

Tesis Doctoral

Estudio de los efectos de inflamación prenatal sobre la neurogénesis adulta, sus comportamientos asociados y sus mecanismos de acción

Graciarena, Mariana

2010

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Graciarena, Mariana. (2010). Estudio de los efectos de inflamación prenatal sobre la neurogénesis adulta, sus comportamientos asociados y sus mecanismos de acción. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Graciarena, Mariana. "Estudio de los efectos de inflamación prenatal sobre la neurogénesis adulta, sus comportamientos asociados y sus mecanismos de acción". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Estudio de los efectos de la inflamación prenatal
sobre la neurogénesis adulta, sus comportamientos
asociados y sus mecanismos de acción.

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos
Aires en el área Ciencias Biológicas:

Lic Mariana Graciarena

Director de tesis: Dr. Fernando J. Pitossi
Consejero de Estudios: Dr. Pablo Wappner

Fundación Instituto Leloir
Buenos Aires, Septiembre de 2010

Resumen

La exposición prenatal a estímulos pro-inflamatorios influye sobre diversas funciones del cerebro adulto. Además, estímulos pro-inflamatorios han mostrado efectos adversos sobre la neurogénesis adulta. En base a estos antecedentes, nuestra hipótesis de trabajo fue que un estímulo pro-inflamatorio durante el período prenatal provoca una disminución permanente de la neurogénesis adulta. Para testar esta hipótesis, ratas Wistar preñadas recibieron inyecciones subcutáneas de un estímulo pro-inflamatorio, el lipopolisacárido bacteriano (LPS), en sus días 14, 16, 18 y 20 de gestación. Las crías adultas prenatalmente tratadas con LPS mostraron una reducción en la cantidad total de células en proliferación y en la diferenciación neuronal en el giro dentado, que resultan en una menor neurogénesis total. Sin embargo la proliferación de progenitores neurales y la supervivencia celular se mantuvieron constantes. Además, el tratamiento prenatal con LPS provocó alteraciones en el desempeño de los animales en el test comportamental de Reconocimiento del Objeto Nuevo, un test que evalúa la memoria a corto plazo, y que ha sido previamente relacionado con la neurogénesis adulta. Evaluando cambios a nivel sistémico que expliquen la disminución de la neurogénesis adulta por el LPS prenatal, observamos que la exposición prenatal a LPS no afectó el funcionamiento basal del eje neuroendócrino Hipotalámico-Hipofisario-Adrenal. Por otra parte, el LPS administrado a las hembras en su preñez sí afectó los niveles de cuidado materno de las crías. Sin embargo, experimentos de adopción cruzada demostraron que los efectos del LPS prenatal sobre la neurogénesis adulta fueron independientes del cuidado materno recibido por las crías. El tratamiento prenatal con LPS provocó alteraciones permanentes en la composición del entorno o nicho neurogénico del GD adulto: a nivel celular, se observó una activación morfológica permanente de la microglía a estadios intermedios. A nivel molecular, se observaron alteraciones agudas en la expresión de citoquinas en el cerebro fetal y una expresión disminuida del Factor Transformante de Crecimiento beta 1 ($TGF-\beta_1$) específicamente en el GD de animales adultos. La sobreexpresión crónica de $TGF-\beta_1$ en el GD adulto restauró los niveles disminuidos de neurogénesis a los niveles originales, equivalentes al grupo control, mientras que no aumentaron los niveles de neurogenesis en el grupo control. Además, la sobreexpresión bilateral de $TGF-\beta_1$ restauró el desempeño en el test de Reconocimiento del Objeto Nuevo a los niveles del grupo control. La exposición adulta a LPS, al contrario de la exposición prenatal, provocó efectos transientes en la disminución de neurogénesis y la activación de microglía. Por otra parte, $TGF-\beta_1$ mostró efectos pro-neurogénicos in vitro a través de la activación de su principal vía de señalización, la vía Smad 2/3. Estos resultados validan la hipótesis de trabajo. Además, destacan el período prenatal con una etapa de susceptibilidad a estímulos inflamatorios que ejercerán efectos a largo plazo sobre la neurogénesis adulta y comportamientos relacionados a través de alteraciones permanentes en la composición del nicho neurogénico, como la activación microglial y la expresión disminuida de $TGF-\beta_1$ en el GD. Por su parte, $TGF-\beta_1$ resulta un modulador central de la disminución de los niveles de neurogénesis adulta y de comportamientos asociados a memoria por el LPS prenatal.

Palabras clave: inflamación prenatal, neurogénesis adulta, nicho neurogénico, microglía, $TGF-\beta_1$.

Abstract

Prenatal exposure to inflammatory stimuli is known to influence adult brain function. In addition, adult hippocampal neurogenesis is impaired by a local pro-inflammatory microenvironment. On this basis, we hypothesized that a pro-inflammatory insult during gestation would have negative effects on adult neurogenesis in the offspring. Pregnant Wistar rats received subcutaneous injections of lipopolysaccharide or saline every other day from gestational day 14 to 20. The adult offspring prenatally treated with LPS showed a decrease in the proliferating cells and the newborn neurons of the dentate gyrus, but no changes in progenitor cell proliferation and newborn neuron survival. Furthermore, prenatal LPS treatment impaired performance in the neurogenesis-dependent Novel Object Recognition test. Basal Hypothalamic-Pituitary-Adrenal functions were not altered by prenatal LPS exposure. Maternal care was impaired by prenatal LPS administration, but the effects on adult neurogenesis of the litter depended only on the prenatal treatment and not the amount of maternal care received, showing that maternal care did not contribute to the effects of prenatal LPS on adult neurogenesis. Prenatal LPS exposure caused permanent alterations in the neurogenic niche composition: persistent microglial activation and downregulated expression of transforming growth factor beta-1 (TGF- β_1) occurred specifically in the adult hippocampus of animals treated prenatally with LPS. Importantly, chronic hippocampal TGF- β_1 overexpression restored neurogenesis as well as recognition memory performance to control levels. TGF- β_1 has shown to exert its pro-neurogenic effects through the canonical signaling pathway, Smad2/3. These findings validate our working hypothesis. In addition, they highlight the prenatal period as a temporal window of susceptibility to inflammatory stimuli that would cause long term alterations on adult neurogenesis and related behaviors through permanent alterations in the neurogenic niche composition, such as microglial activation and reduced TGF- β_1 expression in the dentate gyrus. TGF- β_1 , in turn, emerges as a central modulator in maintaining basal neurogenesis as well as memory-related behavior performance.

Keywords: prenatal inflammation, adult neurogenesis, neurogenic niche, microglía, TGF- β_1 .

INDICE GENERAL

Abreviaturas.....8

Trabajos publicados.....10

INTRODUCCIÓN**I. Neurogénesis adulta****I.1 Características generales. Regiones neurogénicas.....12****I.1.1 Una perspectiva histórica.14****I.2 Linajes celulares y marcadores diferenciales.....15****I.3 Factores que modulan la neurogénesis adulta.....17****I.3.1 Ejercicio, aging, stress, ejes neuroendócrinos.....17****I.3.2 Inflamación central o periférica.....18****I.3.2.1 Nicho neurogénico.....20****I.3.2.1.1 Componentes celulares Astrocitos y microglía.....22**

• Los astrocitos.....22

• La microglía.....23

• Las neuronas.....26

• La vasculatura.....27

I.3.2.1.2 Componentes moleculares. Citoquinas y factores de crecimiento.27

- Las moléculas involucradas en el desarrollo del SNC.....27

- Las citoquinas y neurotrofinas.....28

• La interleuquina 1 (IL-1).....30

• El Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α).....31

• La Interleuquina 6 (IL-6).....32

• El Factor de Crecimiento Transformante β (TGF- β_1).....32

• Factores de crecimiento: FGF y EGF.....35

• Glucocorticoides.....35

I.4 Funciones de las neuronas nuevas. Comportamientos relacionados.....37**I.4.1 Modelos animales de depresión y ansiedad.....38****I.4.2 Modelos animales de aprendizaje y memoria.....39**

II Período prenatal

II.1 Características generales. Importancia como período crítico de programación.....	41
II.2 Distintos estímulos perinatales y sus efectos en el adulto.....	42
II.2.1 Stress prenatal.....	42
II.2.2 Interacción madre-cría.....	43
II.2.3 Inflamación prenatal.....	44

OBJETIVO GENERAL E HIPÓTESIS.....47**MATERIALES Y MÉTODOS**

I. Animales.....	49
II. Tratamientos de animales.....	49
III. Vectores.....	50
IV. Procesamiento del tejido.....	54
IV. Immunohistoquímicas.....	55
V. Tinción con Hoescht.....	56
VI. Tinción con X-Gal.....	56
VII. Cuantificación de neurogénesis y activación de microglía.....	57
- Células en proliferación.....	57
- Neurogénesis.....	57
- Activación de microglía.....	57
VIII. Radioinmunoensayo (RIA).....	58
IX. Cultivo celular e inmunocitoquímica.....	59
X. Extracción de ARN, transcripción reversa (RT) y PCR en tiempo real.....	61
XI. Western blot.....	62
XII. Tests de comportamiento.....	63
- Cuidado Materno.....	63
- Supresión de la Alimentación por Novedad.....	63
- Natación Forzada (Porsolt).....	64
- Test de Preferencia por Sacarosa.....	64
- Test de Burrowing.....	64
- Reconocimiento del Objeto Nuevo (NOR).....	64
XIII. Análisis estadístico.....	65

RESULTADOS**Capítulo I. Efectos de la exposición prenatal a LPS sobre la neurogénesis adulta.**

Hipótesis y Objetivos.....	68
I.1 La administración prenatal de un estímulo inflamatorio (LPS) disminuye la proliferación celular y la diferenciación neuronal.....	69
I.2 La exposición prenatal a LPS no afecta la proliferación de CMN del GD.....	76
I.3 El LPS prenatal no afecta la supervivencia de las neuronas nuevas.....	79
I.4 La magnitud de la disminución de la neurogénesis adulta causada por la administración prenatal o adulta de LPS es equivalente. La combinación de ambos tratamientos no disminuye en mayor medida la neurogénesis adulta.....	82
I.5 La administración de LPS en la adultez no afecta los niveles de neurogénesis adulta a largo plazo.....	84

Capítulo II. Estudio de los posibles mecanismos involucrados en los efectos del LPS prenatal sobre la neurogénesis adulta.

Hipótesis y Objetivos.....	87
II.1 Los glucocorticoides no participan en los efectos del LPS prenatal sobre la neurogénesis adulta.....	88
II.2 El LPS prenatal afecta el comportamiento materno, independientemente de sus efectos sobre la neurogénesis adulta.....	91
II.3 El LPS prenatal produce alteraciones morfológicas en la microglía del GD.....	94
II.4 El LPS prenatal produce cambios agudos en la expresión de citoquinas pro- y anti-inflamatorias en el GD en desarrollo, y menor expresión de TGF- β_1 en el nicho neurogénico de las crías adultas. TGF- β_1 participa en los efectos del LPS prenatal sobre la neurogénesis adulta.....	99

Capítulo III. Estudio de los efectos del LPS prenatal sobre comportamientos adultos dependientes de hipocampo, y sus posibles mecanismos de acción.

Hipótesis y Objetivos.....	105
III.1 La administración prenatal de LPS no afecta comportamientos relacionados con la ansiedad y depresión en las crías adultas.	106

III.2 La administración prenatal de LPS afecta comportamientos relacionados con la memoria y aprendizaje en las crías adultas.....	110
<u>Capítulo IV. Estudio de las vías de señalización involucradas en el efecto pro-neurogénico de TGF-β_1.</u>	
Hipótesis y Objetivos.....	115
IV.1 La presencia de TGF- β_1 induce la activación de la vía Smad2/3 en CMN de hipocampo de ratas adultas. La pre-incubación de estas células con Smad7 previene la activación en presencia de TGF- β_1	116
DISCUSIÓN	122
Capítulo I-Efectos de la exposición prenatal a LPS sobre la neurogénesis adulta.....	122
Capítulo II-Estudio de los mecanismos involucrados en los efectos del LPS prenatal sobre la neurogénesis adulta.....	128
Capítulo III-Estudio de los efectos del LPS prenatal sobre comportamientos adultos dependientes de hipocampo, y sus posibles mecanismos de acción.....	137
Capítulo IV-Estudio de las vías de señalización involucradas en el efecto pro-neurogénico de TGF- β_1	141
Conclusiones generales.....	144
REFERENCIAS	148

Abreviaturas

ABN: índice de cuidado materno (“arched back nursing”)
ACTH: adrenocorticotropina
Ad: vector adenoviral
AD: enfermedad de Alzheimer
ADN: ácido desoxirribonucleico
ADX: adrenalectomía
ARN: ácido ribonucleico
B: test de burrowing
BBB: barrera hematoencefálica
BDNF: factor neurotrófico derivado de cerebro
βgal: beta-galactosidasa
BMP: proteínas morfogénicas de hueso
BrdU: 5´bromo-2´-deoxiuridina
CG: capa granular
CMN: célula madre neural
CRH: corticotropina
CR3: receptor del complemento 3
DCX: doblecortina
E: día embrionario
EGF: factor de crecimiento epidérmico
FGF: factor de crecimiento de fibroblastos
FSK: forskolina
FST: test de natación forzada
GC: glucocorticoides
GD: giro dentado
GDNF: factor neurotrófico derivado de la glía
GFAP: proteína ácida fibrilar glial
GFP: proteína verde fluorescente
GR: receptor de glucocorticoides tipo II
GSA: Griffonia simplicifolia
H: hilus
HPA: hipotalámico hipofisario adrenal
IGF: Factor de Crecimiento de Insulina
IL-1: interleuquina 1
IL-4: interleuquina 4
IL-6: interleuquina 6
IL-1ra: antagonista del receptor de interleuquina 1
Ip: intraperitoneal
LG: índice de cuidado materno (“licking and grooming”)
LIF: factor inhibidor de leucemia
LPS: lipopolisacárido
MAPK: kinasas asociadas a microtúbulos
MR: receptor de glucocorticoides tipo I
MWM: laberinto de agua de Morris
NGF: factor de crecimiento nervioso
NO: óxido nítrico
NOR: test de reconocimiento del objeto nuevo
NSF: test de supresión de la alimentación por novedad

OB: bulbo olfatorio
P: día postnatal
PB: buffer fosfato
PBS: buffer fosfato salino
PD: enfermedad de Parkinson
Poli I:C: ácido poliinosínico-policitídílico
PSA-NCAM: molécula de adhesión celular neural polisialada
RA: ácido retinoico
RIA: radioinmunoensayo
RT-PCR: retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa
Shh: Sonic Hedgehog
SNC: sistema nervioso central
SP: test de preferencia por sacarosa
TGF- β ₁: factor de crecimiento transformante beta 1
TMR: tracto migratorio rostral
TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa
Tuj: beta-III tubulina
VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial
Wnt: Wingless-Int
ZSG: zona subgranular
ZSV: zona subventricular

Resultados de esta tesis que han sido publicados:

- **“Prenatal inflammation impairs adult neurogenesis and memory related behavior through persistent hippocampal TGF- β_1 downregulation”**

Mariana Graciarena, Amaicha M. Depino & Fernando J. Pitossi. *Brain Behavior and Immunity*. 2010 Nov; 24(8):1301-9. PMID: 20600816

Resultados de esta tesis a ser enviados para su publicación:

- **“Differential dynamics of prenatal and adult inflammation on impairing adult neurogenesis and altering the neurogenic niche composition”**.

Mariana Graciarena & Fernando J. Pitossi. Manuscrito en preparación.

Otros trabajos publicados:

- **“The more you have, the less you get: the functional role of inflammation on neuronal differentiation of endogenous and transplanted neural stem cells in the adult brain”**.

Patricia Mathieu, Daniela Battista, Amaicha M. Depino, Valeria Roca, Mariana Graciarena & Fernando Pitossi. *Journal of Neurochemistry*. 2010 Mar; 112 (6):1368-85. Review. PMID: 20028453

- **“Chronic expression of low levels of tumor necrosis factor-alpha in the substantia nigra elicits progressive neurodegeneration, delayed motor symptoms and microglía/macrophage activation”**.

Ana De Lella Ezcurra, Mariela Chertoff, Carina Ferrari, Mariana Graciarena & Fernando Pitossi. *Neurobiology of Disease*. 2010 Mar; 37 (3):630-40. PMID: 19969084

Introducción

I. Neurogénesis adulta

I.1 Características generales. Regiones neurogénicas.

La neurogénesis adulta es la producción de neuronas nuevas en el cerebro adulto a partir de células madre neurales (CMN). Este proceso se compone de diferentes etapas: la proliferación de CMN, su diferenciación hacia un linaje neuronal, la supervivencia de las neuronas nuevas, y la maduración morfológica y fisiológica, para finalmente convertirse en neuronas funcionales.

Las llamadas regiones neurogénicas del cerebro adulto son aquellas en las que ocurre la neurogénesis adulta. Esto implica la presencia de CMN y un microambiente permisivo para la diferenciación de estas células hacia fenotipos neuronales. En el cerebro adulto de mamíferos existen dos regiones actualmente aceptadas como neurogénicas: la zona subventricular (ZSV) adyacente a la pared del ventrículo lateral (Figura 1A-1D), y la zona subgranular (ZSG) del Giro Dentado (GD) del hipocampo (Figura 1A, 1E). En la ZSV, las CMN residen en la porción anterior de la ZSV, y migran como neuroblastos a través del tracto migratorio rostral (TMR) hacia el bulbo olfatorio, donde se integran como interneuronas inhibitorias periglomerulares (Lois y Alvarez-Buylla, 1993; Doetsch et al., 1999). En el GD del hipocampo, las CMN se encuentran en la ZSG, donde proliferan y se diferencian, para luego integrarse en la capa granular donde maduran hasta convertirse principalmente en neuronas excitatorias (Toni et al., 2008).

Además de estas dos regiones, existen evidencias sobre la generación de neuronas nuevas en otras áreas del cerebro adulto, incluyendo el neocórtex (Gould et al., 1999a; Gould et al., 2001; Dayer et al., 2005), el estriado (Bedard et al., 2006; Luzzati et al., 2006) la amígdala (Fowler et al., 2002), y el hipotálamo (Fowler et al., 2002; Kokoeva et al., 2005), aunque han habido discrepancias respecto del carácter neurogénico de estas zonas (Benraiss et al., 2001; Kornack y Rakic, 2001; Ehninger y Kempermann, 2003; Chmielnicki et al., 2004).

A pesar de que comparten varias características, existen también diferencias sustanciales entre ambas zonas neurogénicas. Una de ellas se refiere a las propiedades intrínsecas de las CMN que habitan en cada región. En la ZSV se encuentran CMN

cuya multipotencialidad y capacidad de autoperpetuación han sido demostradas. En cambio, en la ZSG del hipocampo se ha observado que las células que dan origen a las neuronas nuevas poseen una capacidad limitada de autorrenovación, lo que indicaría que en esta región dichas células se encuentran en estadios relativamente más avanzados de diferenciación, aunque manteniendo su capacidad de proliferar y generar neuronas nuevas (Seaberg y van der Kooy, 2002). A los efectos de esta tesis, nos referiremos a los progenitores neurales de la ZSG como CMN, aunque teniendo en cuenta estas consideraciones.

Por otra parte, se ha demostrado recientemente que la neurogénesis adulta en la ZSG resulta en la adición de nuevas neuronas a circuitos neuronales preexistentes lo cual incrementa su plasticidad, mientras que en la ZSV, las neuronas nuevas principalmente contribuyen al mantenimiento del circuito en el bulbo olfatorio mediante el reemplazo de funciones neuronales (Imayoshi et al., 2008).

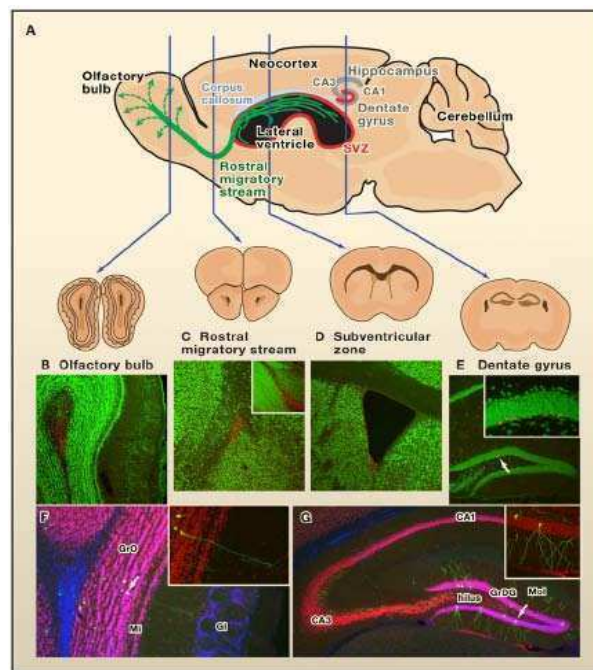


Figura 1. Neurogénesis adulta en el cerebro de roedores.

A. Planos sagital y coronales del cerebro de roedores en zonas donde ocurre la neurogénesis adulta. Las áreas en rojo indican las zonas germinales: la zona subventricular (ZSV) de los ventrículos laterales, y la zona subgranular (ZSG) del giro dentado del hipocampo. Las neuronas generadas en la ZSV migran a través del tracto migratorio rostral y son integradas en el bulbo olfatorio.

B-E. Neurogénesis observada como incorporación de BrdU (rojo) en las distintas zonas neurogénicas. Las neuronas se visualizan con el marcador NeuN (verde).

F-G. Neuronas nuevas en el bulbo olfatorio y el giro dentado visualizadas con el retrovirus que expresa la proteína verde fluorescente (GFP). Rojo: NeuN. Azul: DAPI. Adaptado de (Zhao et al., 2008).

I.1.1 Una perspectiva histórica.

“Once the development was ended, the founts of growth and regeneration of the axons and dendrites dried up irrevocably. In the adult centers, the nerve paths are something fixed, ended, and immutable. Everything may die, nothing may be regenerated. It is for the science of the future to change, if possible, this harsh decree.”
- Santiago Ramon y Cajal, 1913.

Históricamente uno de los dogmas centrales de las neurociencias describía que la generación de neuronas estaba restringida al desarrollo prenatal y postnatal temprano, y que el sistema nervioso central (SNC) adulto de mamíferos era una entidad estática, incapaz de regenerarse. Sin embargo, en 1912, Ezra Allen aportó la primera evidencia de que podían nacer neuronas nuevas en el cerebro adulto de mamíferos, al mostrar figuras mitóticas en la paredes de ventrículos laterales en ratas albinas hasta de 120 días de vida (Allen, 1912). Recién por los años 60s aparecieron nuevas evidencias de neurogénesis adulta: Joseph Altman y sus colegas utilizando timidina tritiada proveyeron evidencias de que nuevas neuronas se estaban produciendo en el Giro Dentado (GD) adulto de ratas (Altman, 1963; Altman y Das, 1965a). Este grupo fue también el primero en demostrar la generación adulta de precursores neurales en la ZSV (Altman y Das, 1965b), y en describir en detalle su diferenciación y migración hacia el bulbo olfatorio donde se integran en circuitos olfatorios como neuronas nuevas (Altman, 1969). Sin embargo, en esa época, estos resultados no fueron aceptados por la comunidad científica ya que la evidencia de que esas células nuevas fueran neuronas resultaba insuficiente, y se discutía acerca de la posibilidad de que células sufriendo procesos de reparación de ADN pudieran estar incorporando la timidina. Recién varios años más tarde, Michael Kaplan corroboró los resultados de Altman en el hipocampo y en el bulbo olfatorio utilizando técnicas de microscopía electrónica con el objetivo de demostrar el fenotipo neuronal de las células que incorporaron timidina (Kaplan y Hinds, 1977; Kaplan y Bell, 1984; Kaplan et al., 1985).

Debido a que la determinación del fenotipo celular estaba puramente basada en criterios morfológicos, la mayoría de la comunidad científica no aceptaba los resultados de Kaplan. Sin embargo Fernando Nottebohm en los 80s reavivó el interés por la neurogénesis adulta al demostrar que un número sustancial de neuronas nuevas eran producidas en los órganos responsables del canto de los pájaros (Goldman y

Nottebohm, 1983; Burd y Nottebohm, 1985). Fueron Heather Cameron y Elizabeth Gould quienes hicieron el tercer re-descubrimiento de la neurogénesis adulta en hipocampo en ratas (Gould et al., 1992; Cameron et al., 1993).

Mientras tanto, durante estos años, se comenzó a utilizar la 5-bromo-3'-deoxiuridina (BrdU) como marcador de células en proliferación. La marcación con BrdU es conceptualmente similar a la timidina tritiada, en cuanto a que las células marcadas son las mitóticamente activas. Pero la BrdU es detectada por técnicas inmunohistoquímicas, y puede ser combinada con marcadores neuronales o gliales de modo de identificar el fenotipo de las células marcadas utilizando microscopía confocal.

Al presente, la neurogénesis adulta ha sido demostrada inequívocamente en gran variedad de especies, incluyendo reptiles (Lopez-Garcia et al., 1992), aves (Barnea y Nottebohm, 1994), roedores (Altman y Das, 1965a; Altman y Das, 1967), primates y humanos (Gould et al., 1997; Gould et al., 1998; Gould et al., 1999c ; Kornack y Rakic, 1999). Es importante el hecho de que la neurogénesis adulta se ha demostrado en cerebros de humanos post-mortem utilizando BrdU (Eriksson et al., 1998) y Ki-67 (Reif et al., 2006).

A pesar de que la tasa de neuronas nuevas en el hipocampo es 10 veces menor en el macaco que en el roedor adulto (Kornack y Rakic, 1999), la mayoría de las CMN presentes se diferencian a neuronas (Gould et al., 2001). Además, se encontró que la neurogénesis disminuía linealmente con la edad, tanto en roedores como en monos (Leuner et al., 2007) y en humanos (Manganas et al., 2007).

Cerca de cien años luego del descubrimiento inicial de Allen, y cincuenta años luego del re-descubrimiento de Altman, la neurogénesis adulta en mamíferos ha ganado aceptación y se ha establecido firmemente en la comunidad científica.

I.2 Linajes celulares y marcadores diferenciales.

La neurogénesis adulta en la ZSG se produce a partir de CMN mediante división asimétrica (Figura 2). Dentro de la población de CMN existen distintos estadios de diferenciación clasificados de acuerdo a su morfología y a su patrón de expresión de marcadores o proteínas específicas de fenotipos celulares. Existen evidencias que describen a las CMN en su estadio más indiferenciado -definidas como las verdaderas células madre- con características morfológicas similares a los astrocitos. Estas células

expresan la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y nestina, ambos filamentos intermedios del citoesqueleto, así como vimentina y sox2. Poseen una morfología característica en la cual su soma se encuentra en la ZSG y un proceso alargado se extiende a través de la capa granular, luego ramificándose. Son relativamente quiescentes con respecto a los progenitores neurales en estadios más avanzados de diferenciación (Figura 2).

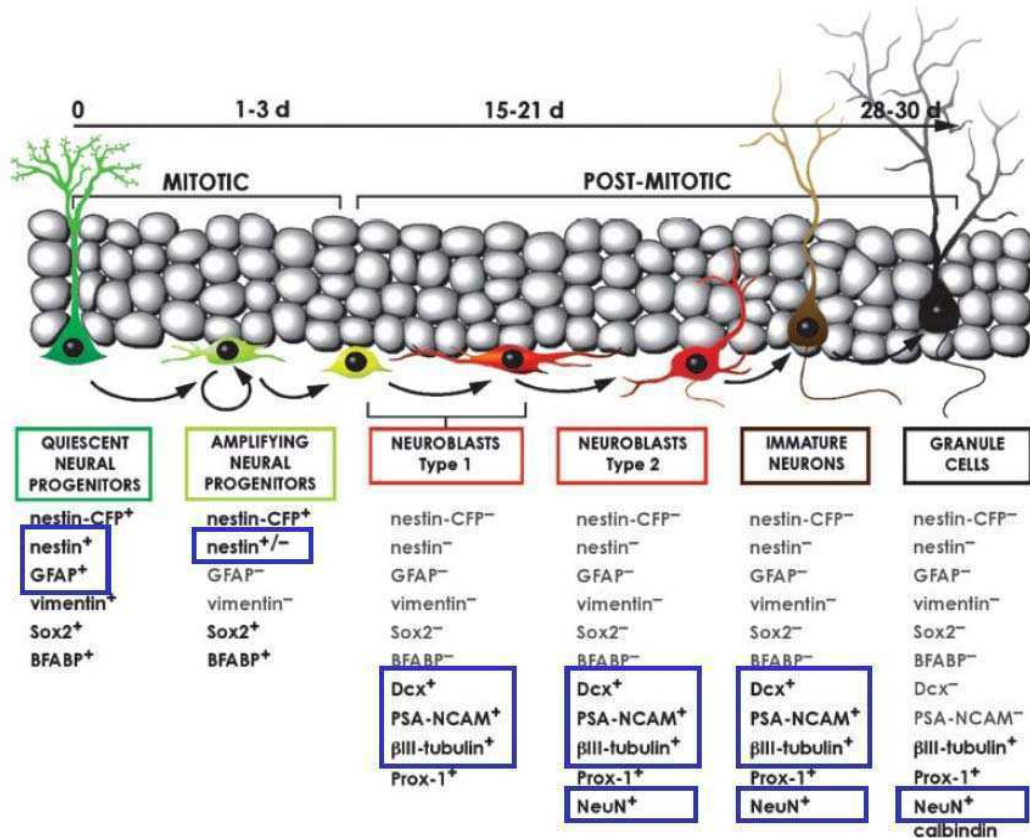


Figura 2. Esquema de los pasos de la diferenciación neuronal en el giro dentado de roedores adultos, y los marcadores específicos de cada tipo celular.

Células madre neurales quiescentes generan, mediante división asimétrica, progenitores neurales de alta tasa de proliferación. Luego de varios ciclos de división simétrica, estos salen del ciclo celular y se diferencian a neuroblastos, que a los 1-3 días se vuelven post-mitóticos. Los neuroblastos sufren procesos madurativos hasta convertirse en interneuronas con procesos apicales y un soma integrado en la capa granular. Estas neuronas adquieren características de neuronas granulares maduras funcionales a los 28-30 días aproximadamente. Adaptado de (Encinas et al., 2006)

Estas células dan lugar por medio de división asimétrica a progenitores neurales con una alta tasa de proliferación, que pierden la expresión de GFAP y vimentina, pero conservan la expresión de nestina y sox2 (Figura 2). Estas células poseen una morfología distinta a sus progenitores positivos para GFAP: pierden el proceso que atraviesa la capa granular y su forma es compacta y tiende a ser paralela a la capa

granular, lo cual es compatible con su alto grado de división celular. Estas células sufren división simétrica y asimétrica, y dan origen a células comprometidas hacia el linaje neuronal, los neuroblastos. Este tipo celular comienza a expresar los marcadores neuronales tempranos PSA-NCAM, Doublecortin (Dcx) (Rao y Shetty, 2004) y beta-III tubulina (Tuj), y todavía conserva su capacidad proliferativa. Se mantienen en su mayoría en la ZSG (Figura 2). Más tarde los neuroblastos pierden su capacidad proliferativa y continúan su maduración. En estadios más avanzados de diferenciación comienzan a expresar el marcador de neuronas maduras NeuN, y más tarde aún expresan calbindina. En esta etapa (28 días post-nacimiento) son neuronas maduras, se encuentran mayoritariamente ubicadas en el tercio más interno de la capa granular, y poseen un soma redondeado, con una proyección axonal extendiéndose hacia el hilus, y proyecciones dendríticas con espinas que alcanzan la capa molecular externa (Esposito et al., 2005).

Existe también oligodendrogénesis en la ZSG aunque en niveles prácticamente despreciables (Hsieh et al., 2004). Sin embargo, estos niveles son incrementados ante la presencia del Factor de Crecimiento de Insulina (IGF), y ante la sobreexpresión en la CMN del factor de transcripción Ascl1 (Jessberger et al., 2008).

I.3 Factores que modulan la neurogénesis adulta

I.3.1 Ejercicio, aging, stress, ejes neuroendócrinos.

Numerosos factores ambientales pueden afectar la neurogénesis influyendo directa o indirectamente sobre ésta. A continuación mencionaremos algunos de los más relevantes.

El **stress** es un factor inhibitorio de la neurogénesis adulta (Altman y Das, 1965a; Gould et al., 1997; Mirescu y Gould, 2006). El stress en particular no solo es anti-neurogénico sino que además es específico de región: disminuye la neurogénesis en el GD pero no tiene ningún efecto sobre la neurogénesis en la ZSV. Una de las formas en la que eventos de stress afectan la neurogénesis adulta es a través de la activación del eje HPA y la consecuente liberación de GC, que poseen efectos inhibitorios sobre la neurogénesis adulta (ver más adelante sección *Componentes del nicho neurogénico*).

Por otra parte, el **envejecimiento** provoca cambios globales en el funcionamiento del hipocampo. En particular, con la edad avanzada disminuyen la capacidad de aprendizaje en paradigmas dependientes de hipocampo (Gage et al., 1984; Smith et al., 2000), la plasticidad sináptica (Barnes, 1994), y la neurogénesis adulta en el GD (Kuhn et al., 1996; Heine et al., 2004).

Distintos tipos de **ejercicio físico** han mostrado incrementar los niveles de neurogénesis adulta (van Praag et al., 1999; Fabel et al., 2003; Farmer et al., 2004) juntos con otros parámetros relacionados como plasticidad sináptica y mejoras en modelos comportamentales.

El hecho de habitar un **ambiente enriquecido**, por su parte también aumenta los niveles de neurogénesis adulta (Kempermann et al., 1997; Kempermann et al., 1998; Madronal et al., 2010).

Numerosos estudios adjudican a los eventos de **aprendizaje** un rol estimulador de la neurogénesis adulta. Se ha observado que los tipos de aprendizaje dependientes de la actividad del hipocampo incrementaron la supervivencia de las neuronas jóvenes, mientras que otros tipos de aprendizaje, no dependientes del hipocampo, no afectaban este parámetro (Gould et al., 1999b). Estos estímulos no produjeron cambios en otros parámetros como la proliferación de las CMN en el GD adulto (Gould et al., 1999b). En otro paradigma, se demostró que el aumento en la supervivencia neuronal estaba correlacionado con la capacidad de aprendizaje (Leuner et al., 2004). Otros grupos han reportado que eventos de aprendizaje modulan positiva o negativamente la proliferación y supervivencia de las CMN y neuronas nacidas en el hipocampo adulto según qué etapa del aprendizaje se analice (Dobrossy et al., 2003). Un trabajo más concluyente sobre el tema indica que sería posible, a partir del desempeño en un test de memoria espacial, predecir los niveles de neurogenesis adulta de un animal (Drapeau et al., 2003).

I.3.2 Inflamación central o periférica.

El rol de los procesos inflamatorios sobre la neurogenesis adulta ha sido parcialmente abordado. En el año 2003, dos trabajos independientes demostraron que un estímulo pro-inflamatorio como el lipopolisacárido (LPS), un componente de la pared de bacterias Gram negativas y potente inflamógeno, provocó una activación de la

microglía y una disminución de la neurogénesis adulta administrado directamente en el SNC (Ekdahl et al., 2003) o en la periferia (Monje et al., 2003). Además, la co-administración de drogas anti-inflamatorias previno los efectos del LPS (Monje et al., 2003). El rol anti-neurogénico de los componentes inflamatorios se demostró también *in vitro*: la exposición de un cultivo primario de CMN del GD a medio condicionado de microglía proveniente de la misma zona del cerebro de animales tratados con LPS, disminuyó su diferenciación neuronal (Monje et al., 2003).

Un proceso inflamatorio en el SNC inducido por una inyección intrahipocampal de LPS en ratas no solo disminuyó la tasa neurogénesis en el cerebro adulto como se mencionó anteriormente, sino que también alteró sus características electrofisiológicas y su integración a circuitos funcionales (Jakubs et al., 2008).

Algunos de los principales mediadores de respuestas inflamatorias que también se han identificado como parte del entorno de las CMN adultas, poseen efectos anti-neurogénicos en el GD. La Interleuquina 1 (IL-1 β) ha demostrado poseer efectos adversos sobre la neurogénesis adulta, participando en la respuesta anti-neurogénica causada por eventos de stress (Koo y Duman, 2008). El efecto parece ser directo sobre las CMN ya que estas expresan su receptor (IL-1RI), y además la IL-1 ha mostrado disminuir la proliferación celular de un cultivo primario de CMN (Koo y Duman, 2008). Datos de nuestro laboratorio muestran que la sobreexpresión crónica de IL-1 β derivada de adenovectores recombinantes inyectados en el GD de ratas adultas disminuye la neurogénesis, confirmando mediante un abordaje experimental diferente el hecho de que la IL-1 β posee efectos anti-neurogenicos in vivo (Mathieu et al., 2010). La Interleuquina 6 (IL-6) también ha mostrado tener un rol inhibitorio frente a la neurogenesis adulta: se ha reportado que el agregado de IL-6 a un cultivo primario de CMN reduce el porcentaje de diferenciación neuronal (Monje et al., 2003). El rol anti-neurogénico de la IL-6 ha sido además demostrado *in vivo*, en ratones transgénicos con una sobreexpresión crónica de esta citoquina por los astrocitos (Vallieres et al., 2002). El Factor de Necrosis Tumoral α (TNF- α) es otra de las citoquinas con efectos inhibitorios sobre la neurogénesis adulta. El número de neuronas nuevas aumentó en el GD de ratones transgénicos que no expresan el receptor TNFR1, lo que indica que los efectos de TNF- α son mediados por la unión a este receptor (Iosif et al., 2006).

Por otra parte, mediadores centrales de la supresión de respuestas inflamatorias, como el Factor de Crecimiento Transformante beta (TGF- β_1), han mostrado tener efectos pro-neurogénicos. Se ha demostrado que TGF- β_1 está involucrado

funcionalmente con los efectos de la adrenalectomía sobre el aumento de la neurogénesis adulta (Battista et al., 2006). Además, el efecto de TGF- β_1 se observó también in vitro: el agregado de esta citoquina a un cultivo primario de CMN aumentó la tasa de diferenciación neuronal (Battista et al., 2006).

En estos trabajos también se vincula la activación de la microglía con los efectos de la inflamación sobre la neurogenesis adulta. En este sentido, la infusión intraventricular de LPS provocó, además de la disminución en la neurogenesis adulta en el GD, una importante activación de la microglía local hasta el estadio IV (fagocítico) en significativa correlación (Ekdahl et al., 2003). Por otra parte, el tratamiento de animales con minociclina, un compuesto inhibitorio de la actividad de la microglía (Seabrook et al., 2006) previno la activación microglial y la reducción en la neurogenesis adulta (Ekdahl et al., 2003). Sin embargo, la activación de la microglía no siempre resulta adversa sobre la neurogenesis, e incluso en algunos casos puede llegar a ser beneficiosa (Hanisch y Kettenmann, 2007; Ekdahl et al., 2009). Un ejemplo de esto es la activación microglial hasta el estadio II/III (no fagocítico), correlacionada con un aumento en la neurogénesis adulta por adrenalectomía (Battista et al., 2006).

En base a estos datos y otros, los efectos netos de la microglía activada sobre la neurogenesis adulta no son predecibles según su grado de activación, sino que dependen de las condiciones del entorno, y el perfil resultante de las moléculas que secreten (Mathieu et al., 2010).

I.3.2.1 Nicho neurogénico. Componentes celulares y moleculares.

La neurogénesis ocurre en un entorno local que se encuentra determinado por las células que lo conforman, sus proteínas de membrana, la matriz extracelular y los factores solubles producidos por células locales o que llegan desde la periferia a través de los vasos sanguíneos. Dicho entorno constituye el *microambiente o nicho neurogénico*.

Durante el desarrollo del cerebro el principal entorno neurogénico está constituido por las células neuroepiteliales, que dan origen a la mayor parte de la glía y neuronas del cerebro adulto y además poseen funciones tróficas y de soporte. En el cerebro adulto las zonas neurogénicas mencionadas, la ZSV y la ZSG, poseen un microambiente o nicho propicio para que ocurra la neurogénesis.

