto de roedores, el número de espinas dendríticas y el tamaño de sinapsis en algunas poblaciones neuronales, así mismo, se ha visto un efecto sobre la neurogénesis hipocámpal y la integración de estas nuevas neuronas en circuitos funcionales (Van Praag & Kempermann, 2000).

Mientras Kempermann en el 2000 reporta que la exposición a un ambiente enriquecido aumenta la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y el factor neurotrófico derivado de las células gliales (GDNF), además de incrementar la expresión del gen para el receptor de serotonina 5-HT<sub>1a</sub> y aumentar los niveles de acetilcolina, así como la actividad del sistema opioide; Nithianantharajah en el 2006 revisa que el enriquecimiento ambiental induce alteraciones en la expresión de subunidades de los receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) y AMPA (ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico), los cuales son responsables de la transmisión glutamatérgica. (Kempermann, 2000; Nithianantharajah et al., 2006)

Karl Fernandes y colaboradores expusieron la veracidad del beneficio del enriquecimiento en animales con estrés, esto se logró mediante un entorno multifactorial de los considerados actuales variables clave de un ambiente enriquecido, los cuales, según Fernandes son el ejercicio voluntario, la interacción social que consiste en colocar a un grupo de ratones en la misma caja y la complejidad ambiental donde los ratones eran estimulados con túneles que fueron girados en dirección opuesta cada determinado tiempo, los resultados obtenidos como era de esperarse es que el ejercicio voluntario es el principal estímulo neurogénico dentro de un ambiente enriquecido; el complejo ambiental redujo los niveles de estrés que fueron asociados al nivel de corticosterona en el plasma y finalmente los resultados de la interacción social indicaron que existe la posibilidad de que sea una especie de amortiguador contra el estrés y disminuyan los niveles de corticosterona, por el contrario del aislamiento social que tuvo un impacto negativo en el desarrollo del cerebro y su correcta función (Karl Fernandes et al. 2014).

Por otro lado, se ha documentado que el enriquecimiento ambiental reduce el temor, esto al comprobarse la reducción de los bolos fecales en las pruebas conductuales de campo abierto y por el número de entradas en los brazos abiertos en el laberinto elevado en cruz (Benaroya et al, 2004); así mismo, los animales alojados en un ambiente enriquecido desempeñan de mejor manera, tareas dependientes del hipocampo (Olson AK. et al, 2006); mientras que el ejercicio se ha asociado con una amplia gama de beneficios para la salud y un considerable incremento en la neurogénesis del hipocampo adulto en ratones adulto ya que se ha demostrado que aumenta la proliferación de las células precursoras neuronales, así como intensificar el número y porcentaje de nuevas células que llegan a neuronas maduras, además de un mejor desarrollo en la cognición (Van Praag et al, 1999; Van der Borght et al, 2007), disminuye los síntomas de las enfermedades

neurodegenerativas y ayuda en la recuperación de algunos trastornos del estado de ánimo así como la depresión entre otros (Duman et al, 2008; Blumenthal et al, 1999; Kronenberg et al, 2003).

La estimulación temprana por un ambiente enriquecido induce cambios en el comportamiento, sin embargo los efectos del enriquecimiento sobre las emociones, aun no están bien descritos. No obstante un estudio de Roy V. y colaboradores en el 2001, demostraron que los ratones en un ambiente enriquecido respondían mejor ante un estado ansiogénico de la prueba de laberinto en cruz elevado explorando con mayor rapidez y mayor tiempo en los brazos abiertos y en la prueba de exploración libre entrando a campo abierto con mayor velocidad que aquellos ratones alojados en condiciones estándar, concluyendo así, que la disminución de las respuestas emocionales en pruebas ansiolíticas clásicas, posiblemente podrían explicarse por una reducción de la neofobia, es decir, un aumento en la motivación del ratón a explorar y no necesariamente por una disminución en sus respuestas emocionales (Roy V. et al., 2001).

### **3.9. Marcadores para analizar la neurogénesis**

#### **Ki-67**

Proteína nuclear, expresada en células en división celular y presentada solo durante el proceso mitótico. A diferencia de BrdU, ki-67 es un marcador endógeno que no tiene ningún efecto negativo sobre la célula. Aunque la función de ki-67 no se conoce muy bien todavía, se sabe que es un marcador fiable, ya que se expresa, aunque en diferentes niveles, durante las fases G1, S, G2 y en la mitosis con vida media muy corta. Estudios de Scholzen y Gerdes en el 2002, confirmaron que ki-67 es expresada en mamíferos roedores y humanos (Scholzen & Gerdes, 2000).

#### **BrdU**

La 5-bromo-2-desoxiuridina, ha sido empleada por algún tiempo como un marcador en las células en fase de síntesis de ADN para los estudios de la neurogénesis adulta. BrdU garantiza un marcaje específico, combinando la alta sensibilidad de la microscopia de fluorescencia y la microscopia confocal ha llevado a que el marcaje de BrdU sea un método muy popular. Para los estudios de ciclo celular en los que se utiliza el marcaje con BrdU in vivo, la selección de la dosis de BrdU y del tiempo de exposición a la misma es importante y estará condicionada en gran medida por el tipo de técnica que se vaya a utilizar para la detección de la BrdU.

## Doblecortina (DCX)

La doblecortina es una proteína específica de neuronas según Rao y Shetty en el 2004. Esta proteína se expresa en cuerpos celulares y en los procesos de células que están migrando, desde migración radial como tangencial, e incluso en células en procesos de diferenciación temprana. Su expresión comienza desde la generación de neuroblastos, alcanzando su punto máximo de expresión alrededor de la segunda semana de la generación de la nueva célula, finalmente su expresión va en decaimiento hasta perderse totalmente a los dos meses (Brown et al., 2003).

## Arc

La proteína asociada al citoesqueleto es regulada por la actividad sináptica. Se expresa en respuesta a actividad sináptica de neuronas de estructuras cerebrales como lo es la amígdala, corteza, cuerpo estriado e hipocampo; esta expresión se correlaciona de manera temporal y espacial con el estímulo que induce la expresión de su mRNA (Guzowski et al., 2002). La transcripción del mRNA ocurre en el núcleo, el cual es posteriormente transportado como ribonucleoproteína hacia las dendritas para su traducción. La traducción de esta proteína no ocurre en todas las dendritas, solo en la región del árbol dendrítico donde se genera la sinapsis que estimula su transcripción.

## NeuN

Es una proteína nuclear soluble, específica de neuronas posmitóticas que se localizan en el núcleo y el citoplasma rodeando al núcleo y en ocasiones se puede localizar en las neuritas. Su expresión se da en la mayoría de las neuronas del sistema nervioso, con excepción de las células mitrales del bulbo olfatorio, células no neuronales y células de Purkinje (Mullen, Buck et al., 1992; Cooper-kuhn et al. 2002). En la neurogénesis adulta del giro dentado del hipocampo, NeuN ha permitido la identificación de todas las neuronas posmitóticas y neuronas maduras.

#### **4. Justificación**

La ansiedad como un trastorno psiquiátrico agravante y de alta prevalencia afecta aproximadamente al 30% de la población incapacitándola social y personalmente.

Por otro lado, se ha sugerido que la creación de neuronas lleva a la formación de una reserva llamada neurogénica que permite la adaptación a situaciones novedosas y complejas. De tal modo que existen diversos reguladores de esta reserva entre los que se encuentra al ambiente estimulador complejo, también conocido como ambiente enriquecido. Este modelo reduce el temor y promueve un mejor desempeño en tareas dependientes de hipocampo, al menos en roedores.

Sin embargo, a la fecha no se conocen los efectos de diferentes grados de complejidad del ambiente enriquecido sobre la generación de neuronas, ni el impacto de este para modular la ansiedad en un modelo animal expuesto a un agente ansiogénico.

Por lo que en este trabajo estudiamos los efectos de diferentes grados de complejidad del ambiente enriquecido como medida preventiva para desarrollar conductas relacionadas con la ansiedad y su relación con la neurogénesis hipocámpica.

#### **Hipótesis**

La exposición de los animales a diferentes niveles de complejidad en un ambiente enriquecido inducirá la disminución de la ansiedad evaluada en la prueba conductual de laberinto en cruz elevado, que a su vez se podrá observar en los cambios del proceso neurogénico evaluados con marcadores moleculares.

#### **Objetivo General**

Evaluar el efecto de la complejidad y novedad del enriquecimiento ambiental sobre la neurogénesis del hipocampo de ratones machos adultos de la cepa BALB/c y su relación con la ansiedad.

#### **Objetivos Particulares**

- 1) Estudiar si existen diferencias en la neurogénesis en los diversos grupos expuestos a diferentes grados de complejidad de enriquecimiento ambiental que corresponden al grupo Control, Grupo ENRCTE, grupo ACTE, grupo AD y el grupo CTED en ratones machos adultos de la cepa BALB/c, basándonos en marcadores vinculados con la neurogénesis.
- 2) Estudiar si el aumento de la complejidad y novedad en el enriquecimiento ambiental induce un cambio de tipo ansiolítico durante la prueba conductual de laberinto en cruz en los ratones macho adultos.

## **5. Material y Métodos**

### **5.1. Diseño Experimental**

Se utilizaron 60 ratones de la cepa BALB/c macho, de 18-22 gramos de peso, aproximadamente de 5 semanas de edad para llevar a cabo el experimento con una duración de 46 días; los animales se dividieron al azar en 5 grupos de exposición con una  $n$  de 12 individuos por grupo. Los animales se mantuvieron en una habitación con temperatura controlada y ciclos alternativos de 12 hrs de luz y 12 hrs de oscuridad.

El período experimental tiene una duración de 46 días, durante el cual se programó el aumento, ó, la disminución en la novedad y complejidad del ambiente enriquecido, de acuerdo con los diferentes grupos experimentales. El grupo control fue alojado en condiciones estándar. Del día 22 al 26 del periodo experimental, se aplicó un pulso diario de 50 mg/kg de BrdU a cada animal por vía intraperitoneal.

El día 45 del experimento se procedió a realizar la prueba conductual de laberinto en cruz elevado.

### **5.2 Marcaje permanente con BrdU**

La aplicación de BrdU, se hizo con la finalidad de marcar a las células que se encontraban en la fase de síntesis, ya que, su analogía con la timidina permite una substitución de éstos nucleótidos de timidina en el ácido desoxirribonucleico.

En este trabajo se realizó un marcaje acumulativo con BrdU durante cinco días para marcar una mayor población de células en fase de síntesis. Considerando que la vida media de la BrdU es menor a 2 horas y que una cohorte de células marcadas por una sola administración de BrdU puede transmitir al análogo hasta su tercera generación de células (la BrdU se va diluyendo a lo largo de la división celular (Kempermann, 2004)) entonces podemos evaluar a las células de nueva generación que supervivieron hasta el día 46.

### **5.3 Grupos experimentales**

Los animales se dividieron en los siguientes grupos: Grupo control, Grupo ENRCTE (Enriquecimiento ambiental constante), Grupo ACTE (Aumento en el enriquecimiento y permanece constante), Grupo AD (Aumento en el enriquecimiento y disminución del mismo), Grupo CTED (Ambiente enriquecido constante y su disminución gradual).

*Grupo Control:* Ratones macho alojados en condiciones estándar en una caja media (37x27.2x15.7 cm) con la base cubierta con una cama de aserrín, durante todo el periodo experimental. Un día antes del término del experimento, se llevó a cabo la prueba conductual de laberinto en cruz elevado.

**A**



**B**

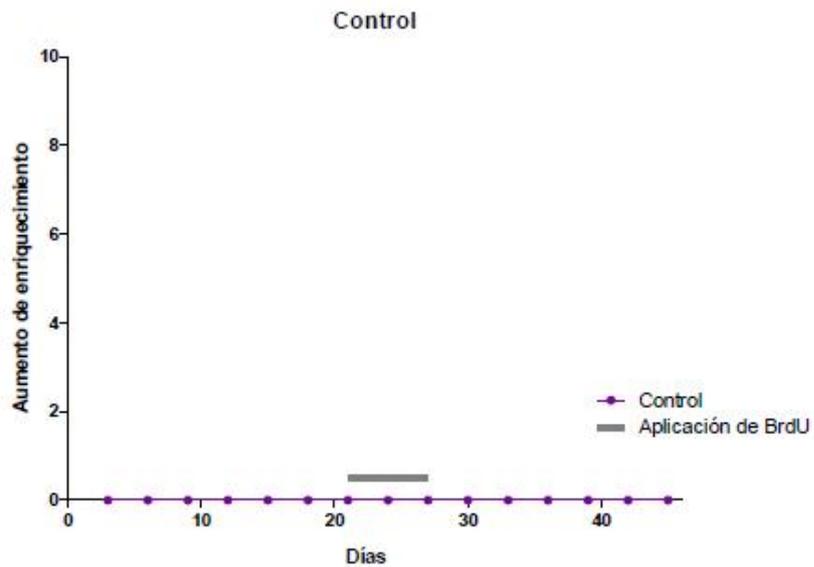


Figura 6: A) Fotografías representativas de los diferentes días de los ratones en condiciones estándar. B) Representación grafica del grupo control en los diferentes estadios de la complejidad ambiental.

*Grupo Enriquecimiento ambiental constante (ENRCTE):* Los ratones macho fueron alojados en una caja grande (43.5x30.5x20 cm), cubierta con una cama de aserrín; desde el primer día del periodo experimental los ratones fueron expuestos a juguetes tal como, túneles, resbaladillas, bolas de papel para roer y una rueda para ejercitarse durante los 46 días, estos juguetes se orientaban en diferente dirección cada 3 días para evitar habituación e introducir novedad.

