

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

INFORME DEL

TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN

**NEURO-PROGENITORES NO RADIALES EN EL GIRO DENTADO DEL  
HIPOCAMPO CONTINÚAN EN DIVISIÓN TRAS DOS MESES DESDE SU  
PRIMERA DIVISIÓN OBSERVADA**

MARÍA INÉS CHAVES RODRÍGUEZ

UNIVERSIDAD DE WISCONSIN-MADISON, ESCUELA DE MEDICINA Y  
SALUD PÚBLICA



CARTAGO, 2011

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

INFORME DEL

TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN

**NEURO-PROGENITORES NO RADIALES EN EL GIRO DENTADO DEL  
HIPOCAMPO CONTINÚAN EN DIVISIÓN TRAS DOS MESES DESDE SU  
PRIMERA DIVISIÓN OBSERVADA**

MARÍA INÉS CHAVES RODRÍGUEZ

UNIVERSIDAD DE WISCONSIN-MADISON, ESCUELA DE MEDICINA Y  
SALUD PÚBLICA

**TEC** | Tecnológico  
de Costa Rica

CARTAGO, 2011



# NEURO-PROGENITORES NO RADIALES EN EL GIRO DENTADO DEL HIPOCAMPO CONTINÚAN EN DIVISIÓN TRAS DOS MESES DESDE SU PRIMERA DIVISIÓN OBSERVADA

María Inés Chaves Rodríguez<sup>1,2</sup>

## Resumen

Todos los días se generan miles de neuronas que son integradas a los circuitos hipocampales en el cerebro adulto, en un proceso llamado neurogénesis. Este proceso ha generado un gran interés entre muchos neurocientíficos lo cual ha llevado al diseño de un modelo que ha sido ampliamente aceptado. Este propone la existencia de neuro-progenitores quiescentes (*QNP*s, por sus siglas en inglés) como la fuente de nuevas neuronas hipocampales. Dichos progenitores se dividen lentamente y presentan características astrocíticas como lo es la expresión de la proteína GFAP. Sin embargo, el considerar solo un modelo para dar explicación a la neurogénesis hipocampal podría llevar a pasar por alto otros procesos que podrían estar involucrados. Administrando inyecciones de dos análogos de timidina, CldU e IdU en diferentes intervalos de tiempo, se logró encontrar evidencia de una población de células que se han dividido al menos dos veces en un lapso de dos meses y que no expresan GFAP. La evidencia de células en división activa por casi dos meses sin expresar GFAP podría explicarse como el resultado de una mitosis continua por parte de una porción de la progenie de las *QNP*s. Por otro lado, podría ser explicado como el resultado de una porción de la progenie que ha dejado el ciclo celular (entran en quiescencia), y son reactivados para entrar de nuevo al proceso de división casi dos meses después de la primera división. Estas posibilidades no excluyen el modelo previamente propuesto que describe los *QNP*s, pero sugiere la posibilidad de que exista heterogeneidad en el acervo de los mismos. Esto abre una puerta para la consideración y subsecuente desarrollo de nuevos enfoques para el estudio de la neurogénesis hipocampal que contribuya al entendimiento más preciso del proceso.

**PALABRAS CLAVE:** neurogénesis adulta, análogos de timidina, inmunohistoquímica, microscopía fluorescencia, GFAP.

<sup>1</sup>INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN. Escuela De Biología, Instituto Tecnológico De Costa Rica. Cartago, Costa Rica, 2011.

<sup>2</sup>[mariaicr.1@gmail.com](mailto:mariaicr.1@gmail.com)

# ACTIVELY DIVIDING NON-RADIAL NEURAL PROGENITORS IN THE DENTATE GYRUS OF THE HIPPOCAMPUS CONTINUE TO DIVIDE TWO MONTHS AFTER THEIR FIRST OBSERVED DIVISION.

María Inés Chaves Rodríguez<sup>1,2</sup>

## Abstract

New neurons are being added to the hippocampal circuitry every day. This process has generated considerable research, leading to the proposal of a model of slowly dividing neural progenitor cells (QNPCs) which express astrocytic characteristics, as the source of new hippocampal neurons. However, considering only one model for explaining hippocampal neurogenesis could lead to overlooking other processes that might be involved. Administering injections of two different thymidine analogs at different time points, we found evidence of a population of cells that undergo at least two divisions separated by almost two months and that do not express GFAP, a marker for astrocytes. The evidence of actively dividing cells for almost two months lacking GFAP expression could be either explained as the result of a continued mitotic process of some of the *QNPCs*' progeny or by a portion of some QNPCs' progeny that leaves the cell cycle and re-enters later, *i.e.*, they become quiescent. This does not exclude the model that has been set previously for the quiescent neural progenitors, but suggest that heterogeneity is likely in the pool of neural progenitors, which opens an opportunity for implementing new approaches to the study of hippocampal neurogenesis.

**KEYWORDS:** adult neurogenesis, thymidine analogues, immunohistochemistry, fluorescence microscopy, GFAP.

<sup>1</sup>GRADUATION FINAL PROJECT REPORT. Escuela De Biología, Instituto Tecnológico De Costa Rica. Cartago, Costa Rica, 2011.

<sup>2</sup>[mariaicr.1@gmail.com](mailto:mariaicr.1@gmail.com)

**NEURO-PROGENITORES NO RADIALES EN EL GIRO DENTADO DEL  
HIPOCAMPO CONTINÚAN EN DIVISIÓN TRAS DOS MESES DESDE SU  
PRIMERA DIVISIÓN OBSERVADA**

Informe presentado a la Escuela de Biología del  
Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial  
para optar al título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología

**Miembros del Tribunal**



**Carolina Centeno Cerdas, M.Sc.**

Profesor Asesor,  
Instituto Tecnológico de Costa Rica



**Ronald E. Kalil, Ph.D.**

Profesor Asesor Externo,  
Universidad Wisconsin-Madison



**Ing. Laura Calvo Castro**

Lectora,  
Instituto Tecnológico de Costa Rica

## **Dedicatoria**

A Dios por iluminar mi razón y darme  
los modelos de persistencia que forjaron  
mi carácter: mi madre y mi abuelita.

A mis padres por el esfuerzo y apoyo  
a lo largo de mi carrera.

*María Inés Chaves*

## **Agradecimientos**

Deseo agradecer a Dios por ser siempre la lámpara que ilumina la toma de decisiones importantes.

Al CONICIT por brindarme el apoyo económico para financiar la pasantía en la que desarrollé el presente trabajo. De igual manera a la Vicerrectoría de Vida Estudiantil por financiar la misma.

Al Dr. Ronald Kalil por brindarme la oportunidad de visitar su laboratorio y ser parte de uno de sus proyectos dando por fruto el presente trabajo. Deseo agradecer su paciencia y su confianza en mi capacidad para desempeñarme y representar en diferentes momentos su laboratorio.

Agradecer a Scott Vermileya y Jenny Dahlberg por su paciencia para guiarme y sus críticas constructivas para con mi trabajo. También por brindarme su amistad y hacer mi estadía amena.

A mis padres por el apoyo económico que me permitió mantenerme enfocada en mi carrera.

A Carolina Centeno y Laura Calvo por sus consejos y su guía no solo en la elaboración de este trabajo, sino en el tiempo que trabajamos juntas.

A mis compañeros del TEC por brindarme su amistad y apoyo, especialmente a Ricardo Alvarado por su apoyo incondicional.

## Índice General

Resumen .....	- 3 -
Abstract.....	- 4 -
Dedicatoria .....	- 6 -
Agradecimientos .....	- 7 -
Índice de Figuras .....	- 9 -
Introducción .....	- 10 -
Revisión de literatura.....	- 12 -
1. El hipocampo.....	- 12 -
1.1 Regiones y circuitos del hipocampo .....	- 12 -
1.2 Papel del hipocampo .....	- 14 -
1.3 Neurogénesis adulta en el hipocampo.....	- 15 -
2. Inmunohistoquímica .....	- 19 -
2.1 Anticuerpos y métodos de detección.....	- 19 -
2.2 Detección de la inmunohistoquímica: Microscopía de fluorescencia .....	- 25 -
Objetivo general .....	- 28 -
Objetivos específicos .....	- 28 -
Materiales y Métodos .....	- 28 -
1. Ubicación del estudio.....	- 28 -
2. Metodología del estudio .....	- 28 -
2.1 Animales.....	- 28 -
2.2 Diseño experimental .....	- 29 -
2.3 Inmunohistoquímica de fluorescencia y cuantificación .....	- 29 -
Resultados .....	- 30 -
1. Sobrevivencia de neuroprogenitores activos en el giro dentado del hipocampo .....	- 30 -
2. Expresión proteica diferencial en poblaciones mitóticamente activas tras dos meses desde la primera división observada .....	- 32 -
Discusión .....	- 34 -
1. Sobrevivencia de neuroprogenitores activos en el giro dentado del hipocampo .....	- 34 -
2. Expresión proteica diferencial en poblaciones mitóticamente activas tras dos meses desde la primera división observada .....	- 34 -
Conclusiones .....	- 37 -
Recomendaciones .....	- 38 -
Referencias.....	- 39 -

## Índice de Figuras

<b>Num.</b>	<b>Título</b>	<b>Pág.</b>
1	Conexiones del circuito hipocampal	-13-
2	Micrografía confocal del giro dentado del hipocampo de rata	-14-
3	Esquema del modelo neurogénico propuesto por Kemperman (2004)	-17-
4	Esquema de dos diferentes métodos de detección en inmunohistoquímica	-21-
5	Esquema de la disposición de anticuerpos en la inmunohistoquímica múltiple	-24-
6	Diagrama del microscopio de epifluorescencia	-26-
7	Diagrama del principio de operación de la microscopía confocal	-27-
8	Cuantificación de células en división en el giro dentado del hipocampo	-32-
9	Micrografías confocales de neuro-progenitores mitóticamente activos	-33-

## Introducción

El hipocampo es una región cerebral cuya actividad está relacionada con el aprendizaje, la memoria espacial y el control de las emociones (Andersen *et al.*, 2007). El giro dentado del hipocampo es una de dos áreas en el cerebro adulto donde ocurre la neurogénesis, la cual ha sido descrita en diferentes especies de mamíferos, incluyendo al ser humano (Brown *et al.*, 2003, Aimone *et al.*, 2006). Los procesos relacionados con la actividad del hipocampo poseen una naturaleza muy diferente con respecto a otras áreas en el cerebro, lo cual se ha asociado con una gran plasticidad del tejido.

El origen de dicha plasticidad constituyó una gran incógnita durante muchos años hasta que en 1965, Altman & Das reportaron por primera vez la presencia de células mitóticas “indiferenciadas” que adicionan nuevas neuronas al giro dentado del hipocampo. Este hecho estableció el inicio de una “carrera” en la investigación por descifrar la naturaleza de dicho proceso, sobre todo por su potencial aplicabilidad en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. Así, el rol que la generación de nuevas neuronas en el hipocampo podría jugar en la funcionalidad de los procesos en dicha estructura ha atraído la atención de muchos científicos en el área de neurociencias, sobre todo por el hecho de que se ha demostrado que cuando la neurogénesis en esta zona se ve interrumpida, el aprendizaje, la memoria y/o el control del ánimo se ven seriamente afectados (Sahay & Hen, 2007; Jessberger *et al.*, 2009; Sahay *et al.*, 2011).

Gracias al desarrollo de estos estudios que sugieren que la pérdida de neuronas en el giro dentado contribuye a una disminución de la funcionalidad hipocámpal, es que se ha incrementado el interés en descifrar los conceptos básicos del proceso neurogénico. Es así que la caracterización del ciclo celular de las neuronas en el giro dentado se ha convertido en un punto de gran interés que permitiría entender de una mejor manera la senda de división que podrían estar siguiendo estas células. Parte de la investigación que se ha desarrollado a este respecto, propone que la longitud de la fase S en estos neuro-progenitores no varía con la edad aunque se ha reportado un número significativamente mayor de estas células en el cerebro joven que en el cerebro envejecido (Olariu *et al.*, 2007).

Para el estudio de la neurogénesis se han propuesto varios modelos con el fin de caracterizar de manera específica la neurogénesis en el giro dentado del hipocampo. Un modelo prominente sugiere que nuevas neuronas surgen de un reservorio de neuro-progenitores quiescentes (*QNP*s por sus siglas en inglés) que expresan GFAP (*Glial Fibrillary Acid Protein*, por sus siglas en inglés), una proteína de los filamentos intermedios que se ha utilizado como un marcador común de astrocitos (células gliales del sistema nervioso central). Dichas células quiescentes se dividen lentamente y dan origen a células con una tasa de

división mayor (*ANPs* del inglés *Amplifying Neural Progenitors*) y que posteriormente se diferencian para dar paso a nuevas neuronas que se integrarán en uno de los circuitos hipocampales (Steiner *et al.*, 2006; Encinas *et al.*, 2011). Por otro lado, también ha sido propuesto que el número de *QNP*s que conforman el reservorio de neuroprogenitores, disminuye con el tiempo a una tasa constante (Hansen & Kalil, 2010), es decir, conforme el individuo envejece este reservorio disminuye.