Las funciones de las CMN, y entre ellas su potencial neurogénico, se encuentran determinadas por las características intrínsecas de estas células así como por las señales que reciben de su entorno. En este sentido, se ha demostrado que las CMN derivadas de la ZSV, al ser transplantadas en el bulbo olfatorio maduran hasta convertirse en interneuronas, mientras que si son transplantadas al hipocampo se diferencian a neuronas granulares. Las CMN del hipocampo, por su parte, al ser transplantadas en el tracto migratorio rostral, la zona de migración hacia el bulbo olfatorio de los neuroblastos nacidos en la ZSV, se diferencian a neuronas funcionales que integran circuitos del bulbo olfatorio (Suhonen et al., 1996). Sin embargo, si estas mismas células son transplantadas a regiones no neurogénicas como el cerebelo, el estriado, o la médula espinal, adquieren fenotipos gliales (Rossi y Cattaneo, 2002). Por lo tanto, podemos afirmar que el entorno es capaz de condicionar o redirigir programas celulares intrínsecos de las CMN. En particular, el nicho de las zonas neurogénicas del cerebro adulto constituye un entorno permisivo y restrictivo para que ocurra la neurogénesis (Alvarez-Buylla y Lim, 2004; Mu et al., 2010; Miller y Gauthier-Fisher, 2009).

El potencial neurogénico intrínseco de un determinado tipo de CMN puede ser estudiado en condiciones de cultivo, en las cuales se habrá perdido la conformación del nicho neurogénico. En estas condiciones, será determinante de la neurogénesis el programa interno de las células, susceptible de ser modulado por la identidad y la concentración de los factores agregados al medio de cultivo (Reynolds y Weiss, 1992; Morshead et al., 1998; Palmer et al., 1995; Monje et al., 2003; Koo y Duman, 2008; Battista et al., 2006). En este sentido, CMN aisladas de las zonas neurogénicas adultas como la ZSV y la ZSG, pueden ser mantenidas en cultivos en monocapa o neuroesferas, y en condiciones de proliferación mediante el agregado de mitógenos como el Factor de Crecimiento de Fibroblastos (FGF-2), y/o el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF). Ambos factores estimulan la proliferación celular en cultivos de CMN derivados de ambas zonas (Kuhn et al., 1997; Palmer et al., 1999). Además, la infusión intracerebroventricular de estos factores aumenta la proliferación celular *in vivo* en ambas regiones (Ciccolini y Svendsen, 1998). En cultivos derivados del hipocampo, las CMN que expresan nestina poseen la capacidad de auto-renovarse y diferenciarse hacia los tres linajes de células neurales. La diferenciación de las CMN hacia fenotipos neuronales se puede inducir con el agregado al medio de cultivo de suero fetal bovino, en combinación con otro factor diferenciador como la Forskolina, o con Ácido Retinoico (RA) (Son et al., 1999 ; Ray y Gage, 2006).

Se han identificado numerosos factores involucrados con la proliferación y diferenciación de las CMN en las zonas neurogénicas. Sin embargo, la relevancia fisiológica de la interacción entre las CMN y su entorno no ha sido integralmente abordada. Futuros estudios sobre los principales ligandos, receptores y vías de transducción involucrados en esta interacción serán de gran ayuda para comprender en mayor profundidad sus resultados sobre la biología de las CMN.

I.3.2.1.1 Componentes celulares. Astrocitos y microglía.

El cerebro se encuentra conformado por células de la glía, las neuronas y la vasculatura. Las células gliales se pueden clasificar en dos tipos, la macroglia conformada por astrocitos, oligodendrocitos y células ependimales, y la microglía. Los dos tipos celulares principalmente involucrados en la respuesta inmune del cerebro son los astrocitos y la microglía. A nivel celular, las células de la glía presentes en el nicho neurogénico poseen roles de soporte y regulación de diversas funciones de las CMN, como veremos más adelante.

Los astrocitos

Los astrocitos han sido extensamente estudiados en su papel como componentes del entorno neurogénico (Wang y Bordey, 2008). Son de origen ectodérmico y se generan a partir de células neuroepiteliales durante el desarrollo. Participan en la homeostasis local, brindando soporte estructural, y regulando la actividad neuronal y la respuesta inmune del SNC. Existe amplia evidencia indicando que los astrocitos poseen no solo funciones estructurales (Doetsch et al., 1997), sino también un rol clave en controlar localmente los múltiples pasos de la neurogénesis adulta, desde la proliferación y la especificación de fenotipo hasta la migración e integración de la progenie neuronal en circuitos neuronales preexistentes en el cerebro adulto (Ma et al., 2005; Barkho et al., 2006; Jiao y Chen, 2008; Wang y Bordey, 2008). Se ha demostrado que regulan la actividad neuronal mediante la liberación de factores neurotróficos, guiando el desarrollo neuronal, e influyendo en los niveles extracelulares de distintas iones (Dong y Benveniste, 2001).

La población de astrocitos es heterogénea y posee características distintivas según la región del cerebro. Se han observado diferencias morfológicas, en la expresión de marcadores celulares y de receptores en distintas regiones del cerebro (Nedergaard et al., 2003; Seri et al., 2004). Los astrocitos del hipocampo pero no de la médula espinal son capaces de promover la neurogénesis al ser co-cultivados con CMN de hipocampo (Song et al., 2002). Los astrocitos ejercen sus funciones parácrinas a través de la liberación de una amplia diversidad de factores, incluyendo factores relacionados con la supervivencia neuronal y la formación de sinapsis (Munoz-Fernandez y Fresno, 1998), y citoquinas como el TGF- β (Finch, 2003).

Una de las funciones fisiológicas más importantes de los astrocitos es formar parte estructural y funcional de la barrera hematoencefálica (BBB), una estructura que selecciona la entrada de elementos presentes en el torrente sanguíneo al SNC. Los procesos de los astrocitos se encuentran en contacto físico con el endotelio microvascular de la BBB, y cumplen así la función de modular la entrada de determinados factores al SNC (Abbott et al., 2006; Wang y Bordey, 2008).

Existen varios marcadores específicos de astrocitos: el más común es GFAP, que además marca CMN en su estadio más indiferenciado (Figura 2). También marcan astrocitos la proteína S100 β y vimentina, que forma parte de los filamentos intermedios. Frente a determinados estímulos, los astrocitos se activan en un proceso que se denomina astrocitosis: aumentan su proliferación, alteran su morfología y aumentan la expresión de GFAP, generando una respuesta local, que es acompañada por un aumento en la expresión de citoquinas, quemoquinas, moléculas de adhesión celular y otros tipos de moléculas inmunes efectoras (Dong y Benveniste, 2001; Wang y Bordey, 2008).

La microglía

Las células de la microglía son de origen mesodérmico, y derivan de células mieloides de la periferia que infiltran el cerebro como células mononucleares fagocíticas durante el período embrionario tardío y postnatal temprano (Bilbo y Schwarz, 2009). Estas células mononucleares evolucionan en microglía a medida que el cerebro madura, desarrollando una morfología característica ramificada en su estado en reposo o basal, y residen permanentemente en el cerebro (Leong y Ling, 1992; Perry et

al., 2010), monitoreando constantemente el entorno (Nimmerjahn et al., 2005; Davalos et al., 2005).

La microglía representa aproximadamente un 12% de las células del cerebro (Hortega, 1932). Sin embargo su densidad, patrón de expresión de citoquinas y morfología son altamente heterogéneos en distintas regiones del cerebro (Lawson et al., 1990; Ren et al., 1999), existiendo la mayor concentración de microglía en las regiones del hipocampo, bulbo olfatorio, ganglios basales, particularmente en la *substantia nigra* (Ren et al., 1999). La microglía se caracteriza por su patrón de marcadores de superficie característico de células inmunes, como los complejos mayores de histocompatibilidad (MHC), marcadores de linfocitos T y B y del receptor del complemento 3 (CR3), además de secretar las principales citoquinas pro- y anti-inflamatorias como IL-1, IL-6, TNF- α y TGF- β (Ekdahl et al., 2009). Estos rasgos remiten a los monocitos y macrófagos de la periferia, y apoyan la idea de una función análoga de la microglía en el SNC (Ekdahl et al., 2009; Block et al., 2007). Este patrón de marcadores resulta útil para identificar a la microglía en el cerebro mediante técnicas inmunohistoquímicas.

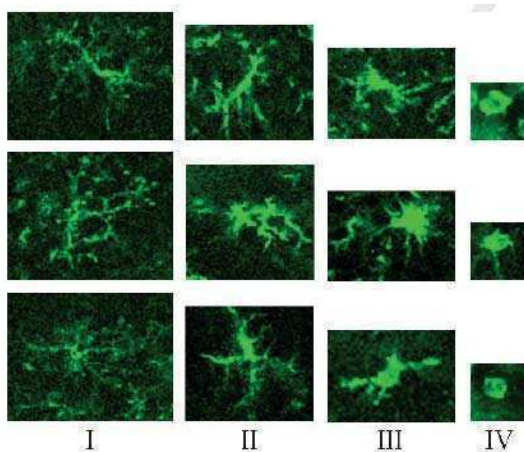


Figura 3. Morfología característica de células microgliales en reposo y en sus distintos estadios de activación, marcadas con la isolectina GSAI-B4, en tejido cerebral de ratas adultas.

Los distintos estadios de activación se indican con números romanos. **I.** Las células en reposo muestran una gran cantidad de ramificaciones delgadas y un soma apenas identificable. **II.** Las células muestran somas celulares elongados con procesos engrosados. **III.** Los procesos se acortan y engrosan aún más y la morfología adopta una forma redondeada. **IV.** Las células poseen una morfología redondeada típica de macrófagos, sin procesos, y un citoplasma vacuolado. (Adaptado de (Mathieu et al., 2010)).

Es importante destacar el hecho de que la microglía, además de ejercer funciones modulatorias y de soporte típicas de otros tipos gliales, respresenta un sistema de defensa inmunocompetente (Streit, 2002; Block et al., 2007). En respuesta a ciertos estímulos inmunológicos o diversos tipos de daño la microglía se activa (Fetler y Amigorena, 2005; Kreutzberg, 1996). La activación de la microglía es un proceso de transformación morfológica desde su estado en reposo, con un soma pequeño y prolongaciones finas y ramificadas (Figura 3). Estas células retraen sus prolongaciones

alcanzando distintos grados de activación. En los estadios intermedios retraen parcialmente sus prolongaciones y adoptan una morfología con ramificaciones más cortas y compactas, mientras que en su estadio máximo de activación adoptan una forma ameboidea con un citoplasma vacuolado, acompañado de un cambio en el perfil de expresión de marcadores de superficie -como el marcador ED1 de actividad fagocítica-, y de secreción de citoquinas y factores tróficos (Block et al., 2007; Ekdahl et al., 2009). Las distintas etapas de activación de la microglía han sido clasificadas en estadios desde el I (en reposo) al IV (máximo grado de activación) de acuerdo a su morfología (Kreutzberg, 1996) (Figura 3). La activación de la microglía es un proceso dinámico y reversible (Perry et al., 2010).

En su estado activado, la microglía puede inducir efectos neurotóxicos por la producción en exceso de un amplio espectro de factores citotóxicos, como iones superóxido (Colton y Gilbert, 1987), óxido nítrico (NO) (Qin et al., 2002), y TNF- α (Sawada et al., 1989). Asimismo tratamientos que reducen la activación microglial resultan en un aumento de la supervivencia neuronal luego de estímulos tóxicos (Tikka et al., 2001; Tikka y Koistinaho, 2001 ; Wu et al., 2002 ; Yan et al., 2003 ; Sawada et al., 1989).

En otras circunstancias sin embargo, la microglía puede ejercer diversas funciones beneficiosas e incluso esenciales para las funciones neuronales (Ekdahl et al., 2009), que incluyen la eliminación de detritos tóxicos (Simard et al., 2006; Wilkinson et al., 2006), funciones inmunológicas (Jack et al., 2005; Town et al., 2005), y la liberación de factores tróficos y anti-inflamatorios (Morgan et al., 2004; Ekdahl et al., 2009). Además, en el cerebro adulto la microglía facilita la reparación de daños al guiar la migración de CMN hacia zonas afectadas de inflamación e injuria (Aarum et al., 2003; Napoli y Neumann, 2009), y ha sido vinculada con promover la regeneración neuronal en zonas dañadas (Ziv et al., 2006a ; Ziv et al., 2006b).

Hasta la fecha, las condiciones que definen si una determinada activación microglial es beneficiosa o adversa para la proliferación, diferenciación y supervivencia neuronal no se conocen en detalle. La activación microglial es un proceso altamente dinámico, y su rol funcional depende del estadio de activación pero especialmente del perfil de moléculas secretadas por la microglía activada (Perry et al., 2010; Mathieu et al., 2010). Varios grupos han intentado correlacionar un cierto grado de activación microglial con la neurogénesis adulta. Al respecto, nuestro grupo ha reportado que en un modelo experimental de aumento de la neurogénesis adulta por adrenalectomía, la

microglía del GD alcanza estadios II-III de activación, en correlación con un aumento en su expresión de TGF- β_1 , de efectos pro-neurogénicos (Battista et al., 2006). En otros trabajos, estadios máximos de activación (tipo IV) han sido asociados con un aumento en la liberación de IL-6 y una reducción en la neurogénesis adulta (Monje et al., 2003). Otros autores distinguen entre activación aguda y crónica de la microglía, cada una con distintos efectos sobre la neurogénesis adulta (Ekdahl et al., 2009). Un aspecto que determina los efectos netos de la microglía sobre la neurogénesis adulta son los estímulos locales que recibe. En este sentido, se ha reportado que la microglía, según haya sido expuesta a IL-4 o Interferón- γ , se activa morfológicamente frente a ambos estímulos pero ejerce efectos inductores de la neurogénesis o de la oligodendrogénesis respectivamente (Butovsky et al., 2006). Este resultado ejemplifica el concepto de que no necesariamente se puede asociar cierto grado de activación con el rol funcional de la microglía en procesos como la neurogénesis adulta. Por lo tanto, no es posible hacer alguna predicción acerca de los efectos de la microglía sobre el funcionamiento de su entorno a partir de su grado de activación.

Las neuronas

Las neuronas también pueden ejercer un rol condicionante del entorno neurogénico. En el hipocampo el recambio celular es un proceso asociado con la neurogénesis, dado que existe una gran proporción de neuronas maduras que sufren apoptosis además de incorporarse a circuitos preexistentes (Gould et al., 1997; Cameron y McKay, 1999). En particular, se estima que aproximadamente el 50% de las neuronas nuevas sufre apoptosis durante sus primeros 30 días. Luego, la población que sobrevive a este período generalmente se mantiene estable por 5 meses (Dayer et al., 2003). La muerte de neuronas nuevas podría aumentar la neurogénesis mediante la liberación de mitógenos u otros factores solubles.

La vasculatura

Recientemente se ha descrito una estrecha relación entre la neurogénesis y la vasculogénesis. En la ZSG las células endoteliales se encuentran espacialmente relacionadas con acumulaciones –o *clusters*- de CMN (Palmer et al., 2000; Monje et al., 2003). Además, el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) induce la proliferación y diferenciación de las CMN en el hipocampo y de la ZSV *in vitro* e *in vivo* (Jin et al., 2002). Finalmente, las neuronas jóvenes de la ZSG son susceptibles al VEGF ya que expresan los receptores de VEGF tipo II (Yang et al., 2003; Ma et al., 2009; Lee y Agoston, 2009).

I.3.2.1.2 Componentes moleculares. Citoquinas y factores de crecimiento.

Las moléculas involucradas en el desarrollo del SNC

A nivel molecular, muchas de las señales que intervienen en la neurogénesis y la gliogénesis durante el desarrollo son importantes también como moduladoras de la neurogénesis adulta (Alvarez-Buylla y Lim, 2004; Miller y Gauthier-Fisher, 2009). Los receptores de la familia Notch participan en la neurogénesis temprana (Chambers et al., 2001), y a su vez ejercen efectos adversos sobre la neurogénesis adulta (Imayoshi et al., 2010), probablemente manteniendo la quiescencia de las CMN (Chapouton et al., 2010). Moléculas como Sonic Hedgehog (Shh), FGF e EGF, que funcionan como morfógenos y mitógenos durante el desarrollo son importantes en mantener la capacidad de auto-renovación de las CMN adultas al estimular su proliferación celular, tanto *in vitro* como *in vivo* (Doetsch et al., 2002; Tureyen et al., 2005). La vía de señalización Wnt (Wnt) ha demostrado ser necesaria para mantener los niveles basales de neurogénesis adulta, ya que su inhibición causa una disminución de la neurogénesis *in vitro* e *in vivo* (Lie et al., 2005). La familia de las Proteínas Morfogénicas de Hueso (BMP) son importantes en la formación del GD durante el desarrollo (Caronia et al., 2010). Sin embargo existen evidencias opuestas acerca de sus efectos sobre la neurogénesis adulta. Por un lado se ha demostrado que poseen efectos inhibitorios sobre la neurogénesis adulta (Gobeske et al., 2009), mientras que otros grupos han descrito roles pro-neurogénicos de los BMPs (Li et al., 1998 ; Colak et al., 2008). Los BMPs parecen estar

involucrados particularmente en la regulación del balance entre la quiescencia y la proliferación de las CMN (Mira et al., 2010).

Las citoquinas y neurotrofinas

Las citoquinas son polipéptidos tradicionalmente involucrados en la comunicación intercelular en el sistema inmune. Pueden ejercer su función localmente sobre el tejido en el cual son secretadas o en tejidos lejanos a través del torrente sanguíneo. Pueden inducir el reclutamiento de células del sistema inmune (Whitney et al., 2009). Su expresión es baja en condiciones basales y se encuentra aumentada en diferentes situaciones de stress como daño al tejido, infecciones, crecimiento tumoral u otros estímulos pro-inflamatorios. En el cerebro sus fuentes son las células de la glia, células endoteliales, neuronas, linfocitos y macrófagos infiltrados de la periferia (Hopkins y Rothwell, 1995; Whitney et al., 2009). Muchas citoquinas regulan su propia secreción y la de otras citoquinas a través de la unión a sus receptores específicos presentes tanto en las neuronas como en la glia. No solo se encuentran involucradas en la respuesta inmune sino que intervienen además en procesos fisiológicos propios del sistema nervioso (Vitkovic et al., 2000; Whitney et al., 2009; Mathieu et al., 2010). Sus efectos dependen del tejido y tipo celular blanco, de su concentración, de la densidad de receptores en la región donde actúan, y de otros tipos celulares presentes, es decir, de las características de su entorno.

Las citoquinas modulan diversos procesos, entre ellos, la función, diferenciación y supervivencia de las CMN y neuronas nuevas (Vitkovic et al., 2000; Mathieu et al., 2010). A su vez, las neuronas nuevas liberan neurotransmisores que afectan el balance del sistema inmune ejerciendo un feedback sobre las acciones de las citoquinas (Kerschensteiner et al., 2009). A nivel sistémico, las citoquinas se han visto involucradas en procesos como el comportamiento, el aprendizaje, el ciclo vigilia-sueño, la regulación de los sistemas inmune y endócrino (Kerschensteiner et al., 2009; Besedovsky y Rey, 2007).

Las citoquinas pueden ejercer efectos sobre el SNC tanto directa como indirectamente. Estímulos inflamatorios periféricos pueden inducir un aumento de citoquinas en el cerebro (Pitossi et al., 1997). Las citoquinas pueden llegar desde la periferia a ciertas regiones del cerebro permeables a la BBB, los órganos

circunventriculares (Konsman et al., 2002). Además, se ha demostrado que existe transporte activo de algunas citoquinas a través de esta barrera (Plotkin et al., 1996; Plotkin et al., 2000). Por otra parte, las citoquinas que circulan en la periferia pueden inducir la expresión de citoquinas en células endoteliales, las cuales pueden ser liberadas al parénquima cerebral (Kerschensteiner et al., 2009). Otra forma en que el aumento de citoquinas periféricas puede afectar el sistema inmune del cerebro es a través de la estimulación del nervio vago (Licinio y Wong, 1997; Johnston y Webster, 2009) o regulando la producción de prostaglandinas y de óxido nítrico (NO) -ambos mediadores de la respuesta inflamatoria- en las células endoteliales de los vasos sanguíneos del cerebro (Licinio y Wong, 1997; Whitney et al., 2009).

Se han identificado más de 40 citoquinas diferentes así como tipos de receptores (Hopkins y Rothwell, 1995). Su característica en común es un amplio rango de acción y un alto pleiotropismo en los efectos que ejercen. Se las puede clasificar funcionalmente en pro- y anti-inflamatorias dependiendo de su efecto final sobre el sistema inmune. Las citoquinas anti-inflamatorias limitan la respuesta inmune, entre otros efectos inhibiendo la acción y síntesis de las citoquinas pro-inflamatorias. Sin embargo esta clasificación no es absoluta ya que existen citoquinas que poseen un comportamiento dual dependiendo del estímulo inicial y las condiciones del entorno. Según sus características funcionales y moleculares se las puede agrupar en familias, aunque algunas citoquinas han sido integradas a diferentes familias debido a la superposición en algunas de sus funciones y homologías estructurales entre ellas. Las principales familias de citoquinas son las interleuquinas (IL), como la IL-1 α , IL-1 β y el receptor antagonista de IL-1 (IL-1ra); la familia del factor de necrosis tumoral (TNF) (tanto TNF- α como TNF- β), la familia de las neurotrofinas como el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) y el factor de crecimiento nervioso (NGF), la familia de factores de crecimiento como el FGF, la familia del factor de crecimiento endotelial (EGF, TGF- α , y el Factor Neurotrófico Derivado de Glía -GDNF), la familia de las neuropoyetinas, entre las que se encuentran la IL-6 y el factor inhibidor de leucemia (LIF), la familia de los interferones y la familia de las quemoquinas (Hopkins y Rothwell, 1995).

A continuación se resumirán los roles que desempeñan en el sistema nervioso las citoquinas y neurotrofinas más relevantes a esta tesis.

La interleuquina 1 (IL-1)

La IL-1 es una citoquina involucrada en una gran variedad de procesos de defensa del organismo, inflamación y respuestas a daños, y como tal se la considera el prototipo de citoquina pro-inflamatoria. Es producida por una variedad de células inmunes incluyendo neutrófilos, macrófagos, fibroblastos, linfocitos en la periferia. En el SNC es producida por CMN (Klassen et al., 2003), astrocitos y microglía (Fogal y Hewett, 2008).

Existen dos moléculas relacionadas, la IL-1 α y la IL-1 β , que son codificadas por distintos genes pero interactúan con el mismo receptor. Ambas se sintetizan como precursores de 31 kDa que son activados por la enzima convertidora de IL-1 (Loddick et al., 1997). Estos dos agonistas se unen al receptor IL-1RI. Existe otro receptor para IL-1 llamado IL-1RII, que carece de dominio intracelular y como tal es incapaz de transducir señales hacia el interior de la célula. El tercer miembro de la familia es el antagonista endógeno IL-1ra, que se une al IL-1RI pero es incapaz de gatillar la asociación de co-receptores y por ende de transducir señales intracelulares.

La expresión de IL-1 es baja en el cerebro y se regula positivamente después de estímulos traumáticos y neurodegenerativos. En general la IL-1 es producto de la activación de la microglía y del reclutamiento de células del sistema inmune en el parénquima cerebral (Allan y Rothwell, 2001; Fogal y Hewett, 2008). La IL-1 a su vez puede estimular la secreción de factores relacionados con la reparación del tejido (Mason et al., 2001).

La IL-1 β es una de las citoquinas más asociadas a enfermedades neurodegenerativas. Se encuentra aumentada en pacientes de las enfermedades de Parkinson (PD), Alzheimer (AD) e infecciones centrales (Fogal y Hewett, 2008). En nuestro laboratorio se ha caracterizado ampliamente el rol de la IL-1 β sobre procesos neurodegenerativos, viéndose involucrada como causante de procesos de desmielinización (Ferrari et al., 2004), muerte de neuronas dopaminérgicas en la *substantia nigra* (Ferrari et al., 2006; Pott Godoy et al., 2010), en el GD (Depino et al., 2005), y exacerbación de la muerte neuronal progresiva de neuronas dopaminérgicas en modelos animales de PD (Pott Godoy et al., 2008; Pott Godoy et al., 2010).

Se han descrito roles inhibitorios de la IL-1 β sobre la neurogénesis adulta y modelos de comportamiento asociados a depresión, como describimos anteriormente (Koo y Duman, 2008; Mathieu et al., 2010).

El Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α)

El TNF- α es una citoquina pro-inflamatoria mayoritariamente producida por células del sistema inmune. En el SNC se encuentra en niveles muy bajos, principalmente expresado por astrocitos (Sternberg, 1997). El TNF- α es una proteína de secreción de 17 kDa. Existen dos tipos de receptores para TNF- α , denominados R1 y R2, expresados ambos tanto por las células de la glía como por las neuronas. El receptor R1 activa una vía de transducción de señales que lleva a la activación del factor de transcripción NF- κ B y/o caspasas, y por lo tanto a la apoptosis, mientras que R2 está asociado a las vías de señalización de NF- κ B y MAPK y media principalmente respuestas inflamatorias (McCoy y Tansey, 2008).

Distintos tipos de células presentes en el SNC, incluyendo los astrocitos, microglía, CMN y neuronas, producen TNF- α frente a diversos estímulos fisiológicos y patológicos (Munoz-Fernandez y Fresno, 1998; Klassen et al., 2003). TNF- α tiene a su vez diferentes efectos en distintos tipos celulares del SNC respecto a la proliferación y/o la supervivencia. TNF- α puede afectar tanto a los astrocitos como a la microglía, en los cuales induce proliferación, como a las neuronas, en los que es tóxico en altas concentraciones (De Lella Ezcurra et al., 2010). Además puede inducir cambios en la reactividad de la microglía (De Lella Ezcurra et al., 2010). Asimismo, la sobreproducción continua de TNF- α soluble en el cerebro de animales transgénicos lleva al desarrollo de desórdenes neurológicos (Akassoglou et al., 1997).

El TNF- α ha demostrado tener efectos adversos sobre la proliferación de CMN y sobre la neurogénesis adulta en el GD a través de la unión a su receptor TNFR1 (Iosif et al., 2006).

La Interleuquina 6 (IL-6)

La IL-6 es una citoquina de 26 kDa que se induce ante estímulos pro-inflamatorios. Posee generalmente un rol pro-inflamatorio aunque en circunstancias particulares también puede actuar suprimiendo la respuesta inmune; estimulando la secreción de glucocorticoides e inhibiendo la síntesis de IL-1 β y TNF- α (Xing et al., 1998; Vallieres et al., 1997). Es expresada en el cerebro casi exclusivamente en condiciones patológicas, principalmente por células microgliales y astrocitos (Vallieres et al., 2002; Pitossi et al., 1997), también por CMN (Klassen et al., 2003). Forma parte de la familia de ligandos del co-receptor gp130 junto con el factor inducible por leucemia (LIF) y otras citoquinas. Es conocida por su rol en la hematopoyesis en la periferia, pero también se ha observado su importancia en la supervivencia de células progenitoras de la médula ósea y la supervivencia, diferenciación y crecimiento neuronal (Munoz-Fernandez y Fresno, 1998). En el cerebro su expresión es relativamente mayor en el hipocampo (Gadient y Otten, 1994).

La IL-6 ha mostrado tener un rol inhibitorio frente a la neurogenesis adulta: se ha reportado que el agregado de IL-6 a un cultivo primario de CMN reduce el porcentaje de diferenciación neuronal (Monje et al., 2003). El rol anti-neurogénico de la IL-6 también ha sido demostrado in vivo, en ratones con sobreexpresión crónica de esta citoquina por los astrocitos (Vallieres et al., 2002).

El Factor de Crecimiento Transformante beta (TGF- β ₁)

Los TGF- β s son una superfamilia formada por más de 100 proteínas diferentes. Entre sus miembros se encuentran TGF- β ₁, TGF- β ₂ y TGF- β ₃, la familia de proteínas BMP y GDNF (Massague y Gomis, 2006; Moustakas y Heldin, 2009). En general son factores con actividad pleiotrópica, importantes en el desarrollo y crecimiento de muchos órganos. Participan en gran cantidad de funciones celulares, entre ellas la proliferación celular, la diferenciación y la angiogénesis (Bommireddy y Doetschman, 2004). Son generalmente anti-inflamatorias (Kulkarni et al., 1993), sin embargo dependiendo del tejido y del estímulo pueden ejercer efectos pro-inflamatorios (Luo et al., 2007).

Las tres isoformas de TGF- β comparten la misma estructura básica y muestran en general actividades similares en los ensayos *in vitro*, aunque la multiplicidad de formas y su alta conservación entre las especies de animales sugieren la existencia de roles específicos para cada una (Flanders et al., 1998). El TGF- β se secreta como precursor inactivo al medio extracelular donde se activa clivándose y generando una proteína de 17 kDa (Moustakas y Heldin, 2009). En el cerebro las tres isoformas de TGF- β son producidas tanto por CMN y neuronas como por células de la glia en diferentes regiones del cerebro como la corteza, hipocampo, estriado, cerebelo y médula espinal (Bottner et al., 2000; Klassen et al., 2003; Battista et al., 2006).

Los TGF- β s participan de varios procesos fisiológicos como el crecimiento de neuritas, la síntesis de neurotransmisores, la formación de sinapsis y la expresión de canales iónicos. Se ha observado además que son importantes en el desarrollo de neuronas dopaminérgicas (Krieglstein et al., 1995; Farkas et al., 2003). Algunas evidencias muestran que no son neurotrofinas *per se* sino que actúan en conjunto con otras neurotrofinas como FGF-2, FGF-8 y GDNF (Krieglstein et al., 1998; Roussa y Krieglstein, 2004).

Por otra parte poseen numerosos efectos sobre el entorno neuronal, entre ellos se encuentran la producción de matriz extracelular en la formación de cicatriz luego de una lesión, el aumento en la expresión de GFAP en los astrocitos frente a determinados estímulos, la inhibición de la proliferación celular (Gomes et al., 2005), y la modulación negativa de la expresión de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β , TNF- α (Fadok et al., 1998) e IL-6 (Benveniste et al., 1994).

TGF- β_1 ejerce diversos efectos sobre las células presentes en su entorno: ha sido propuesto como un mediador en la interacción glia-neurona y de sus efectos sobre la diferenciación de astrocitos (Reilly et al., 1998; de Sampaio e Spohr et al., 2002). En otras circunstancias puede además inhibir la activación y la proliferación de la microglía (Suzumura et al., 1993). Se le ha adjudicado además un rol neuroprotector de neuronas en desarrollo y adultas (Brionne et al., 2003).

El rol de TGF- β_1 sobre la neurogénesis adulta ha sido estudiado en nuestro laboratorio en un modelo de adrenalectomía, en el cual ocurre un aumento en la expresión de TGF- β_1 en correlación con un aumento de la neurogénesis en el GD. Al inyectar en ratas adrenalectomizadas anticuerpos bloqueantes para el receptor de TGF- β_1 tipo II, y consecuentemente bloquear sus efectos fisiológicos, se observó que los niveles de neurogénesis volvían a los originales. De esta manera se demostró que TGF-

β_1 participaba en el aumento de la neurogénesis causado por la adrenalectomía. Los efectos pro-neurogénicos de TGF- β_1 también se demostraron en un cultivo primario de CMN de hipocampo de ratas adultas (Battista et al., 2006).

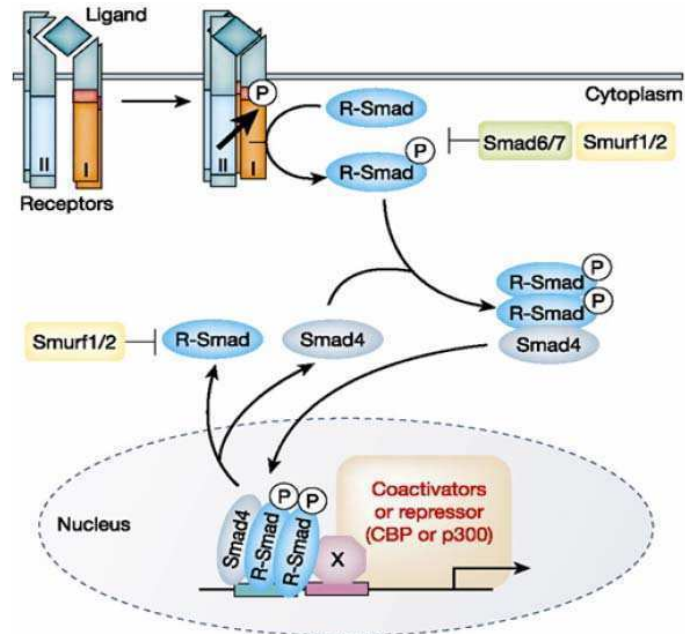


Figura 4. Vía de señalización Smad 2/3, la principal vía de transducción de TGF- β_1 . El primer evento que ocurre es la unión del ligando (TGF- β_1) a su receptor, TβRII. Esto produce la asociación en la membrana del correceptor TβRI, que a su vez gatillará la fosforilación del dominio intracelular del TβRI por el dominio citoplasmático del TβRII. Esto permitirá entonces la fosforilación de las proteínas efectoras, en particular Smad2/3 (R-Smad), que formará un complejo con Smad4. Una de los puntos de regulación de esta vía es la inhibición endógena de la fosforilación de Smad 2/3 por la proteína inhibitoria Smad7. El complejo Smad2/3-Smad4 es capaz de atravesar la membrana nuclear, y una vez en el núcleo de unirse al DNA e inducir genes de respuesta. Adaptado de (Derynck y Zhang, 2003).

El TGF- β utiliza varias vías de señalización. Su vía canónica es la vía Smad (Figura 4). Una de las formas endógenas de regulación de esta vía es la inhibición de la fosforilación de Smad 2/3 por Smad7 (Zhu y Burgess, 2001). La vía Smad 2/3 ha sido involucrada en el aumento de la diferenciación neuronal de un cultivo primario de hipocampo de ratas neonatos (día postnatal 4) incubado con TGF- β (Lu et al., 2005).

Otra de las vías por las que TGF- β señala es la vía NF- κ B, la cual es inhibida por esta citoquina, que ejerce así sus efectos anti-inflamatorios (Massague y Gomis, 2006; Shull et al., 1992).

Factores de crecimiento: FGF y EGF

El FGF-1 y el FGF-2 son los miembros más caracterizados de este grupo. Se ha demostrado que modulan diversas funciones celulares, entre ellas la expresión de genes relacionados con la supervivencia celular y la actividad sináptica. En general, actúan como mitógenos y diferenciadores de muchos tipos celulares como los oligodendrocitos, células de Schwann y astrocitos. Además promueven la supervivencia de neuronas en cultivo (Eckenstein, 1994; Reuss y von Bohlen und Halbach, 2003).

El EGF por su parte, comparte funciones con el TGF- α , pudiendo actuar ambos a través de los mismos receptores -recientemente se los ha incorporado dentro de una misma familia independiente de la de los factores de crecimiento-. El EGF promueve la supervivencia y crecimiento de neuritas de cultivo de neuronas de hipocampo y puede bloquear el daño causado por radicales libres. Su inyección intracerebroventricular puede proteger a las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra (Peng et al., 1998; Wong y Guillaud, 2004).

Glucocorticoides

Una de las formas en que las citoquinas periféricas afectan al cerebro es a través de la estimulación del eje hipotálamo pituitario adrenal (HPA) (Figura 5). Estímulos inflamatorios producen un aumento en la expresión de citoquinas periféricas, lo que lleva a la producción de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) por el hipotálamo. Esta hormona induce la secreción de adrenocorticotropina (ACTH) por la glándula pituitaria, que a su vez induce la consecuente liberación de glucocorticoides (GC) por las glándulas adrenales (Besedovsky y Rey, 2007; Besedovsky y del Rey, 1996). Los GC son importantes moduladores de la respuesta inmune, siendo generalmente su efecto final la supresión del sistema inmunológico frente a estímulos inmunes o de stress. Una de las principales vías utilizadas por los GC es la inhibición de la vía de señalización NF κ B/I κ B (Figura 5) (Sternberg, 1997). Dicha vía es un mediador central de los efectos de varias citoquinas pro inflamatorias, principalmente IL-1 β y TNF- α . Otras citoquinas como TGF- β también son capaces de señalar a través de esta vía (Szelenyi, 2001; Massague y Gomis, 2006).

Los GC son liberados al torrente sanguíneo por la glándula adrenal, y además de ejercer efectos a nivel periférico, son capaces de atravesar la BBB y actuar directamente sobre las células del sistema nervioso. Se ha observado que los distintos tipos celulares presentes en el SNC como las neuronas y la glía expresan receptores para los GC (Garcia et al., 2004). Existen dos receptores con diferentes afinidades y niveles de expresión: el receptor de mineralocorticoides (MR, tipo I) para el cual los GC poseen una alta afinidad y se encuentra en bajos niveles de expresión; y el de glucocorticoides (GR, tipo 2) para el cual los GC poseen baja afinidad, pero se encuentra en altos niveles de expresión. Es por estas características que ambos receptores unen diferencialmente los GC según las condiciones: en estado basal los GC se unen mayoritariamente a los MR, mientras que en estado de activación del eje HPA, y por ende aumento en los niveles de GC, estos ejercen sus efectos principalmente a través de la unión a GR (Spijker y van Rossum, 2009). Una vez que ocurre la unión hormona-receptor, el complejo migra al núcleo y se une al ADN donde modula la transcripción de sus genes blanco (Spijker y van Rossum, 2009).

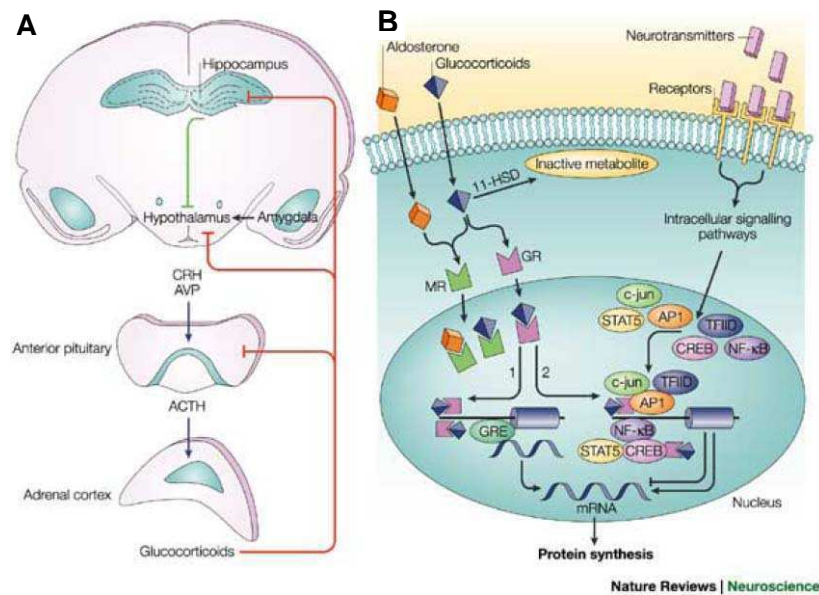


Figura 5.A. Funcionamiento del eje HPA. B. Señalización intracelular de glucocorticoides por los receptores MR y GR. **A.** La liberación de glucocorticoides al torrente sanguíneo está regulada principalmente por la producción de ACTH en la glándula pituitaria, cuya producción está inducida a su vez por la CRH proveniente del hipotálamo. Los glucocorticoides ejercen un feedback negativo sobre su propia síntesis en los distintos centros que conforman el eje. **B.** Vía de señalización intracelular de glucocorticoides. Estos atraviesan la membrana plasmática, y se unen a los receptores tipo I (MR) en condiciones basales o a los receptores tipo II (GR) en condiciones de inducción. Esta unión induce diversos genes de respuesta e interacciona con otras vías de señalización (adaptado de (Sandi, 2004)).

Si bien los GC disminuyen la respuesta inmune en el cerebro, existen evidencias de que los GC frente a determinados estímulos aumentan la respuesta inflamatoria, induciendo el reclutamiento de células del sistema inmune y la liberación de IL-1 β o el TNF- α (Dinkel et al., 2003). Es por eso que se debe considerar a los GC como inmunomoduladores si bien en líneas generales el efecto final que suelen tener es suprimir la respuesta inmune.

Numerosas evidencias indican que un aumento en los niveles de glucocorticoides tienen efectos inhibitorios sobre la neurogénesis adulta en distintos sistemas experimentales (Montaron et al., 1999; Sapolsky et al., 1986; Rodriguez et al., 1998). En nuestro laboratorio se ha caracterizado el rol de los glucocorticoides endógenos sobre la neurogénesis adulta: se ha observado que su ausencia induce un aumento de la proliferación de progenitores neurales, y de su diferenciación neuronal (Battista et al., 2006). Los glucocorticoides constituyen un mecanismo molecular por el cual varios factores ejercen sus efectos sobre la neurogénesis. Algunos de ellos son: el stress agudo (Nacher et al., 2004; Oomen et al., 2007) y el stress prenatal; y la privación del sueño (Mirescu et al., 2006).