**A**



**B**

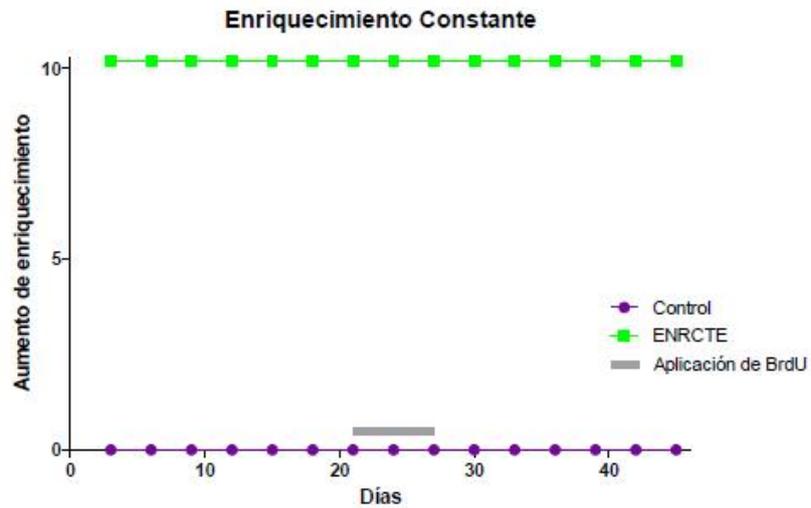


Figura 7: A) Fotografías representativas del grupo enriquecimiento constante. B) Representación grafica del grupo enriquecimiento constante a lo largo del diseño.

*Grupo Aumento de enriquecimiento y permanencia constante (ACTE):* Los ratones macho permanecieron alojados en cajas grandes (43.5x30.5x20 cm) con una cama de aserrín. El enriquecimiento consistió en túneles, resbaladillas, bolas de papel para roer e igualmente una rueda para ejercitarse durante los 46 días. En el caso de este grupo experimental, cada tercer día, la complejidad del enriquecimiento ambiental iba en aumento, colocando los juguetes más simples al inicio y finalizando con los juguetes más complejos hasta el día 22 del periodo experimental, donde, a partir de ese momento el enriquecimiento permaneció constante y solo se orientaban en diferente dirección cada 3 días para evitar habituación e introducir novedad, la rueda permaneció todo el tiempo. La prueba conductual se realizó un día antes del sacrificio.

A



B

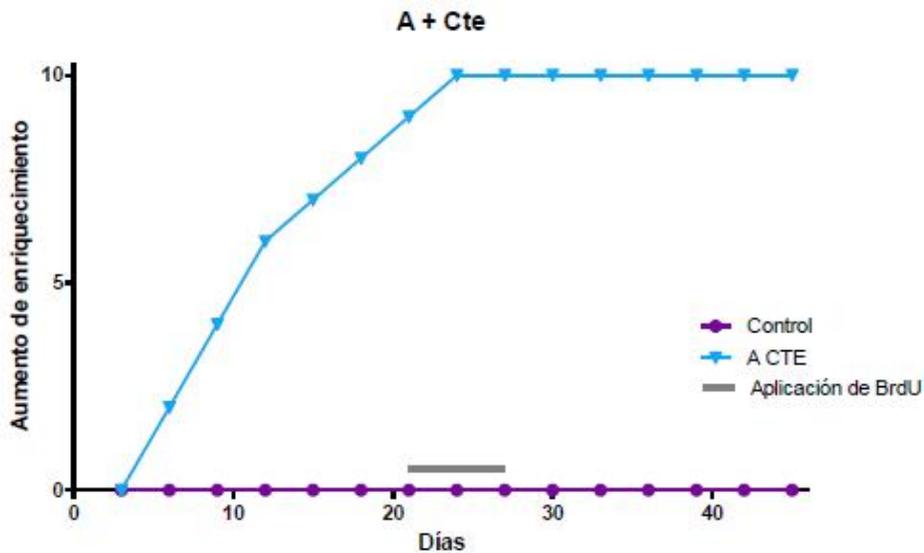


Figura 8: A) Representación fotográfica de la exposición al aumento de complejidad ambiental en el grupo ACTE. B) Grafica representativa del grupo ACTE a lo largo del diseño experimental.

*Grupo Aumento en el enriquecimiento y disminución del mismo (AD):* En este grupo experimental los ratones fueron alojados en cajas grandes (43.5x30.5x20 cm) con una cama de aserrín, El enriquecimiento consistió en los mismos juguetes que los grupos anteriores, la diferencia radica en que, los juguetes fueron añadiéndose cada tercer día, de los más simples hasta los juguetes más complejos; asimismo tres días después del día 22, inició la disminución de la complejidad del enriquecimiento ambiental, es decir, cada tercer día se retiraba un juguete hasta eliminar todos y así llevar a cabo la prueba conductual un día antes del sacrificio.

**A**



**B**

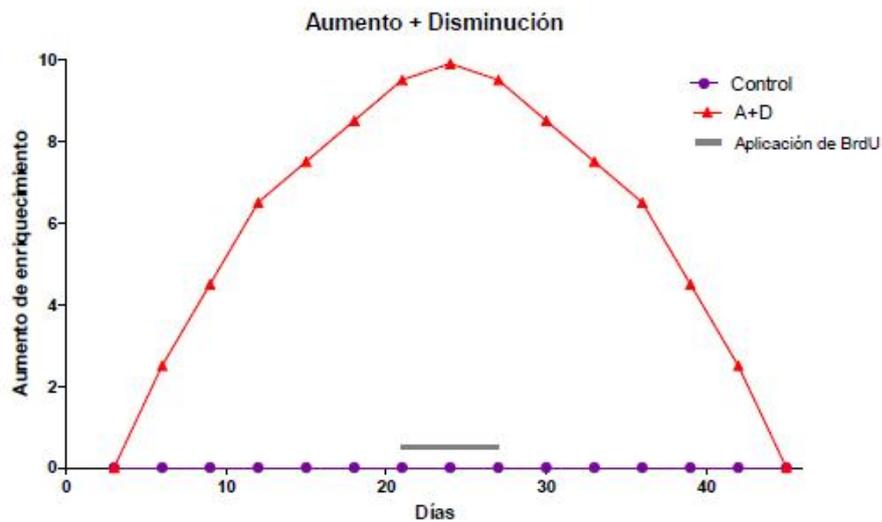


Figura 9: A) Fotografías representativas del grupo AD en los diferentes grados de enriquecimiento.  
B) Representación grafica de la planeación del grupo AD a lo largo del diseño experimental.

*Grupo enriquecimiento constante y su disminución gradual (CTED):* Los ratones macho fueron alojados en cajas grandes (43.5x30.5x20 cm), de igual manera, el enriquecimiento fue basado en los mismos instrumentos de actividad que los grupos anteriores, el cambio consistió en lo siguiente: El primer día del inicio del experimento se les colocaron todos los juguetes desde los más sencillos, hasta los más complejos y cada tercer día se cambiaba la dirección de los juguetes para evitar habituación e incluir novedad; Al día 22, dio inicio a la disminución gradual del enriquecimiento ambiental, cada tercer día se les resto un juguete hasta llegar a cero para el día 45 del periodo experimental. La prueba conductual se ejecuto a partir del día 45.

**A**



**B**

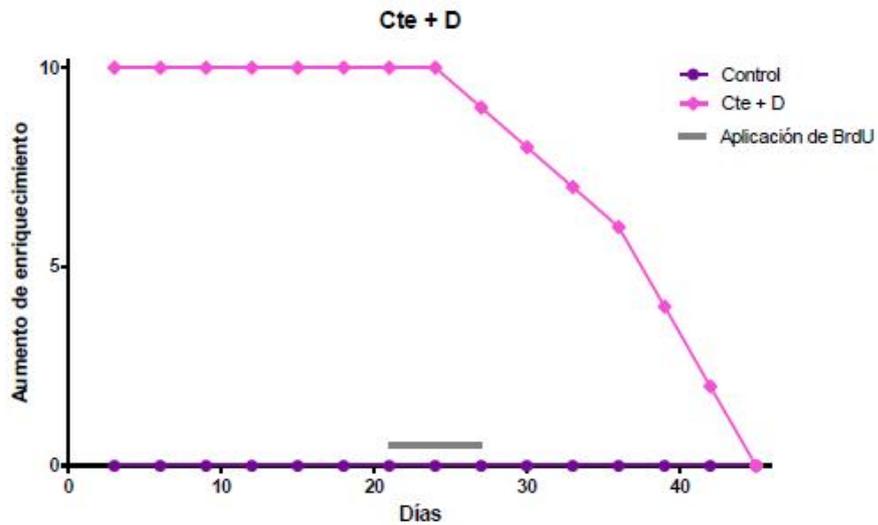


Figura 10: A) Fotografías representativas del grupo CTED en los diferentes grados de enriquecimiento. B) Planeación grafica del grupo CTED a lo largo del periodo experimental.

### Diseño experimental

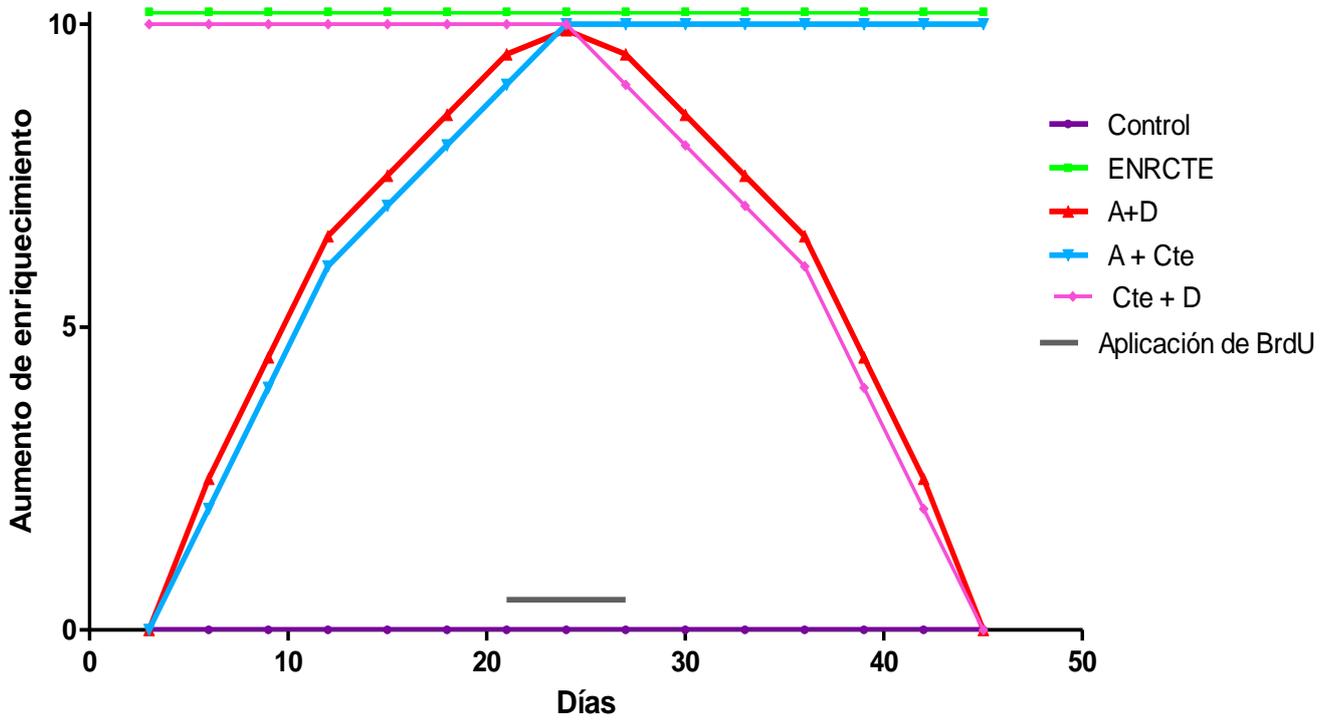


Figura 11. Línea de tiempo del experimento; se muestran todos los grupos con su correspondiente nivel de complejidad de enriquecimiento, así como su duración. Aplicación de inyección de BrdU en los días 21 al 25.

## 5.4 Prueba conductual

### Laberinto en Cruz Elevado

El laberinto en cruz elevado, está conformado por dos brazos abiertos colocados uno al frente del otro de 50 cm de largo x 10 cm de ancho, sin paredes laterales ni techo conectados por un centro con los otros dos brazos cerrados con paredes laterales lisas y sin techo de 50 cm de largo y 10cm de ancho, elevado 50 cm del suelo.



Figura 12. Laberinto en cruz elevado.

Los ratones fueron colocados en el centro del laberinto, con orientación de la cabeza del ratón hacia algún brazo abierto, y se tomaron 5 minutos para la medición de la ansiedad, mediante una cámara de video. La ansiedad se midió a partir de la frecuencia y la duración de las siguientes series de conducta que los ratones manifestaron:

- Frecuencia de entrada en los brazos abiertos: Número de veces que el animal coloca sus cuatro patas en alguno de los brazos abiertos del laberinto en cruz elevado.
- Tiempo de permanencia en los brazos abiertos: Tiempo durante el cual, el animal permanece con sus cuatro patas dentro de alguno de los brazos abiertos del laberinto en cruz elevado.
- Frecuencia de entrada a brazos cerrados: Número de veces que el animal coloca sus cuatro patas en alguno de los brazos cerrados del laberinto en cruz elevado.
- Tiempo de permanencia en brazos cerrados: tiempo durante el cual, el animal permanece con sus cuatro patas dentro de alguno de los brazos cerrados del laberinto en cruz elevado.

Los videos fueron analizados para la cuantificación final de la prueba, con los anteriores parámetros.

