



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

DETERIORO DE LA NEUROGÉNESIS HIPOCAMPAL EN EL ADULTO A TRAVÉS DEL BLOQUEO DEL COTRANSPORTADOR IÓNICO NKCC1 Y SU EFECTO SOBRE EL APRENDIZAJE Y LA MEMORIA DE MIEDO AL CONTEXTO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA  
GIBRÁN GÓMEZ CORREA

DIRECTORA DE TESIS  
DRA. ANGÉLICA ZEPEDA RIVERA  
[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

JURADO DE TESIS  
DRA. DIANA MARÍA ESCALANTE ALCALDE  
[Instituto de Fisiología Celular](#)  
DRA. MARTHA LILIA ESCOBAR RODRÍGUEZ  
[Facultad de Psicología](#)  
DR. JESÚS CHIMAL MONROY  
[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)  
DR. JOSÉ ALONSO FERNÁNDEZ GUAISTI  
[Facultad de Medicina](#)  
DR. JAIME IVÁN VELASCO VELÁZQUEZ  
[Instituto de Fisiología Celular](#)

Ciudad Universitaria, Ciudad de México.

Mayo, 2018.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

# ÍNDICE

<b>AGRADECIMIENTOS</b>	2
<b>ABREVIATURAS</b>	3
<b>RESUMEN</b>	5
<b>INTRODUCCIÓN</b>	6
<b>Aprendizaje y memoria</b>	6
<b>Neurogénesis hipocampal adulta</b>	7
<b>Impacto funcional de la neurogénesis adulta</b>	9
<b>El papel del GABA en la maduración de las neuronas jóvenes</b>	11
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	16
<b>HIPÓTESIS</b>	16
<b>OBJETIVO</b>	16
<b>METODOLOGÍA</b>	16
<b>Sujetos</b>	16
<b>Materiales y métodos</b>	16
<b>RESULTADOS</b>	20
<b>Análisis histológico</b>	20
<b>Análisis anatómico de las células DCX+</b>	20
<b>Densidad de DCX</b>	21
<b>Longitud dendrítica</b>	22
<b>Número de dendritas</b>	24
<b>Ángulos de crecimiento de las dendritas primarias</b>	25
<b>Análisis conductual</b>	25
<b>DISCUSIÓN</b>	26
<b>CONCLUSIÓN</b>	29
<b>REFERENCIAS</b>	30

## **AGRADECIMIENTOS**

La oportunidad de haber estudiado y realizado un proyecto de investigación en la máxima casa de estudios de México representa para mi un enorme orgullo. Agradezco a la UNAM por haberme regalado esta experiencia y permitirme formar parte de su alumnado.

Por supuesto, nada de esto habría sido posible sin el inmesurable apoyo y amor de mis padres y hermanos, les agradezco infinitamente porque siempre estuvieron viendo por mi bienestar y mi crecimiento.

A la Doctora Ángélica Zepeda, le agradezco tantísima paciencia y su excelente labor como tutora. Por ser siempre entusiasta, por fomentar en mi el estudio autocrítico y por recordarme cuan apasionante es la ciencia, muchas gracias.

A mis compañeros de laboratorio, por las risas, por su constante ayuda, por sus siempre atinadas observaciones y consejos, por soportar mis canciones y por su amistad, muchas gracias chicos.

A la Doctora Clorinda Arias por dejarme participar en el laboratorio 5 de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, y a la Técnico Académico Patricia Ferrera, por su guía y apoyo durante mi estancia, muchas gracias.

A los Doctores Federico Bermúdez y Francisco Sotres, que formaron parte de mi comité tutorial, por sus siempre bienvenidas críticas y consejos a este trabajo de investigación, muchas gracias.

A los Doctores Diana Escalante, Martha Escobar, Jesús Chimal, Alonso Fernández e Iván Velasco, por aceptar formar parte del comité jurado de esta tesis y por sus apreciadas observaciones, muchas gracias.

En particular, agradezco a las instituciones que hicieron posible este proyecto con los apoyos PAPIIT IN 203015 y CONACYT 176589. Y también con la Beca Nacional CONACYT no. 384444.

## ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleíco
ARN	Ácido ribonucleico
BrdU	Bromodesoxiuridina
CREB	cAMP response element-binding protein, en inglés
CLC2	Canales de cloro dependientes de voltaje tipo 2
DAPI	Diamino fenilindol
DCX	Doblecortina
DG	Giro dentado hipocampal, por sus siglas en inglés
$E_{GABA}$	Potencial reversionador de GABA
GABA	ácido $\gamma$ -aminobutírico
GD	Giro dentado del hipocampo
GFP	Proteína verde fluorescente, por sus siglas en inglés
ICV	Intracerebroventricular

KCC2	Isoforma 2 del cotransportador de K <sup>+</sup> y Cl <sup>-</sup>
ML	Capa molecular, por sus siglas en inglés
NeuN	Antígeno nuclear neuronal, por sus siglas en inglés
NKCC1	Isoforma 1 del cotransportador de Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> y 2Cl <sup>-</sup>
shRNA	ARN de asa corta, por sus siglas en inglés

## RESUMEN

Los cambios estructurales y funcionales en zonas particulares del cerebro, entre ellos la neurogénesis, o la generación, maduración e integración de nuevas neuronas en el giro dentado del hipocampo (GD), sustentan algunos procesos de aprendizaje y memoria. Diversas aproximaciones experimentales que eliminan el proceso neurogénico del giro dentado han demostrado que este es esencial para el desempeño adecuado de tareas cognitivas como la memoria espacial, la memoria contextual, la memoria de reconocimiento y la separación de patrones. Durante etapas tempranas de su desarrollo, los precursores neuronales y las neuronas jóvenes expresan el cotransportador a  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  NKCC1, el cual participa en el establecimiento de gradientes iónicos y por lo tanto en las propiedades electroquímicas características de estas células. Evidencia experimental muestra que el bloqueo del cotransportador previene la adecuada maduración morfológica de las nuevas neuronas. Sin embargo, se desconoce la repercusión de esta alteración en la conducta. Ello resulta de interés ya que existen fármacos como la bumetanida, un inhibidor con alta especificidad por el cotransportador NKCC1, que se utilizan como diuréticos y se plantea su empleo como agentes terapéuticos en conjunto con las benzodiazepinas para tratar la epilepsia. El objetivo de este estudio fue evaluar la modulación *in vivo* de la maduración de las neuronas del giro dentado generadas en la etapa adulta y analizar el impacto de dicha modulación sobre el aprendizaje y la memoria contextual. Para ello se administró bumetanida a ratas jóvenes-adultas de 12 semanas de edad de forma crónica durante 28 días y al término de la infusión se analizó el aprendizaje y la memoria aversiva al contexto. Se obtuvieron los cerebros para análisis de inmunofluorescencia contra doblecortina (DCX), una proteína del citoesqueleto de las neuronas inmaduras, y se obtuvieron imágenes por microscopía confocal para el análisis de diferentes parámetros estructurales asociados a la maduración de las neuronas jóvenes. Los resultados muestran que la densidad de DCX disminuye en los animales tratados con bumetanida y la capa granular inferior está particularmente afectada. Así mismo, la longitud de las dendritas primarias está significativamente disminuida en la cresta y capa granular inferior y tanto la longitud dendrítica total, como la cantidad de dendritas por zona, se observaron disminuidas en la capa granular superior. Se detectaron diferencias en relación al ángulo de crecimiento de las dendritas en la cuchilla inferior y; las pruebas conductuales muestran que tanto el proceso de aprendizaje, como el de memoria aversiva contextual es igual entre grupos. Estos datos muestran que aun cuando la bumetanida tiene un efecto negativo sobre la maduración de las neuronas jóvenes nacidas en la etapa adulta, ello no afecta significativamente el proceso de aprendizaje y memoria aversiva contextual.

**Palabras clave:** Neurogénesis, NKCC1, Bumetanida.

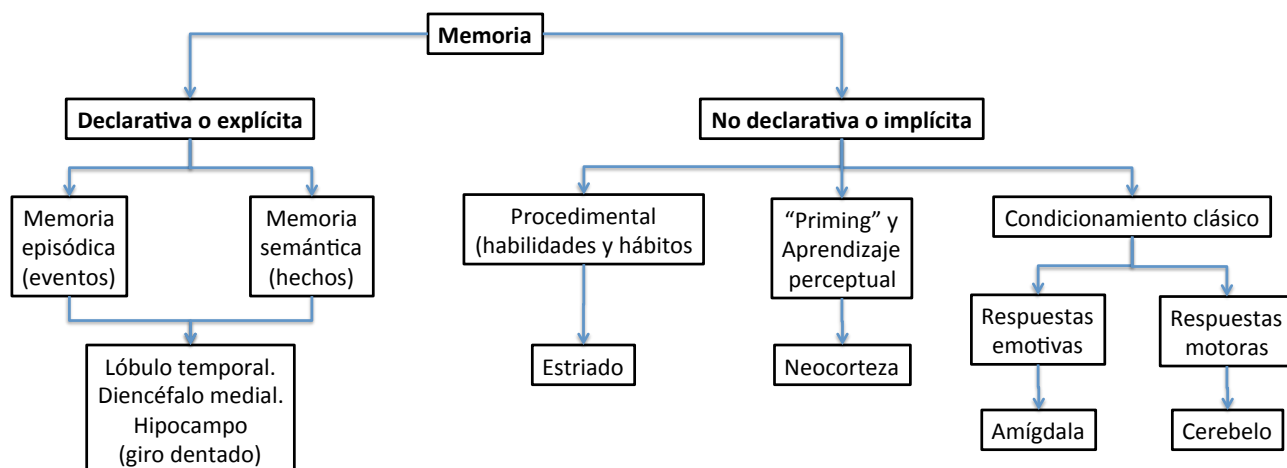
## INTRODUCCIÓN

### *Aprendizaje y memoria*

Los individuos nacen sin conocimientos sobre su ambiente y es a través de la experiencia que adquieren la información necesaria para modificar su conducta y procurar su sobrevivencia. El aprendizaje, o la obtención de nueva información del medio, y la memoria, o en conjunto los procesos de codificación, almacenamiento y recuperación de la información adquirida son la base de la adaptabilidad funcional de la conducta (Kandel y cols., 2001).

Hay formas de aprendizaje que requieren del uso de los sentidos y de una eficiente codificación para cada tipo de estímulo, lo cual depende de estructuras cerebrales diferentes e interconectadas (Kandel y cols., 2001). Por ejemplo, la capacidad de integrar un conjunto de elementos en un contexto depende del hipocampo, la corteza prefrontal medial y la amígdala (Maren y cols., 2013; Rudy, 2009).

La memoria se ha clasificado en explícita o declarativa e implícita o no declarativa (Figura 1). La primera se refiere a la memoria de tipo episódica, que es la capacidad de recordar los acontecimientos de la experiencia personal o eventos, y a la memoria de tipo semántica, que consiste en recuperar conocimientos objetivos o hechos (Kandel y cols., 2001). La memoria no declarativa por otra parte, abarca los procesos mentales que no requieren de un proceso de recuperación voluntario, como las habilidades motoras, la percepción, y las emociones (Kandel y cols., 2001).



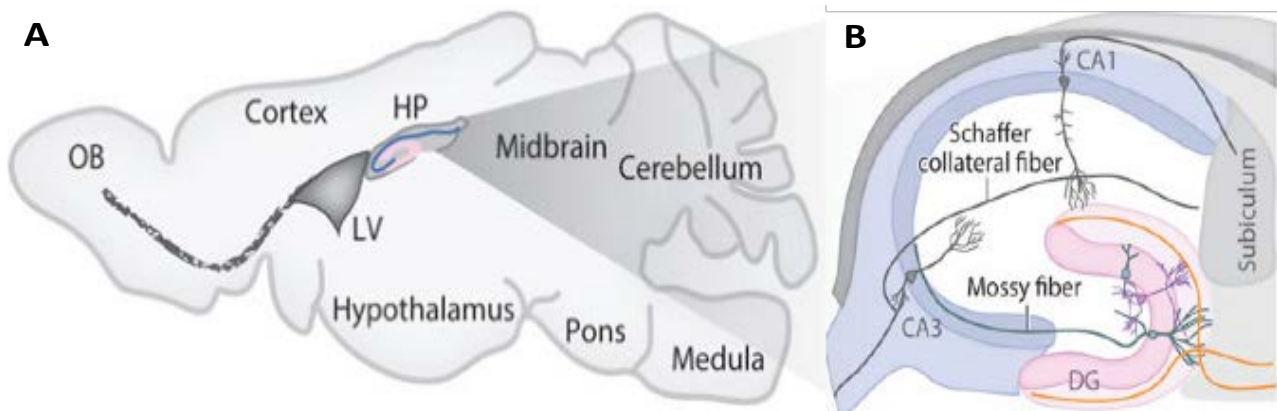
**Figura 1. Clasificación de tipos de memoria.** Se ha elaborado una clasificación de los tipos de memoria gracias al conocimiento adquirido a partir de la práctica clínica y la experimentación animal. Tomado de Kandel y cols., 2001.

El funcionamiento adecuado del circuito hipocampal (Figura 2) es crucial en la memoria de tipo episódica y está particularmente involucrado en resolver tareas que comprenden relaciones espaciales, como la separación de patrones: la capacidad de eliminar la redundancia de eventos o contextos similares de forma que puedan ser diferenciados (Maren y cols., 2013; Whissell y cols., 2013; Cameron y Glover, 2015; Aimone y cols., 2011).

La separación de patrones involucra además la capacidad de los individuos de recordar elementos clave de un ambiente como la presencia de estímulos aversivos, así entonces el hipocampo es también fundamental para recordar contextos (Koehl y Abrous, 2011; Maren y cols., 2013). Para el estudio del aprendizaje y la memoria de tipo contextual se pueden utilizar diferentes pruebas, como la prueba de condicionamiento aversivo al contexto, que



consiste en generar condicionamiento entre un estímulo aversivo (e. g. un choque eléctrico) y un contexto. A medida que el individuo se condiciona o aprende, despliega una conducta de inmovilidad. Al colocar al individuo nuevamente a el contexto de condicionamiento, pero sin la administración de los choques, se puede analizar si el individuo recuerda este contexto como aversivo ya que presenta la conducta de inmovilidad aun en ausencia del estímulo aversivo. El tiempo de inmovilidad observado es un indicador de la capacidad del individuo de recordar el contexto (Curzon y cols., 2009; Maren y cols., 2013).



**Figura 2. La formación hipocampal en el cerebro de la rata.** **A.** En este esquema se muestra a la izquierda una ilustración del corte sagital del cerebro de una rata y la localización de la formación hipocampal (HP) respecto a otras estructuras cerebrales como el bulbo olfatorios (olfactory bulb, OB, por sus siglas en inglés), la corteza (cortex, en inglés), el mesencéfalo (midbrain, en inglés), el cerebelo (cerebellum, en inglés), el ventrículo lateral (lateral véntriculo, LV, por sus siglas en inglés), el hipotálamo (hypothalamus, en inglés), el puente (pons, en inglés) y la médula espinal (medula, en inglés). **B.** Se observan los componentes de la formación hipocampal como las zonas CA1 y CA3, el giro dentado (dentate gyrus, DG, por sus siglas en inglés) y las conexiones entre ellos: las fibra colaterales de Schaffer (Schaffer collateral fiber, en inglés) y las fibras musgosas (Mossy fibers, en inglés). También se representan las neuronas piramidales de CA1 y CA3 en gris; y sobre el giro dentado: una neurona granular en desarrollo y otra madura en verde la cual ya tiene proyecciones a CA3, y una interneurona en morado. Modificado de: Christian y cols., 2014.