Se ha demostrado que ambos receptores de GC se encuentran presentes en la CMN y en las neuronas en sus distintos estadios de diferenciación (Garcia et al., 2004).

I.4 Funciones de las neuronas nuevas. Comportamientos relacionados.

Inicialmente luego del descubrimiento de la neurogenesis adulta, se especuló con la idea de que esta representaba un vestigio evolutivo de organismos más primitivos. Sin embargo, los primeros indicios de posibles roles funcionales de la neurogénesis adulta no tardaron en aparecer. Hoy en día la significancia funcional de la neurogénesis adulta sigue siendo objeto de estudio, aunque se ha llegado a un consenso de que este proceso posee inequívocamente consecuencias funcionales.

Las neuronas nuevas de la ZSG comienzan a recibir inputs funcionales glutamatérgicos entre los 14 y los 18 días (Esposito et al., 2005; Ge et al., 2006) junto con la formación de espinas dendríticas funcionales (Zhao et al., 2006). A los 7 días luego de entrar en el estadio post-mitótico, las neuronas nuevas son capaces de generar potenciales de acción, generar respuestas electrofisiológicas similares a neuronas vecinas nacidas durante el periodo embrionario, y ser integradas dentro de los circuitos

que involucran al hipocampo (Esposito et al., 2005; van Praag et al., 2002; Laplagne et al., 2006). Recientemente se ha demostrado que las neuronas nuevas establecen sinapsis funcionales mayoritariamente con interneuronas de la región del hilus, neuronas de las fibras “mossy” y neuronas piramidales de la región CA3, liberando glutamato como su principal neurotransmisor (Toni et al., 2008).

En cuanto al rol de las neuronas nuevas en distintos comportamientos adultos, este interrogante ha sido extensivamente abordado en paradigmas de diversos comportamientos. Sin embargo, a pesar de las numerosas evidencias hasta la fecha, quedan todavía numerosos aspectos por elucidar, respecto de las características del vínculo funcional entre estos procesos.

A continuación se detallarán los principales modelos comportamentales en los que se ha demostrado intervienen las neuronas nacidas en el cerebro adulto.

I.4.1 Modelos animales de depresión y ansiedad.

Los primeros indicios de que la neurogenesis adulta estaba relacionada con posibles alteraciones del estado de ánimo aparecieron en trabajos que demuestran que los GC, generalmente en niveles elevados en pacientes con depresión, inhiben la proliferación de CMN en el hipocampo adulto (Gould et al., 1992). Hoy, la neurogenesis adulta ha sido vinculada con varios modelos comportamentales de depresión y ansiedad. En particular se ha demostrado que la fluoxetina, un compuesto antidepresivo, aumenta los niveles de neurogénesis adulta; y si este aumento no ocurre, los efectos antidepresivos de la fluoxetina se inhiben (Santarelli et al., 2003). En un trabajo posterior se ha demostrado que la fluoxetina incrementa específicamente la proliferación de los progenitores neurales o CMN, lo que resulta en un aumento de la cantidad de neuronas nuevas en el GD adulto (Encinas et al., 2006). Los antidepresivos como la fluoxetina y compuestos análogos han mostrado también revertir la disminución en la neurogenesis causada por eventos de stress (revisado en (Warner-Schmidt y Duman, 2006)). Sin embargo, los efectos de la fluoxetina no parecen ser generalizados sino depender de la composición genética de los animales en estudio, y del paradigma comportamental utilizado (Miller et al., 2008). Por lo tanto, se debería tener en cuenta que los diferentes antidepresivos actúan mediante distintos mecanismos, y que la modulación de la neurogenesis adulta puede ser sólo uno de ellos.

Más allá de los grandes progresos hechos en el área, no se ha esclarecido si la alteración de la neurogenesis adulta resulta un factor etiológico de la depresión y la ansiedad basales, sobre todo por el hecho de que una disminución de la neurogenesis adulta no altera la performance en una considerable variedad de tests que modelan estos comportamientos (Santarelli et al., 2003; Saxe et al., 2006). Finalmente, y a pesar de que se ha detectado frecuentemente una atrofia en el hipocampo en pacientes con depresión, la posible contribución directa de la neurogenesis adulta a este comportamiento no se ha estudiado.

I.4.2 Modelos animales de aprendizaje y memoria.

El primer abordaje hacia una posible causalidad entre la generación de neuronas nuevas en el cerebro adulto y los mecanismos de memoria y aprendizaje provino del grupo de Elizabeth Gould, en el cual se demostró que la administración de metilazoximetanol (un agente antimitótico) por 14 días, la cual resultaba en una disminución de la neurogénesis adulta, también inhibía la performance en un paradigma comportamental de aprendizaje por condicionamiento clásico (Shors et al., 2001). Este mismo abordaje se llevó a cabo utilizando la irradiación como estrategia para reducir la neurogenesis adulta. Así se demostró que la irradiación además alteraba la performance de ratas en un test de memoria (Winocur et al., 2006). Otro grupo estudió ratones con una disminución en la neurogénesis adulta por irradiación, y observó que estos tenían dificultades en la capacidad de discernir patrones diferentes con una estrecha separación espacial, pero no cuando la separación era mayor (Clelland et al., 2009).

Sin embargo, el problema con estos tratamientos fue que no eran selectivos para la producción de neuronas, e interferían con otras funciones fisiológicas (Bruehl-Jungerman et al., 2007). Por lo tanto, se han desarrollado una variedad de modelos transgénicos con estrategias no invasivas para disminuir la neurogenesis. En uno de ellos se ablacionaron selectivamente las CMN del GD por medio de la administración de Ganciclovir a animales que portaban el gen de la timidin-kinasa río abajo del promotor de Nestina, y se reportó que los animales con neurogénesis disminuida mostraban alteraciones en un comportamiento llamado Condicionamiento Contextual por Miedo (Contextual Fear Conditioning en inglés), un paradigma de memoria/aprendizaje, y además tenían perturbaciones en la respuesta electrofisiológica

de las neuronas (Saxe et al., 2006). Otro grupo ablacionó genéticamente las CMN en animales con un sistema inducible por Doxiciolina, la cual causa la expresión de la proteína Bax en las CMN del hipocampo, provocando su muerte (Lindsten et al., 2003). En estos animales se observaron déficits en la adquisición de memoria espacial en el test de laberinto de agua de Morris (MWM por sus siglas en inglés) (Dupret et al., 2008). Un descubrimiento convergente fue el de Van Praag y colaboradores, quienes encontraron que en animales longevos, y por lo tanto con una menor neurogénesis basal, el ejercicio incrementaba la neurogénesis y en paralelo producía mejoras en la performance del mismo MWM (van Praag et al., 2005).

Por otra parte, se ha postulado que el hipocampo dorsal contribuye mayoritariamente con la memoria espacial, mientras que el hipocampo ventral afecta principalmente a la memoria emocional (Sahay y Hen, 2007).

Existen formas de ablacionar específicamente la neurogénesis alternativas a los animales transgénicos. Una de ellas fue utilizada por el grupo de Fred Gage, y consistió en inyectar estereotáxicamente en el GD un vector lentiviral modificado que expresaba un dominante negativo de la vía Wnt, previamente implicada en la neurogénesis adulta por el mismo grupo (Lie et al., 2005). Esta estrategia, además de reducir la neurogénesis adulta aproximadamente en un 75%, interfirió en un paradigma comportamental de memoria llamado Reconocimiento del Objeto Nuevo (o Novel Object Recognition-NOR su sigla en inglés) (Jessberger et al., 2009). En particular este test cuantifica la exploración de un objeto novedoso en un contexto familiar. La reducción en la neurogénesis adulta resultó en una menor exploración del objeto novedoso, que refleja los niveles de memoria a corto plazo, dependientes de la actividad del hipocampo. En un modelo experimental distinto, la irradiación o exposición a ácido iboténico en el GD –que causa una disminución en la neurogénesis adulta-, la memoria de reconocimiento de objeto se vio afectada (Clark et al., 2000).

Aunque no se ha relacionado todavía a los niveles de neurogénesis adulta con la memoria de reconocimiento de objeto en humanos y primates, se ha establecido un vínculo funcional indirecto entre la actividad del hipocampo y este comportamiento, ya que pacientes con un daño en la formación del hipocampo sufrían de amnesia (McKee y Squire, 1993). Asimismo, monos adultos con lesiones neonatales en el hipocampo mostraron deficiencias en la performance en este tipo de tests (Pascalis y Bachevalier, 1999).

II. Período prenatal

II.1 Características generales. Importancia como período crítico de programación.

Una de las características distintivas del SNC de mamíferos adultos es su limitada plasticidad, definiéndose ésta como la capacidad de hacer ajustes funcionales que modifiquen el medio interno, promoviendo la adaptación del organismo al medio circundante. En la sección anterior mencionamos que algunas zonas del cerebro adulto – la ZSV y la ZSG- retienen algún potencial de plasticidad, a través del constante nacimiento de neuronas nuevas que luego se integran a circuitos funcionales.

Por el contrario, el SNC en desarrollo está caracterizado por una serie de ventanas temporales en las que ocurren importantes procesos de proliferación, diferenciación y migración celular. Durante estos períodos críticos, estos procesos son susceptibles de sufrir modificaciones en función de la experiencia (de Graaf-Peters y Hadders-Algra, 2006). Esta plasticidad temprana del SNC, que involucra también su función coordinada con los sistemas inmune y endócrino, conformaría un mecanismo adaptativo para la supervivencia del individuo en el ambiente que vivirá (Karrow, 2006).

Las relaciones funcionales que se establecen entre los sistemas están determinadas genéticamente y por estímulos ambientales. Esta capacidad de adaptación recíproca entre los sistemas es máxima durante períodos más tempranos (Fox, 1992). Así, el funcionamiento coordinado resultante de esta etapa alcanzará un equilibrio que determinará distintos aspectos de la fisiología adulta. Por lo tanto, las respuestas a modificaciones tempranas de un sistema serán claves en su funcionamiento posterior. El concepto de *programación* surge de la idea de que estímulos tempranos serán potencialmente determinantes del funcionamiento a largo plazo de cierto sistema o conjunto de sistemas.

Existe una gran variedad de estímulos tempranos así como de parámetros que son afectados por éstos. Entre ellos, se destacan los eventos de stress prenatal, alteraciones de la interacción madre-cría durante los primeros días de vida, y estímulos inmunes/inflamatorios durante esta etapa. A continuación ahondaremos en los antecedentes sobre cada uno de ellos y sus principales efectos en diversos aspectos del SNC adulto.

II.2 Distintos estímulos perinatales y sus efectos en el adulto

II.2.1 Stress prenatal

Numerosas evidencias describen que una exposición prenatal a diversos tipos de stress puede afectar parámetros del SNC adulto. El stress por frío y la separación materna (King y Edwards, 1999; Vazquez et al., 2003) han demostrado ser capaces de alterar la programación de varios componentes del eje HPA adulto. También el stress por inmovilización afecta el funcionamiento del eje HPA en animales adultos (Dugovic et al., 1999), el cual es prevenido por la adopción temprana de crías prenatalmente estresadas por madres no estresadas durante su gestación. Esto sugiere que existen interacciones entre los estímulos perinatales que modulan un cierto parámetro de funcionamiento en el adulto.

La modulación en los niveles de GC ha mostrado ser un mecanismo regulatorio de distintos efectos comportamentales por eventos de stress prenatal. Es sabido que el stress prenatal por inmovilización incrementa la producción de GC agudamente ante un estímulo estresor en ratas juveniles (Peters, 1982; Takahashi et al., 1988). Por otra parte, niveles elevados de GC en ratas prenatalmente estresadas son capaces de predecir alteraciones en el sueño (Dugovic et al., 1999). Finalmente, un aumento de GC en humanos puede inducir alteraciones comportamentales (Ling et al., 1981).

Los eventos de stress durante la gestación también afectan distintos parámetros comportamentales en las madres, como ansiedad elevada y alteraciones en el cuidado de las crías (Baker et al., 2008; Champagne y Meaney, 2006). Dado que los niveles de cuidado materno temprano recibido resultan un crítico determinante de comportamientos adultos (Liu et al., 2000a ; Bredy et al., 2003), un cambio en el cuidado materno puede representar un mecanismo de transmisión de efectos de la madre a la cría (ver sección siguiente, Interacción madre-cría). Otros mecanismos de transmisión de efectos a las crías involucran respuestas fisiológicas de la madre a estímulos de stress gestacional, como activación del eje HPA. En este sentido se ha reportado que un bloqueo del aumento de GC en animales que han recibido stress durante su gestación, anula las alteraciones en la respuesta del eje HPA de las crías adultas a un estímulo de stress (Barbazanges et al., 1996).

El stress prenatal por inmovilización ha mostrado poseer también efectos adversos sobre la neurogénesis adulta (Lemaire et al., 2000; Coe et al., 2003; Schmitz et

al., 2002), efecto que también puede ser revertido por una manipulación neonatal de las crías (Lemaire et al., 2006). Estos datos muestran que existen aspectos finos de regulación de algunas funciones que son susceptibles de ser re-establecidas por influencias ambientales en fases críticas del desarrollo.

II.2.2 Interacción madre-cría

La idea de que comportamientos maternos determinados podían afectar funciones específicas en las crías se demostró por primera vez en un estudio que analiza las demandas termorregulatorias y nutricionales de las crías y determina que éstas son satisfechas por el cuidado materno (Hofer, 1984). Más adelante se aceptó el concepto de que los cambios observados en las crías resultado de interacciones maternas son respuestas complejas, que revelan la presencia de varios factores operando simultáneamente. Entre los efectos de la interacción materna sobre la cría se cuentan factores tan diversos como la tasa cardiaca, los patrones de sueño, la liberación de hormona de crecimiento, la actividad del eje HPA (Kuhn et al., 1990), los niveles de BDNF en el cerebro (Roceri et al., 2002), la supervivencia neuronal en el GD de las crías adultas (Bredy et al., 2003), y otros. De este modo, las modificaciones en el cuidado materno constituyen un factor extra que alterará la programación de distintas variables en el adulto (Sullivan et al., 2006).

Es posible manipular experimentalmente los niveles de cuidado materno retirando a la madre de la jaula por cierta cantidad de tiempo. Los tiempos de separación incluyen la *manipulación*, en que la separación es de 15-20 minutos, y la *separación materna*, que dura 2-3 horas. El tiempo de separación correspondiente a la *manipulación* resulta normal incluso en las condiciones de bioterio, ya que la madre suele ausentarse para alimentarse o acicalarse durante ese intervalo de tiempo (Rosenblatt, 1994). En cambio, se han documentado efectos adversos de la *separación materna*. Animales que han sufrido repetidas separaciones maternas muestran una respuesta mayor al stress (Cirulli et al., 2003 ; Champagne et al., 2003 ; Francis et al., 1999). Por otra parte, el protocolo de manipulación aumenta el cuidado materno, mientras que el de separación materna lo disminuye (Plotsky y Meaney, 1993).

En otro modelo experimental de cuidado materno se observó que crías que recibieron un alto cuidado mostraban una menor respuesta del eje HPA luego de un

evento de stress por restricción (Liu et al., 2000b), así como una mayor expresión de BDNF, mayor inervación colinérgica del hipocampo, y un mejor desempeño en tests de memoria y aprendizaje (Liu et al., 2000a); todos parámetros relacionados con una función más eficiente del hipocampo. Por su parte, eventos tempranos de separación materna han resultado en una disminución de la neurogénesis adulta (Mirescu et al., 2004; Oomen et al., 2010). El cuidado materno es susceptible de resultar afectado por eventos que ocurren durante la preñez del animal, como por ejemplo el stress por inmovilización (Baker et al., 2008; Champagne y Meaney, 2006). De este modo, la modulación de los niveles de cuidado materno podría constituir un mecanismo por el cual estímulos prenatales ejercen sus efectos sobre los distintos aspectos del cerebro adulto de las crías.

II.2.3 Inflamación prenatal

La exposición a un patógeno durante el periodo prenatal representa un desafío que no sólo activa al sistema inmune sino que también despierta una respuesta endocrina asociada (Besedovsky y del Rey, 1996). El feto se verá afectado de manera diferencial por esta exposición, dependiendo de la fase gestacional en la que ocurra. La presencia en el plasma de las principales citoquinas pro-inflamatorias TNF- α , IL-1 β e IL-6 se vio aumentada ante el tratamiento con LPS (Cui et al., 2009), o poli I:C, un ARN doble cadena sintético que emula ciertos aspectos de una infección viral (Meyer et al., 2006b).

Una vez que alcanzan el cerebro del feto, estas citoquinas afectan los procesos de desarrollo del SNC en curso. Esta alteración en el desarrollo resulta en modificaciones de diversas funciones del SNC que pueden conducir, entre otras cosas, a algunos aspectos de patologías psiquiátricas en el adulto. Un ejemplo de ello es la alteración por la exposición prenatal a LPS de comportamientos ligados a la esquizofrenia en modelos animales de esta enfermedad (Meyer et al., 2006a; Romero et al., 2010). El patrón preciso de las consecuencias en el adulto estará determinado por el momento en el que ocurre la inflamación, su naturaleza y su intensidad. En el caso de que la inflamación ocurra cerca del nacimiento de las crías, es más probable que las relaciones madre-crías se vean afectadas durante los primeros días de vida,

Una de las estrategias más comunes para estudiar fenómenos inflamatorios es el uso del LPS. Se observó que animales expuestos a este inflamógeno durante el período prenatal tienen cambios permanentes en varios parámetros del funcionamiento del eje HPA: mayor liberación de GC, y menor expresión de ambos receptores de GC en el hipocampo (Reul et al., 1994).

Por otra parte, animales expuestos a LPS durante la primera semana de vida responden más a estímulos estresores en la adultez, mostrando un aumento de ACTH y de GC en un paradigma de restricción (Shanks et al., 2000). Del mismo modo, la administración de IL-1 a ratones de 5 días, produjo en la adultez una menor liberación de ACTH y GC en forma basal, aunque una mayor reactividad ante estímulos inmunes durante la adultez (del Rey et al., 1996).

El SNC en desarrollo está directamente expuesto a respuestas inflamatorias maternas ya que la formación de la BBB comienza alrededor del día 17 de desarrollo embrionario. Por otra parte, se sabe que estímulos pro-inflamatorios durante el desarrollo y en la adultez, incrementan significativamente la permeabilidad de la BBB (Yan et al., 2004; Stolp et al., 2005). Además, estímulos pro-inflamatorios recibidos durante el período prenatal reportan un aumento agudo en la expresión basal de citoquinas como TNF- α (Cai et al., 2000), IL-1 β e IL-6 (Meyer et al., 2006b; Cai et al., 2000) en el cerebro fetal. Otros parámetros de respuesta inmune local aguda también se observan en el cerebro fetal, como la activación microglial y la astrocitosis (Cai et al., 2000; Roumier et al., 2008).

Con respecto a la respuesta comportamental observada, diversos trabajos muestran distintos correlatos comportamentales de los efectos tempranos de la inflamación. Se ha observado que la administración de IL-6 durante el período prenatal causa alteraciones en comportamientos relacionados a modelos animales de esquizofrenia y autismo (Smith et al., 2007). En la misma línea, la exposición al LPS durante el período prenatal ha mostrado efectos comportamentales relacionados con modelos de esquizofrenia (Romero et al., 2010; Meyer et al., 2005). También el poli I:C administrado prenatalmente causa alteraciones en comportamientos ligados a la ansiedad (Meyer et al., 2006b).

Objetivo e Hipótesis

El **objetivo** de esta tesis es estudiar los efectos de un estímulo inflamatorio administrado durante el período prenatal sobre la neurogénesis en el giro dentado de ratas adultas y sobre sus paradigmas comportamentales asociados. Asimismo pretendemos investigar los posibles mecanismos de acción involucrados en estos efectos.

La **hipótesis de trabajo** supone que una exposición prenatal a un estímulo pro-inflamatorio provoca una disminución en la neurogénesis adulta y en sus comportamientos asociados, mediante la alteración permanente de determinados aspectos de la fisiología del animal y específicamente del nicho neurogénico.

_____ **Materiales y Métodos**

I. Animales

En esta tesis se utilizaron ratas *Wistar* preñadas (250-300 g) y sus crías macho adultas (día postnatal 60 – P60) que se mantuvieron en condiciones de temperatura controlada ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) y luz artificial bajo un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad y con alimento y agua *ad libitum*. Todos los procedimientos animales se realizaron de acuerdo a reglamentos de utilización de animales de laboratorio del Instituto Nacional de Salud, Estados Unidos. Todos los experimentos fueron aprobados por el Comité Ético de la Fundación Instituto Leloir.

II. Tratamientos de animales

Las ratas preñadas fueron mantenidas en jaulas individuales, y recibieron inyecciones subcutáneas (sc) de LPS (0.5 mg/kg; cepa 0111:B4, Sigma-Aldrich, MA, USA) o solución salina en los días de gestación 14, 16, 18 y 20. Las crías nacieron al día 21 de gestación aproximadamente, y fueron reducidas a camadas de 10 cuando fuera necesario para evitar diferencias de cuidado materno y lactancia. Las camadas fueron luego destetadas en el día postnatal 21, y fueron distribuidas de a 5 animales por jaula hasta la adultez (P60). Para identificar y estudiar las células en activa proliferación en el GD, los animales se inyectaron intraperitonealmente (ip) con 5-Bromo-2'-Deoxiuridina (BrdU, 50 mg/kg) diariamente por 7 días. Al día 7, 14 o 30 luego de la última inyección, dependiendo del experimento, los animales se perfundieron y sus cerebros fueron procesados para técnicas inmunohistoquímicas como se describe más adelante.

Alternativamente, ratas *Wistar* macho adultas (P60) prenatalmente tratadas con LPS o salina recibieron una inyección ip de LPS (1 mg/kg), seguida de 7 inyecciones diarias de BrdU y perfusión al día 7.

Alternativamente, ratas *Wistar* macho adultas (P60) prenatalmente tratadas con LPS o salina recibieron una inyección estereotáxica de vectores adenovirales expresando los transgenes TGF- β_1 de cerdo o β -Galactosidasa en las coordenadas del GD del hipocampo, fue seguida de 7 inyecciones ip diarias de BrdU desde el día 2 al 9 post-última inyección, y de la perfusión al día 14.

Para realizar las inyecciones estereotáxicas, los animales fueron anestesiados con clorhidrato de ketamina (80 mg/kg) y xilazina (8 mg/kg), y luego inyectados en el

DG con 1×10^7 pfu/ μ l de vectores adenovirales expresando o β -Galactosidasa (Ad β gal), o TGF- β_1 (AdTGF β). Las coordenadas de inyección en el DG fueron: bregma, -3.3 mm; lateral, +1.7 mm; ventral, -3.5 mm.

Alternativamente, ratas *Wistar* macho adultas (P60) sin tratamiento prenatal recibieron 4 inyecciones ip de LPS (1 mg/kg) o salina día por medio. Luego de 60 días, las ratas se inyectaron diariamente con BrdU por 7 días, se perfundieron al día 7 y sus cerebros fueron procesados para técnicas inmunohistoquímicas como se describe más adelante.

III. Vectores

Los vectores adenovirales utilizados en esta tesis fueron el AdTGF β , el adenovector que expresa el transgen Smad7 (AdSmad7), y el Ad β gal como control de experimento. El Ad β gal fue amablemente provisto por el Dr. J. Mallet (Hospital Pitie Salpetriere, Paris, Francia), el AdTGF β por J. Gauldie (Department of Pathology, McMaster University, Ontario, Canada) y el AdSmad7 por la Dra. M. Fujii (Department of Biochemistry, The Cancer Institute, Tokyo, Japan).

Amplificación de los stocks de adenovectores

Los vectores utilizados son derivados de adenovirus humanos de serotipo 5. Poseen deletada la región E1, esencial para la replicación, y por lo tanto son no replicativos. En consecuencia, la amplificación de estos vectores se realiza en células HEK 293, una línea celular derivada de riñón embrionario humano, que posee la región E1. De este modo, el adenovirus, al transducir las células, obtiene en forma *trans* las proteínas necesarias para la replicación viral.

Con el objetivo de generar stocks para obtener suficiente material de trabajo, se amplificó el número de vectores en células HEK 293 a partir de alícuotas de los virus. En primer lugar se realizó una infección en una placa de 10 cm de diámetro (p100) con el adenovector proveniente de una alícuota, con el objetivo de generar una *semilla*. Brevemente, se infectaron células HEK 293 en un 80% de confluencia aproximadamente, con una multiplicidad de infección (MOI, multiplicity of infection) de 1000. La alícuota del adenovector se diluyó en medio DMEM alta glucosa con 2% de suero fetal bovino (SFB, Natocor), y se colocaron 2 ml en la placa. Esta se incubó a

37°C durante 2 horas con agitación cada 20 minutos. Luego, se cambió el medio por DMEM alta glucosa con 10% de SFB y se observaron las células hasta detectar un efecto citopático. El mismo se visualiza como células redondeadas y refringentes, que a medida que el efecto citopático avanza van formando una red. En este momento se disociaron las células mecánicamente, y se realizaron tres ciclos de congelado en nitrógeno líquido y descongelado en baño a 37°C, con el objetivo de lisar las células y liberar los virus. A continuación, se centrifugaron las células a 4000 rpm por 10 minutos, con el objetivo de eliminar el debris celular, de modo que se obtuvo en el sobrenadante la *semilla* del virus.

Por otro lado, se amplificaron células HEK 293 hasta obtener 30 placas de 15 cm de diámetro (p150). El sobrenadante de la semilla se diluyó en 220 ml de DMEM alta glucosa con 2% de SFB. Luego se agregaron 7 ml de la semilla diluida en el medio a cada una de las p150, donde las células se encontraban en un 80% de confluencia aproximadamente. De modo similar a lo descrito anteriormente para la semilla, las células se incubaron a 37°C durante 2hs con agitación cada 20 minutos y luego se cambió el medio por DMEM alta glucosa con 10% de SFB. Nuevamente se esperó hasta observar el efecto citopático y se obtuvo el virus lisando las células (con tres ciclos de congelado y descongelado, como se describió anteriormente) y precipitando el debris celular por centrifugación.

A continuación se realizó la purificación de los adenovectores a partir del sobrenadante obtenido previamente mediante dos gradientes de cloruro de cesio y una cromatografía en columna de Sephadex. Por cada stock se prepararon cuatro tubos de Polyallomer, con 2.5 ml de cloruro de cesio con densidad 1.6 g/ml en la parte inferior y 2.5 ml de densidad 1.3 g/ml en la parte superior. El sobrenadante conteniendo los adenovectores se colocó sobre el cloruro de cesio (un máximo de 6 ml), y se ultracentrifugó a 35000G por 90 minutos a 20°C. Al terminar la centrifugación pudieron observarse en el gradiente dos bandas: la superior corresponde a cápsides vacías, y la inferior al virus completo. Por lo tanto, se extrajo con una aguja la banda inferior y se colocó en un tubo, sobre 5 ml de una solución de cloruro de cesio de densidad 1.34 g/ml. Nuevamente se ultracentrifugó a 35000g a 20°C, esta vez por 18 horas. Se visualizó una única banda con el virus, la cual se extrajo con una aguja. Luego esta se colocó sobre una columna de Sephadex G25 PD-10, previamente estabilizada con 30 ml de Tris 10 mM (pH 7.8), MgCl₂ 1 mM y glicerol 10%. Para eluir el virus, se pasaron por la columna 12 alícuotas de 500 ul de la misma solución, y se colectaron las 12

fracciones en tubos con 50 μ l de glicerol. Para su cuantificación, se separaron alícuotas de cada una de las fracciones y se las inactivó agregando una solución de SDS 0.5% y Tris-HCl 0.02 M (pH 7.5) e incubando durante 30 minutos a temperatura ambiente. A partir de la cuantificación del número de partículas totales mediante densidad óptica a 260 nm, se seleccionó la fracción con el mayor valor de absorbancia para ser alicuotada y congelada a -80°C hasta su uso.

Cuantificación de los adenovectores

Se cuantificó el número de partículas totales midiendo densidad óptica a 260nm. Una OD 260=1 corresponde a un título de $1,1 \times 10^{12}$ partículas totales/ml (AdEasy Vector System). También se determinó la relación de la absorbancia a 260nm y 280nm, que permite evaluar la pureza de la preparación.

El título de partículas infectivas se determinó utilizando el método de dosis infectiva 50 (TICD50, del inglés Tissue Culture Infective Dose 50) en células HEK 293. Para ello, se sembraron, en placas de 96 pocillos, 10.000 células por pocillo en medio DMEM alta glucosa con 2% de SFB y 50 mM de Hepes (medio de siembra). Al día siguiente se llevó a cabo la infección. En primer lugar se prepararon diluciones seriadas al décimo del adenovector en el medio de siembra. La infección con cada dilución se realizó por sextuplicado, correspondiendo una fila de seis pocillos a cada dilución, desde 1×10^{-8} hasta 1×10^{-14} . Luego se retiró el medio de la placa, y se colocaron 100 μ l de la dilución correspondiente por pocillo. A una fila de seis pocillos se le colocó medio DMEM alta glucosa con 4% de SFB, sin adenovector, como control de viabilidad celular. Este esquema se hizo por duplicado para cada virus, en dos placas de 96 pocillos diferentes. Las células fueron incubadas a 37°C por 10 días. Luego de ese tiempo se cuantificó bajo microscopio el número de pocillos con efecto citopático para cada dilución. El título, expresado en partículas infectivas/ml, se calculó usando la siguiente fórmula:

$$\text{TICD50} = a \log [d + 0.5 + (6 + n)/6]$$

Donde d es el orden de la última dilución donde todos los pocillos tienen efecto citopático y n es el número de pocillos con efecto citopático en la siguiente dilución.

Para los adenovectores utilizados, se obtuvieron los siguientes títulos que corresponden a la cantidad de partículas infectivas: Ad β gal = 5.56×10^{11} pfu/ μ l; AdTGF β = 1.1×10^{12} pfu/ μ l; AdSmad7 = 1.05×10^{12} pfu/ μ l.

Extracción del ADN de los adenovectores

En primer lugar, se obtuvo el ADN de los adenovectores utilizando un protocolo basado en el método de HIRT (Hirt, 1967). A una alícuota de 5 ul del adenovector se le agregaron 30 ul de SDS 20%, 20 ul de EDTA 0.5 M, 5 ul de proteinasa K 20 mg/ml y 340 ul de PBS, se invirtió suavemente el tubo y se incubó 1hs a 55°C, con el objetivo de lisar los adenovectores. A continuación se agregaron 100 ul de NaCl 5 M, se invirtió suavemente, y se colocaron 400 ul de una mezcla en partes iguales de fenol/cloroformo. Luego de mezclar suavemente, se agregó 1 ml de etanol 100% y se incubó 30 minutos a -20°C. Al centrifugar 30 minutos a 13000 rpm, se precipitó el ADN, que se lavó con etanol 70% y se dejó secar. Finalmente, se lo resuspendió en 50 ul de agua miliQ autoclavada.

Caracterización de los vectores por mapeo de restricción

Para corroborar la identidad de cada vector, se lo digirió con enzimas de restricción y se compararon los perfiles de restricción con perfiles conocidos. Las digestiones se realizaron con las enzimas Bgl II y Hind III, por separado. Se incubaron 5 ul de la muestra de ADN, 1.5 ul del buffer correspondiente y 0.3 ul de la enzima de restricción, en un volumen total de 15 ul, en un baño a 37°C durante 40 minutos. El producto de esta digestión se corrió en un gel de agarosa 1% con bromuro de etidio (0.5 mg/ml) durante toda la noche a 30V.

Verificación de la ausencia de virus replicativos

Para verificar que los adenovectores, que como ya se mencionó son no replicativos, no hubieran incorporado la región E1 por recombinación con el genoma de las células HEK293, se llevó a cabo una PCR para detectar dicha región en el ADN viral. Como control positivo, se utilizó una curva de distintas concentraciones (1 ng, 100 pg, 10 pg y 1 pg) del genoma del adenovirus tipo 2 (Invitrogen), que es replicativo y por lo tanto posee la región E1 (Lochmuller et al., 1994).

La secuencia de los primers utilizados para detectar la región E1 fue la siguiente:

Primer	Secuencia
A	5'-GACGCCCCGACATCACCTGTG-3'
B	5'-CGGCGAGCGCCTTCTGGCGG-3'

Las muestras se corrieron luego en un gel de agarosa 1% con bromuro de etidio (0.5 mg/ml), y se evaluó la presencia o ausencia de la banda correspondiente al producto de amplificación de la región E1, que tiene aproximadamente 4 Kb. Los adenovectores utilizados en esta tesis dieron un resultado negativo para este test.

Determinación de la presencia de LPS

Se estudió si los stocks de adenovectores presentaban contaminación con LPS utilizando el test Pyrotell (Pyrolab), que es un test de LAL (del inglés, *Limulus amoebocyte lysate*), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El LAL es un extracto acuoso de amebocitos del cangrejo *Limulus polyphemus*. Estos amebocitos reaccionan con el LPS formando un coágulo, propiedad que es utilizada por el test para evaluar la presencia de LPS en una muestra. Este test fue llevado a cabo por Mariela Chertoff en nuestro laboratorio. Los adenovectores utilizados en esta tesis dieron un resultado negativo para este test.

IV. Procesamiento del tejido

Los animales fueron anestesiados profundamente con clorhidrato de ketamina (80 mg/kg) y xilazina (8 mg/kg), y perfundidos transcardíacamente con solución salina heparinizada (0.9% de NaCl, 0.25U/ml de heparina en agua miliQ, aproximadamente 50 ml por rata) seguida de paraformaldehído frío al 4% en buffer fosfato en una concentración 0.1 M (PB 0.1M; pH=7.2) (aproximadamente 300 ml por animal). Las perfusiones se realizaron a un flujo constante (200 ml en 30 minutos) utilizando una bomba peristáltica (Masterflex, Cole-Palmer Instrument Co., IL, USA). Luego, los cerebros fueron extraídos, y post-fijados en la misma solución fijadora a 4°C. El siguiente paso fue criopreservar los cerebros mediante inmersión en una solución conteniendo 30% de sacarosa en PB 0.1M, hasta que estos adquirieran mayor densidad que la solución (4-5 días), y dejaron de flotar en el tubo. Finalmente, los cerebros fueron congelados en una solución de isopentano (J.T.Baker, NJ, USA) enfriada en un baño de etanol puro y hielo seco, por 3 a 5 minutos.

Los cerebros fueron seccionados en un crióstato (Leica) en series coronales de 40µm que incluyeran al hipocampo (entre -2.3 mm y -5.2 mm desde el bregma). Las secciones de 40µm de grosor fueron conservadas en una solución criopreservadora (3

volúmenes de glicerol, 3 volúmenes de etilenglicol, 4 volúmenes de PB 0.1M) a -20°C hasta su utilización.

Luego de realizarse tinciones o inmunohistoquímicas, las secciones fueron ubicadas sobre portaobjetos gelatinizados con ayuda de pinceles de pelo de marta, en la superficie de una placa p100 con PB 0.1M. Una vez secas, se sumergieron brevemente los portaobjetos en un coplin conteniendo PB 0.1M, e inmediatamente luego de extraerlos del coplin se montaron en cubreobjetos con unas gotas de Mowiol (Calbiochem, La Jolla, CA, USA).

V. Técnicas histoquímica e inmunohistoquímicas

Para colocalizar BrdU y otros marcadores de tipo celular, una de cada 6 secciones coronales fue incubada por 2 horas en formamida 50% a 65°C , lavadas con buffer citrato salino-de sodio 2x (SSC; NaCl 0.3 M, citrato de sodio 0.03 M), incubadas por 30 min a 37°C en HCl 2 M, enjuagadas en buffer borato 0.1 M pH 8.5, y extensivamente lavadas en buffer Tris-salino (TBS; Tris-HCl 50mM pH 7.4, NaCl 150mM). Las secciones fueron luego bloqueadas en suero de burro 1% en TBS con Triton X-100 0.1% (solución de bloqueo) por 45 minutos a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios fueron diluidos en solución de bloqueo, y las secciones fueron incubadas por 48 hrs a 4°C . Luego de 2 lavados con PB 0.1 M, se incubaron las secciones en anticuerpos secundarios diluidos en PB 0.1 M por 2 hrs a temperatura ambiente. Se lavaron las secciones nuevamente 2 veces con PB 0.1 M, se colocaron en portaobjetos gelatinizados, y se montaron con Mowiol como se explica en la sección IV.

Los anticuerpos primarios utilizados fueron anti-BrdU hecho en rata (1:200; Abcam, Cambridge, UK), anti-gliial fibrillary acidic protein (GFAP) hecho en conejo (1:500; Chemicon, Temecula, CA); anti-polysialinated neuronal cell adhesion molecule (PSA-NCAM) hecho en ratón (1:200, provisto por Dr. Seki, Department of Anatomy, Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan); anti NeuN hecho en ratón (1:200, Chemicon); anti Doublecortin hecho en conejo (DCX, 1:400, Abcam); y anti Nestina hecho en ratón (1:200, BD Biosciences-Pharmingen, San Jose, CA, USA). Los anticuerpos secundarios utilizados fueron anti-rata hecho en burro conjugado a Cy2,

anti-ratón hecho en burro conjugado a Cy3, y anti-conejo hecho en burro conjugado a Cy3 (1:200; Jackson Laboratories, West Grove, PA).

Para marcar con la lectina *Griffonia simplicifolia* (GSAI-B4) o anti-GFAP solamente, una de cada 6 secciones coronales de cerebro fueron incubadas en GSAI-B4 (1:100; Vector Laboratories, Burlingame, CA) o GFAP por 24 hrs a 4 °C. Luego de 2 lavados con PB 0.1M, las secciones fueron incubadas en anticuerpos secundarios diluidos en PB 0.1M por 2 hrs a temperatura ambiente. Luego, las secciones fueron lavadas 2 veces con PB 0.1M, colocadas en portaobjetos gelatinizados y montadas en Mowiol como se explica en la sección IV..

Los anticuerpos secundarios utilizados fueron anti-conejo hecho en burro conjugado a Cy3, y streptavidina conjugada a Cy2 (1:200; Jackson).

VI. Tinción con Hoescht

Una de cada 6 secciones coronales del cerebro comprendiendo el hipocampo fue incubada con el colorante nuclear Hoescht (1:1000) en PB 0.1M por 5 minutos. Luego se realizaron 2 lavados de 10 minutos con PB 0.1M, se colocaron en portaobjetos gelatinizados, y se montaron con Mowiol como se explica en la sección IV.

VII. Tinción con X-Gal

Para estudiar la distribución del Ad β Gal en el GD, se analizó la expresión de la enzima β -galactosidasa incubándola con un sustrato (X-Gal), resultando un producto de color azul. Para ello, se mezclaron (volumen por muestra): 100 μ l de PBS 10X, 1.3 μ l de MgCl₂, 60 μ l de K₃(CN)₆, 60 μ l de K₄(CN)₆, 50 μ l de sustrato X-Gal y 730 μ l de agua miliQ. Las muestras se incubaron en esta solución por 30 minutos a 37°C. Luego, se lavaron con PBS 2 veces por 10 minutos, se colocaron en portaobjetos gelatinizados, y se montaron con Mowiol como se explica en la sección IV.

VIII. Cuantificación de dobles inmunofluorescencias, microglía activada y núcleos apoptóticos

Células en proliferación.

Se realizó una inmunohistoquímica para BrdU a una de cada 6 secciones coronales comprendiendo el hipocampo. Las células positivas para BrdU en la ZSG y en la capa granular fueron cuantificadas a un aumento de 40X en un microscopio de fluorescencia (Olympus). El número total de células positivas para BrdU por mm^3 de GD se estimó multiplicando el número de células contadas por 0.24 (dado que se contaron 1 de cada 6 secciones de $40 \mu\text{m}$ (o 0.04mm) de grosor, y $6 \times 0.04\text{mm} = 0.24$), y dividiendo este número por el volumen total del GD, calculado manualmente utilizando el sistema de análisis de imágenes Image Pro (Media Cybernetics, Silver Spring, MD).

Dobles inmunofluorescencias con BrdU.