## **5.5 Sacrificio y tratamiento del tejido**

Una vez finalizada la estrategia experimental de los grupos anteriores se procedió a realizar la eutanasia, 30 minutos después de haber realizado la prueba conductual de Laberinto en cruz elevado. Los ratones fueron guillotizados para la disección de los cerebros en paraformaldehído al 4%, fijados durante 24 horas y después se transfirió a una solución de sacarosa al 30%.

Los cerebros se cortaron en un micrótopo (Leica, Bensheim) enfriado con hielo seco, en cortes de 40 micras de espesor y almacenados en una solución crioprotectora que contiene 25% de Glicerol y 25% de etilenglicol con un tampón de fosfato.

## **5.6 Inmunohistoquímicas**

Para la detección de inmunotinción en los tejidos, se utilizaron los siguientes marcadores:

Ki-67

Con el fin de poder observar las células que se encuentren en proliferación se realizó un inmunohistoquímica contra Ki-67 marcador presente en el ciclo celular. Los tejidos se trataron por flotación. Los sitios inespecíficos fueron bloqueados mediante suero fetal bovino al 3%, posteriormente se agregó el anticuerpo primario de conejo anti-Ki-67 (1:500) durante toda la noche a 4°C. Se agregó un anticuerpo secundario biotinilado anti conejo (1:250) seguido del kit ABC y para finalizar se realizó una reacción mediante el kit de diaminobenzidina (DAB) y los cortes fueron montados en portaobjetos en un medio con Neomonunt (Ramírez-Rodríguez et al., 2010).

BrdU

Para determinar cuántas células han sobrevivido gracias al efecto del enriquecimiento ambiental se realizó una inmunohistoquímica contra 5' Bromuro Uoxidin3' (BrdU). Los tejidos se trataron por flotación. Estos tejidos se trataron con ácido clorhídrico 2N durante 30 minutos a 37°C, continuamente 20 minutos en buffer de Boratos 0.1M con un pH de 8.5, luego fueron bloqueados con suero fetal bovino al 3%, posteriormente se agregó el anticuerpo rata anti-BrdU (1:300) durante toda la noche a 4°C. Se agregó un anticuerpo secundario biotinilado anti rata (1:250) seguido del kit ABC. Para finalizar se realizó una reacción mediante el kit de diaminobenzidina (DAB) los cortes se montaron en portaobjetos en un medio con Neomonunt (Ramírez-Rodríguez et al., 2010).

## DCX

La inmunohistoquímica contra doble cortina (DCX) se realizó para poder visualizar las células en proceso de diferenciación y ver si las proporciones cambian con respecto al grupo en tratamiento. Los tejidos se trataron por flotación. Llevaron un tratamiento previo con buffer de citratos con un pH de 6.0 durante 2 horas a 50°C. Se bloqueó con suero fetal bovino al 3% y se agregó el anticuerpo primario cabra anti-DCX (1:250; Santa Cruz Biotech USA) durante toda la noche a 4°C. Por último se agregó un anticuerpo secundario biotinilado anti-cabra (1:250;) seguido del kit ABC, finalizando con una reacción mediante el kit de diaminobenzidina (DAB) y los cortes se montaron en portaobjetos en un medio con Neomonunt. (Ramírez-Rodríguez et al., 2010)

## Arc

La inmunohistoquímica de Arc nos permitió visualizar la activación celular. Los tejidos se trataron por flotación, siendo bloqueado mediante suero fetal bovino al 3%, posteriormente se agregó el anticuerpo primario de conejo anti-Arc (1:4000) durante toda la noche a 4°C. Después de los lavados con TBS se agregó un anticuerpo secundario biotinilado anti conejo (1:250) seguido del kit ABC por una hora y para finalizar se realizó una reacción mediante el kit de diaminobenzidina (DAB) y los cortes se montaron en portaobjetos en un medio con Neomonunt (Ocaña & Ramirez et al., 2014)

## 5.7 Inmunofluorescencias

### BrdU/NeuN

Esta inmunofluorescencia cuyo objetivo fue demostrar cuantas células que sobreviven y llegan a ser neuronas maduras se utilizó un doble marcaje para BrdU y NeuN. El tejido fue incubado en HCL 2N por 30 minutos a 37°C y neutralizado con Buffer de Boratos 0.1M a un pH de 8.5 durante 15 minutos. Posteriormente se colocó TBS-Plus con suero fetal bovino al 3% durante 30 minutos. Incubado con anticuerpo monoclonal de rata anti-BrdU (1:100) y anticuerpo monoclonal ratón anti-NeuN (1:100) durante tres días a 4°C. El cuarto día, le fue añadido un anticuerpo fluoresceinado de NeuN (1:500) y se dejó reposar durante una noche a 4°C. Finalmente se procedió con la agregación de anticuerpo secundario donkey anti rat biotinilado para BrdU (1:125) y el anticuerpo anti- ratón para NeuN (1:125) en tritón/ TBS por cuatro horas. Los cortes se montaron en portaobjetos con Aqua Poli Mount (Ramírez-Rodríguez et al., 2010).

BrdU/ Arc

Con el fin de poder observar activación celular durante el proceso de diferenciación se realizó un doble marcaje para BrdU (células sobrevivientes) y Arc (activación celular). Para realizar esta doble tinción el tejido fue incubado en HCL 2N por 30 minutos a 37°C y neutralizado con ácido bórico 0.1M a un pH de 8.5 durante 20 minutos. Posteriormente se incubó con anticuerpo de rata anti-BrdU (1:100) y anticuerpo anti-conejo Arc (1:1000; Santa Cruz) durante tres días a 4°C. Para finalizar, se procedió con la agregación de anticuerpo secundario floreceinado Arc (1:250) y anticuerpo donkey anti rata biotinilado BrdU (1:250) en tritón/ TBS por cuatro horas. Los cortes se montaron en portaobjetos en la oscuridad utilizando Aqua Poli Mount (Gerardo Ramírez ,2010).

### 5.8 Análisis Citológico

Antes de llevar a cabo las inmunotinciones, los cerebros se seccionaron y los cortes fueron colocados en placas de 96 pozos que contenían una solución crioprotectora. Posteriormente se tomaron dos columnas completas de la placa de 96 para realizar las inmunohistoquímica de ki-67, BrdU y DCX. Una vez terminada cada la inmunohistoquímica, los cortes se colocaron sobre portaobjetos de vidrio teniendo aproximadamente entre 6 y 8 cortes en cada uno, en seguida fueron cubiertos con un medio de montaje y un cubreobjetos para realizar la cuantificación final en un microscopio óptico *Leica*. Los portaobjetos fueron rotulados con el número del animal y el grupo experimental al que correspondían.

Para la inmunohistoquímica de Ki67, la cuantificación de las células se realizó de la siguiente manera: se consideraron positivas aquellas células con el marcador Ki-67 que se encontraban entre el hilus y la capa granular del giro dentado del hipocampo, específicamente se cuantificaron las células localizadas en la zona subgranular de cada uno de los cortes de cada individuo.

Para la inmunohistoquímica de BrdU, la cuantificación de las células se realizó de la siguiente manera: se consideraron positivas aquellas células con el marcador BrdU que se encontraban en la capa granular del giro dentado del hipocampo, en cada uno de los cortes de cada individuo.

Para la inmunohistoquímica de DCX, la cuantificación de las células se realizó de la siguiente manera: se consideraron positivas aquellas células con el marcador DCX que se encontraban en la zona subgranular y en la capa granular del giro dentado del hipocampo, en cada uno de los cortes de cada individuo.

Una vez terminada la cuantificación de cada marcador, el número absoluto se calculó multiplicando los totales obtenidos en cada laminilla por 6, considerando que la separación entre las columnas tomadas para realizar la inmunohistoquímica correspondió a ese valor. Lo anterior se realizó con base en estudios previos del laboratorio de Gerd Kempermann (Kempermann et al., 1997)

En cuanto a las inmunofluorescencias de BrdU/NeuN y BrdU/Arc, se tomo una línea completa de la placa de 96 pozos para cada inmunofluorescencia y fue tratada de acuerdo a lo establecido anteriormente, posteriormente en completa oscuridad, los tejidos fueron colocados en un portaobjetos de 6 a 8 cortes y fijados con Aqua Poli Mount para realizar la cuantificación final en un microscopio de fluorescencia *Nikon*.

Para ambas inmunofluorescencias la cuantificación de células positivas para los marcadores se llevo a cabo en la capa granular del giro dentado del hipocampo, una vez contabilizados todos los cortes se llevo a cabo una multiplicación de las células de cada corte por 12 con el fin de cubrir el área total del hipocampo.

### **5.9 Análisis estadístico**

Todos los gráficos y análisis de datos se realizaron utilizando el programa GraphPad Prism 5. Para establecer comparaciones entre los grupos, se analizaron mediante una ANOVA de una y dos vía y posteriormente se aplico la prueba post-hoc de Tukey ó Bonferroni (Media  $\pm$  EE,). El nivel de significación estadística se estableció en  $P \leq 0,05$ .

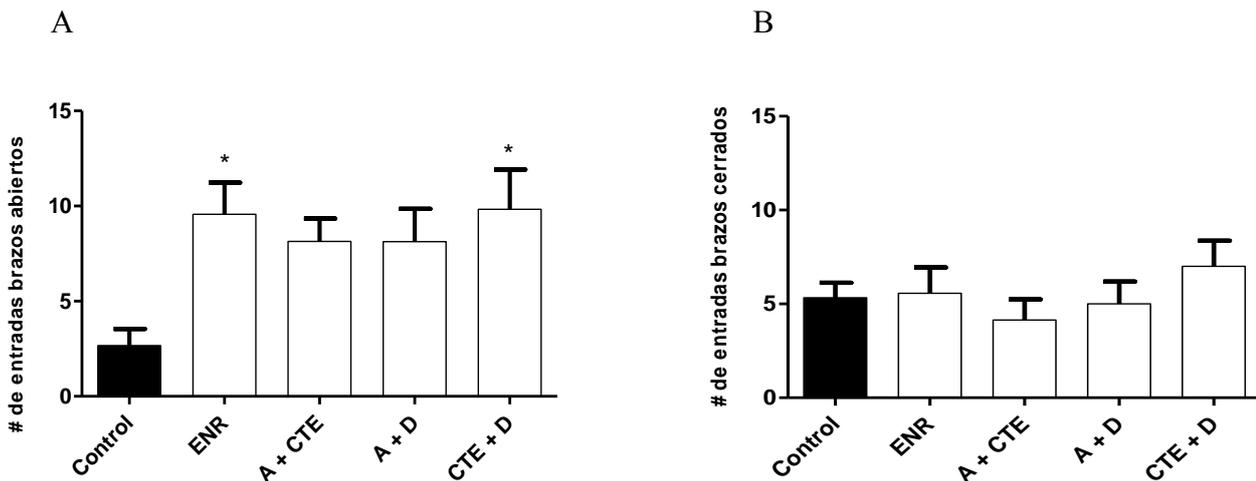
## 6 Resultados

Los efectos de la complejidad del ambiente enriquecido sobre la conducta de ansiedad se estudiaron en el laberinto en cruz elevado.

### 6.1 Laberinto en cruz elevado

Al comparar las conductas de ansiedad de los grupos experimentales con el grupo control, se pudo observar que todos los grupos que fueron alojados en el ambiente enriquecido, independientemente de su complejidad, mostraron un aumento en el número de entradas a los brazos abiertos. Sin embargo, solo se encontró diferencia estadísticamente significativa en los grupos de enriquecimiento constante y enriquecimiento constante y disminución comparados contra control en el número de entradas a brazos abiertos en el laberinto (Fig. 13-A). En cambio en el número de entradas a brazos cerrados en el laberinto no se modificó significativamente con respecto al grupo control. Estos resultados parecen razonables, ya que, los ratones enriquecidos mostraron una conducta de mayor exploración haciendo que estos muchas veces levantaran la cabeza en los brazos abiertos exponiéndose a la luz blanca que según reportes anteriores, aumenta la ansiedad. (Fig. 13-B).

En la figura 13-C se muestra el porcentaje de tiempo exploratorio, sugiriendo la disminución significativa del estado de ansiedad en los ratones expuestos al ambiente enriquecido, invirtiendo sus reacciones neofóbicas durante la exploración. Los resultados obtenidos en esta prueba refuerzan la idea de que el enriquecimiento ambiental tiene respuestas benéficas sobre la ansiedad.