Es importante también mencionar que solo una pequeña proporción de las células que son generadas a partir de las *QNP*s llegan a madurar y a integrarse en los circuitos hipocampales, lo cual sugiere que muchas de las nuevas neuronas mueren en fases tempranas o de inmadurez neuronal (Olariu *et al.*, 2007; Hansen & Kalil, 2010). El modelo global que se ha ido conformando a través del desarrollo de nuevas investigaciones en este campo, ha sentado una base importante para comenzar a entender el proceso neurogénico en el hipocampo. Sin embargo, el tomar en cuenta solo un modelo para explicar la neurogénesis podría llevar a pasar por alto otros procesos que podrían estar llevándose a cabo en esta región.

Recientemente Encinas *et al.* (2011) reportaron el descubrimiento (en ratones) de que las células en división del hipocampo podrían entrar al menos a dos rondas de división antes de dejar el ciclo celular, así como que las *QNP*s eventualmente se diferencian en astrocitos. Dicha propuesta ha establecido una base para el diseño de un nuevo modelo que explica el camino que estas células podrían seguir. Sin embargo, para nuestro conocimiento no se ha generado un trabajo comparable en ratas. Se ha demostrado que la información generada en una cepa de ratones no puede ser generalizada a otras cepas ni a otras especies de roedores (Kempermann, 2008). Por ende, las ratas son un modelo animal más confiable para estudiar la neurogénesis hipocampal y de esta forma presentar información sobre lo que podría estar sucediendo en el cerebro humano.

En este trabajo se presenta un enfoque sistemático para determinar si las células proliferativas en la zona subgranular del giro dentado se dividen más de una vez y en qué periodos de tiempo. Para esto, se usaron dos análogos de timidina para marcar estas células y determinar si estas se dividieron al menos dos veces en los periodos en estudio. También se marcaron células para identificar GFAP con el fin de determinar si una porción de las células en división son *QNP*s.

## **Revisión de literatura**

### **1. El hipocampo**

El hipocampo es una región del córtex cerebral que se ubica en el lóbulo temporal en ambos hemisferios (Bear *et al*, 2007). Esta estructura, cuyo nombre fue dado debido a su parecido con el caballito de mar, ha sido relacionada con multiplicidad de funciones a través de la historia. En la segunda mitad del siglo XIX y la primera mitad del siglo XX las funciones atribuidas al hipocampo le implicaban con el sentido del olfato, el control de la atención, las emociones y la memoria. En la actualidad, las principales funciones que se le atribuyen a esta estructura son la memoria, el aprendizaje y el control de las emociones (Andersen *et al*, 2007).

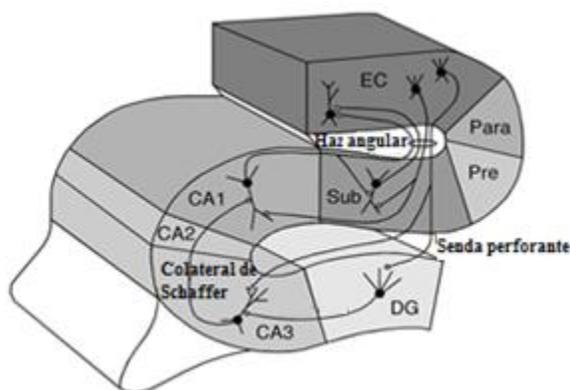
El hipocampo se encuentra formado por varias zonas o regiones celulares, las cuales se correlacionan con diferentes funciones. El particular arreglo celular que presenta esta estructura es una de las características más distintivas del hipocampo. De estos distintivos arreglos celulares se derivan algunas de las propiedades únicas del hipocampo a saber una disposición laminar, conexiones unidireccionales entre series de regiones corticales, sinapsis altamente plásticas y neuronas que crecen en cultivo y pueden ser trasplantadas (Andersen *et al.*, 2007).

El hipocampo es también una de las dos regiones cerebrales en las que se ha descrito la neurogénesis adulta (Altman & Das, 1965). Este proceso hasta hace poco menos de 50 años, no era siquiera considerado como una posibilidad pues se pensaba que todas las neuronas en el sistema nervioso central se formaban durante el desarrollo embrionario. El conjunto de características anteriormente descritas aunado al descubrimiento y exhaustivo análisis en el campo de la neurogénesis en esta región, han contribuido a dar explicación a la gran plasticidad que posee la región hipocampal, única en estructura y funcionalidad.

#### **1.1 Regiones y circuitos del hipocampo**

Como ya se mencionó, el hipocampo se constituye de áreas dispuestas en capas. Anatómicamente el hipocampo se subdivide en las siguientes regiones: el giro dentado, la capa CA1, CA2, CA3, subcúbulo, presubcúbulo, parasubcúbulo y el córtex entornial (Insausti *et al.*, 2010). Estas regiones se diferencian principalmente por la población celular por la que están constituidas, así como por la entrada y salida de conexiones axonales proyectadas hacia y desde ellas. La mayoría de los circuitos que conectan estas regiones son unidireccionales. Así, desde el giro dentado se proyectan axones hacia la capa CA3, la cual a

su vez proyecta axones hacia la capa CA1 formando el colateral de Schaffer. Desde la capa CA1 los axones son proyectados al subcúbulo y al córtex entornial, hacia donde se dirigen de igual manera proyecciones desde el subcúbulo. Por último, desde el córtex entornial se proyectan axones hacia el giro dentado, más específicamente hacia las capas CA3 y CA1 (Andersen *et al*, 2007; Fig. 1). Amaral *et al*. (2007) señalan que dado que las principales conexiones del córtex entornial son dirigidas al giro dentado y que este es una fuente muy importante de mucha de la información sensorial cortical, es razonable considerar al giro dentado como el primer paso para el procesamiento de la información que desemboca en la formación de memorias episódicas, una de las principales funciones atribuidas al hipocampo.

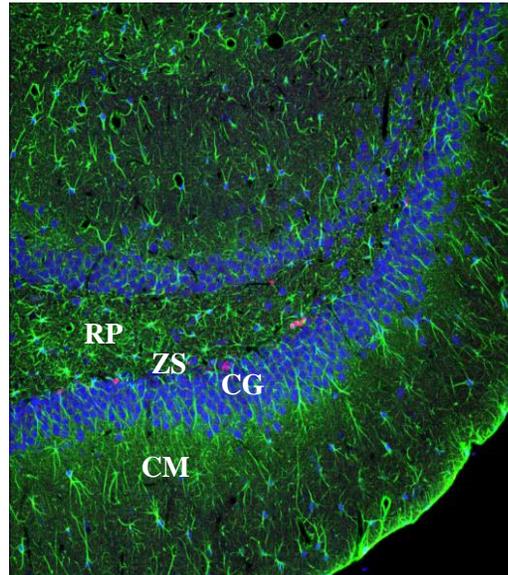


**Fig.1. Conexiones del circuito hipocampal.** Los principales circuitos destacados son el haz angular que se proyecta desde el córtex entornial (EC por sus siglas en inglés) hacia el subcúbulo (Sub) y la capa CA1, la senda perforante que va desde el EC hacia el giro dentado (DG) y la capa CA3 y el colateral de Schaffer que proyecta desde la capa CA3 hasta la CA1. Adaptado de Andersen *et al*, (2007).

El giro dentado por sí mismo es también una de las regiones hipocampales que ha atraído la atención de la comunidad neurocientífica en las últimas décadas. Esto se debe al hecho de que la capa granular (una de las subregiones del giro dentado), más específicamente la zona subgranular, es una de las dos regiones cerebrales donde la neurogénesis adulta ha sido descrita en varias especies de mamíferos, incluyendo al ser humano (Eriksson *et al.*, 1998; Brown *et al.*, 2003, Aimone *et al.*, 2006). Por tanto y debido a la naturaleza del presente trabajo, la atención será enfocada en adelante en el giro dentado del hipocampo.

Esta estructura en forma de “V” o “U”, se encuentra formada por tres capas: la capa granular, la región polimórfica y la capa molecular. La capa granular se caracteriza por poseer células granulares (neuronas) redondeadas y densamente apiladas, entre las cuales rara vez se encuentran células gliales (Amaral *et al.*, 2007). Es aquí donde tiene lugar la neurogénesis hipocampal. Las células en división se encuentran en la zona subgranular, en el límite con la región polimórfica, para posteriormente migrar a una distancia de unos cuantos cuerpos celulares a la capa granular desde donde extienden sus axones hacia la capa CA3 al alcanzar la madurez (Taupin, 2008).

La capa molecular, al contrario de la capa granular no posee gran cantidad de células. Esta se constituye principalmente de las dendritas provenientes de las células granulares y las fibras que conforman la senda perforante desde el córtex entornial (Andersen *et al.*, 2007). La zona polimórfica se encuentra ubicada dentro de la “V” formada por la capa granular y la capa CA3 como se muestra en la figura 2.



**Fig.2. Micrografía confocal del giro dentado del hipocampo de rata.** En azul se muestra la capa granular (CG) densamente poblada. Dentro de la “V” se observa la región polimórfica (RP). Lateral a la CG se observa la capa molecular (CM). 20X. La zona subgranular (ZS) se ubica entre el límite interno de la CG y la RP. Fuente: Chaves & Vermilyea, 2011. (Trabajo no publicado).

## 1.2 Papel del hipocampo

El hipocampo es una estructura muy importante y cuyo principal rol se ha atribuido a la construcción de la memoria episódica y espacial y por ende, los procesos de aprendizaje mediante los cuales estas memorias son procesadas y posteriormente materializadas (Redish, 1999). Estudios que han revelado cambios de comportamiento en modelos animales con el uso de antidepresivos, han sugerido que el hipocampo también podría estar envuelto en el control de algunas emociones como el miedo y el estrés. Así por ejemplo, Liu *et al.* (2011) señalan al hipocampo como uno de los elementos que interacciona con otras estructuras del sistema límbico en respuesta al condicionamiento por miedo, mientras que Erickson *et al* (2010) encontraron que el ejercicio aeróbico contribuye a aumentar el tamaño del hipocampo y mejorar la memoria espacial en sus grupos estudiados. Por su parte Voss *et al* (2011) sugieren un rol del hipocampo en la formación no solo de memorias de larga duración, sino también en el control del

comportamiento en cortos periodos de tiempo. Es importante resaltar que estos estudios fueron llevados a cabo en grupos de seres humanos, lo cual sienta una base experimental fuerte sobre los procesos en los que la actividad hipocampal se ve envuelta.

Las funciones anteriormente descritas no solamente se han atribuido a la actividad de los circuitos hipocampales consolidados *per se*, sino que también se han relacionado con el proceso de neurogénesis adulta que tiene lugar en el giro dentado. La evidencia más importante que ha logrado unir la funcionalidad hipocampal con la neurogénesis es el hecho de que en estudios donde esta es interrumpida, tanto el aprendizaje como la memoria, y/o el control de algunas emociones se ven alterados. Así por ejemplo, Santarelli *et al.* (2003) sugieren que existe una relación de estimulación en la neurogénesis como efecto de la interacción de la fluoexetina (antidepresivo) y las células progenitoras, y que el efecto antidepresivo está correlacionado con esta estimulación.

Otros estudios como el realizado por Snyder *et al.* (2011) señalan el proceso neurogénico como clave en la regulación de circuitos que regulan el estrés. Este estudio concluye que la neurogénesis en el hipocampo actúa como un amortiguador para la respuesta del estrés y la depresión, tanto a nivel hormonal como de comportamiento. Por su parte, Jessberger *et al.* (2009) encontraron que al trabajar con ratones *knock-out* interrumpiendo la neurogénesis, estos presentaron deficiencias en tareas de reconocimiento de objetos y lugares, lo cual sugiere que se ha afectado el circuito involucrado con la memoria espacial. Sahay *et al.* (2011) por otro lado, encontraron que al mejorar la sobrevivencia de las nuevas neuronas, los animales tuvieron un mejor desempeño en tareas de discriminación o separación de patrones. Dicha función según Aimeone *et al.* (2006) constituye el principal rol del giro dentado y por ende, de la neurogénesis dentro del circuito hipocampal.