Una de cada 6 secciones coronales del hipocampo, a las cuales se realizó una inmunohistoquímica para BrdU y un marcador de tipo celular, fueron observadas a un aumento de 40x en un microscopio confocal Zeiss LSM 510 equipado con lasers de Argón y He/Ne con emisiones a 488 nm y 543 nm, respectivamente. Se seleccionaron aleatoriamente 4 campos por cada rata, que fueron escaneados a lo largo de todo el eje Z. Se contaron entre 50 y 100 células BrdU positivas totales por rata. Las neuronas nacidas en el cerebro adulto fueron identificadas como las positivas para BrdU y para un marcador neuronal, como PSA-NCAM o DCX (que marcan neuronas jóvenes) o NeuN (que marca neuronas maduras). La tasa de neurogénesis se expresó como el porcentaje de células doblemente positivas sobre el total de células BrdU analizadas. Las CMN presentes en el GD fueron identificadas como las células positivas para BrdU y para un marcador de CMN, como Nestina o GFAP. La tasa de proliferación de CMN se expresó como el porcentaje de células doblemente positivas sobre el total de células BrdU analizadas.

Microglía activada.

Se realizaron las cuantificaciones de activación de microglía en secciones marcadas con GSAI-B4, que reconoce la microglía en todos sus estadios.

Se definieron 4 estadios de de la microglía (I al IV) (Figura 3, Introducción): en el estadio I, la microglía se encuentra en reposo, y presenta un cuerpo celular casi imperceptible, con varias ramificaciones finas y prolongadas. En el estadio II, las

células presentan un cuerpo celular elongado, con ramificaciones más cortas y engrosadas. En el estadio III, las células presentan una morfología redondeada, con pocas ramificaciones cortas y gruesas. En el estadio IV las células presentan una morfología redondeada sin ramificaciones, y son positivas para ED1, un marcador de actividad fagocítica. La microglía activada comprende los estadios II al IV. En el caso del presente modelo experimental, solo se divisaron estadios de activación II y III, que fueron contados a lo largo de todo el GD en una de cada 6 secciones coronales del hipocampo. El número total de células positivas para GSA en estadios de activación II-III por mm^3 de GD se estimó multiplicando el número de células contadas por 0.24, y dividiendo este número por el volumen total del GD, calculado manualmente utilizando el sistema de análisis de imágenes Image Pro (Media Cybernetics, Silver Spring, MD).

Núcleos apoptóticos.

Los núcleos apoptóticos a lo largo de la capa granular y la ZSG fueron visualizados y cuantificados a una magnificación de 100X en un microscopio de fluorescencia. El número total de núcleos apoptóticos en el GD se estimó multiplicando el número de núcleos observados por 0.24.

Todos los conteos se realizaron a doble ciego.

IX. Radioinmunoensayo (RIA)

Se realizó un RIA para determinar la cantidad de corticosterona en suero, a partir de sangre recolectada del extremo de la cola de ratas adultas (P60) a las 2, 4 y 6 horas luego de una inyección ip de LPS (1 mg/kg) o solución salina. Se obtuvo el suero dejando la sangre durante 30 minutos a temperatura ambiente y centrifugando a 1000g durante 15 minutos. Se partió de muestras de 20 μl de sobrenadante (suero). Estas fueron inactivadas con calor (90 minutos a 70°C). Luego se realizaron 2 extracciones consecutivas con 500 y 300 μl de éter etílico. Las muestras se dejaron secar, y se resuspendieron en 100 μl de buffer B (Tris pH 8, 0.05M, NaCl, 0.1M, Azida zódica 0.1% y BSA 0.1%).

Las condiciones del RIA debieron ser puestas a punto, y se estableció que la mejor concentración a usar de las muestras fue una dilución al quinto en buffer B (volumen final de cada dilución: 100 μl). Dentro del experimento se realizó una curva de calibración con concentraciones conocidas y crecientes de corticosterona para poder

luego estimar las concentraciones de corticosterona en las muestras. Se utilizó una solución estándar de corticosterona (2 µg/ml en etanol) y una cantidad fija de corticosterona marcada con tritio (³H-corticosterona-NEN Life Science Products, Inc., Boston, MA, USA).

El protocolo llevado adelante fue el provisto por la hoja de datos del anticuerpo primario (Sigma): se colocó en un tubo de polipropileno 100 µl de solución estándar o muestra más 500 µl de una dilución 1:10 de anticuerpo anti-corticosterona en buffer AB (Tris pH 8, 0.05M, NaCl, 0.1M, Azida zódica 0.1%). Se mezcló con vortex y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregaron a cada tubo 100 µl de ³H-corticosterona diluida 1:10000 en buffer B. Se mezcló con vortex y se incubó toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente se enfrió durante 15 minutos a 4 °C y se le agregó a cada tubo 200 µl de una mezcla de carbón (0.5%) y dextrano (0.05%) en buffer B. Se mezcló y se incubó en hielo durante 10 minutos a 0 °C. Se centrifugó a 2000g por 15 minutos a 4 °C. Se retiró cuidadosamente el sobrenadante y se colocó en otro tubo. A este se le agregaron 2ml de líquido de centelleo (POPOP-PPO) y se determinó la radiactividad en un contador WALLAC.

Las cuentas totales (aproximadamente 10000cpm) fueron determinadas incubando el radioactivo solo, es decir en ausencia de corticosterona, anticuerpo y carbón dextrano. La unión no específica se calculó incubando la corticosterona radioactiva en ausencia de corticosterona sin marcar (fría) y anticuerpo. La cantidad máxima de unión se determinó mediante la incubación en presencia de anticuerpo y carbón-dextrano, y en ausencia de corticosterona fría.

X. Cultivo celular e inmunocitoquímica

Los experimentos *in vitro* fueron realizados en células derivadas de un cultivo de CMN de hipocampo de ratas adultas (6 semanas de edad) previamente establecido en el laboratorio (Battista et al., 2006). Las células fueron mantenidas en medio DMEM/F12 suplementado con FGF-2 (20 ng/ml) (Peprotech) y N2 (1X) (Invitrogen) (*Medio de proliferación*), en placas con coating previo de poli-ornitina (Sigma) y Laminina (Sigma). El medio se cambió regularmente cada 2 a 3 días. Los pasajes se realizaron a una confluencia de un 80%, mediante un breve tratamiento con tripsina (30 seg. a 1

min.), seguido de un lavado con medio DMEM/F12 sin agregados, y un replaqueo en medio DMEM/F12 con FGF-2 (20 ng/ml) y N2 agregados a la dilución deseada.

Para los experimentos de diferenciación, se plaquearon aproximadamente 3.5×10^4 células/ml. en cubreobjetos redondos en placas de 24 pocillos, con coating de poliornitina y laminina (día 0). Luego de 24 horas (día 1) se transdujeron las células con dosis equivalentes de adenovectores recombinantes para Smad7 o β -galactosidasa (5×10^8 partículas infectivas/ml) en medio DMEM/F12 sin agregados. Cada 20 minutos se movieron suavemente las placas de modo de lograr una distribución homogénea de los adenovectores, y luego de 2 horas se cambió el medio por DMEM/F12 con N2 agregado, con una menor concentración del mitógeno FGF-2 (0.5 ng/ml), y con el agregado extra de Suero Fetal Bovino (1%) (Hyclone, UT, USA) y Forskolina (0.5nM) (Sigma) (*Medio de diferenciación*). Al día siguiente (día 2) se incubaron las células con distintas dosis de TGF- β_1 recombinante humano (0.1-10 ng/ml) (Peprotech) en el Medio de diferenciación por 48 hs. Luego (día 4), se realizó un reemplazo por el mismo medio por otras 48 hs. Al día 6, las células fueron lavadas 2 veces con PBS, y fijadas con paraformaldhído 4% en PBS por 10 minutos a 4°C. Luego, se realizaron 2 lavados adicionales con PBS y se guardaron las células a 4°C por no más de 5 días, o alternativamente se procedió a realizar la inmunocitoquímica.

Para la inmunocitoquímica, las células se lavaron con PBS más 0.1% de Tritón X-100 (PBS-Tx) 2 veces por 5 minutos. Luego se bloquearon con Suero de burro 1% en PBS-Tx por 30 minutos a temperatura ambiente. El siguiente paso fue la incubación con anticuerpos (anti- β III-tubulina 1:000 hecho en ratón (Promega); o anti-Nestina 1:000 hecho en ratón (Pharmingen, NJ, USA) en solución de bloqueo por 2 horas a temperatura ambiente. Luego, se realizaron 2 lavados de 5 minutos con PBS, y se incubaron las células con los anticuerpos secundarios: anti-ratón hecho en burro conjugado a Cy3 1:1000 (Jackson laboratories) en PBS por 2 horas a temperatura ambiente y a resguardo de la luz. Posteriormente, se realizaron 2 lavados de PBS, y se incubaron las células con Hoescht 1:1000 (Sigma) en PBS por 5 minutos. Luego de 2 lavados con PBS, los cubreobjetos se montaron en portaobjetos con Mowiol (Calbiochem).

Las células se observaron en un microscopio de fluorescencia, y se fotografiaron 4 áreas al azar por cada cubreobjetos. Cada tratamiento se realizó en 3 cubreobjetos. En cada área, se contaron el total de núcleos (teñidos con Hoescht), y la cantidad de células

positivas para el marcador de interés (β III-tubulina o Nestina). Luego se calculó para cada cubreobjetos la proporción de células contadas (positivas para Hoescht) que expresaba el marcador de interés (β III-tubulina o Nestina). Los conteos se realizaron manualmente o utilizando el software Image Pro Plus, en condiciones de doble ciego. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes.

XI. Extracción de ARN, transcripción reversa (RT) y PCR en tiempo real

Se obtuvieron cerebros enteros de fetos en el día de gestación 14 (E14), y secciones coronales correspondientes al hipocampo de neonatos en su día de nacimiento (P0). Los animales adultos (P60) fueron decapitados, y sus hipocampos disectados. El tejido obtenido fue inmediatamente congelado en nitrógeno líquido y conservado a -80°C hasta su utilización. La extracción de ARN, la RT y la PCR en tiempo real se realizaron como se ha detallado previamente (Battista et al., 2006; Ferrari et al., 2004). Brevemente, el tejido fue homogeneizado en Trizol (TRI Reagent, Sigma). Se agregó acrilamida lineal (5 mg/ml; Ambion) como carrier y se extrajo la mezcla con cloroformo. Se precipitó la fase acuosa con isopropanol, se lavó con etanol y se resuspendió en 20 μl de agua miliQ libre de RNAsas. La RT se realizó incubando 10 μg de ARN con oligo-dT (Invitrogen, San Diego, CA, USA), enzima y buffer SuperScript First-strand Synthesis (Invitrogen), de acuerdo a las indicaciones de fabricación. Para la PCR en tiempo real, se agregaron 23 μl de Master Mix conteniendo SYBR Green, a 2 μl de ADN copia, obtenido a partir de la RT. La especificidad de los primers (ver Tabla I) fue verificada observando una única banda del tamaño molecular esperado en una corrida electroforética con un gel de agarosa 1.5% teñido con Bromuro de Etidio. Además, se observó un único pico en la curva de melting del iCycler plot. Todos los primers fueron diseñados para hibridizar con regiones correspondientes a dos exones diferentes de cada gen, generando así un amplicón de ADNc con un peso molecular estimado (ver Tabla I), menor al amplicón de ADN genómico. Cada muestra fue testeada por triplicado. Para comparar niveles de expresión entre tratamientos, se relativizaron las cantidades de ARN de un determinado gen (TGF- β_1 , IL-1 β , o IL-6), a la cantidad de ARN de un gen como control de carga o housekeeping (β 2-microglobulina), para cada muestra.

Tabla I. Primers utilizados en las RT-PCR

Gen	Primer sentido	Primer antisentido	Amplicón (pb)
β 2-m	TCTTTCTGGTGCTTGTCTC	AGTGTGAGCCAGGATGTAG	241
IL-1 β	TCCATGAGCTTTGTACAAGG	GGTGCTGATGTACCAGTTGG	237
IL-6	AGACAAAGCCAGAGTCATTCAG	GCTTTCAAGATGAGTTGGATGGT	181
TGF- β ₁	ACCAACTACTGCTTCAGCTC	TGTTGGTTGTAGAGGGCAAG	189

XII. Western blot

Animales adultos (P60) fueron decapitados y sus hipocampos fueron disectados. El tejido obtenido fue inmediatamente congelado en nitrógeno líquido y conservado a -80°C hasta su utilización. Se homogeneizó el tejido en hielo, en 400 μ l de buffer Tris-HCl (pH= 7.3) conteniendo inhibidores de proteasas (apoproteinina 10mg/ml, peptastina 5 mg/ml, leupeptina 5mg/ml, PMSF 1mM). Los homogenatos fueron centrifugados a 10,000 g a 4°C por 10 min, y luego ultracentrifugadas a 40,000 rpm por 2 hrs. Se realizó una sonicación suave (5 segundos). Se realizaron ensayos de Bradford para determinar la concentración total de proteínas en cada sobrenadante.

Para los Western blot de cultivos de CMN adultas, se realizó una extracción de proteínas de las células al día 2, 30 minutos luego del agregado de TGF- β ₁. Brevemente, las células se levantaron, centrifugaron, y resuspendieron en Buffer de muestra (Tris-HCl 62.5 mM (pH 6.8 a 25°C), SDS 2%, glicerol 10%, DTT 50 mM, 0.01% en agua miliQ) con el agregado de inhibidores de proteasas (apoproteinina 10mg/ml, peptastina 5 mg/ml, leupeptina 5mg/ml, PMSF 1mM) en hielo. Se realizó una sonicación suave (5 segundos). Se realizaron ensayos de Bradford para determinar la concentración total de proteínas en cada muestra.

Cantidades iguales de muestras proteicas (30 μ g) fueron separadas en un gel de poliacrilamida-SDS 12% y transferidas a membranas de Nitrocelulosa utilizando un aparato Trans-blot (BioRad, Hercules, CA). Las membranas luego fueron bloqueadas con leche descremada 5% w/v en PBS con Tween 20 0.05% v/v (PBS-Tw) por 1 hr, e incubadas en diluciones de anticuerpos primarios (TGF- β ₁ anti rata hecho en conejo 1:100, GR anti rata hecho en conejo 1:50, MR anti rata hecho en conejo 1:50 todos comprados a Abcam; pro caspasa-3 y caspasa-3 madura anti rata hecho en conejo, 1:500, fosfo-Smad2/3 anti rata hecho en conejo 1:500, Smad7 anti rata hecho en conejo

1:500, Cell Signaling, Boston, MA, USA; Actina anti rata hecho en ratón 1:1000, Sigma) toda la noche a 4°C. Luego de 3 lavados a 10 min con PBS-Tw, las membranas se incubaron anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasas (HRP anti-conejo o anti-ratón hecho en cabra 1:2000; Jackson) por 2 hrs, y lavados 3 veces con PBS-Tw antes de ser reveladas con quimioluminiscencia (ECL plus, GE Healthcare, USA). La densidad óptica de las bandas fue cuantificada utilizando el software Image J (Rasband WS. Image J. Bethesda, Maryland, USA: U. S. National Institutes of Health). Los valores fueron relativizados a los valores de una proteína utilizada como control de carga o housekeeping, en este caso la actina.

XIII. Tests de comportamiento

Cuidado Materno. La cuantificación del cuidado materno se llevó a cabo mediante la observación de comportamientos típicos previamente caracterizados, como cuidar a las crías con postura arqueada (*Arched-back nursing*, ABN), y acicalar a las crías (*Licking & grooming pups*, LG). Se realizaron diariamente 2 tandas de 60 observaciones espaciadas en un minuto, comenzando las observaciones a las 11:00 hs AM y las 16:00 hs PM, durante los primeros 7 días de vida. Se expresó la cantidad de veces que se observó cada madre ejerciendo ABN o LG sobre el total de observaciones, como índice de cuidado materno. La criza de crías o “cross fostering” se realizó al día postnatal 1, retirando previamente las madres de las jaulas, e intercambiando camadas similares en número (con una diferencia de no más de 3 crías).

Supresión de la Alimentación por Novedad. Se les retiró la comida a los animales la noche anterior, limpiando la grilla de restos de alimento. Se colocó un pellet de comida en el centro del campo abierto de 100 x 100 x 20 cm. Cada animal fue colocado contra una de las paredes, y durante 5 minutos se midió la variable *latencia* del animal a oler, a morder y a comer. Se consideró que el animal comió cuando este se sentó sobre sus patas traseras y tomó el pellet con las delanteras. En este ensayo se evalúa el conflicto generado por el hambre del animal y la aversión que le genera ir al centro. El campo se limpió con etanol 20% entre ensayos. Si el animal no se acercó a oler no fue considerado en el análisis, ya que no fue posible suponer que exista el conflicto (Santarelli et al., 2003).

Natación Forzada (Porsolt). 24 hs previo al test, los animales fueron individualmente sumergidos en cilindros plásticos de 30 cm de diámetro y 50 cm. de altura con 35 cm de agua a 25°C. Luego de 15 min las ratas fueron secadas y transferidas a sus jaulas. Durante el test, se midió la variable *proporción del tiempo que cada rata pasó inmóvil en el agua*, sobre un total de 5 minutos (porcentaje de inmovilidad). El agua fue cambiada luego de evaluar cada rata.

Test de Preferencia por Sacarosa. Las ratas fueron inicialmente expuestas a una solución de sacarosa 5% por 24 hs, de modo de aclimatarlas a este test. Luego los animales fueron ubicados en jaulas individuales, y privados de comida y agua por 12 hs, previamente al test. Durante el test, a los animales se les presentaron 2 botellas: una de ellas conteniendo agua de la canilla, la otra conteniendo la solución de sacarosa. De manera de prevenir posibles efectos de preferencia de lado, la posición de las botellas fue contrabalanceada y cambiada en todas las jaulas. La cantidad de líquido consumido en ambas botellas de cada jaula fue medida a las 2 hs y 24 hs luego del inicio de la exposición a las botellas. La variable *preferencia por sacarosa* fue calculada como el porcentaje de consumo de solución de sacarosa respecto del consumo total de cada rata.

Test de Burrowing. El test comenzó aproximadamente 2-3 hs antes del comienzo de la fase de oscuridad. Los animales fueron ubicados en jaulas individuales con alimento, agua y un tubo de burrowing relleno con la misma cantidad de un substrato apropiado (piedras pequeñas). Luego de 2 hs se pesó el contenido remanente de cada tubo y se rellenó. Al día siguiente se realizó el mismo procedimiento. La cantidad de actividad de *burrowing* se presentó como la variable *cantidad de piedras extraídas* en gramos.

Reconocimiento del Objeto Nuevo (NOR). Este comportamiento se analizó de acuerdo al protocolo previamente descrito en (Jessberger et al., 2009). Se utilizó un recinto opaco de plástico (45 cm x 45 cm x 30 cm), en el cual una cámara de video montada directamente sobre el recinto grabó las sesiones de test para análisis offline. El área estuvo iluminada por luz de 80 lux de intensidad. Una sesión de test consistió en una fase de habituación en el recinto vacío de 5 min, una sesión de familiarización de 5 min, y un intervalo fijo de 1 min o 3 hs seguido de una fase de test de 5 min. Durante la fase de familiarización, la rata pudo explorar y familiarizarse con 2 objetos idénticos

ubicados uno al lado del otro en el recinto. Luego, intervalos de 1 min y 3 hs transcurrieron previamente a las fase de test (todas las ratas fueron testadas para ambos intervalos, el orden de intervalos fue contrabalanceado). Durante la fase de test, la rata pudo explorar 2 objetos ubicados uno al lado del otro (un objeto nuevo, y otro copia idéntica de los 2 objetos de la fase de familiarización). Se cuantificó la exploración de ambos objetos (considerando como exploración la nariz a menos de 2 cm del objeto, y los bigotes en movimiento) durante 5 min. La variable *preferencia por el objeto nuevo* se consideró *el porcentaje del tiempo que cada rata pasó explorando el objeto Nuevo, sobre el tiempo total de exploración*. Se contrabalanceó el estado de ambos objetos (cuál era el nuevo/viejo), así como la posición del objeto nuevo. Para cada uno de los tests (con intervalos de 1 min o 3 hs) se utilizaron pares de objetos nuevos. Los análisis offline se realizaron a doble ciego.

XIV. Análisis estadístico

Los datos son presentados como la media \pm el error estandar de la media. Se utilizaron el test de Student de dos colas o el análisis de varianza, ANOVA para analizar dos, o más grupos experimentales, respectivamente. En los casos en que la prueba dio significativa se aplicaron comparaciones a posteriori. Luego del ANOVA se aplicó el test *a posteriori* de Tukey que realiza todas las comparaciones posibles entre pares de resultados. Previamente al análisis estadístico, los datos fueron analizados para los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas, y transformados en el caso de que no cumplieran con estos supuestos. En todos los casos las diferencias se consideraron estadísticamente significativas si la probabilidad de error de tipo I fuera menor que 5% ($p < 0.05$).

Resultados

Capítulo I.

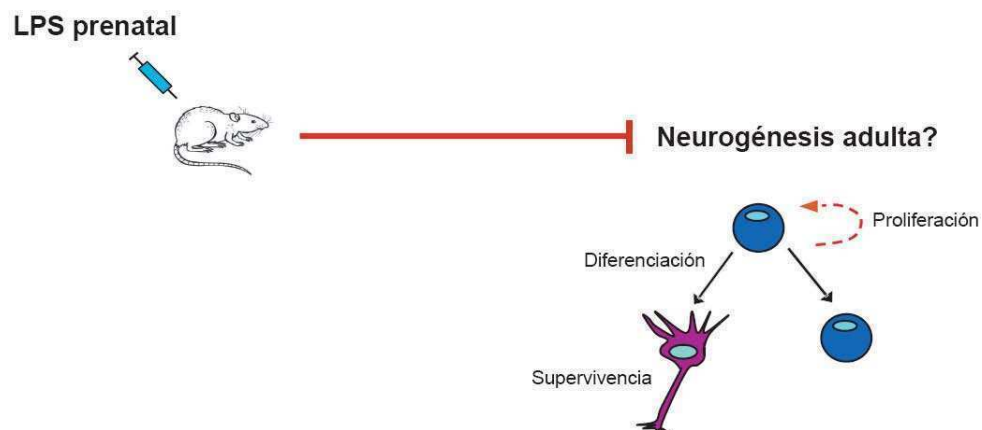
Efectos de la exposición prenatal a LPS

sobre la neurogénesis adulta.

Objetivos e Hipótesis Específicos

El **objetivo** de este capítulo es evaluar y caracterizar los efectos de una exposición prenatal a LPS sobre la proliferación y diferenciación de las CMN, y sobre la supervivencia de las neuronas nuevas en el GD adulto.

La **hipótesis** supone que un estímulo inflamatorio administrado durante el período prenatal tiene consecuencias adversas sobre alguno de los procesos que componen la neurogénesis adulta en las crías.



Esquema de los objetivos generales del capítulo I. Realizando inyecciones de LPS a hembras *Wistar* durante su tercera semana de preñez, se evaluarán los posibles efectos sobre la neurogénesis en el GD de las crías adultas, disectando los efectos específicos sobre la proliferación y diferenciación de las CMN, y sobre la supervivencia de las neuronas nuevas.

Resultados – Capítulo I

I.1 La administración prenatal de un estímulo inflamatorio (LPS) disminuye la proliferación celular y la diferenciación neuronal.

Con el objetivo de determinar los efectos del LPS prenatalmente administrado sobre la neurogénesis adulta se aplicaron inyecciones subcutáneas de LPS (0.5mg/kg) o sol. salina a ratas hembra *Wistar* preñadas, en sus días 14, 16, 18 y 20 de gestación. Las crías adultas (día postnatal 60) recibieron 1 inyección intraperitoneal diaria de BrdU (50 mg/kg) durante 7 días, y fueron perfundidas al día postnatal 67 (Figura I.1.1).

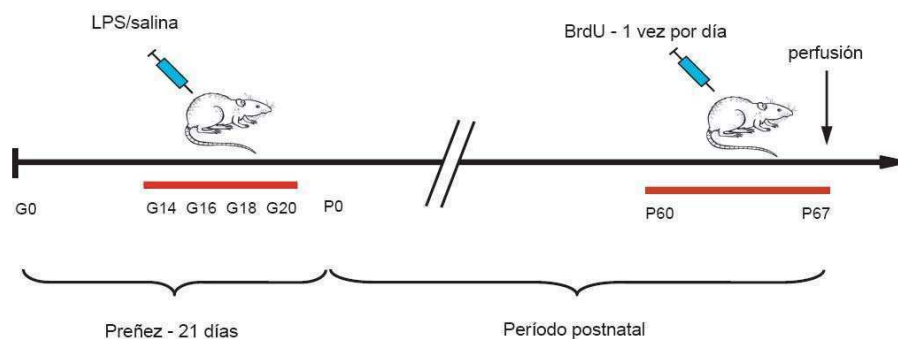


Figura I.1.1 Protocolo de inyecciones prenatales de LPS o sol. salina. Ratas Wistar hembra preñadas fueron sometidas a inyecciones subcutáneas de LPS (0.5mg/kg) o salina, en los días 14, 16, 18 y 20 de gestación. Las crías nacieron aproximadamente al día 21. Estas se destetaron al día postnatal 21 y a partir de los 60 días se les administraron inyecciones diarias intraperitoneales de BrdU hasta el día 67, en que fueron perfundidas y sus cerebros procesados para análisis posteriores.

En primer lugar se procedió a caracterizar el modelo experimental. Para ello se comparó entre ambos grupos el porcentaje de animales que tuvieron cría sobre los inicialmente preñados, con el objetivo de estimar los efectos del LPS sobre la sobrevivencia fetal. Como se aprecia en la Figura I.1.2, el tratamiento de las ratas preñadas con LPS disminuyó 20% el índice de preñez, definido como la tasa entre las camadas nacidas y las ratas inicialmente preñadas; con respecto al tratamiento con salina (Figura I.1.2). Luego se determinó si el tratamiento prenatal con LPS provocaba una disminución del número de animales por camada. En la Figura I.1.2B se observa que el tamaño promedio de las camadas es aproximadamente de 10 crías en ambos casos, de modo que

es posible afirmar que el LPS prenatalmente administrado según este protocolo no causa una disminución en el número de crías de las ratas.

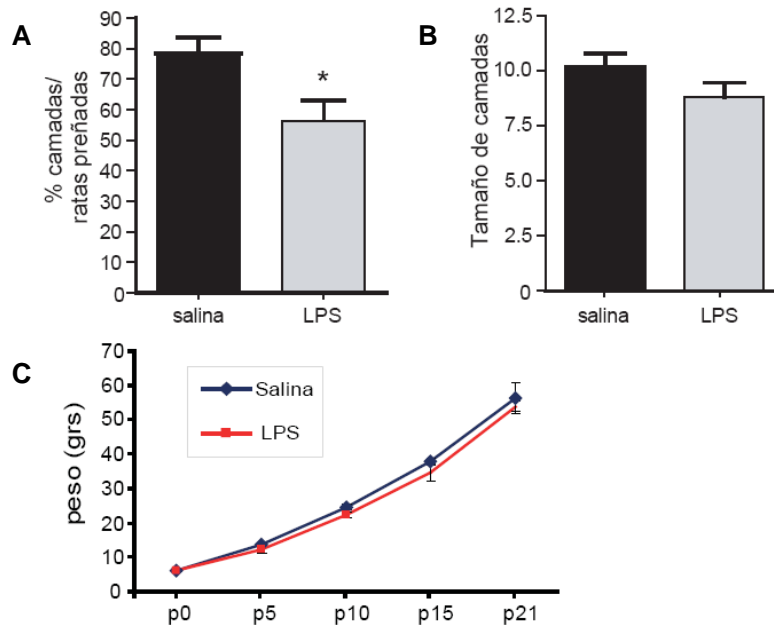


Figura I.1.2 Características del modelo experimental. **A.** Porcentaje de la cantidad de madres que tienen crías sobre la cantidad de ratas inicialmente preñadas. Test de student, * $p < 0.05$, $n = 6$ por grupo. Cada unidad es el promedio de un experimento. El total de madres analizadas fue de: salina: 42. LPS: 31. **B.** Tamaño de camadas. **C.** Pesos de crías a los distintos días postnatales.

Luego se investigó si el LPS prenatal interfería de manera general en el desarrollo de las crías recién nacidas. Para ello se observó si éste causaba algún cambio en los parámetros de desarrollo visibles y caracterizados. En la Figura I.1.2C se observa que el tratamiento prenatal con LPS no provoca cambios ni retardos en el crecimiento general de las crías ($n = 5$ por grupo), medido como peso a los distintos días postnatales (p) hasta el destete. Además, los distintos parámetros indicativos de desarrollo son equivalentes en ambos grupos: la apertura de ojos, la separación de las orejas y el descenso testicular ocurren en el mismo período en ambos grupos (tabla I, $n = 11$ por grupo).

Parámetro	Salina	LPS
Apertura de ojos	16.27 ± 0.89	16.09 ± 1.04
Separación de orejas	4.18 ± 0.87	4.36 ± 0.92
Descenso testicular	24.91 ± 1.04	25.82 ± 0.98

Tabla I. Parámetros de desarrollo en los grupos tratados prenatalmente con salina o con LPS. Unidad de medida: día post-natal (P).

Reuniendo los datos mencionados es posible concluir que el LPS administrado prenatalmente, según esta dosis y protocolo, provoca cierto porcentaje de animales que no llegan a término con su preñez. Sin embargo, las camadas que nacen son equivalentes en número en ambos grupos, y sus crías se desarrollan normalmente.

Una vez caracterizado el modelo experimental, se investigó si el tratamiento prenatal con LPS causaba algún cambio global en la neurogénesis adulta, en particular en la proliferación de CMN, la diferenciación neuronal, y la supervivencia de neuronas nuevas. En primer lugar se analizaron los posibles efectos del LPS prenatal sobre la cantidad de células en proliferación en el GD de las crías adultas. Como se indicó anteriormente, se aplicaron inyecciones subcutáneas de LPS (0.5mg/kg) o sol. salina a ratas hembra *Wistar* preñadas, en sus días 14, 16, 18 y 20 de gestación. Las crías adultas (día postnatal 60) recibieron 7 inyecciones intraperitoneales diarias de BrdU (50 mg/kg), y fueron perfundidas al día postnatal 67 (Figura I.1.1). Como se observa en la Figura I.1.3, la exposición prenatal al LPS provocó una reducción en el número total de células en proliferación (positivas para BrdU) en la ZSG del GD de las crías adultas. (Figura I.1.3). Por lo tanto, el tratamiento prenatal con LPS provocó una reducción en las células en activa proliferación, de entre 0 y 7 días de edad.

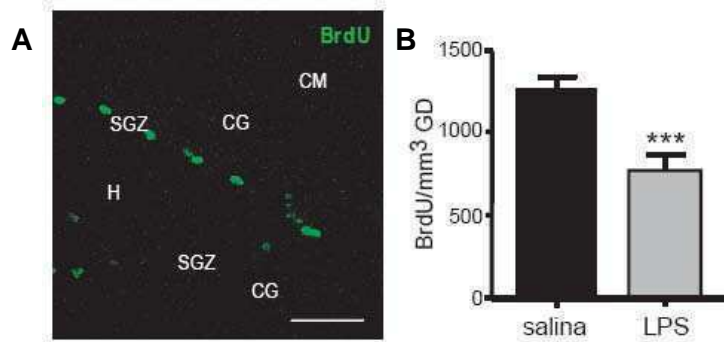


Figura I.1.3 La exposición prenatal al LPS disminuye la proliferación celular en el GD. A. Inmunohistoquímica contra BrdU de secciones de cerebro correspondientes al GD. En verde se visualizan los núcleos de las células positivas para BrdU, en activa proliferación, en la ZSG adyacente a la CG de neuronas. Barra de escala: 50 μ m. CM: capa molecular. H: hilus. **B.** Cuantificación de células positivas para BrdU en el GD, relativizada al área del GD. Test de student, *** $p < 0.001$, $n = 6$ por grupo.

Con el objetivo de corroborar si esta disminución en la población de células positivas para BrdU correspondía a una menor tasa de proliferación y no a un aumento en la apoptosis, se realizó en primer lugar un Western blot para caspasa 3 activa. La caspasa 3 es una de las principales caspasas efectoras del proceso de apoptosis. Se encuentra en las células como un precursor inactivo (pro-caspasa 3) de 32 KDa, y ante señales pro-apoptóticas se cliva generando una proteína de 17 KDa que ejecuta la apoptosis. En la Figura I.I.4A se observa que en el hipocampo de crías adultas tratadas prenatalmente con LPS o sol. salina, existen niveles detectables de pro-caspasa 3. Sin embargo, en ninguno de los dos grupos se detecta la caspasa 3 clivada, aunque sí se detecta en el control positivo (tercera calle del gel), que corresponde a células HeLa tratadas con TNF- α y cicloheximida. Debido a que la sensibilidad del Western blot de caspasa 3 para detectar apoptosis es relativamente baja, para responder a la misma pregunta, se cuantificaron los núcleos apoptóticos presentes en la ZSG y en la CG de todo el GD de crías adultas prenatalmente tratadas con LPS o salina.

En la Figura I.1.4B se muestra una porción del tejido teñida con el colorante nuclear Hoescht, en la cual se puede observar una imagen representativa de un núcleo apoptótico presente en la capa granular del GD. En la tabla correspondiente a la Figura I.1.4B se reportan los valores totales de los núcleos apoptóticos observados en la totalidad de las zonas ZSG y la capa granular del GD (salina: 12 ± 4.9 ; LPS: $9. \pm 3$). En base a estos resultados, es posible afirmar que el grado de apoptosis que se observa a partir de estos datos en el GD de ratas adultas en un momento determinado es

extremadamente bajo, y que el tratamiento con LPS prenatal no provoca un cambio detectable en este parámetro.

Luego se estudió si la exposición prenatal a LPS provocaba algún cambio en la tasa de diferenciación neuronal de las CMN presentes en el GD. Para ello, se cuantificó por microscopía confocal la proporción de células en proliferación que co-expresaban los marcadores neuronales PSA NCAM, DCX (marcadores de neuronas jóvenes), o NeuN (marcador de neuronas maduras) junto con BrdU.

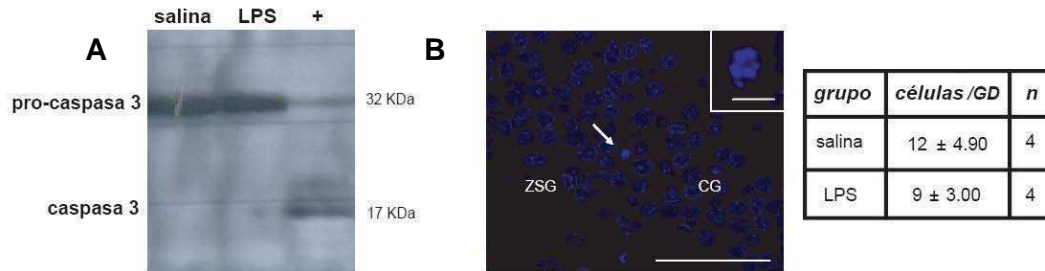


Figura I.1.4 La exposición prenatal al LPS no afecta los niveles basales de apoptosis en el GD. **A.** Western blot de pro-caspasa 3 (32 KDa) y caspasa 3 madura (17 KDa). En la tercera columna se muestra un control positivo para el clivaje de la caspasa (células HeLa tratadas con TNF- α y cicloheximida). **B.** Foto representativa de una sección de GD teñida con Hoescht. La flecha y el inset muestran un núcleo apoptótico. En la tabla se indican las cantidades totales de células apoptóticas contadas en el GD. ZSG: zona subgranular. CG: capa granular. Barra de escala: foto 50 μ m. Inset: 5 μ m.

En la Figura I.I.5 se observa a la izquierda una imagen representativa de microscopía confocal en la cual se muestra una célula que expresa ambos marcadores (BrdU y el correspondiente). A la derecha se muestra la cuantificación correspondiente a cada doble marcación. Se observa que el tratamiento prenatal con LPS disminuyó no solamente la proporción de células en proliferación (positivas para BrdU), sino también el porcentaje de células que co-expresan los marcadores neuronales PSA NCAM (Figura I.1.5A), DCX (Figura I.1.5B), o NeuN (Figura I.1.5C) junto con BrdU.

Por lo tanto, es posible afirmar que el tratamiento prenatal con LPS disminuyó el grado de diferenciación neuronal de las células en proliferación.

Es importante mencionar que animales sin ningún tratamiento prenatal han sido evaluados, presentando los mismos niveles de proliferación celular y neurogénesis que los animales prenatalmente tratados con salina. Por lo tanto se puede considerar que el tratamiento prenatal con salina constituye un control correcto y los experimentos subsiguientes fueron realizados con el tratamiento de salina prenatal como grupo control.

Hasta el momento se analizó la población en proliferación -positiva para BrdU- para evaluar los efectos del LPS prenatal sobre la neurogénesis adulta. Como estudio complementario, se determinaron los efectos del LPS prenatal sobre poblaciones totales de neuronas presentes en el GD, como índice representativo de neurogénesis, de modo de concluir que los efectos del LPS prenatal eran fisiológicamente significativos, y no específicos sobre la población positiva para BrdU. Para cumplir este objetivo, se cuantificaron las células positivas para DCX presentes en el GD de ratas adultas prenatalmente expuestas a LPS o salina. Como es posible observar, el tratamiento

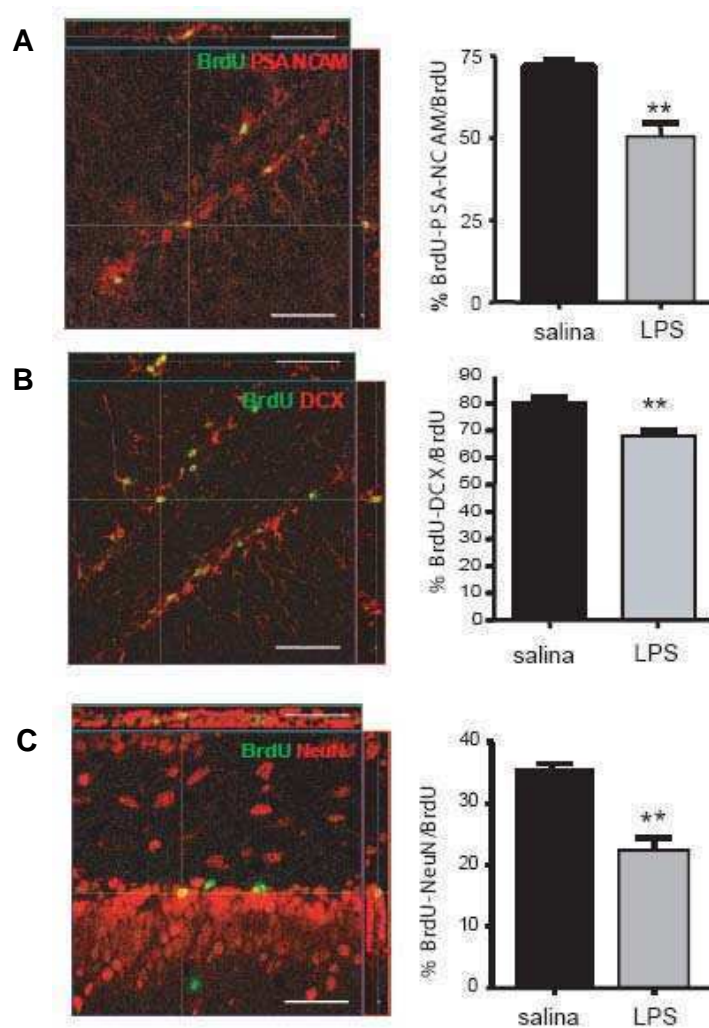


Figura I.1.5 La exposición prenatal al LPS disminuye la neurogénesis adulta en el GD. A, B y C. Microscopía confocal de secciones de GD marcadas por inmunofluorescencia contra BrdU (verde) y distintos marcadores celulares (rojo). **A.** PSA NCAM. **B.** DCX. **C.** NeuN. A la izquierda se muestra una foto representativa de la sección en los 3 ejes intersectando una célula doblemente marcada. Barra de escala: 50 μ m. A la derecha se muestra la cuantificación correspondiente a la cantidad de células doblemente marcadas respecto del total de células BrdU positivas en el GD. **A, B y C.** Test de student, ** $p < 0.01$, $n = 5-6$ por grupo.

prenatal con LPS provocó una disminución de la cantidad de células positivas para DCX presentes en el GD (Figura I.1.6). Este resultado indica que la exposición prenatal a LPS provocó una disminución de la población total de neuronas jóvenes del GD.

