



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Doctorado en Ciencias Biomédicas

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

IMPACTO DE LA DISPERSIÓN DE LAS CÉLULAS GRANULARES EN LA
MORFOLOGÍA Y FUNCIÓN DEL GIRO DENTADO EN RESPUESTA A UN
DAÑO EXCITOTÓXICO FOCAL.

T E S I S
QUE PARA OPTAR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

M. en C. KARINA HERNÁNDEZ MERCADO

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Angélica Zepeda Rivera

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

COMITÉ TUTOR:

Dra. Martha Lilia Escobar Rodríguez

Facultad de Psicología, UNAM

Dr. Raúl Gerardo Paredes Guerrero

Instituto de Neurobiología, UNAM



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este proyecto fue realizado en el Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas bajo la asesoría de Dra. Angélica Zepeda Rivera. El proyecto contó con el apoyo financiero por beca de doctorado CONACyT 308538, además de los donativos PAPIIT-DGAPA 208518 y CONACyT 282470. Se extiende el agradecimiento al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas y al laboratorio de Neurobiología del Aprendizaje y la Memoria de la Facultad de Psicología por haber apoyado en la elaboración y culminación de esta investigación.

ÍNDICE

RESUMEN	4
ABSTRACT	5
1. ANTECEDENTES	7
1.1 Introducción al giro dentado.....	7
1.2 Organización estructural del giro dentado.....	8
1.2.1 Neuronas excitatorias	9
1.2.2 Neuronas inhibitorias	12
1.3 Vía perforante: circuito corteza entorrinal–giro dentado	15
1.3.1 Potenciación a largo plazo	18
1.4 Implicaciones del giro dentado en la memoria	20
1.4.1 Memoria de miedo al contexto	21
1.5 Daño excitotóxico neuronal	24
1.5.1 Daño excitotóxico en el giro dentado	25
1.6 Dispersión de células granulares en giro dentado.....	26
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	31
2.1 Pregunta de investigación.....	31
2.2 Hipótesis.....	32
3. OBJETIVOS	32
4. MATERIALES Y MÉTODOS	33
5. RESULTADOS	42
6. DISCUSIÓN	57
7. CONCLUSIÓN	64
8. BIBLIOGRAFÍA	64

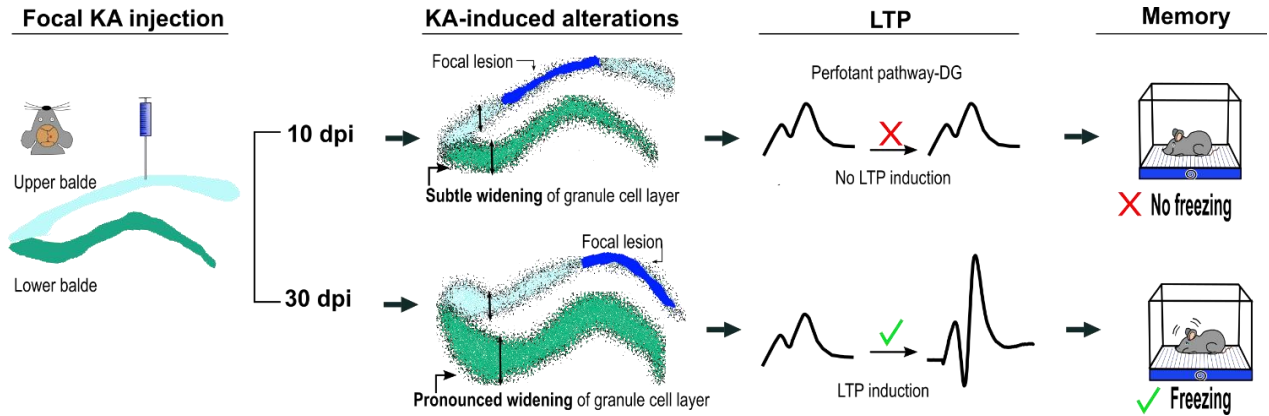
RESUMEN

El giro dentado (GD) es la principal puerta de entrada por la cual la información sensorial proveniente de la corteza entorrinal, a través de la vía perforante, ingresa al hipocampo. El correcto procesamiento de esta información en el GD es importante para la ejecución de procesos cognitivos dependientes de hipocampo. La dispersión de las células granulares (GCD, por sus siglas en inglés *granular cell dispersion*) es una alteración estructura del GD que se genera tras daño excitotóxico neuronal. Esta se caracteriza por un ensanchamiento de las capas granulares debido a un posicionamiento ectópico de las células granulares. En humanos, la GCD se presenta con frecuencia en pacientes con epilepsia de lóbulo temporal. En ratones experimentales, la GCD se induce tras la administración intrahipocampal de ácido kaínico (AK) y el incremento gradual de la dispersión ocurre dentro del primer mes tras la administración del fármaco. Sin embargo, aun cuando el evento de GCD está bien caracterizado, se desconoce el impacto que tiene la presencia y severidad de dicha alteración en la comunicación neuronal entre corteza entorrinal-GD, así como en los procesos cognitivos dependientes del hipocampo. Para abordar lo anterior, en el presente trabajo inyectamos AK en el GD de ratones y evaluamos en dos ventanas temporales, 10 y 30 días post-inyección (dpi), el impacto de la evolución de la GCD en: 1) el establecimiento de la potenciación a largo plazo (LTP) en la vía perforante (VP)-GD y 2) la conducta de aprendizaje y memoria de miedo al contexto. Nuestros resultados muestran que, a 10 dpi, cuando la GCD comienza a ser visible, la LTP, el aprendizaje y la memoria se encuentran alterados. No obstante, a 30 dpi, cuando la GCD es muy evidente, la LTP, el aprendizaje y la memoria están reestablecidas. Estos hallazgos sugieren que la evolución de una alteración morfológica como la GCD no impide ni la plasticidad sináptica en la VP-GD, ni la expresión del aprendizaje y memoria de miedo al contexto. Así entonces este trabajo, se demuestra el potencial plástico del GD para recuperar su función a lo largo del tiempo a pesar de la presencia de alteraciones estructurales como la GCD.

ABSTRACT

The dentate gyrus (DG) is the gateway of sensory information arriving from the perforant pathway (PP) to the hippocampus. The adequate integration of incoming information into the DG is paramount in the execution of hippocampal-dependent cognitive functions. An abnormal DG granule cell layer widening due to granule cell dispersion (GCD) has been reported under hyperexcitation conditions in animal models as well as in patients with mesial temporal lobe epilepsy. Strikingly, it is unclear whether the presence and severity of GCD along time affect synaptic processing arising from the PP and alter the performance in hippocampal-mediated behaviors. To evaluate the above, we injected excitotoxic kainic acid (KA) unilaterally into the DG of mice and analyzed the evolution of GCD at 10- and 30-days post-injection (dpi), while analyzing if KA-induced GCL widening affected in vivo long-term potentiation (LTP) in the PP-DG pathway, as well as the performance in learning and memory through contextual fear conditioning. Our results show that at 10 dpi, when a subtle GCD was observed, LTP induction, as well as contextual fear memory, were impaired. However, at 30 dpi when a pronounced increase in GCD was found, LTP induction and contextual fear memory were already reestablished. These results highlight the plastic potential of the DG to recover some of its functions despite a major structural alteration such as abnormal granule cell layer widening due to GCD.

GRAPHICAL ABSTRACT



GCD was induced by a KA focal administration in the upper blade of DG. After 10 days post-injection (dpi) a subtle GCD was observed and LTP induction, as well as contextual fear learning and memory were impaired. After 30 dpi a pronounced increase in GCD was found, and LTP induction and contextual fear learning and memory were already reestablished.

1. ANTECEDENTES

1.1 Introducción al giro dentado

El giro dentado (GD) es la estructura más sobresaliente de la formación hipocampal. Este presenta características morfológicas, celulares y fisiológicas únicas en el hipocampo, las cuales lo convierten en un blanco importante en el estudio de los procesos mnésicos [1]. El GD representa la principal puerta de entrada de la información sensorial proveniente de corteza entorrinal que ingresa al hipocampo a través de la vía perforante. Las conexiones de sus células principales, las células granulares, son unidireccionales y estas envían la información hacia CA3. A nivel de circuito, el GD es una de las estructuras cerebrales más silentes dado que las células granulares presentan bajos niveles de actividad [2,3]. Sin embargo, cuando las células granulares se activan, éstas logran transmitir eficazmente, a través de las fibras musgosas, la información hacia la región CA3 del hipocampo [4].

La posición anatómica del GD entre la corteza entorrinal y el hipocampo, aunado a la baja actividad de sus neuronas principales ha llevado a establecer la teoría de que el circuito del GD transforma las aferencias de la corteza entorrinal, altamente activas y con múltiple información sensorial, en un código de activación específico [5]. El procesamiento de esta información en el GD es clave en procesos fundamentales de la memoria dependiente de hipocampo como separación y completación de patrones [5,6]. Alteraciones anatómicas y fisiológicas que incrementen la excitabilidad y alteren la estructura del GD pueden comprometer su función y desencadenar daños cognitivos y desórdenes neurológicos [7]. A continuación, se describirá brevemente la organización anatómica del GD, sus principales componentes celulares y su conectividad.

1.2 Organización estructural del giro dentado

El GD está compuesto por tres capas: la molecular, la granular y la polimórfica o hilus (Fig.1). La capa molecular se encuentra ocupada principalmente por las dendritas de las células granulares y algunos somas de interneuronas inhibitorias locales. Asimismo, esta capa recibe axones de un número limitado de regiones, la fuente principal proviene de la vía perforante, los cuales inervan la zona externa y media de la capa molecular [1]. Las fibras de asociación y comisurales provenientes del hilus ipsi y contralateral inervan la zona más interna de la capa molecular, mientras que los axones de las interneuronas (INT) locales del GD cubren toda la capa molecular.

Debajo de la capa molecular se encuentra la capa granular, que está constituida principalmente por los somas de las células granulares y algunos somas, axones y dendritas de interneuronas (INT) locales. En esta capa se identifican dos zonas: 1) la granular donde se localizan los somas de células granulares maduras, y 2) la sub-granular, una región muy fina donde se encuentran células progenitoras y ocurre el nacimiento de nuevas neuronas en el cerebro adulto de muchos mamíferos (Fig.1). Finalmente, el hilus, la tercera capa del GD, se ubica debajo de la zona sub-granular y se extiende en el plano medio-lateral hasta el borde de las dendritas de las neuronas piramidales de CA3. En el hilus residen los axones de las células granulares llamados fibras musgosas, las células musgosas, y algunas INT inhibitorias [8]. El GD se compone de diversos tipos celulares con propiedades únicas e importantes para la función hipocampal. Para facilitar su descripción a continuación se les dividirá en neuronas excitatorias e inhibitorias.

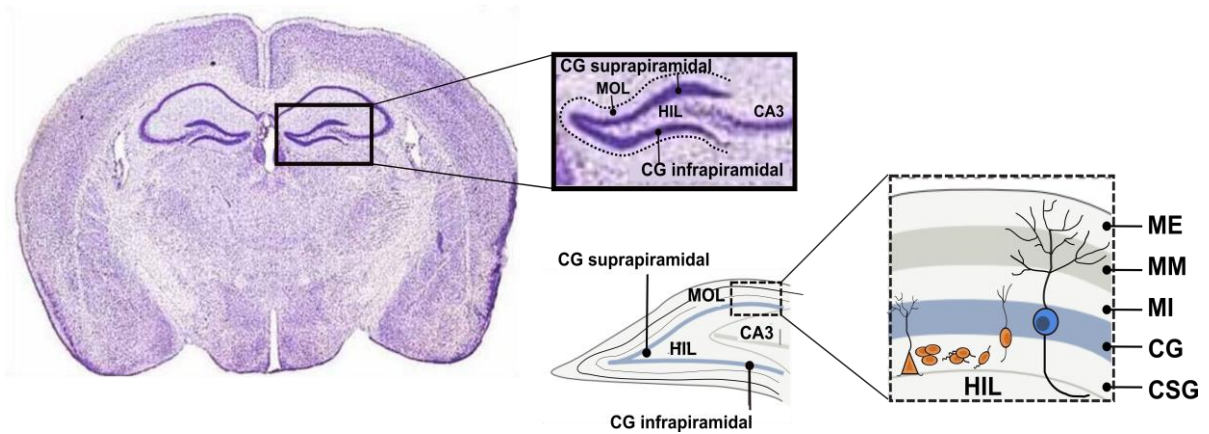


Figura 1. Organización del GD en el plano coronal del cerebro del roedor. A la izquierda se observa un corte coronal del cerebro de ratón teñido con violeta de cresilo. En el recuadro negro con línea continua se muestra una ampliación del GD donde se señalan sus tres capas principales: capa granular (CG), molecular (MOL) y polimórfica o hilus (HIL). Debajo de esta ampliación se encuentra una ilustración del GD con sus capas principales. En el recuadro con líneas no continuas se observa una ampliación de la estructura laminar del GD: en la capa subgranular (CSG) se lleva a cabo el proceso de neurogénesis adulta (células en color naranja); en la capa granular (GC) se encuentran principalmente los somas de las células granulares; en la capa molecular se observan las dendritas de las células granulares, esta se divide en tres zonas: 1) molecular interna (MI), 2) molecular media (MM) y 3) molecular externa (ME). Figura recreada a partir de [9]

1.2.1 Neuronas excitatorias en el GD

Células granulares. Las células granulares son las neuronas principales que conforman al GD. Estas células son excitadoras y reciben aferencias excitatorias mayoritariamente de la corteza entorrinal a través de la vía perforante. A su vez, las células granulares envían sus eferencias a las neuronas piramidales de CA3 y a las INT que residen en el hilus [10]. Las células granulares tienen un soma elíptico localizado en la capa granular y un árbol dendrítico en forma de cono que se extiende por toda la capa molecular [11]. Los somas de las células granulares se encuentran en estrecha aposición entre ellos, lo cual confiere la apariencia compacta propia de la capa granular [1]. Esta compactación puede perderse debido

a una alteración conocida como dispersión de células granulares que se presenta en condiciones patológicas de excitotoxicidad y en la cual se ahondará en el presente trabajo [12,13].

Una característica importante de las células granulares es que son neuronas con baja tasa de actividad, lo que convierte al GD en una de las estructuras cerebrales más silentes. Estas células presentan una tasa promedio de disparos baja durante tareas de exploración (<0.5 Hz) [3]. Paralelamente, se ha reportado un menor porcentaje de genes de expresión temprana dependientes de actividad (c-Fos, Zif86 y Arc) en células granulares que en neuronas piramidales del hipocampo (~ 2 -5% vs 40%) tras exponer a roedores a tareas exploración o navegación espacial [2,14,15]. Las células granulares son menos excitables que las neuronas piramidales dado que poseen un potencial de reposo más hiperpolarizado y una mayor resistencia de membrana [16]. Además, estas células presentan una rápida adaptación en la frecuencia de sus disparos ante despolarizaciones sostenidas [17,18,16]. Del mismo modo, su baja actividad se encuentra modulada por el fuerte control inhibitorio que ejercen sobre ellas las INT GABAérgicas locales [7,19]. No obstante, una vez activas, las células granulares tienen la capacidad de transmitir y amplificar de manera efectiva la información proveniente de la CE a su principal efector, las neuronas piramidales de CA3, gracias a los botones gigantes de las fibras musgosas (ver abajo). La precisión en la actividad de las células granulares es clave para la ejecución de funciones cognitivas como la codificación y discriminación espacial [5,20].

Las células granulares tienen axones no mielinizados denominados fibras musgosas (Fig. 2). Estas fibras juegan un papel primordial en el procesamiento de la información de la vía perforante y garantizan la transferencia de esta a la región de CA3. Las fibras musgosas contactan a sus blancos postsinápticos con tres estructuras pre-sinápticas: 1) botones gigantes, 2) elongaciones filopodales y 3) terminales *en passant*. Los botones gigantes forman sinapsis excitatorias con las células musgosas del hilus (7-12 por axón) y con neuronas piramidales en CA3 (11-15 por axón) [19]. Una neurona piramidal en CA3 puede ser contactada por ~ 50

botones gigantes originarios de diferentes axones [21]. Los botones gigantes además de ser de gran tamaño, contienen múltiples sitios de liberación de neurotransmisores y presentan facilitación sináptica. Estas características son únicas en el cerebro de mamíferos y permiten a las células granulares actuar como “detonadores” sobre sus blancos postsinápticos en CA3 durante periodos de alta actividad [4]. El contacto sináptico con los botones gigantes genera la formación de un complejo de espinas en las dendritas de las neuronas piramidales y células musgosas llamado excresencias espinosas (Fig.2).

Por su parte, las elongaciones filopoidales que brotan de los botones gigantes (2-4 elongaciones por botón) y las terminales *en passant*, contactan a INT inhibitorias tanto en el hilus como en CA3 (~ 150 en el hilus y ~ 50 en CA3). La activación de estas INT inhibitorias puede a su vez inhibir a células granulares y piramidales de CA3 [19]. La distribución de estos contactos denota que cada fibra musgosa puede crear un fuerte control inhibitorio sobre los ensamblajes neuronales en CA3 y en el GD. Este control inhibitorio es importante para la precisión de memorias episódicas dependientes de hipocampo [20,22].

Las células musgosas. Las células musgosas son las segundas células excitatorias del GD y residen en el hilus. Estas células tienen un cuerpo celular largo en forma triangular y sus dendritas se esparcen principalmente sobre el hilus y algunas sobre la capa molecular interna (Fig. 2) [23]. Las células musgosas reciben aferencias de otras células musgosas, INT inhibitorias, neuronas del septum medial y de la corteza entorrinal, así como de células granulares [24]. Una característica sobresaliente de las dendritas proximales de las células musgosas es la presencia de excresencias espinosas, resultado del contacto con botones gigantes de las fibras musgosas [1]. Por su parte, el axón de estas células crea contactos distantes con células granulares ipsi y contralaterales formando una vía comisural [25]. Cabe mencionar que, las células musgosas localizadas en la parte temporal de GD pueden contactar a células granulares distales en el eje dorsal ipsilateral [9]. A su vez, las células musgosas crean sinapsis locales con INT inhibitorias en el hilus, de manera tal que, mientras en regiones distales las células musgosas promueven la

excitación directa de células granulares, en regiones locales contribuyen a su inhibición indirecta [26].

El óptimo funcionamiento de la neurotransmisión glutamatérgica es clave para transmisión de información desde la CE hacia el GD. Sin embargo, en el caso de un evento de hiperexcitabilidad con el consecuente daño excitotóxico en GD, las células granulares son vulnerables de sufrir alteraciones como migración ectópica y formación de conexiones recurrentes aberrantes. Se ha postulado que estas alteraciones, como se verá más adelante, podrían aumentar la severidad del daño excitotóxico y comprometer así la función del GD y la comunicación entre la CE-GD.

1.2.2 Interneuronas Inhibitorias en GD

Las interneuronas (INT) inhibitorias son elementos clave para el adecuado funcionamiento de los circuitos cerebrales. En el GD existe una gran variedad de INT inhibitorias con propiedades y distribuciones regionales específicas. Su clasificación constituye una tarea de gran dificultad debido que al analizar sus propiedades no surgen clases bien definidas. A continuación, se describirán brevemente algunas de las principales características de estas INT con base en la proyección de su axón y la localización de su soma [27].

INT de canasta parvoalbúmina positiva. En esta clasificación se encuentran las INT de canasta que contactan somas y dendritas proximales, y las axo-axónicas que contactan al segmento inicial del axón (Fig. 2). El soma de estas INT se localiza entre el borde de la capa granular y el hilus [28]. Su axón se expande y ramifica sobre la capa granular, lo que les permite contactar a múltiples células granulares [29]. Las dendritas se extienden ampliamente desde el hilus hasta la capa molecular y reciben sinapsis de todas las aferencias del GD [30]. Dada la localización de sus dendritas (hilus y capa molecular), estas INT ejercen un fuerte control inhibitorio sobre las células granulares por mecanismos de *feedback* y *feedforward* [31]. A su vez, al contactar regiones perisomáticas, modulan la

respuesta de disparos de las células granulares. Por ejemplo, se ha observado que la inhibición optogenética de las INT parvoalbúmina positivas en el GD incrementa la tasa de disparo de las células granulares tras la estimulación de la vía perforante *in vitro*. Lo anterior denota un papel importante de estas INT sobre el control de la excitabilidad del GD.

INT somatostatina positivas. Estas INT se caracterizan porque su soma se localiza en el hilus y se pueden distinguir dos tipos celulares: las INT asociadas a la vía perforante del hilus (HIPP, por sus siglas en inglés *hilar perforant path*) y las INT del hilus (HIL) (Fig.2). Estas INT establecen sinapsis inhibitorias en las dendritas de sus blancos. Las dendritas de las HIPP se distribuyen en el hilus y pocas veces entran a la capa granular [27]. Su axón se bifurca transversalmente en la capa granular, ramificándose en la capa molecular externa donde forman el 75% de sus contactos con células granulares [32]. Una porción pequeña de su axón permanece en el hilus haciendo sinapsis con otras INT locales u otras HIPP. Por su parte, las dendritas y el axón de las INT HIL se localizan casi por completo en el hilus, solo una mínima parte del axón entra a la capa granular. Estas reciben aferencias de muchas células de musgosas e inhiben principalmente a otras INT en el hilus y a células glutamatérgicas en el septum medial. A su vez, se ha observado que algunas INT somatostatina positivas contactan al GD contralateral, lo cual podría modular la actividad neuronal en ambos hemisferios. Además, cabe mencionar que la inhibición optogenética de estas INT disminuye la expresión de c-fos *in vivo* en el GD indicando una función importante de estas INT en la plasticidad sináptica del circuito.

INT de la vía comisural asociativa (por sus siglas en inglés, HICAP). El soma de esta clase de INT se localiza entre el borde del hilus y la capa subgranular y sus dendritas se extienden desde el hilus hasta la capa molecular (Fig. 2). Su axón proyecta y se ramifica principalmente en la capa molecular interna (75.5%) y en la capa granular (22.6%) y cubre casi por completo al GD en el eje dorso-ventral. Dada su posición cercana al hilus, las INT HIPP, HIL y HICAP reciben mucha inervación

de las fibras musgosas y en consecuencia ejercen inhibición sobre las células granulares por el mecanismo de *feedback* [29].

Interneuronas (INT) con cuerpo celular en la capa molecular. En esta clasificación se encuentran dos tipos de INT cuyo soma reside en la capa molecular: 1) las de la vía perforante de la capa molecular (MOPP, por sus siglas en inglés *molecular layer perforant pathway*) y las de la capa molecular externa (OML, por sus siglas en inglés *outer molecular layer*) [28]. Las dendritas de las INT MOPP se extienden por la capa molecular y forman sinapsis con los axones de la vía perforante y la vía comisural. Los axones se localizan en la capa molecular externa y forman contactos con células granulares e INT en esta región. Por su parte, las dendritas y axones de las INT OML residen también en la capa molecular externa, pero los axones atraviesan la fisura hipocámpal y forman conexiones con el subículo. Dada la ausencia de dendritas en el hilus, las INT MOPP y OML ejercen inhibición sobre las células granulares por el mecanismo de *feedforward* [32].