### **1.3 Neurogénesis adulta en el hipocampo**

Como ya ha sido mencionado, la neurogénesis no es un proceso circunscrito solamente al estadio prenatal, sino que ha sido demostrado en dos zonas del cerebro adulto de diferentes mamíferos incluyendo al ser humano (Eriksson *et al.*, 1998; Brown *et al.*, 2003, Aimone *et al.*, 2006). Desde su primera descripción en 1965 por Altman & Das, se han propuesto diferentes modelos que tratan de explicar la senda por la cual nuevas neuronas son generadas tanto en la zona subventricular como en el giro dentado del hipocampo. En el primer caso, células progenitoras ubicadas en la zona subventricular bordeando los ventrículos laterales, se dividen para formar neuroblastos (células nerviosas inmaduras) que migran hasta el bulbo olfatorio por medio de la llamada corriente migratoria rostral (Zhao *et al.*, 2008). La migración de los neuroblastos se produce gracias a la formación de una cadena migratoria de largos agregados

celulares sostenidos por células gliales llamadas astrocitos. Una vez en el bulbo olfatorio, las células se diferencian en células granulares y neuronas periglomerulares, las cuales son interneuronas que conectan neuronas aferentes y eferentes en esta zona (Zhao *et al.*, 2008).

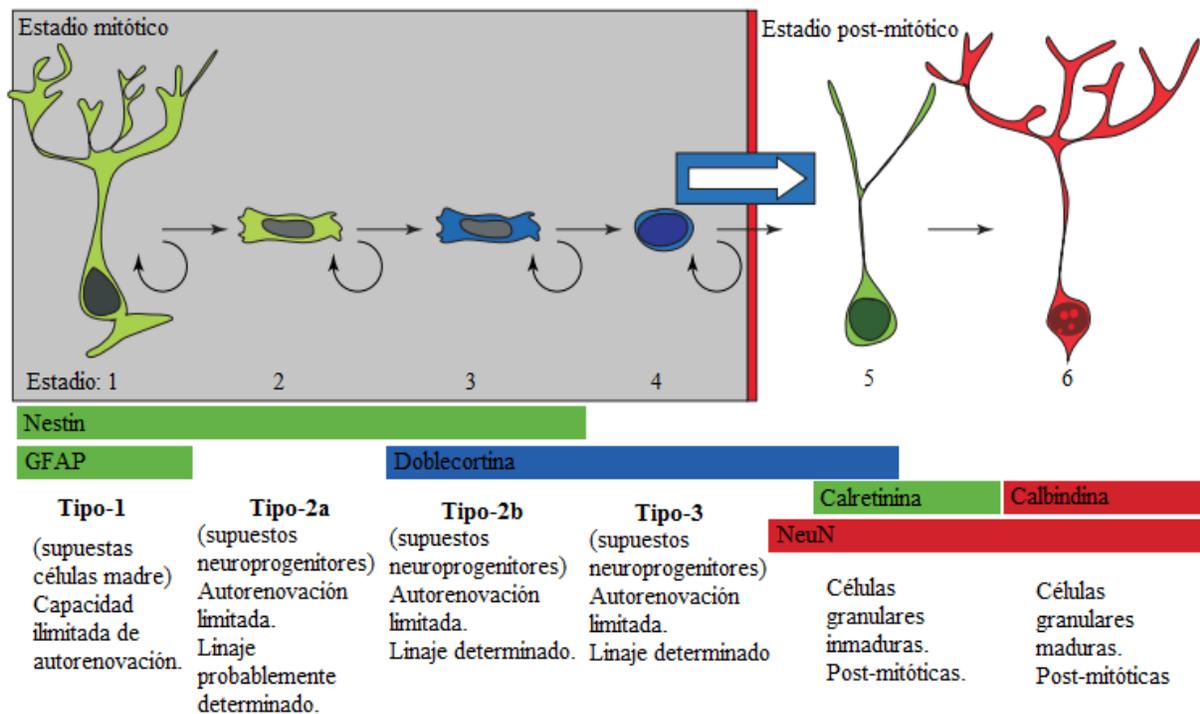
En el caso de la neurogénesis hipocampal, los neuroprogenitores se ubican en la zona subgranular de la capa granular en el giro dentado (Andersen *et al.*, 2007). Tras la división, las células migran cortas distancias hacia la capa granular en donde van madurando al formar dendritas y axones. Estos últimos son extendidos para conectarse con las células piramidales de la capa CA3. Una vez que las conexiones se han establecido y las nuevas células son capaces de generar potenciales de acción, las células habrán completado su proceso de madurez y pasan formalmente a formar parte de los circuitos hipocampales (Shors, 2008).

Se han propuesto modelos más específicos que explican el desarrollo del proceso neurogénico en sí en la zona hipocampal. En los últimos años se ha sugerido un modelo que ha sido ampliamente aceptado como la base de lo que podría estar sucediendo. Dicho modelo hace énfasis en la subdivisión de los diferentes estadios por los cuales los neuroprogenitores pasan para llegar a integrarse en los circuitos hipocampales. El modelo fue propuesto por Kempermann en el 2004. Este sugiere la presencia de un acervo de neuroprogenitores, *i.e.*, células multipotenciales cuyas principales características son la expresión de un largo proceso radial de la proteína GFAP (una proteína de filamento intermedio encontrada también en las células astrogiales del sistema nervioso central) y la quiescencia (son células que se dividen de manera poco frecuente). Estas células han sido llamado células Tipo-1. Una vez que estas entran en el ciclo celular, se dividen de manera asimétrica para dar origen a dos células. Una de ellas posee las mismas características del progenitor y vuelve al reservorio mientras que la otra, entra en una serie de divisiones celulares más rápida y a su vez va cesando la expresión de GFAP. Estas células son conocidas como Tipo-2 (Kempermann, 2004).

En su transición hacia la madurez (diferenciación), estas células pasan por estadios de cambio de expresión génica. Así, las células Tipo-2 se dividen en dos tipos, Tipo-2a y Tipo-2b, las cuales se diferencian por la expresión de un corto proceso de GFAP en las primeras y de la proteína doblecortina, (un marcador de la transición de neuroprogenitores hacia la diferenciación celular) en las segundas (Steiner *et al.*, 2006). Las células que expresan doblecortina poseen las características de neuroblastos migratorios, es decir, en este estadio las células Tipo-2b adquieren la capacidad de migrar desde la zona subgranular hasta la capa granular (Brown *et al.*, 2003). Estas células continúan en división y en el cambio de la expresión génica en los estadios 3 y 4. En el estadio 5 (células Tipo-5) estas células han migrado y dejado el ciclo celular, es decir, son células post-mitóticas. Es aquí cuando se comienzan a establecer las

conexiones axonales que marcan el inicio de la madurez de las nuevas neuronas. En el estadio 6 las células se encuentran totalmente maduras y sobrevivirán para ser parte de los circuitos funcionales del hipocampo (Kempermann, 2004).

En resumen, los estadios de la neurogénesis en el giro dentado pueden ser clasificados en proliferación, diferenciación, migración, establecimiento de conexiones dendríticas y axonales y la integración sináptica (Von Bohlen & Halbach, 2007), todo lo cual contribuye a seleccionar e integrar nuevas neuronas para mantener la funcionalidad en el hipocampo. Es importante resaltar que los estadios anteriormente descritos se diferencian por la expresión de diferentes proteínas o marcadores que a su vez, confieren características específicas a la célula según el estadio en que se encuentre. Un esquema al respecto se muestra en la figura 3.



**Fig. 3. Esquema del modelo de neurogénesis propuesto por Kempermann (2004).** Se indica en barras de colores las diferentes proteínas que se expresan de manera transitoria en cada estadio. Adaptado de Kempermann, (2004).

Más recientemente Encinas *et al* (2011) han propuesto un modelo en el que las células derivadas de los progenitores quiescentes que expresan GFAP, se mantienen en el ciclo celular para diferenciarse en astrocitos. Estas células, que en el modelo de Kempermann se conocen como Tipo-1, en este modelo son

llamadas neuro-progenitores quiescentes (*QNP*s, por sus siglas en inglés) y las células de los tipos 2-4 se conocen como progenitores de rápida amplificación (*ANP*s, por sus siglas en inglés) las cuales posteriormente maduran para convertirse en neuronas integradas a los circuitos. Estos modelos anteriormente analizados son la base sobre la cual se ha diseñado el presente trabajo.

### **1.3.1 Marcadores de proliferación**

El estudio de la neurogénesis adulta ha sido posible gracias a la utilización de proteínas expresadas por los progenitores. Dichas proteínas se han utilizado como marcadores que pueden ser revelados por medio de la técnica de inmunohistoquímica. El uso de proteínas como nestina, Sox2, vimentina, BLBP (*brain lipid-binding protein*, por sus siglas en inglés), GFAP, doblecortina, neuroD-1, NeuN (*Neuronal Nuclei*, por sus siglas en inglés), calretinina, calbindina, entre otras, han proporcionado la oportunidad de caracterizar en parte el ciclo neurogénico (Von Bohlen & Halbach, 2007).

Los modelos de la neurogénesis hipocampal de Kempermann y Encinas previamente mencionados, se basan en la caracterización de los periodos de madurez celular de acuerdo a los diferentes patrones de expresión de estas proteínas. Así por ejemplo, una célula que exprese doblecortina será una célula en transición hacia la madurez que ha dejado el acervo neurogénico, mientras que si la misma célula expresara NeuN y calretinina estaría en un estadio más avanzado y probablemente post-mitótico (Fig.3), según ha sido descrito por Kempermann (2004).

De estas proteínas, GFAP ha sido una base importante para la caracterización de los neuro-progenitores multipotenciales que, según se ha propuesto, mantienen el reservorio celular a lo largo de la vida del individuo (Von Bohlen & Halbach, 2007). GFAP es una proteína de filamento intermedio utilizado ampliamente como marcador de astrocitos, células gliales del sistema nervioso central. Kempermann (2004) describe estas células como células radiales que presentan un amplio proceso apical que se extiende incluso dentro de la capa molecular del giro dentado. Esta característica le diferencia de su progeñie, la cual según el modelo propuesto por el mismo autor, en su fase más temprana expresa un corto proceso de GFAP que desaparece conforme esta célula se divide en su camino hacia la diferenciación. Las células progenitoras con largo proceso apical se caracterizan además por ser quiescentes, es decir, se dividen de manera poco frecuente. En el caso del presente estudio, el marcaje de células progenitoras en división en diferentes intervalos de tiempo, resulta crucial sobre todo en largos intervalos en los cuales se espera ver células en división con presencia del proceso de GFAP.

Existen otros métodos que han sido muy utilizados para dar seguimiento y analizar la dinámica celular de los neuroprogenitores. El empleo de análogos de timidina ha sido un valioso elemento para caracterizar el

proceso de manera cuantitativa. Estos, permitieron la primera descripción de la neurogénesis adulta en el hipocampo de rata en 1965 por Altman & Das. En el análisis de la neurogénesis se ha reportado el uso de análogos de timidina tales como la timina- $6H^3$ -deoxiribosida (timidina- $H^3$ ), bromo-deoxiuridina (BrdU) y más recientemente modificaciones de este, yodo-deoxiuridina (IdU) y cloro-deoxiuridina (CldU) (Altman & Das, 1965; Encinas *et al*, 2011) como marcadores del ciclo celular de las células proliferativas.

Los análogos de timidina son inyectados generalmente por vía intraperitoneal en el caso de los roedores (Von Bohlen & Halbach, 2007). Tras la administración, la sustancia alcanza los sistemas del organismo animal, llegando vía torrente sanguíneo al tejido de interés que, en el caso del presente estudio es el hipocampo. Allí, las células que entren en la fase G del ciclo celular podrán incorporar el análogo de timidina y hacerlo parte del ADN en la duplicación (fase S). Las células entrarán posteriormente en fase M y el análogo de timidina será traspasado a la progenie durante algunas generaciones. Las células que han incorporado el análogo de timidina pueden ser detectadas post-mortem mediante inmunohistoquímica (Taupin, 2008).

## **2. Inmunohistoquímica**

La inmunohistoquímica es una técnica de detección que utiliza anticuerpos asociados a compuestos fluorescentes o complejos enzimáticos, que se unen específicamente a una molécula de interés (antígeno) y que puede ser posteriormente identificada por microscopía (Chemicon, 2011). La técnica se basa en los principios del sistema inmunológico para producir anticuerpos contra sustancia foráneas a las que el organismo responde produciendo anticuerpos que son específicos para la “sustancia invasora” (Jantzie *et al*, 2010). Los antígenos pueden ser proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos y en general, cualquier polímero puede generar una respuesta inmune. Los anticuerpos producidos tendrán afinidad por una porción del antígeno que se conoce como epitopo, lo cual genera una amplia gama de opciones para que los anticuerpos generados puedan asociarse al antígeno (Chemicon, 2011). En inmunohistoquímica, el resultado de este acoplamiento antígeno-anticuerpo depende de diversos factores como el pH, constituyentes del amortiguador, sales presentes, dilución del anticuerpo utilizada y temperatura, ya que como se ha indicado la unión es muy específica y por tanto requiere condiciones particulares en cada caso (Montero, 2003).