C

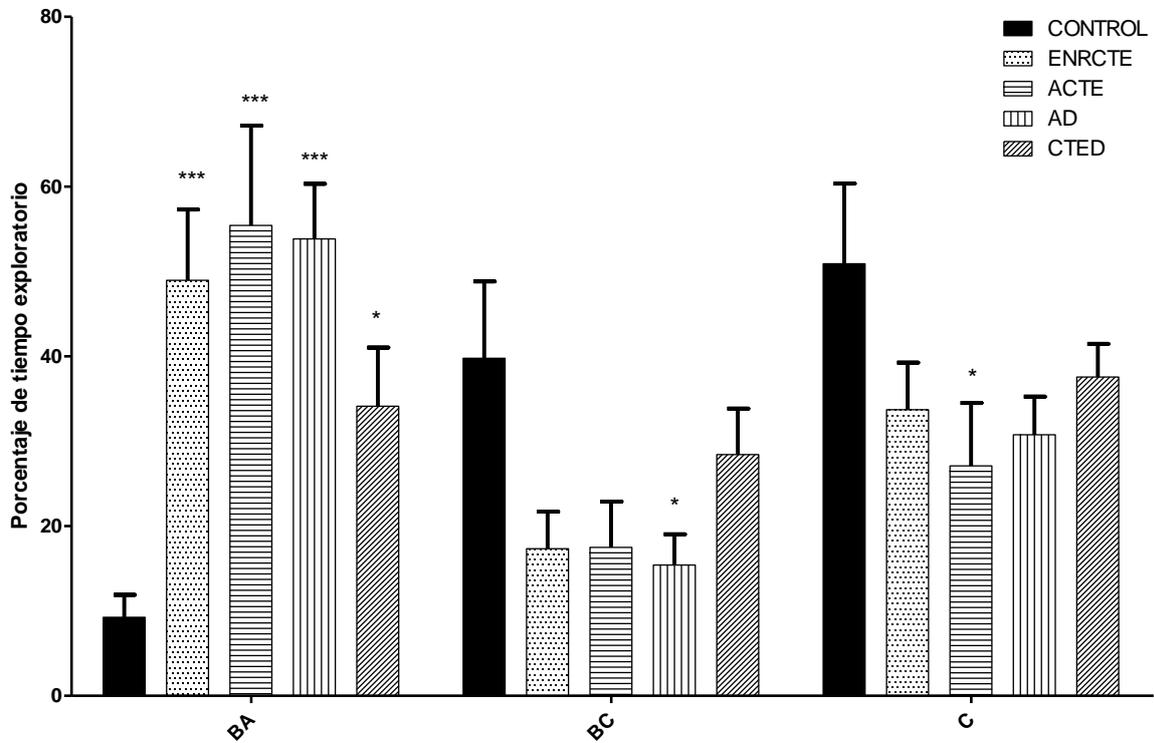
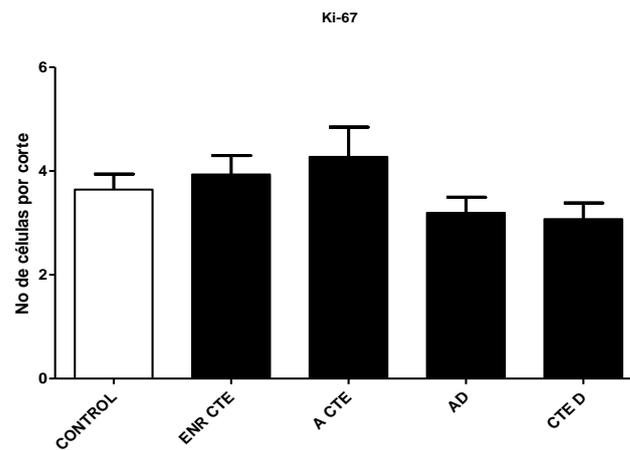


Figura 13. A) Frecuencia de entradas en brazos abiertos (BA), donde se observa una diferencia significativa en el grupo experimental de enriquecimiento constante (ENRCTE) contra control, al igual que el grupo enriquecimiento constante y disminución (CTED) con una diferencia significativa contra control. B) Frecuencia de entrada en brazos cerrados (BC) Para identificar las diferencias en la frecuencia y duración de las conductas de ansiedad entre los grupos experimentales (A y B) se utilizó el análisis de varianza de una vía dándole seguimiento por una prueba de Tukey para identificar los grupos significativamente diferentes. C) Porcentaje de tiempo exploratorio en el laberinto en cruz en los Brazos abiertos (BA), Brazos cerrados (BC) y Centro (C), se procedió a realizar un análisis de varianza de dos vías y finalmente analizado con una prueba de Tukey (Media  $\pm$  EE, \*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ).

## 6.2 Ki-67

Para la evaluación de proliferación celular, se realizó la cuantificación de células positivas las cuales fueron identificadas con el marcador específico ki-67. No se observó diferencia significativa en el número de células en proliferación de los grupos experimentales expuestos a diferentes complejidades de enriquecimiento comparados con el grupo control. Sin embargo existe una tendencia discreta en la proliferación celular en los grupos de aumento en enriquecimiento y permanencia constante y en el grupo de enriquecimiento constante. Estos resultados van en la misma línea de trabajo de Overall en el 2014, en el cual observan que la exposición a ejercicio voluntario, que es un elemento del ambiente enriquecido, no causó un aumento en proliferación celular después de cinco días de exposición, lo que sugirió que el ejercicio voluntario tiene un efecto temporal sobre la proliferación (Overall et al., 2014). Por otro lado se observa una tendencia a disminuir el número de células positivas para Ki-67 en los grupos AD y CTED (Fig. 14-A).

A



**B**

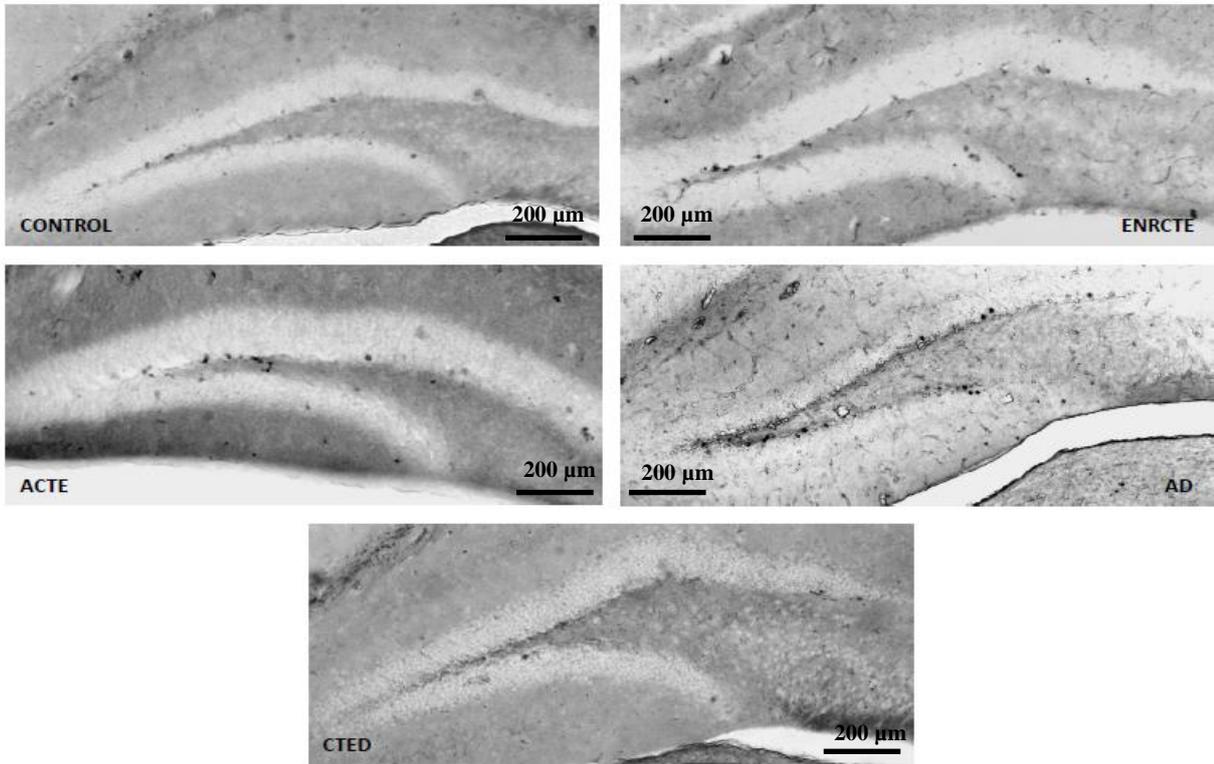


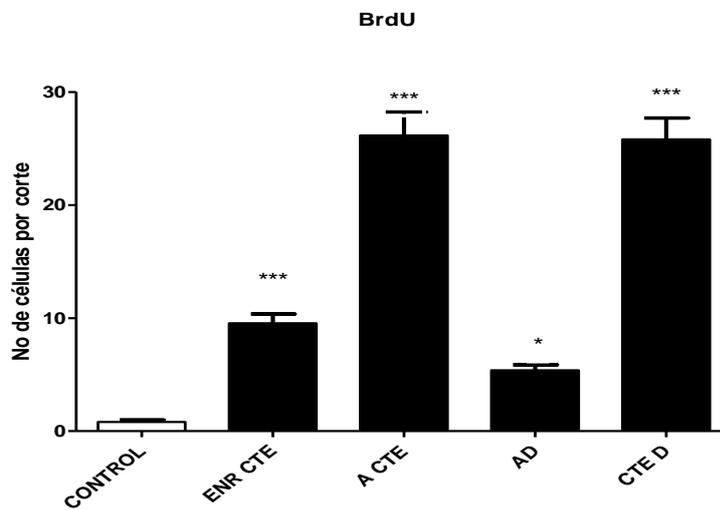
Figura 14. Inmunohistoquímica ki-67, A) se observa la cuantificación de células en proliferación mediante el marcador específico de ciclo celular ki-67. Los resultados indican que no se encontró diferencia significativa entre los grupos de enriquecimiento expuestos contra el grupo control. B) Imágenes representativas del giro dentado del hipocampo adulto del grupo control y los grupos de enriquecimiento. Los datos se analizaron mediante una ANOVA de una vía y post-hoc de Tukey (Media  $\pm$  EE).

### 6.3 Supervivencia celular (BrdU)

La evaluación del efecto de las diversas variantes del ambiente enriquecido sobre la supervivencia celular se determinó a través de la cuantificación de las células que incorporan la BrdU que se administró a la mitad del periodo experimental. La supervivencia celular analizada 28 días después de la primera administración, permitió confirmar la eficacia de los diferentes modelos de complejidad de un ambiente enriquecido.

Los grupos ENR CTE, ACTE y CTED mostraron un aumento significativo  $P < 0.001$  comparados contra el grupo control (Figura 15-A). Estos resultados indican que el ambiente enriquecido, independientemente de su complejidad beneficia la supervivencia de las células de nueva generación en el giro dentado del hipocampo.

A



**B**

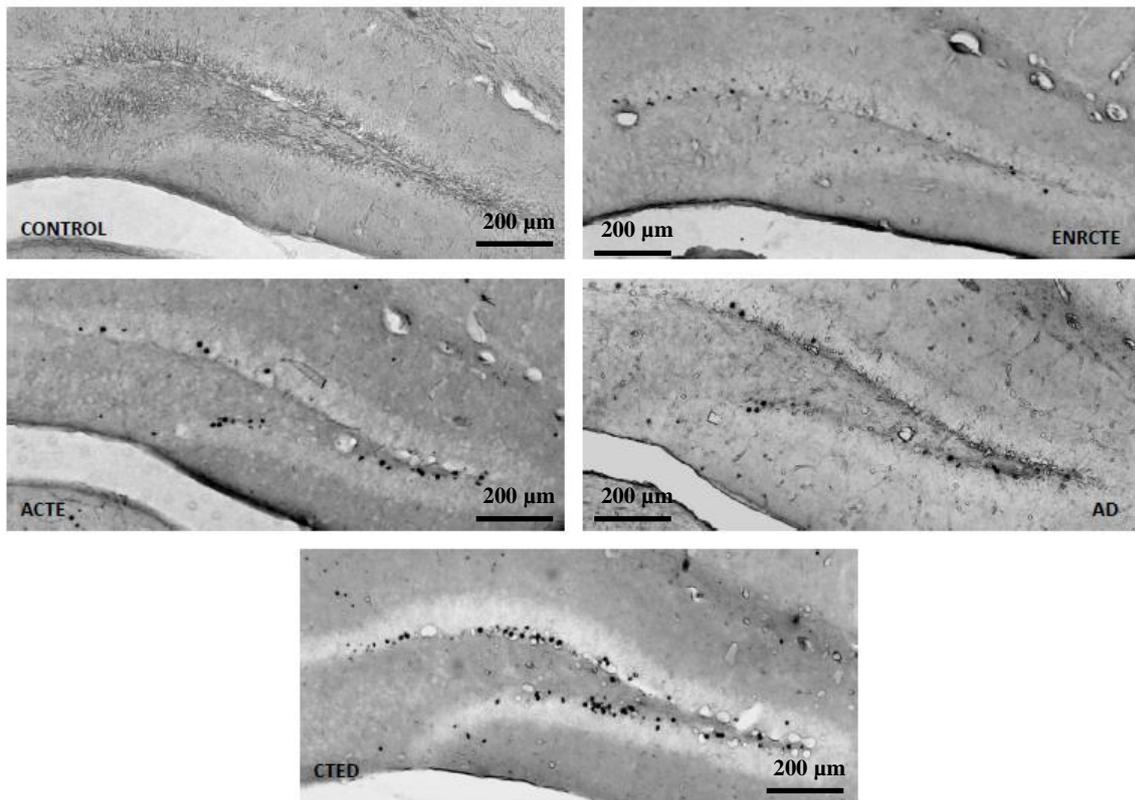


Figura 15. A) Cuantificación de las células que incorporaron BrdU y que indican supervivencia celular. Los grupos ENRTE, ACTE y CTED muestran una diferencia significativa de  $P < 0.001$  contra control, grupo AD muestra una  $P < 0.05$ . B) Imágenes representativas del giro dentado del hipocampo adulto con el marcador de BrdU para supervivencia del grupo control y del grupo aumento y disminución gradual del enriquecimiento. Los datos se analizaron mediante una ANOVA de una vía y post-hoc de Tukey (Media  $\pm$  EE, \*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ).

## 6.4 Doblecortina

Con el objetivo de evaluar los efectos de las diferentes complejidades del enriquecimiento sobre la población de neuroblastos y neuronas inmaduras se llevó a cabo la inmunohistoquímica para marcar la proteína doblecortina. Los resultados indicaron que todos los grupos expuestos a enriquecimiento respondieron favorablemente al ambiente enriquecido incrementando el número de células (Fig. 16-A).