Investigaciones de la última década adjudican al nacimiento de nuevas neuronas o neurogénesis en el giro dentado del hipocampo un papel preponderante tanto en la separación de patrones, como en la memoria aversiva contextual (Koehl y Abrous, 2011).

### **Neurogénesis hipocampal adulta**

En el cerebro suceden continuamente fenómenos de plasticidad a nivel estructural y funcional, que además son los principios fisiológicos que le permiten a un individuo aprender y recordar (Bliss y cols., 2007). Uno de los cambios plásticos que ocurren en el cerebro es el fortalecimiento sináptico, que se traduce en la potenciación a largo plazo, la capacidad de las neuronas para facilitar la generación de respuestas eléctricas en función de su actividad sináptica previa, y se le ha propuesto como un mecanismo que modula la codificación de la nueva información (Bliss y cols., 2007; Deng y cols. 2009).

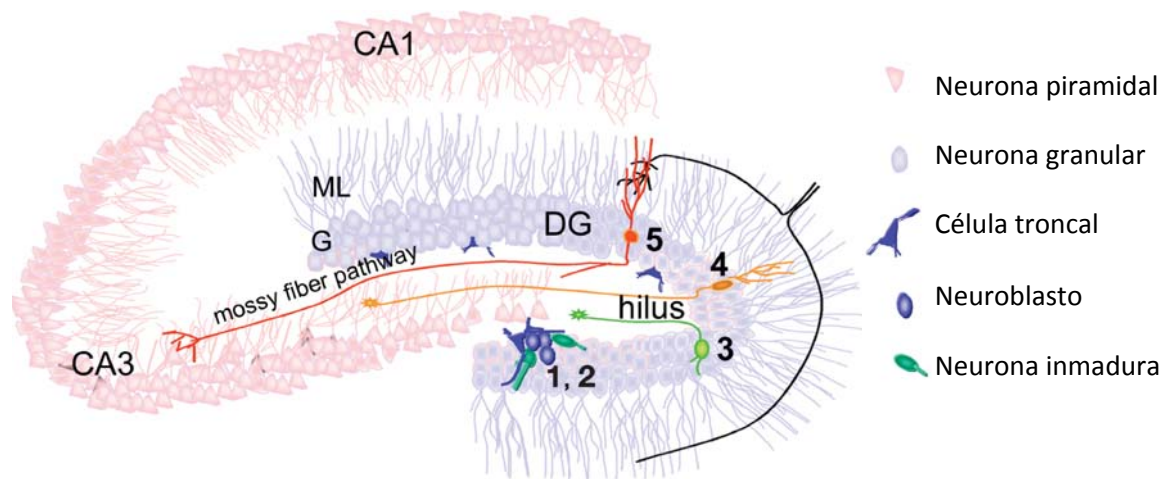
Otro de los cambios plásticos que se asocian a algunos tipos de aprendizaje y de memoria es la generación de nuevas neuronas (Ming y Song, 2005; Deng y cols., 2009; Palloto y Deprez, 2014). La continua generación de células neuronales y su integración en los circuitos cerebrales ocurre a lo largo de la ontogenia de los animales, incluso en la etapa adulta, aunque decae con el envejecimiento (Kuhn y cols., 1996; Gage, 2000; Marin y Schinder, 2012). Este proceso, denominado neurogénesis, es una forma en que zonas discretas del cerebro

adicionan nuevos elementos celulares (Kempermann, 2002; Mu y Gage, 2011; Palloto y Deprez, 2014).

La neurogénesis del giro dentado del hipocampo ha sido de particular interés debido a su papel regulador en estados emocionales como el miedo y la ansiedad (Hill y cols., 2015; Schoenfeld y Cameron, 2015), por su relación con procesos patológicos como la epilepsia (Eisch y cols., 2008), la adicción (Eisch y cols., 2008) y la depresión (Eisch y cols., 2008; Hill y cols., 2015; Schoenfeld y Cameron, 2015), así como en la conducta sexual (Leuner y cols., 2010; Kim y cols., 2013).

La neurogénesis confiere al hipocampo un conjunto de células con capacidades funcionales distintas de las neuronas maduras, como a su alta plasticidad y excitabilidad y por tanto poseen capacidades de procesamiento distintas (Christian y cols., 2014). Debido a esto también se ha estudiado su participación en los procesos de aprendizaje y memoria (Deng y cols., 2009; Mu y Gage, 2011).

En el cerebro de los mamíferos adultos la generación de nuevas neuronas está restringida a dos estructuras denominadas nichos neurogénicos (Kuhn y cols., 1996; Ming y Song, 2011). Por un lado la zona subventricular de las paredes de los ventrículos laterales produce precursores neurales que migran hacia los bulbos olfatorios donde se integran en los glomérulos y participan en los procesos de memoria olfativa (Deng y cols., 2009; Ming y Song, 2011; Palloto y Deprez, 2014). Por otra parte en la zona subgranular del giro dentado del hipocampo residen células precursoras neuronales, las cuales pueden dividirse simétricamente o generar progenitores intermedios, que a su vez pueden autorrenovarse o diferenciarse hacia neuroblastos. Estos últimos también se dividen y dan lugar a las neuronas jóvenes que migran una corta distancia hacia la zona interna de la capa granular del giro dentado, concluyendo su maduración y formando células granulares adultas (Figura 3) (Ming y Song, 2011; Palloto y Deprez, 2014).



**Figura 3. Neurogénesis en el hipocampo.** En este esquema se aprecia la evolución temporal del desarrollo de las nuevas neuronas: 1. En el giro dentado (DG) las células troncales dan origen a precursores neurales y después a neuroblastos. 2. Los neuroblastos migran desde la zona subgranular a la capa granular (G) conformada principalmente por células granulares. 3. Una vez concluida su fase mitótica, los neuroblastos se diferencian a neuronas inmaduras y envían proyecciones eferentes hacia la región CA3 del hipocampo a través de la vía de fibras musgosas (mossy fiber pathway). 4. En esta zona las proyecciones eferentes de las neuronas inmaduras se conectan con las células piramidales. 5. Al mismo tiempo las neuronas inmaduras reciben aferentes de la corteza entorrinal en sus proyecciones dendríticas que crecen hacia la capa molecular (ML). Modificado de Ming y Song, 2005.

Aproximadamente a los 5 días de su nacimiento, los precursores neuronales del giro dentado hipocampal reciben primeramente entradas GABAérgicas de interneuronas del hilus y de la zona subgranular así como de las de células hiedra (Ivy cells, en inglés); posteriormente reciben entradas glutamatérgicas de las vías perforantes medial y lateral y finalmente reciben entradas perisomáticas GABAérgicas desde las células en canasta (basket cells, en inglés) además de conexiones axo-axónicas de células en candelabro (chandelier cells, en inglés). Los precursores continúan su diferenciación hacia neuronas jóvenes y continúan su maduración integrándose a la capa granular del GD. A las 4 semanas las células nuevas envían proyecciones a la capa molecular del giro dentado donde reciben aferentes de la corteza entorrinal (Ming y Song, 2011; Palloto y Deprez, 2014) mientras que las proyecciones eferentes se dirigen al *stratum lucidum* y al *stratum oriens* de la región CA3 (Ming y Song, 2011; Palloto y Deprez, 2014).

El desarrollo adecuado de los precursores neuronales y su desempeño en los circuitos locales depende de la coordinación de una variedad de estímulos endógenos que intervienen en la proliferación celular, la formación de circuitos neurales, y la formación estructural y morfológica (Ben-Ari, 2002; Bordey, 2007; Epp y cols., 2013). Por ejemplo un indicador estructural del apropiado desarrollo de las neuronas granulares en el giro dentado es el ángulo de crecimiento de las dendritas primarias. En condiciones fisiológicas normales las neuronas granulares tienen una morfología bipolar, teniendo una única dendrita que se proyecta en un ángulo recto, respecto del borde entre la capa granular y el hilus hacia la capa molecular del giro dentado. La interrupción de la expresión de *Cdk5*, un gen que participa en la migración neuronal y la extensión de neuritas en neuronas jóvenes nacidas durante la etapa adulta del ratón, produce la aparición de dendritas con ángulos de crecimiento aberrantes que resultan en la extensión de las dendritas primarias hacia el hilus o a lo largo de la capa granular (Jessberger y cols., 2008). También el bloqueo de la actividad de miR-338-3p, el cual es un micro ARN que se expresa prioritariamente en neuronas del giro dentado, genera la aparición de dendritas de neuronas granulares con ángulos aberrantes de crecimiento (Howe y cols., 2017).

Entre otros tipos de estímulos endógenos que regulan la neurogénesis se encuentra la activación por neurotransmisores, importantemente aquellos mediados a través del ácido-  $\gamma$ -aminobutírico (GABA, por sus siglas en inglés) (Ge y cols. 2006; Bordey, 2007; Epp y cols., 2013). El GABA se presenta como el principal neurotransmisor inhibitorio en el cerebro adulto. Sin embargo, durante el desarrollo funciona como estímulo despolarizante y constituye una señal que promueve la maduración neuronal, la proliferación y migración de neuroblastos así como la formación de sus sinapsis y su plasticidad sináptica (Epp y cols., 2013, Palloto y Deprez, 2014; Ge y cols., 2006; Kaila y cols., 2014).

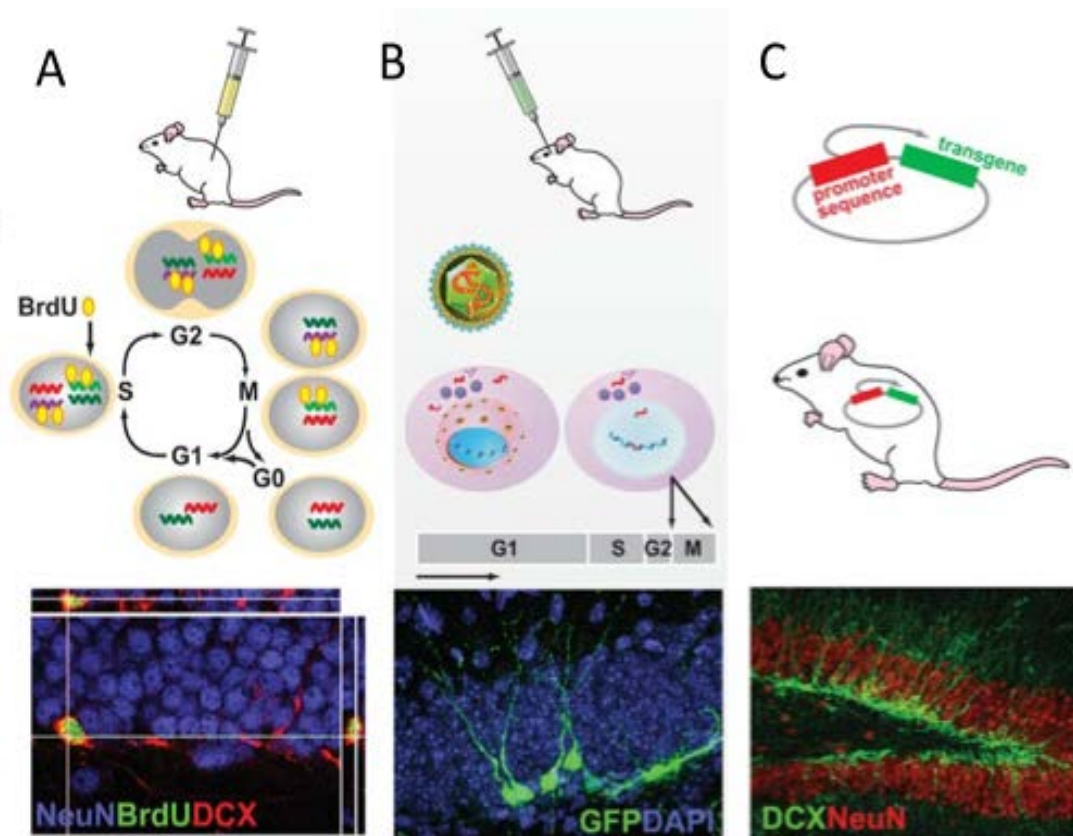
### ***Impacto funcional de la neurogénesis adulta***

Se ha propuesto que la adición de neuronas al giro dentado incrementa la capacidad resolutoria de esta estructura para la codificación de un estímulo al reclutar más elementos funcionales. De esta manera la neurogénesis estaría implicada en algunos procesos como: la separación de patrones al aumentar la capacidad de discernir entre elementos contextuales (Aimone y cols., 2011) la memoria espacial, al requerirse para recordar elementos visuales dentro de un contexto (Abrous y Wojtowicz, 2015) y la flexibilidad cognitiva, estudiado con la prueba de evitación activa de lugar (Burghardt y cols., 2012). A su vez, las aproximaciones computacionales que tratan de simular la neurogénesis hipocampal indican que este proceso aumenta la capacidad de recordar nuevas situaciones (Weisz y Argibay, 2009).

Las neuronas nacidas durante la etapa adulta representan una baja población de células en el giro dentado (5-10%). Sin embargo, presentan una mayor capacidad de plasticidad sináptica así como de excitabilidad, por lo que se ha establecido que la neurogénesis que ocurre en el hipocampo incide sobre la función de las neuronas maduras y es un factor importante para el desempeño adecuado de tareas cognitivas que dependen de esta estructura (Kempermann, 2002; Epp y cols., 2013; Maren y cols., 2013). Un ejemplo de estas tareas es el condicionamiento aversivo contextual, que es una forma de condicionamiento clásico en la que un animal aprende a relacionar las señales que componen un contexto con la aparición de un estímulo aversivo como un choque eléctrico (Maren y cols., 2013).

Existen diferentes estrategias para estudiar el impacto de la neurogénesis en individuos adultos a través de la modulación o el deterioro de este proceso como son: el ambiente enriquecido y el ejercicio voluntario, los cuales aumentan la proliferación de precursores neuronales; la irradiación del cerebro a pequeñas dosis; el tratamiento sistémico con agentes antimitóticos; y el aprovechamiento del envejecimiento como proceso natural de decremento neurogénico (Ming y Song, 2005; Deng y cols., 2009; Drew y Denny, 2010; Marin y Schinder, 2012). En la Figura 4 se esquematizan algunas de las estrategias para la identificación de nuevas células producidas en el cerebro adulto.

La participación de la neurogénesis en el adulto en los procesos mnémicos aún es un tema de controversia debido a que las diferentes aproximaciones experimentales que inducen la disminución de la neurogénesis han tenido diferentes resultados (Marin y Schinder, 2012; Oomen y cols., 2014). En el caso particular de la memoria al contexto aversivo, la administración del agente antimitótico metilazoximetanol durante 14 días no produjo una alteración de la recuperación de la memoria al finalizar el tratamiento (Shors y cols., 2002) y; la depleción de las nuevas neuronas a través de una estrategia transgénica no logró disminuir la recuperación de la memoria (Dupret y cols., 2008). Sin embargo, la irradiación  $\gamma$  local del giro dentado indujo una disminución significativa de la recuperación de la memoria (Ko y cols., 2009); la inactivación optogénica de las neuronas inmaduras de aproximadamente 4 semanas de edad disminuye el tiempo de inmovilidad en la fase de recuperación de la memoria (Gu y cols., 2012) y; la aceleración de la diferenciación de las nuevas neuronas a través de la expresión anticipada del gen pro-diferenciación PC3 disminuyen el tiempo de inmovilidad en la prueba de memoria contextual (Farioli-Vecchioli y cols., 2008). En otras pruebas conductuales que analizan el funcionamiento del hipocampo, como el laberinto de agua, el condicionamiento del parpadeo, el reconocimiento de objetos y el reconocimiento de la localización de objetos, también existen observaciones controversiales (Marin y Schinder, 2012; Oomen y cols., 2014).