### **2.1 Anticuerpos y métodos de detección**

Los anticuerpos utilizados se clasifican en dos categorías dependiendo de la técnica utilizada para su obtención y su homogeneidad: anticuerpos policlonales y monoclonales. Los primeros se obtienen por

medio de la inmunización repetida de animales como el caballo, el burro, la oveja, el ratón y la rata (Chemicon, 2011). Los anticuerpos se obtienen de la sangre de los animales inmunizados y son posteriormente purificados (Kapadia *et al.*, 2003). Cuando se genera una respuesta inmune, miles de células llamadas linfocitos B producen anticuerpos que son específicos contra el antígeno. Sin embargo, cada linfocito producirá un anticuerpo diferente que reconocerá un epitopo diferente del antígeno, por lo que no se tiene homogeneidad. Una ventaja del uso de mezclas policlonales es que esta será menos sensible a pequeños cambios que pudiera presentar el antígeno en el tejido de interés (Chemicon, 2011).

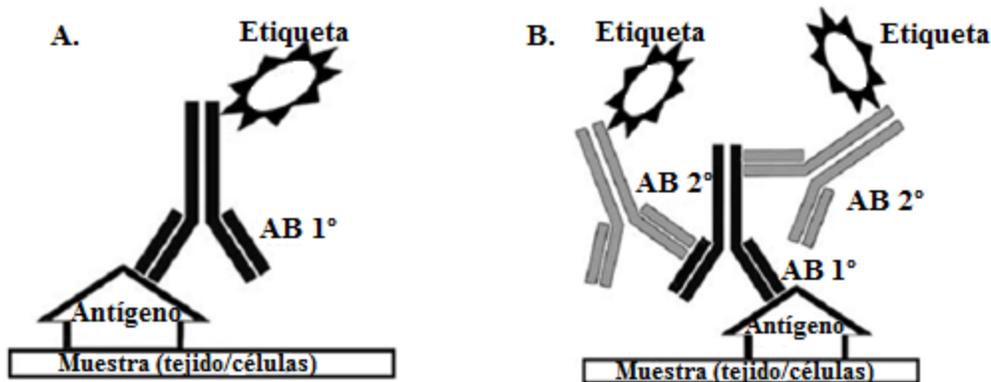
En el caso de los anticuerpos monoclonales, estos provienen del clonaje de anticuerpos por medio de la fusión de linfocitos B con células de cultivos inmortalizados, por lo que se obtiene una mezcla homogénea que será más sensible en la detección del antígeno de interés (Kapadia *et al.*, 2003). Existen sin embargo, otras formas de producir este tipo de anticuerpos entre las que destacan la infección de linfocitos B con el virus de Epstein-Barr, humanización de anticuerpos monoclonales por medios químicos e ingeniería genética (Steinitz, 2009). Contrario al caso de los anticuerpos policlonales, los anticuerpos monoclonales son más sensibles a pequeños cambios sufridos por el antígeno.

Los anticuerpos que se adquieren a nivel comercial están conjugados o asociados a moléculas con las cuales posteriormente será posible “rastrear” los complejos anticuerpo-antígeno. Estas moléculas pueden ser fluorocromos o enzimas que pueden estar asociados a anticuerpos primarios, es decir que están directamente conjugados al antígeno (detección directa); o a anticuerpos secundarios, *i.e.*, anticuerpos que se unen al anticuerpo primario con el fin de amplificar la señal de detección (detección indirecta; Jantzie *et al.*, 2010). Un esquema sobre la disposición de las moléculas en cada uno de los tipos de detección se muestra en la figura 4. La ventaja del uso de anticuerpos secundarios radica en el hecho de que estos reconocen varios epitopos del anticuerpo primario por lo que varios anticuerpos secundarios marcados se asociarán a un solo anticuerpo. Es así como se obtiene el efecto amplificador de la señal que puede llegar a ser incluso tres veces mayor al que se conseguiría utilizando solamente el anticuerpo primario (Palmer *et al.*, 2006). En el presente estudio se utilizó este tipo de marcaje indirecto con el fin de asegurar la detección de los antígenos de interés.

En cuanto a las moléculas asociadas para el marcaje de los anticuerpos, en el caso de los conjugados enzimáticos la enzima se encuentra asociada al anticuerpo. Posteriormente la adición de un sustrato y un cromógeno permitirán la detección por medio de la coloración obtenida por la formación de los complejos. Por otro lado, los fluorocromos son detectados por medio de excitación con haces de luz a diferentes longitudes de onda no visible, los cuales emitirán luz en longitudes de onda visibles que son

detectados por medio de microscopios equipados especialmente para la detección de estas señales (Jantzie *et al*, 2010).

Una de las mayores ventajas de la inmunohistoquímica es el hecho de poder realizar hasta 3 detecciones en una sesión, en lo que se conoce como inmunohistoquímica múltiple. Esta requiere de más tiempo e incluso más atención por parte del investigador con el fin de evitar confundir los anticuerpos que utilizará. Es importante que cada anticuerpo utilizado para detectar un antígeno específico provenga de una especie diferente (por ejemplo burro, ratón, rata, oveja, etc.), esto con el fin de evitar reacciones cruzadas que podrían intervenir con el análisis (Jantzie *et al*, 2010; Palmer *et al.*, 2006). La inmunohistoquímica múltiple es de gran interés para el presente trabajo por cuanto se pretende la detección de ácidos nucleicos y proteínas en una misma célula, con el fin de caracterizar la dinámica del ciclo celular de los neuroprogenitores.



**Fig.4. Esquema de dos diferentes métodos de detección en inmunohistoquímica.** A. Detección directa del antígeno por marcaje del anticuerpo primario. B. Detección indirecta del antígeno por marcaje de anticuerpos secundarios. Este método permite la amplificación de la señal de detección. AB: anticuerpo. Adaptado de Buchwalow & Bocker, (2010).

Uno de los mayores problemas que se presentan con la inmunohistoquímica en general es la baja detección de la fluorescencia. Una solución que se ha desarrollado para amplificar aún más dicha señal es el uso de anticuerpos biotinilados. La biotina es una vitamina que se encuentra en todas las células y que tiene la particular característica de tener una gran afinidad con dos moléculas: la avidina y la estreptavidina (Holmberg *et al.*, 2005). La avidina es una proteína extraída de huevos de gallina mientras que la estreptavidina constituye su análogo extraído de la actinobacteria *Streptomyces avidinii* (Key, 2009). Ambas poseen cuatro sitios de unión a la biotina. El complejo formado posee una constante de afinidad muy alta, especialmente el complejo estreptavidina-biotina el cual es considerado como el

complejo biológico no covalente más fuerte de la naturaleza, con una constante de disociación ( $K_d$ ) de  $4 \times 10^{14} \text{M}$  (Holmberg *et al.*, 2005). Debido a la mayor constante de afinidad que presenta la estreptavidina con respecto a la avidina y al hecho de que esta última es propensa a unirse de manera no específica a moléculas de tejido cargadas negativamente a pH fisiológico, en inmunohistoquímica se prefiere el uso de la estreptavidina (Keys, 2009).

La aplicación que se ha desarrollado en inmunohistoquímica con estas moléculas para amplificar la señal de detección de los anticuerpos comprende la asociación de anticuerpos secundarios con moléculas de biotina. Posteriormente se adiciona un reactivo que contiene moléculas de estreptavidina asociadas a un fluorocromo. Varias moléculas de estreptavidina se unirán a un solo anticuerpo produciendo el efecto amplificador (Keys, 2009). En este estudio se utilizó este principio para amplificar la señal del fluorocromo *DyLight* burro anti-conejo 488.

### **2.1.1 Inmunohistoquímica indirecta**

La inmunohistoquímica es una técnica muy útil que ha permitido el desarrollo y descubrimiento de una amplia gama de procesos en diferentes ámbitos de la ciencia. Esta técnica, como se ha mencionado anteriormente, puede ser utilizada diferencialmente bajo dos metodologías: inmunohistoquímica directa e indirecta. Dicha clasificación se basa en la detección del antígeno asociada a anticuerpos primarios o secundarios respectivamente (Jantzie *et al.*, 2010). Para interés del presente estudio, la inmunohistoquímica indirecta ha sido la técnica base que ha permitido dilucidar diferentes procesos que envuelven la neurogénesis adulta, incluyendo la existencia de la neurogénesis en sí (Altman & Das, 1965; Eriksson, 1998; Kempermann, 2004; Hansen & Kalil, 2010; Encinas *et al.*, 2011.).

Si bien esta técnica requiere relativamente poco equipamiento (pues solo se necesita un microscopio especializado para poder analizar las muestras procesadas), es una técnica financieramente costosa. Los anticuerpos son reactivos con un costo relativamente alto, así como lo es el microscopio de detección, especialmente si se utilizan modelos más sofisticados como el microscopio confocal. Otro factor importante que debe tomarse en cuenta para el uso de esta técnica es la estandarización. La detección de los anticuerpos es un paso crucial debido a que factores externos como la luz ambiental y el tejido en análisis en sí, pueden generar falsas señales que pueden sesgar el análisis. Por esta razón es importante estandarizar para cada caso particular, cada una de las etapas que comprenden la técnica (Jantzie *et al.*, 2010). A este respecto, el conocimiento preciso de dichas etapas permite la corrección de parámetros

como la concentración, tiempos de incubación y procedimientos secundarios que son específicos en cada caso como por ejemplo, el uso de ácidos para la desnaturalización del polímero de interés.

Uno de los primeros y más recurrentes pasos a lo largo del procedimiento son los lavados. Estos permiten remover remanentes de la sustancia utilizada en el paso anterior que podrían eventualmente afectar las etapas sucesivas del procedimiento. En general para los lavados se utilizan detergentes como el Tween-20 o Tritón-X disueltos en una solución salina como PBS (del inglés *Phosphate Buffered Saline*) o TBS (del inglés *Tris-Buffered Saline*), con lo cual se mantiene la osmolaridad y se evita dañar el tejido (Miller, 2001). El uso de detergentes contribuye a reducir la tensión superficial y a mantener las muestras húmedas por más tiempo (Buchwalow & Bocker, 2010). Posteriormente, dependiendo de la ubicación del antígeno, puede añadirse un paso de permeabilización de la membrana celular. De nuevo la utilización de un detergente funge como el agente activo en esta etapa.

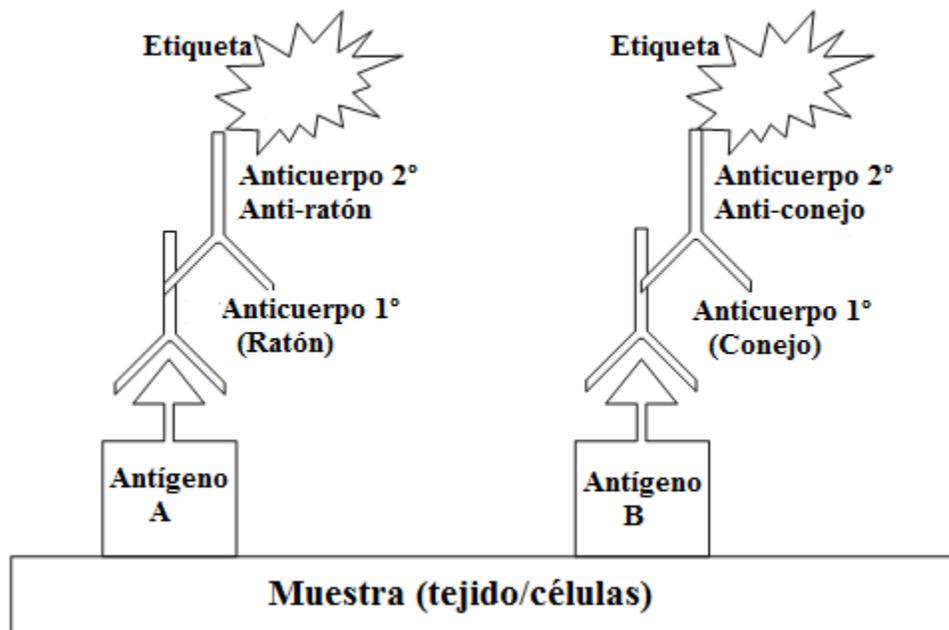
Un paso muy importante en el desarrollo de la técnica es el bloqueo. El objetivo de este paso es precisamente bloquear posibles sitios de unión de los anticuerpos secundarios que se encuentren en el tejido y que son diferentes al antígeno de interés, es decir, sitios de unión inespecífica que podrían causar ruido de fondo (Jantzie *et al*, 2010). Entre las sustancias que se utilizan generalmente se encuentran reactivos tan específicos como el suero del animal en el cual fueron producidos los anticuerpos secundarios, o tan generales como la leche descremada en polvo (Miller, 2001).