En conjunto, el óptimo funcionamiento de la neurotransmisión GABAérgica es clave para mantener la silencia y el funcionamiento del GD. Durante el daño excitotóxico, las INT GABAérgicas son vulnerables a muerte. Aquellas que sobreviven pueden sufrir múltiples cambios en sus conexiones, su fisiología y su función. Por ello, las alteraciones en las propiedades de estas INT podrían contribuir con la evolución y severidad de la excitotoxicidad en un escenario de daño.

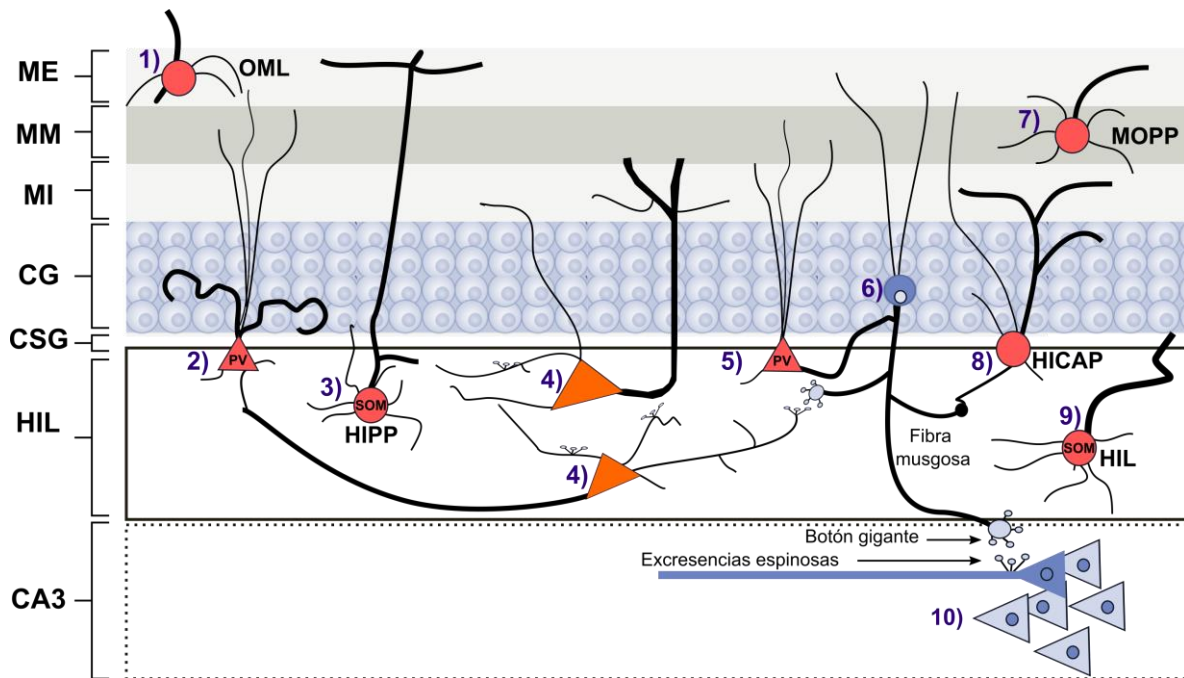


Figura 2. Componentes celulares del GD. Las líneas más gruesas en cada tipo celular representan la distribución de su axón, mientras que las líneas delgadas reflejan la ubicación sus dendritas. Las células con soma rosa corresponden a INT GABAérgicas, con soma naranja a células musgosas y con soma azul circular a células granulares. **(1)** INT OML cuyo soma, dendritas y axón residen principalmente en la capa molecular externa; **(2)** INT de canasta PV positivas que realizan contactos en el soma o en el segmento inicial del axón de las células granulares; **(3)** INT somatostatina (SOM) positiva HIPP que proyectan su axón hacia la capa molecular externa; **(4)** células musgosas con soma triangular en el hilus, en las dendritas se puede observar la presencia de excrescencias espinosas; **(5)** INT de canasta PV positiva que establece conexiones axo-axónicas con células granulares; **(6)** célula granular con soma en la capa granular, los axones de estas forman las fibras musgosas que atraviesan el hilus donde pueden contactar con botones gigantes a células de musgosas y con filopodios a INT GABAérgicas; **(7)** INT MOPP con soma en la capa molecular media; **(8)** INT de la vía comisural asociativa HICAP; **(9)** INT SOM positiva HIL; **(10)** En CA3 se localizan las neuronas piramidales que son contactadas por las células granulares a través de botones gigantes. Hilus (HIL); capa subgranular (CSG); capa granular (CG); molecular interna (MI); molecular medio (MM); molecular externa (ME).

1.3 Vía perforante: circuito corteza entorrinal–giro dentado

La corteza entorrinal (CE) y el giro dentado (GD) son dos estructuras cerebrales interconectadas cuya comunicación es clave en la formación de la memoria

episódica dependiente de hipocampo [33]. La fuente principal de inervación glutamatérgica que ingresa al GD proviene de la CE [1]. Las eferencias glutamatérgicas de la CE llegan al GD a través de la vía perforante. Esta vía se forma por los axones de la CE, los cuales pasan por la circunvolución angular, atraviesan la capa de células piramidales del subículo y la fisura hipocampal para finalmente entrar al GD [34]. La CE se divide comúnmente en medial (CE-M) y lateral (CE-L). La CE-M se encuentra conectada corticalmente con áreas como el pre-subículo y el para-subículo, la corteza retrosplenial y la corteza post-perirrinal [35]. Estas regiones están fuertemente involucradas en el procesamiento de la información espacial y la navegación [36–38]. Por su parte, la CE-L se conecta con áreas olfativas, insulares, orbitofrontales y la corteza perirrinal. Estas regiones están más asociadas a la codificación de los objetos en el contexto, la atención y la motivación [39].

La CE medial y la lateral se encuentran organizadas en seis capas que se caracterizan por una diversidad neuronal específica. Las células de la capa II y III proyectan hacia la formación hipocampal; específicamente, las células de la capa II inervan al GD y a CA3, mientras que las de la capa III proyectan hacia CA1 [35]. La capa II contacta al GD en los dos tercios externos de la capa molecular (Fig. 3). Los axones de la CE medial provenientes de la capa II desembocan en la parte media de la capa molecular del GD y proveen a este de información espacial importante para la navegación [34,40]. Por su parte, los axones de la CE lateral llegan a la parte más externa de la capa molecular del GD y proveen a éste de información sobre las características de los objetos y su localización dentro de un contexto [34,40]. La adecuada integración de esta información por parte del GD es clave en la función de la memoria episódica dependiente de hipocampo [41,42]. De manera interesante, se ha reportado que, en cerebros de pacientes con Alzheimer, la capa II de la CE se encuentra particularmente alterada, con una disminución de aproximadamente 56% del número de células reportado en individuos control [43]. Esta alteración se asocia con una disminución en el contenido de glutamato en la zona terminal de los axones de la vía perforante, la capa molecular del GD, lo cual

denota la estrecha comunicación entre estas estructuras y sugiere un correlato anatómico de la alteración de la memoria [44].

El flujo de información de la CE hacia el hipocampo se caracteriza por la generación de patrones de oscilación gamma en CE y theta en el hipocampo durante el aprendizaje [45,46]. Una vez procesada la información por el hipocampo, esta se transmite a la capa V de la CE y otras regiones corticales como la corteza prefrontal. Este flujo de información se asocia a la generación de oscilaciones rápidas (*sharp-ripples* por su denominación en inglés) relacionadas con la consolidación de la memoria en áreas corticales [47,48]. Finalmente, las neuronas de la capa V de la CE pueden contactar a las neuronas en las capas II y III, regresando así al punto de inicio de la comunicación CE- GD e hipocampo. De esta manera, se crea un bucle de comunicación entre dichas estructuras, importante para los procesos mnémicos.

Ante el daño por excitotoxicidad, tanto la CE, como el hipocampo son altamente vulnerables de sufrir pérdida neuronal. Este tipo de insulto podría alterar las propiedades funcionales del circuito CE-hipocampo y comprometer así aspectos relacionados con la formación de la memoria episódica (ver más adelante).

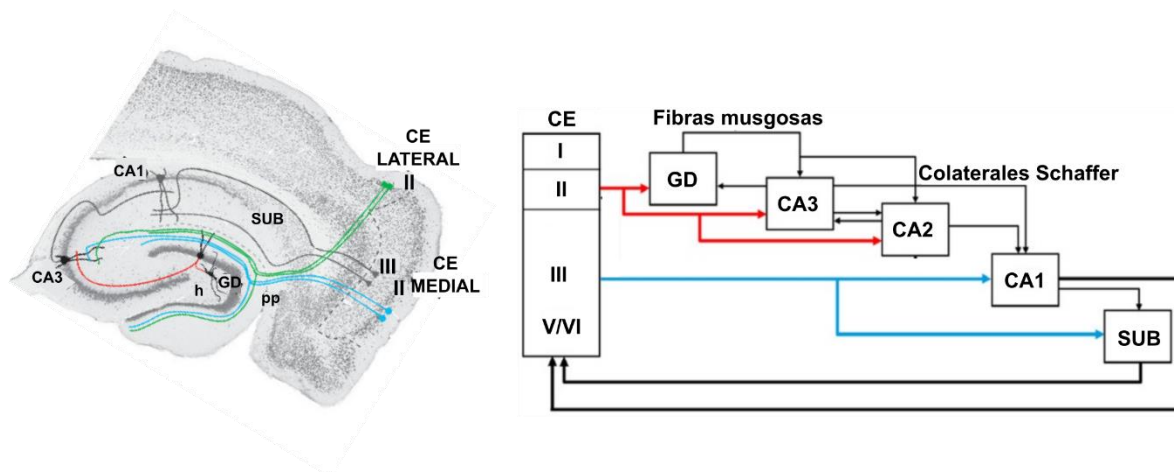


Figura 3. Circuito corteza entorrinal-hipocampo. (A) se observa la formación hipocampal de rata y su conectividad. El GD recibe conexiones de la capa II de la corteza entorrinal (CE, en líneas verde

y azul). Las fibras musgosas (línea roja) envían la información a las células piramidales del CA3 e INT del hilus. (B) Representación esquemática de las proyecciones de la vía perforante hacia el hipocampo y las principales conexiones entre el GD, CA3, CA2, CA1 y el subículo (SUB). Figura modificada de: [49,50]

1.3.1 La potenciación de largo plazo (LTP)

Desde la descripción de la amnesia anterógrada generada en el paciente H.M tras la extirpación de ambos lóbulos temporales en 1957, el hipocampo se convirtió en un blanco importante para el estudio de la memoria [51]. Aproximadamente, quince años después, el conocimiento respecto a las bases neurofisiológicas que subyacen la función del hipocampo tuvo dos avances importantes: 1) el hallazgo del fenómeno de potenciación de largo plazo (LTP) por Tim Bliss y Terje Lømo en 1973 y 2) el descubrimiento de las células de lugar que codifican la posición espacial de un animal por O'Keefe y Dostrovsky en 1971 [52,53]. Estos descubrimientos motivaron a los estudios subsecuentes y actuales que tratan de comprender cómo dichos mecanismos contribuyen en el almacenamiento de la información y en la representación espacial.

La LTP se refiere al aumento de la eficiencia sináptica dependiente de actividad. Tim Bliss y Terje Lømo observaron que tras la estimulación de alta frecuencia en la vía perforante-GD (VP-GD) en conejos anestesiados se incrementaba la eficiencia de la transmisión sináptica [52]. Este incremento podía durar por periodos prolongados, horas o días, por ello la denominación de "potenciación de largo plazo". La LTP se considera en un fenómeno de plasticidad Hebbiana ya que funcionan acorde al postulado de Donald Hebb que dice "cuando la terminal de una célula A se encuentra lo suficientemente cerca para excitar a una célula B y repetidamente forma parte de su activación, un cambio metabólico o estructural tiene lugar en alguna de las dos células, de modo que la eficiencia de A para activar a B incrementa [54]. Dicha plasticidad Hebbiana es ideal para la formación de ensamblajes neuronales a partir de circuitos reverberantes, lo cuales

podrían funcionar como los sustratos sobre los cuales se construyen las rutas de la memoria [54].

En términos de su expresión temporal se reconocen dos fases de la LTP: la fase temprana y la tardía [55]. La fase temprana es evidente durante los primeros minutos tras la estimulación y se caracteriza por cambios que no requieren síntesis de proteínas como la activación de los receptores AMPA y NMDA por la unión del glutamato liberado de la terminal presináptica. Los receptores AMPA permiten la entrada de iones sodio lo cual genera una ligera despolarización de la membrana postsináptica. Cuando dicha despolarización es suficiente, se libera el ion magnesio que obstruye al poro que conforma el receptor NMDA, permitiendo así la entrada de calcio. El incremento de calcio intracelular activa una serie de eventos que aumentan la comunicación neuronal [56]. Si las condiciones de inducción son suficientes, la fase temprana evoluciona a la fase tardía. Esta se caracteriza principalmente por la síntesis de proteínas y modificaciones estructurales que producen un fortalecimiento estable de las sinapsis. Se ha demostrado que el mantenimiento de la LTP es dependiente de síntesis de proteínas en periodos mayores a una hora tras la inducción [55]. Estudios teóricos sugieren que la expresión temporal de las fases de la LTP permite el almacenamiento duradero de la información a través de los cambios plásticos en la función sináptica [57].

La LTP presenta tres propiedades fundamentales: cooperatividad, asociatividad y especificidad [58]. La cooperatividad se refiere al requerimiento de la actividad simultánea de las fibras presinápticas para alcanzar el umbral necesario que induce la potenciación. La asociatividad se refiere a cuando la actividad de una sinapsis fuerte que es capaz de expresar LTP, facilita la potenciación de otra sinapsis débil que no expresa LTP, siempre y cuando ambas coincidan en tiempo y espacio. Finalmente, la especificidad refleja que solo aquellas fibras que fueron estimuladas pueden ser potenciadas. Estas tres propiedades, aunado a su persistencia en el tiempo, hacen que la LTP sea considerada como uno de los mecanismos que subyacen el almacenamiento de la información [59]. Diversos

estudios han generado evidencia sólida sobre la relación entre la LTP y la consolidación de la memoria, como: 1) son fenómenos que funcionan acorde al postulado de Hebb, 2) ambos operan en áreas cerebrales involucradas en memoria, 3) son fenómenos que requieren incremento intracelular de calcio y síntesis de proteínas, 4) son eventos de duración prolongada y presentan una fase temprana y tardía, 5) ambos presentan un decaimiento similar en ciertas condiciones (envejecimiento y exposición a estrés crónico) y 6) ambos generan reorganización sináptica [59–61]. En el presente trabajo se empleó la tarea del condicionamiento de miedo al contexto para evaluar el aprendizaje y memoria asociadas al funcionamiento del circuito hipocampal [62,63]. En este sentido, estudios han observado una relación positiva entre la magnitud de la LTP en la VP-GD y la adquisición de dicha tarea [64]. Lo anterior denota una estrecha relación entre la plasticidad sináptica de la VP-GD y la funcionalidad hipocampal.

1.4 Implicaciones del giro dentado en la memoria

La formación hipocampal es crucial para la función de la memoria episódica - espacial. Individuos con lesiones hipocámpales son incapaces de codificar o presentan deficiencia en la memoria episódica, particularmente en aquellas con contenido espacial [65]. Dada su posición anatómica y conectividad, el GD tiene la posibilidad de procesar la información espacial y no espacial proveniente de la corteza entorrinal (CE). Se postula que esto le permite demarcar con características precisas la información de una experiencia en un contexto específico [66]. En este sentido, se ha reportado que el GD participa en la separación y completación de patrones [6], en la detección de aspectos novedosos [67] y en la precisión de la memoria [22,66]. Esto señala al GD como un elemento importante para el adecuado funcionamiento de la memoria episódica-espacial dependiente de hipocámpal.

Dentro de este marco de ideas, se ha observado que el GD dorsal ejerce un papel importante en la codificación y evocación de la memoria asociativa [68]. Este

tipo de memoria crea asociaciones entre la información espacial y las pistas sensoriales (visuales, auditivas, olfativas etc.) presentes en un contexto específico [69,70]. El procesamiento de información espacial en el GD se asocia a la activación de receptores NMDA mediada por su conexión con la vía perforante medial [71,72,73]. Esta vía aporta información métrica para crear una representación neuronal del espacio [69]. Por su parte, el procesamiento de objetos visuales se relaciona con la activación de receptores opioides mediada por su conexión con la vía perforante lateral [74]. Esta vía provee información relacionada con las características de los objetos dentro de un espacio [40]. Por lo tanto, a través de estas conexiones, se propone que el GD ejerce una función de codificación asociativa de objetos visuales e información espacial para crear una representación precisa y métrica del contexto [40]. La tarea de condicionamiento de miedo al contexto ha sido empleada ampliamente para evaluar la memoria espacial asociativa [75]. A continuación, se describirá brevemente la participación de GD en la formación de este tipo de memoria.

1.4.1 Memoria del miedo al contexto

El condicionamiento de miedo al contexto es una tarea en donde los roedores aprenden a asociar un estímulo sensorial negativo (ej. choque eléctrico) con un contexto neutro específico (ej. cámara de condicionamiento) [62,63]. El estímulo negativo se presenta a través de la generación de un choque eléctrico en las patas de los roedores cuando estos se introducen en un contexto particular, como una cámara de condicionamiento [76]. En la fase de condicionamiento o aprendizaje, el roedor se introduce en la caja de condicionamiento y tras uno o varios ensayos en los que se presenta el choque eléctrico, este presenta una respuesta conductual de miedo caracterizada por inmovilidad o congelamiento. En la fase de memoria el sujeto se introduce en la cámara de condicionamiento donde previamente se les presentó el choque, pero en esta ocasión ningún choque es generado. La expresión conductual de la memoria en el roedor se observa con un mayor porcentaje de tiempo inmóvil durante la sesión. El hipocampo y la amígdala basolateral se han

señalado como las regiones cerebrales más importantes para la codificación, consolidación y evocación de las memorias del miedo al contexto [77]. Específicamente, el hipocampo tiene una relevancia clave en la codificación del elemento contextual condicionado al estímulo negativo [78,79].

A partir de estudios en roedores se ha reportado que el GD dorsal es importante para establecer la asociación entre el choque eléctrico y el contexto condicionado [75]. La inhibición optogenética y farmacológica de las células granulares en el GD dorsal durante la fase de adquisición, altera el posterior desempeño de los ratones durante la fase de evocación [75,80,81]. Además, la activación optogenética de las células granulares que estuvieron activas durante la adquisición es suficiente para evocar la memoria de miedo al contexto, mientras que su inhibición altera la evocación de la memoria [82]. De manera semejante, la inhibición de Arc y CREB en células granulares durante la fase de evocación, disminuye la expresión de la memoria de miedo al contexto [81,83]. A nivel neuronal se tiene la hipótesis de que, durante la etapa de codificación de la memoria, las células granulares a través de la vía de las fibras musgosas reclutan un ensamble único en CA3 (vía indirecta: vía perforante (VP)→GD→CA3) (Fig.4). A su vez, este ensamble en CA3 se asocia con las conexiones de la vía perforante para formar así una representación sólida de la información (vía directa: VP→CA3) [20,84].

Aunado a lo anterior, se ha reportado que la comunicación entre vía indirecta VP→GD→CA3 es importante en el mantenimiento y consolidación de la memoria de miedo al contexto [20]. El fortalecimiento sináptico entre las fibras de la VP y las células granulares que participan en la codificación de la memoria se presenta durante la primera semana tras el condicionamiento [84]. Durante este tiempo es posible reactivar al engrama de memoria en GD por reexposición al contexto condicionado. Tras dos semanas del condicionamiento, el engrama de memoria en GD se vuelve silente y las conexiones sinápticas entre la VP y las células granulares que participan en la codificación de la memoria disminuyen [84,85]. Esto se relaciona en tiempo con la activación y maduración del engrama de memoria en corteza prefrontal (Fig.4). Cabe destacar que, la inactivación de las eferencias de

las células granulares que participan en la codificación de la memoria sobre CA3 durante el condicionamiento, alteran la subsecuente maduración del engrama en corteza prefrontal y la consolidación tardía de la memoria [84]. En conjunto, estos estudios señalan al GD y su comunicación con la VP y CA3, como elementos importantes para la formación, mantenimiento y consolidación de la memoria de miedo al contexto.

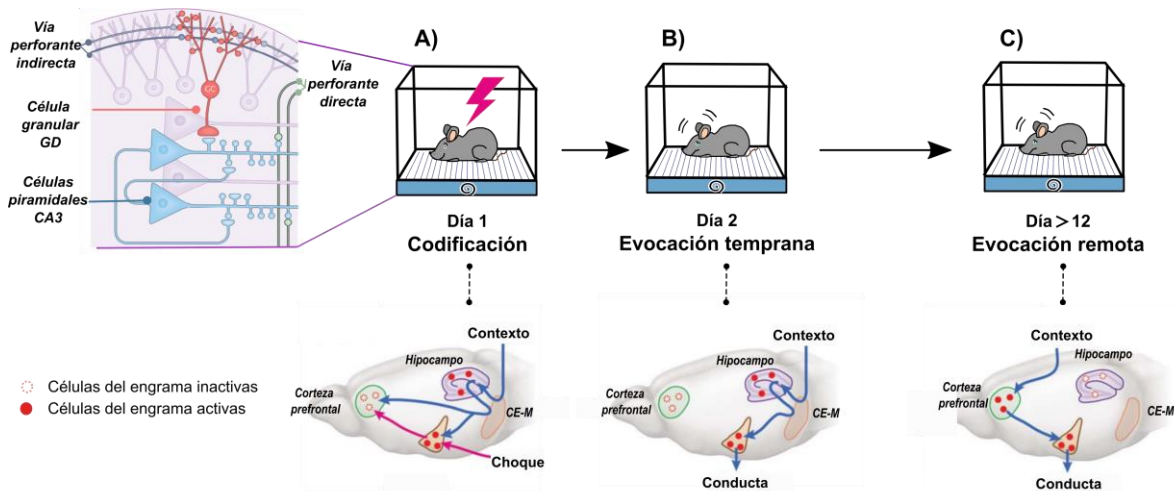


Figura 4. El giro dentado y la memoria de miedo al contexto. A) Durante la codificación de la memoria, día 1 (condicionamiento), se inicia un fortalecimiento sináptico entre los axones de la vía perforante (morado) y las dendritas de las células granulares. La activación de las células granulares podría reclutar, a través de las fibras musgosas, un ensamble único de células en CA3 (vía indirecta). A su vez este ensamble se asocia con las conexiones de la vía perforante directa (verde) para crear así una representación sólida de la información contextual. Debajo se observan los engramas de memoria y los circuitos relacionados con la consolidación de la memoria de miedo al contexto. Durante la codificación se forma los engramas del hipocampo, incluyendo el del GD, la amígdala y el de la corteza prefrontal. **B)** Durante la evocación temprana de la memoria, día 2 tras la codificación, los engramas del hipocampo y la amígdala se encuentran activos, pero no así el engrama de la corteza prefrontal, el cual se encuentra silente e inmaduro, este madura y es funcional con el paso del tiempo. **C)** Durante la evocación de la memoria tardía, >12 días tras codificación, el engrama del hipocampo ya no es reclutado durante la evocación de la memoria dado que se encuentra silente. No obstante, el engrama de memoria en corteza prefrontal y la amígdala se encuentran activos y son reclutados. Figura recreada a partir de: [20,84]

1.5 Daño excitotóxico neuronal

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador en el sistema nervioso. La mayoría de las neuronas en el cerebro expresan uno o más tipos de receptores a glutamato, los cuales son clasificados en ionotrópicos y metabotrópicos [86]. La transmisión glutamatérgica juega un papel primordial en la mayoría de las funciones cerebrales [87]. Sin embargo, la activación sostenida de la transmisión glutamatérgica puede ocasionar daño y muerte neuronal por excitotoxicidad [88]. En humanos existe evidencia de que la excitotoxicidad contribuye en el proceso neurodegenerativo de algunas patologías como la epilepsia, las enfermedades de Alzheimer [89], Parkinson [90] y Huntington [91], así como la esclerosis lateral amiotrófica [92]. Además, este tipo de daño se puede presentar tras experimentar accidentes cerebrovasculares y traumatismo craneoencefálico [93].