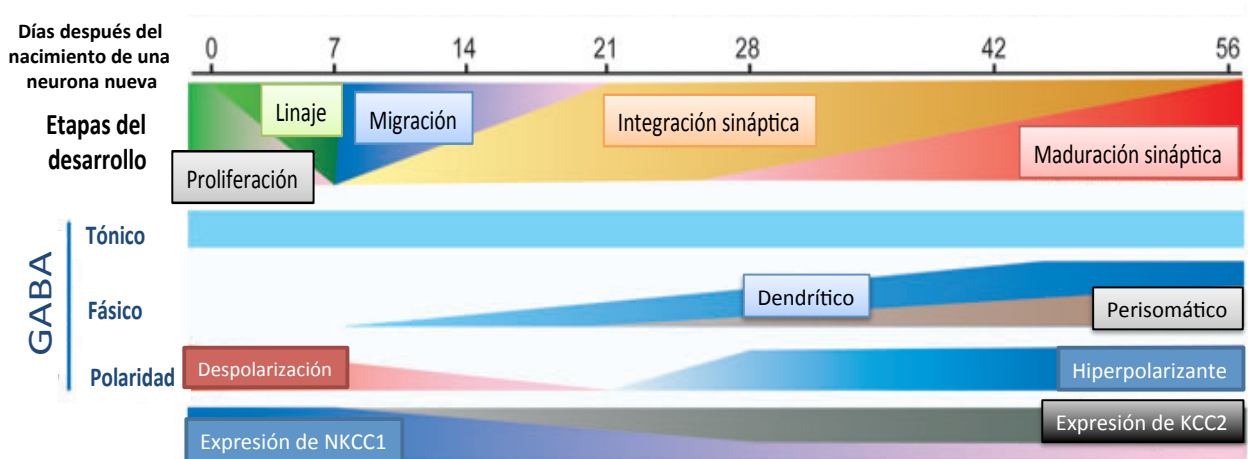
**Figura 4. Estrategias para la observación y estudio de la neurogénesis en sujetos adultos.** **A)** Incorporación de nucleótidos: La inyección sistémica de análogos de nucleótidos es útil para observar a células que sintetizan ADN y posteriormente realizan mitosis. En este caso la bromodeoxiuridina (BrdU) substituye a la timidina durante la fase de duplicación celular. En la parte inferior se muestra una fotografía de microscopía confocal que permite observar la colocalización de las marcas de inmunofluorescencia contra doblecortina (DCX) una proteína asociada al citoesqueleto de las neuronas inmaduras, NeuN, un antígeno nuclear específico de neuronas y BrdU. **B)** Marcado a través de vectores virales: la expresión de transgenes por retrovirus requiere de su incorporación en el genoma del hospedero durante la fase mitótica. Se presenta una fotografía con neuronas que expresan a la proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés) y de diamino fenilindol, (DAPI, por sus siglas en inglés), el cual es un marcador fluorescente que se une a regiones del DNA con abundantes pares de bases de adenina y timina. **C)** Expresión de marcadores específicos de neuronas inmaduras: análisis basado en la creación de un animal transgénico en el cual los reporteros se expresan bajo promotores específicos como es la DCX para neuronas inmaduras. En la parte inferior se muestra la marca de DCX y NeuN, un antígeno nuclear específico de neuronas. Modificado de Ming y Song, 2005.

### ***El papel del GABA en la maduración de las neuronas jóvenes***

La estimulación GABAérgica es particularmente importante en la maduración neuronal dado que se encuentra desde el nacimiento de los precursores neuronales y se mantiene a lo largo de su desarrollo (Ben-Ari, 2002; Ming y Song, 2005; Palloto y Deprez, 2014). Los efectos del GABA en la neurogénesis adulta son mediados a través del receptor ionotrópico GABA<sub>A</sub>, el cual se compone por distintas subunidades que forman un pentámero que conforma un canal permeable al ión Cl<sup>-</sup>. La familia de genes que codifican para las subunidades de este receptor se agrupan en 7 clases acorde a la homología en sus secuencias, encontrándose las siguientes familias con su respectivo número de miembros: familias α (1-6), β (1-3), γ (1-3), δ, ε, θ, π, y ρ (Whissell y cols., 2013; Palloto y Deprez, 2014; Cameron y Glover, 2015). Los subtipos de receptores GABA<sub>A</sub> formados por estas subunidades tienen diferencias en sus propiedades farmacológicas y funcionales (Whissell y cols., 2013; Palloto y Deprez, 2014). La despolarización GABAérgica permite la activación de canales de calcio de tipo L mediados por voltaje. La entrada de los iones Ca<sup>2+</sup> activa vías de señalización que inducen la consecuente activación del factor de transcripción CREB (cAMP response element-binding protein, en

inglés) que resulta en la regulación de la transcripción de genes involucrados en el desarrollo de las nuevas células (Palloto y Deprez, 2014; Kaila y cols., 2014).

La estimulación GABAérgica de las neuronas inmaduras en un principio y a lo largo de su ontogenia es de tipo tónico y está mediado por las moléculas de GABA en el microambiente provenientes de las interneuronas vecinas. En etapas posteriores de su desarrollo, las neuronas inmaduras reciben estímulos GABAérgicos de tipo fásico debido a la formación de sus primeras conexiones sinápticas (Figura 5) (Ben-Ari, 2002; Palloto y Deprez, 2014; Ming y Song, 2005).



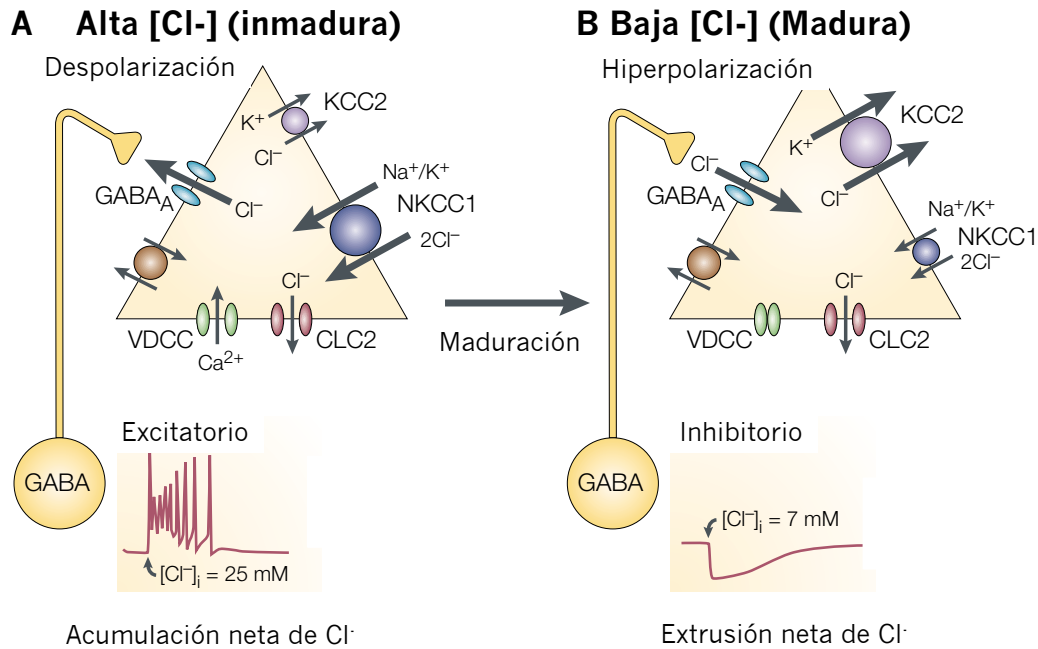
**Figura 5. Etapas del desarrollo de las neuronas nacidas durante la etapa adulta.** La nuevas células generadas en el giro dentado atraviesan distintos eventos durante su desarrollo, siendo regulados por estímulos endógenos y exógenos, entre ellos las señales mediadas por GABA de naturaleza tónica, y fásica, así como glutamatérgica. En particular, los estímulos GABAérgicos pueden tener un efecto despolarizante o hiperpolarizante en las células inmaduras, esto se ha asociado a la relación de la expresión de 2 cotransportadores iónicos: NKCC1, el cual introduce iones  $\text{Cl}^-$  a la célula y KCC2, el cual transporta iones  $\text{Cl}^-$  al exterior. Modificado de Ge y cols., 2008.

Los estímulos GABAérgico tónico y fásico son en principio de tipo excitatorio para las neuronas en desarrollo. Esto es debido a la expresión del cotransportador NKCC1, cuya actividad incrementa la concentración de  $\text{Cl}^-$  intracelular. Bajo estas condiciones, la activación GABAérgica a través de los receptores  $\text{GABA}_A$  ionotrópicos, los cuales permiten el flujo de  $\text{Cl}^-$ , provoca la salida de este ión de carga negativa y en consecuencia la despolarización de las células (Ben-Ari, 2002; Bordey, 2007).

Mientras los precursores neurales maduran, la expresión del cotransportador NKCC1 disminuye, a la vez que aumenta la del cotransportador de  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$  KCC2, cuyo papel funcional es la excreción de estos iones y en consecuencia la disminución de la concentración intracelular de  $\text{Cl}^-$ . De esta manera, la activación GABAérgica se vuelve hiperpolarizante, como es común en las neuronas maduras (Ming y Song, 2005; Blaesse y cols., 2009; Palloto y Deprez, 2014; Kaila y cols., 2014).

El cotransportador NKCC1 introduce  $\text{Cl}^-$  a la célula utilizando la fuerza del gradiente de iones sodio generado por las bombas de sodio y potasio. Por otro lado, KCC2 utiliza la fuerza del gradiente de iones potasio generado por la ATPasa de sodio y potasio para enviar iones  $\text{Cl}^-$  fuera de la célula (Ben-Ari, 2002; Ge y cols., 2006; Blaesse y cols., 2009; Palloto y Deprez, 2014).

El mantenimiento de una alta concentración de iones  $\text{Cl}^-$  en el interior de la célula permite que la activación GABAérgica sea despolarizante. Esto es debido a que el potencial reverso de GABA ( $E_{\text{GABA}}$ ), el voltaje de membrana al cual las corrientes activadas por GABA se neutralizan, es mucho mayor que el potencial de membrana celular (Ben-Ari, 2002; Kaila y cols., 2014) (Figura 6).



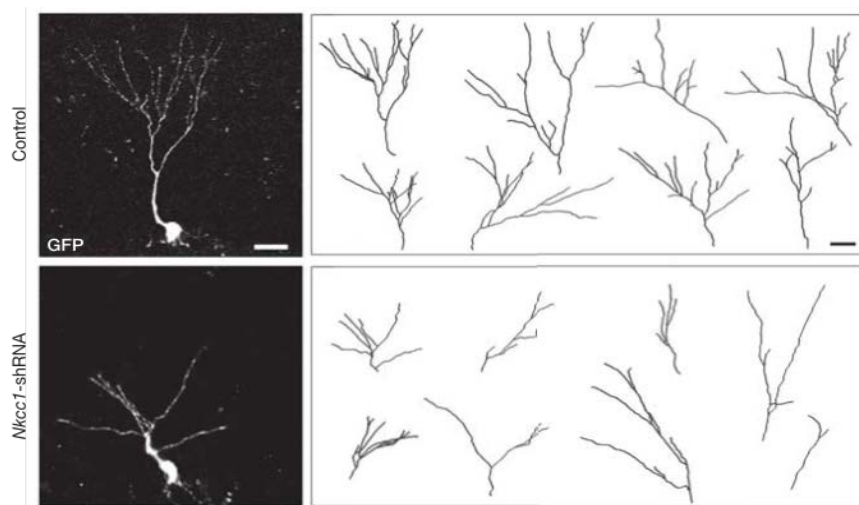
**Figura 6. Los cotransportadores iónicos NKCC1 y KCC2 generan la baja y alta concentración de  $\text{Cl}^-$  en neuronas inmaduras y maduras, respectivamente.** La expresión de estos cotransportadores depende del estado de desarrollo de las células neuronales. **A.** En los precursores neuronales, existe una alta expresión del cotransportador NKCC1, que genera una alta concentración intracelular de iones  $\text{Cl}^-$ , de manera que la activación GABAérgica inducirá una respuesta despolarizante por la salida de  $\text{Cl}^-$  a través de los receptores a GABA tipo A ( $\text{GABA}_A$ ) que puede estar acompañada por la apertura de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje (VDCC, por sus siglas en inglés). **B.** En cambio en las neuronas maduras predomina el cotransportador KCC2, que genera bajas concentraciones intracelulares de iones  $\text{Cl}^-$ , haciendo que las respuestas a GABA sean hiperpolarizantes. Los canales de cloro dependientes de voltaje tipo 2 (CLC2, por sus siglas en inglés) funcionan como un rectificador de la corriente de cloro. Modificado de Ben-Ari, 2002.

El cambio del efecto despolarizante del neurotransmisor GABA por uno hiperpolarizante en las neuronas en desarrollo durante la etapa adulta, a través del silenciamiento del cotransportador NKCC1, genera defectos en la integración sináptica y el desarrollo dendrítico (Figura 7), por lo que se ha planteado que la activación GABAérgica tiene un papel importante en la maduración y funcionalidad de las nuevas neuronas (Ge y cols., 2006; Palloto y Deprez, 2014).

Estas observaciones tienen relevancia clínica debido a que el NKCC1 es un blanco de fármacos, como la furosemida y la bumetanida, que son usados actualmente como diuréticos y en el tratamiento de edema cerebral (Walcott y cols., 2012). La bumetanida es un inhibidor selectivo del cotransportador NKCC1, al cual se une con alta afinidad. En pruebas clínicas se plantea su posible uso en conjunto con antiepilépticos en pacientes pediátricos (Hannaert y cols., 2002; Dzhala y cols., 2005).

De hecho, se ha observado que la bumetanida bloquea la despolarización producida por el neurotransmisor GABA en neuronas en desarrollo (Figura 8) a través de la inversión de los

potenciales de membrana y reversor de GABA, que en consecuencia da lugar a la activación GABAérgica de naturaleza hiperpolarizante (Wang y Kreigstein, 2011).