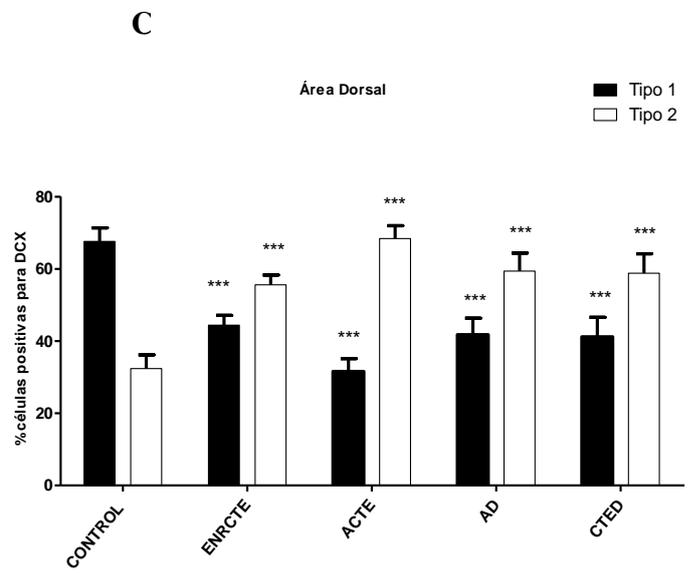
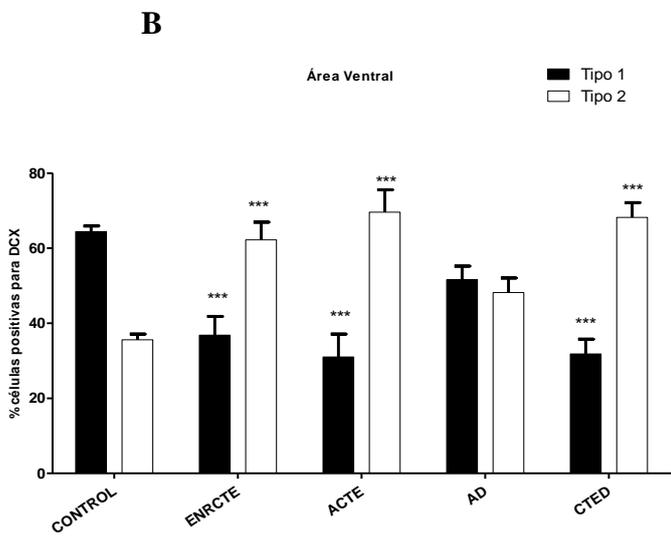
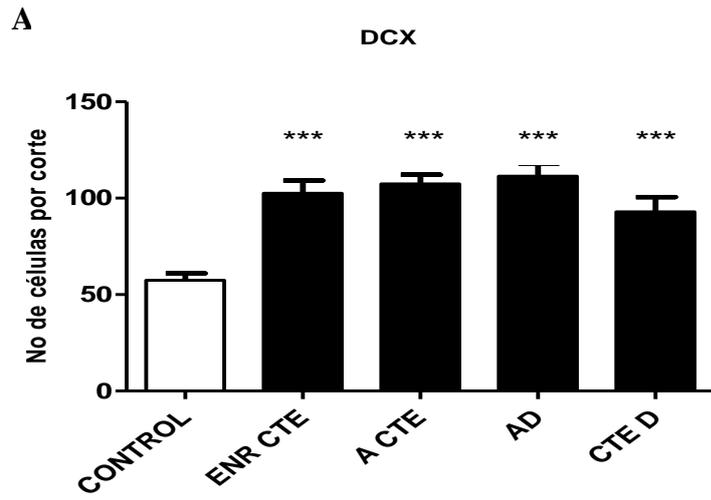
Sin embargo el grupo CTED muestra una ligera reducción en el número total de células positivas para DCX con un 61%, por lo que se ha deducido que la disminución gradual del enriquecimiento en los ratones pudo haber provocado un efecto negativo en estos y así reducir el número de células que sobrevivieron en comparación con los otros grupos enriquecidos.

Además, se realizaron análisis basados en la morfología dendrítica para establecer el impacto del ambiente enriquecido tanto en el área ventral como en el área dorsal y su posible comparación, teniendo en cuenta que para la cuantificación por tipos, se tomo una muestra al azar de 100 células por cada individuo. Para ellos se realizó una clasificación de acuerdo a los siguientes criterios. Este análisis fue necesario ya que se han atribuido funciones específicas para el hipocampo dorsal y para el ventral (REFs) (Fig. 16-B y C):

Tipo uno: Incluyen las categorías A, B, C y D siendo células sin o con procesos muy cortos, C y D representan a las células con procesos de longitud intermedia y morfología inmadura y que de acuerdo por lo reportado corresponden a células que no han salido del ciclo celular (Plumpe, 2006).

Tipo dos: Incluyen a las categorías E y F representando a las células con mayor madurez fenotípica, altamente polarizadas que extienden los procesos dendríticos hasta la capa molecular que de acuerdo por lo reportado corresponden a células que ya han salido del ciclo celular (Plumpe, 2006).

Los análisis mostraron que independientemente de las variantes del ambiente enriquecido, éste favoreció la complejidad dendrítica en las nuevas neuronas al aumentar el número de células correspondientes a la clasificación tipo II ( $P < 0.001$ ) (Fig. 16-A). En las figuras B y C se muestra la cuantificación de la clasificación neuronal de acuerdo con lo reportado (Plumpe, 2006), del área dorsal y ventral del hipocampo respectivamente.



D

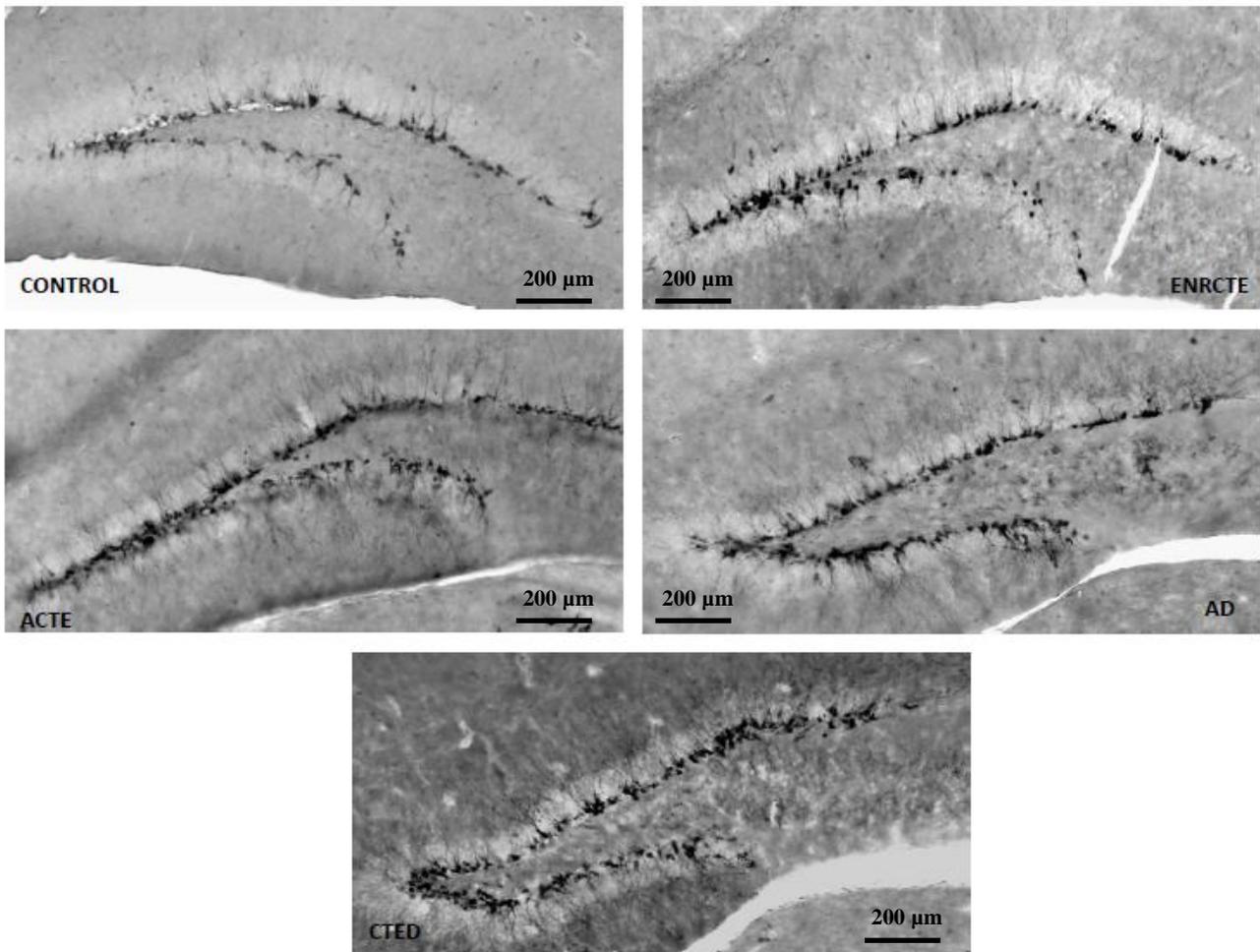


Figura 16. A) Cuantificación de células positivas para doblecortina, todos los grupos mostraron una diferencia de  $P < 0.001$  contra el grupo control. B y C) Cuantificación de las neuronas tipo uno y tipo dos del Área dorsal y ventral del hipocampo. D) Imágenes representativas del giro dentado del hipocampo adulto mostrando las células positivas para el marcador doblecortina de los grupos control y enriquecimiento constante y su disminución gradual. Los datos de la gráfica A se analizaron mediante una ANOVA de una vía y post-hoc de Tukey. (Media  $\pm$  EE). \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ . Los datos de las gráficas B y C fueron analizados mediante una ANOVA de dos vías y post-hoc de Tukey (Media  $\pm$  EE, \*\*\*  $P < 0.001$ ).

## 6.5 BrdU/ NeuN

La diferenciación neuronal es un proceso que requiere varias semanas, a pesar que la adquisición de su fenotipo neuronal ocurre en la primera semana de desarrollo (REFS) (Kempermann et al., 2003). El doble marcaje con los marcadores BrdU y NeuN, permitió estudiar las células granulares. En la figura 17, en el panel B mediante el análisis del co-marcaje de BrdU y NeuN, observamos que la tasa de nuevas células generadas que llegaron a un estado maduro de los grupos expuestos a un enriquecimiento se ve incrementada por este ambiente complejo y novedoso a los que fueron sometidos los ratones, los grupos que responden mejor, son aquellos a los cuales el incremento ó en el caso disminución y permanencia de los juguetes fue gradual (ACTE y CTED) (Fig. 17-B).

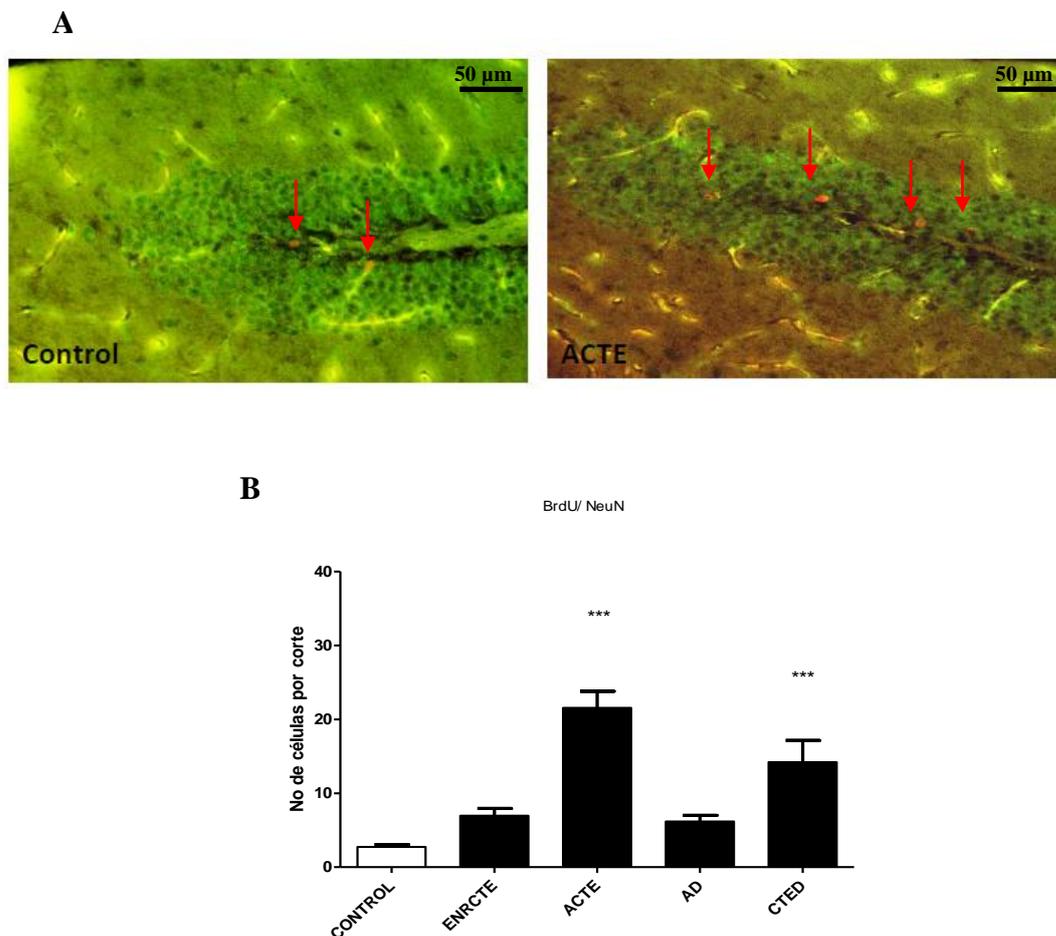
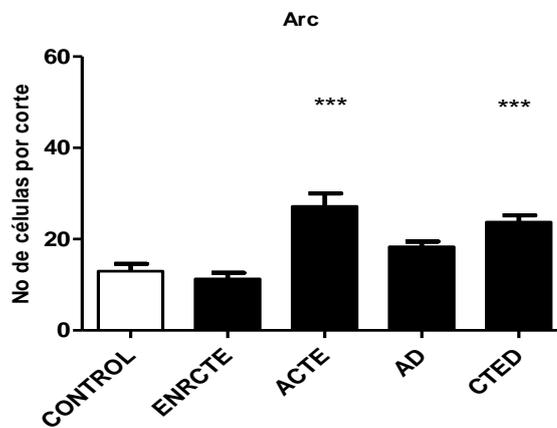


Figura 17. Neuronas maduras como resultado del ambiente enriquecido. A) Imágenes representativas de los grupos control y aumento de enriquecimiento respectivamente, donde los marcadores NeuN (verde) y BrdU (rojo) colocalizan mostrando neuronas maduras marcadas en el inicio de del diseño experimental. B) Análisis cuantitativo que representa el número de células positivas al marcador BrdU y que colocalizan con el marcador NeuN. Los datos se analizaron mediante una ANOVA de una vía y post-hoc de Tukey (Media ± EE, \*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ).