El mecanismo de excitotoxicidad involucra la entrada masiva y acumulación de sodio y calcio en el espacio intracelular [88]. Esto conlleva a la subsecuente activación de calpaínas, generación de especies reactivas de oxígeno y disfunción mitocondrial, que en conjunto ocasionan muerte neuronal (ver Fig.5) [88]. Las concentraciones elevadas y prolongadas de calcio activan a las calpaínas, unas proteasas de cisteína que degradan proteínas del citoesqueleto, receptores de membranas y enzimas metabólicas, lo cual ocasiona degeneración dendrítica y muerte neuronal [94]. Asimismo, se genera un aumento exacerbado de especies reactivas de oxígeno, como: el ion superóxido, el peróxido de hidrogeno y el radical hidroxilo. Estas pueden provocar daños a la membrana mitocondrial y a la molécula de ADN y en consecuencia inducir muerte neuronal por apoptosis [95].

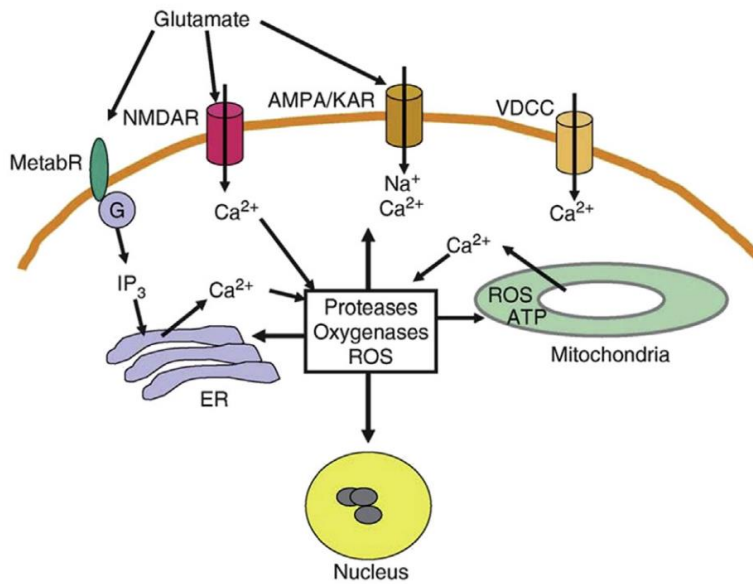


Figura 5. Mecanismos relacionados al daño neuronal por excitotoxicidad. La unión del glutamato a los receptores AMPA y kainato permiten la entrada de sodio a la neurona y la subsecuente despolarización de la membrana. Esto provoca la apertura de los canales de calcio (Ca^{2+}) dependientes de voltaje (VDC) y de los receptores NMDA. EL glutamato a través de la activación de los receptores metabotrópicos (MetabR) induce

la liberación de calcio del retículo endoplásmico (ER). En conjunto esto resulta en una entrada masiva de calcio. Los niveles altos de calcio en el citoplasma pueden inducir la entrada del ion a la mitocondria. Esto promueve la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y una disminución en los niveles de ATP. A su vez, la activación de proteasas como las calpaínas y las ROS pueden inducir degeneración y muerte neuronal. Figura modificada de: [96]

La susceptibilidad al daño por excitotoxicidad puede variar entre diferentes tipos neuronales. La capacidad que tiene cada neurona para amortiguar y sacar calcio del espacio intracelular influye en dicha susceptibilidad. Las neuronas de la corteza entorrinal (CE) y del hipocampo son regiones altamente vulnerables al daño neuronal por excitotoxicidad. Este tipo de insulto podría modificar las propiedades funcionales del circuito CE-hipocampo y comprometer así aspectos relacionados con la formación de la memoria episódica. A continuación, se describirán brevemente las características del daño inducido por excitotoxicidad en el GD.

1.5.1 Daño excitotóxico en el giro dentado

En el GD, el daño por excitotoxicidad se caracteriza por una abundante perdida celular en el hilus, particularmente de las INT GABAérgicas somatostatina positivas y las células musgosas [97]. En cambio, las células principales del GD, las células

granulares, son más resistentes a la muerte por excitotoxicidad que las INT del hilus y que las neuronas piramidales de CA3 y CA1 [98]. Su resistencia se ha asociado a la alta expresión de las proteínas de unión a calcio calbindina y a la proteína celular Purkinje, las cuales permiten amortiguar eficientemente la entrada de calcio [99,100]. Asimismo, la baja excitabilidad y el eficiente control inhibitorio local que reciben las neuronas granulares, les confiere protección extra ante este tipo de insulto [101]. Esto ha llevado a proponer la hipótesis de que el GD funciona como un filtro o puerta que en estado normal podría prevenir o limitar la propagación de episodios de excitotoxicidad provenientes de la vía perforante hacia el hipocampo [7,102,103,104]. No obstante, el GD también sufre de alteraciones tras el daño excitotóxico, como: pérdida de la arquitectura neuronal, disminución en la eficacia inhibitoria del circuito, incremento de conexiones excitatorias recurrentes y reestructuración sináptica [105,106]. Se ha señalado que dichas perturbaciones podrían amplificar el insulto excitotóxico y comprometer la funcionalidad del GD [7]. Específicamente, el presente trabajo se enfocó en estudiar una alteración morfológica particular del GD conocida como: dispersión de células granulares, la cual surge tras un daño excitotóxico prolongado [107]. Esta alteración se caracteriza por una extensión o ensanchamiento de la capa granular debido a la localización ectópica y el distanciamiento entre los somas de las células granulares [108]. A continuación, se ahondará más sobre las características principales de la dispersión de las células granulares.

1.6 Dispersión de las células granulares en el giro dentado

La dispersión de las células granulares (GCD, por sus siglas en inglés *granular cell dispersion*) es una alteración estructural del GD descrita por primera vez por Carolyn R. Houser en pacientes con epilepsia del lóbulo temporal (ELT) refractaria al tratamiento farmacológico [12]. Alrededor del 50 % de las muestras cerebrales de pacientes con ELT que cursan con esclerosis hipocampal presentan GCD [109,110]. En un GD normal, la capa de células granulares se encuentra compacta y delimitada

por el hilus y la capa molecular. En cambio, en el GD con GCD, la compactación y delimitación de la capa granular se pierde y es posible observar somas de células granulares tanto en el hilus como en la capa molecular [12]. Esto está dado por la migración ectópica y el posicionamiento distante de los somas de las células granulares a partir de la pérdida de la proteína reelina (Fig.6) [107,107,109,110]. Lo anterior genera un incremento en el ancho de las capas granulares, aproximadamente 4 veces más que las capas de un GD sano (400µm vs 120µm) [111]. La severidad y extensión de la GCD a lo largo del eje dorso-ventral es muy variable entre los pacientes [111,112]. Las causas exactas que ocasionan la GCD no se conocen con claridad, pero se le ha asociado con el inicio temprano (< 4 años) de convulsiones febriles [113]. Asimismo, la GCD se ha observado en infantes que presentan el síndrome de muerte infantil súbita [114].

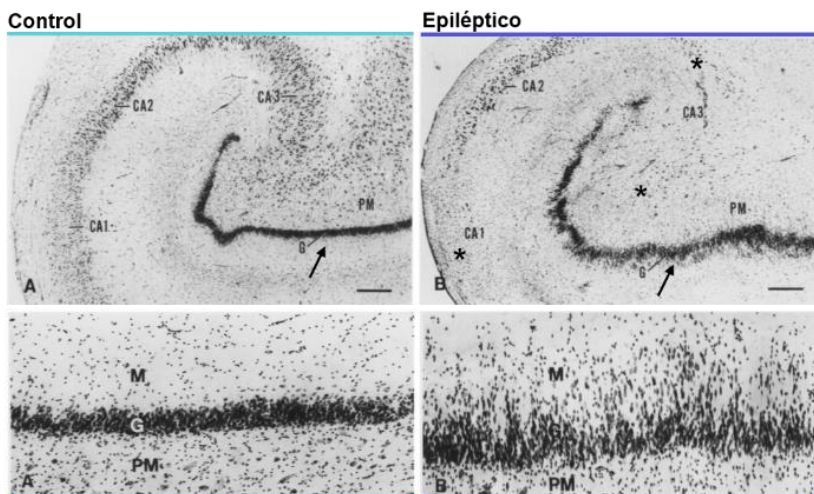


Figura 6. Dispersión granular celular (GCD) en el GD de pacientes con ELT. Las imágenes muestran secciones del hipocampo teñidas con violeta de cresilo. En la imagen superior izquierda se observa la sección de hipocampo control de un individuo sano; barra de

escala: 500 µm. Debajo de esta se observa una magnificación que muestra una capa granular compacta donde se puede distinguir la zona granular (G), la molecular (M) y el hilus (PM, polimórfica) bien definidas; barra de escala: 100 µm. En la imagen superior izquierda se muestra la sección de un hipocampo de un paciente epiléptico con esclerosis hipocámpal y GCD. Los asteriscos denotan la pérdida celular en CA1, CA3 y el hilus. La flecha señala el ancho de la capa granular. Debajo de esta imagen, se muestra la capa granular con GCD donde los somas de las células están dispersos y se extienden tanto a la capa molecular (M), como al hilus (PM). Figura modificada de: [12]

Por otro lado, en modelos experimentales, la GCD se logra inducir tras la administración intrahipocámpal (IHC) de ácido kaínico (AK) [106]. El AK es un

agonista de los receptores ionotrópicos AMPA/kainato [115]. La activación sostenida de estos receptores por AK desencadena una serie de eventos celulares que ocasionan degeneración y muerte neuronal por excitotoxicidad (ver arriba) [116]. Particularmente, la GCD es fácilmente visible una semana en aquellos ratones que presentan actividad epiléptica de duración prolongada ($\geq 8h$) tras la inyección IHC de AK [100,117,108]. El desarrollo de la GCD continúa incrementando hasta alcanzar su máxima extensión dentro del primer mes tras la administración IHC de AK [100,117]. Este desarrollo se caracteriza por un aumento en el ancho de la capa granular debido al posicionamiento distante de los somas de las células granulares (ver Fig.7). Como se mencionó anteriormente, el aumento de la GCD se ha correlacionado negativamente con los niveles de la proteína reelina tanto en roedores como en pacientes con ELT [107,117]. Reelina es una glicoproteína de matriz extracelular que regula la correcta migración y posicionamiento de las células, modulando la laminación del GD [118]. Esta proteína es secretada por las células Cajal Retzius y las INT GABAérgicas en el hilus, las cuales son altamente vulnerables a muerte por excitotoxicidad [119]. La disminución de la proteína reelina tras la muerte de estas células compromete la laminación del GD, generando la GCD. Sin embargo, las implicaciones de la presencia y severidad de la GCD en la funcionalidad del GD y la memoria hipocampal no se conocen con exactitud.

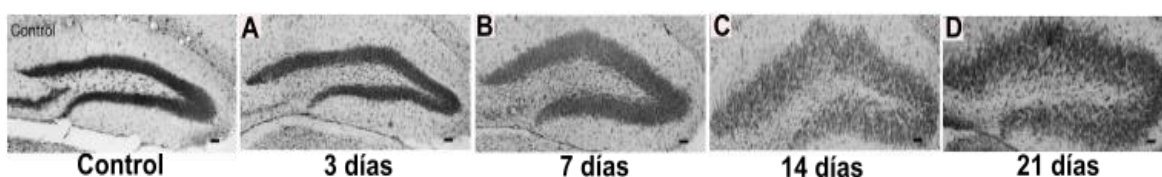


Figura 7. Desarrollo temporal de la dispersión granular celular tras la inyección de ácido kaínico intrahipocampal. La primera imagen a la izquierda muestra la tinción de Nissl del GD de un sujeto intacto sin lesión excitotóxica. En A, B, C y D se observa la evolución de la dispersión granular celular a los 3,7,14 y 21 días respectivamente. El ancho de la capa granular incrementa y el espacio del hilus disminuye con el paso de los días tras la lesión. La pérdida celular en el hilus es evidente desde el día 3. Figura modificada de: [120]

Algunos estudios sugieren que la alteración estructural ocasionada por la GCD genera una reestructuración sináptica que promueve el incremento de excitabilidad en el GD [102]. Las células granulares que residen en zonas con GCD pueden sufrir alteraciones morfológicas como incremento en el número de dendritas basales [108], espinas dendríticas [121] y rebrote de fibras musgosas, lo cual podría promover el incremento de conexiones recurrentes excitatorias entre células granulares, y aumentar así la excitabilidad del circuito GD [103]. Asimismo, las conexiones entre la vía perforante medial y las células granulares del GD sufren modificaciones. Estas incrementan en número y tamaño debido al aumento en las descargas excitatorias de las aferencias provenientes de la CE medial (ver Fig.8) [122]. Por lo anterior, la GCD podría ser considerada como una alteración que favorece la hiperexcitabilidad del circuito. No obstante, otros estudios postulan un escenario diferente respecto a la GCD. En ellos se señala a este fenómeno como un cambio estructural homeostático que contribuye a regular la excitabilidad del circuito tras daño excitotóxico [123,124,125]. Resultados de registros electrofisiológicos obtenidos con la técnica de patch-clamp, indican que las células granulares que sobreviven en las zonas con GCD disminuyen su excitabilidad intrínseca tanto en pacientes con ELT como en ratones tras la administración IHC de AK [123,125,126]. Estas células presentan una menor disminución en la resistencia de entrada y un aumento en la reobase en comparación con las células granulares en zonas sin GCD. La disminución en su excitabilidad se ha asociado con un incremento en las corrientes de fuga mediadas por canales rectificadores de potasio [123,125,126,127]. Cabe mencionar que, en humanos, la reducción en la excitabilidad intrínseca de las células granulares es mayor en especímenes con GCD severa que en especímenes con GCD moderada y débil [125,127]. Con base en estas evidencias, se ha propuesto que la menor excitabilidad intrínseca de las células granulares en zonas con GCD podría surgir como un cambio compensatorio ante la alta excitabilidad del circuito. Sin embargo, se desconoce con claridad como este cambio podría impactar en la funcionalidad del GD tras el insulto excitotóxico.

Considerando la importancia del funcionamiento del GD tanto en la integración de las aferencias de la CE como en los procesos cognitivos asociados al hipocampo, resulta interesante evaluar cómo podría impactar el desarrollo de la GCD en la comunicación sináptica en la vía perforante (VP)-GD y la función cognitiva del hipocampo (Fig.8).

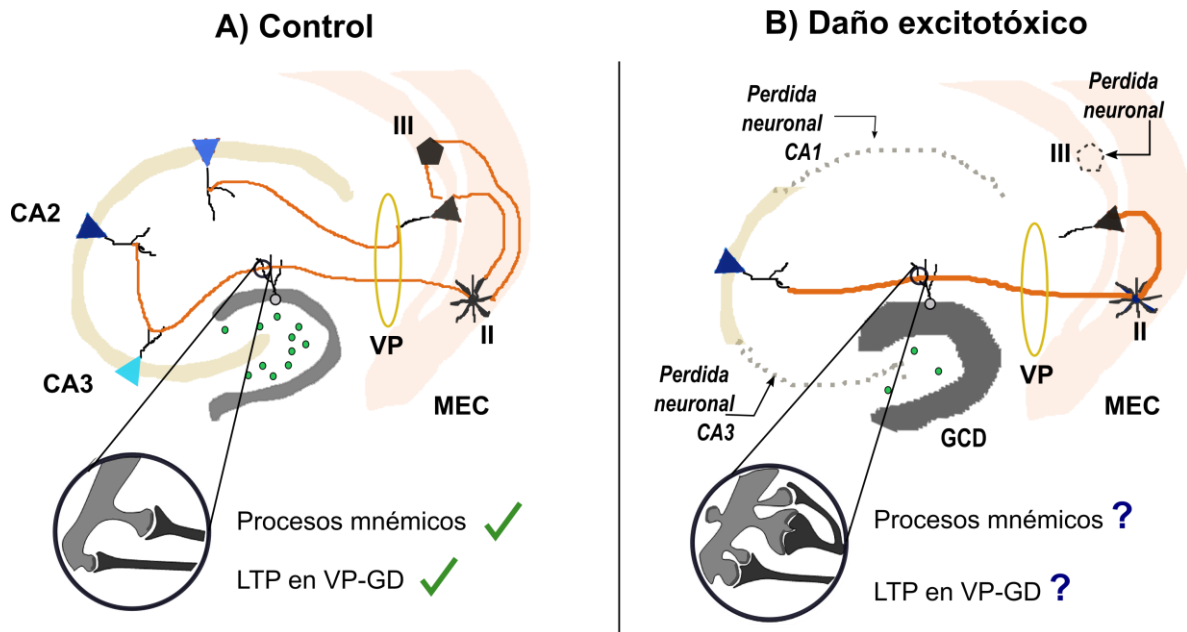


Figura 8. Modelo propuesto para la organización del circuito corteza entorrinal-hipocampo en condiciones control y con daño excitotóxico con AK. (A) A la izquierda se ilustra al circuito en un contexto sano (control). En esta situación, las neuronas estrelladas de la corteza entorrinal medial (CE-M) de la capa II inervan a las células granulares del GD y a las neuronas piramidales en CA3 y CA2. Las neuronas piramidales en la CE-M de la capa III pueden contactar directamente a las neuronas piramidales de CA1. En la capa III, las células piramidales activan a las interneuronas GABAérgicas (pentágono negro), las cuales ejercen un control inhibitorio sobre las neuronas estrelladas de la capa II. A su vez, las células piramidales de la capa III pueden excitar a las neuronas estrelladas de la capa II (línea naranja continua). (B) En condiciones de excitotoxicidad, el circuito se reorganiza dada la abundante pérdida neuronal (líneas grises no continuas) y las alteraciones estructurales como la GCD. Esta pérdida neuronal genera que las conexiones entre la CE-M y las regiones CA1-CA3 disminuyan. Por otro lado, en la capa III, se presenta muerte de las interneuronas

GABAérgicas (pentágono negro con líneas no continuas). Lo anterior disminuye la inhibición de las neuronas estrelladas de la capa II, lo cual incrementa su excitabilidad. Como resultado hay un aumento en el número y tamaño de espinas dendríticas en las células granulares. Es probable que estas alteraciones modifiquen la plasticidad sináptica en la vía perforante (VP)-GD y las funciones mnémicas del hipocampo. Figura recreada a partir de: [122]

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El giro dentado (GD) es un componente de la formación hipocampal común en todos los mamíferos. Esta estructura representa la principal puerta de entrada al hipocampo de la información sensorial proveniente de corteza entorrinal a través de la vía perforante (VP). El procesamiento de esta información en el GD es clave en los procesos de aprendizaje y memoria dependiente de hipocampo. La baja excitabilidad del circuito del GD es una propiedad importante para el funcionamiento óptimo de dicha estructura. Insultos cerebrales que incrementen la excitabilidad del circuito y generen alteraciones estructurales como la GCD pueden comprometer la comunicación neuronal entre VP-GD, así como en el aprendizaje y la memoria dependiente de hipocampo. Así, el presente trabajo se enfocó a evaluar si la plasticidad sináptica en la VP-GD, así como el aprendizaje y la memoria dependiente de hipocampo sufrían alteraciones durante el desarrollo gradual de la GCD.

2.1 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cómo impacta el incremento de la GCD a través del tiempo en la plasticidad sináptica en la vía perforante-GD y en la conducta de aprendizaje y memoria dependientes de hipocampo?

2.2 HIPÓTESIS

Si la evolución en la GCD generada tras daño excitotóxico afecta la integración de la información en el circuito hipocampal a lo largo del tiempo, entonces se observará una alteración gradual en la plasticidad sináptica en la vía perforante-GD y en la conducta de aprendizaje y memoria dependientes de hipocampo como producto del compromiso estructural.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar el impacto del incremento en la GCD sobre la plasticidad sináptica en la vía perforante-GD y la conducta cognitiva asociada al funcionamiento del hipocampo tras la administración focal de AK en el GD de ratones adultos.

3.2 Objetivos particulares

1. Inducir el desarrollo gradual de la dispersión granular tras la generación de un daño excitotóxico focal en el GD de ratones adultos.
2. Analizar el aprendizaje y memoria de miedo al contexto tras 10 y 30 días de la inducción del daño.
3. Evaluar en ambas ventanas temporales la plasticidad sináptica en la vía PP-GD a través de la inducción *in vivo* de la potenciación a largo plazo.
4. Caracterizar el incremento gradual de GCD en ambas ventanas temporales mediante análisis estereológico.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Sujetos

Todos los ratones en esta investigación se manipularon bajo el código de ética para el trabajo con animales de laboratorio aprobado por la CICUAL (protocolo No.077) del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Se realizaron esfuerzos por disminuir al máximo el malestar de los sujetos ante los protocolos requeridos.

En el presente trabajo se emplearon ratones adultos machos de 8 semanas de edad de la cepa C57BL/6. Estos se alojaron en grupos de 4 a 5 animales por caja en ciclo invertido de 12h luz/12h oscuridad. Los ciclos se cambiaban a las 7:00 y 19:00 horas de cada día. El alimento y el agua se les proporcionó *ad libitum*.