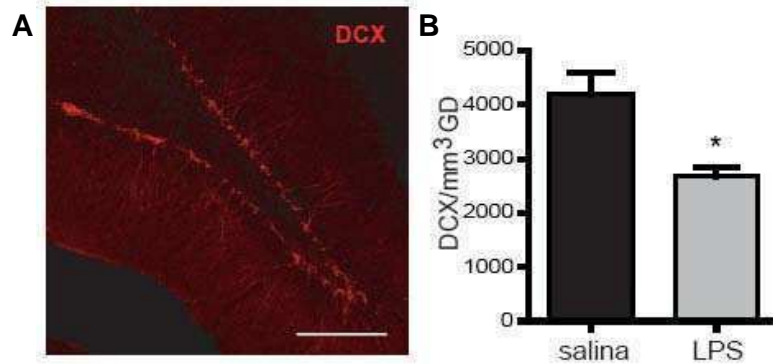


Figura I.1.6 La exposición prenatal al LPS disminuye la neurogénesis adulta en el GD. A. Inmunohistoquímica contra DCX de una sección de GD. Barra de escala: 50 μm . B. Cuantificación correspondiente a la cantidad de células positivas para DCX por mm^3 de GD. Test de student con corrección de Welch, * $p < 0.05$, $n = 6$ por grupo.

Los resultados descritos hasta el momento indican que la exposición prenatal al LPS disminuye la proliferación celular y la diferenciación neuronal en el GD. Además, el LPS prenatalmente administrado disminuye la cantidad total de neuronas jóvenes en el GD. Por lo tanto, es posible concluir que el LPS prenatalmente administrado disminuye la neurogénesis adulta.

I.2 La exposición prenatal a LPS no afecta específicamente la proliferación de CMN del GD.

A partir los datos que describen los efectos del LPS prenatal sobre la proliferación total, y sobre la cantidad de neuronas nuevas en el GD, surgió la pregunta de si una menor proliferación de CMN presentes en la SGZ sería el origen del menor porcentaje de neuronas nuevas observado. Para responder esta pregunta, según el protocolo anteriormente descrito (Figura I.I.1), se cuantificó la proliferación de CMN presentes en el GD. Para ello se cuantificó el número de células positivas para BrdU que además co-expresaban Nestina (marcador de CMN).

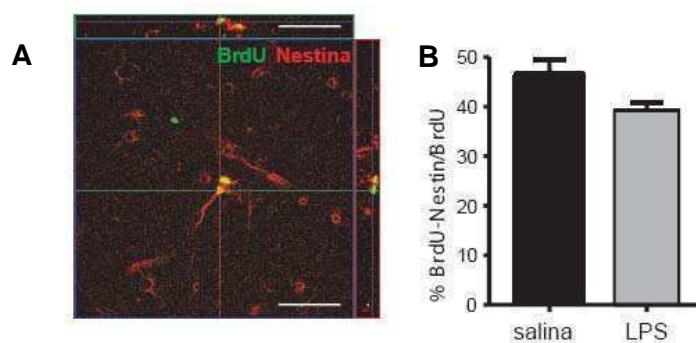


Figura I.2.1 La exposición prenatal al LPS no afecta la proliferación de CMN en el GD. **A.** Foto representativa de microscopía confocal de secciones de GD marcadas por inmunofluorescencia contra BrdU (verde) y Nestina (rojo), donde los 3 ejes se intersectan en una célula doblemente marcada. Barra de escala: 50 μ m. **B.** Cuantificación correspondiente a la cantidad de células doblemente marcadas respecto del total de células positivas para BrdU en el GD. Test de student, $p=0.07$, $n=6$ por grupo.

En la Figura I.2.1 se observa que la proliferación de progenitores se mantiene estable ante el tratamiento prenatal con LPS, de modo que es posible afirmar que la exposición prenatal a LPS no afecta la proliferación de las CMN.

Además, para responder a la misma pregunta de si el LPS prenatal afecta la proliferación de CMN, se cuantificó el número de células positivas para BrdU que además co-expresaban GFAP. La proteína GFAP es expresada por una subpoblación de CMN así como por astrocitos, de modo que esta cuantificación refleja el grado de proliferación de CMN y la diferenciación astrocítica que ocurren en el GD. Se observa que la población de células positivas para BrdU que co-expresan GFAP no se ve afectada por el tratamiento prenatal con LPS (Figura I.2.2). Este dato también sugiere

que ni la proliferación de las CMN ni la diferenciación astrocítica se encuentran afectadas ante la exposición prenatal a LPS.

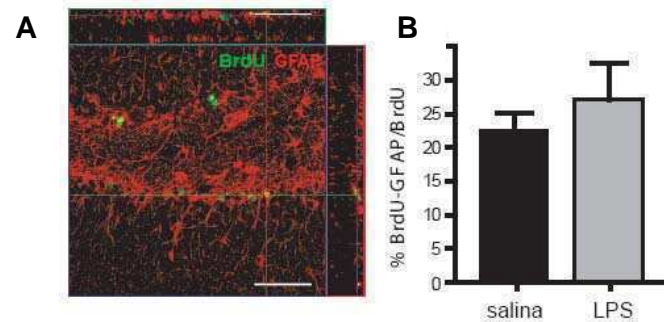


Figura I.2.2 La exposición prenatal al LPS no afecta la proliferación de células positivas para GFAP en el GD. **A.** Foto representativa de microscopía confocal de secciones de GD marcadas por inmunofluorescencia contra BrdU (verde) y GFAP (rojo), donde los 3 ejes intersecan una célula doblemente marcada. Barra de escala: 50 μ m. **B.** Cuantificación correspondiente a la cantidad de células doblemente marcadas respecto del total de células BrdU positivas en el GD. Test de student, $p=0.45$, $n=4-5$ por grupo.

Por otra parte, se evaluaron los efectos del LPS prenatal sobre la población total de CMN. Para ello se calculó la cantidad total de células positivas para Nestina en la ZSG del GD (Figura I.2.3). Como se observa en la Figura, la cantidad total de CMN presentes en el GD no varía frente al LPS prenatal.

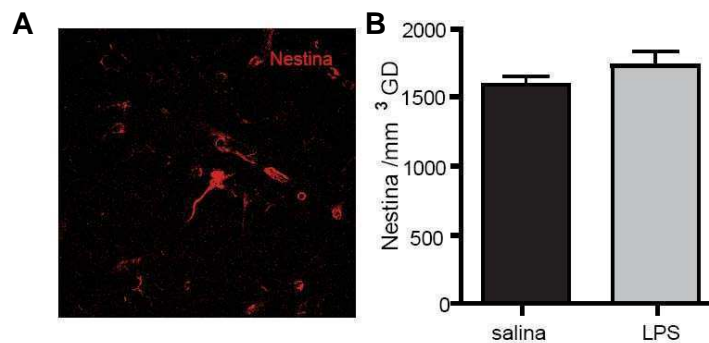


Figura I.2.3 La exposición prenatal al LPS no afecta la cantidad total de CMN en el GD. **A.** Inmunohistoquímica contra Nestina de una sección de GD. Barra de escala: 50 μ m. **B.** Cuantificación correspondiente a la cantidad de células positivas para Nestina por mm³ de GD. Test de student, $p=0.38$, $n=6$ por grupo.

A continuación se resumen los resultados en la Tabla II. En síntesis, el tratamiento con LPS prenatal provocó una disminución en la proliferación celular, en la diferenciación celular y en la cantidad total de neuronas nuevas en el GD. Sin embargo, la proliferación y el número total de CMN no fueron afectados.

Cuantificación	Significado biológico	Respuesta al LPS prenatal
BrdU	Proliferación celular	Disminuye
BrdU + PSA NCAM/ BrdU	Diferenciación neuronal	Disminuye
BrdU + DCX/ BrdU	Diferenciación neuronal	Disminuye
BrdU + NeuN/ BrdU	Diferenciación neuronal	Disminuye
DCX totales	Nro. total de neuronas nuevas	Disminuye
BrdU + Nestina/ BrdU	Proliferación de CMN	No se ve afectada
BrdU + GFAP/ BrdU	Proliferación de CMN + Diferenciación astrocítica	No se ve afectada
Nestina totales	Nro. total de CMN	No se ve afectada

Tabla II: Resumen de los efectos del LPS prenatal sobre las distintas poblaciones de células presentes en el GD de ratas adultas prenatalmente tratadas con LPS.

Teniendo en cuenta el conjunto de resultados hasta el momento, y pudiendo afirmar que el LPS prenatal no afecta la tasa de proliferación de CMN, pero sí afecta el porcentaje de neuronas nuevas, es posible concluir que este tratamiento inhibe la tasa de diferenciación de CMN a un fenotipo comprometido hacia el linaje neuronal, que se refleja en un menor número de neuronas nuevas en el GD adulto.

I.3 El LPS prenatal no afecta la sobrevivida de las neuronas nuevas.

Debido a que durante la neurogénesis adulta las neuronas nuevas sufren un proceso selectivo por el cual según sus características fisiológicas y su conectividad un porcentaje de aproximadamente 50% no sobrevive (Dayer et al., 2003), otro parámetro que potencialmente afecta el proceso neurogénico es el del grado de sobrevivida de las neuronas nuevas. De este modo surge la pregunta de si el LPS prenatal afecta la sobrevivida de las neuronas nuevas. Para responder este interrogante se realizó el mismo protocolo de 7 inyecciones diarias de BrdU, esperando esta vez 30 días para la perfusión y el análisis (Figura I.3.1). De esta manera es posible conocer y cuantificar la sobrevivida de progenitores neurales en proliferación luego de 30 días.

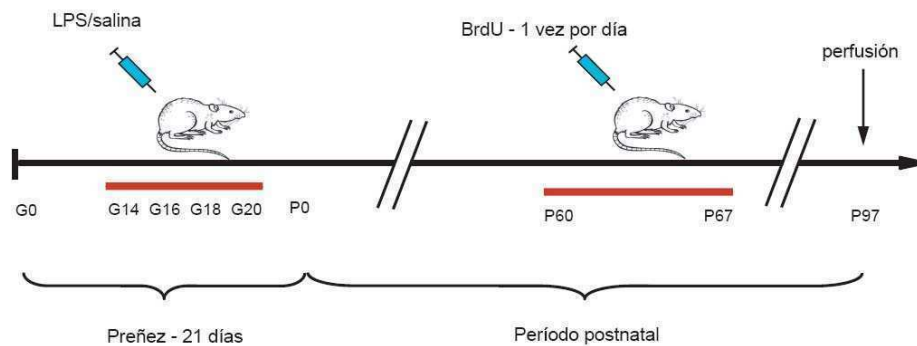


Figura I.3.1 Diseño experimental para cuantificar la sobrevivida de células en proliferación y neuronas nuevas en el GD. Al igual que en el diseño descrito anteriormente, ratas preñadas fueron sometidas a inyecciones LPS o salina. A partir de los 60 días las crías se inyectaron con BrdU. En este caso, se esperaron 30 días a partir de la última inyección de BrdU para la perfusión y el procesamiento de cerebros.

Como es posible observar en la Figura I.3.2, existe un menor número total de células en proliferación (positivas para BrdU) (Figura I.3.2A), así como de neuronas nuevas (positivas para BrdU y NeuN). (Figura I.3.2B) en el grupo tratado prenatalmente con LPS.

Sin embargo, la magnitud de la disminución en células proliferantes totales y en neuronas nuevas es similar entre tiempos de análisis tempranos y tardíos luego de la marcación de células con BrdU. Cuando se compararon las magnitudes de los cambios en las poblaciones de células en proliferación (positivas para BrdU) y de neuronas nuevas (positivas para BrdU y NeuN) en el grupo LPS prenatal, se observó que estas magnitudes eran equivalentes. (Tabla III: número de células positivas para BrdU a los 30 días luego de la incorporación de BrdU/aquellas contadas inmediatamente luego de la incorporación de BrdU: grupo salina prenatal = 0.51; grupo LPS prenatal = 0.53.

Número de neuronas nuevas (positivas para BrdU y NeuN) 30 días luego de la incorporación de BrdU/aquellas contadas inmediatamente luego de la incorporación de BrdU: grupo salina prenatal = 1.08; grupo LPS prenatal = 1.20). Por lo tanto, la sobrevivencia de las células en proliferación y de las neuronas nuevas no fue afectada por el tratamiento con LPS prenatal. Por el contrario, los porcentajes de disminución de ambas se mantienen constantes desde tiempos tempranos de análisis, en los que el tratamiento con LPS prenatal afectó la proliferación total y la diferenciación neuronal.

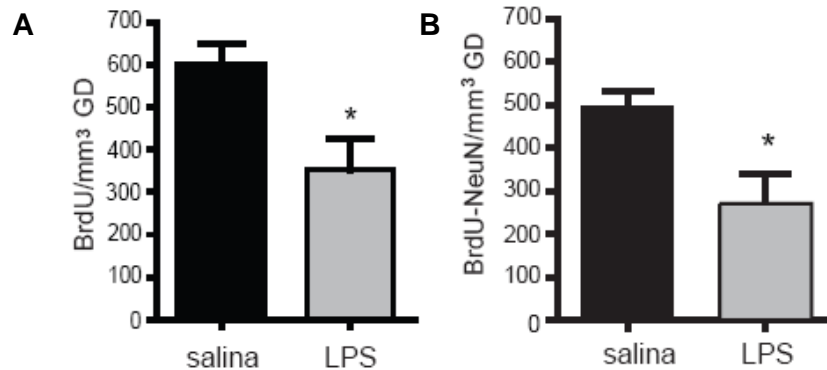


Figura 1.3.2 La exposición prenatal al LPS disminuye la cantidad total de células en proliferación y de neuronas jóvenes en el GD. **A.** Cuantificación de células en proliferación –positivas para BrdU– en el GD luego de 30 días, relativizada al área del GD. Test de student, * $p < 0.05$, $n = 5-6$ por grupo. **B.** Cuantificación de neuronas jóvenes –positivas para BrdU y NeuN– en el GD luego de 30 días, relativizada al área del GD. Test de student, * $p < 0.05$, $n = 5-6$ por grupo

Cuantificación	BrdU positivas/mm ³ GD		BrdU-NeuN positivas/mm ³ GD	
Significado biológico	Células en proliferación		Neuronas nuevas	
Tratamiento prenatal	salina	LPS	salina	LPS
Perfusión día 7 post BrdU	1186 ± 65	612 ± 85 ***	459 ± 79	212 ± 46 ***
Perfusión día 30 post BrdU	608 ± 47	327 ± 75 *	500 ± 33	256 ± 67 *
Magnitud de los cambios (relación 30 días /7 días)	0.51	0.53	1.08	1.20

Tabla III: Efectos del LPS prenatal sobre la cantidad de células en proliferación y neuronas nuevas, inmediatamente luego de 7 inyecciones diarias de BrdU, o 30 días después de la última inyección. Test de Student * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, $n = 5-6$ por grupo.

Por otra parte, el porcentaje de neuronas nuevas -que co-expresan NeuN dentro de la población positiva para BrdU-, se mantiene disminuido en el grupo LPS prenatal luego de 30 días. (Figura I.3.3), lo que indica que los efectos del LPS prenatal sobre la diferenciación neuronal adulta persisten a largo plazo, y sugiere que ocurrirían a lo largo de toda la vida del animal.

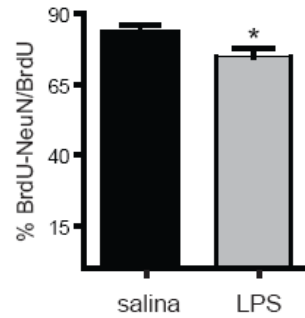


Figura I.3.3 La exposición prenatal al LPS disminuye la diferenciación neuronal en el GD, luego de 30 días. Cuantificación correspondiente a la cantidad de células doblemente marcadas con BrdU y NeuN respecto del total de células BrdU positivas en el GD. Test de student,, * $p < 0.05$, $n = 5-6$ por grupo.

En base a estos resultados concluimos que el LPS prenatal disminuye la neurogénesis adulta afectando la diferenciación de las CMN a neuronas, no poseyendo efectos aparentes sobre la sobrevivencia de las neuronas nuevas o la proliferación de las CMN.

I.4 La magnitud de la disminución de la neurogénesis adulta causada por la administración prenatal o adulta de LPS es equivalente. La combinación de ambos tratamientos no disminuye en mayor medida la neurogénesis adulta.

Hasta el momento los resultados presentados muestran que el LPS prenatal disminuye la neurogénesis adulta. Por otra parte, un trabajo previo describe que el LPS administrado en ratas adultas disminuye la neurogénesis adulta luego de 7 días (Monje et al., 2003). A partir de estos datos surgió la pregunta de si los niveles reducidos de neurogénesis a causa del LPS prenatal podían ser afectados por una exposición adicional, aguda, al LPS durante la adultez. Para responder esta pregunta, animales **prenatalmente** inyectados con LPS o salina según el mismo protocolo descrito anteriormente en las secciones I.1 a I.4, fueron inyectados con LPS (1 mg/kg) o salina **durante la adultez**. Inmediatamente luego de la inyección con LPS/salina, recibieron 7 inyecciones diarias de BrdU, y fueron perfundidos para su análisis al séptimo día de inyección de BrdU (Figura I.4.1).

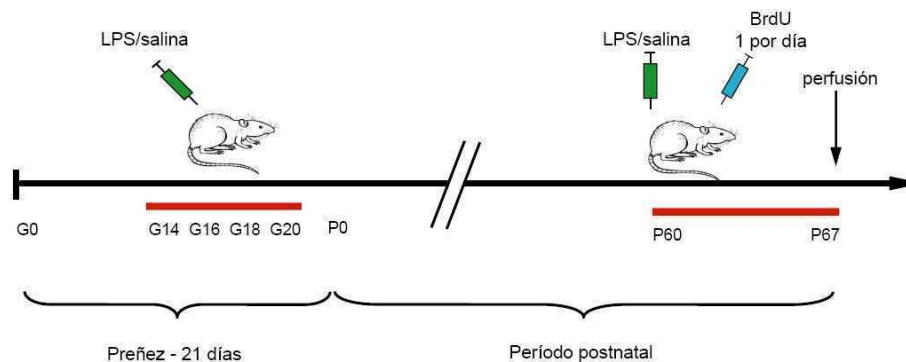


Figura I.4.1 Protocolo de inyecciones prenatales y adultas de LPS/salina. Ratas Wistar hembra preñadas fueron sometidas a inyecciones subcutáneas de LPS (0.5mg/kg) o salina, en los días 14, 16, 18 y 20 de gestación. Las crías nacieron aproximadamente al día 21. A los 60 días se les administró intraperitonealmente salina o LPS (1mg/kg). A partir de ese mismo día se les administraron inyecciones diarias intraperitoneales de BrdU hasta el día 67, en que fueron perfundidas y sus cerebros procesados para análisis posteriores.

En el GD de estos animales se cuantificó la neurogénesis, como el número de células positivas para BrdU que co-expresa marcadores neuronales. Se observa que la administración de LPS en ratas adultas causó una disminución aguda en los niveles de neurogénesis, cuantificada como el porcentaje de células positivas para BrdU que co-

expresan marcadores neuronales como PSA NCAM (Figura I.4.2) o NeuN (Figura I.4.3), como se ha reportado anteriormente (Monje et al., 2003). Sin embargo, el grupo tratado con LPS prenatalmente y en la adultez presenta el mismo grado de disminución de la neurogénesis que los grupos que recibieron cada uno de los estímulos por separado. En otras palabras, la administración de LPS en adultez no fue capaz de exacerbar la disminución en la neurogénesis provocada por el LPS prenatal. Por lo tanto, es posible afirmar que el LPS administrado a animales adultos afecta la neurogénesis cuando previamente existen niveles normales, mientras que no disminuye en mayor medida la neurogénesis de animales que poseen previamente afectado este proceso.

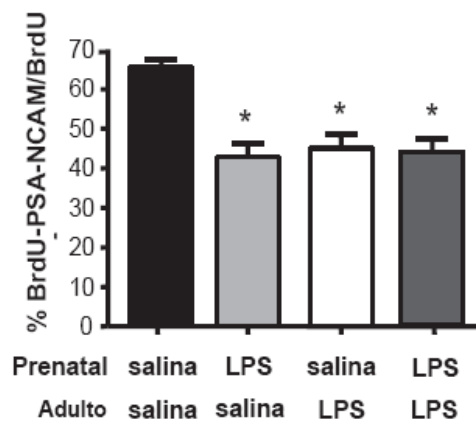


Figura I.4.2 La administración prenatal y/o adulta de LPS reduce la neurogenesis adulta. Cuantificación correspondiente a la cantidad de células doblemente marcadas con BrdU y PSA NCAM respecto del total de células BrdU positivas en el GD. ANOVA de 2 factores. Tratamiento prenatal: $p=0.0040$; adulto, $p=0.0122$; interacción prenatal x adulto, $p=0.0082$. Test de Tukey $*p<0.05$; $n=3$ por grupo.

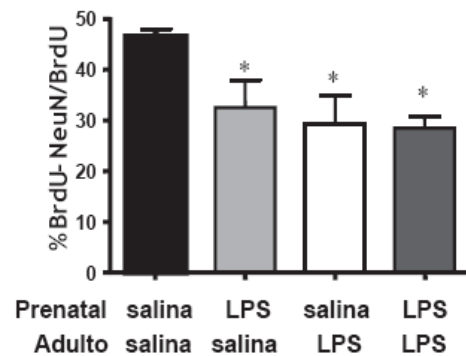


Figura I.4.3 La administración prenatal y/o adulta de LPS reduce la neurogenesis adulta. Cuantificación correspondiente a la cantidad de células doblemente marcadas con BrdU y NeuN respecto del total de células BrdU positivas en el GD. $*p<0.05$ Student's t test. ANOVA de 2 factores. Tratamiento prenatal: $p=0.0040$; adulto, $p=0.0122$; interacción prenatal x adulto, $p=0.0082$. Test de Tukey $*p<0.05$; $n=3$ por grupo.

I.5 La administración de LPS en la adultez no afecta los niveles de neurogénesis adulta a largo plazo.

Debido a que el LPS administrado prenatalmente y en la adultez causa una disminución en los niveles de neurogénesis en las crías adultas, surgió la pregunta de si los efectos a largo plazo son específicos de la administración durante el período prenatal, o alternativamente, si la administración de LPS durante la adultez tendrá también efectos a largo plazo sobre la neurogénesis adulta. Para responder esta pregunta, se realizó el mismo protocolo de 4 inyecciones de LPS (1 mg/kg) que en las secciones I.1 a I.3, esta vez a ratas macho adultas. Luego de 60 días, la misma cantidad de tiempo esperada para que las crías prenatalmente tratadas con salina/LPS lleguen a la adultez, se perfundieron los animales y se realizaron los análisis correspondientes (Figura I.5.1).

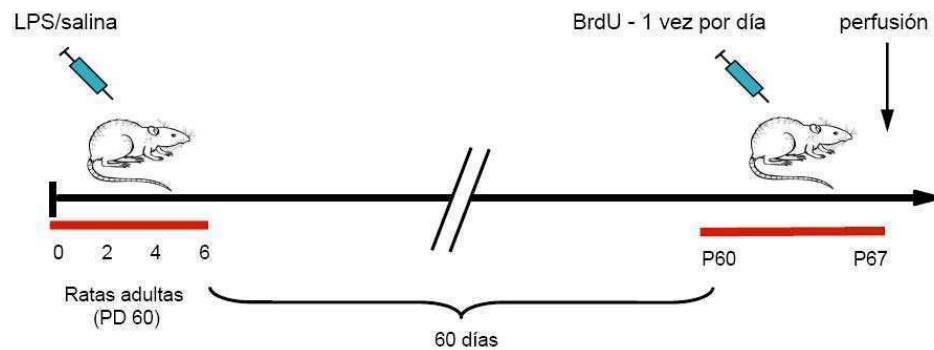


Figura I.5.1 Protocolo de inyecciones adultas de LPS o sol. salina. Ratas Wistar macho adultas (PD60) fueron sometidas a inyecciones intraperitoneales de LPS (1 mg/kg) o salina, administradas día por medio. Luego de 60 días se les administraron 7 inyecciones diarias intraperitoneales de BrdU, fueron perfundidas inmediatamente luego de la última inyección y sus cerebros procesados para análisis posteriores.

En la Figura I.5.2 se observa que la administración de LPS durante la adultez no modifica los niveles de diferenciación neuronal luego de 60 días. Por lo tanto, la administración adulta de LPS no ejerce efectos a largo plazo sobre la neurogénesis del GD, al contrario que el mismo estímulo administrado prenatalmente. A partir de este experimento es posible afirmar que los efectos a largo plazo de la administración del LPS solo ocurren cuando es administrado durante el período prenatal.

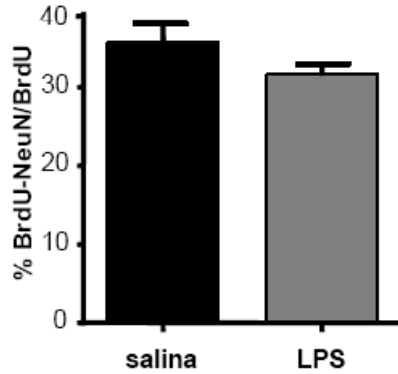


Figura I.5.2 El LPS administrado en ratas adultas no afecta los niveles de diferenciación neuronal luego de 60 días. Cuantificación correspondiente a la cantidad de células doblemente marcadas con BrdU y NeuN respecto del total de células BrdU positivas en el GD. Test de student, $p=0.24$, $n=4$ por grupo.

En el marco de los resultados presentados en esta sección y en la sección I.4, es posible concluir que el LPS administrado a animales adultos afecta agudamente –luego de 7 días- la neurogénesis, pero que este efecto es reversible y transiente, ya que no se observa luego de los 60 días. Por el contrario, el LPS prenatalmente administrado afecta los niveles de neurogénesis a largo plazo, y probablemente durante toda la vida adulta de los animales.

Capítulo II.

Estudio de los posibles mecanismos involucrados en los efectos del LPS prenatal sobre la neurogénesis adulta.

Objetivos e Hipótesis Específicos

El **objetivo** de este capítulo es elucidar los mecanismos de acción de los efectos de la exposición prenatal a LPS sobre la neurogénesis adulta. Se estudiarán las posibles alteraciones a nivel sistémico, celular y molecular por la exposición prenatal a LPS, como candidatos a participar en sus efectos finales sobre la neurogénesis adulta.

La **hipótesis** supone que el eje HPA y el cuidado materno a nivel sistémico, la microglía y los astrocitos a nivel celular y/o las citoquinas a nivel molecular son candidatos a participar en la disminución de la neurogénesis adulta observada luego de la exposición prenatal a LPS.

Resultados – Capítulo II

II.1 Los glucocorticoides no participan mayoritariamente en los efectos del LPS prenatal sobre la neurogénesis adulta.

A partir de evidencias de trabajos previos (ver Introducción) se hipotetizó que el LPS prenatal podría provocar alteraciones tempranas en la formación del eje HPA que conduzcan a una disfunción en su actividad en animales adultos. Una alteración en la producción de glucocorticoides podría estar involucrada en la disminución de los niveles de neurogénesis. Con este objetivo, a animales prenatalmente tratados con sol. salina o LPS se les cuantificaron los niveles basales de corticosterona en suero por radioinmunoensayo (RIA). Como se observa en la Figura II.1.1, los niveles basales de corticosterona en suero no se ven afectados por el tratamiento con LPS prenatal. A partir de esta Figura es posible afirmar que nuestro tratamiento prenatal con LPS no afectó la producción **basal** de glucocorticoides en las crías adultas.

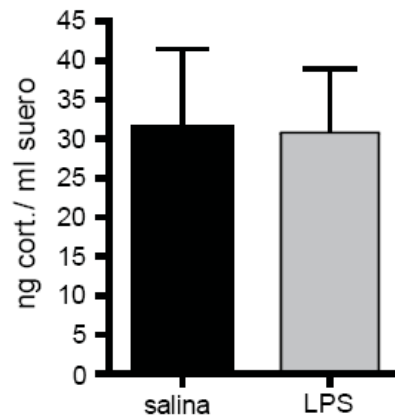


Figura II.1.1 El tratamiento prenatal con LPS no afecta los niveles basales de corticosterona en suero en las crías adultas. RIA de corticosterona a partir de muestras de suero de crías adultas, prenatalmente tratadas con LPS o salina. Test de student, $p=0.84$, $n=4-5$ por grupo.

Sin embargo, la administración prenatal de LPS podría modificar la respuesta local del GD a los GC a través de cambios en la expresión de sus receptores en esta región. Existen dos tipos de receptores de GC: el receptor tipo I (de mineralocorticoides-MR), que es el encargado de transducir la señal de los GC en niveles basales, y el receptor de tipo II (de glucocorticoides-GR), el encargado de transducir la señal de glucocorticoides en niveles aumentados (para mayor detalle ver

Introducción). Por las características funcionales de ambos receptores, se hipotetizó que el LPS prenatal podría estar afectando la expresión de MR, y de esta forma alterando la sensibilidad del GD a los niveles normales de GC en las crías adultas. Para verificar si este era el caso, se analizaron los niveles de ambos receptores por Western blot, seguido de cuantificaciones densitométricas de sus niveles de expresión (Figura II.1.2A y B).

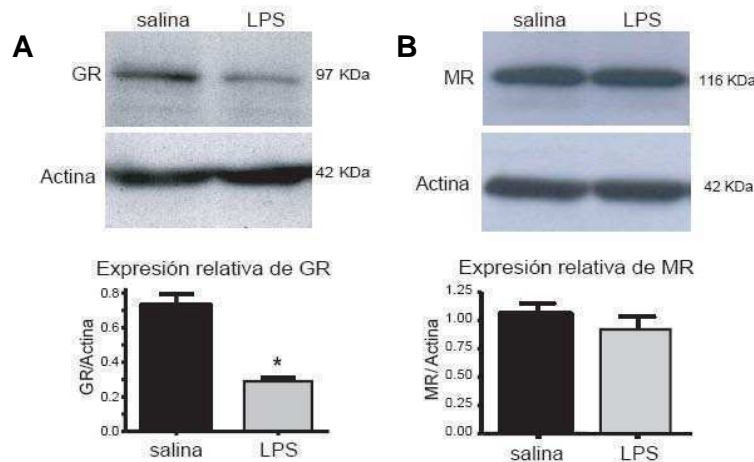


Figura II.1.2 El tratamiento prenatal con LPS afecta los niveles basales de expresión de GR, pero no de MR, en hipocampo de crías adultas. **A.** Western blot de GR y cuantificación densitométrica de sus niveles relativos de expresión. Test de Student, * $p < 0.05$, $n = 4-5$ por grupo. **B.** Western blot de MR y cuantificación densitométrica de sus niveles relativos de expresión. Test de Student ns, $n = 4-5$ por grupo.

Se puede observar que los niveles de GR se encuentran disminuidos ante el tratamiento con LPS prenatal (Figura II.1.2A), mientras que los niveles de MR no varían frente a este tratamiento (Figura II.1.2B). A partir de estos resultados es posible sugerir que los GC no contribuyen mayoritariamente en los efectos del LPS prenatal sobre la neurogénesis adulta en condiciones basales, a través de cambios en la liberación de corticosterona ni en los niveles de expresión del receptor activable por niveles basales de GC (MR). El LPS prenatal sí afecta la expresión de GR, que media los efectos de los niveles aumentados de GC. A priori, este cambio no tendría efectos funcionales sobre la neurogénesis adulta. Sin embargo, los niveles disminuidos de GR podrían alterar los efectos de los niveles aumentados de GC en forma circadiana (Stavreva et al., 2009). Por este motivo, no es posible descartar totalmente una contribución menor de este receptor en los efectos del LPS prenatal sobre la neurogénesis adulta.

Luego se estudió si el tratamiento con LPS prenatal modificaba la respuesta del eje HPA ante un estímulo adulto de LPS. Para ello se cuantificaron los niveles de GC en suero de la manera anteriormente descrita, a ratas tratadas prenatalmente con salina o LPS, a las 2, 4 y 6 horas luego de una inyección adulta de salina o LPS. Como se puede observar en la Figura II.1.3, el estímulo adulto de LPS generó el mismo aumento de los niveles de GC en sangre a los tiempos estudiados. Por lo tanto, el estímulo prenatal de LPS no generó cambios en la respuesta del eje HPA sobre un estímulo adulto, a los tiempos estudiados. Este resultado relativiza aun más la posible contribución de los GR a la disminución de la neurogénesis adulta por el LPS prenatal.

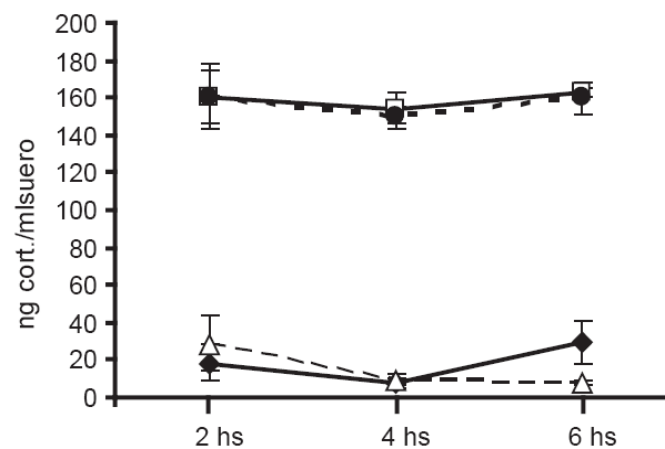


Figura II.1.3 El tratamiento prenatal con LPS no afecta los niveles basales de corticosterona en suero en las crías adultas. RIA de corticosterona a partir de muestras de suero de crías adultas tratadas con LPS o salina durante el período prenatal, a las 2, 4 y 6 horas luego de una inyección adulta de salina o LPS. ANOVA de medidas repetidas, n=5 por grupo.

II.2 El LPS prenatal afecta el comportamiento materno, independientemente de sus efectos sobre la neurogénesis adulta.

Como se describió en la Introducción, estímulos de stress recibidos durante la gestación disminuyen el cuidado materno. A su vez, el cuidado materno recibido afecta varios aspectos del desarrollo del sistema nervioso, lo que se refleja en alteraciones en su funcionamiento en el adulto. Se hipotetizó a partir de estos antecedentes que el tratamiento con LPS a las hembras preñadas puede afectar el cuidado materno de sus crías, y de esta forma contribuir a la disminución en la neurogénesis que la crías presentan en la adultez.

Con el objetivo de evaluar si alteraciones en el comportamiento materno provocadas por el LPS prenatal participan de la reducción en la neurogénesis adulta, se realizaron experimentos de adopción cruzada o “cross fostering”, de modo de contar con 4 grupos experimentales a los cuales se cuantificarán los niveles de neurogénesis (ver Introducción). Así, será posible disociar si la menor neurogénesis adulta se debe al tratamiento prenatal, a posibles alteraciones del comportamiento materno, o a ambos factores.

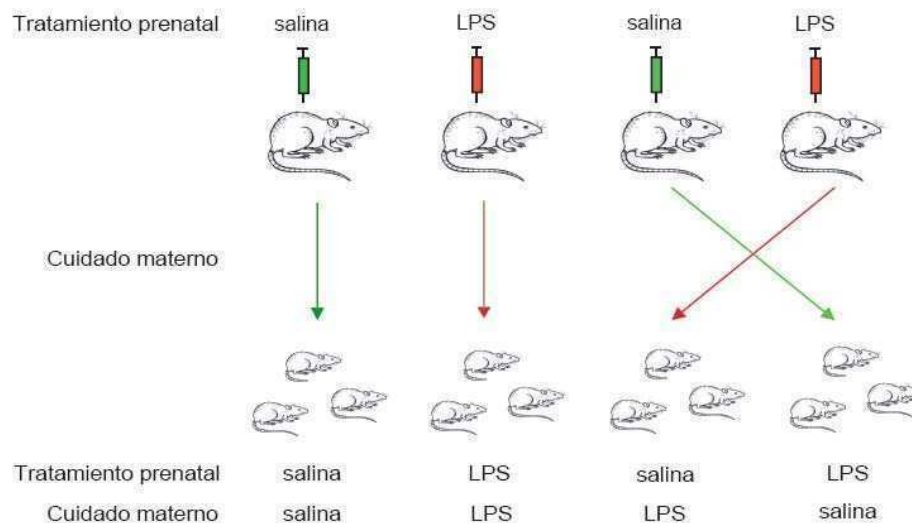


Figura II.2.1 Diseño experimental para evaluar el rol de los niveles de cuidado materno en los efectos de la exposición prenatal a LPS sobre la neurogénesis adulta. Se realizaron inyecciones de LPS o salina a ratas preñadas según el protocolo anteriormente descrito. Una vez que nacieron las crías, algunas madres se dejaron con sus propias crías, mientras que en otras, se intercambiaron las crías entre las madres tratadas con LPS y las tratadas con salina. De este modo se contó con 4 grupos experimentales de crías, según hayan sido prenatalmente tratadas con LPS o salina, y hayan sido cuidadas por madres que recibieron LPS o salina. Se cuantificaron en estos grupos los niveles de cuidado materno durante la primera semana de vida, y la neurogénesis adulta.

Para responder estos interrogantes, se cuantificaron los niveles de cuidado materno durante la primera semana de vida de crías prenatalmente expuestas a LPS o salina. Desde el día P1 hasta P7 se observaron a las madres y crías durante dos lapsos separados de una hora (de 11 a 12 AM, y de 16 a 17 PM). Durante esa hora, se realizó una observación por minuto y se registró la actividad de la madre. Se cuantificó como *cuidado materno* el número de observaciones en las que la madre realiza comportamientos ya descritos como cuidado (“Arched-back nursing” y “Licking & grooming”, ver Introducción y Métodos), sobre el total de observaciones.

Como se observa en la Figura II.2.2, las hembras tratadas durante su preñez con LPS mostraron una reducción en sus niveles de cuidado materno. Cuando se realizaron las adopciones cruzadas, ambos grupos experimentales -salina y LPS- mostraron un alto grado de cuidado materno de las crías adoptivas, equivalente a las hembras tratadas con salina sobre sus propias crías.

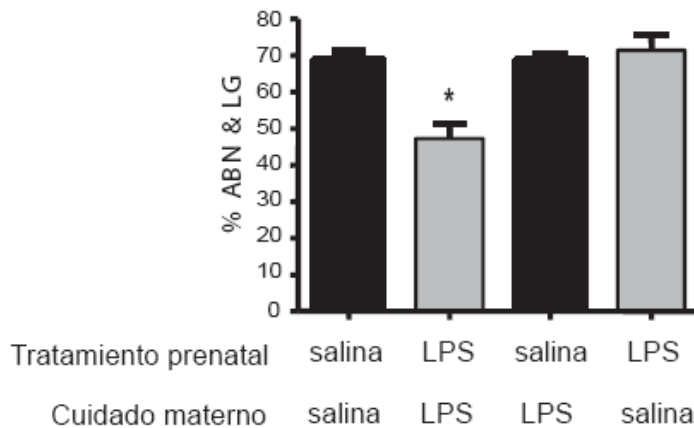


Figura II.2.2 La administración de LPS durante la gestación afecta el cuidado materno. La adopción cruzada revierte este efecto. Cuantificación de cuidado materno medido como la suma de las observaciones de comportamientos de *Arched-back nursing* (ABN) y de *Licking & grooming pups* (LG) sobre el total de observaciones durante los primeros 7 días de vida de las crías. ANOVA de 2 factores, efectos simples: tratamiento prenatal de crías, $p=0.068$; tratamiento de madres, $p=0.028$; interacción $p=0.028$; $n=2-4$ por grupo. $*p<0.05$ Test de Tukey.

Luego, una vez que estas crías llegaron a la adultez, se cuantificaron sus niveles de neurogénesis adulta (Figura II.2.3). Se observa una disminución de la neurogénesis adulta en crías tratadas prenatalmente con LPS, independientemente de si fueron cuidadas por sus propias madres, o por madres adoptivas (Figura II.2.3).

En base a estos datos, es posible concluir que el LPS administrado a hembras preñadas afecta el cuidado materno de sus crías, y por otra parte disminuye la

neurogénesis adulta de sus crías, pero este último efecto es independiente del cuidado materno.