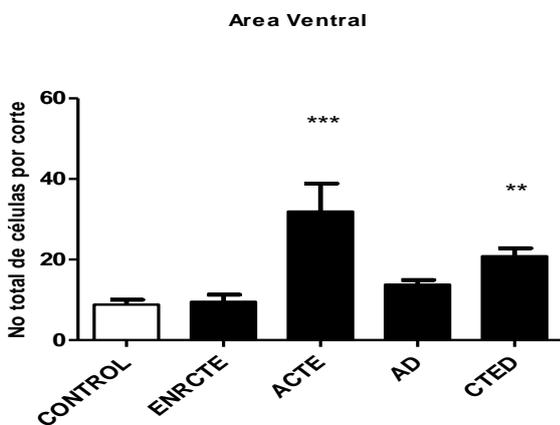
## 6.6 Arc

La plasticidad neuronal es un proceso que requiere expresión temprana de genes, con el fin de generar modificaciones que puedan perdurar en el tiempo, por este motivo se llevo a cabo la inmunohistoquímica con el marcador de respuesta a actividad sináptica de neuronas ARC, la cuantificación total (Fig. 18-A) reveló que el grupo expuesto a un aumento en el enriquecimiento gradual y su conservación constante, permitió una mayor activación neuronal y por lo tanto una diferencia significativa de un 109% contra el grupo control ( $P < 0.001$ ), así mismo, el grupo expuesto a un enriquecimiento constante y su disminución gradual durante el periodo experimental favoreció la activación neuronal en un 82% en comparación con el grupo control con un  $P < 0.001$ . También se llevó a cabo la cuantificación de las áreas Dorsal y Ventral (Figura 18-B y C).

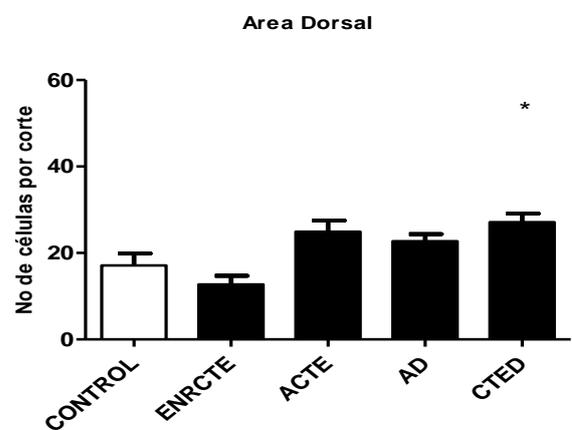
A



B



C



D

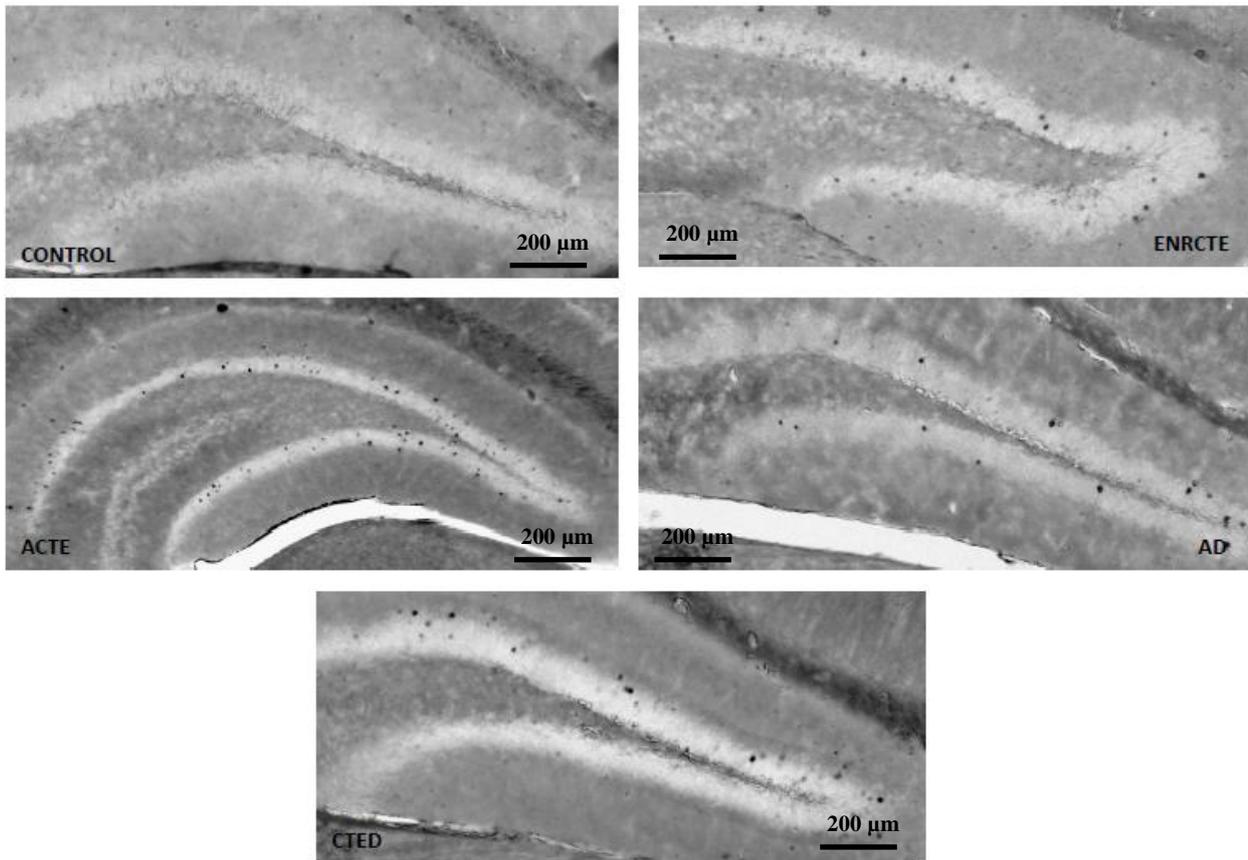


Figura 18. Activación neuronal. A) Análisis cuantitativo de células positivas al marcador Arc, se muestra un aumento significativo en los grupos ACTE y CTED. B) Análisis cuantitativo de células positivas al marcador Arc en el área ventral del hipocampo reflejando actividad neuronal y en el cual se observa diferencias significativas en los grupos ACTE y CTED. C) Análisis cuantitativo de células positivas al marcador Arc en el área dorsal del hipocampo en la cual vemos un aumento significativo del grupo CTED. D) Imágenes representativas de las células positivas para Arc. Los datos se analizaron mediante una ANOVA de una vía y post-hoc de Tukey (Media  $\pm$  EE, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ).

## 6.7 BrdU/ Arc

Dando el mismo seguimiento que el co-marcaje anterior, también fue analizada la activación celular de las nuevas células. Estos resultados demuestran que la novedad en el enriquecimiento y el aumento gradual de la complejidad del ambiente enriquecido favorece mucho más esta activación celular que aquellos animales en donde el enriquecimiento es constante durante todo el periodo experimental (Figura 19-A), sin embargo, estos grupos enriquecidos son también significativamente elevados en comparación con aquellos ratones alojados en condiciones estándar, siendo el 50% más de activación en todos los grupos enriquecidos que en el grupo control.

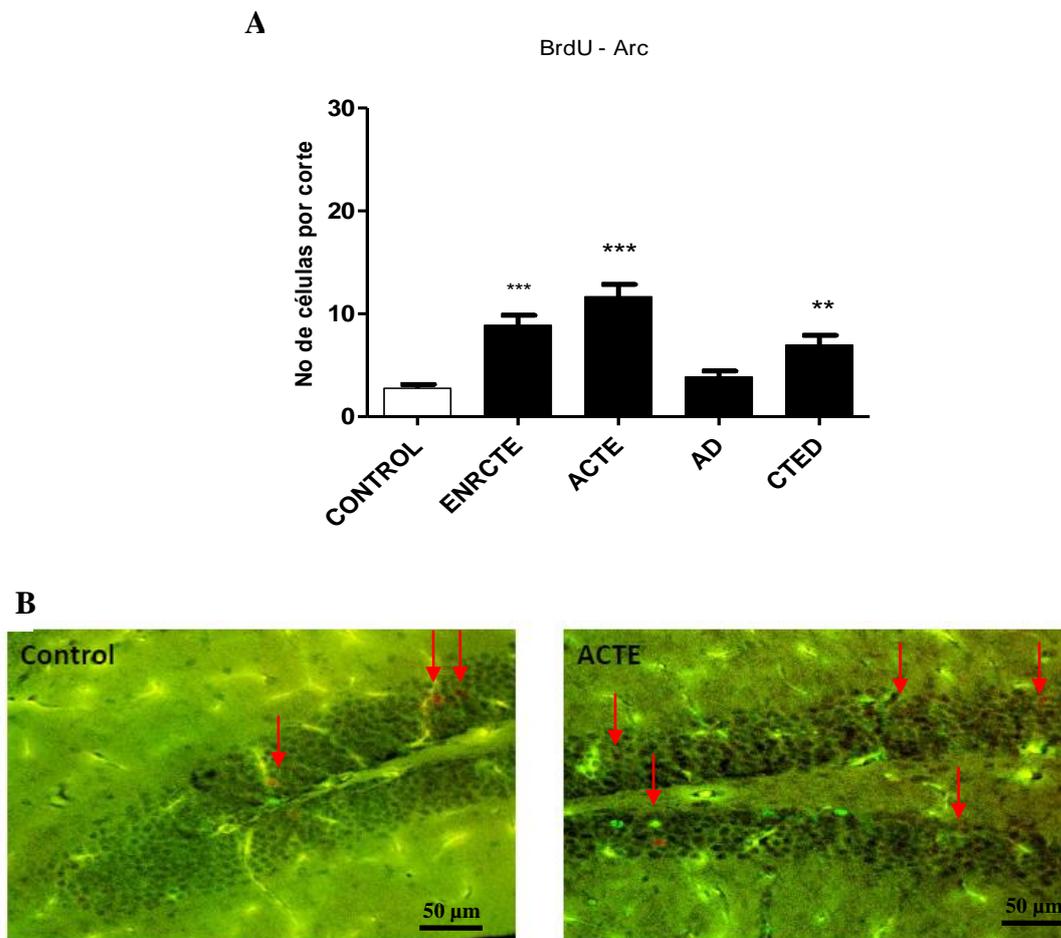


Figura 19. Células con activación de Arc como resultado del ambiente enriquecido. A) Análisis cuantitativo que representa el porcentaje del número de células positivas al marcador BrdU y que colocalizan con el marcador Arc ( $n = 5$  ratones por grupo). B) Imágenes representativas de los grupos control y aumento en el enriquecimiento respectivamente, donde los marcadores BrdU (verde) y Arc (rojo) colocalizan mostrando células activas marcadas en el inicio de del diseño experimental. (Escala 50  $\mu$ m) Los datos se analizaron mediante una ANOVA de una vía y post-hoc de Tukey (Media  $\pm$  EE, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ )

## 7 Discusión

El presente trabajo tuvo como objetivo la evaluación del efecto de la complejidad y novedad del enriquecimiento ambiental sobre la neurogénesis del hipocampo adulto y su relación con la ansiedad en ratones adultos macho de la cepa BalbC.

Cumpliendo el primer objetivo particular encontramos que en la etapa de proliferación del proceso de neurogénesis en el hipocampo que fue cuantificado por el número de células positivas para el marcador Ki-67, no hubo modificaciones o diferencias con respecto al grupo control. Sin embargo podemos hablar de una ligera tendencia de incremento en el número de células positivas por corte en los grupos de ENRCTE y ACTE. En correspondencia con los resultados obtenidos en el presente estudios, se sabe que la proliferación causada por la actividad física, solo es un efecto transitorio, ya que, pasadas seis semanas en las cuales la tasa proliferativa llega a su punto máximo, se inicia un retroceso en la generación de nuevas células (Overall et al., 2013)

En ese sentido es importante considerar que en el presente trabajo, el enriquecimiento ambiental incluyó la rueda para ejercicio voluntario por más de cuatro semanas, hecho que pudo haber limitado su efecto.

No obstante encontramos un incremento en el número de células en etapas posteriores del desarrollo neuronal (Fig. 17-A), lo cual podría sugerir que el efecto temprano del ejercicio voluntario podría influir en los eventos subsecuentes a la proliferación. Sin embargo, eso es solo una especulación que no fue aclarada en este estudio.