Para la evaluación conductual y análisis histológicos los sujetos fueron divididos de manera aleatoria en cinco grupos: **1)** intacto, **2)** 10 días post- cirugía sham (10 dsh), **3)** 30 días post-cirugía sham (30 dsh), **4)** 10 días post-inyección (10 dpi), **5)** 30 días post-inyección (30 dpi). Para los registros electrofisiológicos, se utilizaron animales independientes no expuestos a tareas conductuales con el fin de evitar que la conducta pudiera influir sobre la evaluación de la plasticidad sináptica.

4.2 Diseño experimental

En el día 0 del experimento, los ratones fueron sometidos a cirugía estereotáxica para llevar a cabo la administración intrahipocampal de AK o para realizar los procedimientos de una inyección sham. Tres días previos a las pruebas conductuales, los sujetos fueron manipulados por el investigador y habituados al cuarto de conducta. En el día 8 o 28, se llevó a cabo la prueba de campo abierto. Al día siguiente, se realizó el condicionamiento de miedo al contexto y 24h después se evaluó la memoria. Al término de la evaluación conductual, los animales se sacrificaron y se obtuvo el tejido cerebral para realizar análisis histológicos. Se

empleó un grupo de ratones independientes no expuestos a pruebas conductuales para el análisis de los registros electrofisiológicos (ver Fig.9).

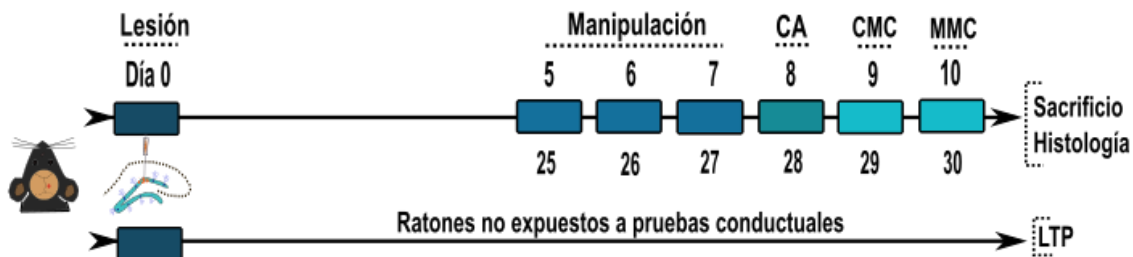


Figura.9. Línea de tiempo experimental. Se realizó la lesión con AK o una cirugía sham el día cero. Los días 5, 6 y 7 se habitúo a los ratones al experimentador y al cuarto de conducta. En el día 8 o 28 se llevó a cabo la tarea de campo abierto (CA) para evaluar la locomoción y ansiedad. Durante los días 9 o 29 los sujetos se sometieron a la fase de condicionamiento de miedo al contexto (CMC). Finalmente, el día 10 o 30 se evaluó la memoria de miedo al contexto (MMC) y al término los animales se para el a sacrificaron para realizar análisis histológico del hipocampo. Para realizar el estudio electrofisiológico, se empleó a ratones independientes sin manipulación conductual.

4.3 Lesión excitotóxica en el giro dentado e inducción de la dispersión de las células granulares

Para inducir la dispersión de las células granulares (GCD), se realizó un daño excitotóxico focal en el GD mediante la administración de ácido kaínico (AK). La administración de AK se realizó utilizando un aparato estereotáxico (Stoelting, Wood Dale, IL) en ratones anestesiados con isoflurano al 2% en una mezcla de 95% O₂ y 5% CO₂. A un grupo de ratones se les infundió unilateralmente 0.15 µl/min de AK (0.75mM; AK, Sigma Aldrich) en la capa suprapiramidal del GD siguiendo las siguientes coordenadas: a partir de Bregma: anteroposterior (AP) -2mm, mediolateral (ML) -1.3mm y dorsoventral (DV) -2mm (Paxinos y Watson, 1982). Para la infusión de AK, se utilizó una jeringa Hamilton de 10µl controlada por un inyector automático (Quintessential Stereotaxic Injector, Stoelting Co., Wood Dale, IL, EU).

La posición del inyector se mantuvo en las coordenadas blanco durante 2 minutos posteriores a la infusión para permitir la difusión del AK. Al término, el inyector se elevó lentamente para retirar la aguja del tejido cerebral. Posteriormente, la piel se suturó y se interrumpió la anestesia. Se colocó tópicamente un anestésico local (lidocaína 4%) sobre la cabeza para evitar dolor. Para el grupo sham, se realizó la cirugía estereotáxica bajo el mismo procedimiento, pero no se administró ninguna solución.

Tras la recuperación de la anestesia, se monitoreó la conducta de los animales durante 3-4 horas. En este intervalo de tiempo, la mayoría de los animales que recibieron AK presentaron conductas asociadas a crisis epilépticas. Esta conducta se caracterizó por movimientos rotativos, saltos repetitivos con las patas traseras e inmovilidad [128]. Los sujetos sometidos a cirugía sham no presentaron dichas conductas. La temperatura de los animales se mantuvo con una cama térmica durante todo el procedimiento. Al término del procedimiento, los animales regresaron a sus respectivas cajas habitación y ahí se mantuvieron por el resto del tiempo.

4.3.1 Preparación del ácido kaínico: El AK (K0250; Sigma-Aldrich, Chemie, St. Louis, MO) se disolvió en 50 μ l de NaOH 1N y se aforó a 1 ml con buffer de fosfatos 10mM para obtener una solución final de 0.75 mM. Esta solución se fijó a un pH final de entre 7.0-7.4 y se diluyó 1:10. Para visualizar el sitio donde se llevó a cabo la difusión del AK, previo a la cirugía, se añadió un trazador fluorescente (red Retrobeads, LumaFluor, Naples, FL) a la solución stock (49 μ l de AK + 1 μ l del trazador fluorescente).

4.4 Evaluación conductual

Todos los ratones se evaluaron en su fase de obscuridad en una sala diferente al de su alojamiento. La sala de conducta se iluminó con luz roja y se mantuvo en

condiciones de temperatura y humedad similares a las de la sala de alojamiento. Previo a la aplicación de los protocolos conductuales, se manipuló a los animales durante 3 días consecutivos para crear habituación tanto al experimentador como a la sala de conducta. Antes de iniciar cada sesión, los animales fueron habituados a la sala durante 20-30 min. Ningún ratón presentó signos de conducta asociada a crisis epiléptica, como las descritas anteriormente, durante las conductas realizadas.

4.4.1 Aparatos

Arena de campo abierto. En la tarea de campo abierto se empleó una arena con paredes de acrílico blancas, con las siguientes medidas: 40 cm de ancho, 40 cm de largo y 25 cm de alto. Para facilitar el análisis conductual, el piso de la arena se dividió en 16 cuadros del mismo tamaño (10 X10 cm cada cuadro). Estos cuadros se clasificaron en 4 centrales y 12 periféricos.

Cámara de condicionamiento: Para realizar la tarea de miedo al contexto se utilizó una cámara de condicionamiento de acrílico transparente con las siguientes dimensiones: 25 cm de largo X 25 cm de ancho X 20 cm de alto (San Diego instruments). Esta cámara contiene un piso removible de 23 rodillos de acero inoxidable a través de los cuales se transmite una corriente eléctrica de intensidad y duración variable. La cámara está diseñada para detectar movimiento mediante una matriz (16 X 16) de rayos infrarrojos colocada a nivel del piso. La información sobre la interrupción de los rayos (movimiento) se registra y procesa a través del software Freeze Monitor (Freeze Monitor, SD instruments). Todos los movimientos fueron registrados por un observador y comparados con los resultados arrojados por el software.

4.4.2 Protocolos conductuales

Análisis del desempeño locomotor y el comportamiento asociado con ansiedad: Previo a la realización de la tarea de condicionamiento de miedo al contexto, los ratones se sometieron a la tarea de campo abierto para analizar sus

niveles de ansiedad y su desempeño locomotor. En el día 8 o 28 post cirugía, cada ratón se colocó en una esquina dentro de la arena de campo abierto y se le dejó explorar libremente durante 5 minutos. Las sesiones conductuales fueron grabadas mediante una cámara de video casera para su análisis posterior. Para evaluar el desempeño motor, se contabilizó manualmente el número de cruces totales. Se considero como cruce cuando el 70% de cuerpo del ratón pasaba de un cuadro a otro. Para analizar el comportamiento asociado con ansiedad se midió el tiempo que el ratón pasó en los cuadros centrales y en los periféricos. Después de cada sesión la arena se limpió con una solución compuesta de extrán (10%) y etanol al 96% (10%) en agua bidestilada.

Evaluación del aprendizaje y memoria de miedo al contexto: Esta prueba se realizó en dos fases: 1) condicionamiento o adquisición y 2) memoria. La fase de condicionamiento se realizó previo al sacrificio en los días 9 o 29 post cirugía. Individualmente, cada ratón se introdujo dentro de la cámara de condicionamiento y se le dejó explorar durante 120s. Al finalizar este tiempo, los animales recibieron un total de 4 choques eléctricos (0.5 mA, 2s de duración) con intervalo inter-choques de tiempo variable (60-180s). La figura 15A muestra el porcentaje de tiempo que cada ratón pasó inmóvil durante cada ensayo (intervalo de tiempo entre cada choque).

La fase de memoria de miedo al contexto se llevó a cabo 24h después del condicionamiento en el día 10 o 30 post cirugía. Durante esta fase, cada ratón se expuso nuevamente a la cámara de condicionamiento, sin aplicar ningún choque eléctrico. Se le dejó explorar durante 300 segundos y se contabilizó el porcentaje de tiempo que pasó inmóvil durante la sesión. Después de cada sesión la cámara se limpió con una solución compuesta de extrán (10%) y etanol al 96% (10%) en agua bidestilada.

4.3 Registros electrofisiológicos

Potenciación de largo plazo (LTP) en la vía perforante-giro dentado

Para este análisis se utilizaron animales independientes, no expuestos a manipulación conductual. Durante los procedimientos quirúrgicos y electrofisiológicos, los animales se anestesiaron con pentobarbital (50 mg/kg i.p.) suministrando dosis suplementarias del mismo (25 mg/kg) a fin de mantener los niveles quirúrgicos de anestesia. Las respuestas del GD se registraron de manera unilateral por medio de un electrodo monopolar de acero inoxidable en el giro dentado situado en las siguientes coordenadas estereotáxicas: AP -2.0 mm a partir de Bregma, ML 1.2 mm a partir de la línea media y DV -1.8 mm de duramadre. Estas respuestas fueron evocadas en forma unilateral por medio de un electrodo de estimulación (100µm de diámetro) localizado en la vía perforante en las coordenadas estereotáxicas: AP -0.2 mm a partir de lambda, ML -2.8mm y DV -1.5 mm a partir de la duramadre.

La estimulación fue suministrada por un estimulador Grass S48. Las respuestas evocadas se amplificaron por medio de un preamplificador Grass P5, con un filtro de 1-10 Hz y digitalizadas para su almacenamiento y posterior análisis en una computadora provista del software BrainWave (Datawave, Co.). Las respuestas evocadas se midieron obteniendo la pendiente de la espiga poblacional, así como la pendiente de los potenciales excitatorios postsinápticos (PPE) de campo. La intensidad del estímulo evocado corresponde al 50% de la amplitud máxima de PPE. La línea base se estableció durante 20 minutos, y posteriormente se aplicó estimulación de alta frecuencia con la finalidad de inducir LTP. El protocolo de estimulación de alta frecuencia fue de 5 trenes compuestos de 10 ráfagas (50ms, 400 Hz, 20 pulsos por burst) administrados cada 200 ms (2.3 s de duración) con intervalos inter tren de 15s. Las respuestas se continuaron registrando durante 2 horas a partir de la estimulación de alta frecuencia. Se consideró el establecimiento de la LTP como un incremento promedio de la pendiente de los potenciales

postsinápticos excitatorios mayor a 120%. La temperatura de los animales se mantuvo con una cama de gel térmica durante todo el procedimiento.

4.4 Sacrificio y procesamiento del tejido

El sacrificio de los animales se realizó mediante una perfusión intracardiaca con 50ml de NaCl (0.9%) seguido de 50ml de paraformaldehído (PFA, 4% en PB 0.1M, pH 7.4). Al término de la perfusión, el cerebro se extrajo y se almacenó en PFA a 4°C por 24 h. Posteriormente, los cerebros se transfirieron en solución de sacarosa al 15% durante 48h, seguidas de solución sacarosa al 30% por 48 horas adicionales. Cada cerebro se cortó en secciones coronales de 40 micras por medio de un criostato (Microm HM550, Thermo Scientific, Waltham, MA, EU). Una de cada 3 secciones se colocó en laminillas previamente gelatinizadas (portaobjetos bañados en solución de 1% de gelatina bovina y 0.01% de CrSO₄) para llevar a cabo la tinción de Nissl.

Tinción de Nissl: Esta tinción se fundamenta en la utilización del colorante básico violeta de cresilo que tiñe los cuerpos ácidos de Nissl (cúmulos de retículo endoplásmico rugoso). Los cuerpos de Nissl se localizan en el soma de las neuronas y la primera porción de las dendritas, lo que permite evaluar la morfología de estructuras y regiones cerebrales. A través de esta tinción se analizaron las alteraciones estructurales del GD generadas tras la administración de AK, específicamente la dispersión granular celular y la lesión focal en la capa suprapiramidal provocada por la inyección.

La tinción se llevó a cabo en secciones cerebrales montadas en laminillas gelatinizadas. El tejido se sumergió durante dos minutos en agua bidestilada para hidratarlo y en seguida se sometió a deshidratación en 75%, 95% y 100% de etanol por 2 min por concentración. Posteriormente, se sumergió en violeta de cresilo por 3 min (0.1%; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EU). En seguida, los cortes se lavaron en agua bidestilada por 2 min y se les volvió a sumergir en las soluciones de etanol antes mencionadas. Finalmente, los cortes se lavaron en Xilol por 2 min y se

cubrieron con medio de montaje Permount (Fischer Scientific, NJ, EU) y un cubreobjetos.

4.4.1 Medición de la dispersión de células granulares y de la lesión focal inducida por la inyección del AK

Con el objetivo de evaluar el desarrollo de la dispersión granular celular inducido tras la administración de AK, se midieron el grosor y el volumen de la capa granular superior e inferior en cortes de cerebro teñidas con tinción de Nissl.

Medición del grosor de las capas granulares: Para evaluar el grosor de las capas granulares, se seleccionó la sección cerebral con la mayor dispersión granular celular en el DG dorsal. A partir de esta sección, se analizaron 4 secciones consecutivas reuniendo un total de 5 (cada sección separada por 80 μm) secciones por cerebro. En cada sección, se realizaron medidas del grosor (dorso-ventral) a lo largo de toda la capa (eje medio-lateral), cada medición estuvo separada por 100 μm . Para medir el grosor en la zona de la lesión provocada por la inyección, las mediciones se hicieron a un intervalo menor de 50 μm debido a la pequeña longitud de la región dañada (Fig.10). Para el análisis estadístico, se calculó el promedio del grosor de cada capa granular por sección como se reportó en estudios previos [129].

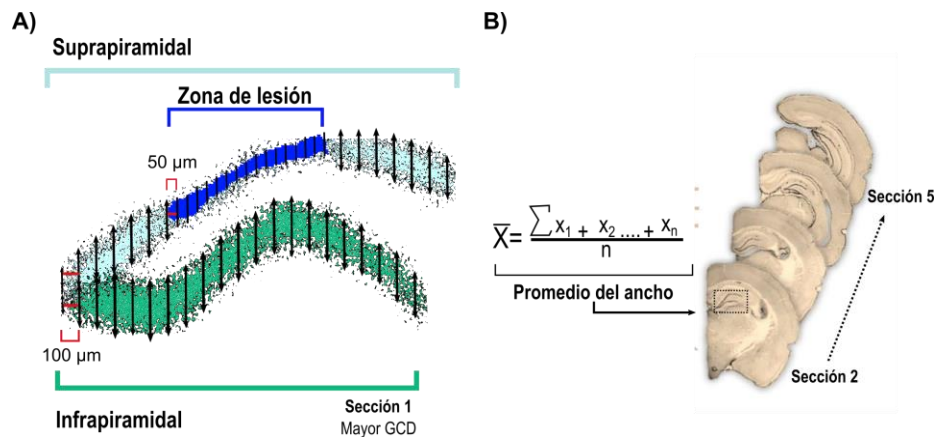


Figura 10. Estimación del grosor de las capas granulares. (A) Reconstrucción visual que ilustra las principales características del daño en el GD en la sección con máxima GCD (sección 1): en azul claro, la GCD en capa suprapiramidal, en azul fuerte la zona de lesión focal y en verde la GCD en la infrapiramidal. En cada sección, se realizaron medidas del grosor a lo largo de toda la capa (eje medio-lateral), cada medición estuvo separada por 100 μm . Para medir el grosor en la zona de la lesión, las mediciones se hicieron a un intervalo menor de 50 μm debido a la pequeña longitud de la región dañada. (B) Para el análisis estadístico, se calculó el promedio del ancho de cada capa granular por sección (total de 5 secciones por sujeto).

Análisis volumétrico del giro dentado: El volumen del GD se calculó por el método estereológico de Cavalieri como se reportó en estudios previos [130]. A través de este análisis, se obtuvieron los volúmenes de las capas granulares, la zona de daño focal y el volumen total de GD. Se analizaron 6 secciones por cerebro, cada una separada por 80 μm en el eje AP: -1.94 mm al -2.46. En cada corte de cerebro, se delineó el contorno de las capas granulares en las 6 secciones y se estimó el volumen automáticamente mediante el software StereoInvestigator (software StereoInvestigator; MBF Biosciencie, Inc., Williston, VT). Se calculó el promedio del volumen por grupo experimental. Para calcular el volumen de la zona de lesión se utilizó el mismo método, pero se emplearon 5 secciones por sujeto.

4.5 Análisis estadístico

Para el análisis de volumen (Fig.11 I), del número de cruces en el campo abierto (Fig.15A) y del porcentaje de tiempo de inmovilidad en la fase de memoria de miedo al contexto (Fig.16B), se empleó una ANOVA de una vía seguido de una prueba *post hoc* de Bonferroni. Para analizar los cambios en el volumen del sitio de lesión a 10 y 30dpi (Fig.11J) y el ancho del GD (Fig.11K), se empleó una prueba de t-student no pareada con corrección de Welch. Para el tiempo en la periferia y centro en el campo abierto (Fig.15B) y el porcentaje de inmovilidad durante la fase de condicionamiento (Fig.16A), se utilizó una ANOVA de dos vías seguido de una prueba *post hoc* Bonferroni. Para los resultados electrofisiológicos se utilizó una ANOVA de medidas repetidas seguido de una prueba *post hoc* de Fisher. Los datos

evaluados a través de ANOVA cumplieron con las pruebas de normalidad y homogeneidad de varianzas. En todos los casos se consideró una $p < 0.05$ como estadísticamente significativa.

5. RESULTADOS

5.1 Alteraciones morfológicas en el giro dentado tras la administración focal de AK.

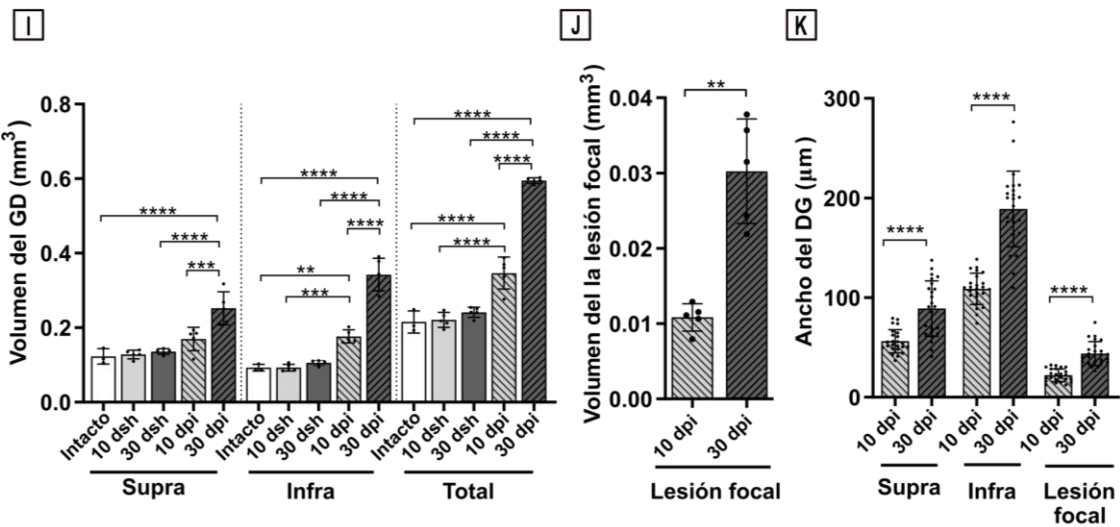
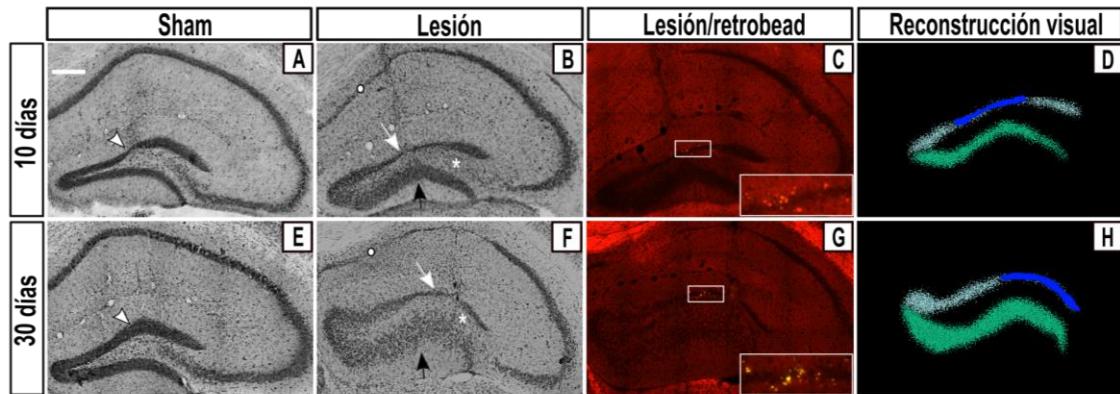
Con el objetivo de inducir el desarrollo gradual de la dispersión de células granulares (GCD), se generó un daño focal en la capa suprapiramidal del GD a través de la administración de AK. Tomando en cuenta la temporalidad en el desarrollo de la GCD previamente reportado [117], se eligió estudiar los cambios morfológicos a: 10 días post-inyección (10 dpi) cuando la GCD comienza a ser visible, y a 30 dpi cuando esta ha alcanzado su máximo desarrollo. En efecto, tras la administración de AK observamos un incremento mayor de la GCD a 30 dpi que a 10 dpi (Fig. 11 B, F, D, H). Cabe destacar que, la presencia de GCD fue mayor en la capa infrapiramidal opuesta al daño focal con AK (Fig. 11 B y F flechas negras).