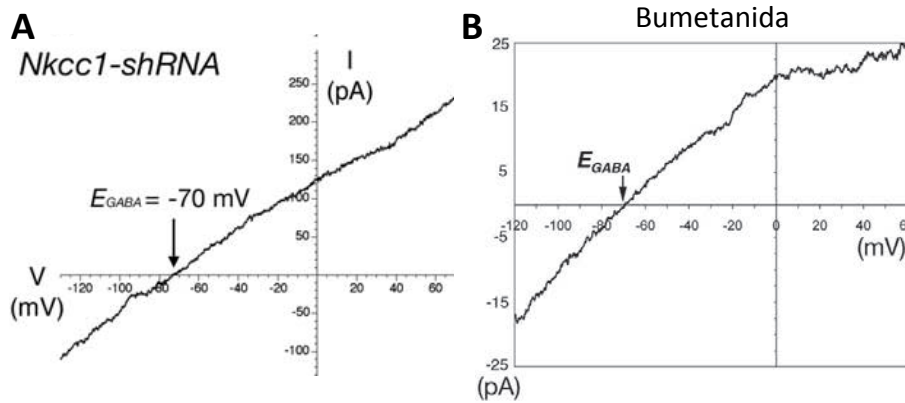


**Figura 7. Efecto del silenciamiento del gen *Nkcc1* en la arborización dendrítica de neuronas inmaduras.** El silenciamiento de la expresión del contransportador NKCC1 interfiere en la arborización dendrítica de las nuevas neuronas generadas en el adulto, disminuyendo la longitud de las neuritas y la cantidad de divisiones en sus proyecciones. Tomado de Ge y cols., 2006.

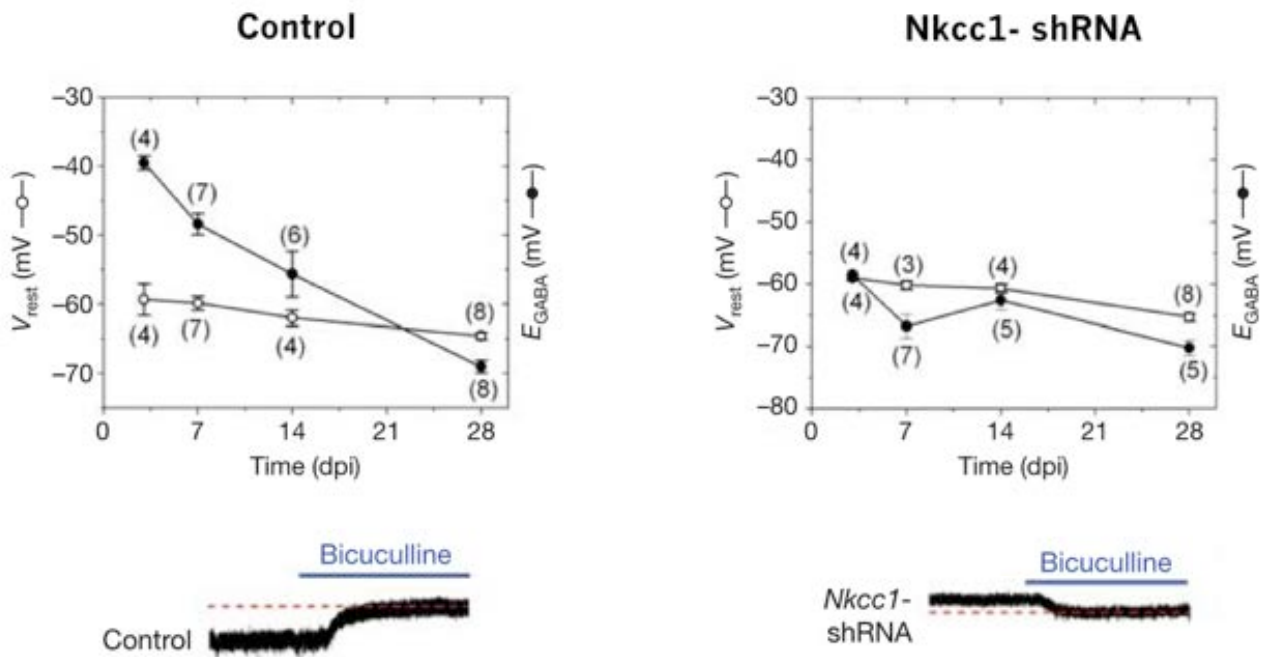
En vista del papel del GABA en la maduración neuronal, estudios previos han evaluado el bloqueo de las señales GABAérgicas tempranas en el desarrollo de las nuevas neuronas en el ratón adulto (Ge y cols., 2006; Ge y cols. 2008). Los resultados muestran que en la preparación de rebanadas de cerebro, el bloqueo de las corrientes tónicas de neuronas con la expresión de un shRNA (short hairpin RNA, por su nombre en inglés) dirigido al ARN de *Nkcc1* e integrado a través de un vector viral, genera un cambio en la relación entre el potencial de membrana en reposo ( $V_{rest}$ ) y el potencial reverso de GABA ( $E_{GABA}$ ) (Figura 9) (Ge y cols., 2006). Mas aún, la carencia de expresión de NKCC1 por este medio impide las respuestas fásicas o sinápticas, tanto a GABA, como a glutamato. También el porcentaje de nuevas células que reciben impulsos GABAérgicos y glutamatérgicos disminuye por la falta de expresión de *Nkcc1*. Así, se ha podido determinar que las señales mediadas por el NKCC1 son fundamentales para el correcto desarrollo morfológico, electrofisiológico y sináptico de neuronas jóvenes en el individuo adulto (Ge y cols., 2006; Ge y cols. 2008).

Dados estos antecedentes, en el presente trabajo nos propusimos analizar los efectos del bloqueador farmacológico del canal NKCC1 en un sistema *in vivo* y evaluar si la maduración estructural de las nuevas neuronas se alteraba y si ello incidía en procesos particulares de aprendizaje y memoria. Al mismo tiempo resulta importante observar el efecto que tiene la bumetanida en la neurogénesis, dado que es un fármaco con un gran potencial para utilizarse en el tratamiento de la epilepsia en neonatos. Sin embargo, no se ha hecho énfasis en los posibles efectos negativos que la administración de bumetanida pueda tener en el proceso neurogénico en esta etapa crítica del desarrollo. Por otro lado, el uso de la bumetanida en eventos patológicos en los cuales la barrera hematoencefálica se encuentra alterada y permeable, como en el edema cerebral por traumatismo, y su capacidad de atravesar esta barrera en condiciones fisiológicas normales, hacen necesario conocer si la bumetanida tiene un impacto funcional en la neurogénesis del hipocampo y si esto tiene un impacto a nivel cognitivo y conductual.





**Figura 8. Efecto del bloqueo de la actividad del cotransportador iónico NKCC1 en los potenciales de membrana y reverso a GABA de neuronas inmaduras corticales.** A pesar de utilizar dos estrategias muy diferentes para eliminar la actividad del cotransportador NKCC1 en crías recién nacidas de ratón, (en **A** el silenciamiento del gen en neuronas inmaduras corticales desde etapas embrionarias y en **B** la administración de bumetanida a una dosis de 0.2 mg/Kg en madres preñadas) el efecto final sobre la inversión de los potenciales  $V_{rest}$  y  $E_{GABA}$  (-70 mV) es muy similar, por lo que podría inferirse que el efecto antagónico de la bumetanida sobre NKCC1 es equiparable al del silenciamiento de *Nkcc1*. Esto denota la efectividad del fármaco en inducir un bloqueo de la actividad GABAérgica en los precursores neurales. **A)** tomado de Wang & Kreigstein, 2008; y **B)** tomado de Wang y Kreigstein, 2011.



**Figura 9. Cambios en la naturaleza de la activación GABAérgica después del silenciamiento de *Nkcc1*.** Las células en desarrollo de las ratas control muestran propiedades electrofisiológicas normales. Es importante notar que la inversión de los potenciales  $V_{rest}$  y  $E_{GABA}$  sucede en etapas tardías de la neurogénesis y en las neuronas maduras. Por otro lado, el silenciamiento de la expresión del cotransportador *Nkcc1* invierte los valores de los potenciales desde etapas muy tempranas del desarrollo de las nuevas células. La diferencia en la inducción de las corrientes GABAérgicas tónicas cambia de polaridad entre los sujetos control y los sujetos con el silenciamiento de *Nkcc1*, de manera que las corrientes tónicas en condiciones fisiológicas son excitatorias, dado que la activación por GABA induce la salida de iones  $Cl^-$  porque se encuentran más concentrado dentro de la célula por la actividad del cotransportador. La infusión de la bicuculina (bicuculline, en inglés), un antagonista de los receptores  $GABA_A$ , crea una corriente inhibitoria en el grupo control y una corriente excitadora en el grupo con el silenciamiento. Modificado de Ge y cols., 2008.

## JUSTIFICACIÓN

La función nerviosa puede afectarse por variaciones en el número de células que se producen durante la etapa adulta y por la reducción en el nacimiento de las mismas. Sin embargo, se desconoce si el interferir en la maduración de las nuevas neuronas nacidas durante la etapa adulta tiene algún impacto en procesos aprendizaje y memoria dependientes del giro dentado.

## HIPÓTESIS

La bumetanida deteriorará la progresión de la maduración de neuronas inmaduras del giro dentado hipocámpal en el cerebro adulto, comprometiendo las funciones mnémicas dependientes de esta estructura.

## OBJETIVO

Evaluar el efecto de la infusión crónica de bumetanida sobre la maduración de neuronas nacidas en la etapa adulta y analizar el impacto de esta manipulación en los procesos de aprendizaje y memoria de miedo al contexto.

## MÉTODOLOGÍA

### *Sujetos*

Se utilizaron 14 ratas macho de la cepa Wistar de 250-350 g. Los animales se mantuvieron en condiciones estándar de bioterio, en un ciclo de luz-oscuridad invertido 12 h/12 h con encendido de las luces a las 19 h, con alimento y agua *ad libitum*. Los sujetos se dividieron en 2 grupos experimentales acorde a la solución administrada vía intracerebroventricular (icv): la sustancia excipiente propilenglicol, o esta misma combinada con bumetanida.

### *Materiales y métodos*

*Bumetanida* (Santa Cruz Biotech, E.U.A.). Se utilizó una dosis de 0.4 mg/kg por día. Se utilizó como excipiente al propilenglicol (Sigma Aldrich, E.U.A.) dado que es una sustancia en la que la bumetanida es completamente soluble. Se colocó en promedio una dilución de 3.92 mg de bumetanida en 200 µL del excipiente dentro de la bomba osmótica.

*Preparación de bombas osmóticas.* Se utilizaron mini-bombas osmóticas de liberación prolongada de 0.5 µl/h; 14 días (Alzet, E.U.A., Modelo 2002). Se utilizaron 2 bombas osmóticas por sujeto, implantando una en un inicio y reemplazándola con una nueva a los 14 días de realizado el primer implante. Las bombas se llenaron con una solución de bumetanida en propilenglicol o sólo con propilenglicol como control, posteriormente se colocaron en un baño de solución salina 0.9% a 37°C durante 6 horas para inducir el bombeo adecuado; la implantación de la bomba se realizó una vez concluido este periodo de equilibrio de bombeo.

*Implante intracerebroventricular (icv) de la minibomba osmótica.* Todos los procedimientos quirúrgicos se realizaron bajo el código de ética del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM y minimizando en lo posible el malestar de los animales. Se utilizó el anestésico gaseoso isoflurano al 2% en una mezcla de O<sub>2</sub> 95% y CO<sub>2</sub> 5%, y se montó a los animales en

un instrumento estereotáxico (Kopf, E.U.A.). Se realizó una incisión en el eje anteroposterior en la línea media del cráneo y se procedió a perforar en el lado derecho en las coordenadas antero-posterior -1.4 mm, medio-lateral -2.0 mm respecto del bregma tomando de referencia el Atlas de Paxinos y Watson 2010. Se utilizó un kit de infusión cerebral (Brain infusion kit 2; Alzet, E.U.A.), con una cánula de penetración de 3-5 mm, la cual se pegó a la torre vertical del estereotáxico y se introdujo en el eje dorso-ventral a -4.0 mm respecto del bregma para que la salida de la cánula llegase al ventrículo lateral derecho; el sostén de la cánula se fijó al cráneo con cemento dental (MDC Dental, E.U.A.). A continuación se retrajo tejido subcutáneo del área dorsal del animal y se colocó la mini bomba osmótica para después conectarla al infusor implantado al cerebro por medio de un catéter plástico. Se suturó la piel del animal, se aplicó el analgésico inyectable lidocaína/epinefrina (PiSA, México), se le retiró la anestesia y se mantuvo en observación durante 1 hora después de la cual se regresó a su caja habitación. A los 14 días se realizó el reemplazo de las bombas de manera que la bumetanida o solución control se liberó durante 28 días.

*Habitación.* Los días 24 a 26 después de realizado el implante de la minibomba, se habituó a los animales al experimentador y al cuarto de condicionamiento. Para ello, el experimentador manipuló al sujeto durante 10 min por día en la sala de experimentación.

*Prueba de campo abierto.* Se utilizó una arena de acrílico negro de 80x80x30 cm, dividida con líneas blancas en 16 cuadrantes iguales de 20x20 cm. Este procedimiento se realizó al día 27 después de hecho el implante. El objetivo de realizar esta prueba fue comprobar que la inmovilidad que presentan los animales en la inducción de la evocación después del condicionamiento aversivo fuera debido al resultado del condicionamiento y no a efectos motores o de ansiedad asociados a las infusiones o el procedimiento quirúrgico. Para la realización de esta prueba, se colocó a un sujeto en el centro de la caja y se observó durante 5 min. Se evaluó su conducta exploratoria con el conteo de cruces entre las divisiones virtuales del piso de la caja.

*Condicionamiento aversivo al contexto.* Se utilizó una cámara (caja) de condicionamiento de 25 cm de largo x 25 cm de ancho y 20 cm de alto (San Diego Instruments, E.U.A.). Las paredes y el techo son de acrílico transparente y el piso está formado por una rejilla de 23 tubos de acero inoxidable por medio de los que se puede pasar corriente eléctrica de duración e intensidad regulables. La cámara cuenta además con una red de rayos infrarrojos que se mantienen encendidos durante la prueba de manera que permiten el registro del movimiento de los animales cuando la continuidad del trayecto de los rayos se interrumpe. Los datos correspondientes a los lapsos en los que se interrumpieron los rayos se envían automáticamente a una computadora y se les grafica como "tiempo de inmovilidad" del sujeto. Tanto la programación de los choques eléctricos, como la detección de la interrupción de la red de rayos al interior de la cámara se llevan a cabo con el programa Freeze Monitor (San Diego Instruments, E.U.A.) que está contenido en una computadora de escritorio conectada a la cámara de condicionamiento.

Al terminar la prueba de campo abierto, se realizó el condicionamiento de los sujetos en la cámara de condicionamiento. Los sujetos se introdujeron a la caja y permanecieron ahí durante 2 min para que exploraran libremente. Posteriormente se inició la administración de 5 choques de 1 mA con duración de 2 s en intervalos variables en un periodo de 720 s. Los periodos de inmovilidad se registraron utilizando el programa Freeze Monitor y a través de la observación de dos experimentadores independientes.

*Memoria aversiva a un contexto.* 24 horas después de realizado el condicionamiento, se realizó la evocación de la memoria aversiva al contexto en la misma cámara en la que se realizó el condicionamiento. La respuesta condicionada que se espera al exponer al animal al estímulo condicionado es el “freezing” o “inmovilidad” motora, la cual consiste en la ausencia de movimientos, excepto de aquellos necesarios para la respiración (Brandão y cols., 2007). Se sacrificó a los animales 1 h después de la prueba con una inyección letal de pentobarbital sodico (PiSA, México) y se procedió a realizar una perfusión intracardiaca con solución salina (300 mL) y después con paraformaldehído 4% en una solución amortiguadora de fosfatos (PB) 0.1 M a pH 7.4 (300 mL) como fijador. Posteriormente se extrajo el cerebro y se le dejó en la solución de fijación, por al menos 24 horas.