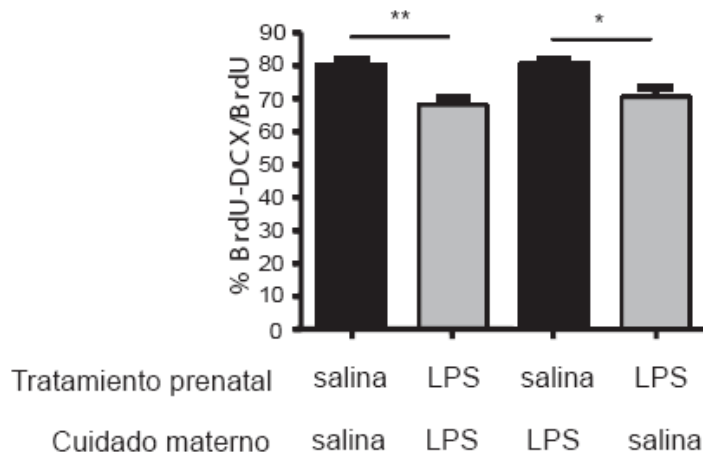


Figura II.2.3 La administración de LPS durante la gestación afecta la neurogénesis adulta, independientemente del cuidado materno recibido. Cuantificación de la neurogénesis adulta, medida como porcentaje de células doblemente marcadas con BrdU y DCX sobre el total de células positivas para BrdU en el GD. ANOVA de 2 factores. Efectos simples: tratamiento prenatal, $p < 0.0001$; cuidado materno, $p = 0.63$; interacción, $p = 0.55$, $n = 5-6$ por grupo. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ test de Tukey.

II.3 El LPS prenatal produce alteraciones morfológicas en la microglía del GD adulto.

Debido a que el nicho neurogénico es el microambiente celular y molecular donde ocurre la neurogénesis adulta, surgió la pregunta de si la exposición prenatal al LPS puede causar cambios permanentes en la composición del nicho neurogénico, y de esta manera afectar al funcionamiento de las CMN. En primer lugar se estudiaron los efectos del LPS prenatal sobre la microglía del GD, ya que este tipo celular es altamente susceptible al LPS. Para ello, se cuantificaron las células de microglía activada en los estadios II-III en cortes a los que se realizó una histoquímica contra GSA, una lectina que marca la microglía en todos sus estadios. Esta cuantificación se realizó en todo el volumen del GD de ratas prenatalmente expuestas a salina o LPS. En la Figura II.3.1 se observa que la microglía adulta en estado activado de tipo II-III aumenta en gran cantidad en respuesta al LPS prenatal. Por lo tanto, es posible afirmar que el LPS prenatal provoca un aumento en la activación de microglía en el GD de las crías adultas.

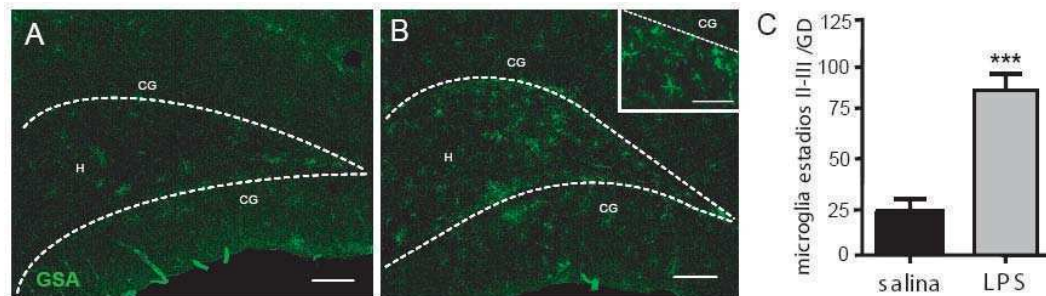


Figura II.3.1 La administración prenatal de LPS produce activación de microglía. A y B. Histoquímica contra GSA en cortes correspondientes a ratas tratadas prenatalmente con salina (A) o LPS (B). El inset muestra en mayor detalle la morfología de la microglía en estadios II-III. C. Cuantificación total de células de la microglía activadas en estadios II y III relativizado a la superficie del GD. Test de student *** $p < 0.001$, $n = 4-5$ por grupo. CG: capa granular. H: hilus. Barra de escala: 50 μm . Inset: 200 μm .

Ya que el LPS administrado en la adultez también disminuye la neurogénesis en forma aguda, es posible que esté provocando además la concomitante activación local de microglía. Se estudió entonces el componente microglial en la disminución aguda de la neurogénesis por la administración de LPS en la adultez. Para ello se cuantificó la microglía activada en ratas prenatalmente tratadas con salina o LPS, y expuestas durante su adultez a una inyección de salina o LPS, a los 7 días después.

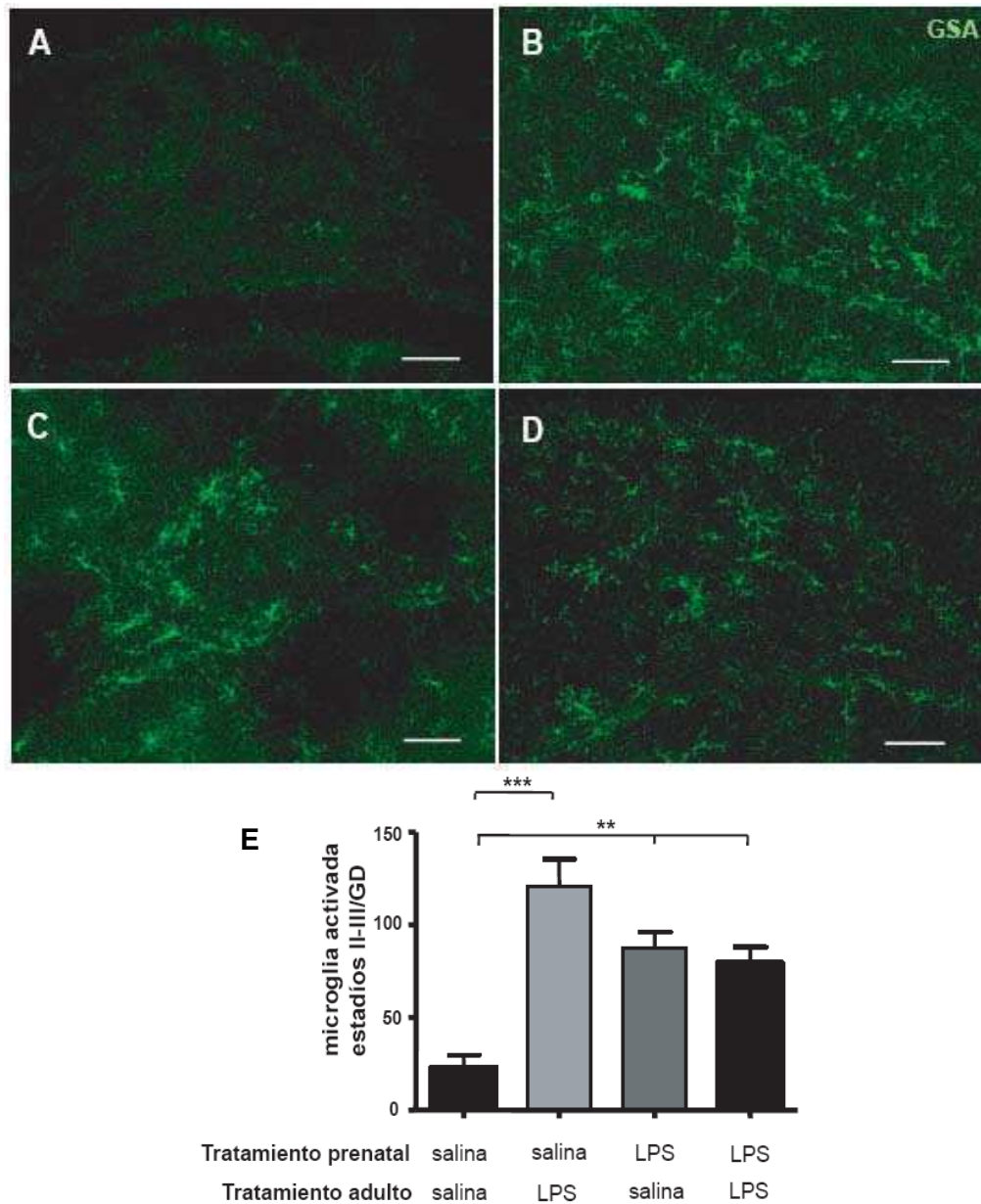


Figura II.3.2 La administración prenatal y/o adulta de LPS causa la activación de la microglía en el GD hasta los estadios II-III. A-D Histoquímica contra GSA de los 4 grupos experimentales: **A.** Salina prenatal + salina adulta. **B.** Salina prenatal + LPS adulto. **C.** LPS prenatal + salina adulta. **D.** LPS prenatal + LPS adulto. Barra de escala: 100 μ m. **E.** Cuantificación de células de microglía en los estadios II y III de activación en el GD de ratas tratadas prenatalmente y/o en la adultez con LPS o salina. ** $p < 0.01$. *** $p < 0.001$. ANOVA de 2 factores, efectos simple: tratamiento prenatal, $p = 0.25$; tratamiento adulto, $p = 0.0004$; interacción, $p < 0.0001$; $n = 4-5$ por grupo. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ test de Tukey.

Se observa en la Figura II.3.2 que el LPS administrado prenatalmente, en la adultez, o en ambos períodos provoca el mismo grado de activación de la microglía. Ambos efectos no son aditivos, ya que la exposición prenatal y adulta al LPS causa un

grado de activación microglial similar a la exposición a cada uno de los estímulos por separado. La activación de microglía es específica del GD, ya que no se observó en otras zonas del cerebro adulto como la corteza, el tálamo y el hipotálamo (datos no mostrados). No se observó la presencia de células activadas hasta el estadio IV (fagocítico) en ninguno de los animales, ni con la detección de GSA (marcador de microglía en todos sus estadios de activación), ni con inmunohistoquímicas contra ED1 (marcador de actividad fagocítica - microglía activada hasta estadio IV).

Si los efectos adversos del LPS administrado durante la adultez a los 7 días de la inyección, son acompañados por una activación de la microglía, es posible pensar que luego de 60 días de la inyección de LPS, cuando este ya no produce cambios en la neurogénesis, sus efectos sobre la activación de la microglía se hayan resuelto. Para verificar si esto ocurría, se observó si existía algún grado de activación de microglía en todo el GD de ratas adultas, 60 días luego de la administración de LPS en adultos. En la Figura II.3.3 se observa que no hay microglía activada en los GD de estas ratas.

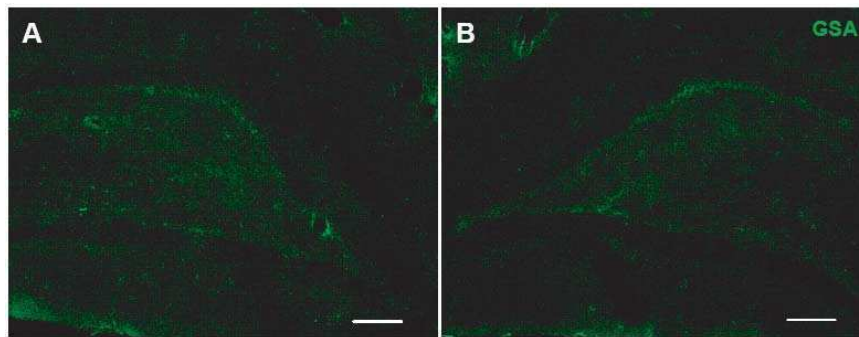


Figura II.3.3 La administración adulta de LPS no produce activación de microglía luego de 60 días. Fotos representativas de histoquímicas para GSA de los 2 grupos experimentales: **A.** Sol. Salina. **B.** LPS. Barra de escala: 50 μ m.

Se puede afirmar a partir de estos resultados, que la activación microglial ocurre concomitantemente con la disminución de la neurogénesis adulta. En el caso de la administración prenatal de LPS, ésta se observa a largo plazo junto con una disminución de la neurogénesis. En el caso de la administración adulta de LPS, se observa activación microglial luego de 7 días, junto con una menor neurogénesis adulta, y ambos efectos se revierten luego de 60 días. Estos resultados sugieren fuertemente una asociación funcional entre la neurogénesis adulta y la activación microglial.

Luego se cuantificó la astrogliá presente en el GD de ratas adultas prenatalmente tratadas con salina o LPS. Los astrocitos responden generalmente a estímulos adversos aumentando su intensidad de marca para GFAP, cambiando su morfología, y proliferando, en un fenómeno conocido como astrocitocis (ver Introducción). De modo que se observó la morfología y se cuantificó la intensidad de marca por densidad óptica para GFAP en el GD de ratas prenatalmente tratadas con salina o LPS. Como se muestra en la Figura II.3.4, no se aprecian modificaciones en la intensidad de marca ni en la morfología de los astrocitos en respuesta al LPS prenatal. Por lo tanto, es posible afirmar que la administración prenatal de LPS afecta la neurogénesis adulta sin producir alteraciones en los astrocitos del GD. Tampoco el estímulo adulto con LPS, ni la combinación de ambos provocan alteraciones en cuanto a la morfología ni al número de astrocitos en respuesta al LPS prenatal (Figura II.3.5), indicando que las células de la microglía son un blanco preferencial del LPS prenatal.

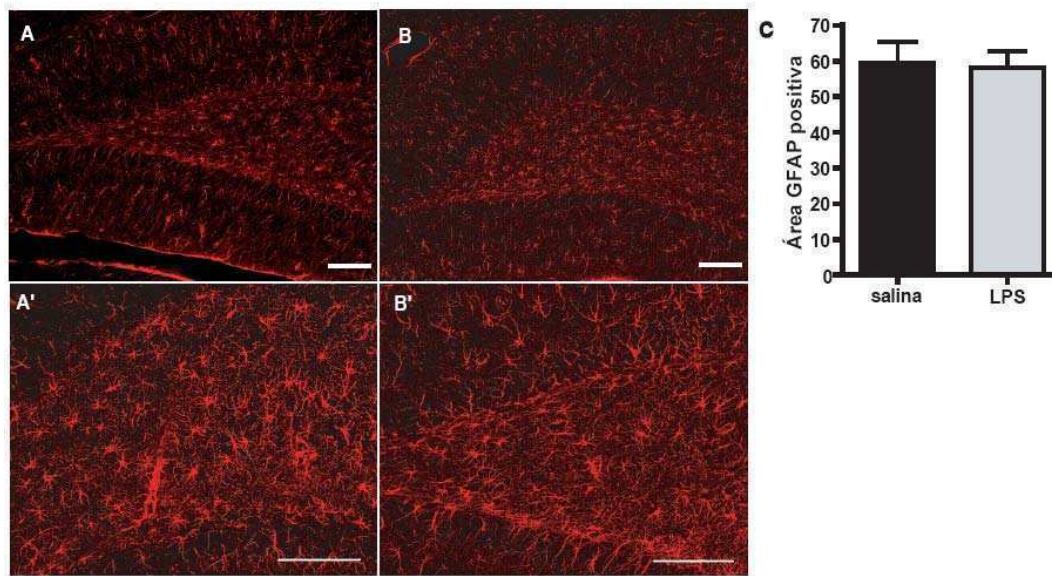


Figura II.3.4 La administración prenatal de LPS no produce astrocitosis. A y B. Fotos representativas de inmunohistoquímicas para GFAP en cortes correspondientes a ratas tratadas prenatalmente con salina (A) o LPS (B). Las fotos correspondientes a A' y B' muestran en detalle la morfología astrocítica. C. Cuantificación de la densidad óptica de la marcación GFAP relativizada a la superficie del GD. Barra de escala: A y B: 50 μ m. A' y B': 100 μ m. Test de student, $p = 0.86$, $n = 6$ por grupo.

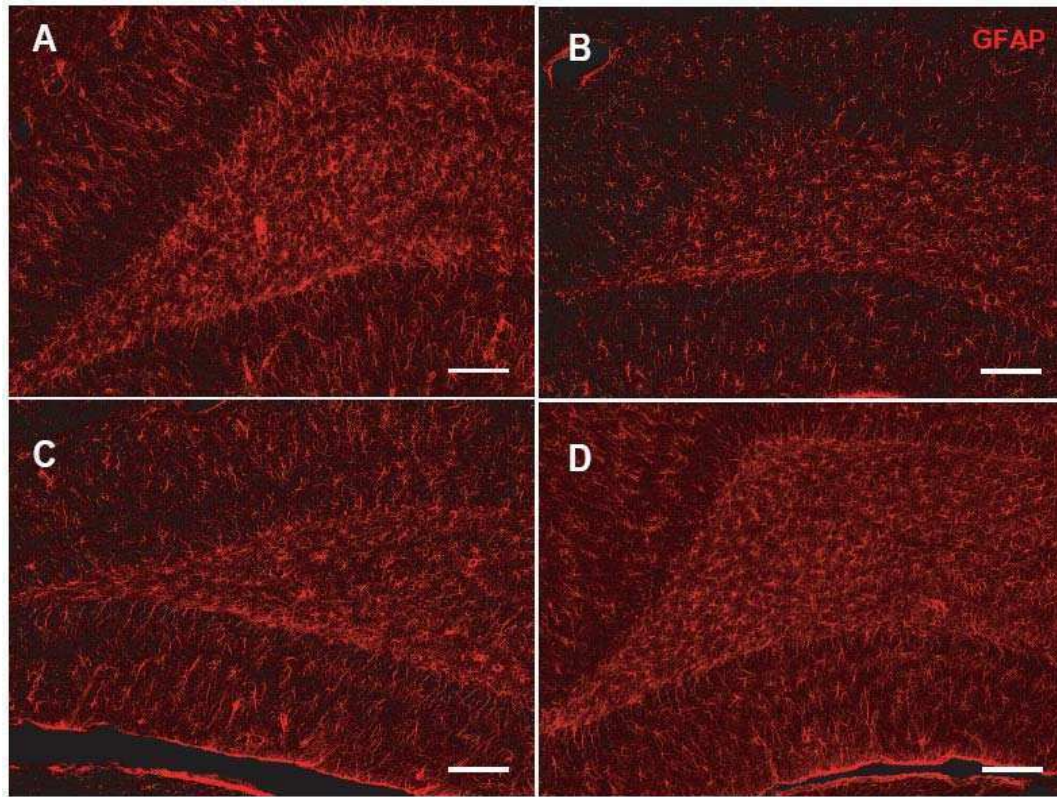


Figura II.3.5 La administración prenatal y/o adulta de LPS no afecta la morfología de los astrocitos ni la intensidad de marca para GFAP en el GD de ratas adultas. Fotos representativas de inmunohistoquímicas para GFAP de los 4 grupos experimentales: **A.** Salina prenatal + salina adulta. **B.** Salina prenatal + LPS adulto. **C.** LPS prenatal + salina adulta. **D.** LPS prenatal + LPS adulto. Barra de escala: 50 μ m.

II.4 El LPS prenatal produce cambios agudos en la expresión de citoquinas pro- y anti-inflamatorias en el GD en desarrollo, y menor expresión de TGF- β_1 en el nicho neurogénico de las crías adultas. TGF- β_1 participa en los efectos del LPS prenatal sobre la neurogénesis adulta.

Por otra parte, se intentó responder la pregunta de si el LPS prenatalmente administrado provoca cambios duraderos en el perfil de expresión de las principales citoquinas pro-y anti-inflamatorias en el GD de las crías adultas. Para ello, se cuantificaron en el hipocampo los niveles de ARNm de IL-1 β , IL-6 y TGF- β_1 por PCR en tiempo real en el día 14 de gestación (E14), a 2 y 6 horas luego de la primera inyección materna; en el día del nacimiento (P0), y en la adultez (P60). Como era esperable, en la Figura II.3.7 se observa que al día E14 existe un aumento en los niveles de ARNm de IL-1 β y TGF- β_1 , así como una tendencia a un aumento de ARNm de IL-6 (Figura II.4.1A). Al día del nacimiento de las crías (P0), algunas de estas alteraciones todavía se observan: los niveles de ARNm de IL-1 β se ve aumentados, mientras que en este momento los niveles de ARNm de TGF- β_1 se encuentran disminuidos, e IL-6 se encuentra en sus valores basales (Figura II.4.1B).

En la adultez (P60), solamente se mantiene la disminución en los niveles de ARNm de TGF- β_1 (Figura II.4.1C), mientras que los niveles de IL-1 β retornaron a los valores basales y los de IL-6 no variaron. Los menores niveles de ARNm de TGF- β_1 en hipocampo adulto fueron corroborados por una menor expresión de proteína por Western blot (Figura II.4.1D).

Por lo tanto, la administración de LPS prenatal afecta el componente inmune celular y molecular del entorno o nicho neurogénico a largo plazo disminuyendo la expresión de TGF- β_1 , de conocido rol anti-inflamatorio, y con efectos pro-neurogénicos reportados (Battista et al., 2006). Su expresión disminuida en el hipocampo adulto indica que existen efectos duraderos del LPS prenatal sobre el entorno neurogénico también a nivel molecular.

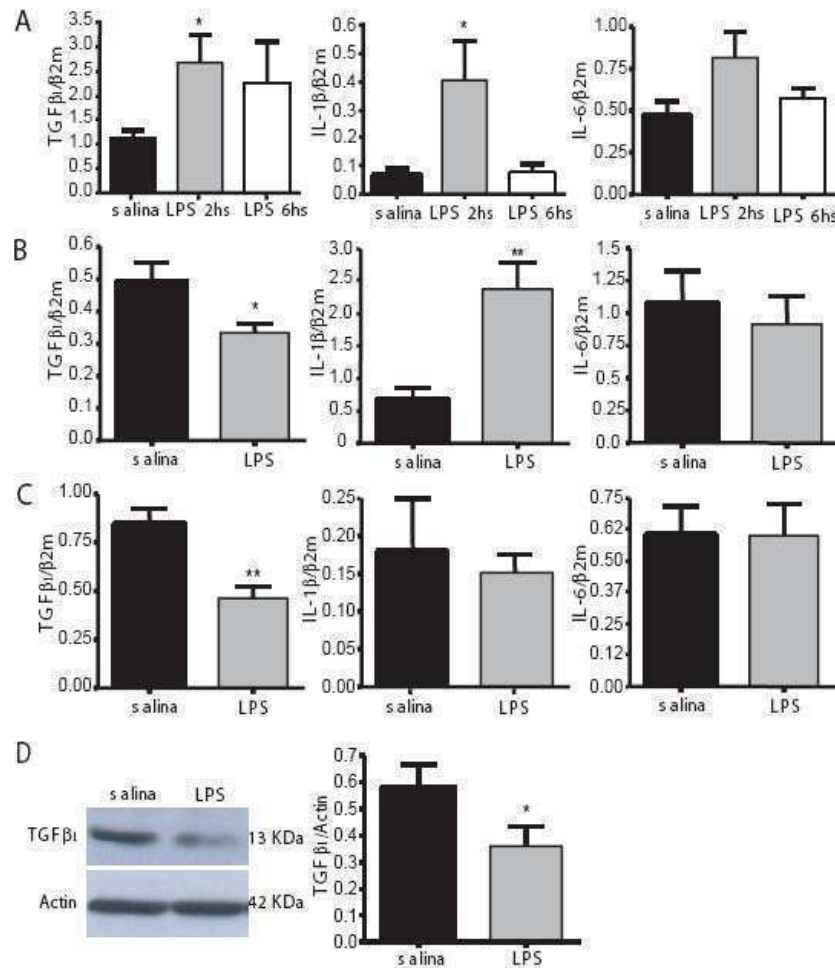


Figura II.4.1 La exposición prenatal a LPS produce alteraciones en la expresión de citoquinas en el GD a distintos tiempos luego de su administración. A-C. RT-PCR en tiempo real de citoquinas pro/anti-inflamatorias en el GD de ratas prenatalmente expuestas a LPS. **A.** Día embrionario 14 (E14). ANOVA de un factor, $p=0.025$; $n=3-4$ por grupo. Post-test de Tukey $*p<0.05$, $**p<0.01$. **B.** Día postnatal 0 (P0). TGFβ₁: Test de student, $**p<0.01$, $n=7-12$ por grupo; IL-1β: Test de student, $*p<0.05$; $n=7-10$ por grupo. **C.** Día postnatal 60 (P60). Test de student, $p=0.0054$; $n=4-5$ por grupo. $*p<0.05$. **D.** Western blot y cuantificación por densitometría de los niveles de expresión de TGFβ₁ y Actina en el GD de ratas a P60 expuestas prenatalmente a salina o a LPS. Test de student, $*p<0.05$; $n=3-4$ por grupo. β2m: β2-microglobulina, gen utilizado como control de carga y de eficiencia de la RT en el hipocampo.

Si la disminución de la neurogénesis ocurre acompañada de una menor expresión de TGF-β₁ en el GD, y esta molécula posee efectos pro-neurogénicos, es posible que la disminución de TGF-β₁ contribuya a la menor neurogénesis observada. En este caso, una sobreexpresión crónica de TGF-β₁ en el GD adulto podría restaurar, al menos parcialmente, los niveles originales de neurogénesis. Para verificar esta hipótesis, adenovectores expresando TGF-β₁ (AdTGF-β₁) o β-Galactosidasa (AdβGal) como control fueron inyectados en el GD adulto de animales prenatalmente tratados con salina

o LPS. Durante los días 2 a 9 post-inoculación de los adenovectores, los animales fueron diariamente inyectados con BrdU, y se perfundieron al día 14 post-inyección para el análisis de neurogénesis (Figura II.4.2).

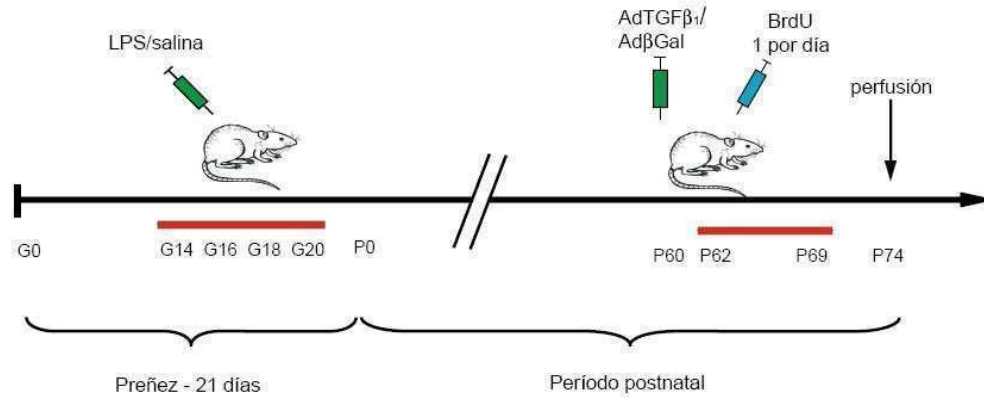


Figura II.4.2 Protocolo de inyecciones prenatales de LPS/salina e inyecciones estereotáxicas en el GD adulto de AdTGFβ₁/Adβgal. Ratas preñadas Wistar hembra fueron sometidas a inyecciones subcutáneas de LPS (0.5mg/kg) o salina, en los días 14, 16, 18 y 20 de gestación. Las crías nacieron aproximadamente al día 21. Al día postnatal 60 fueron inyectadas estereotáxicamente en el GD con dosis equivalentes de AdTGF-β₁/Adβgal. A partir de las 48 horas de estas inyecciones, las ratas recibieron 7 inyecciones diarias de BrdU. Luego de 5 días de la última administración de BrdU, las ratas fueron perfundidas y sus cerebros procesados para análisis posteriores.

Los vectores virales se generaron como se describe en Materiales y Métodos. Todos los stocks utilizados se hallaban libres de LPS y de vectores replicativos (datos no mostrados). Los vectores se distribuyen antero-posteriormente en el hipocampo dorsal, particularmente acumulándose en el GD, aproximadamente entre -2.3 y -5.2 mm desde el bregma (Figura II.4.3). Asimismo, ambos adenovectores expresan correctamente sus transgenes en el tejido, ya que el transgen de la β-Galactosidasa fue detectado con el método X-Gal (Figura II.4.3A), y el TGF-β₁ fue efectivamente reconocido por anticuerpos específicos (Figura II.4.3B).

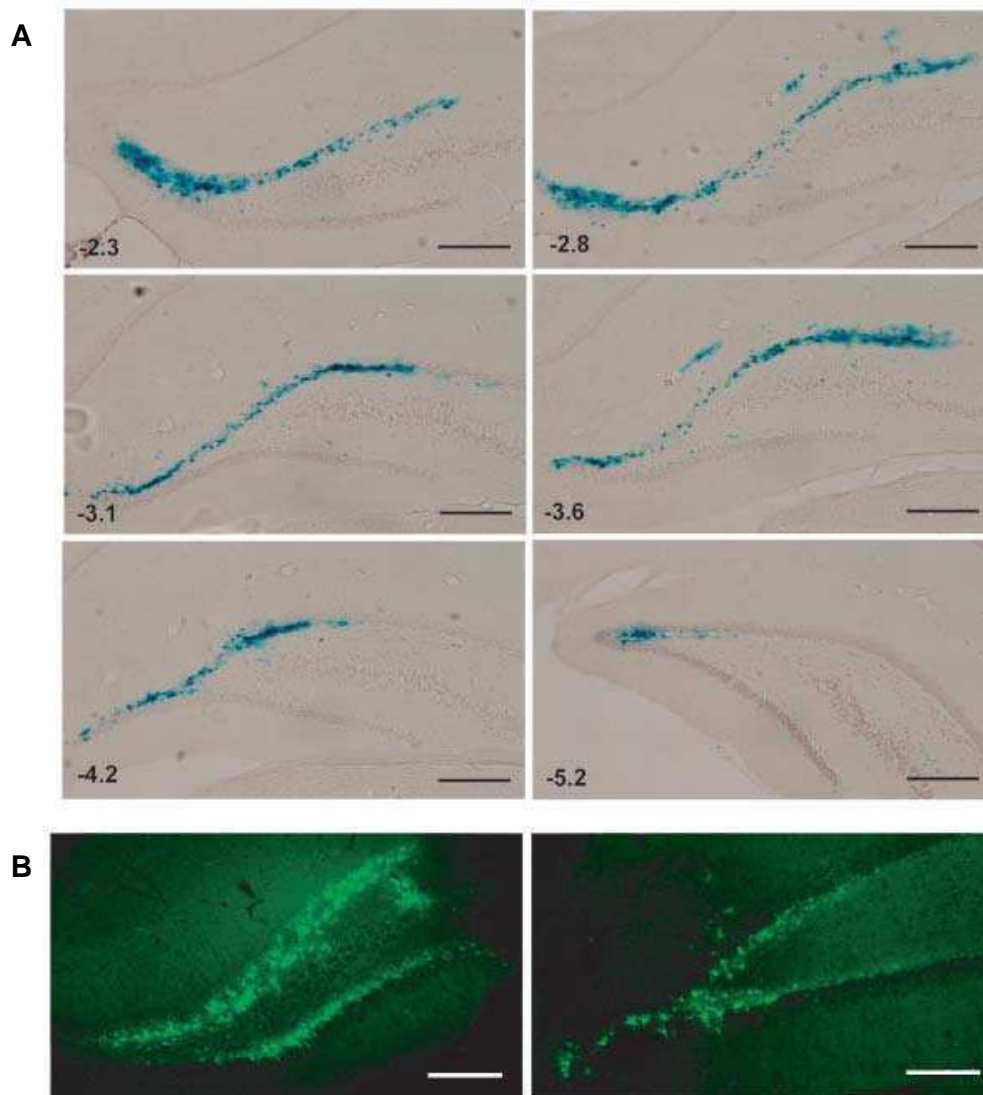


Figura II.4.3 Expresión de los transgenes inyectados estereotáxicamente en el GD. **A.** Marcación con el sustrato X-gal que muestra la distribución antero-posterior del transgen β -galactosidasa en el GD de animales inyectados con Ad β gal. El rango de distribución antero-posterior del adenovector es el utilizado para los análisis de la neurogénesis adulta. **B.** Inmunohistoquímica para TGF- β_1 en el GD de animales inyectados con AdTGF- β_1 . Barra de escala: 50 μ m.

En la Figura II.4.4 se observa la cuantificación de la neurogénesis luego de estos tratamientos, medida como porcentaje de células positivas para BrdU que co-expresan los marcadores neuronales DCX (Figura II.4.4A) o NeuN (Figura II.4.4B). La sobreexpresión crónica de TGF- β_1 no incrementa significativamente la tasa de neurogénesis en el grupo tratado con salina prenatal, mientras que aumenta los niveles de neurogénesis en el grupo LPS prenatal (Figura II.4.4). En otras palabras, la sobreexpresión de TGF- β_1 no provoca un aumento detectable en la neurogénesis per se,

pero revierte los niveles de neurogénesis disminuidos por el tratamiento prenatal con LPS a los originales.

Se puede concluir a partir de estos resultados que la disminución en la expresión de TGF- β_1 está involucrada en los efectos adversos del LPS prenatal sobre la neurogénesis adulta.

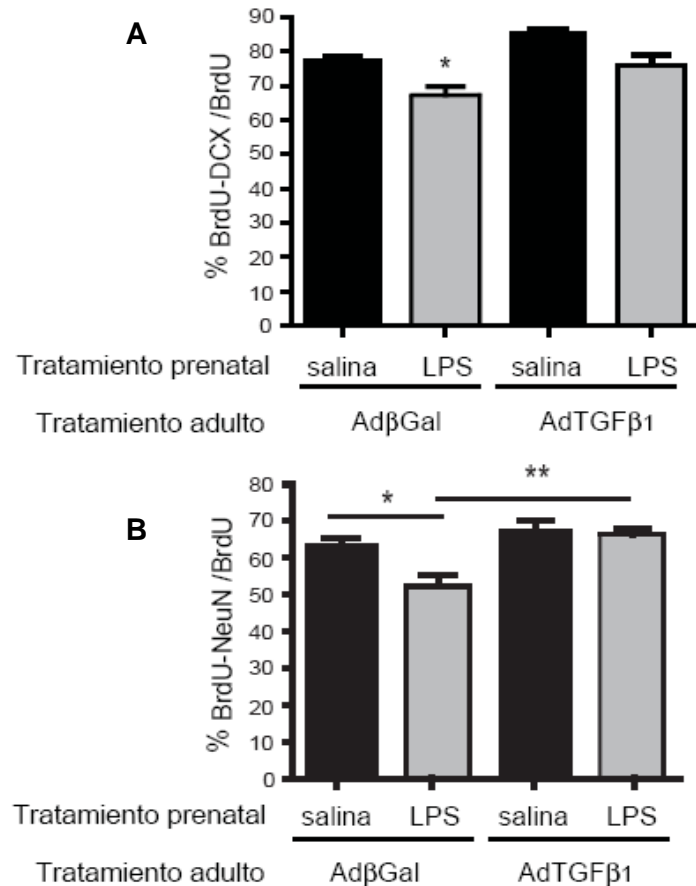


Figura II.4.4 La sobreexpresión de TGF- β_1 no provoca cambios significativos en la neurogénesis de animales prenatalmente inyectados con salina, pero revierte los niveles reducidos de neurogénesis en animales prenatalmente tratados con LPS. A. Cuantificación de los niveles de neurogénesis adulta como cantidad de células doblemente marcadas para DCX y BrdU sobre el total de células positivas para BrdU. ANOVA de dos factores, efectos simples: tratamiento prenatal, $p=0.0017$; inyección adenoviral adulta, $p=0.0035$; interacción, $p=0.72$; $n=6-8$ por grupo. **B.** Cuantificación de los niveles de neurogénesis adulta como cantidad de células doblemente marcadas para NeuN y BrdU sobre el total de células positivas para BrdU. ANOVA de dos factores, efectos simples: tratamiento prenatal, $p=0.0023$; inyección adenoviral adulta, $p=0.0032$; interacción, $p=0.0072$; $n=5-8$ por grupo. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ Test de Tukey.

Capítulo III.

Estudio de los efectos del LPS prenatal sobre
comportamientos adultos dependientes de hipocampo, y
sus posibles mecanismos de acción.

Objetivos e Hipótesis Específicos

El **objetivo** de este capítulo es determinar si la administración prenatal de LPS causa, concomitantemente con la disminución de la neurogénesis adulta, alguna alteración en comportamientos asociados con este proceso. En este caso, se estudiarán también los posibles mecanismos de acción de los efectos del LPS prenatal.

La **hipótesis de trabajo** supone que la disminución en la neurogénesis adulta observada ante el tratamiento prenatal con LPS posee un correlato comportamental de alguno de estos paradigmas.

Resultados – Capítulo III

III.1 La administración prenatal de LPS no afecta comportamientos relacionados con la ansiedad y depresión en las crías adultas.

Con el objetivo de estudiar si la disminución en la neurogénesis adulta causada por la administración prenatal de LPS tendría un correlato comportamental, se sometió a los animales a distintos tests comportamentales que modelan ansiedad, depresión, o “comportamiento durante la enfermedad” (“sickness behavior” en inglés).

Uno de los mencionados tests es el de Preferencia por Sacarosa o “Sucrose Preference”. Este test evalúa el interés de las ratas por una condición que normalmente es preferible para ellas: el consumo de agua azucarada. Para ello, se expusieron ratas prenatalmente tratadas con salina o LPS y alojadas en jaulas individuales, a 2 botellas con agua azucarada (sacarosa 1% en agua corriente) por 48 hs, con el objetivo de familiarizarlas con esta condición. Luego, se les retiró todo el líquido por una noche, de modo de provocar la necesidad de beber durante el test. El test consistió en exponerlas por determinado tiempo a una botella con agua y una con sacarosa 1%, y luego medir la ingesta de cada una (Figura III.1.1A). Normalmente las ratas prefieren la sacarosa 1%, y beben más de este líquido. Las ratas que sufren anhedonia, un aspecto importante de la depresión, no se encuentran motivadas por el agua azucarada y beben cantidades equivalentes de ambos líquidos. Datos de nuestro laboratorio confirman estos efectos en modelos de depresión (datos no mostrados).

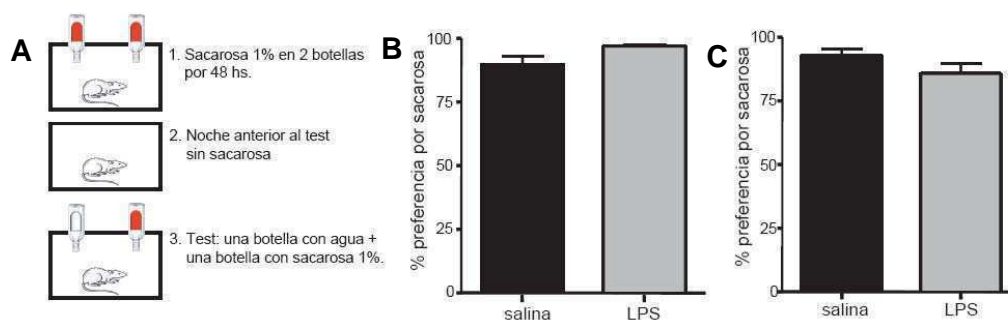


Figura III.1.1 El tratamiento prenatal con LPS no causa anhedonia. **A.** Protocolo del test de preferencia por sacarosa. **B.** Porcentaje de la solución de sacarosa 1% tomada sobre el total de líquido tomado, luego de 2 horas. Test de student, $p=0.08$, $n=6$ por grupo. **C.** Porcentaje de la solución de sacarosa 1% tomada sobre el total de líquido tomado, luego de toda la noche. Test de student, $p=0.19$, $n=6$ por grupo.

Al someterse a ratas prenatalmente tratadas con salina o LPS a este test, se observó que el LPS no provocó modificaciones en la preferencia por sacarosa luego 2 horas, ni luego de toda la noche. En la Figura III.1.1B y C se observa que las ratas de ambos grupos mantienen una alta preferencia por la sacarosa, ya que ambos toman alrededor de un 80 al 90% de esa botella con respecto a la botella con agua. De modo que es posible afirmar a partir de este dato que la exposición prenatal a LPS no es una causante de anhedonia.

Otro de los test comportamentales utilizados fue el de la Natación Forzada o “Porsolt Forced Swimming”. Este test constituye un modelo de depresión y se vale de la cantidad de esfuerzo físico que realizan las ratas por flotar al ser sumergidas en agua. Estos animales flotan naturalmente de modo que el test no constituye un peligro para ellos, sin embargo actúan como si lo fuera. En particular, el test consiste en cuantificar la cantidad de tiempo en movimiento en relación a la cantidad total de tiempo en el recinto con agua (Figura III.1.2A). Un estado de depresión disminuye significativamente la cantidad de tiempo en movimiento. Datos de nuestro laboratorio confirman estos efectos (datos no mostrados).

Como se observa en la Figura III.1.2B, la exposición prenatal a LPS no provocó cambios en el porcentaje del tiempo en que estos animales permanecen en movimiento. De este modo, concluimos que el LPS prenatalmente administrado no afecta comportamientos relacionados con la depresión.