La GCD se cuantificó a través de las mediciones del volumen (análisis de Cavalieri) y del ancho de las capas granulares del GD dorsal. Tanto el volumen como el ancho de las capas granulares fue mayor a los 30 dpi que a los 10 dpi (Fig. 11 I y K). El incremento en dichas mediciones fue mayor en la capa infrapiramidal que en la capa suprapiramidal en ambas ventanas temporales (Fig. 11 I y K, flecha negra en B y F). Finalmente, en sujetos sham, el volumen y el ancho de las capas granulares fue similar al grupo intacto, sin cambios en el tiempo (10 dsh vs 30 dsh). La tabla en la figura 11L muestra el promedio del volumen y el coeficiente de Gundersen obtenido a través del análisis de Cavalieri. En conjunto, nuestros datos indican que tras la inyección focal de AK, se observa un incremento gradual en la

GCD a través del tiempo, siendo esta mayor en la capa infrapiramidal que en la suprapiramidal.

Por otro lado, en ratones sham tras 10 días de la cirugía (10 dsh) se observó un daño mecánico caracterizado por una ligera interrupción en la capa suprapiramidal, el cual no fue visible en sujetos tras 30 dsh (Fig.11 A y E). En ratones lesionados con AK, aunado a la GCD, se observó una zona de lesión focal en la capa suprapiramidal. Esta se caracterizó por un adelgazamiento de la capa debido a la abundante pérdida celular en dicha región (Fig. 11 B y F, flechas blancas). La zona de lesión se localizó cercana al sitio de inyección de AK, el cual fue identificado por el trazador fluorescente (Fig. 11 C y G). Con el objetivo de analizar el desarrollo de GCD en esta zona de lesión, se realizaron las mediciones de su volumen y su grosor. A los 30 dpi, el volumen y el grosor fueron mayores que a los 10 dpi debido al desarrollo de la GCD en las células sobrevivientes (Fig.11 J y K). Finalmente, en ratones lesionados con AK se encontró abundante pérdida celular en el hilus y las subregiones CA1 y CA3 del hipocampo ipsilateral al daño (Fig.11 B y F, círculo blanco). La pérdida celular es evidente desde los 10 dpi y se mantiene presente aun a los 30 dpi. En la región CA1 del hipocampo, la pérdida celular fue constante, pero con severidad variable entre sujetos.

Con respecto al eje septo-temporal, la GCD se observó completamente en ambas capas del GD en secciones septales cercanas al daño focal (~ AP: -2.06 hasta -2.54 mm a partir de bregma. Fig.12 A). Sin embargo, en secciones más temporales, la GCD se observó en la parte dorsal del GD, cercana a la cresta, pero no en la región más ventral (~ AP: -3.16 hasta -3.52 a partir de Bregma; ~ DV: -2.12 hasta -2.75 mm) (Fig.12 A y B). En resumen, tras la administración de AK, se encontraron tres alteraciones principales en el GD: 1) el desarrollo gradual de la GCD, 2) una zona de lesión focal cercana al sitio de administración de AK, y 3) pérdida celular en el hilus y en la región CA1 y CA3 del hipocampo.



L	Supra	Coefficiente Gundersen	Infra	Coefficiente Gundersen	Total	Coefficiente Gundersen	Zona de lesión focal	Coefficiente Gundersen
Intacto	0.1229	0.0160	0.0927	0.0180	0.2156	0.0170	---	---
10 dsh	0.1281	0.0156	0.0928	0.0172	0.2209	0.0164	---	---
30 dsh	0.1357	0.0158	0.1054	0.0164	0.2411	0.0161	---	---
10 dpi	0.1576	0.0165	0.1877	0.0173	0.3452	0.0169	0.0108	0.0423
30 dpi	0.2540	0.0148	0.3092	0.0158	0.5632	0.0154	0.0302	0.0280

Figura 11. Alteraciones morfológicas en el giro dentado tras la administración focal de AK.

Las imágenes a la izquierda muestran las secciones coronales representativas tras la tinción de Nissl de sujetos: **(A)** 10 dsh, **(E)** 30 dsh, **(B)** 10 dpi y **(F)** 30 dpi. **(A)** En el grupo 10 dsh, se presentó un daño mecánico en la capa suprapiramidal del GD (cabeza de flecha blanca). Barra blanca indica la escala: 300 μ m. **(E)** En el grupo 30 dsh, el daño mecánico ya no resultaba evidente (cabeza de flecha blanca). **(B)** A los 10 dpi, se observó una zona de lesión focal caracterizado por un adelgazamiento de la capa suprapiramidal (flecha blanca). Fuera de este sitio, se observó el desarrollo de la GCD, siendo más evidente en la capa infrapiramidal (flecha negra). **(F)** A los 30 dpi, ambas capas granulares presentan una evidente GCD. La flecha negra indica el pronunciado

desarrollo de GCD en la capa infrapiramidal. El círculo blanco y el asterisco indican pérdida celular en CA1 y en el hilus, respectivamente. **(C y G)** Marcador fluorescente que revela el sitio de inyección a los 10 y 30 dpi, respectivamente. En los recuadros blancos se observa la marca fluorescente que corresponde a magnificaciones de 40X. **(D-H)** Modelo visual que reconstruye las principales características del daño en el GD: en gris la GCD en la capa suprapiramidal, en azul la zona de lesión focal y en verde la GCD en la infrapiramidal. **(I)** El volumen del GD con base en el análisis Cavalieri (intacto n=3, 10 dsh n=5, 30 dsh n= 5, 10 dpi n=5, 30 dpi n= 5; ANOVA de una vía seguido de una prueba *post hoc* Bonferroni, $F_{(14, 54)} = 131.4$, $p < 0.0001$). **(J)** Volumen en la zona de lesión focal (10 dpi n=5; 30 dpi n=5; prueba t-test no pareada con corrección de Welch, $F_{(4, 4)} = 14.65$, $p < 0.0235$). **(K)** El ancho en las capas granulares y en la zona de la lesión focal (10 dpi n=5; 30 dpi n=5; prueba t-test no pareada con corrección de Welch; suprapiramidal $F_{(23, 23)} = 5.743$, $p < 0.0001$; infrapiramidal, $F_{(23, 23)} = 5.894$, $p < 0.0001$; zona de la lesión focal, $F_{(23, 23)} = 3.374$, $p = 0.0051$). Las columnas representan la media \pm desviación estándar (DE) de cada grupo; los puntos dentro de cada columna en las gráficas representan los valores individuales. **(L)** Tabla que muestra el promedio del volumen y el coeficiente de Gundersen obtenidos por medio de Cavalieri de los grupos analizados en I-J. Un coeficiente de Gundersen menor a 0.1 refleja un valor estadístico significativo del volumen $p^* < 0.05$; $p^{**} < 0.01$; $p^{***} < 0.001$; $p^{****} < 0.0001$.

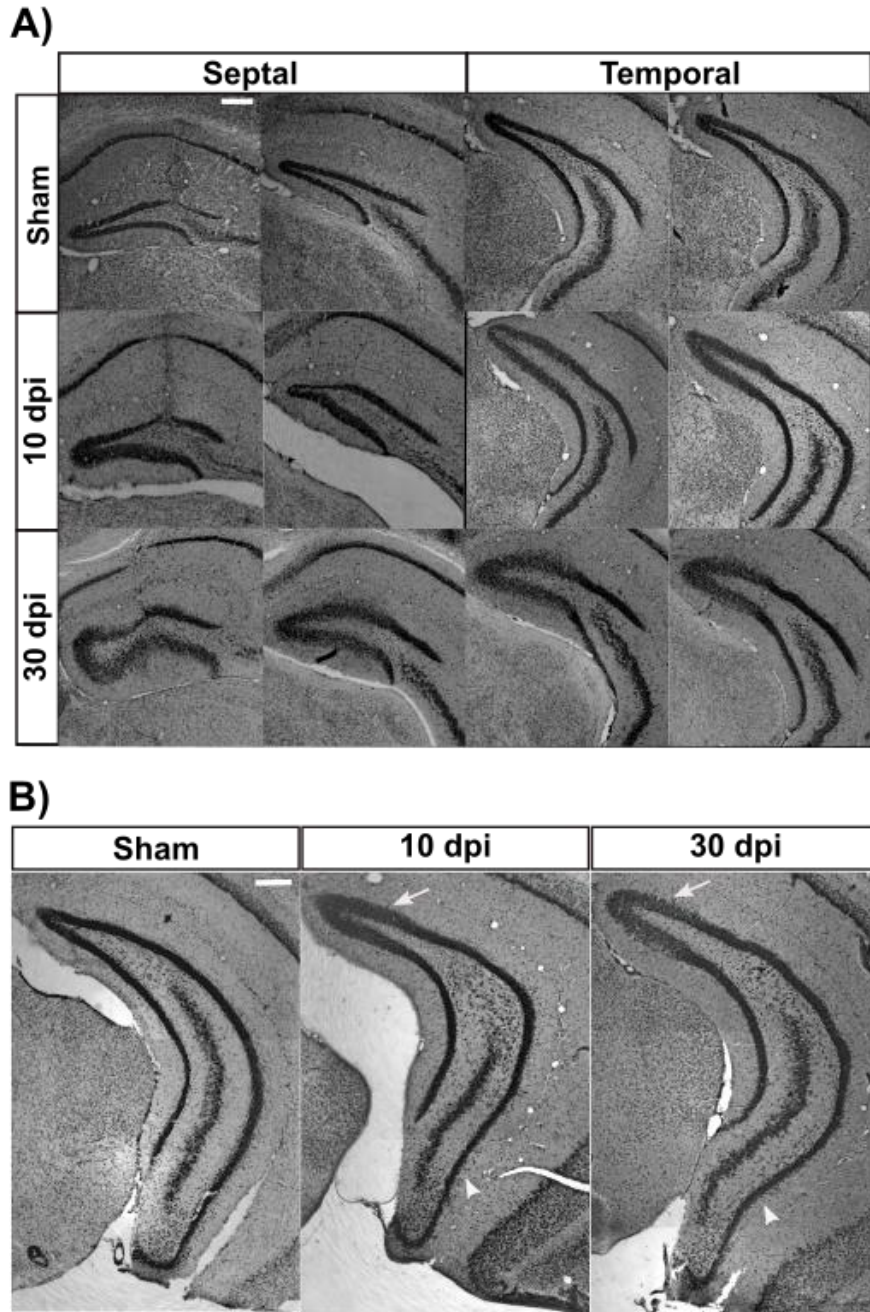


Figura 12. Dispersión de células granulares a través del eje septo-temporal. Las imágenes muestran secciones coronales representativas tratadas con tinción de Nissl. **(A)** Los sujetos sham no presentaron GCD en el eje septo-temporal. Los sujetos lesionados con AK presentaron GCD en el eje septal (~AP: -2.06 to -2.54 mm de bregma) y temporal (~ AP: -3.16 to -3.52 mm de bregma). **(B)** En la zona más temporal del GD, la GCD se presentó solo en la región de la cresta del GD, pero no en la zona más ventral (~AP: -3.16 to -3.52 mm, and ~DV: -2.12 to -2.75 mm de bregma). Barra de escala: 300 μ m.

6.2 Potenciación a largo plazo en la vía perforante-giro dentado *in vivo*

Con el objetivo de evaluar el impacto del desarrollo gradual de la GCD en la plasticidad sináptica en la vía perforante (VP) -GD, se analizó el establecimiento de la LTP *in vivo* en dicha vía. En la figura 13A se muestra un esquema general de la estimulación de alta frecuencia empleada, la cual fue capaz de generar LTP en la VP-GD en ratones, *in vivo*. Las respuestas evocadas en el GD fueron medidas a través de la obtención de la pendiente de los potenciales postsinápticos excitatorios (PPEs) y de las espigas poblacionales de campo, como se ejemplifica en la figura 13B. La LTP se observó como un incremento porcentual (con respecto a la línea base) en las pendientes de los PPEs y las espigas poblacionales, la cuales se mantuvieron estables durante dos horas (Fig. 13 y 14).

La expresión de la LTP se observó en los sujetos de los grupos control (intacto, 10dsh y 30dsh) y en los lesionados con AK a 30 dpi, pero no así a 10 dpi. Con respecto a nuestros grupos control, en ratones intactos y 30 dsh, se observó un incremento porcentual promedio de la PPEs similar tras la estimulación de alta frecuencia (Fig.13C. Intacto: 171.1 ± 1.4 ; 30 dsh: 172.3 ± 0.88 , media \pm EEM de la pendiente obtenida durante los últimos 20 min del registro). No obstante, en ratones del grupo 10 dsh se presentó un incremento porcentual menor que los sujetos de los grupos intacto y 30 dsh (Fig. 13C. 10 dsh: 139.7 ± 0.75 < intacto: 171.1 ± 1.4 , 30 dsh: 172.3 ± 0.88 , ANOVA de medidas repetidas seguido de un análisis *post hoc* Fisher $p < 0.0001$). De este modo, en relación con los grupos control, no lesionados con AK, se puede resumir que todos generaron LTP en la VP-GD, pero esta fue de menor magnitud en sujetos del grupo 10dsh.

En relación con los sujetos lesionados con AK, a 10 dpi no fue posible inducir LTP tras la estimulación de alta frecuencia. Sin embargo, cabe resaltar que a 30 dpi si fue posible generar LTP, con un incremento porcentual promedio del PPEs del 151 ± 1.5 . Este incremento fue significativamente menor que los grupos control

intacto y 30 dsh (30 dpi: 151 ± 1.5 < intacto: 171 ± 1.4 y 30 dsh: 172.3 ± 0.88 , ANOVA de medidas repetidas seguido de un análisis *post hoc* Fisher, $p < 0.0001$). Además, la LTP observada a 30 dpi tardó mayor tiempo en alcanzar su meseta en comparación con la LTP de los otros grupos (intacto, 10dsh y 30dsh). De este modo, en relación con los sujetos lesionados con AK, se puede resumir que la comunicación sináptica entre la VP y el GD se encuentra alterada tras 10 dpi, pero esta mejora considerablemente tras 30 dpi.

Con respecto a la pendiente de la espiga poblacional se encontraron cambios similares a los del PPEs mencionados arriba, pero estos fueron más pronunciados en todos los grupos (Fig.14). En los grupos control intacto y 30 dsh se obtuvo un incremento porcentual similar (intacto: 273.1 ± 1.1 y 30 dsh: 277.77 ± 0.84 , $p = 0.2283$). El grupo 10 dsh tuvo un incremento menor respecto al intacto y 30 dsh (10 dsh: 223.7 ± 1 < intacto: 273.1 ± 1.1 y 30 dsh: 277.77 ± 0.84 , $p < 0.0001$). En relación con los grupos lesionados con AK, a 10dpi no hubo incremento porcentual respecto a la línea base, pero a 30 dpi se observó un incremento porcentual de 217.0 ± 0.4 . Este incremento fue menor que en los grupos intacto y 30dsh (30dpi: 217.0 ± 0.4 < intacto: 273.1 ± 1.1 y 30dsh: 277.77 ± 0.84 , $p < 0.0001$). En conjunto, estos resultados indican que la generación de la LTP en la VP-GD se encuentra comprometida en sujetos a 10 dpi de AK, pero no a tras 30 dpi.

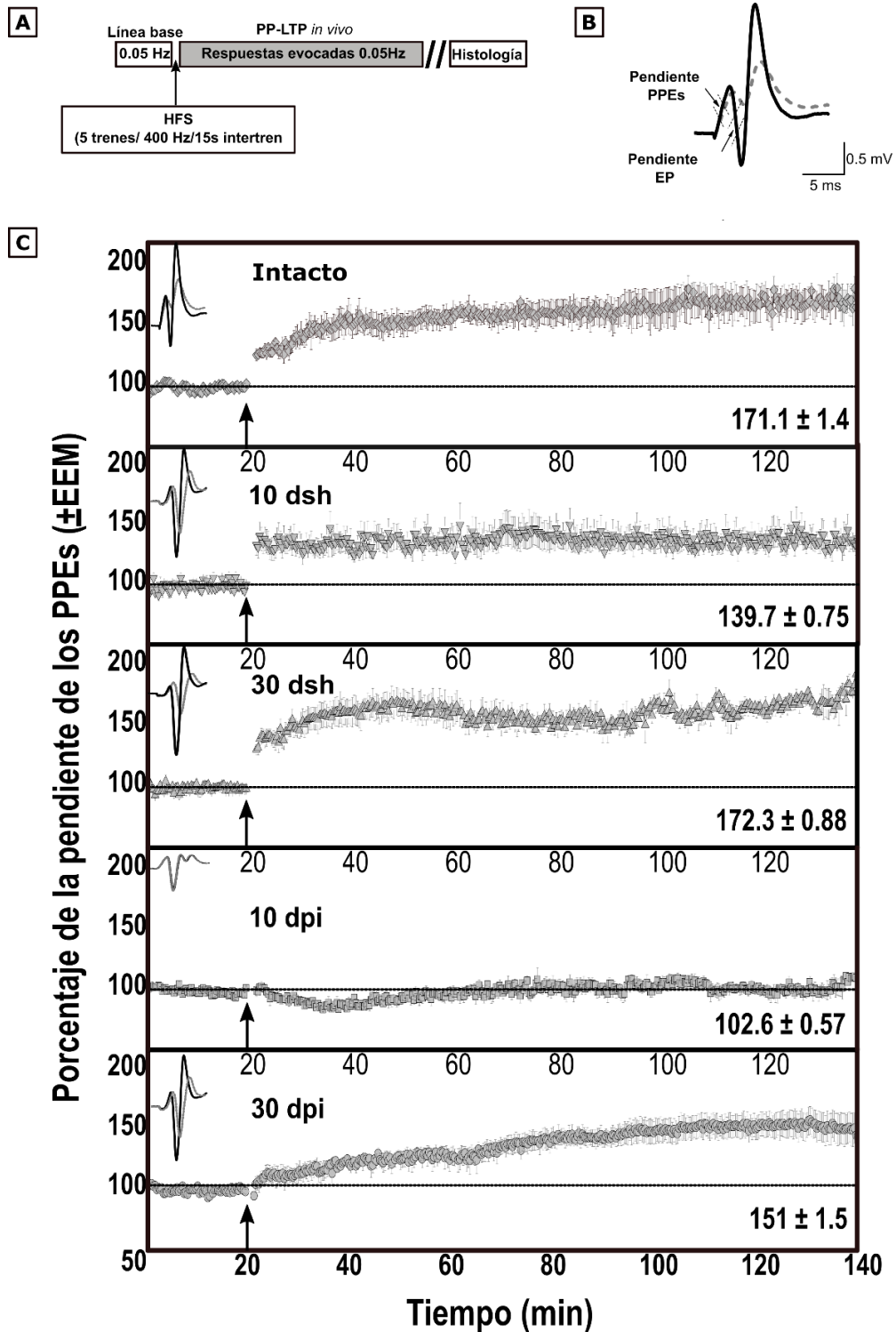


Figura 13. Cambios en la PPEs tras la inducción del daño con AK. (A) Representación esquemática del protocolo experimental para la inducción de LTP. La estimulación con trenes de alta frecuencia inició tras 20 min de registro de línea base. La respuesta evocada fue registrada durante

120 min. **(B)** Representación de la respuesta obtenida durante la línea base (línea gris discontinua) y tras la estimulación con trenes de alta frecuencia (línea negra continua). En el trazo se muestran los sitios donde se midió la pendiente de la PPEs y de la espiga poblacional. **(C)** Gráfico de la respuesta de la pendiente del PPEs durante el registro de línea base y tras la estimulación (flecha negra). Los números dentro de cada señal indican el porcentaje promedio \pm EEM de la pendiente obtenida durante los últimos 20 min del registro (incremento con respecto a la línea base). ANOVA de medidas repetidas seguido de un análisis *post hoc* Fisher (10dsh < intacto y 30dsh, $p < 0.0001$ y 30dpi < intacto y 30dsh, $p < 0.0001$); intacto $n=4$; 10 dsh $n=4$; 30 dsh $n=4$; 10 dpi $n=4$; 30 dpi $n=4$.

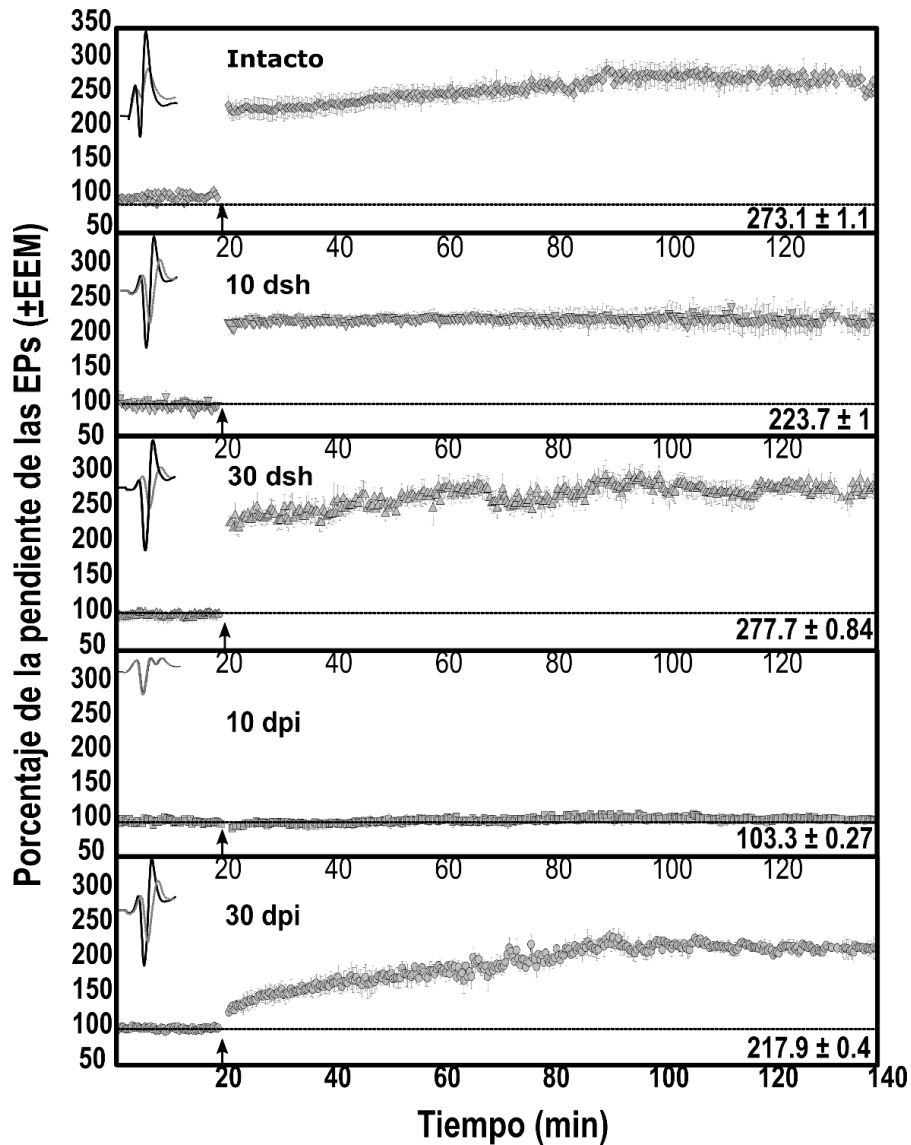


Figura 14. Cambios en la espiga poblacional. Gráfico de la respuesta de la pendiente del PPEs durante el registro de línea base y tras la estimulación (flecha negra). Los números dentro de cada señal indican el porcentaje promedio \pm EEM de la pendiente obtenida durante los últimos 20 min del registro (incremento con respecto a la línea base). ANOVA de medidas repetidas seguido de un análisis *post hoc* Fisher (10dsh < intacto y 30dsh, $p < 0.0001$ y 30dpi < intacto y 30dsh, $p < 0.0001$); intacto $n=4$; 10 dsh $n=4$; 30 dsh $n=4$; 10 dpi $n=4$; 30 dpi $n=4$.