*Procesamiento del cerebro de los animales.* Se colocó a los cerebros fijados en una solución de sacarosa 15% en PB por 24 h y después en una solución de sacarosa 30% en PB por 48 h. Se procedió a congelar los cerebros a -20°C y a cortarlos en un criostato (Leica Biosystems, Alemania) obteniendo cortes coronales de 30 µm de grosor.

*Histología de Nissl.* La tinción con violeta de cresilo se usó para identificar posibles cambios en la morfología normal de la formación hipocampal y para corroborar la entrada de la cánula en un implante intracerebroventricular. Para cada sujeto se utilizó una serie de cortes de cerebro con una distancia de 210 µm entre cada corte sobre el eje antero-posterior.

*Inmunohistoquímica.* Se realizó el marcado inmunohistoquímico en cortes coronales del hipocampo para identificar la presencia de DCX, NeuN y BrdU. El protocolo a seguir fue el siguiente: se lavaron los cortes de cerebro en una solución amortiguadora de fosfatos (pH 7.4, 0.1 M) en agitación durante 10 min 3 veces; después se lavaron en una solución amortiguadora salina de fosfatos (pH 7.4, 0.1 M) agregando el detergente Triton al 2% y suero normal de caballo 3% durante 5 min 2 veces consecutivas y una más por 10 min; a continuación se lavaron en una solución amortiguadora salina de fosfatos (pH 7.4, 0.1 M) agregando Triton al 3% y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.6% durante 30 min; después se lavaron nuevamente en una solución amortiguadora salina de fosfatos (pH 7.4, 0.1 M) agregando el detergente Triton al 2% y suero normal de caballo 3% durante 5 min 2 veces consecutivas y una más por 10 min; seguido de esto se lavaron en solución salina (NaCl 0.9%) durante 5 min 2 veces consecutivas; a continuación se lavaron en una solución de HCl 2N durante 30 min a una temperatura de 37°C para desnaturalizar el ADN; después se lavaron en una solución amortiguadora salina de fosfatos (pH 7.4, 0.1 M) a una temperatura de 4°C durante 5, 10 y 15 min consecutivamente; enseguida se lavaron en una solución amortiguadora salina de fosfatos (pH 7.4, 0.1 M) agregando Tritón al 2% y suero normal de caballo al 10% para bloquear las interacciones peptídicas durante 1 h a temperatura ambiente; después se incubaron en una solución amortiguadora salina de fosfatos (pH 7.4, 0.1 M) agregando el detergente Tritón al 2% y suero normal de caballo 3% con el anticuerpo primario conejo anti-DCX (Santa Cruz Biotechnology, E.U.A.) durante 12 h a 4 °C; terminado este periodo se lavaron nuevamente en una solución amortiguadora salina de fosfatos (pH 7.4, 0.1 M) durante 10 min 3 veces consecutivas; a continuación se incubaron en una solución amortiguadora salina de fosfatos (pH 7.4, 0.1 M) con los anticuerpos secundarios: Alexa Fluor 488 burro anti-ratón y Dylight 594 burro anti-conejo (Thermo Fisher Scientific, E.U.A.) durante 2 horas; finalmente se lavaron una solución amortiguadora salina de fosfatos (pH 7.4, 0.1 M) durante 10 min 3 veces consecutivas y se montaron en laminillas de vidrio agregando 2 gotas de medio para montado de inmunofluorescencias (Agilent, E.U.A.) antes de colocar el cubreobjetos. Las laminillas montadas con los cortes de cerebro se almacenaron a 4°C.

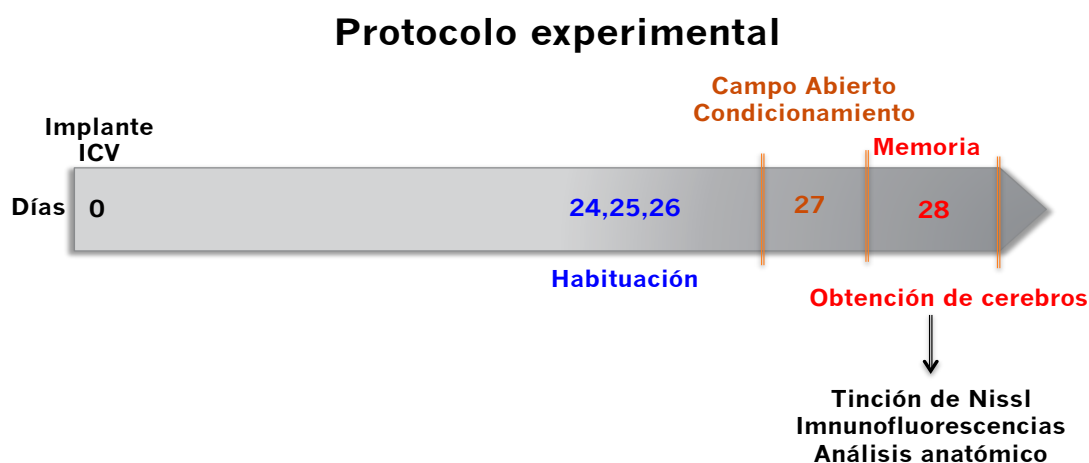
*Adquisición de imágenes del giro dentado.* Los cortes tratados para inmunohistoquímica se capturaron con un microscopio confocal Zeiss LSM 5 y se adquirieron imágenes de 9-11 planos en el eje z con una distancia de 1.8-2.0  $\mu\text{m}$  entre planos focales. Se tomó una muestra aleatoria de 4 campos del hipocampo en 4 secciones de cerebro, obteniendo un total de 16 campos por sujeto.

*Densidad de la marca de DCX.* Se utilizó la herramienta “Analyze particles” del programa ImageJ para analizar la densidad de células de DCX+ utilizando un apilado de imágenes digitales de 9-10 imágenes por cada campo adquirido. La densidad se calculó en todos los casos sobre un área de  $1024 \times 1024 \mu\text{m}$  y con los mismos parámetros de umbral de detección de señal para todos los casos. Se filtraron las imágenes determinando el conteo de partículas a un diámetro mínimo de 2  $\mu\text{m}$  y una circularidad de 0 a 0.8. La circularidad es un parámetro que determina que tan circular es una marca en la imagen, entre el valor se aproxime más a 1 las marcas tendrán una forma más cercana a un círculo perfecto; por tanto, limitar el rango de circularidad de las marcas en una imagen es útil para eliminar el ruido de fondo.

*Rastreo de dendritas.* Se utilizó la herramienta “Simple Neurite Tracer” del programa FIJI para rastrear de manera semiautomática el curso de las dendritas de las células DCX+ en las imágenes de giro dentado; esta herramienta tiene la bondad de proporcionar la longitud de las dendritas rastreadas. Se analizó la longitud de las dendritas y su cantidad promedio.

*Análisis del los ángulos de crecimiento.* Se realizó empleando el programa ImageJ, que permite determinar de manera arbitraria el ángulo relativo de crecimiento de las dendritas primarias tomando como base del ángulo al eje medio-lateral de la continuidad de la capa granular del giro dentado; los ángulos de crecimiento se determinaron en relación a este eje.

*Análisis estadístico.* Los resultados se analizaron con el programa Prism v4.2. Las pruebas estadísticas utilizadas se especifican en los resultados de cada experimento.

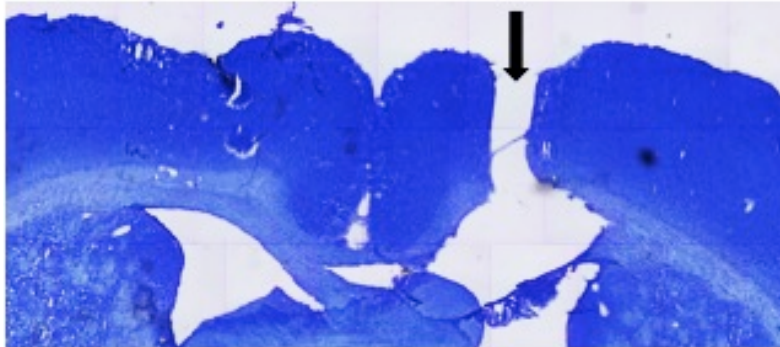


**Figura 10. Protocolo experimental.** Se muestra la secuencia de los procedimientos generales descritos en la metodología.

## RESULTADOS

### *Análisis histológico*

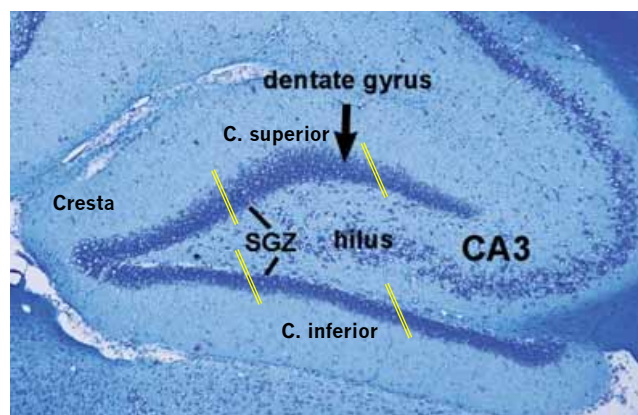
Con el objeto de comprobar que la cánula de infusión hubiera estado correctamente posicionada en el ventrículo lateral, se realizó una tinción de Nissl en secciones coronales de cerebro (30  $\mu\text{m}$ ) a lo largo del eje anteroposterior (Figura 11). Sólo aquellos sujetos en los que se identificó que la cánula entró al ventrículo sin provocar mayor daño estructural se incluyeron en el análisis.



**Figura 11. Tinción de Nissl.** Se muestra un corte coronal a nivel de los ventrículos laterales. Se señala con una flecha negra el lugar de entrada de la cánula de infusión. Se denota un ensanchamiento del ventrículo derecho por la infusión crónica de las soluciones administradas.

### *Análisis anatómico de las células DCX+*

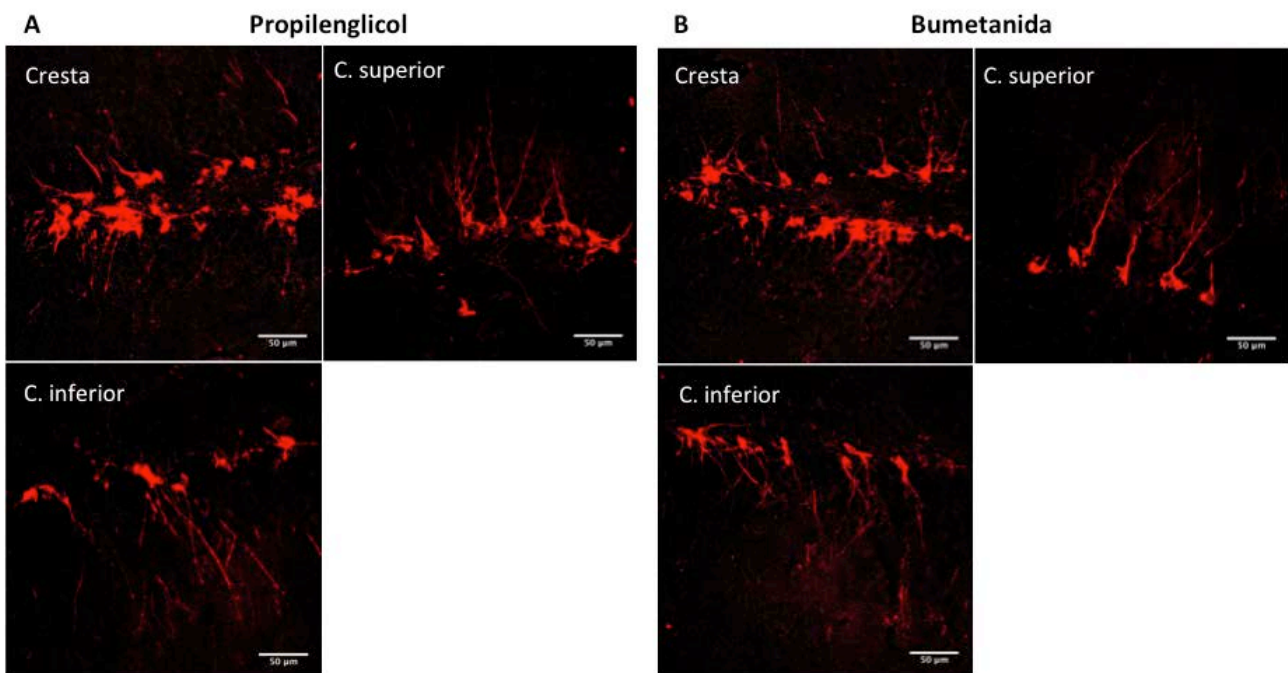
Con la intención de evaluar el impacto de la infusión de bumetanida sobre el proceso de maduración de las células jóvenes del GD, se analizó tanto la densidad como las características morfológicas de éstas células. El análisis morfológico comprendió diversos parámetros de maduración celular, como la longitud de dendritas primarias, la longitud total de los árboles dendríticos por zona del GD, la cantidad de dendritas primarias por zona del GD y el ángulo de crecimiento de las dendritas primarias que refleja un desarrollo normal o un crecimiento atípico. El análisis se realizó en el denominado “giro dental dorsal” que abarca la región anteroposterior comprendida entre las coordenadas -3.14 a -4.8 (Paxinos, G. y Watson, C., 2013), ya que el proceso de maduración de las nuevas células en el GD adulto es diferente entre la región dorsal y la región ventral (Piatti, V. C. y cols., 2011). Así mismo, y debido a que la maduración neurogénica también es diferente entre regiones del hipocampo dorsal (Piatti V. C. y cols., 2006), se hizo una división regional en la valoración de modo que reportan los resultados obtenidos del análisis de la cresta del GD, así como de las cuchillas superior e inferior del GD dorsal (Figura 12).



**Figura 12. Giro dentado hipocampal.** Se muestra la división virtual con líneas amarillas entre la cresta y las cuchillas superior e inferior del giro dentado (dentate gyrus, en inglés). Modificado de Balentova y cols., 2015.

### Densidad de DCX

En la figura 13 se muestran imágenes representativas de las imágenes de inmunofluorescencia contra DCX en el giro dentado. El análisis de densidad de DCX muestra que, mientras que la comparación de densidad entre crestas y cuchillas superiores de los grupos no hay diferencias significativas, en la capa inferior si las hay (Figura 14). En primer lugar se realizó un ANOVA de dos vías el cual no presentó diferencias significativas respecto a la interacción ( $p = 0.676$ ), pero si entre las zonas del giro dentado ( $p < 0.003$ ) y ambos tratamientos ( $p = 0.032$ ). La prueba *post hoc* Bonferroni no arrojó diferencias significativas al comparar los tratamientos por cada zona del giro dentado. Este tipo de pruebas *post hoc* toma en cuenta el error global en el análisis estadístico por lo que pueden aumentar la probabilidad de dar por correcto un resultado falso negativo. Por ello debido a esto, a continuación se utilizó la prueba t de Student para analizar cada par de tratamientos por zona del giro dentado, obteniendo diferencias no significativas entre los tratamientos en la cresta ( $p = 0.279$ ) y la cuchilla superior ( $p = 0.070$ ), pero sí en la cuchilla inferior ( $p = 0.048$ ). A pesar de no encontrar diferencias estadísticamente significativas en la cuchilla superior, resulta importante denotar que la densidad de DCX disminuyó en promedio un 30.94 %; en la cuchilla inferior esta disminución fue del 42.86 %.