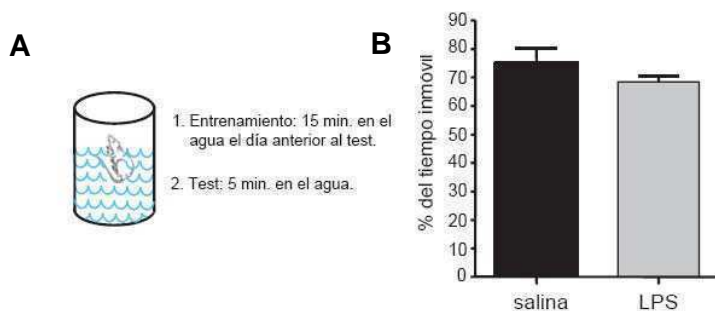


Figura III.1.2 El tratamiento prenatal con LPS no provoca comportamientos relacionados con la depresión. A. Protocolo del test de natación forzada. **B.** Porcentaje del tiempo que las ratas permanecen inmóviles durante los 5 minutos en el agua. Test de student, $p=0.23$, $n=6-8$ por grupo.

Otro de los comportamientos que comparten rasgos con un estado depresivo es el llamado comportamiento durante la enfermedad o “sickness behavior”, en el cual el animal padece actividad reducida, encontrándose en un estado letárgico. El estado de

“sickness behavior” es típicamente causado por el LPS en forma aguda, durante las primeras 24 horas, junto con fiebre y un descenso de peso de alrededor del 10% (Dantzer, 2004).

Para determinar la posible existencia de esta condición como resultado del tratamiento prenatal con LPS, se realizó el test de “Burrowing”, en el cual se cuantifica una actividad particular espontánea de los roedores (Dantzer, 2004). El test consiste en exponer individualmente a los animales a un tubo lleno de pequeñas piedras, que ellos sacan a medida que se van introduciendo en el tubo. Luego de cierto tiempo de exposición, se pesan las piedras remanentes en el tubo y se calcula cuánto sacaron (Figura III.1.3A). Este parámetro es indicativo del nivel de actividad del animal.

En este caso, el tratamiento prenatal con LPS no causó diferencias en el nivel de actividad de las ratas en el test mencionado ni luego de 2 horas, ni luego de 12 horas de exposición al tubo con piedras (Figura III.1.3B y C). Por lo tanto, el LPS prenatalmente administrado no genera un estado de “sickness behavior” en las crías adultas.

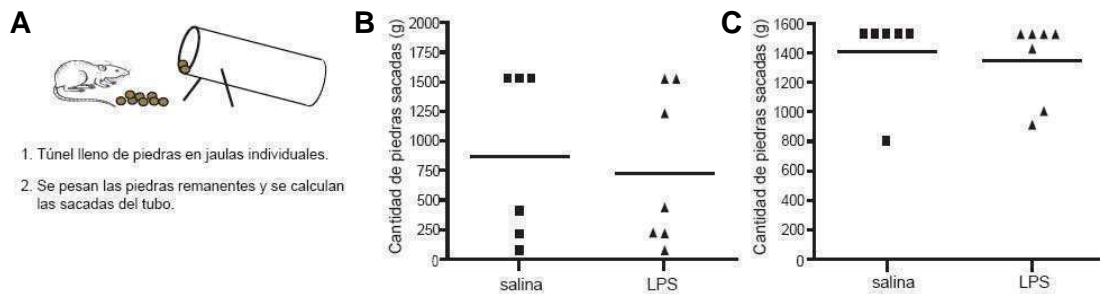


Figura III.1.3 El tratamiento prenatal con LPS no causa sickness behavior. **A.** Protocolo del test de “Burrowing”. **B.** Cantidad en peso de piedras sacadas del tubo luego de 2 horas. Test de Mann-Whitney, $p=0.73$, $n=6-7$ por grupo **C.** Cantidad en peso de piedras sacadas del tubo luego de 12 horas. Test de Mann-Whitney, $p=0.74$, $n=6-7$ por grupo

Los animales fueron sometidos a otros tests comportamentales que modelan comportamientos que han sido relacionados con la depresión, como la ansiedad. Uno de los tests más conocidos y avalados que modelan este estado es el de la Alimentación Suprimida por la Novedad o “Novelty Suppressed Feeding”. En este test, la rata se encuentra con dos instintos opuestos: la tendencia natural a evitar espacios demasiado expuestos y luminosos (el centro del recinto) y la necesidad de alimentarse. Al colocarse la comida en el centro del recinto que constituye el espacio ansiogénico, en la rata prima normalmente la necesidad de alimentarse por sobre la ansiedad que le genera llegar a ella. El tiempo que tarde en vencer la ansiedad (latencia) es la variable que mide este

test, y representa el nivel de ansiedad de la rata (Figura III.1.4A). Ante estados de ansiedad, la latencia a alcanzar el centro del recinto es mayor, e incluso algunos animales nunca se exponen en el centro durante el curso del test.

Se observa que el tratamiento prenatal con LPS no provocó diferencias en la latencia a alcanzar el centro para oler, ni para comer el pellet que estaba presente allí (Figura III.1.4B y C). Por lo tanto se concluye que el LPS prenatal no provoca un estado de ansiedad en las crías adultas.

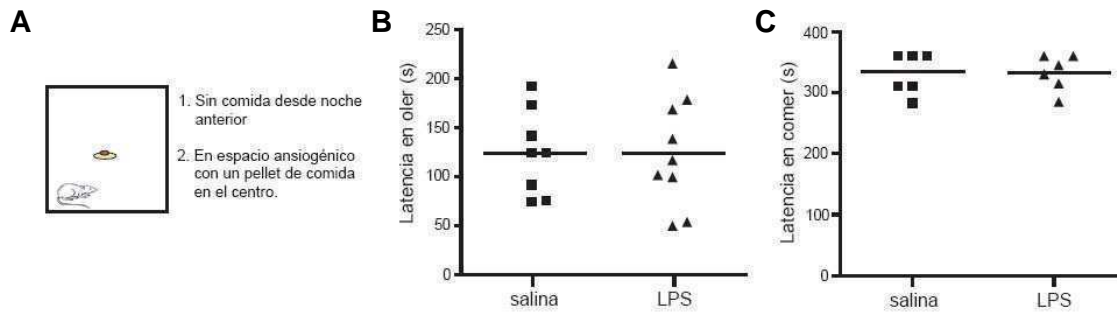


Figura III.1.4 El tratamiento prenatal con LPS no causa un estado de ansiedad medida por NSF. A. Protocolo del test de alimentación suprimida por la novedad. **B.** Latencia en oler la comida ubicada en el centro del recinto. Test de student, $p=0.86$, $n=8-9$ por grupo **C.** Latencia en comer la comida ubicada en el centro del recinto. Test de student, $p=0.94$, $n=6$ por grupo.

Tomando estos datos en conjunto, es posible concluir que la disminución de la neurogénesis causada por la exposición prenatal a LPS no se ve reflejada en comportamientos relacionados con la ansiedad y/o depresión en las crías adultas.

III.2 La administración prenatal de LPS afecta comportamientos relacionados con la memoria y aprendizaje en las crías adultas.

Con el objetivo de responder si la disminución en la neurogénesis adulta causada por el tratamiento prenatal con LPS es acompañada por cambios comportamentales que afecten la memoria y/o el aprendizaje, animales prenatalmente tratados con salina o LPS fueron también sometidos al test del Reconocimiento del Objeto Nuevo (NOR su sigla en inglés) según el protocolo de la Figura III.2.1.

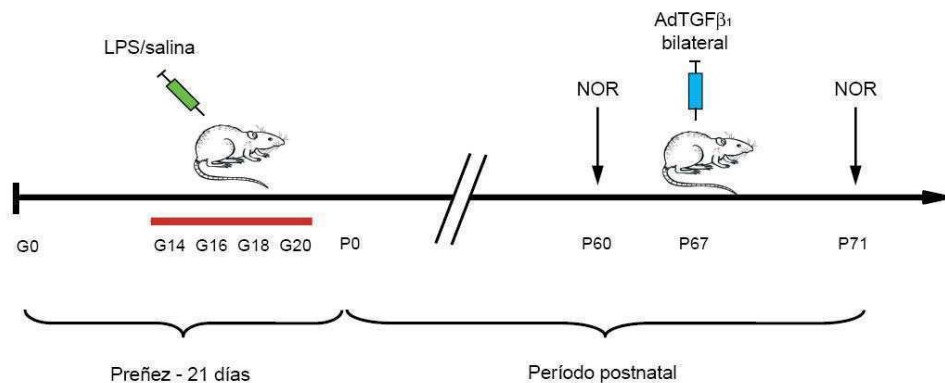


Figura III.2.1 Diseño experimental para probar comportamientos adultos relacionados con la memoria. Ratas Wistar hembra preñadas fueron sometidas a inyecciones subcutáneas de LPS (0.5mg/kg) o salina, en los días 14, 16, 18 y 20 de gestación. Las crías nacieron aproximadamente al día 21. Estas se destetaron al día 21. A los 60 días se les realizó el test de Reconocimiento de Objeto Nuevo (NOR). Luego de una semana se les inyectó un adenovector recombinante para TGF- β_1 (AdTGF- β_1) en el GD en forma bilateral. Luego de 14 días de la operación, las ratas fueron sometidas nuevamente al NOR con objetos nuevos.

Este test consta de varias etapas: en la primera se expone al animal a un entorno determinado, que es un espacio abierto de forma cuadrada (*habitación*). Luego, dentro de ese mismo recinto se expone al animal por 5 minutos a dos objetos iguales, que serán explorados (*familiarización*). Luego de un tiempo determinado y fijado por el investigador, el tercer paso es exponer al animal a un objeto igual a los previamente explorados en la etapa anterior, y a uno nuevo (*test*) (Figura III.2.2A). El animal recordará el objeto que exploró en la etapa de familiarización y que le es conocido, y por lo tanto es esperable que el objeto nuevo llame diferencialmente su atención, y el animal explore el objeto nuevo por más tiempo. Animales con defectos en la capacidad de almacenar memoria a corto plazo no reconocen al objeto familiar como tal, y entonces lo exploran en la misma medida que el objeto novedoso. Es decir, la

preferencia por el objeto novedoso es el parámetro indicativo de la capacidad de recordar el otro objeto como familiar, y por lo tanto del estado de la memoria. En este caso, se utilizan dos tiempos del test, a 1 minuto y 3 horas después de la etapa de familiarización. El primero, representa una memoria inmediata del reconocimiento del objeto. Al segundo tiempo, luego de 3 horas, ocurre una retención de la memoria a corto plazo, que es afectada por la disminución en la neurogénesis (Jessberger et al., 2009).

En este caso se observa que ambos grupos, salina y LPS prenatal, incrementaron en igual medida la exploración del objeto nuevo cuando el intervalo entre la fase de familiarización y la de test fue de 1 minuto (Figura III.2.2B). Por otra parte, cuando el intervalo entre las fases de familiarización y test fue de 3 horas, solo el grupo prenatalmente tratado con salina exploró diferencialmente el objeto nuevo. Por el contrario, la exposición prenatal al LPS afectó la memoria de reconocimiento del objeto, ya que los animales de este grupo exploraron por una cantidad de tiempo menor el objeto nuevo (Figura III.2.2C).

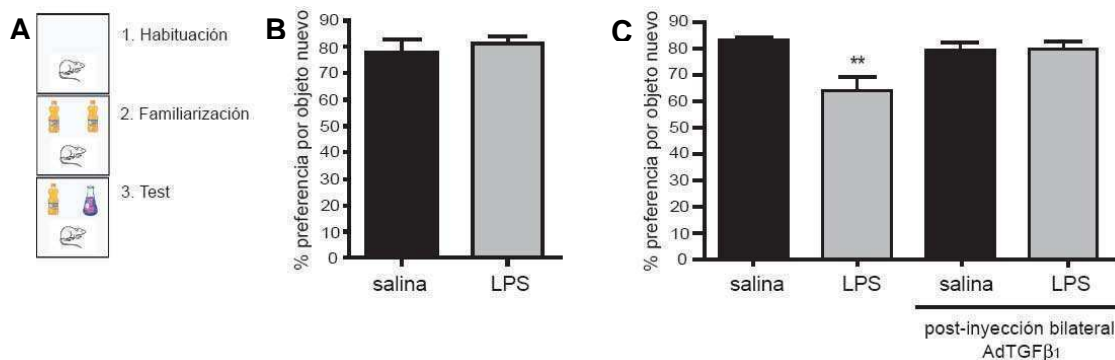


Figura III.2.2 El LPS prenatal afecta el desempeño en el test NOR. Este efecto es dependiente de los niveles de TGF- β ₁ en el GD. A. Etapas del test. **B.** Preferencia por el objeto nuevo, medida como cantidad de tiempo explorando el objeto nuevo en relación al tiempo total de exploración de ambos objetos, luego de un intervalo de 1 minuto entre la fase de familiarización y la fase de test. Test de student, $p=0.54$, $n=8-9$ por grupo. **C.** Preferencia por el objeto nuevo, medida como cantidad de tiempo explorando el objeto nuevo en relación al tiempo total de exploración de ambos objetos, luego de un intervalo de 3 horas entre la fase de familiarización y la fase de test. ANOVA de dos factores, efectos simples: tratamiento prenatal, $p<0.05$; AdTGF- β 1, $p=0.15$; interacción, $p<0.05$, $n=6-9$ por grupo. Test de Tukey: ** $p<0.01$ LPS prenatal pre-inyección versus el resto de los grupos.

En el capítulo II se demostró que la expresión disminuida de TGF- β_1 participa en la disminución de la neurogénesis adulta causada por la exposición prenatal al LPS. Como el desempeño en el test NOR es dependiente de los niveles de neurogénesis adulta luego de 3 horas (Jessberger et al, 2009), se hipotetizó que una disminución en la expresión de TGF- β_1 en el GD podría estar también involucrada en la menor preferencia por el objeto nuevo en el test NOR, observada en el grupo LPS prenatal. Si éste fuera el caso, una sobreexpresión bilateral crónica de TGF- β_1 debería restaurar, al menos parcialmente, la preferencia por el objeto nuevo en el grupo tratado con LPS prenatal.

Para verificar si esta hipótesis era correcta, los mismos animales que fueron evaluados en el test NOR, fueron inyectados bilateralmente con un adenovector recombinante expresando TGF- β_1 (AdTGF- β_1) en el GD, y sometidos nuevamente al test 14 días luego de la inyección (Figura III.2.2C).

Como se esperaba, al ser TGF- β_1 bilateralmente sobreexpresado, los animales prenatalmente tratados con salina no modificaron su preferencia por el objeto nuevo. Sin embargo, los animales prenatalmente tratados con LPS aumentaron su preferencia por el objeto nuevo a valores similares a los del grupo prenatalmente tratado con salina (Figura III.2.2C). Las diferencias mencionadas no se debieron a alteraciones en la exploración total ni en la locomoción total, como se muestra en la Figura III.2.3B y C.

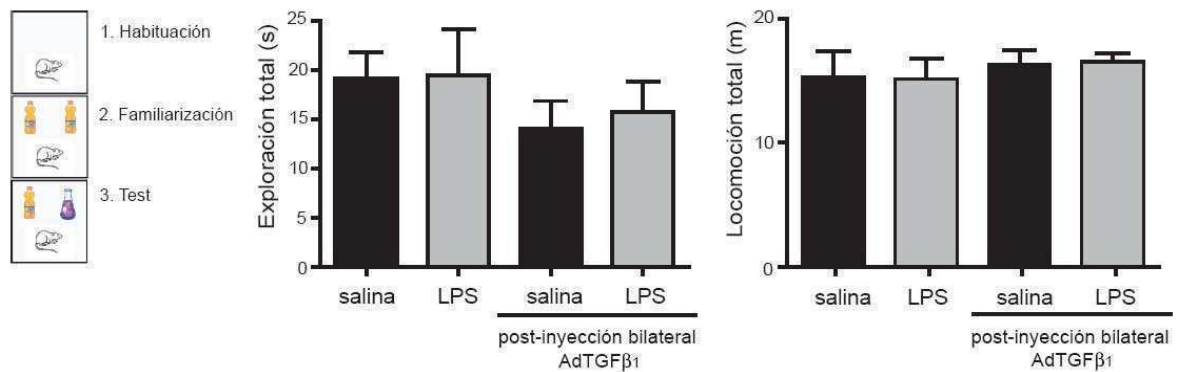


Figura III.2.3 El LPS prenatal no afecta el total de exploración ni de locomoción en el test NOR. A. Protocolo del test. **B.** Tiempo total de exploración en la fase del test, medido en segundos. **C.** Distancia total recorrida en el transcurso de la fase del test, medido en metros. ANOVA de 2 factores ns.

Por otra parte, tanto el tiempo total de exploración como la distancia total de locomoción se mantuvieron constantes en ambos grupos luego de la inyección bilateral de TGF- β_1 . Esto indica que los niveles locales de TGF- β_1 tampoco afectan a estos parámetros, y por lo tanto que el nivel de expresión de TGF- β_1 en el GD también es específico sobre la preferencia por el objeto nuevo.

Es posible concluir en base a estos datos que los niveles locales de TGF- β_1 constituyen un factor modulador del comportamiento en el test NOR, indicativo de los niveles de memoria a corto plazo. Estos resultados denotan una relación funcional entre los niveles de TGF- β_1 en el GD y el consecuente desempeño en tests de comportamientos específicamente dependientes de la neurogénesis adulta.

Capítulo IV.

Estudio de las vías de señalización involucradas en el efecto pro-neurogénico de TGF- β_1 .

Objetivos e Hipótesis Específicos

El **objetivo** de este capítulo es caracterizar el rol pro-neurogénico de TGF- β_1 , en particular determinar si la vía canónica de señalización, la vía Smad2/3, media los efectos de TGF- β_1 sobre la diferenciación neuronal de un cultivo de CMN de hipocampo de ratas adultas.

La **hipótesis** supone que la vía Smad 2/3 es la mediadora de los efectos pro-neurogénicos de TGF- β_1 .

Resultados – Capítulo IV

IV.1 La presencia de TGF- β_1 induce la activación de la vía Smad2/3 en CMN de hipocampo de ratas adultas. La pre-incubación de estas células con Smad7 previene la activación por TGF- β_1 .

La vía canónica de señalización utilizada por TGF- β_1 para inducir genes de respuesta y ejercer sus diversos efectos es la vía Smad2/3. Se hipotetizó que los efectos pro-neurogénicos de esta citoquina podrían estar mediados por ésta, su principal vía de señalización. Para verificar esta hipótesis en cultivos de CMN adultas (obtenidos de hipocampo de ratas adultas, ver Materiales y Métodos), se utilizó un adenovector que sobreexpresa Smad7 (AdSmad7), un inhibidor fisiológico de la vía Smad2/3, como herramienta para bloquear la cascada de señalización en presencia de TGF- β_1 . Como control, se utilizó un adenovector que expresa la proteína β -galactosidasa (Ad β gal).

En primer lugar, se quiso confirmar la expresión específica del transgen Smad7. Para ello, se transdujeron CMN con AdSmad7 y Ad β gal, como se observa en la figura IV.1 (día 1). A las 24 horas se agregó TGF- β_1 al medio en distintas concentraciones (0.1 y 1ng/ml) (día 2). Luego de 30 minutos se procesaron las células para extraer proteínas y se realizó un Western blot para Smad7 y actina. Como se observa en la Figura IV.2, el transgen Smad7 se expresa solamente en CMN transducidas con el AdSmad7. De esta manera se confirmó la expresión del transgen Smad7 en las CMN.

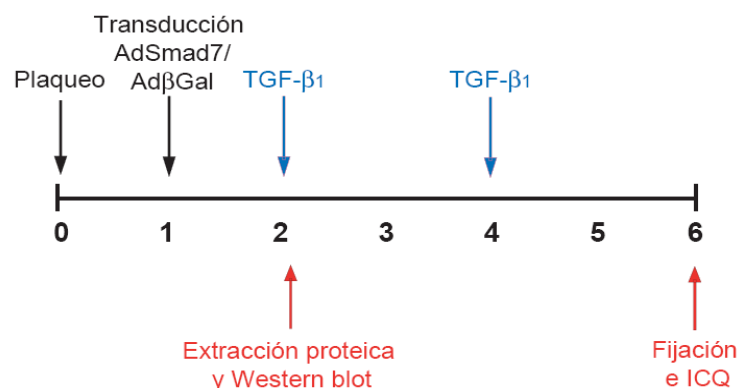


Figura IV.1 Diseño experimental para evaluar la activación de la vía Smad 2/3 y la diferenciación neuronal de las CMN. Las CMN fueron plaqueadas en placas de 24 pocillos (día 0). Al día siguiente, fueron transducidas con dosis equivalentes de adenovectores Ad β Gal o AdSmad7 (día 1). Al día siguiente (día 2) y a las 48 horas (día 4), fueron estimuladas con el agregado de TGF- β_1 al medio de cultivo. Para realizar los Western blot las células fueron levantadas al día 2, a los 30 minutos luego del agregado de TGF- β_1 , para realizar una extracción de proteínas. Para realizar las inmunocitoquímicas (ICQ), las células se fijaron al día 6, y se incubaron con anticuerpos anti- β -III tubulina (marcador de neuronas jóvenes) y coloraciones para Hoescht (marcador de núcleos).

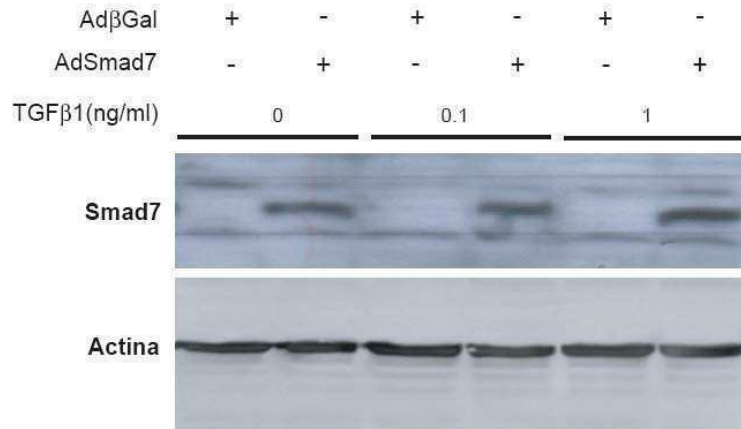


Figura IV.2 El transgen Smad7 se expresa en las CMN transducidas con el adenovector recombinante para esta proteína. Western blot de Smad7 y de actina como control de carga, partiendo de lisados de CMN transducidos con AdSmad7 o Ad β Gal por 24 horas, y tratados con distintas concentraciones de TGF- β ₁ (0.1 y 1ng/ml) por 30 minutos.

Luego se quiso comprobar la funcionalidad de la vía Smad2/3 en el cultivo de CMN (Figura IV.3). Para ello se realizó un Western blot para Smad2/3, y actina como control de carga, de CMN pre-incubadas con AdSmad7 o Ad β gal por 24 horas, e incubadas con distintas concentraciones de TGF- β ₁ (0.1, 1 y 10ng/ml) por 30 minutos. Se observa un grado de fosforilación basal de Smad2/3, y ante la presencia de dosis crecientes de TGF- β ₁ esta fosforilación aumenta. Este efecto es a su vez inhibido por la presencia de Smad7, que interfiere específicamente con el evento de fosforilación de Smad 2/3 por el receptor de TGF- β ₁, a concentraciones de TGF β ₁ menores que 10ng/ml (Figura IV.3). Por lo tanto, la vía Smad 2/3 en las CMN se activa en respuesta a TGF- β ₁, y esta activación es prevenida por Smad7.

Una vez confirmado el funcionamiento de esta vía, se evaluó el rol funcional de la cascada de señalización de la vía Smad2/3 sobre la diferenciación neuronal del cultivo de CMN. Para ello, se transdujeron las CMN con AdSmad7 o Ad β gal (día 1), se estimularon con TGF- β ₁ en los días 2 y 4, y se fijaron con paraformaldehído 4% en el día 6 (Figura IV.1). Luego, se realizaron inmunocitoquímicas para marcadores de neuronas jóvenes (β -III tubulina) y tinciones nucleares con el colorante Hoescht. Como índice de diferenciación neuronal, se cuantificó el número de neuronas jóvenes (positivas para β -III tubulina) respecto del total de células (positivas para Hoescht).

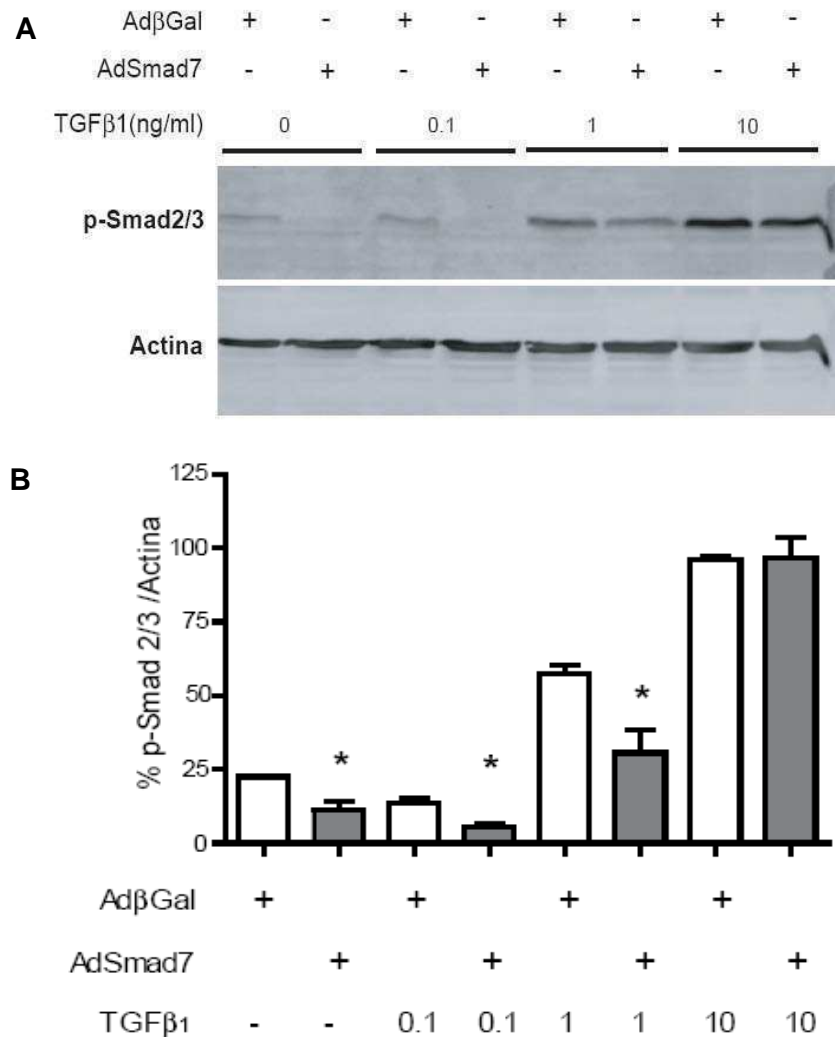


Figura IV.3 La vía de señalización Smad2/3 se activa ante la presencia de TGF-β₁. La pre-incubación de las CMN con Smad7 inhibe parcialmente la activación de la vía a dosis de TGF-β₁ menores que 10 ng/ml. **A.** Western blot de Smad2/3 fosforilado (p-Smad2/3) y de actina como control de carga, partiendo de lisados de CMN transducidas con AdSmad7 o AdβGal por 24 horas, y tratados con distintas concentraciones de TGF-β₁ (0.1, 1 y 10 ng/ml) por 30 minutos. **B.** Cuantificación de los niveles de proteína Smad2/3 fosforilado (p-Smad2/3) y de actina por densitometría relativa de bandas en 3 experimentos independientes, realizada con el software Image J. ANOVA de dos factores seguido de test de Tukey *p<0.05.

En la Figura IV.4 se observa que la presencia de TGF-β₁ aumentó el grado de diferenciación neuronal de las CMN. La pre-incubación con AdβGal no afectó significativamente el grado de diferenciación neuronal en respuesta a TGF-β₁. Sin embargo, la pre-incubación con AdSmad7 previno el aumento en la diferenciación neuronal causado por TGF-β₁, de esta forma manteniendo los niveles de diferenciación neuronal basales, similares a los del grupo control (bajo FGF).

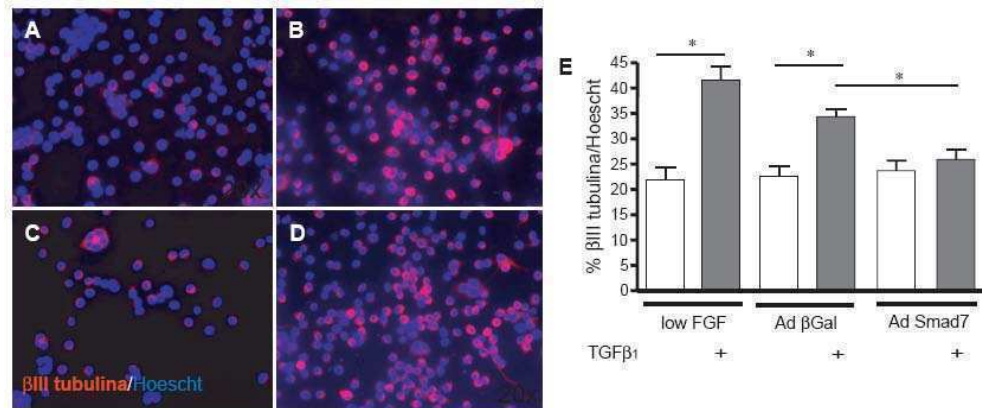


Figura IV.4 La presencia de TGF-β₁ (1ng/ml) induce la diferenciación neuronal de las NSCs. La pre-incubación de estas células con Smad7 previene los efectos pro-neurogénicos de TGF-β₁. A-D. Inmunocitoquímica para Tuj y Hoescht. **A.** bajo FGF **B.** bajo FGF+ TGFβ₁. **C.** AdSmad7+ TGF-β₁. **D.** AdβGal+ TGF-β₁. **E.** Cuantificación del porcentaje de células contadas que expresan β-III tubulina (%β-III tubulina /Hoescht). ANOVA de dos factores seguido de test de Tukey *p<0.05.

Luego se estudió si junto a esta diferenciación neuronal, evidenciada por una mayor proporción de células que expresan Tuj, se podía observar también como una disminución en la población de CMN. Para ello, se realizaron inmunocitoquímicas para marcadores de CMN (Nestina) y tinciones nucleares con el colorante Hoescht. Como índice de proporción de CMN en el cultivo, se cuantificó el número de CMN (positivas para Nestina) respecto del total de células (positivas para Hoescht) (Figura IV.5).

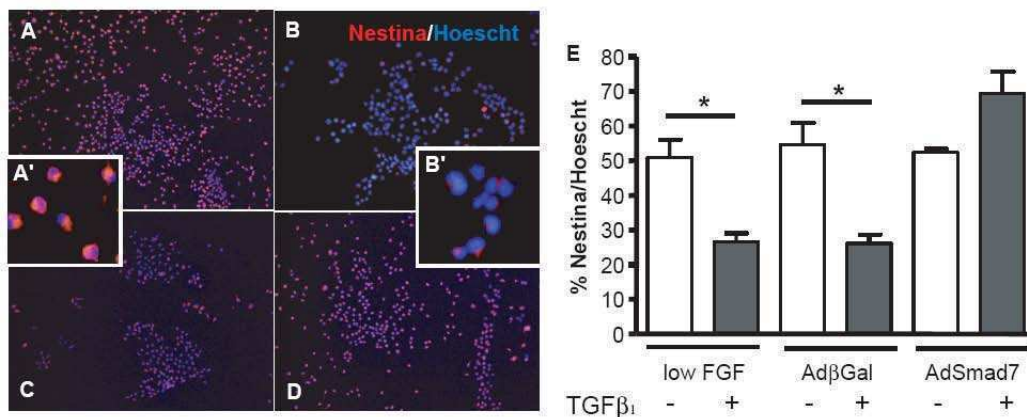


Figura IV.5 La presencia de TGF-β₁ (1ng/ml) reduce la proporción de NSCs. La pre-incubación de estas células con Smad7 previene los efectos de TGF-β₁. A-D. Inmunocitoquímica para Nestina y Hoescht. **A.** AdβGal **B.** AdβGal + TGF-β₁. **C.** AdSmad7. **D.** AdSmad7 + TGF-β₁. **A' y B'.** Inset. **E.** Cuantificación del porcentaje de células contadas que expresan Nestina (%Nestina/Hoescht). ANOVA de dos factores seguido de test de Tukey *p<0.05.

En la Figura IV.5 es posible observar que la proporción de CMN con respecto a la población total disminuye ante la presencia de TGF- β_1 . Este efecto es a su vez contrarrestado por la pre-incubación de las CMN con AdSmad7.

El hecho de que TGF- β_1 produzca una disminución en la proporción de CMN concomitantemente con un aumento en la proporción de neuronas, sugiere que este factor estaría promoviendo la diferenciación neuronal al favorecer la división asimétrica de las CMN -en la cual cada CMN genera una CMN y una neurona- por sobre la división simétrica -en la cual una CMN genera dos CMN-. Asimismo se concluye que la vía Smad2/3 es utilizada por TGF- β_1 para ejercer sus efectos pro-neurogénicos sobre las CMN.

Discusión

En el transcurso de esta tesis hemos descripto el rol de fenómenos inflamatorios sistémicos administrados durante el período prenatal y durante la adultez sobre la neurogénesis en el GD adulto. Más allá de los aportes particulares, creemos haber adquirido una visión profunda y global sobre los efectos a largo término de la inflamación, cuando ocurre en determinadas ventanas temporales de susceptibilidad, sobre la generación de neuronas nuevas y comportamientos asociados y los mecanismos involucrados en estos fenómenos.

Capítulo I-Efectos de la exposición prenatal a LPS sobre la neurogénesis adulta

En el primer capítulo de esta tesis se estudiaron los efectos de una exposición prenatal a LPS sobre la neurogénesis adulta, bajo la hipótesis de que este estímulo tendría efectos adversos sobre la generación de neuronas nuevas en el GD de crías adultas.

Para ello, en primer lugar se estableció un modelo experimental en el cual testar esta hipótesis. Se administró LPS en forma subcutánea a ratas preñadas en sus días 14, 16, 18 y 20 de gestación, y a las crías adultas (P60) se les cuantificaron los niveles de neurogénesis adulta. Este modelo resultó apropiado para estudiar la hipótesis de trabajo, ya que se observó que el LPS prenatal no posee efectos globales a nivel del crecimiento y desarrollo de las crías, al comparar ganancia de peso y marcadores generales de desarrollo como apertura de ojos, separación de orejas, y descenso testicular. Por lo tanto, en este modelo experimental, los efectos del LPS prenatal sobre la neurogénesis adulta no son un aspecto de un conjunto de efectos generales sobre las crías.

En este modelo se estudió el rol de la administración prenatal de LPS sobre la neurogénesis adulta, evaluando por separado los efectos sobre los componentes de este proceso: la **proliferación celular**, la **tasa de diferenciación neuronal** y la **sobrevida neuronal**. En primer lugar se estudió la **proliferación celular** en el GD. Se observó que el LPS prenatal disminuye la cantidad de células en proliferación (positivas para BrdU) de entre 0 y 7 días luego de la administración de BrdU (Figura I.1.3).

Debido a que la menor cantidad de células en proliferación observada en el grupo LPS prenatal se puede atribuir tanto a una menor proliferación celular, como a una mayor tasa de apoptosis en la ZSG, se evaluó el grado de contribución de la **apoptosis** a esta diferencia observada. Como se muestra en la Figura I.1.4, los niveles

de apoptosis no fueron suficientes como para explicar la diferencia entre los grupos en la población positiva para BrdU. Recientemente se ha reportado que las células apoptóticas en la ZSG son rápidamente fagocitadas por células de la microglía con una alta eficiencia (Sierra et al., 2010), lo cual dificulta técnicamente su detección, y abre un interrogante sobre la tasa de apoptosis real en el GD adulto.

Por otra parte, se ha reportado que el porcentaje de células apoptóticas en la capa granular de ratas adultas es menor del 3% (Biebl et al., 2000). Si bien este número puede jugar un rol significativo en la auto-renovación del pool de neuronas granulares, consta de dos órdenes de magnitud menos que el total de células en proliferación (Número de células positivas para BrdU en el GD: 1960 ± 310 ; número de células apoptóticas analizadas por ensayo de TUNEL en el GD: 52 ± 4.9). Ambos resultados incluso pueden no resultar comparables -ya que puede ocurrir que no todas las células apoptóticas sean BrdU positivas-. Además, se ha observado que la administración intraperitoneal de LPS en ratas adultas no afecta los niveles de apoptosis en el GD (Fujioka y Akema, 2010).

Teniendo en cuenta estos datos, es posible afirmar que la menor cantidad de células en proliferación observada en el grupo LPS prenatal no es reflejo de una mayor tasa de apoptosis sino de una menor tasa de proliferación celular. No obstante, no es posible descartar un aporte minoritario de una posible tasa diferencial de sobrevivencia temprana de las células positivas para BrdU durante este período.

La exposición prenatal a LPS también disminuyó la **diferenciación neuronal**, cuantificada como el porcentaje de células positivas para BrdU que co-expresan marcadores neuronales jóvenes y maduros (Figura I.1.5); y el número de neuronas nuevas, cuantificado como la cantidad de células positivas para el marcador neuronal DCX, marcador transiente en neuronas inmaduras (Figura I.1.6). Este último parámetro ha sido caracterizado recientemente como un marcador confiable de los niveles de neurogénesis en el GD (Couillard-Despres et al., 2005) y, a diferencia de la tasa de neurogénesis evaluada sobre una población positiva para BrdU, refleja los niveles de neurogénesis en la población total del GD.

Trabajos publicados durante el último período de esta tesis han reportado que dosis menores de LPS (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) administradas en lapsos más cortos del período prenatal (E15 y E16, o E18 y E19), no afectaron la proliferación celular en el GD ni la diferenciación neuronal (Cui et al., 2009). Nuestro tratamiento involucró dosis mayores

de LPS (500 µg/kg) así como un lapso más amplio del período prenatal (E14-E20). Además, nuestros análisis estudian una mezcla de poblaciones de células positivas para BrdU de 0 a 7 días de edad, al contrario del trabajo mencionado, en el cual se realiza una inyección de BrdU y se analiza la proliferación celular a las 2 horas. Este conjunto de diferencias en las condiciones de administración de estímulos pro-inflamatorios y el sistema experimental utilizado para estudiar la neurogénesis explicaría los distintos resultados encontrados.

Por otra parte, se ha descrito que el tratamiento prenatal con PolyI:C -un ARN de doble cadena sintético que emula aspectos de respuesta a una infección viral- en el día E9 disminuye la intensidad de marcación para DCX en las crías adultas, mientras que al día E17 existe una tendencia no significativa hacia este mismo resultado (Meyer et al., 2006b). En este trabajo, la intensidad de la marca DCX en el GD, y no la cuantificación de células positivas para este marcador, se asume como un indicador de los niveles de neurogénesis adulta. Sin embargo, por reflejar la cantidad de células de un modo semi-cuantitativo, es de suponer que se necesitarían cuantificaciones más precisas para obtener datos concluyentes acerca de los efectos del PolyI:C sobre la neurogénesis adulta al día E17. Respecto del estímulo utilizado, LPS es una endotoxina bacteriana que provoca una respuesta inflamatoria con aspectos en común con infecciones bacterianas, en cambio PolyI:C modela componentes de una infección viral. De todos modos es posible afirmar teniendo en cuenta este antecedente y los resultados aquí descritos, que estímulos que desencadenan un umbral de respuesta inflamatoria sistémica durante determinados estadios de la preñez, tendrán efectos adversos a largo plazo sobre la neurogénesis adulta de las crías.

El tratamiento prenatal con LPS no afectó la tasa de **proliferación de las CMN** (Figura I.2.1), ni su cantidad total en el GD (Figura I.2.3). Tampoco modificó la tasa de diferenciación astrocítica (Figura I.2.2). Debido a que las CMN poseen un potencial intrínseco de diferenciación hacia los tres linajes celulares descritos –neuronas, astrocitos y oligodendrocitos-; y que su tasa de diferenciación basal hacia oligodendrocitos en el GD es extremadamente baja (Jessberger et al., 2008), nuestros resultados indicarían que el LPS prenatal no afectaría la división simétrica de las CMN, ni su tasa de diferenciación astrocítica, sino específicamente su tasa de diferenciación neuronal (Figura i).