6.3 Incremento en la actividad locomotora y el comportamiento relacionado con ansiedad en ratones lesionados con AK

Con el objetivo de evaluar el desempeño locomotor y el comportamiento asociado con ansiedad, los ratones fueron expuestos a la tarea de campo abierto. La actividad locomotora se analizó al contabilizar el número de cruces de un cuadrante a otro realizados por cada sujeto durante la sesión. Los animales lesionados con AK a 10 y 30 dpi presentaron un mayor número de cruces que los sujetos control (intactos y sham) (Fig.15A; (media \pm DE) 10 dpi: 195.5 ± 19.87 y 30 dpi: 189.2 ± 23.92 > intacto: 122.4 ± 25.46 , 10 dsh; 139.1 ± 23.62 , y 30 dsh: 137.3 ± 19.9 , $p < 0.0001$).

Con respecto al comportamiento asociado con ansiedad, este se analizó mediante la medición del tiempo que los sujetos pasaban en el centro o periferia de la arena. Los ratones lesionados con AK a 10 y 30 dpi pasaron mayor tiempo en la periferia y menor tiempo en el centro en comparación a los sujetos de grupos intacto y sham (Fig.15B; ANOVA de dos vías seguido de una prueba *post hoc* Bonferroni, interacción $F_{(4,76)} = 16.44$, $p < 0.0001$). Estos resultados indican que los sujetos lesionados con AK presentan una mayor locomoción y comportamiento asociado con ansiedad que los sujetos control (intacto y sham) tanto a 10 como a 30 dpi.

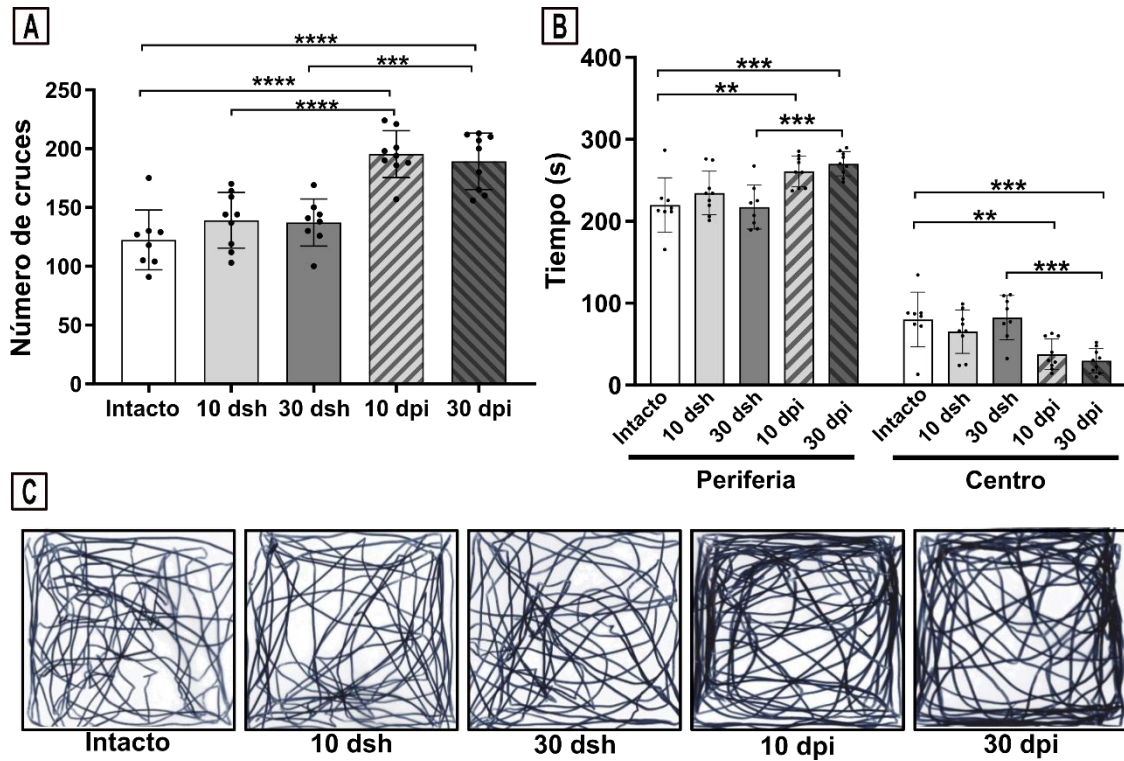


Figura.15. Incremento en la actividad locomotora y el comportamiento relacionado con ansiedad en ratones a 10 y 30 dpi. (A) Número de cruces realizados durante la evaluación de campo abierto. Los ratones lesionados a 10 y 30 dpi presentaron mayor número de cruces que los sujetos intactos y sham (ANOVA de una vía seguido de una prueba *post hoc* Bonferroni, $F_{(4, 38)} = 18.58$, $p < 0.0001$). **(B)** Tiempo que los ratones pasaron en los cuadrantes centrales y periféricos. Los ratones lesionados con AK a 10 y 30 dpi pasaron mayor tiempo en la periferia y menor tiempo en el centro que los sujetos de grupos intactos y sham (ANOVA de dos vías seguido de una prueba *post hoc* Bonferroni, interacción $F_{(4,76)} = 16.44$, $p < 0.0001$). **(C)** Trayectoria recorrida por un sujeto representativo de cada grupo experimental durante los 5 min de la sesión. Las columnas representan la media \pm DE en cada grupo. Los puntos dentro de cada columna en las gráficas representan los valores individuales. $p^* < 0.05$; $p^{**} < 0.01$; $p^{***} < 0.001$; $p^{****} < 0.0001$. Intacto $n = 8$, 10 dsh $n = 9$, 30 dsh $n = 8$, 10 dpi $n = 9$, 30 dpi $n = 9$.

6.4 El aprendizaje y la memoria del miedo al contexto se reestablecen aun cuando continúa el desarrollo de la dispersión de las células granulares

Con el propósito de evaluar el impacto del incremento gradual de la GCD en el aprendizaje y memoria dependiente de hipocampo, se analizó el desempeño de los sujetos en la tarea de miedo al contexto. Durante la fase de condicionamiento, todos los ratones, con excepción del grupo 10 dpi, aprendieron correctamente la tarea. Este aprendizaje se vio reflejado por un incremento gradual en el porcentaje de tiempo que los ratones pasaron inmóviles a medida que avanzaba la sesión de condicionamiento (Fig.16A). Sin embargo, los ratones del grupo 10 dpi no mostraron un incremento gradual en el porcentaje de tiempo de inmovilidad durante el ensayo, lo cual refleja una alteración en el aprendizaje (Fig.16A; ANOVA de dos vías seguido de una prueba *post hoc* Bonferroni, $F_{(4,192)} = 43.07$, $p < 0.0001$).

La fase de memoria fue analizada 24h después del condicionamiento. Los ratones lesionados con AK a 10 dpi mostraron incapacidad para evocar la memoria. Esto se vio reflejado al presentar un porcentaje de inmovilidad menor al que presentaron los grupos control (Fig.16B; 10 dpi: $11.54\% \pm 4.623$ < intacto: $67.43\% \pm 9.88$, 10 dsh: $33.88\% \pm 9.151$, 30 dsh: $59.64\% \pm 14.59$). No obstante, a 30 dpi, se observó un porcentaje de inmovilidad similar al que presentaron los grupos intacto y 30 dsh (Fig.16B; 30 dpi $57.07\% \pm 19.78$ vs intacto $67.43\% \pm 9.88$ y 30 dsh $59.64\% \pm 14.59$, ns $p > 0.9999$). Estos resultados indican que, a 10 dpi, el desempeño conductual de los ratones para aprender y en consecuencia evocar la memoria de miedo al contexto se encuentra alterado, pero a 30 dpi dichos procesos se desarrollan adecuadamente. Por otro lado, en la fase de memoria, el grupo 10 dsh mostró un porcentaje de inmovilidad estadísticamente menor que el de los grupos intacto, 30 dsh y 30 dpi (Fig.16B; 10 dsh $33.38\% \pm 9.15$ < intacto $67.43\% \pm 9.88$ y 30 dsh $59.64\% \pm 14.59$), lo cual refleja una alteración para evocar la memoria. Esto correlaciona con un menor incremento en la LTP y con el daño mecánico observado

en el análisis histológico a 10 dsh. No obstante, a 30 dsh, dichas alteraciones no fueron evidentes.

Cabe mencionar que, todos los ratones incluidos en el análisis mostraron reactividad ante los choques recibidos en la fase de condicionamiento. Esta reactividad se vio reflejada por vocalizaciones, saltos e incremento en la movilidad, lo que descarta que las diferencias en movilidad estuvieran dadas por falta de sensibilidad al estímulo.

Finalmente, se analizó la correlación en el tiempo entre el desarrollo de la GCD y la conducta. Para ello, se realizó un análisis de correlación entre el volumen de las capas granulares (reflejo de la GCD) y el porcentaje de inmovilidad observado durante la evocación de la memoria. Dicho análisis indicó una correlación positiva entre ambas variables (Fig.16C y D, correlación de Spearman). Esto es, a los 10 dpi, cuando la GCD era moderada, el aprendizaje y la memoria se encontraban alterados; en cambio, a los 30 dpi, cuando la GCD resultó mayor, dichos procesos se desarrollaron adecuadamente. En conjunto, estos resultados indican que el restablecimiento en la LTP en la vía perforante-GD y en la conducta de aprendizaje y la memoria dependiente de hipocampo ocurren independientemente de que continúe el incremento gradual de la GCD.

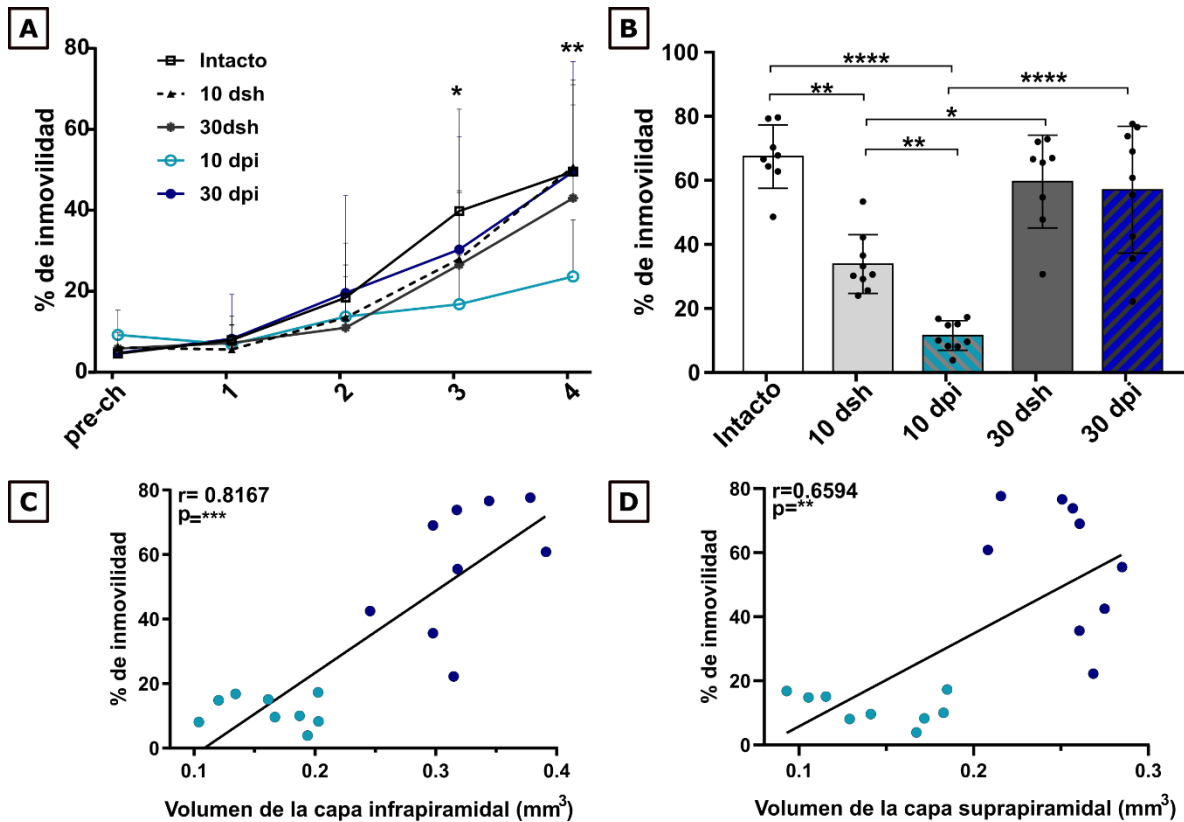


Figura.16. El aprendizaje y la memoria del miedo al contexto se reestablecen aun cuando continúa el desarrollo de la GCD. (A) Curva de aprendizaje durante la fase de condicionamiento. Cada punto representa la media \pm DE del porcentaje de tiempo de inmovilidad por grupo tras cada ensayo (los asteriscos indican la diferencia entre el grupo intacto y 10 dpi; ANOVA de dos vías seguido de una prueba *post hoc* Bonferroni, $F_{(4,192)} = 43.07$, $p < 0.0001$). **(B)** Evocación de la memoria. El grupo 10 dsh muestra menor porcentaje de inmovilidad que el grupo intacto, pero mayor que el del grupo 10 dpi. A 30 dpi, los ratones presentan inmovilidad similar al grupo intacto y 30 dsh. Cada columna representa la media \pm DE cada grupo. Los puntos dentro de cada columna en las gráficas representan los valores individuales (intacto $n=8$, 10 dsh $n=9$, 30 dsh $n=8$, 10 dpi $n=9$, 30 dpi $n=9$). **(C-D)** Graficas que muestran una correlación positiva entre el porcentaje de tiempo que los sujetos pasan inmóviles y el volumen de su capa infrapiramideal **(C)**, $r=0.8167$; intervalo de confianza 95% (0.5552 a 0.9313); $n=18$) y suprapiramideal **(D)**, $r= 0.6594$; intervalo de confianza 95% (0.2644 a 0.8650); $n=18$). Los círculos azul claro corresponden a ratones 10 dpi ($n=9$) y los círculos azul oscuro a 30 dpi ($n=9$). $p * \leq 0.05$; $p ** \leq 0.01$; $p *** \leq 0.001$.

6. DISCUSIÓN

Ante la presencia de daño por excitotoxicidad, el GD es vulnerable de sufrir alteraciones anatómicas que comprometen su función [130][7]. La dispersión de células granulares (GCD) es una afectación caracterizada por un ensanchamiento de la capa granular debido a la migración ectópica de las células granulares [12]. En el presente trabajo de investigación estudiamos el impacto del incremento de la GCD en la comunicación sináptica en la vía perforante (VP)-GD y en una tarea de aprendizaje y la memoria dependiente de hipocampo. Evidencia previa sugería que el desarreglo morfológico producido por el AK podía derivar en: 1) una función alterada debido al incremento en la excitabilidad del circuito, 2) una función no alterada debido a la generación de mecanismos de compensación que le permitirían al GD readaptarse funcionalmente. Los datos de este trabajo apoyan la segunda alternativa, ya que nuestros resultados indican que la evolución de la GCD no impide ni la LTP en la VP-GD, ni la expresión del aprendizaje y la memoria dependientes de GD. A los 10 dpi, cuando la GCD aún no es completa, la LTP en la VP-GD, el aprendizaje y la memoria se encuentran alterados, en cambio, a 30 dpi cuando la GCD es mayor, estos mejoran.

6.1 Cambios morfológicos en el giro dentado tras la administración de ácido kaínico.

Tras la administración de AK, se observó un incremento gradual de la GCD a través del tiempo. Dicho incremento coincide con lo reportado previamente por otros estudios donde la dispersión comienza a ser evidente durante la primera semana y alcanza su máximo desarrollo en la tercera semana tras el daño con AK [106,117]. Esta ventana temporal permitió evaluar el impacto de la GCD en dos puntos importantes de su desarrollo, a los 10 dpi cuando comienza a ser evidente y a los 30 dpi cuando se ha desarrollado completamente. El desarrollo de la GCD se asocia con la pérdida de la proteína extracelular reelina [107]. Esta proteína se relaciona con procesos de migración neuronal y la plasticidad sináptica [131]. En el

hipocampo, la concentración de reelina correlaciona indirectamente con el incremento de la GCD tanto en humanos con epilepsia como en ratones tras la administración intrahipocampal de AK [107,108,117]. Además, la inactivación de la proteína por la administración de un anticuerpo neutralizante induce el desarrollo de GCD en ratones [117]. En el hipocampo, las interneuronas GABAérgicas en el hilus y las células de Cajal Retzius en la capa molecular externa del GD y en la fisura hipocampal producen reelina [132,133]. Cabe destacar que, estas células son altamente susceptibles al daño por excitotoxicidad y su pérdida correlaciona con el incremento de la GCD [119,134]. En particular, esto coincide con los hallazgos histológicos del presente trabajo donde se observó una severa pérdida celular en el hilus desde los 10 dpi, la cual se mantuvo hasta los 30 dpi.

Por otro lado, la lesión con AK que se muestra en este trabajo se caracterizó por un daño en la capa suprapiramidal debido a la administración focal del agonista en ese sitio. Este daño se distinguió por un adelgazamiento en la capa suprapiramidal debido a la abundante pérdida celular en dicha región. Cabe destacar que, a través del tiempo, observamos una disminución en el adelgazamiento de la zona dañada. Esta disminución se asoció a la dispersión de las células granulares sobrevivientes cercanas al daño. De modo similar, en trabajos previos en nuestro laboratorio en rata se ha mostrado que, tras el daño focal con AK en la capa suprapiramidal, el área ausente de células en la zona de lesión disminuye con el tiempo [130,135,136]. Esta disminución también se asoció con el desplazamiento o dispersión de las células próximas al daño. No obstante, debe señalarse que, en dichos trabajos no se observó un proceso de GCD generalizado en el GD como el generado en el presente trabajo. En ellos, la GCD se observa puntualmente en el sitio circundante a la lesión focal. Esto podría estar relacionado con la baja dosis (subepileptogénica) de AK administrada, la cual no genera conductas asociadas a epilepsia. Cabe resaltar que, la dispersión granular se presenta de manera generalizada en todo el GD solo en aquellos ratones que actividad epiléptica de larga duración ($\leq 8h$) tras la administración intrahipocampal de AK [100].

Finalmente, en relación con nuestros resultados histológicos, se observó abundante pérdida celular en el hilus y en la región CA3 y CA1 del hipocampo. Esta pérdida celular se observa con frecuencia tras la inducción de daño excitotóxico en roedores y en pacientes con epilepsia de lóbulo temporal (ELT) [106,109]. Por lo anterior, las alteraciones obtenidas en el presente trabajo reproducen la mayoría de las alteraciones en el hipocampo reportadas en pacientes con ELT y tras la inducción de excitotoxicidad en el roedor, especialmente la GCD, lo cual le convierte en un modelo importante para el estudio de esta alteración anatómica [12,106].

6.2 Cambios en la potenciación a largo plazo en la vía perforante-GD a través del tiempo tras la inducción del daño con AK.

Un hallazgo importante del presente estudio fue que el incremento en la severidad de la GCD no impactó negativamente en el restablecimiento de la comunicación sináptica entre la vía perforante (VP)-GD. Esto se vio reflejado en la posibilidad de inducir potenciación a largo plazo a 30 dpi, cuando la GCD fue mayor, en comparación con la imposibilidad de inducir LTP a 10 dpi, cuando la GCD fue menor. Con relación al restablecimiento de la LTP a 30 dpi, se ha reportado que hay un incremento en la fuerza sináptica entre la corteza entorrinal y el GD a lo largo del tiempo tras la administración de AK [122]. Este fortalecimiento se ve reflejado por un aumento de nuevas sinapsis excitatorias (60%) en los segmentos de las dendritas de células granulares que se encuentran en la capa molecular media, lugar a donde llegan las fibras de la vía perforante medial. A nivel estructural, los botones presinápticos y las espinas postsinápticas son grandes y alargadas, tal como ocurre con la morfología de las estructuras sinápticas que presentan plasticidad inducida por un protocolo de LTP [122]. En este sentido, se ha reportado que las células granulares en regiones con alta dispersión muestran una mayor corriente postsináptica excitatoria que las células de zonas no dispersas ante la estimulación extracelular de la vía perforante medial [122,137].

Otro posible mecanismo involucrado en la facilitación para inducir LTP a 30 dpi, es el incremento en el ARNm del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en las células granulares tras la inducción del daño excitotóxico [100]. De manera interesante, este incremento sucede gradualmente y a la par con el desarrollo de la dispersión granular. El BDNF ha sido involucrado fuertemente en la inducción y el mantenimiento de la LTP [138,139]. En el GD, la infusión de BDNF produce una LTP de inicio lento, tal como la que se observó a 30 dpi en el presente trabajo[139]. En conjunto, el fortalecimiento sináptico entre la VP-GD y el aumento de BDNF en el GD a lo largo del tiempo podrían influir en la inducción y mantenimiento de la LTP observada a 30 dpi.