**Figura 13. Imágenes de inmunofluorescencia representativas del giro dentado.** Se muestran las inmunofluorescencias en rojo de la DCX tanto en la cresta del giro dentado como en las cuchillas superior e inferior. **A.** Tratamiento con propilenglicol. **B.** Tratamiento con propilenglicol + bumetanida. Barra de escala de 50 µm.

### Densidad de doblecortina en el giro dentado

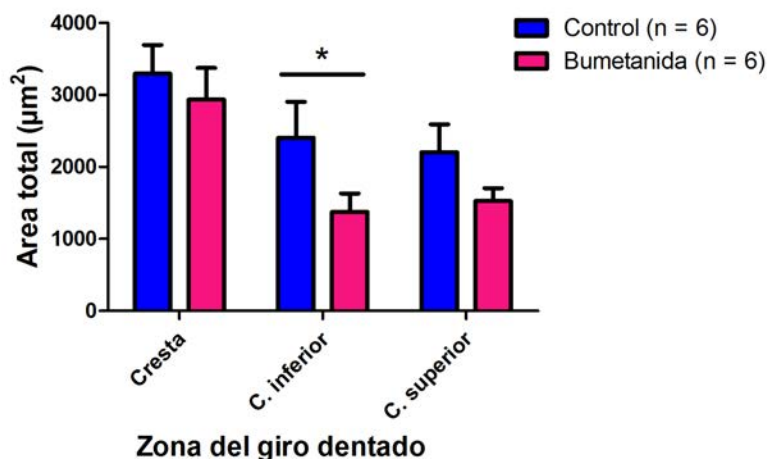


Figura 14. Densidad de doblecortina en el giro dentado hipocampal. Se muestran las diferencias entre los tratamientos en cada zona del giro dentado. n= 6; t de Student; \* p = 0.048.

### Longitud dendrítica

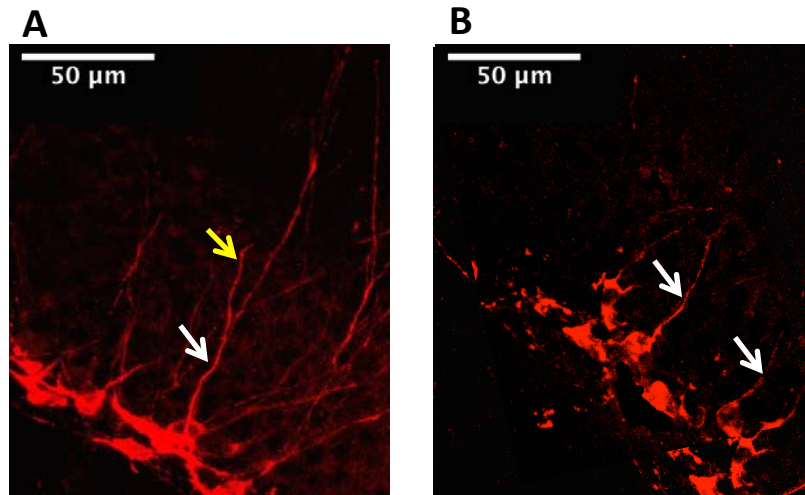
#### Dendritas primarias

En la figura 15 se muestran imágenes representativas de inmunofluorescencia de las dendritas primarias y sus arborizaciones. El análisis referente a la longitud de las dendritas primarias apicales reveló que ésta es diferente entre el grupo control y el experimental solamente en la cuchilla inferior (Figura 16). Inicialmente se realizó un ANOVA de dos vías el cual no presentó diferencias significativas ni respecto a la interacción ( $p = 0.292$ ), ni entre las zonas del giro dentado ( $p = 0.154$ ); pero si respecto al tratamiento ( $p = 0.007$ ). La prueba *post hoc* Bonferroni no arrojó diferencias significativas al comparar los tratamientos por cada zona del giro dentado, por lo que a continuación se utilizó la prueba t de Student para analizar cada par de tratamientos por zona del giro dentado. Se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos en la cresta ( $p = 0.026$ ) y la cuchilla inferior ( $p = 0.027$ ), pero no así en la cuchilla superior ( $p = 0.305$ ).

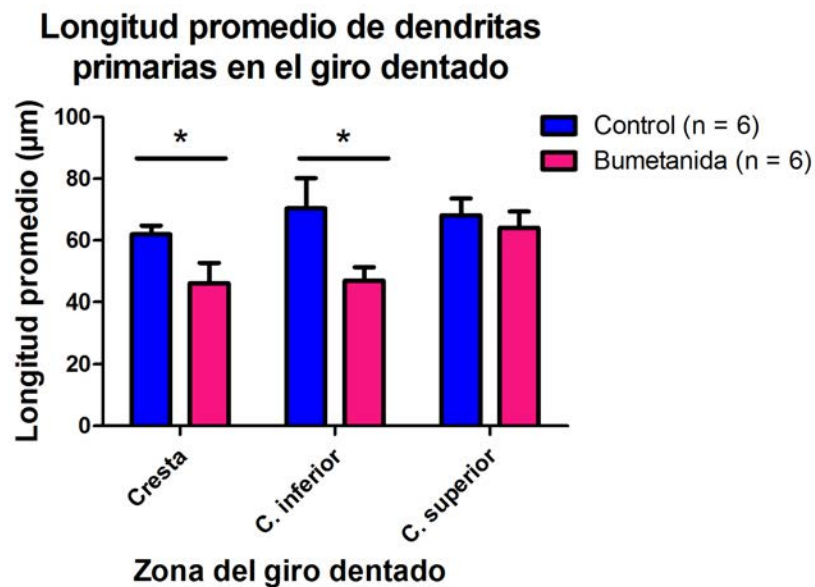
#### Longitud total dendrítica

El análisis referente a la longitud en conjunto de las dendritas primarias y sus ramificaciones por zona del GD reveló que estas son diferentes entre el grupo control y el experimental solamente en la cuchilla inferior (Figura 17). En primer lugar se realizó un ANOVA de dos vías el cual no presentó diferencias significativas respecto a la interacción ( $p = 0.889$ ), tampoco entre las zonas del giro dentado ( $p = 0.809$ ); ni respecto al tratamiento ( $p = 0.125$ ). A continuación se utilizó la prueba t de Student para analizar cada par de tratamientos por zona del giro dentado; obteniendo diferencias no significativas entre los tratamientos en la cresta ( $p = 0.335$ ) y la cuchilla inferior ( $p = 0.174$ ), pero sí en la cuchilla superior ( $p = 0.017$ ).

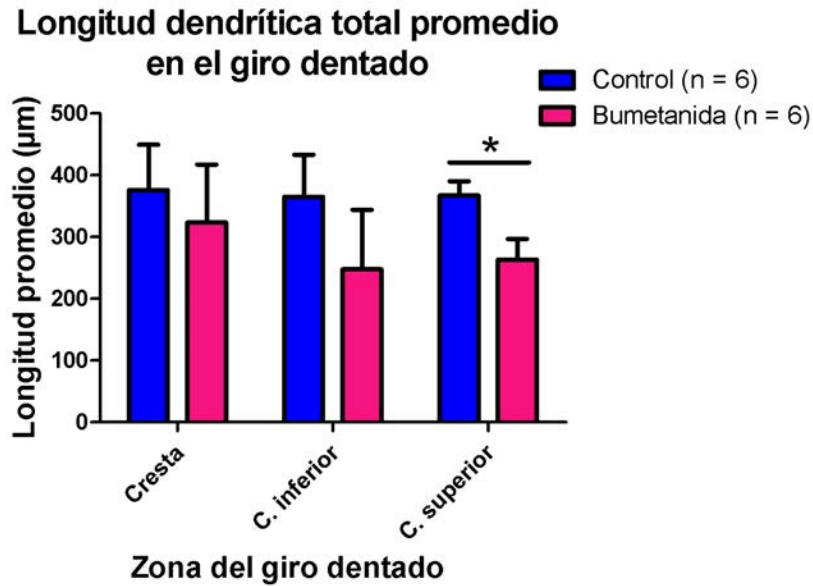




**Figura. 15. Dendritas de las neuronas en desarrollo.** Se muestra parte del árbol dendrítico de las neuronas en desarrollo en un fragmento de la cresta del giro dentado, señalando con las flechas blancas las dendritas primarias apicales y con las flechas amarillas dendritas secundarias; **A**, tratamiento con propilenglicol; **B**, tratamiento con bumetanida; se puede apreciar que las dendritas primarias en B tienen una longitud menor que en A.



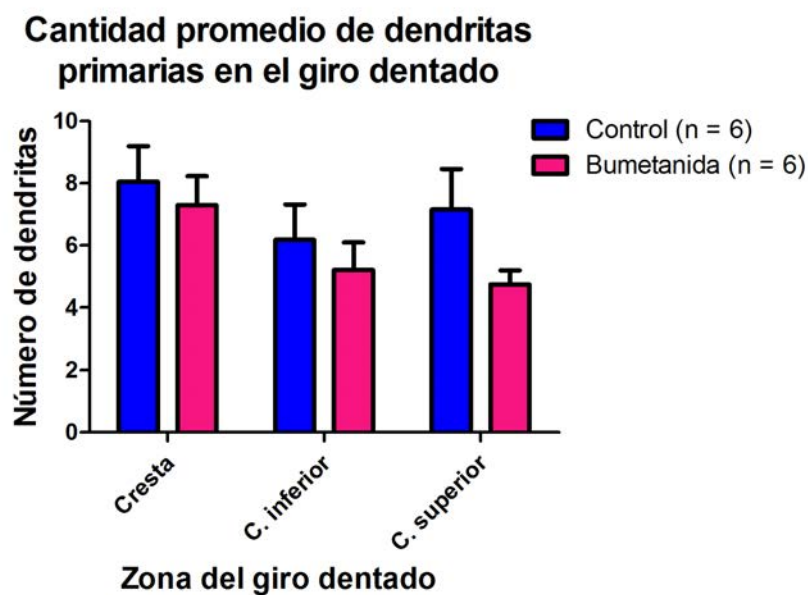
**Fig. 16. Longitud de dendritas primarias de neuronas inmaduras.** Se muestran las diferencias entre los tratamientos en cada zona del giro dentado. n = 6; cresta, t de Student: \*p = 0.026; C. inferior, t de Student: \*p = 0.027.



**Fig. 17. Longitud del árbol dendrítico de neuronas inmaduras.** Se muestran las diferencias entre los tratamientos en cada zona del giro dentado. n = 6; t de Student; \*p = 0.017.

### ***Número de dendritas***

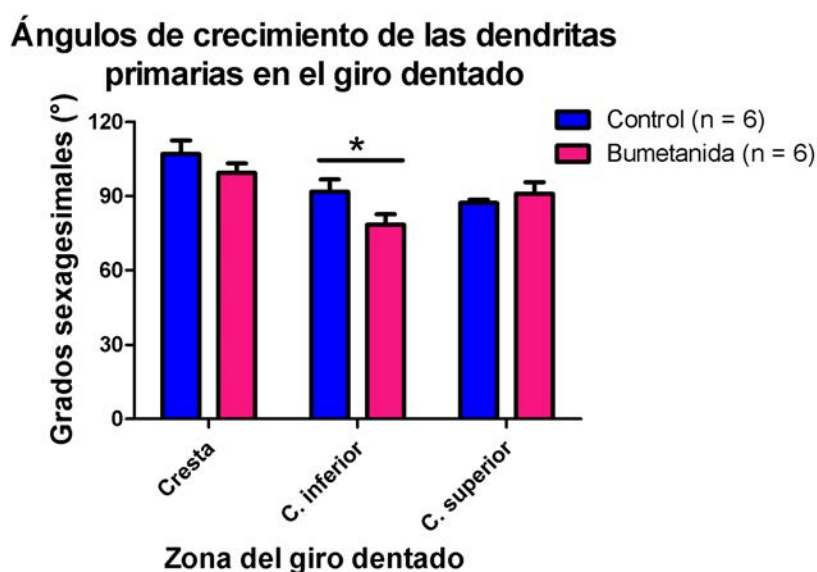
El análisis del número promedio de dendritas primarias apicales reveló que éste no es diferente entre el grupo control y el experimental (figura18). Se realizó un ANOVA de dos vías el cual no presentó diferencias significativas respecto a la interacción ( $p = 0.678$ ), ni entre las zonas del giro dentado ( $p = 0.122$ ), ni respecto al tratamiento ( $p = 0.107$ ). Después se utilizó la prueba t de Student para analizar cada par de tratamientos por zona del giro dentado; obteniendo diferencias no significativas entre los tratamientos; cresta, t de Student:  $p = 0.310$ ; cuchilla inferior, t de Student:  $p = 0.259$ ; cuchilla superior, t de Student:  $p = 0.056$ . A pesar de no encontrar diferencias estadísticamente significativas, resulta importante denotar que la cantidad de dendritas en la cuchilla superior disminuyó en promedio un 33.63%.



**Figura. 18. Número de dendritas primarias de neuronas inmaduras.** Se muestran las diferencias entre los tratamientos en cada zona del giro dentado. n = 6; cresta, t de Student:  $p = 0.310$ ; cuchilla inferior, t de Student:  $p = 0.259$ ; cuchilla superior, t de Student:  $p = 0.056$ .

### **Ángulos de crecimiento de las dendritas primarias**

El análisis de los ángulos de crecimiento u orientación de las dendritas primarias apicales de las neuronas en desarrollo DCX+ reveló diferencias significativas entre los tratamientos solo en la cuchilla inferior (figura 19). En principio se realizó un ANOVA de dos vías el cual no presentó diferencias significativas respecto a la interacción ( $p = 0.01527$ ); ni respecto al tratamiento ( $p = 0.1107$ ); pero sí entre las zonas del giro dentado ( $p = 0.0006$ ). A continuación se utilizó la prueba t de Student para cada par de tratamientos por zona del giro dentado. No se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos ni en la cresta ( $p = 0.137$ ) ni en la cuchilla superior ( $p = 0.238$ ), pero sí en la cuchilla inferior ( $p = 0.034$ ); esta diferencia fue de  $^{\circ}12$  sexagesimales.



**Fig. 19. Promedio de los ángulos de crecimiento de dendritas primarias.** Se muestra el promedio de los ángulos de crecimiento de las dendritas primarias de las neuronas en desarrollo.  $n = 6$ ; cresta, t de Student:  $p = 0.137$ ; cuchilla superior, t de Student:  $p = 0.238$ ; cuchilla inferior, t de Student:  $*p = 0.034$ .