Posterior al bloqueo se procede con la incubación de la muestra con los anticuerpos primarios sin embargo, en este punto esto dependerá de la ubicación del antígeno en la célula. En casos en los que es necesario un pre-tratamiento para exponer el antígeno (etapa conocida como recuperación antigénica) se utilizan técnicas de desnaturalización como el uso de ácidos, ultrasonido y principalmente calor que permiten reducir el umbral de detección en las muestras al exponer los epitopos del antígeno para su unión con los anticuerpos (Miller, 2001; Shi *et al*.2001). Sin embargo, se presentan de igual forma casos en los que la recuperación antigénica en este punto no es necesaria, por lo que la incubación en la solución de los anticuerpos primarios es la etapa consecuente al bloqueo.

En la etapa de incubación en el anticuerpo primario es crucial ser muy cuidadoso con el uso de anticuerpos de diferentes especies. Buchwalow & Bocker (2010) señalan la importancia de utilizar anticuerpos producidos en una especie diferente a la muestra. Esto permite evitar la unión de los anticuerpos a sitios de unión inespecífica cuyo resultado es un aumento en el ruido de fondo. Se debe tener en cuenta que los anticuerpos secundarios se unirán a los sitios de los anticuerpos primarios contra los que fueron producidos. Una ilustración sobre la disposición de los anticuerpos en el empleo de inmunohistoquímica múltiple se muestra en la figura 5.

Precisamente la incubación con anticuerpos secundarios es el paso a seguir para culminar con el montaje de la muestra. La escogencia de los fluorocromos conjugados al anticuerpo secundario debe basarse en la separación de los espectros de emisión y absorción de los mismos. El uso de fluorocromos cuyo rango de absorción se encuentre en longitudes de onda más amplias como el caso del rojo e infrarrojo, permite evitar la auto-fluorescencia en la muestra, dado que esta generalmente se presenta en longitudes de onda más cortas (Buchwalow & Bocker, 2010). Por último, es importante tomar en cuenta que una vez que se ha incubado la muestra en anticuerpos marcados con fluorocromo esta debe protegerse de la exposición a la luz para evitar la excitación y desvanecimiento progresivo de la fluorescencia.

El paso final del montaje dependerá de la manera en que se trabajó la muestra (secciones flotantes o muestras fijas en portaobjetos), pero en general comprende cubrir el tejido con un medio de montaje que no interfiera con la excitación de la muestra en la etapa de análisis y la proteja de daños físicos, y la cobertura con cubreobjetos (Buchwalow & Bocker, 2010). El análisis por microscopía de fluorescencia se analizará en la próxima sección.



**Fig.5. Esquema de la disposición de anticuerpos en la inmunohistoquímica múltiple.** En este caso los anticuerpos correspondientes a antígenos diferentes provienen de especies diferentes con el fin de evitar una reacción cruzada en la unión de los anticuerpos secundarios. Adaptado de Buchwalow & Bocker, (2010).

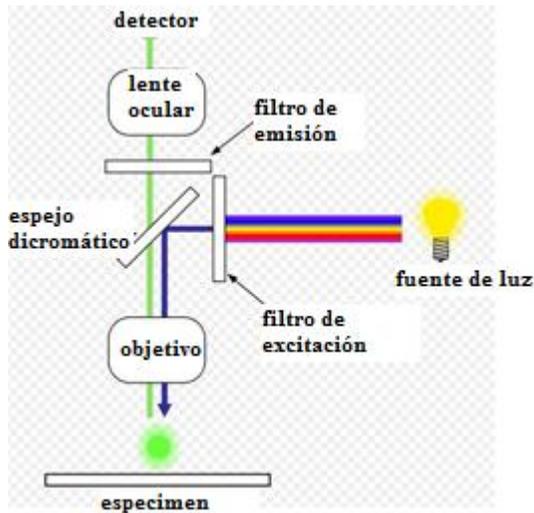
## **2.2 Detección de la inmunohistoquímica: Microscopía de fluorescencia**

Cuando se utilizan fluorocromos como marcadores de anticuerpos en inmunohistoquímica, la microscopía de fluorescencia es la técnica que permite visualizar los resultados de este tipo de experimentos. En el presente trabajo se utilizaron dos enfoques para la detección de las células de interés: la microscopía de epifluorescencia y la microscopía confocal.

### **2.2.1 Microscopía de epifluorescencia**

La fluorescencia fue descrita por primera vez por el científico George G. Stokes tras observar que el material fluorita emitía luz roja cuando era excitado con luz ultravioleta (Spring & Davidson, 2011). Stokes observó que la luz emitida correspondía con una mayor longitud de onda que la del haz con el que el material o sustancia era excitado, describiendo así el principio de la fluorescencia. Las moléculas que son capaces de emitir fluorescencia se conocen como fluorocromos (Lichtman & Conchello, 2005). Estas sustancias poseen un estado basal en el cual, los electrones de su capa electrónica no absorben ni emiten energía. Cuando un haz de luz incidente es lo suficientemente energético para excitar los electrones, estos absorben la energía lo cual los mueve a capas superiores. Eventualmente, el electrón excitado regresará a su estado basal liberando energía que es observada en forma de fluorescencia (Spring & Davidson, 2011).

La técnica de microscopía epifluorescente se basa en la excitación de una muestra que ha sido pretratada con fluorocromos por parte de una fuente de luz que suele ser una lámpara de mercurio. Dicha luz pasa a través de un filtro que dejará pasar solamente la longitud de onda de interés, mientras que otro filtro en el lente ocular, deja pasar solamente la luz emitida, *i.e.*, la fluorescencia, sin permitir el paso de la longitud de onda de excitación (Redei, 2008; Fig.6). En un microscopio correctamente configurado, el objeto fluorescente puede ser observado sobre un fondo muy oscuro, idealmente negro (Spring & Davidson, 2011). En el presente estudio esta técnica fue utilizada para realizar los conteos de las células que incorporaron CldU e IdU.



**Fig.6. Diagrama del microscopio de epifluorescencia.** Adaptado de:

[http://cse.lmu.edu/resources/MANE\\_Labs/Instruments/Epi-fluorescence\\_Microscope\\_EFM\\_.htm](http://cse.lmu.edu/resources/MANE_Labs/Instruments/Epi-fluorescence_Microscope_EFM_.htm).

### 2.2.2 Microscopía confocal

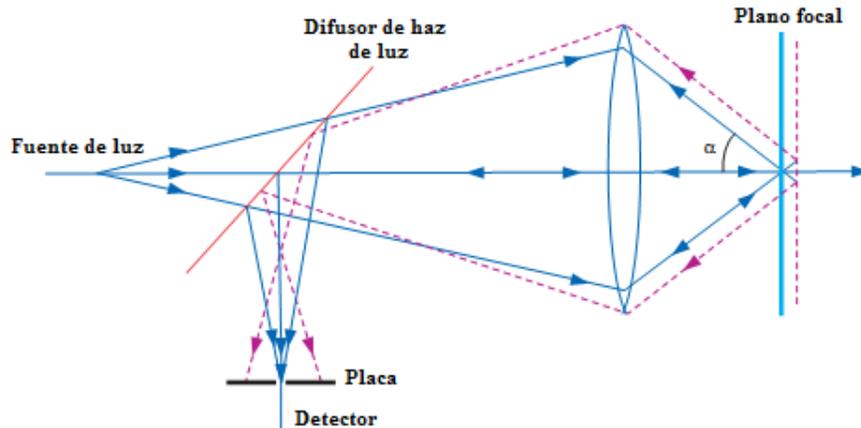
La microscopía confocal ha sido una de las principales herramientas de las que la investigación biológica se ha servido desde 1987 con la introducción del primer microscopio confocal de escaneo láser (Paddock, 2008). Este dispositivo fue primero diseñado y patentado en 1957 por Marvin Minsky, pero no fue sino hasta los 70's cuando se construyeron los primeros modelos prácticos (Cox, 2002), y los 80's cuando la inmunofluorescencia y la distribución de marcadores fluorescentes acoplados a anticuerpos y proteínas extendieron su popularidad. Hasta ese momento sin embargo, las imágenes obtenidas se presentaban en escala de grises en las publicaciones (Paddock, 2008).

El principio en el que se basa la microscopía confocal se encuentra bien establecido. Cox (2002) lo describe de la siguiente forma:

*“Una fuente de luz (típicamente un láser) es enfocada a un punto de difracción limitado en el espécimen por medio de los lentes objetivos. La luz reflejada o la fluorescencia emitida, es enfocada por los mismos lentes hacia un punto en el detector. En este punto, una placa es colocada para que el único punto de enfoque pase al detector. La luz proveniente de planos fuera de enfoque, no forma parte del punto de enfoque por lo que son bloqueados por la placa. Mediante el escaneo de planos sucesivos, se crea una imagen tridimensional de la muestra.”*

Un diagrama del principio descrito por Cox se muestra en la figura 7. Una de las ventajas que ofrece la microscopía confocal es su multi-dimensionalidad. Esto incluye la capacidad de grabar imágenes en los

planos X, Y y Z, lo cual permite la resolución de objetos en 3 dimensiones en canales múltiples. Las series obtenidas se conocen como series Z (Paddock, 2008). Para el presente trabajo, dichas series resultan de gran utilidad para dilucidar la expresión de GFAP en células individuales.



**Fig. 7. Diagrama del principio de operación de la microscopía confocal.** Adaptado de Cox (2002).

Uno de los principales problemas que se presentan con la microscopía de fluorescencia en general es el fenómeno conocido como “*photobleaching*”. Este fenómeno se produce por el paulatino desvanecimiento irreversible de la fluorescencia emitida por la muestra durante el análisis, el cual entre otras cosas envuelve la modificación fotoquímica del fluorocromo (Diaspro *et al.*, 2006). Otro importante problema que suele ser frecuente es la auto-fluorescencia. Esta se presenta en muestras celulares y de tejido donde el citoplasma puede generar “*background*” o ruido de fondo. Una de sus principales causas es la asociación de anticuerpos primarios y secundarios a proteínas que no son las de interés, dificultando la detección de los fluorocromos sin embargo, se puede presentar el caso de tejidos que al ser excitados por el haz de luz presentan una fluorescencia endógena debido a la presencia de moléculas que producen fluorescencia en esa longitud de onda (Jantzie *et al.*, 2010). El uso de diluciones apropiadas de los anticuerpos, tiempos de incubación, evitar la exposición de la muestra tratada a la luz natural y la sobre-exposición de la muestra al láser contribuyen a prevenir y en dado caso corregir situaciones en las que el “*photobleaching*” y el “*background*” se presenten. El ruido de fondo puede ser parcialmente corregido con el uso de softwares especiales como el programa que controla las funciones del microscopio desde la computadora (Chemicon, 2011).

## Objetivo general

Determinar si las células neuro-progenitoras en la zona subgranular del giro dentado del hipocampo se dividen más de una vez en los diferentes intervalos de tiempo evaluados.

## Objetivos específicos

- Analizar el proceso neurogénico a nivel hipocampal mediante doble tinción inmunohistoquímica con los análogos de timidina IdU y CldU.
- Evaluar el proceso de división neuronal mediante la cuantificación del número de células CldU<sup>+</sup>/IdU<sup>+</sup> (co-localización), así como células CldU<sup>+</sup>/IdU<sup>-</sup> y CldU<sup>-</sup>/IdU<sup>+</sup> en la zona subgranular del giro dentado.
- Determinar la presencia de potenciales neuro-progenitores quiescentes en división por medio de co-localización de células en división (CldU/IdU) con expresión de GFAP.

## Materiales y Métodos

### 1. Ubicación del estudio

Este trabajo se desarrolló en el laboratorio del doctor Ronald E. Kalil, *Ph.D.* del Departamento de Oftalmología y Ciencias Visuales de la Universidad de Wisconsin-Madison, Estados Unidos. Los análisis confocales se realizaron en el Laboratorio W.M. Keck para Imágenes Biológicas de la misma institución.

### 2. Metodología del estudio

#### 2.1 Animales

Los experimentos se llevaron a cabo utilizando 3 grupos (n=2 por grupo) de ratas Sprague-Dawley macho, normales, de 8 semanas de edad. Los animales se mantuvieron en pares en cajas y bajo condiciones controladas de luz (12 horas luz/oscuridad) y acceso a comida y agua *ad libitum*. El uso de estos animales se realizó de acuerdo con protocolos aprobados por el Comité de Cuidado y Uso Animal de la Universidad de Wisconsin-Madison.

## **2.2 Diseño experimental**

Los análogos de timidina 5'-cloro-2'-deoxiuridina (CldU, 43mg/kg, MP Biomedicals) y 5-yodo-2'-deoxiuridina (IdU, 58mg/kg, MP Biomedicals) fueron inyectados por vía intraperitoneal. Inicialmente todas las ratas recibieron 3 inyecciones de CldU cada cuatro horas y fueron trasladadas de nuevo a las condiciones de alojamiento hasta la aplicación de las inyecciones de IdU. Posteriormente los grupos recibieron 3 inyecciones de IdU en intervalos de cuatro horas a los 3, 21, 28 y 56 días respectivamente tras la inyección de CldU. Los animales fueron sacrificados 12 horas después de la última inyección de IdU.