Por otro lado, el balance excitación/inhibición es clave para el adecuado funcionamiento de los circuitos cerebrales. Específicamente, el GD se caracteriza por una baja tasa de actividad neuronal, la cual es relevante para llevar a cabo sus funciones. Un aspecto importante del GD que contribuye a la baja tasa de actividad neuronal es el fuerte control inhibitorio generado por las INT GABAérgicas locales. En relación con el daño excitotóxico, estudios reportan una disminución en la eficacia inhibitoria GABAérgica en el GD durante la primera semana la administración intrahipocampal de AK [140]. Los niveles de GABA disminuyen desde el primer día tras la lesión y continúan bajos durante una semana [140]. Además, se reporta que el E_{GABA} (potencial de equilibrio) de las células granulares cambia a un estado menos hiperpolarizado (-55 a -60mv) durante la primera semana tras la inducción de daño excitotóxico por pilocarpina [141]. La disminución en la eficacia inhibitoria del GD podría comprometer la funcionalidad del GD. De forma interesante, se ha reportado que los niveles de GABA regresan a niveles fisiológicos alrededor de la cuarta semana tras la administración intrahipocampal de AK. De manera similar, el E_{GABA} de las células granulares regresa a niveles control a la cuarta semana de la inducción de la lesión excitotóxica con pilocarpina [140,141]. La restauración de la eficacia inhibitoria en el GD es importante para el establecimiento de un adecuado balance excitación/inhibición. Dado que el

incremento en la eficacia inhibitoria ocurre alrededor de la cuarta semana, es posible sugerir que ello contribuye al establecimiento de la LTP y la memoria observada a 30 dpi en nuestro trabajo.

Con respecto a la LTP obtenida a 30 dpi, se observó que ésta tuvo una cinética de respuesta más lenta para alcanzar su meseta y presentó un incremento porcentual menor que los grupos intacto y 30 dsh. Es posible que los mecanismos relacionados con la inducción de la fase temprana de la LTP estén alterados en ratones a 30 dpi. Estos mecanismos en la VP-GD se relacionan con la activación de los receptores AMPA y NMDA [58,142]. En el modelo utilizado en este estudio se ha reportado una disminución en la densidad de receptores AMPA en las zonas con GCD [137]. Lo anterior podría así, retrasar la entrada de Ca^{2+} necesaria para inducir la respuesta rápida de la etapa temprana de la LTP. En consecuencia, otros mecanismos como la activación de receptores metabotrópicos podrían ser responsables del incremento lento en la respuesta de la LTP [143]. Asimismo, es posible que el inicio lento de la respuesta en la LTP, pudiera estar modulado por el BDNF. En el GD, la infusión de BDNF produce una LTP de inicio lento, el cual es independiente a la activación de receptores NMDA [144]. Como se precisó anteriormente, existe una correlación positiva entre el incremento de ARNm de BDNF en las células granulares y el incremento de la GCD a través del tiempo, lo cual podría hacer factible que la respuesta de inicio lenta en la LTP esté modulada por esta neurotrofina. [100]. Se requiere de futuros experimentos que indaguen sobre lo anterior. Sin embargo, esto sugiere que la plasticidad sináptica está aún comprometida a los 30 dpi, pero con una notable mejoría en relación a lo que ocurre 10 dpi.

Por otro lado, en relación con la LTP obtenida en el grupo 10 dsh, se observó un incremento porcentual menor que la de los grupos control intacto y 30 dsh. Esto podría estar asociado con la interrupción de la capa granular observada por la inserción de la cánula durante la cirugía. Es probable que este daño mecánico ocasionara la activación de calpaínas, las cuales incrementan tras traumatismo

cerebral [145]. Se ha reportado que los altos niveles de activación de las calpaínas limitan la magnitud de la respuesta de la LTP y comprometen el desempeño de la memoria [146]. Lo anterior coincide con la menor magnitud de la LTP y la disminución en el desempeño cognitivo del grupo 10 dsh. De igual manera, en el presente trabajo se contempló que, este daño mecánico estuvo presente en sujetos lesionados con AK a 10 dpi. Sin embargo, mientras que los sujetos sham mostraron un grado de afectación en la LTP, en el aprendizaje y la memoria, en los sujetos a 10 dpi estos procesos no fueron posibles de evocar, lo que resalta la participación del daño inducido por el AK.

6.3 El aprendizaje y la memoria del miedo al contexto mejoran a través del desarrollo de GCD

Con respecto a nuestros resultados conductuales se observó que, a 10 dpi, los animales presentaron alteraciones tanto en la conducta de aprendizaje como en la memoria. No obstante, a 30 dpi cuando la GCD fue mayor, el aprendizaje y la memoria se presentaron adecuadamente. Es posible que, a 10 dpi, el circuito del GD se encuentre aun en un estado de inestabilidad e hiper excitabilidad, lo cual impida la formación de nuevas memorias. Este estado puede estar relacionado a: un incremento en las aferencias de la CE [122], una baja eficiencia inhibitoria [140], la formación de conexiones excitatorias recurrentes y la astrogliosis [147]. Asimismo, se ha reportado pérdida de proyecciones de la corteza retrosplenial y los cuerpos mamilares tras la inyección intrahipocampal de AK [148]. Las aferencias de estas estructuras al hipocampo son importantes para el procesamiento de la memoria contextual [149,150]. Sin embargo, a 30 dpi cuando la GCD es mayor, es posible que el circuito haya compensado dichas alteraciones permitiendo el restablecimiento de la función.

En relación a lo anterior, diversos estudios han reportado que, en zonas con alta dispersión, las células granulares sufren cambios hemostáticos que podrían

contribuir a mantener las funciones del circuito tras daño excitotóxico [123,125,127]. Estos cambios involucran la disminución de la excitabilidad intrínseca de las células granulares (menor resistencia de entrada y mayor reobase que células granulares en zonas sin dispersión) [127]. Los autores de estos trabajos sugieren que, la reducción en la excitabilidad intrínseca celular podría contribuir a disminuir la hiperexcitabilidad en las zonas con GCD. En este sentido, cabe resaltar que, a través de un análisis computacional se observó que dicho cambio homeostático contribuye a mantener las funciones cognitivas del GD tras daño excitotóxico debido a que las células granulares recuperan su propiedad silente o de baja actividad [151].

Por otro lado, los astrocitos podrían también contribuir a la inestabilidad temprana y subsecuente compensación del circuito tras daño excitotóxico con AK [152]. Los astrocitos participan, entre otras funciones, en la recaptura de glutamato del espacio extracelular contribuyendo así en la excitabilidad neuronal [153]. El transportador de glutamato 1 (GLUT1) se expresa en astrocitos y contribuye de forma importante en la recaptura de glutamato extracelular [154]. Cabe resaltar que, la expresión de GLUT1 en el hipocampo disminuye durante la primera semana tras el daño excitotóxico con AK, cuando la GCD comienza a ser evidente [147]. La disminución de GLUT1 en el hipocampo puede incrementar la hiperexcitabilidad del circuito e influir en las alteraciones en la LTP y la conducta observada en nuestra investigación a 10 dpi. No obstante, alrededor de la cuarta semana tras el insulto excitotóxico, cuando la GCD es abundante, se observa una recuperación en los niveles de expresión del transportador GLUT1 [147]. Esto podría ayudar a disminuir la hiperexcitabilidad del circuito hipocampal y contribuir así con las mejoras en la LTP y la conducta observada en el presente trabajo a 30 dpi.

Finalmente, a través de la tarea de campo abierto observamos una mayor locomoción y ansiedad en sujetos lesionados con KA a 10 y 30 dpi. Es posible pensar que, el aumento en la locomoción y la ansiedad interfieran con la expresión de la conducta de miedo (inmovilidad) durante el aprendizaje y memoria de miedo al contexto. Sin embargo, cabe considerar que, cuando a pesar de que ambos

grupos presentan niveles similares de locomoción y ansiedad, solo los sujetos a 10 dpi presentaron deficiencias en el aprendizaje y la memoria. En este sentido se podría interpretar que la elevada locomoción y ansiedad no interfieren en los resultados obtenidos.

7. CONCLUSIÓN

El incremento gradual en la GCD en el tiempo no impide la comunicación sináptica en la VP-GD, ni la expresión del aprendizaje y memoria de miedo al contexto. Sin embargo, el desarrollo de la GCD si podría estar acompañado con cambios intrínsecos que contribuyen en la recuperación de la hemostasis del circuito. Estos hallazgos destacan el potencial plástico del GD para recuperar su función a lo largo del tiempo a pesar de la presencia de alteraciones estructurales como la GCD.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Amaral DG, Scharfman HE, Lavenex P. The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). 2007. pp. 3–790. doi:10.1016/S0079-6123(07)63001-5
2. Chawla MK, Guzowski JF, Ramirez-Amaya V, Lipa P, Hoffman KL, Marriott LK, et al. Sparse, environmentally selective expression of Arc RNA in the upper blade of the rodent fascia dentata by brief spatial experience. *Hippocampus*. 2005;15: 579–586. doi:10.1002/hipo.20091
3. Jung MW, McNaughton BL. Spatial selectivity of unit activity in the hippocampal granular layer. *Hippocampus*. 1993;3: 165–182. doi:10.1002/hipo.450030209
4. Rollenhagen. The mossy fiber bouton: the “common” or the “unique” synapse? *Front Synaptic Neurosci*. 2010. doi:10.3389/fnsyn.2010.00002
5. Leutgeb JK, Leutgeb S, Moser M-B, Moser EI. Pattern Separation in the Dentate Gyrus and CA3 of the Hippocampus. *Science (1979)*. 2007;315: 961–966. doi:10.1126/science.1135801

6. Nakashiba T, Cushman JD, Pelkey KA, Renaudineau S, Buhl DL, McHugh TJ, et al. Young Dentate Granule Cells Mediate Pattern Separation, whereas Old Granule Cells Facilitate Pattern Completion. *Cell*. 2012;149: 188–201. doi:10.1016/j.cell.2012.01.046
7. Dengler CG, Coulter DA. Normal and epilepsy-associated pathologic function of the dentate gyrus. 2016. pp. 155–178. doi:10.1016/bs.pbr.2016.04.005
8. Claiborne BJ, Amaral DG, Cowan WM. A light and electron microscopic analysis of the mossy fibers of the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol*. 1986;246: 435–458. doi:10.1002/cne.902460403
9. Scharfman HE. The enigmatic mossy cell of the dentate gyrus. *Nat Rev Neurosci*. 2016;17: 562–575. doi:10.1038/nrn.2016.87
10. Amaral DG. Synaptic extensions from the mossy fibers of the fascia dentata. *Anat Embryol (Berl)*. 1979;155: 241–251. doi:10.1007/BF00317638
11. Amaral, D. and Lavenex P. Hippocampal Neuroanatomy. Per Andersen, Richard Morris, David Amaral, Tim Bliss and JO, editor. *The Hippocampus Book*; 2006.
12. Houser CR. Granule cell dispersion in the dentate gyrus of humans with temporal lobe epilepsy. *Brain Res*. 1990;535: 195–204. doi:10.1016/0006-8993(90)91601-C
13. Heinrich C, Nitta N, Flubacher A, Müller M, Fahrner A, Kirsch M, et al. Reelin deficiency and displacement of mature neurons, but not neurogenesis, underlie the formation of granule cell dispersion in the epileptic hippocampus. *J Neurosci*. 2006;26: 4701–13. doi:10.1523/JNEUROSCI.5516-05.2006
14. Tashiro A, Makino H, Gage FH. Experience-Specific Functional Modification of the Dentate Gyrus through Adult Neurogenesis: A Critical Period during an Immature Stage. *Journal of Neuroscience*. 2007;27: 3252–3259. doi:10.1523/JNEUROSCI.4941-06.2007
15. Guzowski JF, McNaughton BL, Barnes CA, Worley PF. Environment-specific expression of the immediate-early gene *Arc* in hippocampal neuronal ensembles. *Nat Neurosci*. 1999;2: 1120–1124. doi:10.1038/16046
16. Fricke RA, Prince DA. Electrophysiology of dentate gyrus granule cells. *J Neurophysiol*. 1984;51: 195–209. doi:10.1152/jn.1984.51.2.195
17. Spruston N, Johnston D. Perforated patch-clamp analysis of the passive membrane properties of three classes of hippocampal neurons. *J Neurophysiol*. 1992;67: 508–529. doi:10.1152/jn.1992.67.3.508
18. Staley KJ, Otis TS, Mody I. Membrane properties of dentate gyrus granule cells: comparison of sharp microelectrode and whole-cell recordings. *J Neurophysiol*. 1992;67: 1346–1358. doi:10.1152/jn.1992.67.5.1346

19. Correction for Acsady et al., GABAergic Cells Are the Major Postsynaptic Targets of Mossy Fibers in the Rat Hippocampus. *The Journal of Neuroscience*. 1998;18: np-np. doi:10.1523/JNEUROSCI.18-11-j0001.1998
20. Hainmueller T, Bartos M. Dentate gyrus circuits for encoding, retrieval and discrimination of episodic memories. *Nat Rev Neurosci*. 2020;21: 153–168. doi:10.1038/s41583-019-0260-z
21. Amaral DG, Ishizuka N, Claiborne B. Chapter 1 Chapter Neurons, numbers and the hippocampal network. 1990. pp. 1–11. doi:10.1016/S0079-6123(08)61237-6
22. Ruediger S, Vittori C, Bednarek E, Genoud C, Strata P, Sacchetti B, et al. Learning-related feedforward inhibitory connectivity growth required for memory precision. *Nature*. 2011;473: 514–518. doi:10.1038/nature09946
23. Ribak CE, Seress L, Amaral DG. The development, ultrastructure and synaptic connections of the mossy cells of the dentate gyrus. *J Neurocytol*. 1985;14: 835–857. doi:10.1007/BF01170832
24. Sun Y, Grieco SF, Holmes TC, Xu X. Local and Long-Range Circuit Connections to Hilar Mossy Cells in the Dentate Gyrus. *eNeuro*. 2017;4: ENEURO.0097-17.2017. doi:10.1523/ENEURO.0097-17.2017
25. Buckmaster PS, Wenzel HJ, Kunkel DD, Schwartzkroin PA. Axon arbors and synaptic connections of hippocampal mossy cells in the rat in vivo. *J Comp Neurol*. 1996;366: 270–292. doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19960304)366:2<270::AID-CNE7>3.0.CO;2-2
26. Scharfman HE, Myers CE. Hilar mossy cells of the dentate gyrus: a historical perspective. *Front Neural Circuits*. 2013;6. doi:10.3389/fncir.2012.00106
27. Booker SA, Vida I. Morphological diversity and connectivity of hippocampal interneurons. *Cell Tissue Res*. 2018;373: 619–641. doi:10.1007/s00441-018-2882-2
28. Houser CR. Interneurons of the dentate gyrus: an overview of cell types, terminal fields and neurochemical identity. 2007. pp. 217–811. doi:10.1016/S0079-6123(07)63013-1
29. Freund TF, Buzsáki G. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*. 1998;6: 347–470. doi:10.1002/(SICI)1098-1063(1996)6:4<347::AID-HIPO1>3.0.CO;2-I
30. Soriano E, Frotscher M. A GABAergic axo-axonic cell in the fascia dentata controls the main excitatory hippocampal pathway. *Brain Res*. 1989;503: 170–174. doi:10.1016/0006-8993(89)91722-8
31. Miles R, Tóth K, Gulyás AI, Hájos N, Freund TF. Differences between Somatic and Dendritic Inhibition in the Hippocampus. *Neuron*. 1996;16: 815–823. doi:10.1016/S0896-6273(00)80101-4

32. Halasy K, Somogyi P. Subdivisions in the Multiple GABAergic Innervation of Granule Cells in the Dentate Gyrus of the Rat Hippocampus. *European Journal of Neuroscience*. 1993;5: 411–429. doi:10.1111/j.1460-9568.1993.tb00508.x
33. Basu J, Siegelbaum SA. The Corticohippocampal Circuit, Synaptic Plasticity, and Memory. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015;7: a021733. doi:10.1101/cshperspect.a021733
34. Witter MP. The perforant path: projections from the entorhinal cortex to the dentate gyrus. 2007. pp. 43–61. doi:10.1016/S0079-6123(07)63003-9
35. Canto CB, Wouterlood FG, Witter MP. What Does the Anatomical Organization of the Entorhinal Cortex Tell Us? *Neural Plast*. 2008;2008: 1–18. doi:10.1155/2008/381243
36. O'Mara S. The subiculum: what it does, what it might do, and what neuroanatomy has yet to tell us. *J Anat*. 2005;207: 271–282. doi:10.1111/j.1469-7580.2005.00446.x
37. Simonnet J, Fricker D. Cellular components and circuitry of the presubiculum and its functional role in the head direction system. *Cell Tissue Res*. 2018;373: 541–556. doi:10.1007/s00441-018-2841-y
38. Mitchell AS, Czajkowski R, Zhang N, Jeffery K, Nelson AJD. Retrosplenial cortex and its role in spatial cognition. *Brain Neurosci Adv*. 2018;2: 239821281875709. doi:10.1177/2398212818757098
39. Knierim JJ, Neunuebel JP, Deshmukh SS. Functional correlates of the lateral and medial entorhinal cortex: objects, path integration and local–global reference frames. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2014;369: 20130369. doi:10.1098/rstb.2013.0369
40. Knierim JJ, Neunuebel JP, Deshmukh SS. Functional correlates of the lateral and medial entorhinal cortex: objects, path integration and local–global reference frames. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2014;369: 20130369. doi:10.1098/rstb.2013.0369
41. Zhen Z-H, Guo M-R, Li H-M, Guo O-Y, Zhen J-L, Fu J, et al. Normal and Abnormal Sharp Wave Ripples in the Hippocampal-Entorhinal Cortex System: Implications for Memory Consolidation, Alzheimer's Disease, and Temporal Lobe Epilepsy. *Front Aging Neurosci*. 2021;13. doi:10.3389/fnagi.2021.683483
42. Zhang S-J, Ye J, Couey JJ, Witter M, Moser EI, Moser M-B. Functional connectivity of the entorhinal–hippocampal space circuit. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2014;369: 20120516. doi:10.1098/rstb.2012.0516
43. Moryś J, Sadowski M, Barcikowska M, Maciejewska B, Narkiewicz O. The second layer neurones of the entorhinal cortex and the perforant path in physiological ageing and Alzheimer's disease. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 1994;54: 47–53.

44. Hyman BT, van Hoesen GW, Damasio AR. Alzheimer's disease: Glutamate depletion in the hippocampal perforant pathway zone. *Ann Neurol.* 1987;22: 37–40. doi:10.1002/ana.410220110
45. Headley DB, Paré D. Common oscillatory mechanisms across multiple memory systems. *NPJ Sci Learn.* 2017;2: 1. doi:10.1038/s41539-016-0001-2
46. Fernández-Ruiz A, Oliva A, Soula M, Rocha-Almeida F, Nagy GA, Martin-Vazquez G, et al. Gamma rhythm communication between entorhinal cortex and dentate gyrus neuronal assemblies. *Science (1979).* 2021;372. doi:10.1126/science.abf3119
47. Joo HR, Frank LM. The hippocampal sharp wave–ripple in memory retrieval for immediate use and consolidation. *Nat Rev Neurosci.* 2018;19: 744–757. doi:10.1038/s41583-018-0077-1
48. Sasaki T, Piatti VC, Hwaun E, Ahmadi S, Lisman JE, Leutgeb S, et al. Dentate network activity is necessary for spatial working memory by supporting CA3 sharp-wave ripple generation and prospective firing of CA3 neurons. *Nat Neurosci.* 2018;21: 258–269. doi:10.1038/s41593-017-0061-5
49. Llorens-Martín M, Blazquez-Llorca L, Benavides-Piccione R, Rabano A, Hernandez F, Avila J, et al. Selective alterations of neurons and circuits related to early memory loss in Alzheimer's disease. *Front Neuroanat.* 2014;8. doi:10.3389/fnana.2014.00038
50. Leutgeb JK, Leutgeb S. Book review: The dentate gyrus: A comprehensive guide to structure, function, and clinical implications. *Hippocampus.* 2009; NA-NA. doi:10.1002/hipo.20662
51. Squire LR, Zola-Morgan JT. The Cognitive Neuroscience of Human Memory Since H.M. *Annu Rev Neurosci.* 2011;34: 259–288. doi:10.1146/annurev-neuro-061010-113720
52. Bliss TVP, Lømo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol.* 1973;232: 331–356. doi:10.1113/jphysiol.1973.sp010273
53. O'Keefe J, Dostrovsky J. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res.* 1971;34: 171–175. doi:10.1016/0006-8993(71)90358-1
54. Shaw GL. Donald Hebb: The Organization of Behavior. *Brain Theory.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1986. pp. 231–233. doi:10.1007/978-3-642-70911-1_15
55. Baltaci SB, Mogulkoc R, Baltaci AK. Molecular Mechanisms of Early and Late LTP. *Neurochem Res.* 2019;44: 281–296. doi:10.1007/s11064-018-2695-4
56. Ho VM, Lee J-A, Martin KC. The Cell Biology of Synaptic Plasticity. *Science (1979).* 2011;334: 623–628. doi:10.1126/science.1209236

57. Fusi S, Drew PJ, Abbott LF. Cascade Models of Synaptically Stored Memories. *Neuron*. 2005;45: 599–611. doi:10.1016/j.neuron.2005.02.001
58. Bliss TVP, Collingridge GL, Morris RGM, Reymann KG. Long-term potentiation in the hippocampus: discovery, mechanisms and function. *Neuroforum*. 2018;24: A103–A120. doi:10.1515/nf-2017-A059
59. LYNCH MA. Long-Term Potentiation and Memory. *Physiol Rev*. 2004;84: 87–136. doi:10.1152/physrev.00014.2003
60. Martinez JL, Derrick BE. LONG-TERM POTENTIATION AND LEARNING. *Annu Rev Psychol*. 1996;47: 173–203. doi:10.1146/annurev.psych.47.1.173
61. Barnes CA, McNaughton BL. An age comparison of the rates of acquisition and forgetting of spatial information in relation to long-term enhancement of hippocampal synapses. *Behavioral Neuroscience*. 1985;99: 1040–1048. doi:10.1037/0735-7044.99.6.1040
62. Ji J, Maren S. Hippocampal involvement in contextual modulation of fear extinction. *Hippocampus*. 2007;17: 749–758. doi:10.1002/hipo.20331
63. Maren S, Phan KL, Liberzon I. The contextual brain: implications for fear conditioning, extinction and psychopathology. *Nat Rev Neurosci*. 2013;14: 417–28. doi:10.1038/nrn3492
64. Maren S, de Oca B, Fanselow MS. Sex differences in hippocampal long-term potentiation (LTP) and Pavlovian fear conditioning in rats: positive correlation between LTP and contextual learning. *Brain Res*. 1994;661: 25–34. doi:10.1016/0006-8993(94)91176-2
65. Nadel L, Samsonovich A, Ryan L, Moscovitch M. Multiple trace theory of human memory: Computational, neuroimaging, and neuropsychological results. *Hippocampus*. 2000;10: 352–368. doi:10.1002/1098-1063(2000)10:4<352::AID-HIPO2>3.0.CO;2-D
66. Lee JW, Jung MW. Separation or binding? Role of the dentate gyrus in hippocampal mnemonic processing. *Neurosci Biobehav Rev*. 2017;75: 183–194. doi:10.1016/j.neubiorev.2017.01.049
67. Hunsaker MR, Rosenberg JS, Kesner RP. The role of the dentate gyrus, CA3a,b, and CA3c for detecting spatial and environmental novelty. *Hippocampus*. 2008;18: 1064–1073. doi:10.1002/hipo.20464
68. Kesner RP. An analysis of dentate gyrus function (an update). *Behavioural Brain Research*. 2018;354: 84–91. doi:10.1016/j.bbr.2017.07.033
69. Hafting T, Fyhn M, Molden S, Moser M-B, Moser EI. Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. *Nature*. 2005;436: 801–806. doi:10.1038/nature03721
70. Kesner RP. An analysis of the dentate gyrus function. *Behavioural Brain Research*. 2013;254: 1–7. doi:10.1016/j.bbr.2013.01.012