### **Análisis conductual**

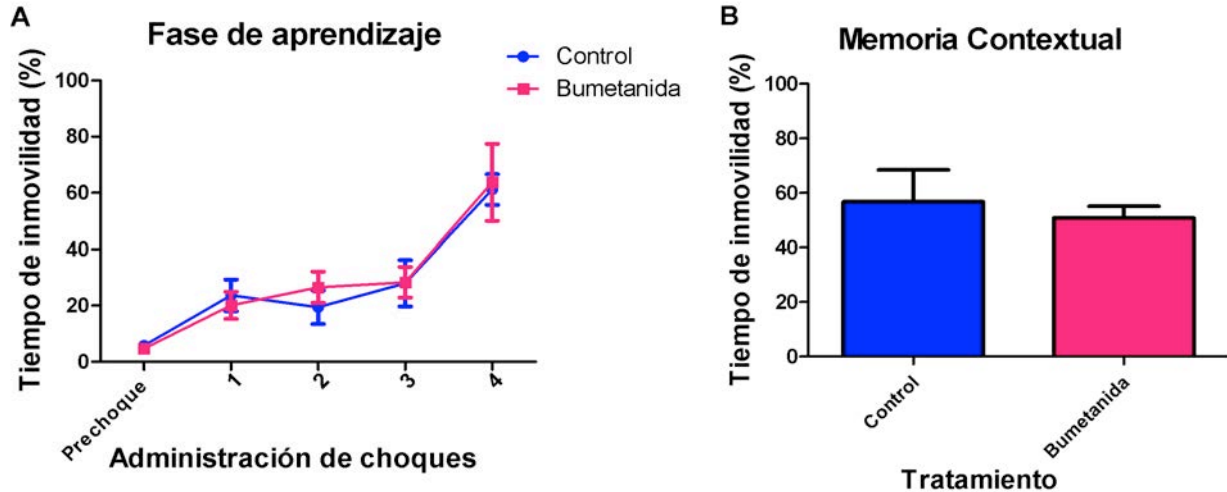
El análisis conductual consistió en la evaluación del proceso de aprendizaje de la presencia aleatoria de un evento aversivo (choque eléctrico) en el contexto de condicionamiento y en el recuerdo del contexto de condicionamiento en ausencia del choque.

#### **Aprendizaje en la prueba de condicionamiento aversivo al contexto**

Con respecto al aprendizaje, ambos grupos siguieron una curva de condicionamiento típica de esta prueba (figura 20A). El aprendizaje se manifiesta como el incremento gradual de la conducta de inmovilidad a lo largo de la sesión (720 s) y refleja una forma de aversión. Los resultados muestran que la infusión de bumetanida no modifica el proceso de aprendizaje aversivo contextual. Debido a que los errores estandar se sobrelapan en cada intervalo entre los choques administrados no se realizaron más pruebas estadísticas en busca de diferencias entre los tratamientos, esto se justifica además por la forma típica de las curvas de aprendizaje que surgieron en ambos tratamientos.

### **Memoria en la prueba de condicionamiento aversivo al contexto**

24 horas después de finalizado el condicionamiento, se analizó la memoria aversiva contextual, la cual consistió en introducir a cada sujeto en la cámara de condicionamiento sin que se presentara el choque. Durante toda la sesión (300 s) se registraron los movimientos de cada sujeto. Ambos grupos mostraron recordar el contexto aversivo, lo cual se reflejó en inmovilidad (figura 20B). Se utilizó una prueba t de Student para comparar a los tratamientos:  $p = 0.318$ .



**Figura 20 Análisis conductual.** A. Condicionamiento aversivo al contexto. Se muestra el porcentaje de tiempo de inmovilidad en cada periodo de la secuencia de choques presentados durante la prueba de condicionamiento aversivo a un contexto. Los tratamientos no muestran diferencias significativas.  $n = 7$ ; ANOVA de dos vías, factor "Tratamiento"  $p = 0.114$ ; factor "Administración de choque"  $p < 0.0001$ ; factor "interacción"  $p = 0.7553$ . B. Fase de recuperación de la memoria. Se muestra el porcentaje de tiempo de inmovilidad de los grupos.  $n = 7$ ; t de Student,  $P = 0.318$ .

## **DISCUSIÓN**

Diversos estudios han evaluado la importancia de las neuronas generadas en la etapa adulta sobre procesos conductuales como el aprendizaje y la memoria de tipo espacial y de contexto. Las aproximaciones experimentales utilizadas hasta ahora para afectar la neurogénesis y comprobar así su papel funcional se han enfocado a la eliminación del proceso además de que en algunos casos carecen de selectividad en términos de las células eliminadas (para una revisión, ver Nieto-Escamez y Moreno-Montoya, 2011). El interés de esta tesis fue el de analizar el impacto conductual de interferir con la maduración de las nuevas neuronas en el marco del empleo de fármacos que inciden en dicho proceso. Para ello, se administró bumetanida de manera crónica y vía intracerebroventricular. La bumetanida es un bloqueador de alta selectividad por el cotransportador iónico NKCC1, el cual mantiene los gradientes electroquímicos normales de las neuronas en desarrollo (Wang y Kriegstein, 2011).

Para determinar la dosis de bumetanida a utilizar en este trabajo se tomó en cuenta un estudio previo en el que se reportó el uso de la bumetanida en conjunto con fenobarbital para eliminar las crisis epilépticas inducidas por hipoxia en ratas en la etapa perinatal, utilizándose dos dosis de bumetanida, 0.15 mg/Kg y 0.3 mg/Kg, administradas por vía intraperitoneal (Cleary y cols., 2013). Para el trabajo aquí presente en primer lugar se realizó la administración subcutánea e intracerebroventricular crónica de bumetanida, a una dosis de

0.2mg/Kg, o del excipiente. No se observaron diferencias entre los tratamientos utilizando esta dosis en cuanto la densidad de DCX y tampoco se observaron diferencias estructurales en los árboles dendríticos. Se empleó entonces una dosis mayor (0.4 mg/Kg) considerando algunas limitaciones técnicas que aparecieron durante la dilución de la droga. En concreto, la bumetanida se disolvió en propilenglicol ya que es muy poco soluble en vehículos a base de agua como líquido cefalorraquídeo artificial y solución salina fisiológica y; la concentración finalmente empleada respondió a la imposibilidad de disolverla a concentraciones más altas.

Está documentado (Ge y cols., 2006) que el bloqueo de la actividad del cotransportador NKCC1 impide la estimulación GABAérgica de tipo tónico, la cual sucede durante toda la fase de desarrollo de las neuronas inmaduras e incluso desde la etapa en que las células son progenitores neurales de amplificación transitoria (inmunoreactivas a DCX) y que la estimulación GABAérgica mediada por la actividad fisiológica del NKCC1 es uno de los primeros estímulos tróficos para las neuronas en desarrollo. Los resultados de este trabajo muestran que la bumetanida, la cual bloquea la activación del cotransportador NKCC1, induce una disminución significativa en la densidad de DCX en la cuchilla inferior del GD y notable aunque no estadísticamente significativa en la cuchilla superior. Esto puede deberse a una cantidad de neuronas DCX+ menor lo cual sugiere la baja sobrevivencia neuronal en ausencia del estímulo trófico, o bien podría reflejar un impedimento en la síntesis de la proteína en ausencia del estímulo.

La disminución de la longitud dendrítica primaria sugiere un desarrollo inadecuado o en arresto del desarrollo dendrítico, aunque la longitud de las dendritas primaria solo se vio afectada en las neuronas de la cresta inferior, mientras que la longitud dendrítica total sólo se vio afectada en la cresta superior lo que indica i) una sensibilidad farmacológica diversa en las zonas del giro dentado o, ii) un desarrollo diferencial específico de cada zona. Aunque la cantidad de dendritas por zona del GD no mostró diferencias significativas, se observó una marcada tendencia en la cuchilla superior, teniendo una disminución del 33%. Esto sugiere un pobre desarrollo de las nuevas neuronas en esta zona del GD. Sin embargo, los ángulos de crecimiento dendrítico mostraron ser diferentes solamente en la capa inferior del giro dentado. La aparición de indicadores anatómicos de un desarrollo anormal neuronal en diferentes zonas del GD reitera la posibilidad de una sensibilidad diferente al fármaco entre las mismas.

En cuanto al análisis conductual, es importante aclarar en primer lugar que las neuronas inmaduras de la zona granular no necesitan de recibir aferentes provenientes de la corteza entorrinal para influir en la excitabilidad del giro dentado, ya que desde etapas tempranas en su desarrollo estas neuronas mantienen conexiones con las interneuronas del hilus (hilar cells, en inglés) y con las interneuronas musgosas del hilus (mossy cells, en inglés) que a su vez tienen conexiones GABAérgicas con las neuronas granulares maduras del giro dentado (Ikhar y cols., 2013; Scharfman, y Myers, 2013; Kempermann y cols., 2015; Aimone, 2016). Una propuesta dice que una adecuada neurogénesis mantiene al giro dentado en baja actividad a través de estas conexiones y se propone que una neurogénesis adecuada ayuda a aumentar la robustez de una memoria de manera que las nuevas neuronas se integran en el giro dentado como elementos importantes para la recuperación de los estímulos a los que fueron expuestas en etapas tempranas de su desarrollo; este modelo es apoyado por aproximaciones computacionales que indican que la neurogénesis permite aumentar la capacidad de almacenamiento y recuperación de memorias recientes en el giro dentado (Weisz y Argibay, 2009; Jocelyn y cols., 2015; Johnston y cols., 2015).

Otra propuesta dice que dependiendo de la demanda resolutive de la tarea en la que se encuentre el individuo adulto, las neuronas en desarrollo y las neuronas maduras son reclutadas como unidades funcionales en la codificación y recuperación de la información (Weisz y Argibay, 2009; Satvat y cols., 2011). Por ejemplo, en el caso de discernir entre dos contextos, si estos son muy similares, el giro dentado puede codificar la información de ambos en distintos elementos celulares a través del reclutamiento de las nuevas neuronas, lo cual aumenta la capacidad resolutive de esta estructura (Satvat, y cols., 2011; Jocelyn, y cols., 2015). En nuestro experimento la demanda resolutive que implicó la tarea de aprendizaje pudo haber sido baja y en consecuencia no se observaron diferencias entre los tratamientos en cuanto a la recuperación de la memoria. Desde esta perspectiva, la posible participación de las nuevas neuronas no fue evidente entre los tratamientos porque la tarea empleada no exigió la necesidad de reclutar a las nuevas neuronas a un nivel diferencial.

Otros estudios proponen que las neuronas que sustentan la codificación en la etapa de aprendizaje son en su mayoría las mismas que se reclutan durante la recuperación de la memoria, ya sean nuevas o maduras (Johnston, y cols., 2015). Desde esta perspectiva, dado que la fase de aprendizaje y la fase de memoria son muy cercanos en los experimentos del presente trabajo, 24 hr de diferencia, no importaría si el desarrollo de las nuevas neuronas se vió afectado por el tratamiento con bumetanida pues el giro dentado mantendría a los mismos elementos neuronales reclutados tanto en la fase de adquisición como en la de recuperación. Sin embargo, esto no descarta la posibilidad de que el aprendizaje y la memoria en la prueba de condicionamiento aversivo al contexto no puedan verse afectados por las deficiencias estructurales inducidas por el tratamiento con bumetanida. De hecho, se sabe que en roedores la plasticidad de las fibras musgosas -la vía emergente de las neuronas granulares del GD- depende de la estimulación de las neuronas nacidas en la etapa adulta (Kempermann y cols., 2015).

Varios estudios concluyen que la participación de la neurogénesis en el aprendizaje y la memoria de aversión al contexto es limitada e incluso sucede en un gradiente de calidad, esto es, que si la prueba es más demandante, la neurogénesis tendrá una participación más pronunciada (Johnston y cols., 2015). En este sentido el protocolo aquí utilizado pudo no ser lo suficientemente sensible debido a la probable alta intensidad y frecuencia del estímulo aversivo.

Resulta importante resaltar que los efectos más pronunciados sobre la neurogénesis en el giro dentado se observaron en la cuchilla inferior. Existen diferencias anatómicas, funcionales y de maduración entre ambas cuchillas del giro dentado (Piatti y cols., 2011) y la evidencia experimental sugiere que es la cuchilla superior la que tiene una participación prioritaria en cuando a tareas de aprendizaje y memoria espacial, mientras que la cuchilla inferior se ve más involucrada en (Amaral y cols., 2007; Satvat y cols., 2011; Gallitano y cols., 2016). Podemos argumentar entonces, que dado que los cambios inducidos por la administración de bumetanida son más notorios sobre la cuchilla inferior la cual no tiene tanta relevancia en los procesos mnémicos, estos en consecuencia no se vieron influenciados por el tratamiento. Alternativamente, dado que se observó que varias de las nuevas neuronas que crecieron bajo el tratamiento con bumetanida tuvieron dendritas apicales que llegan hasta la capa molecular del GD, se puede especular que algunas de las nuevas células recibieron aferentes desde la corteza entorrinal y por ende pudieron ser partícipes directos de la codificación del contexto aversivo y/o participar en la modulación del aprendizaje del mismo (Johnston y cols., 2015).

Dentro de las perspectivas de este estudio está el comprobar la participación de las neuronas en desarrollo a través de una prueba de condicionamiento más demandante. Esto se puede

lograr disminuyendo el número de choques o la intensidad de los mismos. También se plantea comparar la capacidad de separación de patrones, otra tarea dependiente del GD en la que se somete a los sujetos experimentales a distinguir entre una cámara de condicionamiento y un contexto similar neutro. También es de interés básico conocer si otro tipo de procesos, en particular de memoria espacial, se ven afectados por la administración de bumetanida.

Para comprobar el efecto de interferir en la maduración de las nuevas neuronas modificando el protocolo aquí utilizado, se podría ampliar el intervalo de tiempo entre la etapa de aprendizaje y memoria, dejando que los individuos se sometieran a la fase de adquisición al inicio o mitad del tratamiento y observando si son capaces de recuperar la memoria al final de la administración crónica. Se evaluaría de esta manera si las nuevas neuronas reclutadas en la fase de adquisición pueden ser influenciadas por el tratamiento y entonces comprobar si mantienen su capacidad funcional y si son necesarias para la recuperación de la memoria del contexto al que estuvieron expuestas.

Este estudio es también un antecedente en el discernimiento del efecto de la bumetanida sobre la neurogénesis en humanos lo cual es de relevancia clínica dado que se usa actualmente como diurético y se propone su uso en conjunto con antiepilépticos en pacientes pediátricos y también en procesos de inflamación cerebral (O'Donnell, 2004; Walcott y cols. 2012; Cleary y cols., 2013; Löscher y cols., 2013).

Este estudio es para nuestro conocimiento el primero en analizar el efecto que tiene la administración crónica de bumetanida sobre la neurogénesis hipocampal en el adulto y en consecuencia sobre los procesos mnémicos en esta etapa del desarrollo. También es el primero en intentar impedir la continuidad de la neurogénesis de manera gradual más que determinante como sucede en los experimentos que utilizan estrategias de radiación, la administración de agentes antimitóticos y los modelos transgénicos.

## CONCLUSIÓN

Los resultados de este estudio muestran que la administración de bumetanida *icv* interfiere de manera negativa con la maduración de las nuevas neuronas en un sistema *in vivo* teniendo efectos sobre la estructura de las nuevas neuronas en desarrollo de manera diferencial entre las zonas del giro dentado. En la cresta, la administración de bumetanida disminuye la longitud de las dendritas primarias; en las cuchillas inferiores, disminuye la longitud de las dendritas primarias y desvía el ángulo de crecimiento normal de las mismas; y en las cuchillas superiores, se ve disminuida la densidad de la marca de DCX, así como la longitud dendrítica total y el número de dendritas primarias. Sin embargo, estos cambios estructurales no tienen un efecto sobre la formación del aprendizaje y el proceso de memoria aversiva contextual.