Todos los animales fueron anestesiados profundamente con una inyección intramuscular de ketamina (70mg/kg)/xilazina (7mg/kg) y perfundidos intracardialmente con solución fisiológica, seguida por 4% paraformaldehído en amortiguador de sales de fosfato (PBS, por sus siglas en inglés). Posteriormente, el cerebro fue removido y almacenado en una solución de 4% paraformaldehído hasta ser seccionado. Los cerebros fueron seccionados en el plano coronal a 40µm de grosor con un micrótopo con navaja en vibración. Las secciones fueron recolectadas en platos multi-pozos con 0.1M PBS/0.05% solución de azida de sodio y mantenidos a una temperatura de 4°C hasta que fueron procesadas.

## **2.3 Inmunohistoquímica de fluorescencia y cuantificación**

Se procesó cada sexta sección a través del hipocampo para realizar inmunohistoquímica de fluorescencia y así revelar las células que incorporaron el CldU y/o IdU. Las secciones flotantes fueron lavadas tres veces con 0.1M PBS/ 0.05% Tween20 después de cada paso descrito. Todos los experimentos fueron conducidos a temperatura ambiente y en agitación a menos que se indique lo contrario.

El tejido fue permeabilizado con 0.3% Tritón-X/0.1M PBS e incubado 60 minutos en solución de bloqueo de suero de burro al 5% (Jackson ImmunoResearch). Posteriormente las secciones fueron incubadas 60 minutos en una solución 2N HCl/0.1M PBS para desnaturalizar las moléculas de ADN y así exponer los análogos de timidina. Esto fue seguido por una neutralización con una solución 0.1M borato de sodio. Las secciones fueron incubadas en una solución 1:500 de anticuerpo policlonal de oveja anti-BrdU (Maine Biotech para CldU) y 1:500 de anticuerpo policlonal de ratón anti-BrdU (Becton/Dickenson para IdU) disueltos en PBS. Esto se incubó a 4 °C durante la noche. Al día siguiente las secciones fueron incubadas por dos horas en una solución con los anticuerpos secundarios respectivos, 1:500 *DyLight* 488 burro anti-ratón (Jackson Immunoresearch) y 1:500 *DyLight* 549 burro anti-oveja (Jackson Immunoresearch). De estos fluorocromos el 488 absorbe energía en longitudes de onda correspondientes al rango del azul en el espectro visible, mientras que emite fluorescencia en el rango del verde; el 549 por su parte absorbe en el

rango del verde y emite en el rojo. Por último, las secciones fueron montadas en portaobjetos y cubiertas con glicerol y un cubreobjetos para su posterior análisis.

Además de realizar inmunohistoquímica para CldU e IdU, se llevó a cabo una tinción adicional para GFAP para distinguir entre astrocitos maduros y posibles *QNP*s que expresen esta proteína. Estas secciones se incubaron en solución 1:250 anticuerpo primario de conejo anti-GFAP (Promega) durante la noche a 4 °C. Posteriormente fueron incubadas en una solución 1:250 anticuerpo secundario biotinilado burro anti-conejo (Jackson ImmunoResearch) por 2 horas y finalmente incubadas en solución 1:500 *DyLight* 488 estreptavidina por 2 horas para visualizar los anticuerpos biotinilados. Después de lavar las secciones, fueron procesadas para realizar inmunohistoquímica para CldU/IdU, utilizando como fluorocromo *DyLight* 405 para marcar el IdU. Este fluorocromo absorbe energía en el ámbito cercano a la luz ultravioleta y emite fluorescencia en el rango del azul.

La cuantificación de los núcleos CldU<sup>+</sup> e IdU<sup>+</sup>, fue llevada a cabo en el hemisferio izquierdo del cerebro, limitados a la zona subgranular del hipocampo utilizando un microscopio epifluorescente Nikon. El número total células marcadas contado por sección se multiplicó por dos para reflejar el número de células en ambos hemisferios y luego por seis para obtener el número total de células en el hipocampo. Además se determinó el porcentaje de células que mostraron co-localización para CldU e IdU. Todas las imágenes fluorescentes, incluyendo las células GFAP<sup>+</sup> y GFAP<sup>-</sup>, fueron capturadas con un microscopio confocal Nikon A1R.

## Resultados

### 1. Sobrevivencia de neuroprogenitores activos en el giro dentado del hipocampo

Se contó cada sexta sección a través del hipocampo en el hemisferio izquierdo en ratas inyectadas con CldU e IdU en intervalos de 3, 21, 28 y 56 días entre inyecciones. En el día 3 se encontró el mayor número de células CldU<sup>+</sup>. McDonald & Wojtowicz (2005) sugieren que tras una semana, la producción de células se ve marcada por un declive debido probablemente a un periodo de transición crítico en el que un gran número de células inmaduras son eliminadas. Las células que sobreviven tienen una mayor posibilidad de madurar e incorporarse a los circuitos del hipocampo.

Con respecto a la misma población celular en el día 21 se encontró una disminución del 26.9%, seguida por un incremento del 12.7% a los 28 días y un nuevo declive de 10.9% a los 56 días. A pesar de que en este estudio no fue posible realizar un análisis estadístico debido a que la población en estudio no era

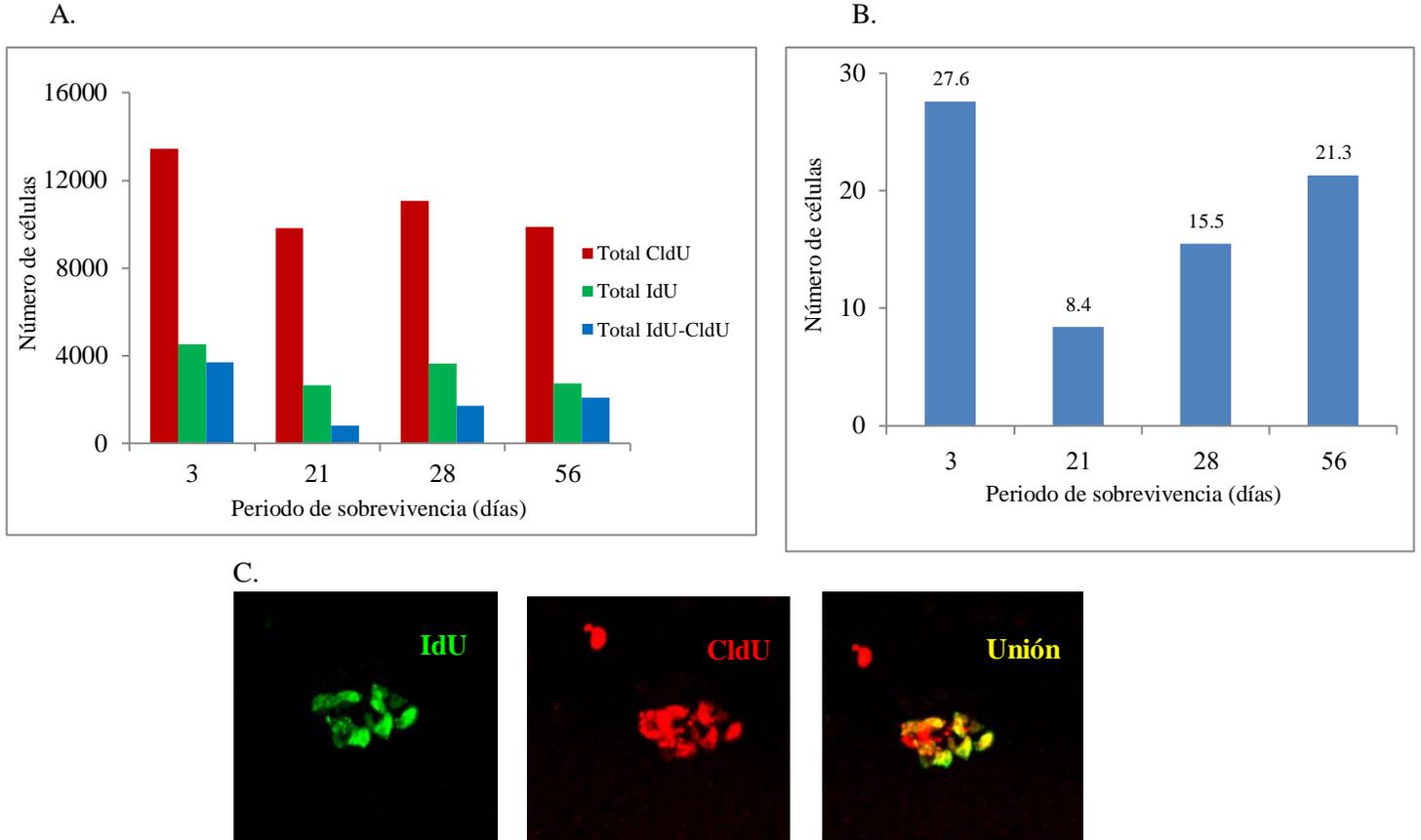
significativa en este punto, es posible que el número de células entre los días 21 y 56 no sea significativamente diferente. Es importante recalcar que para el grupo de estudio del día 56 se analizó solamente la muestra proveniente de un individuo. El otro individuo murió en la aplicación de la anestesia. Esta siempre representa un riesgo para el animal pues el umbral entre una sobredosis y la dosis correcta suele ser poco significativo. Una pérdida como esta podría evitarse aplicando la inyección del reactivo de interés, en este caso el análogo de timidina, sin anestesiarse al animal. En el presente estudio sin embargo, la aplicación de la anestesia fue llevada a cabo a fin de evitar que el animal estuviera sometido a estrés dado que este puede afectar el proceso neurogénico.

En el caso de la población de células IdU<sup>+</sup> se encontró que del día 3 al 21 hubo una disminución del 41.5%. Posteriormente, se presentó un incremento del 38.0% al día 28 para decaer nuevamente a un 25.2% al día 56 (Fig.8.A). Sin embargo, de nuevo la falta de un análisis estadístico previene establecer alguna afirmación. No obstante, se espera que la población de estas células en todos los intervalos sea aproximadamente constante, dado que en todos los casos el tiempo para dividirse e incorporar el IdU fue el mismo. En todos los intervalos se encontró que las mayoría de las células IdU<sup>+</sup> estaban dispuestas en pares o grupos de 3 o más células, especialmente en el día 3 (Fig. 8.C). Esta observación sugiere un ciclo reciente de división, el cual Hansen & Kalil (2010) han definido como una posibilidad originada por ciclos de división de los ANPs. En el caso de las células CldU<sup>+</sup>, se encontró un gran número de células individuales, lo cual es debido posiblemente al hecho de que al madurar algunas células migran a diferentes áreas del estrato celular granular del giro dentado (McDonald & Wojtowicz, 2005).

De igual manera se cuantificaron las células CldU<sup>+</sup>/IdU<sup>+</sup>, las cuales se encontraron en todos los intervalos. Esta población está constituida por células que entraron a la fase S del ciclo celular al menos por una segunda vez entre 3 y 56 días tras su primera división observada. El número de células co-localizadas presentó un decrecimiento del 18.1% del día 3 al día 21. Al día 28 hubo un incremento del 108% con respecto al día 21, mientras que al día 56 hubo un crecimiento de 22.4% (Fig.8.B).

Un inconveniente presentado al inicio del experimento fue la presencia de ruido de fondo que interfirió con la detección de IdU. Por un lado se determinó una baja intensidad de la fluorescencia emitida por el análogo de timidina; por otro lado se presentó auto-fluorescencia por parte del tejido impidiendo diferenciar los núcleos marcados con otros núcleos ubicados cerca de la zona de interés. La sobreexposición del tejido a la luz ambiental y la radiación del microscopio contribuyen a acentuar el problema (Jantzie *et al*, 2010). Esto se previno en los siguientes análisis evitando tal exposición. Una alternativa viable para evitar este problema es el uso del microscopio confocal que permite una excitación

precisa del fluorocromo. En nuestro caso no se hizo uso de este equipo debido a la falta de un lente objetivo (40X) que permitiera el conteo de manera eficaz.