Por otro lado, la exposición de los ratones al ambiente enriquecido favoreció la supervivencia celular, viéndose reflejado en todos los grupos expuestos a las diferentes complejidades de enriquecimiento. Si bien es cierto, el enriquecimiento constante favorece la supervivencia, la novedad constante y el aumento en complejidad en el enriquecimiento (grupos ACTE y CTED) parece ser el protocolo más eficiente para favorecer mayormente la supervivencia celular. Esto se debe al efecto pro-supervivencia del ambiente enriquecido, que ha sido observado tanto en ratas como en ratones (Kempermann et al., 1997; Van Praag et al., 1999), esto es demostrado con la cuantificación de células positivas para BrdU en el giro dentado del hipocampo de los grupos de enriquecimiento con un aumento significativo contra el grupo control.

Revalidando los resultados anteriores, se realizó la evaluación del efecto de la complejidad del enriquecimiento en células positivas a DCX. Esta población aumento significativamente en los ratones enriquecidos en comparación con los ratones de condición estándar. Inclusive se pudo observar una diferencia en la longitud y morfología de los procesos de las células inmaduras, tanto del área ventral como dorsal del hipocampo. Lo anterior también permitió encontrar un mayor número de células con arboles dendríticos maduros y bien elaborados (categoría II) en los ratones con enriquecimiento comparándolos con el grupo control. Esto es interesante, ya que, aquellas altamente polarizadas, con la extensión de los procesos dendríticos hasta la capa molecular en ambas áreas del giro dentado

del hipocampo pueden mejorar respuestas ante estímulos estresantes y disminuyen conductas ansiolíticas en los ratones. Los cambios en las respuestas de ansiedad correlacionados con células positivas para DCX se pueden confirmar con la prueba de laberinto en cruz elevado, en el cual, los animales expuestos a enriquecimiento muestran un comportamiento relajado para la confrontación de un nuevo medio e incluso amenazador, mejor exploración y una locomotricidad mas activa en los brazos abiertos. Existen evidencias de que estos cambios provocados por el enriquecimiento son casi inmediatos, ya que, confirmando nuestros resultados, otros autores han podido encontrar incrementos en la longitud de las dendritas y en el número total de ramificaciones de dendritas basales de las neuronas piramidales de la capa III de la corteza occipital, tan solo con cuatro días de enriquecimiento ambiental (Wallace et al., 1992).

Las observaciones originales sobre la función de la proteína asociada a la actividad reguladora de citoesqueleto (ARC) fueron asociadas a la remodelación de los filamentos de actina, permitiendo la formación y/o regeneración de conexiones sinápticas, llevando a los investigadores a la idea de que la proteína Arc tiene una amplia correlación con la plasticidad sináptica (Messaoudi E. et al, 2007). Por otro lado, el hipocampo ventral tiene fuertes y específicas conexiones eferentes con varias estructuras subcorticales del cerebro incluyendo el hipotálamo y la amígdala. Estas conexiones permiten que el hipocampo ventral puedan asignar una variedad de respuestas tanto endocrinas, reproductivas, emocionales y sociales ante diversos estímulos (Amaral, 1987; Witter et al., 1989; Canteras and Swanson, 1992).Ademas, se ha demostrado que el hipocampo ventral se encuentra relacionado con la ansiedad ( Bannerman et al., 2004 y Kjelstrup et al., 2002 ).

El estrecho vinculo entre la actividad celular y el enriquecimiento como modulador positivo de la ansiedad nos llevó al uso de los marcadores moleculares Arc y BrdU/Arc, para la determinación del número de neuronas activadas en respuesta al enriquecimiento ambiental y a la resolución de una mejor comprensión al comportamiento de los ratones en el laberinto en cruz elevado. Esta comprobado el aumento significativo de la proteína Arc a partir de neuronas inmaduras activadas en el área ventral (Fig. 18-A, B y C), dando pauta, nuevamente a la conducta mejorada en el laberinto en cruz, tomando en cuenta que los ratones enriquecidos con mayor plasticidad sináptica pueden hacer frente a un medio innovador, disminuyendo el tiempo que toman en los brazos cerrados y así mismo incrementando el número de entradas y el porcentaje de tiempo en los brazos abiertos, concluyendo que el enriquecimiento ambiental complejo y novedoso podría otorgar una capacidad adaptativa del sistema nervioso ayudando a la disminución de la ansiedad gracias a una reorganización sináptica y la formación de nuevas sinapsis a partir de una nueva neurona o una neurona ya existente. La cuantificación de la inmunofluorescencia de BrdU/Arc confirma la presencia de nuevas neuronas generadas por un ambiente enriquecido que son activadas cuando los roedores son expuestos a una situación novedosa. (Fig. 19-A).

Los resultados del aumento del número de nuevas neuronas (células positivas para BrdU / NeuN) confirman que el enriquecimiento ejerce un efecto promotor de la supervivencia y de la diferenciación neuronal. La selección de las células para la supervivencia se produce en la etapa posmitótica, cuando las células han establecido sus primeros contactos sinápticos (Kempermann et al., 2004; Brandt et

al, 2003). Corroborado en nuestro laboratorio la información anterior, se demostró que en aquellos animales que fueron sometidos a un complejo enriquecimiento por un periodo prolongado, las células positivas para el marcador BrdU/ NeuN son más en número que aquellos animales alojados en condiciones estándar, consideramos nuevamente que los grupos ACTE y CTED son el mejor modelo para iniciar un tratamiento con un ambiente enriquecido.

Nuestros resultados demostraron la reducción de un comportamiento ansiogénico en los ratones enriquecidos en la prueba de laberinto en cruz elevado; siendo que, el tratamiento de enriquecimiento incrementó de forma significativa el número de entradas y también un mayor porcentaje de tiempo empleado en los brazos abiertos, reforzando la idea de que los ratones expuestos a un ambiente enriquecidos tenían una motivación mayor a la exploración en un ambiente novedoso y así mismo una reducción en la neofobia de los individuos, reflejado en una mayor exploración en los brazos abiertos. Este hallazgo es consistente con estudios previos (Benaroya Milshtein, 2004). Así mismo, los animales control comparados con los enriquecidos mostraron una mayor concurrencia de conductas de aproximación y retirada desde las zonas protegidas del laberinto, lo cual indica un patrón de exploración más cauto.

La complejidad en el ambiente enriquecido impuesta a los ratones parece tener un efecto potencial para una respuesta inmediata y reforzada para tratar trastornos ansiogénicos.

La conducta social de ratones macho también fue modificada por el enriquecimiento, ya que se mostraron menos agresivos y la delimitación del territorio o el nivel jerárquico de dominancia disminuyeron en sus interacciones sociales que los ratones alojados en condiciones estándar, esto fue observado durante todo el periodo experimental.

## **8 Conclusión**

1° El enriquecimiento ambiental aumentó significativamente la supervivencia celular en la zona subgranular del giro dentado del hipocampo adulto.

2° Esta complejidad y novedad gradual en el ambiente, aumentó la cantidad de neuronas inmaduras tanto en el número total de éstas, como en el número de neuronas inmaduras del área ventral y dorsal del hipocampo, ayudando a una mejora en la resolución de problemas como se refleja en la prueba conductual.

3° Se demuestra que la complejidad del enriquecimiento ambiental es capaz de modificar la activación neuronal de manera significativa a través de la expresión del marcador molecular Arc.

Finalmente concluimos que estos efectos positivos generados por las condiciones ambientales en los ratones de la cepa BalB/c favorecen la integración de nuevas neuronas en las redes neuronales existentes y éstas confieren la capacidad de adaptación y mitigación ante trastornos de ansiedad.

## 9 Referencias

1. Abelson, J.L. and Nesse, R.M., Cholecystokinin-4 and panic. *Arch.Gen. Psychiatry*, 1990, 47, 395
2. Abrous DN, Koehl M, Le Moal M. Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *Physiol Rev* 2005; 85: 523-569.
3. Albrechet-Souza, L., Carvalho, M.C., Franci, C.R., & Brandão, M.L. Increases in plasma corticosterone and stretched-attend postures in rats naive and previously exposed to the elevated plusmaze are sensitive to the anxiolytic-like effects of midazolam. *Hormones and Behavior*, 2007, 52, 267-273.
4. Albrechet-Souza, L., Borelli, K.G., Carvalho, M.C., & Brandão, M.L. The anterior cingulate cortex is a target structure for the anxiolytic-like effects of benzodiazepines assessed by repeated exposure to the elevated plus-maze and fos immunoreactivity. *Neuroscience*, 2009, 164, 387-397.
5. Altman J. Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science*, 1962, 135:1127–1128.
6. Altman J. Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats. Postnatal growth and differentiation of the mammalian brain, with implications for a morphological theory of memory. *Anat Rec*, 1963, 145:573–591.
7. Altman J. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis II. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in infant rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions. *J Comp Neurol.*, 1966, 128:431–474.
8. Altman J. Postnatal growth and differentiation of the mammalian brain, with implications for a morphological theory of memory. In: *The neurosciences, a study program* Quarten GC, Melnechuck T, Schmitt FO, eds, New York: Rockefeller UP., 1967, pp 723–743.
9. Alvarez Buylla A, García Verdugo JM Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neuroscience*, 2002, 22:629-634.
10. Amaral DG. Memory: anatomical organization of candidate brain regions. In: Mountcastle VB, ed. *Handbook of physiology, the nervous system*, Vol. V. Baltimore: Waverly Press, 1987, 211– 294
11. Arias-Carrión O, Olivares-Bañuelos T, Drucker-Colín R. Neurogénesis en el cerebro adulto. *Rev Neurol* 2007; 44: 541-50.
12. Bai F, Bergeron M, Nelson DL, Chronic AMPA receptor potentiator (LY451646) treatment increases cell proliferation in adult rat hippocampus. *Neuropharmacology*, 2003, 44(8):1013-21.
13. Banasr M, Hery M, Brezun JM, Daszuta A. Serotonin mediates o estrogen stimulation of cell proliferation in the adult dentate gyrus. *Eur JNeurosci*, 2001, 14:1417-24.
14. Bannerman, D.M., Rawlins, J.N., McHugh, S.B., Deacon, R.M., Yee, B.K., Bast, T., Zhang, W.N., Pothuizen, H.H., and Feldon, J. Regional dissociations within the hippocampus—memory and anxiety. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2004, 28, 273–283.

15. Beauquis J, Homo-Delarche F, Giroix MH, Ehse J, Coulaud J, Roig P, Portha B, De Nicola AF, Saravia F. Hippocampal neurovascular and hypothalamic-pituitary-adrenal axis alterations in spontaneously type 2 diabetic GK rats, *Exp Neurol* 2010, 222(1):125-34
16. Beauquis J, Roig P, De Nicola AF, Saravia F., Short-term environmental enrichment enhances adult neurogenesis, vascular network and dendritic complexity in the hippocampus of Type 1 diabetic mice, 2010, *PLoS One* 5: e13993. doi: 10.1371/journal.pone.0013993
17. Benaroya Milstein, N. et al. Environmental enrichment in mice decreases anxiety attenuates stress responses and enhances natural killer cell activity. *Eur. J. Neurosci.* 20, 2004, 1341–1347
18. Blumenthal, J.A., Babyak, M.A., Moore, K.A., Craighead, W.E., Herman, S., Khatri, P., Waugh, R., Napolitano, M.A., Forman, L.M., Appelbaum, M., Doraiswamy, P.M. & Krishnan, K.R., Effects of exercise training on older patients with major depression. *Arch Intern Med* 159, 1999, 2349–2356.
19. Bradwejn, J., Koszycki, D. and Meterissian, G., Cholecystokinin tetrapeptide induces panic attacks in patients with panic disorder. *Can. J. Psychiatry*, 1990, 35, 83–85.
20. Brandt, M.D., S. Jessberger, B. Steiner, G. Kronenberg, K. Reuter, A. Bick-Sander, W. von der Behrens, and G. Kempermann., Transient calretinin expression defines early postmitotic step of neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis of mice. *Mol. Cell. Neurosci.* 24, 2003, 603–613.
21. Brown J.P., Couillard Despres S., Cooper Kuhn C.M., Winkler J., Aigner L. y Kuhn H.G., Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *J Comp Neurol*, 467 (1), 2003, 1-10
22. Canteras NS, Swanson LW. Projections of the ventral subiculum to the amygdala, septum, and hypothalamus a PHA-L anterograde tract tracing study in the rat. *J Comp Neurol* 1992; 324:180–194
23. Cameron HA, Woolley CS, McEwen BS, Gould E Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat, 1993, *Neuroscience* 56:337-344.
24. Cardinali, D.P., *Neurociencia aplicada. Sus fundamentos.* Buenos Aires. Panamericana. 2007
25. Carlson, N.R., *Fisiología de la Conducta.* Barcelona: Ariel Psicología. 1999
26. Cassano P, Argibay P. Depression and neuroplasticity. Interaction of nervous, endocrine and immune systems. *Medicina (B Aires)* 2010, 70(2):185-93
27. Christie BR, Cameron HA. Neurogenesis in the adult hippocampus. 2006, *Hippocampus* 16:199- 207.
28. Clement, Y. and Chapouthier, G. Biological basis of anxiety. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 1998, 22, 623-633.
29. Cooper-Kuhn, C. M., J. Winkler, et al. "Decreased neurogenesis after cholinergic forebrain lesion in the adult rat." *J Neurosci Res* 2004, 77(2): 155-165.
30. Crossman, A. R. ; Neary, D. *Neuroanatomía.* Barcelona. Masson. 2007
31. Daugé, V. and Lena, I., CCK in anxiety and cognitive processes. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 1998, 22 (6), 815-825.