## REFERENCIAS

- Abrous, D. N. & Wojtowicz, J. M. (2015) Interaction between neurogenesis and hippocampal memory system: new vistas. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 7: a018952. doi: 10.1101/cshperspect.a018952.
- Aimone, J. B. (2016) Computational modeling of adult neurogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 8: a018960. doi: 10.1101/cshperpect.a018960.
- Aimone, J. B., Deng, W. & Gage, F. H. (2011) Resolving new memories: a critical look at the dentate gyrus, adult neurogenesis, and patten separation. *Neuron*. 70 (4): 589-596.
- Amaral, D. G., Scharfman, H. E. & Lavenex, P. (2007) The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Progress in Brain Research*. 163: 788-790.
- Ben-Ari, Y. (2002) Excitatory actions of GABA during development: the nature of the nurture. *Nature*. 3 (9): 728-739.
- Balentova, S., Hajtmanova, E., Filova, B., Borbelyova, V. & Lehotsky, J. (2015) Effect of fractionated irradiation on the hippocampus in an experimental model. *Klinicka Onkologie*. 28 (3): 191-199.
- Blaesse, P., Airaksinen, M. S., Rivera, C. & Kaila, K (2009) Cation-chloride cotransporters and neuronal function. *Neuron*. 61 (6): 820-838.
- Bliss, T., Collingridge, G. & Morris, R. (2007) Synaptic plasticity in the hippocampus. En: Andersen, P., Morris, R., Amaral, D., Bliss, T. & O'Keele, J. *The hippocampus book* (pp. 343-474). Oxford University Press.
- Bordey, A. (2007) Enigmatic GABAergic networks in adult neurogenic zones. *Brain Reseach Reviews*. 53 (1): 124-134.
- Brandão, M. L., Zanoveli, J. M., Ruiz, R. C., Oliveira, L. C. & Landeira, J. (2008) Different patterns of freezing behavior organized in the peiacueductal gray of rats: Association with different types of anxiety. *Behavioural Brain Research*. 188 (1): 1-13.
- Burghardt, N. S., Park, E. H., Hen, R. & Fenton, A. A. (2012) Adult-born hippocampal neurons promote cognitive flexibility in mice. *Hippocampus*. 22 (9): 1795-1808.
- Cameron, H. A. & Glover, L. R. (2015) Adult neurogenesis: Beyond learning and memory. *Annual Review of Psychology*. 66: 53-81.
- Christian, K. M., Song, H. & Ming, G. (2014) Functions and dysfunctions of adult hippocampal neurogenesis. *Annual Review of Neuroscience*. 37: 243-262.
- Cleary, R. T., Sun, H., Huynh, T., Manning, S. M., Li, Y., Rotenberg, A., Talos, D. M., Kahle, K. T., Jackson, M., Rakhade, S. N., Berry, G. & Jensen, F. E. (2013) Bumetanide enhances phenobarbital efficacy in a rat model of hypoxic neonatal seizures. *PLoS ONE*. 8: e57148. doi:10.1371/journal.pone.0057148.



- Curzon, P., Rustay, N. R. & Browman, K. E. (2009) Cued and contextual fear conditioning for rodents. En: Buccafusco, J. J. (2da Ed.) *Methods of behavior analysis in neuroscience*. (pp. 20-37) CRC Press.
- Deng, W., Saxe, M. D., Gallina, I. S. & Gage, F. H. (2009) Adult-born hippocampal dentate granule cells undergoing maturation modulate learning and memory in the brain. *The Journal of Neuroscience*. 29 (43): 13532-13542.
- Drew, M. R. & Denny, C. A. (2010) Arrest of hippocampal neurogenesis in mice impairs single-but not multiple-trial contextual fear conditioning. *Behavioral Neuroscience*. 124 (4): 446-456.
- Dupret, D., Revest, J.-M., Kohl, M., Ichas, F., De Giorgi, F., Costet, P., Abrous, D. N. & Piazza, P. V. (2008) Spatial relational memory requires hippocampal adult neurogenesis. *PLoS ONE*. 3 (4): e1959. doi:10.1371/journal.pone.0001959
- Dzhala, V. I., Talos, D. M., Sdrulla, D. A., Brumback, A. C., Matthews, G. C., Benke, T. A., Delpire, E., Jensen, F. E. & Staley, K. J. (2005) NKCC1 transporter facilitates seizures in the developing brain. *Nature Medicine*. 11 (11): 1205-1213.
- Eisch, A. J., Cameron, H. A., Encinas, J. M., Meltzer, L. A., Ming, G.-L. & Overstreet, L. S. (2008) Adult neurogenesis, mental health, and mental illness: Hope or hype?. *The Journal of Neuroscience*. 28 (46): 11785-11791.
- Epp, J. R., Chow, C. & Galea, L. A. M. (2013) Hippocampus-dependent learning influences hippocampal neurogenesis. *Frontiers in Neuroscience*. 7: 57. doi:10.3389/fnins.2013.00057
- Farioli-Vecchioli, S., Saraulli, D., Costanzi, M., Pacioni, S., Cinà, I., Aceti, M., Micheli, L., Bacci, A., Cestari, V. & Tirone, F. (2008) The timing of differentiation of adult hippocampal neurons is crucial for spacial memory. *PLoS Biology*. 6 (10): e246. doi:10.1371/journal.pbio.0060246
- Gage, F. H. (2000) Mammalian neural stem cells. *Science*. 287 (5457): 1433-1438.
- Gallitano, A. L., Satvat, E., Gil, M. & Marrone, D. F. (2016) Distinct dendritic morphology across the blades of the rodent dentate gyrus. *Synapse*. 70 (7): 277-282.
- Ge, S., Gh, E. L. K., Sailor, K. A., Kitabatake, Y., Ming, G. & Song, H. (2006) GABA regulates synaptic integration of newly generate neurons in the adult brain. *Nature*. 439 (7076): 589-593.
- Ge, S., Sailor, K. A., Ming, G. & Song, H. (2008) Synaptic integration and plasticity of new neurons in the adult hippocampus. *Journal of Physiology*. 586 (16): 3759-3765.
- Gu, Y., Arruda-Ctarvalho, M., Wang, J., Janoschka, S., Josselyn, S., Frankland, P. & Ge, S. (2012) Optical controlling reveals time-dependent roles for adult-born dentate granule cells. *Nature Neuroscience*. 15 (12): 1700-1706.
- Hannaert, P., Alvarez, M., Pirot, D., Nazaret, C. & Garay, R. P. (2002) Rat NKCC2/NKCC1 cotransporter selectivity for loop diuretic drugs. *Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 365 (3): 193-199.

- Hill, A. S., Sahay, A. & Hen, R. (2015) Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to reduce anxiety and depression-like behaviors. *Neuropsychopharmacology*. 40 (10): 2368-2378.
- Howe, J. R., VI, Li, E. S., Streeter, S. E., Rahme, G. J., Chipumuro, E., Russo, G. B., Litzky, J. F., Hills, L. B., Rodgers, K. R., Skelton, P. D. & Luikart, B. W. (2017) MiR-338-3p regulates neuronal maturation and suppresses glioblastoma proliferation. *PLoS ONE*. 12 (5): e0177661. doi.org/10.1371/journal.pone.0177661.
- Ikrar, T., Guo, N., He, K., Besnard, A., Levinson, D., Hill, A., Lee, H.-K., Hen, R., Xu, X. & Sahay, A. (2013) Adult neurogenesis modifies excitability of the dentate gyrus. *Frontiers in Neural Circuits*. 7: 204. doi: 10.3389/fncir.2013.00204
- Jessberger, S., Aigner, S., Clemenson Jr., G. D., Toni, N., Lie, D. C., Karalay, Ö., Overall, R., Kempermann, G. & Gage, F. H. (2008) Cdk5 regulates accurate maturation of newborn granule cells in the adult hippocampus. *PLoS Biology*. 6 (11): e272. doi.org/10.1371/journal.pbio.0060272.
- Jocelyn, S. A., Kohler, S. & Frankland, P. W. (2015) Finding the engram. *Nature Reviews Neuroscience*. 16 (9): 521-534.
- Johnston, S. T., Shtrahman, M., Parylak, S., Gonçalves, J. T. & Gage, F. H. (2015) Paradox of pattern separation and adult neurogenesis: A dual role for new neurons balancing memory resolution and robustness. *Neurobiology of Learning and Memory*. 129: 60-68.
- Kaila, K., Price, T. J., Payne, J. A., Puskarjov, M. & Voipio, J. (2014) Cation-chloride cotransporters in development, plasticity and disease. *Nature Reviews Neuroscience*. 15 (10): 637-654.
- Kandel, E. R., Kupfermann, I. & Iversen, S. (2001) Aprendizaje y memoria. En: Kandel, E. R., Schwartz, J. H. & Jessel, T. M. (4ta Ed.) *Principios de neurociencia*. (pp. 1227-1246) McGraw-Hill.
- Kempermann, G. (2002) Why new neurons? Possible functions for adult hippocampal neurogenesis. *The Journal of Neuroscience*. 22 (3): 635-638.
- Kempermann, G., Song, H. & Gage, F. H. (2015) Neurogenesis in the adult hippocampus. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 7: a018812. doi: 10.1101/cshperspect.a018812.
- Koehl, M. & Abrous, D. N. (2011) A new chapter in the field of memory: adult hippocampal neurogenesis. *European Journal of Neuroscience*. 33 (6): 1101-1114.
- Kim, J.-I., Lee, J. W., Lee, Y. A., Lee, D.-H., Han, N. S., Choi, Y.-K., Hwang, B. R., Kim, H. J. & Han J. S. (2013) Sexual activity counteracts the suppressive effects of chronic stress on adult hippocampal neurogenesis and recognition memory. *Brain Research*. 1538: 26-40.
- Ko, H.-G., Jang, D.-J., Son, J., Kwak, C., Choi, J.-H., Ji, Y.-H., Lee, Y.-S., Son, H. & Kaang, B.-K. (2009) Effect of ablated hippocampal neurogenesis on the formation and extinction of contextual fear memory. *Molecular Brain*. 2 (1): 1. doi:10.1186/1756-6606-2-1

- Kuhn, H. G., Dickinson, H. & Gage, F. H. (1996) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *The Journal of Neuroscience*. 16 (6): 2027-2033.
- Leuner, B., Glasper, E. R. & Gould, E. (2010) Sexual experience promotes adult neurogenesis in the hippocampus despite an initial elevation in stress hormones. *PLoS ONE*. 5 (7): e11597. doi:10.1371/journal.pone.0011597.
- Löscher, W., Puskarjov, M. & Kaila, K. (2013) Cation-chloride cotransporters NKCC1 and KCC2 as potential targets for novel antiepileptic and antiepileptogenic treatments. *Neuropharmacology*. 69: 62-74.
- Maren, S., Phan, K. L. & Liberzon, I. (2013) The contextual brain: implications for fear conditioning, extinction and psychopathology. *Nature Reviews Neuroscience*. 14 (6): 417-428.
- Marín, A. & Schinder, A. F. (2012) Requirement of adult-born neurons for hippocampus-dependent learning. *Behavioural Brain Research*. 227 (2): 391-399.
- McAvoy, K., Besnard, A. & Sahay, A. (2015) Adult hippocampal neurogenesis and pattern separation in DG: a role for feedback inhibition in modulating sparseness to govern population-based coding. *Frontiers in Systems Neuroscience*. 9: 120. doi: 10.3389/fnsys.2015.00120.
- Ming, G. L. & Song, H. (2005) Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annual Review of Neuroscience*. 28: 223-250.
- Ming, G.-L., & Song, H. (2011) Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Nature*. 70 (4): 687-702.
- Mu, Y. & Gage, H. (2011) Adult hippocampal neurogenesis and its role in Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*. 6: 85. doi: 10.1186/1750-1326-6-85
- Nieto-Escamez, F. A. & Moreno-Montoya, M. (2011) Neurogénesis en el giro dentado del hipocampo: implicaciones para el aprendizaje y la memoria en el cerebro adulto. *Archivos de Neurociencias*. 16 (4): 193-199.
- O'Donnell, M. E., Tran, L., Lam, T. I., Liu, X. B. & Anderson, S. E. (2004) Bumetanide inhibition of the blood-brain barrier Na-K-Cl cotransporter reduces edema formation in the rat middle cerebral artery occlusion model of stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 24 (9): 1046-1056.
- Oomen, C. A., Bekinschtein, P., Kent, B. A., Saksida, L. M. & Bussey, T. J. (2014) Adult hippocampal neurogenesis and its role in cognition. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Cognitive Science*. 5 (5): 573-587.
- Palloto, M. & Deprez, F. (2014) Regulation of adult neurogenesis by GABAergic transmission: signaling beyond GABAA-receptors. *Frontiers in cellular neuroscience*. 8: 166. doi: 10.3389/fncel.2014.00166.
- Paxinos, G. & Watson, C. (2013) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 7th ed. Academic Press. Estados Unidos de América.

- Piatti, V. C., Davies, M. G., Espósito, M. S., Mongiat, L. A., Trincherro, M. F. & Schinder, A. F. (2011) The timing for neuronal maturation in the adult hippocampus is modulated by local network activity. *Journal of Neuroscience*. 31 (21): 7715-7728.
- Piatti, V. C., Espósito, M. S. & Schinder, A. F. (2006) The timing of neuronal development in adult hippocampal neurogenesis. *Neuroscientist*. 12 (6): 463-468.
- Revest, J. M., Dupret, D., Koehl, M., Funk-Reiter, C., Grosjean, N., Piazza, P. V. & Abrous, D. N. (2009) Adult hippocampal neurogenesis is involved in anxiety-related behaviors. *Molecular Psychiatry* 14 (10): 959-967.
- Rudy, J. W. (2009) Context representations, context functions, and the parahippocampal-hippocampal system. *Learning and Memory*. 16 (10): 573-585.
- Satvat, E., Schmidt, B., Arrives, M., Marrone, D. F. & Markus, E. J. (2011) Changes in task demands alter the pattern of zif268 expression in the dentate gyrus. *The Journal of Neuroscience*. 31 (19): 7163-7167.
- Scharfman, H. E. & Myers, C. E. (2013) Hilar mossy cells of the dentate gyrus: a historical perspective. *Frontiers in Neural Circuits*. 6: 106. doi: 10.3389/fncir.2012.00106.
- Schoenfeld, T. J. & Cameron, H. A. (2015) Adult neurogenesis and mental illness. *Neuropsychopharmacology*. 40 (1): 113-128.
- Shots, T. J., Townsend, D. A., Zhao, M., Kozorovitsiy, Y. & Gould, E. (2012) Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning. *Hippocampus*. 12 (5): 578-584.
- Wang, D.D. & Kriegstein, A. R. (2008) GABA regulates excitatory synapse formation in the neocortex via NMDA receptor activation. *The Journal of Neuroscience*. 28 (21): 5547-5558.
- Wang, D.D. & Kriegstein, A. R. (2011) Blocking early GABA depolarization with bumetanide results in permanent alterations in cortical circuits and sensorimotor gating deficits. *Cerebral Cortex*. 21 (3): 574-587.
- Walcott, B. P., Kahle, K. T. & Simard, J. Marc. (2012) Novel treatment targets for cerebral edema. *Neurotherapeutics*. 9 (1): 65-72.
- Weisz, V. I. & Argibay, P. F. (2009) A putative role for neurogenesis in neurocomputational terms: Inferences from a hippocampal model. *Cognition*. 112 (2): 229-240.
- Whissell, P. D., Rosenzweig, S., Lecker, I., Wang, D.-S., Wojtowicz, J. M. & Orser, B. A. (2013)  $\gamma$ -aminobutyric acid type A receptors that contain the  $\delta$  subunit promote memory and neurogenesis in the dentate gyrus. *Annals of Neurology*. 74 (4): 611-621.