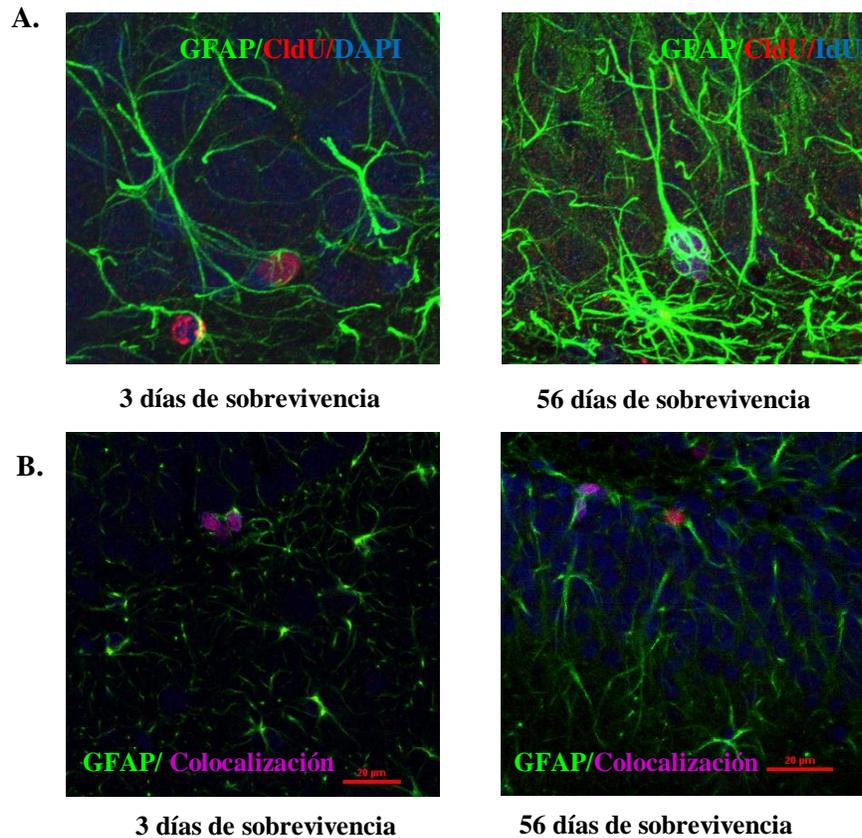
**Fig.8. Cuantificación de células en división en el giro dentado del hipocampo.** **A.** Cuantificación global. Se presenta una marcada disminución tras 3 días de sobrevivencia lo cual se debe probablemente a una eliminación de la población celular recién generada en su transición a la madurez. **B.** Porcentaje de células CldU<sup>+</sup>/IdU<sup>+</sup>. La presencia de células CldU<sup>+</sup> co-localizadas a los 56 días tras la primera inyección de CldU sugiere la presencia de ANPs. **C.** Imagen confocal de un clúster de células a los 3 días de sobrevivencia mostrando co-localización (20X).

## 2. Expresión proteica diferencial en poblaciones mitóticamente activas tras dos meses desde la primera división observada

Tras 3 días de sobrevivencia se encontró co-localización para CldU/IdU y GFAP. Esto sugiere la presencia de neuro-progenitores quiescentes (Fig. 9.A). Este patrón de tinción también fue encontrado a los 56 días de sobrevivencia. Esto sin embargo, no es algo inesperado por el contrario, se preveía una tasa de división muy lenta por parte de estos progenitores. Por otro lado, sorpresivamente se encontró otra

población de neuro-progenitores co-localizados a los 56 días. Estas células no expresan GFAP como las ya descritas *QNP*s, por lo que para nuestro conocimiento este constituye el primer reporte de una población neurogénica con estas características (Steiner *et al.*, 2006; Zhao, 2008; Encinas *et al.*, 2011) (Fig 9.B).

Cabe destacar que en el análisis de las imágenes obtenidas en el microscopio confocal, la detección del anticuerpo secundario burro anti-ratón 405 requirió en varias ocasiones de un mayor esfuerzo. Esto debido a que la señal emitida por el anticuerpo no era lo suficientemente fuerte como para resaltar de manera evidente sobre el fondo de tinción DAPI (azul) generado por el software. Este tipo de inconvenientes puede ser solucionado utilizando anticuerpos biotinilados con los cuales se logra amplificar la señal de detección (Buchwalow & Bocker, 2010).



**Fig.9. Micrografías confocales de neuro-progenitores mitóticamente activos. A.** Células co-localizadas con un proceso vertical de GFAP a los 3 días (izquierda) y 56 días (derecha) de sobrevivencia. Esto sugiere la presencia de neuro-progenitores quiescentes que fueron encontrados en todos los intervalos analizados (60X). **B.** Imágenes confocales de neuro-progenitores mitóticamente activos a los 3 días (izquierda) y 56 días de sobrevivencia (derecha). Estas células no expresan GFAP, por tanto no corresponde con el neuro-progenitor descrito en la literatura, sino que sugiere la presencia de una población diferente de células en división sin el proceso radial del GFAP (20X). La tinción DAPI (azul) es añadida por el software para diferenciar los núcleos en diferentes células.

## Discusión

### 1. Sobrevivencia de neuroprogenitores activos en el giro dentado del hipocampo

Se han reportado estudios que indican que la población de células proliferativas en el giro dentado del hipocampo disminuye con el tiempo. La mayoría de estos reportes se han basado en estudios hechos en ratones (Hayes & Nowakowski, 2002; Mandyman *et al.*, 2007; Encinas *et al.*, 2011). También se han llevado a cabo algunos reportes en ratas que sugieren la misma información (Heine *et al.*, 2004; McDonald & Wojtowicz, 2005; Hansen & Kalil, 2010). Nuestro estudio sugiere un declive en la población mitóticamente activa del día 3 al día 21 en concordancia con los reportes previamente mencionados. Sin embargo, en los otros intervalos de tiempo este declive no es evidente y las diferencias presentadas probablemente no son significativas. Esto podría deberse al hecho de que la información del día 56 corresponde solamente a un animal, mientras que para los días 21 y 28 se utilizaron 2 animales.

Por otro lado, es interesante resaltar que todos los estudios previamente mencionados utilizaron BrdU como análogo de timidina para marcar las células. Por tanto, no se podría excluir la posibilidad de que un número relativamente grande de células marcadas para CldU se presenten debido al hecho de que en nuestro estudio se utilizaron análogos de timidina alternativos, lo cual habría afectado los resultados que reportamos al compararlos con estudios previos que utilizaron BrdU. Es decir, es posible que la disponibilidad de CldU tras la inyección fuera mayor que la del BrdU, por tanto una mayor cantidad de células pudo ser marcada en comparación con lo que ocurre con el BrdU.

### 2. Expresión proteica diferencial en poblaciones mitóticamente activas tras dos meses desde la primera división observada

Se han propuesto varios modelos con el fin de explicar la neurogénesis hipocampal. Encinas *et al.*, (2011) sugirieron un modelo en el cual un neuro-progenitor quiescente que expresa GFAP da origen a un neuro-progenitor de amplificación rápida (*ANP*) que no expresa dicha proteína. Tras cuatro divisiones, las *ANPs* maduran y se diferencian en neuronas. Por otro lado, Steiner *et al.*, (2006) proponen que las *ANPs* podrían expresar GFAP como un proceso más corto que en las *QNP*s. Estas células podrían pasar por un estadio pre-neural (Tipo-2a) y uno transicional (Tipo-2b) previo a la diferenciación neuronal. El periodo que define la duración de estos estadios no ha sido definido aún. Nuestro descubrimiento de una población de células co-localizadas casi 2 meses después de la primera división observada y que no expresan GFAP, provee nueva evidencia de un periodo de mitosis extendido. Esto podría presentarse por dos razones. Una opción, que también ha sido apoyada por el trabajo de Lugert *et al.*, (2010) es que la progenie de las *QNP*s podrían permanecer quiescentes por un periodo de tiempo, es decir, dejan el ciclo celular y luego

vuelven a entrar para continuar eventualmente con el proceso de diferenciación celular. Se estaría entonces hablando de una población quiescente que no expresa GFAP, lo cual hasta la fecha se había considerado una característica específica de la población quiescente. Otra posible explicación a nuestro descubrimiento es que la progenie de *QNP*s continúe dividiéndose a lo largo de, en el caso del intervalo más largo, casi dos meses tras la primera división observada. Es necesario recaudar más información para poder clarificar las razones que ayuden a explicar esta nueva población aquí descrita. A pesar de esto, la evidencia claramente sugiere un proceso extendido de mitosis continua en una población celular que no expresa GFAP.

La expresión de GFAP por parte de los neuro-progenitores quiescentes ha sido reportada en diferentes estudios. Sin embargo, ninguno de estos estudios ha considerado la posibilidad de que alguna otra población de células madre/progenitoras esté jugando un rol en la dinámica de la neurogénesis hipocampal. En nuestro estudio confirmamos la presencia de células que han entrado a la fase S del ciclo celular al menos dos veces en un intervalo de casi dos meses. Esta nueva evidencia de mitosis continua abre una ventana para la exploración de nuevos enfoques que puedan contribuir a entender de una manera más completa el proceso de neurogénesis hipocampal. Para esto, el uso de ratones transgénicos que expresen proteínas marcadoras bajo el control de la expresión de proteínas específicas de los neuro-progenitores que ayuden a revelar su identidad sería de gran utilidad (Lugert *et al.*, 2010). Sin embargo, en el caso de animales como las ratas y otros mamíferos (incluyendo primates no humanos) esta no es una herramienta disponible. Por esta razón, el empleo de inmunohistoquímica que abarque más marcadores de células progenitoras constituye la mejor alternativa para su estudio.

Los estudios de caracterización de la neurogénesis adulta han cobrado gran relevancia. La asociación de dicho proceso con una estructura funcionalmente tan compleja como lo es el hipocampo ha despertado la curiosidad de los neurocientíficos con respecto al posible vínculo que pueda existir. Este trabajo, al presentar nueva evidencia de una alternativa al modelo aceptado hasta el momento, contribuye al entendimiento del proceso. La recolección de esta información resulta crucial para poder entender procesos patológicos como la depresión, cuyo tratamiento ha sido vinculado con la neurogénesis hipocampal (Snyder, 2011). La confirmación de un vínculo función-estructura en este caso permitiría el desarrollo de tratamientos específicamente dirigidos a la región y proceso de interés, lo cual desembocaría en tratamientos más efectivos.

De manera general, lograr dilucidar la asociación función-estructura y función-función de los diferentes procesos regulados por el hipocampo daría como resultado un mejor abordaje a nivel de tratamiento y mejoramiento de dichas funciones ante diferentes patologías. La generación de este tipo de conocimiento

en la ciencia básica resulta crucial para poder escalar hacia el mejoramiento del desarrollo y la calidad de vida en general.

## Conclusiones

En el presente estudio por primera vez se demuestra la presencia de neuro-progenitores quiescentes en el giro dentado del hipocampo que continúan en división hasta por 56 días. En dicha población se encontró una población de células en división activa por 56 días que no expresan GFAP, además de las ya descritas previamente *QNP*s. Dicha población sugiere la posibilidad de heterogeneidad fenotípica en el acervo de neuro-progenitores.

Así, se desprende la necesidad de tomar en cuenta diferentes enfoques con respecto al modelo propuesto para explicar la neurogénesis hipocampal. Al ser un proceso tan complejo y en el que intervienen gran cantidad de variables, las alternativas a lo que se conoce deben explorarse constantemente. El presente trabajo sienta una base para un estudio más profundo y posible replanteamiento del modelo actual. Esto no desvirtúa lo que hasta el momento se ha logrado describir, mas enriquece el campo con una visión más amplia que podría ayudar a entender de una mejor manera el proceso.

Por otro lado, en cuanto a la metodología se desprende la necesidad de tomar en cuenta que el uso de la anestesia constituye un riesgo para los animales en estudio, la cual puede incluso causar la pérdida de individuos. De igual manera se puede concluir que el uso de análogos de timidina constituye una herramienta fundamental en la caracterización de la neurogénesis. Sin embargo, se debe estudiar más a fondo el efecto de las diferencias estructurales de cada uno de ellos con el fin de prever y enmendar posibles discrepancias que se deriven del uso diferencial de los análogos.

## Recomendaciones

Es muy necesario contar con poblaciones de estudio estadísticamente significativas, de manera que puedan realizarse afirmaciones que contribuyan ya sea a confirmar o introducir nuevas descripciones. Es por tanto, de gran relevancia trabajar con al menos 4 animales por grupo. Así por ejemplo, en el caso de que ocurriera la muerte de un animal el grupo de estudio seguirá teniendo una cantidad significativa de individuos.

Es importante además considerar la realización del conteo celular en un microscopio confocal. Como se ha mencionado, en el microscopio confocal se utiliza láser de longitudes de onda determinadas por lo que habrá excitación exclusiva del fluorocromo de interés. Además esta técnica bloquea cualquier radiación diferente a la fluorescencia correspondiente, lo cual contribuye a disminuir el ruido de fondo. Con la microscopía de epifluorescencia, aunque se utilizan filtros, es posible que la muestra se vea irradiada con longitudes de onda en un rango más amplio que no solamente excitaría el fluorocromo de interés, sino cualquier sustancia que se excite a dichas longitudes de onda. El ruido de fondo en esta técnica es difícil de evadir.