32. Dauge', V.; Roques, B.P., Opioid and CCK systems in anxiety and reward. In: Bradwejn, J.; Vasar, E., eds. Cholecystokinin and Anxiety, From Neuron to Behaviour. R.G. Landes Company, 1995:151–171
33. Diamond, G. S., Siqueland, L., & Diamond, G. M. Attachment-based family therapy for depressed adolescents: programmatic treatment development. *Clinical Child and Family Psychology Review*, 2003, 6(2), 107–127.
34. Dinse HR, and Böhmer G. Plastic-adaptive properties of cortical areas. In: *Cortical Areas: Unity and Diversity: Conceptual Advances in Brain Research*, edited by Schüz A and Miller R. London: Taylor and Francis, 2002, p. 311-348.
35. Dinse HR, Ragert P, Pleger B, Schwenkreis P, and Tegenthoff M. Pharmacological modulation of perceptual learning and associated cortical reorganization. *Science* 2003, 301: 91–94.
36. Doetsch F. The glial identity of neural stem cells. *Nat Neurosci* 2003, 6:1127-1134.
37. Doetsch F, Alvarez-Buylla. A Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1996, 93:14895-14900.
38. Doetsch F, Caille I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 1999, 97:703-716.
39. Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci* 1997, 17:5046-5061.
40. Doetsch F, Petreanu L, Caille I, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron* 2002, 36:1021-1034.
41. Duman RS, Heninger GR, Nestler EJ. Molecular and cellular theory of depression. *Arch Gen Psychiatry* 1997; 54:597-606.
42. Duman, C.H., Schlesinger, L., Russell, D.S. & Duman, R.S. Voluntary exercise produces antidepressant and anxiolytic behavioral effects in mice. *Brain Res* 2008, 1199: 148–158.
43. Estrada-Camarena Ericka, Factores que modifican el efecto antidepresivo de los estrógenos: evidencia preclínica, *Salud mental* 2012.
44. Horacio Cía A. La ansiedad y sus trastornos: Manual diagnóstico y Terapéutico. 2da edición, Editorial Polemos, Buenos aires, 2007 p.p 83-112
45. Fabel K, TamB, Kaufer D, Baiker A, Simmons N, Kuo CJ, et al. VEGF is necessary for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis. *Eur J Neurosci* 2003, 18(10):2803–12.
46. Forgyas DG, Forgyas JW. The nature of the effect of free-environmental experience in the rat. *Journal of Comparative Physiology* 1952, 45:322–8.
47. Friedman, E.M., & Lawrence, D.A. Environmental stress mediates changes in neuroimmunological interactions. *Toxicological Sciences*, 2002, 67, 4–10.
48. Fuss J, Ben Abdallah NM, Vogt MA, Touma C, Pacifici PG, Palme R, Witzemann V, Hellweg R, Gass P: Voluntary exercise induces anxiety-like behavior in adult C57BL/6J mice correlating with hippocampal neurogenesis. *Hippocampus* 2010, 20(3):364–376.

49. Gariépy, J.L., Rodriguez, R.M. & Jones, B.C. Handling, genetic and housing effects on the mouse stress system, dopamine function, and behavior. *Pharmacol. Biochem. Behav* 2002, 73, 7–17.
50. Gerd Kempermann, Daniela Gast, Golo Kronenberg, Masahiro Yamaguchi, Fred Gage , Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice, *Development and disease*, The company of Biologists, 2003 p.p 391-399.
51. Glaser, R., & Kiecolt-Glaser, J.K. Stress-induced immune dysfunction: Implications for health. *Nature Reviews Immunology* 2005, 5, 243–251.
52. Goddard, A. W. and Charney, D. S. Panic disorder, psychobiology. En: Andelman, G., Smith, B. H. (Eds.) *Encyclopedia of Neuroscience*. Elsevier Science, 1997.
53. Graeff, F. G., Guimaraes, F. S., De Andrade, T. G. S., and Deakin, F. W., Role of 5-HT in stress, anxiety and depression. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 1996, 54(1), 219-141.
54. Guo-li Ming and Hongjun Song, Adult Neurogenesis in the Mammalian Central Nervous System, *Annual Review of Neuroscience*, v.28, 2005.
55. Handley, S.L., & Mithani, S. Effects of alpha-adrenoreceptor agonist in a maze-exploration model of “fear-motivated behavior”. *Naunyn–Schmiedeberg’s Archives of Pharmacology* 1984, 327, 1-5.
56. Hebb HO. The effects of early experience on problem solving at maturity. *American Psychologist* 1947; 2:306–7.
57. Hoglinger GU, Rizk P, Muriel MP, Duyckaerts C, Oertel WH, Caille I, et al. Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson's disease. *Nat Neurosci* 2004; 7:726-35
58. Holmes MM, Galea LA, Mistlberger RE, Kempermann G. Adult hippocampal neurogenesis and voluntary running activity: circadian and dose-dependent effects. *J Neurosci Res* 2004; 76(2):216–22.
59. Ip EY, Giza CC, Griesbach GS, Hovda DA. Effects of enriched environment and fluid percussion injury on dendritic arborization within the cerebral cortex of the developing rat. *J Neurotrauma* 2002, 19: 573 –585.
60. Jin K, Mao XO, Sun Y, Xie L, Jin L, Nishi E, et al. Heparin binding epidermal growth factor-like growth factor: hypoxia inducible expression in vitro and stimulation of neurogenesis in vitro and in vivo. *J Neurosci* 2002; 22:5365-73
61. Kandel R.E., James H, SH Wartz, Jessell M. T. *Principios de neurociencia*, cuarta edición, Editorial McGraw-Hill Interamericana, España Madrid, 2001.
62. Kandel, E.R.; Schwartz, J.H.; Jessell, TM. *Neurociencia y Conducta* Madrid: Prentice Hall, 1997.
63. Karl J.L. Fernandes, Gregoire Catherine Alexandra, David Bonenfant, Adalie Le Nguyen, Anne Aumont. Untangling the Influences of Voluntary Running, Environmental Complexity, Social Housing and Stress on Adult Hippocampal Neurogenesis. *PLOS ONE*, 2014.
64. Kempermann Gerd, Sebastian Jessberger, Barbara Steiner and Golo Kronenberg, Milestones of neuronal development in the adult hippocampus, *Trends in Neurosciences*. 2004 p.p 447-52.
65. Kempermann, G., Kuhn, H.G. & Gage, F.H. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 1997, 386, 493–495

66. Kjelstrup, K.G., Tuvnes, F.A., Steffenach, H.A., Murison, R., Moser, E.I., and Moser, M.B. Reduced fear expression after lesions of the ventral hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 2002, 10825–10830.
67. Kriegstein A, Álvarez Buylla A. The Glial nature of Embryonic and Adult neural Stem Cells *Annu Rev Neurosci.* 2009; 32: 149–184.
68. Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* 1996, 16:2027–2033.
69. Kuhn HG, Winkler J, Kempermann G, Thal LJ, Gage FH. Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *J Neurosci* 1997; 17:5820-9
70. Kulkarni VA, Jha S, Vaidya VA. Depletion of norepinephrine decreases the proliferation, but does not influence the survival and differentiation, of granule cell progenitors in the adult rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 2002; 16:2008-12
71. Lambert TJ, Fernandez SM, Frick KM. Different types of environmental enrichment has discrepant effects on spatial memory and synaptophysin levels in female mice. *Neurobiol Learn Mem* 2005, 83: 206 –216.
72. Larsson, F., Winblad, B. & Mohammed, A.H. Psychological stress and environmental adaptation in enriched vs. impoverished housed rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 2002, 73, 193–207
73. Laviola G, Hannan AJ, Macri S, Solinas M, Jaber M. Effects of enriched environment on animal models of neurodegenerative diseases and psychiatric disorders. *Neurobiol Dis* 2008; 31(2): 159-168.
74. Lee J, Duan W, Mattson MP. Evidence that brain derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice. *J Neurochem* 2002; 82:1367-75
75. Lee SJ, Campomanes CR, Sikat PT, Greenfield AT et al. Estrogen induces phosphorylation of cyclic AMP response element binding (pCREB) in primary hippocampal cells in a time-dependent manner. *Neuroscience* 2004; 124:549-560.
76. Lois C, Alvarez Buylla A. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science*, 1994, 264:1145-1148.
77. Messaoudi E, Kanhema T, Soule J, Tiron A, Dageyte G, Da Silva B, Bramham C. Sustained Arc/Arg3.1 synthesis controls long-term potentiation consolidation through regulation of local actin polymerization in the dentate gyrus in vivo. *J Neurosci*, 2007, 27: 10445–10455.
78. Ming G-L, Song H. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 2005, 28:223–50
79. Ming GL, Song H. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron.* 2011; 70:687-702.
80. Montgomery, K.C., The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 1955, 48, 254-260.
81. Mullen, R. J., C. R. Buck, et al. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 1992, 116(1): 201-211.
82. Nelson, R.J. *Psicoendocrinología. Las Bases Hormonales de la Conducta.* Barcelona: Ariel Psicología. 1996

83. Nithianantharajah J, Hannan AJ. Enriched environments, experience dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 2006; 7(9): 697-709.
84. Nutt, D. J. and Malizia, A. L., New insights into the role of the GABAa-benzodiazepine receptor in psychiatric disorder. *British Journal of Psychiatry*, 2001, 179, 390-396
85. Olson AK, Eadie BD, Ernst C, Christie BR. Environmental enrichment and voluntary exercise massively increase neurogenesis in the adult hippocampus via dissociable pathways. *Hippocampus* 2006, 16: 250–260.
86. Ormerod BK, Galea LA. Reproductive status influences cell proliferation and cell survival in the dentate gyrus of adult female meadow voles: a possible regulatory role for estradiol. *Neuroscience* 2001; 102:369-79.
87. Overall RW, Walker TL, Leiter O, Lenke S, Ruhwald S, Kempermann G, Delayed and transient increase of adult hippocampal neurogenesis by physical exercise in DBA/2 mice, *PloS One*, 2013
88. Pierre-Marie Lledo, Mariana Alonso, Matthew S Grubb, Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits., Article, *Nature reviews. Neuroscience* 04/2006; 7(3):179-93
89. Plumpe T, Ehninger D, Steiner B et al. Variability of doublecortin associated dendrite maturation in adult hippocampal neurogenesis is independent of the regulation of precursor cell proliferation. *BMC Neurosci* 2006, 7:77.
90. Ramírez-Rodríguez Gerardo, Gloria Benítez-King, Gerd Kempermann, Formación de neuronas nuevas en el hipocampo adulto: neurogénesis, *Salud Mental* 2007; 30(3) : 12-19.
91. Ramírez Rodríguez G, Klempin F, Babu H et al. Melatonin modulates cell survival of new neurons in the hippocampus of adult mice. *Neuropsychopharmacology* 2009, 34:2180–2191.
92. Ramírez-Rodríguez G., Gómez-Sánchez A., Ortiz-López L., Melatonin maintains calcium-binding calretinin-positive neurons in the dentate gyrus during aging of Balb/C mice. *Experimental Gerontology* 60, 2014, 147–152.
93. Revest JM, Dupret D, Koehl M et al. Adult hippocampal neurogenesis is involved in anxiety-related behaviors. *Mol Psychiatry* 2009, 14:959–967.
94. Reynolds, B.A., and Weiss, S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 1992, 255, 1707-1710.
95. Reynolds, B.A., Tetzlaff, W., and Weiss, S. A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J. Neurosci.* 1992, 72, 4565-4574.
96. Roy, V., Belzung, C., Delarue, C. & Chapillon, P. Environmental enrichment in BALB / c mice: effects in classical tests of anxiety and exposure to a predatory odor. *Physiol. Behav.*, 2001, 74, 313–320.
97. Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A. y cols. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science*, 2003, 301(5634):805-9.
98. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 Protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 2000; 182:311-/22.
99. Shingo T, Gregg C, Enwere E et al. Pregnancy-stimulated neurogenesis in the adult female forebrain mediated by prolactin. *Science* 2003; 299:117–120.

100. Tanapat P, Hastings NB, Reeves AJ, Gould E. Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. *J Neurosci* 1999; 19:5792-801.
101. Taupin P: BrdU Immunohistochemistry for Studying Adult Neurogenesis: paradigms, pitfalls, limitations, and validation. *Brain Res Rev*, 2007; 53: 198–214
102. Trejo JL, Carro E, Torres-Aleman I. Circulating insulin-like growth factor I mediates exercise-induced increases in the number of new neurons in the adult hippocampus. *J Neurosci* 2001; 21(5):1628–34.
103. Van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci* 1999, 2: 266 –270.
104. Van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Neural consequences of environmental enrichment. *Nat Rev Neurosci* 2003: 191 –198.
105. Wallace CS, Kilman VL, Withers GS, Greenough WT. Increases in dendritic length in occipital cortex after 4 days in differential housing in weanling rats. *Behavioral and Neural Biology* 1992. 58:64-68
106. Will B, Galani R, Kelche C, Rosenzweig MR. Recovery from brain injury in animals: Relative efficacy of environmental enrichment, physical exercise or formal training (1990 –2002). *Prog Neurobiol* 2004, 72: 167 –182.
107. Winner B, Cooper-Kuhn CM, Aigner R, Winkler J, Kuhn HG. Long-term survival and cell death of newly generated neurons in the adult rat olfactory bulb. *Eur J Neurosci* 2002, 16:1681-1689.
108. Witter MP, Groenewegen HJ, Lopes da Silva FH, Lohman AHM. Functional organization of the extrinsic and intrinsic circuitry of the parahippocampal region. *Prog Neurobiol* 1989; 33:161–254.
109. Yoshimizu T, Chaki S., Increased cell proliferation in the adult mouse hippocampus following chronic administration of group II metabotropic glutamate receptor antagonist, MGS0039. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 315(2):493-6.
110. Zhao. C, Teng. E.M, Summers. R.G. Ming.G.L, Gage.F.H. Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *J. Neurosci.*, 2006, 26:3–11.
111. Zigova T, Pencea V, Wiegand SJ, Luskin MB. Intraventricular administration of BDNF increases the number of newly generated neurons in the adult olfactory bulb. *Mol Cell Neurosci* 1998; 11:234-45