71. 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: 161–253. doi:10.1016/0301-0082(89)90009-9
72. Hargreaves EL. Major Dissociation Between Medial and Lateral Entorhinal Input to Dorsal Hippocampus. *Science (1979).* 2005;308: 1792–1794. doi:10.1126/science.1110449
73. Dahl D, Burgard EC, Sarvey JM. NMDA receptor antagonists reduce medial, but not lateral, perforant path-evoked EPSPs in dentate gyrus of rat hippocampal slice. *Exp Brain Res.* 1990;83. doi:10.1007/BF00232206
74. Poucet B. Object exploration, habituation, and response to a spatial change in rats following septal or medial frontal cortical damage. *Behavioral Neuroscience.* 1989;103: 1009–1016. doi:10.1037/0735-7044.103.5.1009
75. Bernier BE, Lacagnina AF, Ayoub A, Shue F, Zemelman B v., Krasne FB, et al. Dentate Gyrus Contributes to Retrieval as well as Encoding: Evidence from Context Fear Conditioning, Recall, and Extinction. *The Journal of Neuroscience.* 2017;37: 6359–6371. doi:10.1523/JNEUROSCI.3029-16.2017
76. Curzon P, Rustay NR, Browman KE. Cued and Contextual Fear Conditioning for Rodents. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience.* 2009. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21204331>
77. Phillips RG, LeDoux JE. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behavioral Neuroscience.* 1992;106: 274–285. doi:10.1037/0735-7044.106.2.274
78. Rudy JW, Huff NC, Matus-Amat P. Understanding contextual fear conditioning: insights from a two-process model. *Neurosci Biobehav Rev.* 2004;28: 675–685. doi:10.1016/j.neubiorev.2004.09.004
79. Fanselow MS. From contextual fear to a dynamic view of memory systems. *Trends Cogn Sci.* 2010;14: 7–15. doi:10.1016/j.tics.2009.10.008
80. Madroñal N, Delgado-García JM, Fernández-Guizán A, Chatterjee J, Köhn M, Mattucci C, et al. Rapid erasure of hippocampal memory following inhibition of dentate gyrus granule cells. *Nat Commun.* 2016;7: 10923. doi:10.1038/ncomms10923
81. Denny CA, Kheirbek MA, Alba EL, Tanaka KF, Brachman RA, Laughman KB, et al. Hippocampal Memory Traces Are Differentially Modulated by Experience, Time, and Adult Neurogenesis. *Neuron.* 2014;83: 189–201. doi:10.1016/j.neuron.2014.05.018
82. Ramirez S, Tonegawa S, Liu X. Identification and optogenetic manipulation of memory engrams in the hippocampus. *Front Behav Neurosci.* 2014;7. doi:10.3389/fnbeh.2013.00226

83. Park S, Kramer EE, Mercaldo V, Rashid AJ, Insel N, Frankland PW, et al. Neuronal Allocation to a Hippocampal Engram. *Neuropsychopharmacology*. 2016;41: 2987–2993. doi:10.1038/npp.2016.73
84. Kitamura T, Ogawa SK, Roy DS, Okuyama T, Morrissey MD, Smith LM, et al. Engrams and circuits crucial for systems consolidation of a memory. *Science*. 2017;356: 73–78. doi:10.1126/science.aam6808
85. Tonegawa S, Morrissey MD, Kitamura T. The role of engram cells in the systems consolidation of memory. *Nat Rev Neurosci*. 2018;19: 485–498. doi:10.1038/s41583-018-0031-2
86. Reiner A, Levitz J. Glutamatergic Signaling in the Central Nervous System: Ionotropic and Metabotropic Receptors in Concert. *Neuron*. 2018;98: 1080–1098. doi:10.1016/j.neuron.2018.05.018
87. Riedel G. Glutamate receptor function in learning and memory. *Behavioural Brain Research*. 2003;140: 1–47. doi:10.1016/S0166-4328(02)00272-3
88. Mattson MP. Excitotoxic and Excitoprotective Mechanisms: Abundant Targets for the Prevention and Treatment of Neurodegenerative Disorders. *Neuromolecular Med*. 2003;3: 65–94. doi:10.1385/NMM:3:2:65
89. Olney JW. Excitotoxic Neurodegeneration in Alzheimer Disease. *Arch Neurol*. 1997;54: 1234. doi:10.1001/archneur.1997.00550220042012
90. Ambrosi G, Cerri S, Blandini F. A further update on the role of excitotoxicity in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neural Transm*. 2014;121: 849–859. doi:10.1007/s00702-013-1149-z
91. Estrada Sánchez AM, Mejía-Toiber J, Massieu L. Excitotoxic Neuronal Death and the Pathogenesis of Huntington's Disease. *Arch Med Res*. 2008;39: 265–276. doi:10.1016/j.arcmed.2007.11.011
92. van den Bosch L, van Damme P, Bogaert E, Robberecht W. The role of excitotoxicity in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2006;1762: 1068–1082. doi:10.1016/j.bbadis.2006.05.002
93. Tehse J, Taghibiglou C. The Overlooked Aspect of Excitotoxicity: Glutamate-Independent Excitotoxicity in Traumatic Brain Injuries. *European Journal of Neuroscience*. 2018; ejn.14307. doi:10.1111/ejn.14307
94. Metwally E, Zhao G, Zhang YQ. The calcium-dependent protease calpain in neuronal remodeling and neurodegeneration. *Trends Neurosci*. 2021;44: 741–752. doi:10.1016/j.tins.2021.07.003
95. Verma M, Lizama BN, Chu CT. Excitotoxicity, calcium and mitochondria: a triad in synaptic neurodegeneration. *Transl Neurodegener*. 2022;11: 3. doi:10.1186/s40035-021-00278-7

96. Mattson MP. Excitotoxicity. *Stress: Physiology, Biochemistry, and Pathology*. Elsevier; 2019. pp. 125–134. doi:10.1016/B978-0-12-813146-6.00011-4
97. Sloviter RS. Decreased Hippocampal Inhibition and a Selective Loss of Interneurons in Experimental Epilepsy. *Science* (1979). 1987;235: 73–76. doi:10.1126/science.2879352
98. Blümcke I, Coras R, Miyata H, Özkara C. Defining Clinico-Neuropathological Subtypes of Mesial Temporal Lobe Epilepsy with Hippocampal Sclerosis. *Brain Pathology*. 2012;22: 402–411. doi:10.1111/j.1750-3639.2012.00583.x
99. Sloviter RS. Calcium-binding protein (calbindin-D28k) and parvalbumin immunocytochemistry: Localization in the rat hippocampus with specific reference to the selective vulnerability of hippocampal neurons to seizure activity. *J Comp Neurol*. 1989;280: 183–196. doi:10.1002/cne.902800203
100. Tulke S, Haas CA, Häussler U. Expression of brain-derived neurotrophic factor and structural plasticity in the dentate gyrus and CA2 region correlate with epileptiform activity. *Epilepsia*. 2019; epi.15540. doi:10.1111/epi.15540
101. Coulter DA, Carlson GC. Functional regulation of the dentate gyrus by GABA-mediated inhibition. 2007. pp. 235–812. doi:10.1016/S0079-6123(07)63014-3
102. Lothman EW, Stringer JL, Bertram EH. The dentate gyrus as a control point for seizures in the hippocampus and beyond. *Epilepsy Res Suppl*. 1992;7: 301–13. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1334669>
103. Andersen P, Holmqvist B, Voorhoeve PE. Entorhinal Activation of Dentate Granule Cells. *Acta Physiol Scand*. 1966;66: 448–460. doi:10.1111/j.1748-1716.1966.tb03223.x
104. Krook-Magnuson E, Armstrong C, Bui A, Lew S, Oijala M, Soltesz I. In vivo evaluation of the dentate gate theory in epilepsy. *J Physiol*. 2015;593: 2379–2388. doi:10.1113/JP270056
105. Sloviter RS, Bumanglag A v., Schwarcz R, Frotscher M. Abnormal dentate gyrus network circuitry in temporal lobe epilepsy. *Jasper’s Basic Mechanisms of the Epilepsies*. 2012. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22787603>
106. Bouilleret V, Ridoux V, Depaulis A, Marescaux C, Nehlig A, le Gal La Salle G. Recurrent seizures and hippocampal sclerosis following intrahippocampal kainate injection in adult mice: electroencephalography, histopathology and synaptic reorganization similar to mesial temporal lobe epilepsy. *Neuroscience*. 1999;89: 717–729. doi:10.1016/S0306-4522(98)00401-1
107. Haas CA, Dudeck O, Kirsch M, Huszka C, Kann G, Pollak S, et al. Role for Reelin in the Development of Granule Cell Dispersion in Temporal Lobe Epilepsy. *The Journal of Neuroscience*. 2002;22: 5797–5802. doi:10.1523/JNEUROSCI.22-14-05797.2002
108. Chai X, Münzner G, Zhao S, Tinnes S, Kowalski J, Häussler U, et al. Epilepsy-Induced Motility of Differentiated Neurons. *Cerebral Cortex*. 2014;24: 2130–2140. doi:10.1093/cercor/bht067

109. Wieser H-G. ILAE Commission Report. Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Epilepsia*. 2004;45: 695–714. doi:10.1111/j.0013-9580.2004.09004.x
110. Neves RS da C, de Souza Silva Tudesco I, Jardim AP, Caboclo LOSF, Lancellotti C, Ferrari-Marinho T, et al. Granule cell dispersion is associated with memory impairment in right mesial temporal lobe epilepsy. *Seizure*. 2012;21: 685–690. doi:10.1016/j.seizure.2012.07.008
111. Blümcke I, Kistner I, Clusmann H, Schramm J, Becker AJ, Elger CE, et al. Towards a clinico-pathological classification of granule cell dispersion in human mesial temporal lobe epilepsies. *Acta Neuropathol*. 2009;117: 535–544. doi:10.1007/s00401-009-0512-5
112. Blümcke I, Thom M, Aronica E, Armstrong DD, Bartolomei F, Bernasconi A, et al. International consensus classification of hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy: A Task Force report from the ILAE Commission on Diagnostic Methods. *Epilepsia*. 2013;54: 1315–1329. doi:10.1111/epi.12220
113. Lurton D, el Bahh B, Sundstrom L, Rougier A. Granule cell dispersion is correlated with early epileptic events in human temporal lobe epilepsy. *J Neurol Sci*. 1998;154: 133–136. doi:10.1016/S0022-510X(97)00220-7
114. Kinney HC, Cryan JB, Haynes RL, Paterson DS, Haas EA, Mena OJ, et al. Dentate gyrus abnormalities in sudden unexplained death in infants: morphological marker of underlying brain vulnerability. *Acta Neuropathol*. 2015;129: 65–80. doi:10.1007/s00401-014-1357-0
115. Bleakman D, Lodge D. Neuropharmacology of AMPA and kainate receptors. *Neuropharmacology*. 1998;37: 1187–1204. doi:10.1016/S0028-3908(98)00139-7
116. Wang Q, Yu S, Simonyi A, Sun GY, Sun AY. Kainic Acid-Mediated Excitotoxicity as a Model for Neurodegeneration. *Mol Neurobiol*. 2005;31: 003–016. doi:10.1385/MN:31:1-3:003
117. Heinrich C. Reelin Deficiency and Displacement of Mature Neurons, But Not Neurogenesis, Underlie the Formation of Granule Cell Dispersion in the Epileptic Hippocampus. *Journal of Neuroscience*. 2006;26: 4701–4713. doi:10.1523/JNEUROSCI.5516-05.2006
118. Frotscher M, Chai X, Bock HH, Haas CA, Förster E, Zhao S. Role of Reelin in the development and maintenance of cortical lamination. *J Neural Transm*. 2009;116: 1451–1455. doi:10.1007/s00702-009-0228-7
119. Orcinha C, Münzner G, Gerlach J, Kiliass A, Follo M, Egert U, et al. Seizure-Induced Motility of Differentiated Dentate Granule Cells Is Prevented by the Central Reelin Fragment. *Front Cell Neurosci*. 2016;10. doi:10.3389/fncel.2016.00183
120. Rougier A, Arthaud S, Zombre N, Salle GLG la. Patterns of dentate granule cell responses to perforant path stimulation in epileptic mice with granule cell dispersion. *Epilepsy Res*. 2005;63: 119–129. doi:10.1016/j.eplepsyres.2005.01.004

121. Freiman TM, Eismann-Schweimler J, Frotscher M. Granule cell dispersion in temporal lobe epilepsy is associated with changes in dendritic orientation and spine distribution. *Exp Neurol*. 2011;229: 332–338. doi:10.1016/j.expneurol.2011.02.017
122. Janz P, Savanthrapadian S, Häussler U, Kiliass A, Nestel S, Kretz O, et al. Synaptic Remodeling of Entorhinal Input Contributes to an Aberrant Hippocampal Network in Temporal Lobe Epilepsy. *Cerebral Cortex*. 2017;27: 2348–2364. doi:10.1093/cercor/bhw093
123. Nägerl UV, Mody I, Jeub M, Lie AA, Elger CE, Beck H. Surviving Granule Cells of the Sclerotic Human Hippocampus Have Reduced Ca²⁺ Influx Because of a Loss of Calbindin-D 28k in Temporal Lobe Epilepsy. *The Journal of Neuroscience*. 2000;20: 1831–1836. doi:10.1523/JNEUROSCI.20-05-01831.2000
124. le Duigou C, Boullieret V, Miles R. Epileptiform activities in slices of hippocampus from mice after intra-hippocampal injection of kainic acid. *J Physiol*. 2008;586: 4891–4904. doi:10.1113/jphysiol.2008.156281
125. Stegen M, Kirchheim F, Hanuschkin A, Staszewski O, Veh RW, Wolfart J. Adaptive Intrinsic Plasticity in Human Dentate Gyrus Granule Cells during Temporal Lobe Epilepsy. *Cerebral Cortex*. 2012;22: 2087–2101. doi:10.1093/cercor/bhr294
126. Young CC, Stegen M, Bernard R, Müller M, Bischofberger J, Veh RW, et al. Upregulation of inward rectifier K⁺ (Kir2) channels in dentate gyrus granule cells in temporal lobe epilepsy. *J Physiol*. 2009;587: 4213–33. doi:10.1113/jphysiol.2009.170746
127. Stegen M, Young CC, Haas CA, Zentner J, Wolfart J. Increased leak conductance in dentate gyrus granule cells of temporal lobe epilepsy patients with Ammon's horn sclerosis. *Epilepsia*. 2009;50: 646–653. doi:10.1111/j.1528-1167.2009.02025.x
128. Riban V, Boullieret V, Pham-Lê BT, Fritschy J-M, Marescaux C, Depaulis A. Evolution of hippocampal epileptic activity during the development of hippocampal sclerosis in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience*. 2002;112: 101–111. doi:10.1016/S0306-4522(02)00064-7
129. Müller MC, Osswald M, Tinnes S, Häussler U, Jacobi A, Förster E, et al. Exogenous reelin prevents granule cell dispersion in experimental epilepsy. *Exp Neurol*. 2009;216: 390–397. doi:10.1016/j.expneurol.2008.12.029
130. Aguilar-Arredondo A, Zepeda A. Memory retrieval-induced activation of adult-born neurons generated in response to damage to the dentate gyrus. *Brain Struct Funct*. 2018;223: 2859–2877. doi:10.1007/s00429-018-1664-7
131. Wasser CR, Herz J. Reelin: Neurodevelopmental Architect and Homeostatic Regulator of Excitatory Synapses. *Journal of Biological Chemistry*. 2017;292: 1330–1338. doi:10.1074/jbc.R116.766782
132. Pesold C, Impagnatiello F, Pisu MG, Uzunov DP, Costa E, Guidotti A, et al. Reelin is preferentially expressed in neurons synthesizing γ -aminobutyric acid in cortex and

- hippocampus of adult rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998;95: 3221–3226. doi:10.1073/pnas.95.6.3221
133. Campo CG, Sinagra M, Verrier D, Manzoni OJ, Chavis P. Reelin Secreted by GABAergic Neurons Regulates Glutamate Receptor Homeostasis. *PLoS One*. 2009;4: e5505. doi:10.1371/journal.pone.0005505
 134. del Río JA, Heimrich B, Borrell V, Förster E, Drakew A, Alcántara S, et al. A role for Cajal–Retzius cells and reelin in the development of hippocampal connections. *Nature*. 1997;385: 70–74. doi:10.1038/385070a0
 135. Hernández-Ortega K, Ferrera P, Arias C. Sequential expression of cell-cycle regulators and Alzheimer’s disease–related proteins in entorhinal cortex after hippocampal excitotoxic damage. *J Neurosci Res*. 2007;85: 1744–1751. doi:10.1002/jnr.21301
 136. Zepeda A, Aguilar-Arredondo A, Michel G, Ramos-Languren LE, Escobar ML, Arias C. Functional recovery of the dentate gyrus after a focal lesion is accompanied by structural reorganization in the adult rat. *Brain Struct Funct*. 2013;218: 437–453. doi:10.1007/s00429-012-0407-4
 137. Janz P, Hauser P, Heining K, Nestel S, Kirsch M, Egert U, et al. Position- and Time-Dependent Arc Expression Links Neuronal Activity to Synaptic Plasticity During Epileptogenesis. *Front Cell Neurosci*. 2018;12. doi:10.3389/fncel.2018.00244
 138. Figurov A, Pozzo-Miller LD, Olafsson P, Wang T, Lu B. Regulation of synaptic responses to high-frequency stimulation and LTP by neurotrophins in the hippocampus. *Nature*. 1996;381: 706–709. doi:10.1038/381706a0
 139. Messaoudi E, Bårdsen K, Srebro B, Bramham CR. Acute Intrahippocampal Infusion of BDNF Induces Lasting Potentiation of Synaptic Transmission in the Rat Dentate Gyrus. *J Neurophysiol*. 1998;79: 496–499. doi:10.1152/jn.1998.79.1.496
 140. Janz P, Schwaderlapp N, Heining K, Häussler U, Korvink JG, von Elverfeldt D, et al. Early tissue damage and microstructural reorganization predict disease severity in experimental epilepsy. *Elife*. 2017;6. doi:10.7554/eLife.25742
 141. Pathak HR, Weissinger F, Terunuma M, Carlson GC, Hsu F-C, Moss SJ, et al. Disrupted Dentate Granule Cell Chloride Regulation Enhances Synaptic Excitability during Development of Temporal Lobe Epilepsy. *Journal of Neuroscience*. 2007;27: 14012–14022. doi:10.1523/JNEUROSCI.4390-07.2007
 142. Huang EP. Synaptic plasticity: Going through phases with LTP. *Current Biology*. 1998;8: R350–R352. doi:10.1016/S0960-9822(98)70219-2
 143. Nguyen P v., Kandel ER. A Macromolecular Synthesis-Dependent Late Phase of Long-Term Potentiation Requiring cAMP in the Medial Perforant Pathway of Rat Hippocampal Slices. *The Journal of Neuroscience*. 1996;16: 3189–3198. doi:10.1523/JNEUROSCI.16-10-03189.1996

144. Messaoudi E, Ying S-W, Kanhema T, Croll SD, Bramham CR. Brain-Derived Neurotrophic Factor Triggers Transcription-Dependent, Late Phase Long-Term Potentiation *In Vivo*. The Journal of Neuroscience. 2002;22: 7453–7461. doi:10.1523/JNEUROSCI.22-17-07453.2002
145. Saatman KE, Creed J, Raghupathi R. Calpain as a therapeutic target in traumatic brain injury. Neurotherapeutics. 2010;7: 31–42. doi:10.1016/j.nurt.2009.11.002
146. Wang Y, Zhu G, Briz V, Hsu Y-T, Bi X, Baudry M. A molecular brake controls the magnitude of long-term potentiation. Nat Commun. 2014;5: 3051. doi:10.1038/ncomms4051
147. Hubbard JA, Szu JI, Yonan JM, Binder DK. Regulation of astrocyte glutamate transporter-1 (GLT1) and aquaporin-4 (AQP4) expression in a model of epilepsy. Exp Neurol. 2016;283: 85–96. doi:10.1016/j.expneurol.2016.05.003
148. Fernandez AM, Gutekunst C-A, Grogan DP, Pedersen NP, Gross RE. Loss of efferent projections of the hippocampal formation in the mouse intrahippocampal kainic acid model. Epilepsy Res. 2022;180: 106863. doi:10.1016/j.eplepsyres.2022.106863
149. Kwapis JL, Jarome TJ, Lee JL, Helmstetter FJ. The retrosplenial cortex is involved in the formation of memory for context and trace fear conditioning. Neurobiol Learn Mem. 2015;123: 110–116. doi:10.1016/j.nlm.2015.06.007
150. Jiang J, Wang G-Y, Luo W, Xie H, Guan J-S. Mammillary body regulates state-dependent fear by alternating cortical oscillations. Sci Rep. 2018;8: 13471. doi:10.1038/s41598-018-31622-z
151. Yim MY, Hanuschkin A, Wolfart J. Intrinsic rescaling of granule cells restores pattern separation ability of a dentate gyrus network model during epileptic hyperexcitability. Hippocampus. 2015;25: 297–308. doi:10.1002/hipo.22373
152. Hubbard JA, Hsu MS, Fiacco TA, Binder DK. Glial cell changes in epilepsy: Overview of the clinical problem and therapeutic opportunities. Neurochem Int. 2013;63: 638–651. doi:10.1016/j.neuint.2013.01.017
153. Mahmoud S, Gharagozloo M, Simard C, Gris D. Astrocytes Maintain Glutamate Homeostasis in the CNS by Controlling the Balance between Glutamate Uptake and Release. Cells. 2019;8: 184. doi:10.3390/cells8020184
154. Danbolt NC. Glutamate uptake. Prog Neurobiol. 2001;65: 1–105. doi:10.1016/S0301-0082(00)00067-8