Por otro lado, el trabajar con controles positivos y negativos al inicio del experimento es vital para poder establecer parámetros con los cuales guiar las observaciones derivadas del experimento. En esta misma línea, la realización de un control de BrdU y CldU, lograría contribuir a esclarecer si existen diferencias en la biodisponibilidad del segundo con respecto al primero.

Para solucionar inconvenientes como la detección del anticuerpo burro anti-ratón 405 se recomienda utilizar anticuerpos biotinilados con los cuales se pueda posteriormente amplificar la señal de detección. En caso de no contar con la posibilidad de conseguir dichos anticuerpos se puede considerar el uso de un fluorocromo diferente o la eliminación de la tinción DAPI agregada por el software del microscopio.

Sería además interesante extender el estudio a ratas más jóvenes y ratas más viejas a 8 semanas de edad. Esto para confirmar y en dado caso, cuantificar la población de células y hacer comparaciones con respecto a los datos encontrados en el presente estudio (posibles *QNP*s que no expresan GFAP). El uso de ratones transgénicos así como de inmunohistoquímica con marcadores adicionales con proteínas como nestina y factores de transcripción utilizados como marcadores de proliferación (por ejemplo Sox2, Ki67) podrían ayudar a este objetivo en diversas especies.

## Referencias

- Aimone, J., J. Wiles & F. Gage. 2006. Potential Role for Adult Neurogenesis in the Encoding of Time in New Memories. *Nature Neuroscience*. 9(6): 723-727pp.
- Altman, J. & G. Das. 1965. Autoradiographic and Histological Evidence of Postnatal Hippocampal Neurogenesis in Rats. *J. Comp Neur.* 124: 319-336pp.
- Amaral, D., H. Scharfman & P. Lavenex. 2007. The Dentate Gyrus: Fundamental Neuroanatomical Organization (Dentate Gyrus for Dummies). *Progress in Brain Reseach*. 163: 3-22pp.
- Andersen, P., R. Morris, D. Amaral, T. Bliss & J. O'Keefe. 2007. The Hippocampus Book. Oxford University Press. New York, USA. 832pp.
- Bear, M., B. Connors & M. Paradiso. 2007. Neuroscience: Exploring the brain. 3<sup>rd</sup> Edition. Lippincott Williams & Wilkins. PA, USA. 857pp.
- Brown, J., S. Couillard, C. Cooper, J. Winkler, L. Aigner & H. Georg. 2003. Transient Expression of Doublecortin During Adult Neurogenesis. *The Journal of Comparative Neurology*. 467: 1-10pp.
- Buchwalow, I. & W. Bocker, 2010. Immunohistochemistry: Basics and Methods. 1<sup>st</sup> Ed. Springer Verlag Berlin Heidelberg. Germany. 149pp.
- Chemicon. Introduction to Antibodies. Disponible en: <http://www.millipore.com/immunodetection/id3/immunostainingtechniques>. Consultado 27 Setiembre, 2011.
- Cox, G. 2002. Biological Confocal Microscopy. *Materials Today*. 5: 34-41pp.
- Diaspro, A., G. Chirico, C. Usai, P. Ramoino, & J. Dobrucki. 2006. Photobleaching. In: Handbook of Biological Confocal Microscopy. J. Pawley. Ed. 3<sup>rd</sup> Edition. Springer Science+Business Media, LLC. Wisconsin, USA. 691pp.
- Encinas, M., T. Michurina, N. Peunova, J. Park, J. Tordo, D. Peterson, G. Fishell, A. Koulakov & G. Enikolopov. 2011. Division-Coupled Astrocytic Differentiation and Age-Related Depletion of Neural Stem Cells in the Adult Hippocampus. *Cell Stem Cell*. 8: 566-579pp.
- Eriksson, P., E. Perfilieva, T. Björk-Eriksson, A. Alborn, C. Nordborg, D. Peterson & F. Gage. 1998. Neurogenesis in the Adult Human Hippocampus. *Nature*. 4(11): 1313-1317pp.

- Erickson, K., M. Voss, R. Shaurya-Prakash, C. Basak, A. Szabo, L. Chaddock, Jennifer S. Kim, S. Heo, H. Alves, S. White, T. Wojcicki, E. Mailey, V. Vieira, S. Martin, B. Pence, J. Woods, E. McAuley & A. Kramer. 2010. Exercise Training Increases Size of Hippocampus and Improves Memory. *PNAS*. 108(7):3017-3022pp.
- Hansen, M. & R. Kalil. 2010. The Generation and Survival of New Granule Cells Neurons in the Hippocampus of the Adult Rat. *Soc. Neurosci. Abstr.* Vol.36.
- Hayes, N. & R. Nowakowski. 2002. Dynamics of Cell Proliferation in the Adult Dentate Gyrus of Two Inbred Strains of Mice. *Brain Research Interactive*. 134:77-85pp.
- Heine, V., S. Maslam, M. Joëls & P. Lucassen. 2004. Prominent Decline of Newborn Cell Proliferation, Differentiation, and Apoptosis in the Aging Dentate Gyrus, in Absence of an Age-Related Hypothalamus–Pituitary–Adrenal Axis Activation. *Neurobiology of Aging*. 25: 361-375pp.
- Holmberg, A., A. Blomstergren, O. Nord, M. Lukacs, J. Lundeberg & M. Uhlén. 2005. The Biotin-Streptavidin Interaction can be Reversibly Broken Using Water at Elevated Temperatures. *Electrophoresis*. 26: 501–510pp.
- Insausti, R., S. Cebada-Sánchez, P. Marcos. 2010. Postnatal Development of the Human Hippocampal Formation. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Germany. 89pp.
- Jantzie, L., V. Tanay & K. Todd. 2010. Methods in Immunochemistry. En: Handbook of Biomarkers. K., Jain. Humana Press. Springer. Germany. 194-215pp.
- Jessberger, S., R. Clark, N. Broadbent, G. Clemenson Jr., A. Consiglio, D. Lie, L. Squire & F. Gage. 2009. Dentate Gyrus-Specific Knockdown of Adult Neurogenesis Impairs Spatial and Object Recognition Memory in Adult Rats. *Learning & Memory*. 16: 147-154pp.
- Kapadia, C., A. Chang, G. Sotiropoulou, G. Yousef, L. Grass, A. Soosaipillai, X. Xing, D. Howarth & E. Diamandis. 2003. Human Kallikrein 13: Production and Purification of Recombinant Protein and Monoclonal and Polyclonal Antibodies, and Development of a Sensitive and Specific Immunofluorometric Assay. *Clinical Chemistry*. 49 (1):77–86pp.
- Kempermann, G. 2008. The Neurogenic Reserve Hypothesis: What Is Adult Hippocampal Neurogenesis Good For? *Trends in Neurosciences*. 31(4): 163-169pp.
- Kempermann, G., S. Jessberger, B. Steiner & G. Kronenberg. 2004. Milestones of Neuronal Development in the Adult Hippocampus. *Trends in Neuroscience*. 27(8): 447-452pp.

- Keys, M. 2009. Immunohistochemistry Staining Methods. In: Immunohistochemical Staining Methods. G. Kumar & L. Rudbeck. Eds. 5<sup>th</sup> Edition. California, USA. 160pp.
- Lichtman, J. & J. Conchello. 2005. Fluorescence Microscopy. *Nature Methods*. 2 (12): 910-919pp.
- Liu, C., N. Crone, P. Franaszczuk, D. Cheng, D. Schretlen & F. Lenz. 2011. Fear Conditioning is Associated with Dynamic Directed Functional Interactions Between and within the Human Amygdala, Hippocampus, and Frontal Lobe. *Neuroscience*. 189: 359–369pp.
- Lugert, S., O. Basak, P. Knuckles, U. Haussler, K. Fabel, M. Götz, C. Haas, G. Kempermann, V. Taylor & C. Giachino. 2010. Quiescent and Active Hippocampal Neural Stem Cells with Distinct Morphologies Respond Selectively to Physiological and Pathological Stimuli and Aging. *Cell Stem Cell*. 6: 445-456pp.
- Mandyman, C., G. Harburg & J. Eisch. 2007. Determination of Key Aspects of Precursor Cell Proliferation, Cell Cycle Length and Kinetics in the Adult Mouse Subgranular Zone. *Neuroscience*. 146:108–122pp.
- Miller, R. 2001. Technical Immunohistochemistry: Achieving Reliability and Reproducibility of Immunostains. *Society for Applied Immunohistochemistry*, 2001. Annual Meeting. 56pp.
- McDonald, H. & J. Wojtowicz. 2005. Dynamics of Neurogenesis in the Dentate Gyrus of Adult Rats. *Neuroscience Letters*. 385:70-75pp.
- Montero, C. 2003. The Antigen–Antibody Reaction in Immunohistochemistry. *J. Histochem Cytochem*. 51:1–4pp.
- Olariu, A., K. Cleaver & H. Cameron. 2007. Decreased Neurogenesis in Aged Rats Results from Loss of Granule Cell Precursors without Lengthening of the Cell Cycle. *The Journal of Comparative Neurology*. 501:659–667pp.
- Paddock, S. 2008. Over the Rainbow: 25 years of Confocal Imaging. *Biotechniques*. 44: 643-648pp.
- Palmer, R., J. Haagensen, T. Neu & C. Sternberg. 2006. Confocal Microscopy of Biofilms: Spatiotemporal Approaches. In: Handbook of Biological Confocal Microscopy. J. Pawley. 3<sup>rd</sup> Edition. Springer Science+Business Media, LLC. Wisconsin, USA. 877pp.
- Redei, G. 2008. Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics, and Informatics. Vol. 1. 3<sup>rd</sup> Edition. Springer. Germany. 701pp.

- Redish, A. 1999. *Beyond the Cognitive Map. From place cells to episodic memories.* MIT Press. Massachussets, USA. 420pp.
- Sahay, A., K. Scobie, A. Hill, C. O'Carroll, M. Kheirbek, N. Burghardt, A. Fenton, A. Dranovsky & R. Hen. 2011. Increasing Adult Hippocampal Neurogenesis is Sufficient to Improve Pattern Separation. *Nature.* 472: 466-470pp.
- Sahay, A. & R. Hen. 2007. Adult Hippocampal Neurogenesis in Depression. *Nature Neuroscience.* 10 (9): 1110-1115pp.
- Santarelli, L., M. Saxe, C. Gross, A. Surget, F. Battaglia, S. Dulawa, N. Weisstaub, J. Lee, R. Duman, O. Arancio, C. Belzung & R. Hen. 2003. Requirement of Hippocampal Neurogenesis for the Behavioral Effects of Antidepressants. *Science.* 301: 805-809pp.
- Shi, S., R. Cote & C. Taylor. 2001. Antigen Retrieval Techniques: Current Perspectives. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry.* 49(8): 931-937pp.
- Shors, T. 2008. From Stem Cells to Grandmother Cells: How Neurogenesis Relates to Learning and Memory. *Cell Stem Cell.* 3:253-258pp.
- Snyder, J., A. Soumier, M. Brewer, J. Pickel & H. Cameron. 2011. Adult Hippocampal Neurogenesis Buffers Stress Responses and Depressive Behavior. *Nature.* 476: 458-461pp.
- Spring, K. & M. Davidson. Introduction to Fluorescence Microscopy. Disponible en: <http://www.microscopyu.com/print/articles/fluorescence/fluorescenceintro-print.html>. Consultado: 28 Setiembre, 2011.
- Steiner, B., F. Klempin, L. Wang, M. Kott, H. Kettenmann & G. Kempermann. 2006. Type-2 Cells as Link Between Glial and Neural Lineage in Adult Hippocampal Neurogenesis. *Glia.* 54:805-814pp.
- Steinitz, M. 2009. Three Decades of Human Monoclonal Antibodies: Past, Present and Future Developments. *Human Antibodies.* 18: 1-10pp.
- Taupin, P. 2008. *Stem Cells and Regenerative Medicine, Volume I. Adult Neurogenesis and Neural Stem Cells.* NOVA Science Publisher, Inc. New York, USA. 2p.
- Von Bohlen, O. & Halbach. 2007. Immunohistological Markers for Staging Neurogenesis in Adult Hippocampus. *Cell Tissue Res.* 329: 409-420pp.

Voss, J., D. Warren, B. Gonsalves, K. Federmeier, D. Tranel & N. Cohen. 2011. Spontaneous Revisitation during Visual Exploration as a Link among Strategic Behavior, Learning, and the Hippocampus. *PNAS*. 108(31): 402-409pp.

Zhao, C. W. Deng & F. Gage. 2008. Mechanisms and Functional Implications of Adult Neurogenesis. *Cell*. 132: 645-660pp.