Con respecto a la **sobrevida** de las células en proliferación (positivas para BrdU) y de las neuronas nuevas (positivas para BrdU y NeuN) a tiempos más tardíos, entre 30

y 37 días, ninguna de ellas fue afectada por el LPS prenatal (Figuras I.3.2A y B). Al observar los valores basales (grupo salina prenatal) de cantidad total de células en proliferación (positivas para BrdU), es posible distinguir que aproximadamente la mitad de las células de entre 0 y 7 días luego de la administración de BrdU que se encontraban en activa proliferación, se encuentran todavía proliferando entre los días 30 y 37 luego de la administración de BrdU (ver Tabla III, Resultados - Capítulo I; Células en proliferación – grupo salina: Perfusión día 7 post-BrdU vs. Perfusión día 30 post-BrdU). En concordancia con este resultado, se ha demostrado previamente que una proporción significativa de muerte celular de las células en proliferación (50%) ocurre entre los días 6 y 28 post-administración de BrdU (Dayer et al., 2003), mientras que a tiempos más tardíos que 30 días la población de células BrdU positivas no varía hasta por lo menos los 11 meses luego de la administración de BrdU (Kempermann et al., 2003). Por lo tanto, creemos que la cuantificación de la población de células positivas para BrdU luego de 30 días -como la realizada en la presente tesis- refleja valores que son representativos de lo que ocurre en el largo plazo (aproximadamente 11 meses después del presente análisis)

Por otra parte, los niveles de diferenciación neuronal se mantuvieron disminuidos en el grupo LPS prenatal luego de 30 días de la administración de BrdU, lo que sugiere que la menor tasa de diferenciación neuronal observada tempranamente (Figura I.1.5) se refleja en una menor proporción de neuronas maduras 30 días después. Si se asume que las poblaciones de neuronas nuevas mayores de 30 días no varían (Kempermann et al., 2003), se concluye que el efecto del LPS prenatal está afectando en forma sostenida la cantidad de neuronas nuevas a ser incorporadas en circuitos funcionales probablemente durante toda la vida adulta del animal. Este resultado es también importante para vincular la menor tasa de neurogénesis adulta a comportamientos asociados a este proceso.

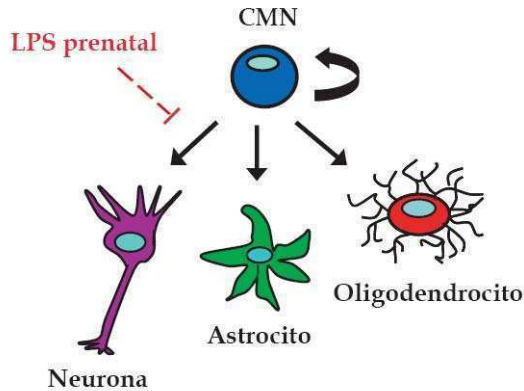


Figura i. Esquema de los efectos del LPS prenatal sobre la diferenciación neuronal en el GD. Las CMN del GD poseen la capacidad de auto-renovación, y el potencial intrínseco de diferenciación hacia los linajes neuronal, astrocítico y oligodendrocítico. La exposición prenatal a LPS afecta específicamente su tasa de diferenciación neuronal.

Luego, se estudió si una **exposición a LPS durante la adultez** afectaba los niveles de neurogénesis. En primer lugar se observó que la exposición de ratas adultas (P60) a LPS provocó una disminución de la neurogénesis luego de 7 días (Figuras I.4.2 y I.4.3). Este resultado replica el publicado por Monje y colaboradores (Monje et al., 2003), en el cual se describe que una inyección intraperitoneal de LPS disminuye la neurogénesis adulta luego de 7 días. En esta tesis se evaluaron además los efectos sobre la neurogénesis adulta de la administración combinada de LPS (durante el período prenatal, más una inyección de LPS en las crías adultas (P60)). La neurogénesis adulta se cuantificó luego de 7 días. El grado de disminución de la neurogénesis adulta ante ambas exposiciones a LPS fue el mismo que en los grupos tratados por separado con LPS: durante el período prenatal, o durante la adultez (Figuras I.4.2 y I.4.3). Este resultado podría explicarse hipotetizando que el LPS prenatal afectó a una subpoblación susceptible de las CMN que ya no se encuentra funcionalmente apta para responder ante el estímulo adulto de LPS. Otra posible explicación es la re-programación temprana de la respuesta inmune innata por la estimulación prenatal con LPS, lo que provoca una hiporrespuesta sistémica al mismo estímulo en la adultez, y la consiguiente falta de respuesta local en el GD. En este sentido, se ha demostrado que animales prenatalmente tratados con LPS poseen una menor respuesta inmune innata frente a un estímulo adulto de LPS en la periferia (Hodyl et al., 2007; Lasala y Zhou, 2007). Además, estos animales muestran un menor aumento en la expresión de citoquinas pro-inflamatorias en el cerebro en respuesta al estímulo adulto con LPS (Lasala y Zhou, 2007). Por lo tanto, especulativamente, creemos que nuestros resultados favorecen la segunda hipótesis.

Sin embargo, la exposición a LPS durante la adultez, aplicando el mismo régimen de administración que durante el período prenatal, no provocó cambios en los

niveles de neurogénesis adulta luego de 60 días -el mismo tiempo de cuantificación de la neurogénesis adulta en ratas tratadas prenatalmente con LPS- (Figura I.5.2). Este resultado indica que al contrario que la administración prenatal de LPS, su administración durante la adultez no provoca efectos sobre la neurogénesis adulta a largo plazo.

Como se ha detallado en la Introducción, el período prenatal está caracterizado por ventanas temporales en las que ocurren importantes procesos de desarrollo, que involucran la proliferación, diferenciación y migración celular. Durante estos períodos, estos procesos son susceptibles de sufrir modificaciones en función de la experiencia (de Graaf-Peters y Hadders-Algra, 2006) que se mantendrán en el largo plazo. Estas características, intrínsecas del período prenatal, explicarían los efectos sostenidos de la administración prenatal de LPS sobre la neurogénesis adulta, al contrario de lo que ocurre en la adultez. Durante el período prenatal el SNC se encuentra expuesto a potenciales alteraciones sistémicas en la madre, las cuales podrían ocasionar un desarrollo alterado en diversos aspectos de la fisiología del SNC que se reflejará en funciones alteradas en el adulto. En este sentido, la administración de un estímulo pro-inflamatorio durante este período desencadenó respuestas a largo plazo en la producción de neuronas nuevas en el GD. En cambio el SNC adulto, si bien manifestó una respuesta aguda en cuanto a la disminución de la neurogénesis frente a la administración de LPS, el hecho de que esta respuesta no sea sostenida en el tiempo es consistente con que durante la adultez existe una homeostasis tisular establecida que permite que el sistema se recupere y vuelva a su equilibrio basal cierto tiempo luego de un estímulo moderado.

En base a estos resultados, es posible afirmar que los efectos del LPS a largo plazo sobre la neurogénesis adulta son exclusivos de su administración durante la etapa prenatal. Este dato conforma una evidencia de la susceptibilidad diferencial del período prenatal a alteraciones externas, en este caso, pro-inflamatorias.

Capítulo II-Estudio de los mecanismos involucrados en los efectos del LPS prenatal sobre la neurogénesis adulta.

En este capítulo se evaluaron los mecanismos por los cuales la exposición prenatal a LPS causa una disminución sostenida de la neurogénesis adulta. Se estudiaron los posibles mecanismos –un aumento sostenido en la actividad del eje HPA; una disminución del cuidado materno; y/o alteraciones locales, a nivel celular y/o molecular, en la composición del nicho neurogénico adulto- como candidatos a mediar estos efectos, en base a los antecedentes que describían su susceptibilidad a distintos tipos de estímulos administrados durante el período prenatal, y sus efectos moduladores de la neurogénesis adulta o sobre parámetros relacionados a este proceso.

En primer lugar, se estudió el rol del eje HPA y de su principal producto, los glucocorticoides (corticosterona en ratas), como posible mecanismo de acción del LPS prenatal sobre la disminución de la neurogénesis adulta. Al cuantificar los niveles basales de corticosterona en el suero de ratas prenatalmente expuestas a salina y a LPS, no se observaron diferencias (Figura II.1.1). Este resultado coincide con el de Romero y colaboradores, en el cual ratas tratadas con LPS (2 mg/kg) diariamente durante toda su gestación muestran niveles equivalentes de corticosterona en plasma con los animales control (Romero et al., 2010). Por el contrario, otro trabajo describe que la administración prenatal de LPS (una dosis de 30 µg/kg en E10) en ratas, provoca un aumento en los niveles de corticosterona en plasma en las crías adultas (Reul et al., 1994). Como hemos discutido en el caso de la proliferación celular y la diferenciación neuronal en el GD, las diferencias observadas radicarían en la potencia del estímulo y las ventanas temporales de administración.

El LPS prenatal no modificó los niveles de expresión del receptor de tipo I (MR) de corticosterona en el hipocampo, de mayor afinidad por el ligando y que por lo tanto transduce los efectos de la corticosterona en sus niveles basales (Figura II.1.2B). Este resultado es consistente con el mantenimiento de los niveles basales de corticosterona en el grupo LPS prenatal, y da idea de que el funcionamiento basal del eje HPA no se encuentra alterado ante el tratamiento prenatal con LPS. Por el contrario, los niveles de expresión del receptor de tipo II (GR), de menor afinidad por el ligando y mayores niveles de expresión, y por ende el encargado de mediar la señal de la corticosterona en niveles aumentados, se encuentran reducidos (Figura II.1.2A). Trabajos previos reportan una disminución en la expresión de ambos tipos de receptores en el hipocampo -en

conjunto con el mencionado aumento de corticosterona en plasma-, a raíz de un tratamiento prenatal con LPS (Reul et al., 1994). También en este caso, las diferencias observadas en nuestros resultados se deberían a la potencia del estímulo y la ventana temporal de administración.

Los glucocorticoides ejercen una retroalimentación negativa sobre su propia producción uniéndose a sus receptores del hipocampo entre otros puntos del eje (ver Introducción). Al encontrarse disminuida la expresión de GR en el hipocampo de los animales prenatalmente tratados con LPS, hipotetizamos que un aumento de corticosterona en sangre retornaría a sus niveles originales más tardíamente que en el grupo prenatalmente tratado con salina, debido a una menor eficiencia en la retroalimentación negativa. Sin embargo, como es posible observar en la Figura II.1.3, animales prenatalmente tratados con LPS, a las 2, 4 y 6 horas luego de ser sometidos a un estímulo de LPS en su adultez, mantuvieron sus niveles aumentados de corticosterona en suero en la misma medida que el grupo salina prenatal, en los tiempos analizados. Es posible que nuestra hipótesis se cumpla a tiempos más tardíos de evaluación de niveles de corticosterona en plasma, por ejemplo, a las 12 horas luego de un estímulo con LPS. Futuras investigaciones se encargarán de elucidar si este es el caso.

Nuestros datos implican que si bien el funcionamiento basal del eje HPA no se observa alterado, ciertos aspectos particulares de su activación sí podrían estarlo. La administración prenatal de LPS en las condiciones experimentales de esta tesis afectaría selectivamente el funcionamiento del eje HPA en condiciones en las que se encuentra activado, y por lo tanto no contribuiría sustancialmente a los efectos de disminución de los niveles basales neurogénesis adulta. Sin embargo, no es posible descartar una contribución menor de los efectos de los glucocorticoides a través del receptor GR en condiciones basales, ya que recientemente se ha demostrado que en estas condiciones la variación circadiana en los niveles sistémicos de glucocorticoides induce cíclicamente la expresión de GR (Stavreva et al., 2009).

A continuación se evaluó el posible rol del cuidado materno como mecanismo de acción de los efectos del LPS prenatal sobre la neurogénesis adulta. Inicialmente se determinó un posible efecto de la administración de LPS a las ratas madre preñadas, sobre el cuidado materno de sus crías. Se observó que las madres que recibieron LPS durante su preñez ejercieron menores niveles de cuidado materno sobre sus crías durante la primera semana de vida (Figura II.2.2, 1a y 2da columnas). Estos resultados

son coherentes con estudios previos que describen que el cuidado materno es afectado por estímulos adversos sufridos durante la gestación, como stress por restricción (Baker et al., 2008; Champagne y Meaney, 2006). Al realizar la crúza de crías, se observó que las madres tratadas con salina durante su gestación ejercieron los mismos niveles de cuidado materno sobre las crías tratadas prenatalmente con LPS, que sobre sus propias crías. Por el contrario, las madres tratadas con LPS durante su gestación ejercieron mayores niveles de cuidado materno sobre las crías tratadas prenatalmente con sol. Salina que sobre sus propias crías. Un estudio previo comparó el cuidado de madres adoptivas con el de madres biológicas, y demostró que las madres adoptivas realizan más cuidado materno de sus crías que las madres biológicas (Maccari et al., 1995). En nuestro caso, ésto se evidencia solamente en las madres tratadas con LPS que adoptan crías prenatalmente tratadas con salina, mientras que en el caso inverso el cuidado materno no aumenta, sino que se mantiene constante (Figura II.2.2, 3a y 4ta columnas). De acuerdo a este dato, es posible hipotetizar que existiría un reconocimiento diferencial de las crías prenatalmente tratadas con LPS por parte de sus madres.

Al cuantificar la neurogénesis de estos cuatro grupos experimentales (crías adultas prenatalmente tratadas con salina o LPS, y cuidadas por sus propias madres o por madres adoptivas que recibieron el tratamiento contrario), se observó que el tratamiento prenatal con LPS provocó una disminución en la neurogénesis adulta de las crías, independientemente de que estas fueran criadas por sus propias madres, o por madres adoptivas que recibieron salina durante su gestación (Figura II.2.3). En base a estos datos, es posible concluir que el LPS administrado a ratas durante su gestación afecta los niveles de cuidado materno de sus propias crías. Por otra parte, los efectos sobre la neurogénesis adulta de las crías dependen exclusivamente del tratamiento prenatal, y no del cuidado materno recibido.

Luego se intentó evaluar el rol del entorno o nicho neurogénico como mediador de los efectos del LPS prenatal sobre la neurogénesis adulta. Para ello, en un primer abordaje, se caracterizó al entorno neurogénico de las crías adultas a nivel celular y molecular, en respuesta a la administración prenatal de LPS. Se observó en el GD de crías adultas prenatalmente tratadas con LPS, un aumento de la microglía activada en estadíos II-III (Figura II.3.1). Las células de la microglía en este estadío de activación típicamente no expresan marcadores macrofágicos (ED1) o un perfil de citoquinas pro-inflamatorias (Cunningham et al., 2002; Depino et al., 2003), en contraste con estadíos

más avanzados de activación de microglía observados en otros modelos (Perry et al., 2002).

Se observó además que la activación de microglía en respuesta al LPS prenatal fue específica del GD, ya que no se encontraba activada en otras zonas del cerebro adulto como la corteza, el tálamo y el hipotálamo. Este dato destaca los efectos selectivos de la administración prenatal de LPS sobre el establecimiento y desarrollo de la microglía en el cerebro fetal específicamente en el GD, lo cual se refleja en el estado de activación basal de la microglía en el GD adulto.

La activación de la microglía es un proceso altamente dinámico, y su rol funcional está determinado en menor grado por su activación morfológica que por el perfil de moléculas secretadas (Perry et al., 2010; Mathieu et al., 2010). Varios grupos han intentado correlacionar los distintos estadios de activación con sus efectos locales sobre diversos procesos, entre ellos la neurogénesis adulta. Por un lado, se ha reportado una disminución de la neurogénesis adulta ante la administración de LPS en forma central o periférica, y se ha adjudicado un rol a la microglía activada en estadio IV en los efectos sobre la neurogénesis (Ekdahl et al, 2003; Monje et al, 2003). Por otra parte, en nuestro grupo se ha caracterizado un modelo experimental de adrenalectomía, en el cual la activación de la microglía alcanza los estadios II-III. En este caso, la activación de la microglía se produjo correlativamente con un aumento de la neurogénesis adulta (Battista et al, 2006).

En el presente trabajo también se observa una activación de la microglía hasta los estadios II-III pero conjuntamente con una disminución de la neurogénesis. Si bien este resultado no se encuentra en línea con lo anteriormente descrito, nos sugiere que el grado de activación morfológica de la microglía puede dissociarse de las funciones sobre su entorno. Un dato por demás interesante afirma que la microglía, según haya sido expuesta a Interferón gamma (IFN- γ) -una molécula que media respuestas de tipo T helper 1, típicamente pro-inflamatorias-, o a IL-4 -una molécula que media respuestas de tipo T helper 2, típicamente anti-inflamatorias-, ejerce distintos efectos funcionales sobre la diferenciación celular. Ante la exposición a IFN- γ , la microglía aumenta la oligodendrogénesis de las CMN. En cambio, cuando es expuesta a IL-4, la microglía provoca un aumento en la diferenciación neuronal de las CMN (Butovsky et al, 2006). Según se puede observar en la Tabla 1, hasta el momento no se ha establecido una correlación entre el estadio de activación microglial, y sus efectos funcionales sobre la neurogénesis adulta, sino que ambas variables parecen encontrarse dissociadas. Por el

contrario, la naturaleza del estímulo inductor de la activación microglial, y sobre todo el perfil de moléculas secretadas, parecen ser parámetros más asociables al rol de la microglía sobre la neurogénesis.

Estímulo causante de la activación microglial	Período de administración/ Tiempo luego de la exposición al estímulo	Estadío de activación microglial	Efectos funcionales sobre la neurogénesis adulta	Fuente
LPS	Prenatal	Tipo II/III	Disminuye	Tesis doctoral; Graciarena et al, 2010
LPS	Adulto - 7 días	Tipo II/III	Disminuye	Tesis doctoral
LPS	Adulto - 60 días	En reposo	No afecta	Tesis doctoral
LPS	Adulto - 7 días	Tipo IV	Disminuye	Monje et al, 2003; Ekdahl et al, 2003.
LPS	24 horas (cultivo)	No específica (cultivos)	Disminuye	Butovsky et al, 2006
ADX	Adulto - 5 días	Tipo II/III	Aumenta	Battista et al, 2006
IL-4	24 horas (cultivo)	No específica (cultivos)	Aumenta	Butovsky et al, 2006

Tabla 1: Distintos tipos y grados de activación de la microglía, y sus efectos sobre la neurogénesis adulta.

De esta forma, la activación así como el rol funcional de la microglía están finamente regulados por un conjunto de factores locales, y por lo tanto un determinado estadio de activación microglial no deberá necesariamente asociarse con un perfil molecular de expresión, ni con consecuencias positivas o negativas sobre la neurogénesis y otros procesos.

Se ha postulado previamente que células mononucleares derivadas de la médula ósea infiltran el cerebro de roedores a partir del día E14 (Ling y Wong, 1993; Bilbo y Schwarz, 2009). Durante el desarrollo prenatal del cerebro estas células se encuentran con una morfología ameboidea y una reactividad a estímulos inmunes propia de estadios intermedios de activación (Ling y Wong, 1993). Luego ocurre un proceso de diferenciación hacia el fenotipo microglial ramificado y en reposo que finaliza aproximadamente el día P14 (Ling y Wong, 1993). La microglía permanece en estado de reposo en la adultez (P60), pudiendo activarse morfológicamente frente a diversos estímulos inmunes (Figura ii; Tabla 1).

A partir de nuestros resultados, hipotetizamos que una fracción de la microglía se mantendría permanentemente activada en los estadios II/III de activación en el adulto, como consecuencia de la exposición temprana a LPS (Figura ii). Este cambio permanente en la morfología de la microglía en el hipocampo sugiere un rol funcional alterado de distintos procesos dependientes de la función microglial, como la neurogénesis adulta y comportamientos asociados a memoria.

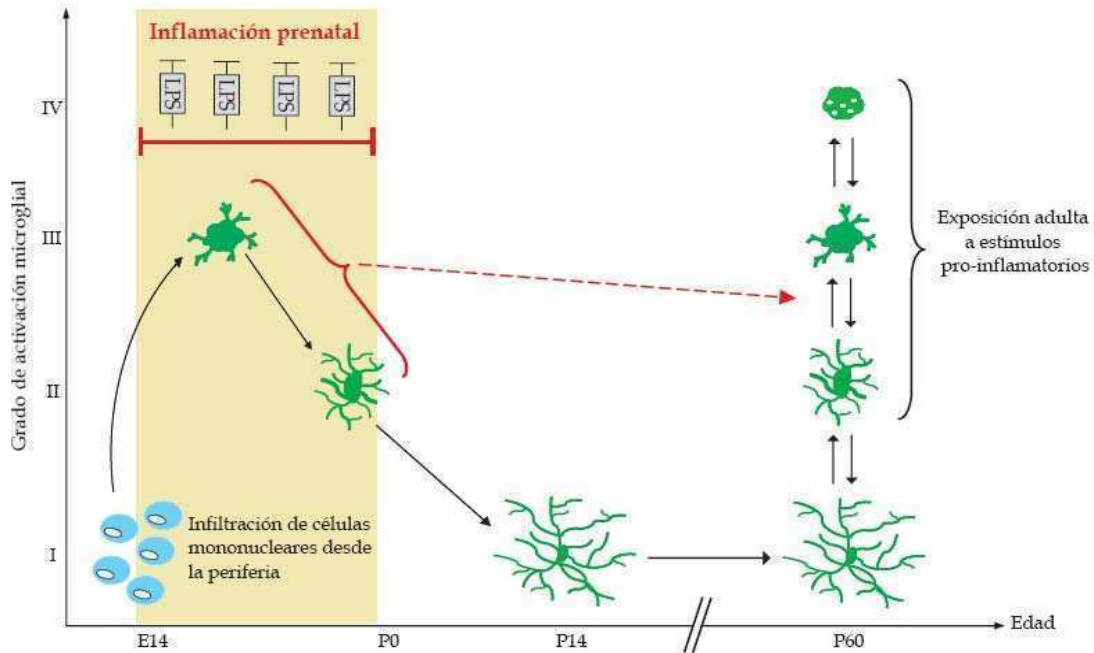


Figura ii. Establecimiento y desarrollo de la microglía en el hipocampo, y alteraciones a largo plazo en su morfología por la exposición prenatal a LPS. A partir del día E14 en roedores ocurre una infiltración del cerebro por células mononucleares derivadas de la médula ósea que darán origen a la microglía. Durante el posterior desarrollo del cerebro, éstas presentan un estado ameboso, y son altamente reactivas a cambios en el ambiente. Luego, mediante un proceso de diferenciación, adquieren un fenotipo microglial ramificado y en reposo que finaliza aproximadamente el día P14. En la adultez (P60), la microglía también puede activarse morfológicamente frente a diversos estímulos. Ante una exposición prenatal a la inflamación, la microglía se encontraría permanentemente en estadios activados durante la vida adulta del animal (representado por la línea roja punteada).

La administración de LPS en la adultez provocó un grado de activación de la microglía equivalente a la administración prenatal de LPS: en este caso también se observó microglía activada hasta los estadios intermedios II-III (Figura II.3.2). La administración combinada de LPS durante el período prenatal y durante la adultez, provocó el mismo grado de activación, y la misma cantidad de células de microglía activada, que cada uno de los tratamientos individuales (Figura II.3.2). Por otra parte,

no se observó activación de la microglía luego de 60 días después de la administración de LPS en la adultez (Figura II.3.3). Los resultados observados de activación microglial ocurrieron concomitantemente con una disminución de la neurogénesis adulta en todas las condiciones analizadas. Más aún, no se observó activación microglial en condiciones en que no ocurrió una disminución de la neurogénesis adulta (administración de LPS en adultez y análisis luego de 60 días; ver Tabla 1). Este conjunto de datos indica que los efectos finales del LPS sobre la neurogénesis adulta están acompañados por un estadio y grado determinados de activación de la microglía, que podrían estar involucrados en este efecto.

En cuanto a los astrocitos, no se observó una expresión aumentada de GFAP, ni alteraciones en su morfología, ambos parámetros indicativos de astrocitosis- en respuesta al LPS prenatal (Figura II.3.4). Tampoco se observaron alteraciones en su morfología en respuesta a la administración de LPS en la adultez, ni la administración conjunta de LPS durante ambos períodos prenatal y adulto (Figura II.3.5). Estos resultados sugieren una participación limitada o nula de los astrocitos en los efectos del LPS prenatal, y destacan el rol de la microglía como célula preferencial de respuesta a este estímulo y como posible fuente celular de la producción local de citoquinas.

A nivel molecular se apreciaron cambios agudos en el perfil de expresión de citoquinas pro- y anti-inflamatorias en el cerebro en desarrollo en respuesta a la administración prenatal de LPS. A las 2 horas luego de la primera inyección prenatal de LPS en el día E14 se observó un aumento en la expresión de IL-1 β y TGF- β ₁, así como una tendencia a un aumento en IL-6 (Figura II.4.1A). Estos datos son consistentes con estudios previos que reportan un aumento de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β y TNF α en el cerebro fetal de ratas en el día E18, una hora luego de la administración materna de LPS (Cai et al., 2000). Asimismo, también se ha observado la activación temprana de la vía NF- κ B -una de las principales vías de señalización intracelular que median respuestas inflamatorias, y son disparadas por IL-1 (entre otras citoquinas), en cerebros fetales, a las dos y seis horas luego de la administración materna de LPS en el día E15 (Wang et al., 2007). Por otra parte, también la administración prenatal de Poly I:C generó un aumento de la expresión de citoquinas pro-inflamatorias en el cerebro fetal a tres y seis horas luego de su administración, en el día E17 (Meyer et al., 2006b). Por lo tanto, nuestros datos son coherentes con la literatura previa, que reporta efectos agudos en la expresión de citoquinas pro-inflamatorias en el cerebro fetal como consecuencia de la administración prenatal de estímulos inflamatorios.

Al día del nacimiento de las crías (P0), los niveles de IL-1 β se mantuvieron aumentados, mientras que los niveles de TGF- β ₁ se encontraron disminuidos, e IL-6 no se modificó con respecto a sus valores basales (Figura II.4.1B). Finalmente, en la adultez (P60), mientras que la expresión de IL-1 β volvió a sus valores normales y la de IL-6 se mantuvo igual que el grupo control, la expresión de TGF- β ₁ en el hipocampo disminuyó en el grupo tratado prenatalmente con LPS. Esto se observó a nivel de expresión de ARNm, y de proteína (Figuras II.4.1C y II.4.1D).

Debido a limitaciones técnicas, no fue posible co-localizar la expresión de esta citoquina con marcadores celulares específicos, y por lo tanto atribuir su expresión endógena a un determinado tipo celular presente en el GD. De esta manera, no es posible concluir acerca de cuál es el tipo celular involucrado en la modulación de la expresión de TGF- β ₁ como resultado del tratamiento con LPS prenatal.

Sin embargo, trabajos previos postulan que las fuentes principales de producción de TGF- β ₁ en el GD son la microglía (Battista et al., 2006) y los astrocitos (Finch, 2003), mientras que ocasionalmente puede ser producido por neuronas (Flanders et al., 1998). De acuerdo a estos datos, la fuente más probable de TGF- β ₁ son los astrocitos o la microglía. Ya que en el presente modelo no se detectó activación astrocítica y sí activación microglial, este resultado favorece la idea de que las células de microglía activada son la fuente más probable de producción de TGF- β ₁. En efecto, trabajos previos del laboratorio han demostrado que la microglía activada de tipo II-III produce TGF- β ₁ en un modelo de adrenalectomía, en el cual la expresión de esta citoquina se ve aumentada (Battista et al., 2006).

Respecto del perfil de citoquinas que acompaña la disminución de la neurogénesis adulta, previamente se demostró en el laboratorio que, conjuntamente con un aumento en la neurogénesis en ratas adrenalectomizadas, la expresión local de las principales citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 α , IL-1 β , TNF- α) no fue detectable o no aumentó significativamente (Battista et al., 2006). Por el contrario los niveles de TGF- β ₁ si se encontraron elevados y en correlación con el aumento en neurogénesis.

Por otra parte, si se compara el trabajo de Monje y colaboradores (Monje et al., 2003) con el descrito en la presente tesis, se observan diferencias. Monje y colaboradores encontraron que una sobreexpresión de IL-6 por las células microgliales era la principal característica que determinaba la reducción en la neurogénesis, luego de 7 días de una exposición a LPS en la adultez. En cambio en el presente trabajo, es la

expresión disminuida de TGF- β_1 la alteración local que correlaciona con una disminución de la neurogénesis adulta.

De todos modos, es probable que los efectos de la administración prenatal o adulta de LPS sobre la neurogénesis adulta involucren distintos mecanismos moleculares, más aún si los efectos de la administración prenatal de LPS sobre la neurogénesis adulta se mantienen a largo plazo, mientras que los efectos del LPS administrado en la adultez son agudos y reversibles luego de 60 días, como se demuestra en esta tesis.

Debido a que la expresión de TGF- β_1 en el GD se encontraba disminuida conjuntamente con la neurogénesis adulta frente al tratamiento prenatal con LPS, se hipotetizó acerca de un posible rol funcional de esta citoquina sobre los niveles de neurogénesis adulta. Mediante la inyección estereotáxica de adenovectores que expresaban TGF- β_1 (o β -galactosidasa como control) en el GD de crías adultas prenatalmente tratadas con LPS, fue posible demostrar que la sobreexpresión de esta citoquina pudo revertir los niveles de neurogénesis adulta a los originales, mientras que al ser TGF- β_1 sobreexpresado en el GD de crías adultas prenatalmente tratadas con salina, la neurogénesis adulta no aumentó (Figura II.4.4A y B). Este resultado indica que la expresión de TGF- β_1 constituye una molécula clave por la cual el LPS administrado durante la etapa prenatal disminuye la neurogénesis adulta. Si bien se ha reportado previamente que componentes locales del entorno neurogénico modulan la neurogénesis adulta, y además que ésta es susceptible de ser afectada por diversos factores sistémicos, esta tesis integra por primera vez ambos niveles de estudio, y propone un mecanismo molecular de acción para los efectos de un estímulo periférico durante el período prenatal sobre la neurogénesis adulta.

En el sistema de sobreexpresión de TGF- β_1 en el GD por adenovectores recombinantes, las células responsables de la expresión de esta molécula son las que incorporaron los adenovectores y que por lo tanto expresan el transgen de TGF- β_1 . Si bien fue posible detectar TGF- β_1 por inmunohistoquímica en el tejido en estas condiciones (figura II.4.3B), la expresión de TGF- β_1 aquí corresponde a la administración exógena mediante los adenovectores recombinantes, por lo tanto no está relacionada con su fuente endógena de producción. Además, al ser TGF- β_1 una proteína de secreción, su fuente endógena en este sistema –a través de la incorporación del adenovector y la expresión de su transgen- no es altamente relevante.

De acuerdo a los resultados mostrados, es posible afirmar que este trabajo reporta por primera vez el rol de una citoquina pro-neurogénica como mediador molecular de los efectos de un estímulo pro-inflamatorio prenatal sobre la neurogénesis adulta de forma sostenida.

Capítulo III-Estudio de los efectos del LPS prenatal sobre comportamientos adultos dependientes de hipocampo, y sus posibles mecanismos de acción.

El objetivo de este capítulo fue estudiar si existían correlatos comportamentales de los efectos del LPS prenatal sobre la neurogénesis adulta. Para ello, se evaluó si la administración prenatal de LPS afectaba comportamientos en las crías adultas que habían sido previamente asociados a la neurogénesis adulta. Los comportamientos adultos que han sido relacionados con la neurogénesis adulta han sido clasificados en dos grandes grupos: los comportamientos que modelan ansiedad y depresión, y los que modelan memoria y aprendizaje.

En primer lugar, se observó que la administración prenatal de LPS no afectó el desempeño de los animales en el test de Preferencia por Sacarosa, que modela comportamientos depresivos (Figura III.1.1A-C). Este resultado se encuentra en línea con estudios anteriores, que describen que una infección postnatal temprana en ratas les confiere protección ante los síntomas depresivos y ante el aumento de corticosterona que provoca un agente estresor en el adulto, pero no afecta el desempeño basal en este paradigma comportamental (Bilbo et al., 2008).

Por otra parte, ratas prenatalmente tratadas con LPS o solución salina tuvieron un desempeño equivalente en el test de Natación Forzada o “Porsolt Forced Swimming” (Figura III.1.2A-B). Este dato contrasta con lo reportado para animales que sufrieron eventos de stress durante el período prenatal, los cuales muestran un comportamiento depresivo cuando son sometidos a este test, así como un aumento en la producción basal de glucocorticoides (Morley-Fletcher et al., 2003).

A partir de nuestros resultados es posible concluir que el tratamiento prenatal con LPS no afecta comportamientos de las crías adultas que han sido relacionados con estados de depresión, en contraste con lo reportado ante eventos de stress prenatal. Debido a que en estos casos junto con las alteraciones comportamentales se observa un aumento en la producción de corticosterona, mientras que en nuestro modelo se

mantiene constante, es posible que los niveles basales de corticosterona de las crías adultas participen en la diferencia en estos comportamientos, ya que los estados depresivos se han asociado con varios aspectos de activación del sistema inmune (Dantzer et al., 1999; Dunn et al., 2005), y además cerca de la mitad de los pacientes que sufren de depresión presentan alteraciones en el funcionamiento del eje HPA (Carroll et al., 1968).

Luego, se evaluó el desempeño de las ratas prenatalmente tratadas con LPS en tests que modelan ansiedad, como el test de la Alimentación Suprimida por la Novedad o “Novelty Suppressed Feeding”. Se observó que en este caso, tampoco estaba alterado este comportamiento en el grupo tratado con LPS prenatal (Figura III.1.3A-C). Al respecto, se ha demostrado que si bien la neurogénesis adulta intervendría en los efectos antidepressivos de la fluoxetina, no posee un rol directo sobre estados depresivos/ansiosos basales, que son reflejados por el desempeño en este test (Santarelli et al., 2003), lo cual es consistente con nuestro resultado. Por lo tanto, es posible afirmar que la disminución de la neurogénesis adulta por el LPS prenatal no posee un rol funcional directo en comportamientos basales asociados a la depresión o la ansiedad.

Debido a que la administración de LPS causa un efecto agudo de *sickness behavior*, o comportamiento ligado a la enfermedad, en el cual los animales mansifiestan un estado febril, disminución de la movilidad y locomoción, descenso del peso y otras características, se intentó responder la pregunta de si la administración prenatal de LPS causaba en las crías adultas algún aspecto reminiscente de este estado. Por lo tanto se sometió a las crías adultas al test de “Burrowing”. Se observó que el tratamiento prenatal con LPS no alteró el desempeño de los animales en este comportamiento, lo que indica que estos animales no muestran aspectos a largo plazo de *sickness behavior*, o comportamiento ligado a la enfermedad, ante la administración prenatal de LPS.

Nuestros resultados no permiten descartar que el tratamiento prenatal con LPS pueda haber provocado un aumento en la susceptibilidad de los comportamientos estudiados frente a estímulos de stress en la adultez. Por ejemplo, se demostró que los niveles de IL-1 β en el cerebro intervienen en la disminución de la neurogénesis adulta y en la generación de un estado depresivo, solamente ante un estímulo de stress (Koo y Duman, 2008; Goshen et al., 2008).

Por otra parte, la administración prenatal de LPS afectó el desempeño de los animales en el test de memoria a corto plazo Reconocimiento del Objeto Nuevo o NOR

(sus siglas en inglés). Al contrario de lo observado previamente en los tests que modelan ansiedad y depresión, el LPS prenatal afectó el desempeño de las crías adultas en el test NOR en condiciones basales, lo cual da una idea de la especificidad de los efectos del LPS prenatal sobre un tipo particular de comportamiento. Además, hemos demostrado que la expresión de TGF- β_1 en el hipocampo participa de los efectos del LPS prenatal sobre el desempeño en este test. En este sentido, una variedad de trabajos han vinculado estímulos inflamatorios o de stress recibidos durante el período prenatal, con efectos sobre funciones cognitivas (ver Introducción). Sin embargo, hasta el momento ningún trabajo había atribuido a estos efectos un mecanismo molecular de acción.

A pesar de que evidencias previas postulan que la neurogénesis adulta contribuye al comportamiento en el test NOR (Jessberger et al., 2009), en base a los resultados mostrados no es posible descartar la posibilidad de que la expresión de TGF- β_1 en el GD esté afectando este comportamiento vía mecanismos adicionales, no excluyentes a la neurogénesis adulta. Por ejemplo, los TGF- β s han sido vinculados con promover el desarrollo y la diferenciación de conexiones sinápticas, que a su vez juegan un rol clave en procesos de memoria y aprendizaje (Fukushima et al., 2007; Packard et al., 2003; Chin et al., 2006; Heupel et al., 2008). Por lo tanto, una posible influencia de TGF- β_1 sobre la plasticidad sináptica podría también contribuir a los efectos observados en el desempeño en el test NOR.

Uno de los aspectos más importantes de este trabajo radica en adjudicar un rol a la disminución de la expresión local de TGF- β_1 en el GD sobre los efectos de la inflamación prenatal sobre el test NOR, presumiblemente a través de la disminución en la neurogénesis adulta, como se ha demostrado previamente (Jessberger et al., 2009). En este sentido, trabajos que destacan el rol de las neuronas inmaduras del GD adulto (de 1 a 4 semanas de edad) como las involucradas en el desempeño en el test de memoria MWM (Deng et al., 2009) refuerzan la hipótesis de que en este paradigma comportamental las neuronas nuevas también juegan un rol central aunque aún no se hallen integradas a circuitos funcionales. En esta tesis observamos una reversión en el desempeño en el test NOR luego de 14 días de sobreexpresión de TGF- β_1 en el GD. De acuerdo a este dato, es probable que TGF- β_1 esté ejerciendo sus efectos sobre el test NOR a través de un aumento, durante esos 14 días, en la población de neuronas inmaduras, el tipo celular involucrado en el desempeño en comportamientos de memoria (Deng et al., 2009).

Es destacable la magnitud de la dependencia de los niveles de neurogénesis adulta para el desempeño en el test NOR, ya que ratas que presentan una disminución promedio del 12% en la proporción de neuronas nuevas muestra un desempeño alterado en este test. Este dato otorga una idea de la magnitud de la sensibilidad de este comportamiento por los niveles de neurogénesis adulta en el GD.

El rol del hipocampo en distintos paradigmas comportamentales ha sido ampliamente estudiado. En este sentido, se han identificado regiones responsables de distintos tipos de comportamientos: mientras que el hipocampo dorsal se ha encontrado involucrado en procesos de memoria y aprendizaje (Scoville y Milner, 2000), el hipocampo ventral juega un rol en estados de ansiedad y/o depresión (Gray y McNaughton, 1983). El hecho de que la neurogénesis adulta en el hipocampo dorsal se encuentre disminuida ante el tratamiento prenatal con LPS, concomitantemente con defectos en un comportamiento asociado a memoria (NOR) es otro dato que refuerza el vínculo funcional entre la neurogénesis adulta y este comportamiento.

En resumen, en este capítulo se ha demostrado que la administración prenatal de LPS no provoca alteraciones en tests que modelan estados depresivos y/o ansiosos basales. En cambio, sí afecta en desempeño en el test NOR, un paradigma de memoria a corto plazo que se ha vinculado funcionalmente con los niveles de neurogénesis adulta (Jessberger et al., 2009). El desempeño en el test es restablecido a los niveles del grupo control al aumentar la expresión de TGF- β_1 en el GD, al igual que lo que ocurre con la neurogénesis adulta. Estos resultados describen por primera vez un estímulo que afecta la neurogénesis adulta y un comportamiento previamente relacionado con este proceso, y propone a la expresión de TGF- β_1 en el GD como mediador molecular de ambos efectos. Más aún, este estudio destaca la importancia de las citoquinas como componentes del nicho neurogénico, y su rol funcional sobre los niveles de neurogénesis adulta, y sobre comportamientos dependientes de este proceso.

Capítulo IV-Estudio de las vías de señalización involucradas en el efecto pro-neurogénico de TGF β ₁.

En este capítulo se realizaron estudios en un cultivo primario de CMN con el objetivo de determinar qué vía/s de señalización se encuentra/n involucrada/s en los efectos pro-neurogénicos de TGF- β ₁. Para ello en primer lugar se estudió la vía Smad 2/3 como la principal candidata a participar en estos efectos. Se observó que dicha vía de señalización se encuentra funcional en un cultivo primario de CMN: la presencia de TGF- β ₁ indujo la activación de la vía Smad 2/3 en distintas dosis (Figura IV.3). Por el contrario, la expresión previa de Smad7, un inhibidor fisiológico de la vía Smad 2/3, en estas células previno la señalización basal de la vía, y su activación en presencia de TGF- β ₁ a concentraciones menores que 10ng/ml (Figuras IV.2 y IV.3).

Por otra parte, al realizar estudios funcionales de la modulación de la vía Smad 2/3 sobre el grado de diferenciación neuronal de las CMN, se observó que en presencia de TGF- β ₁ (1ng/ml), este parámetro aumenta significativamente, cuantificado como proporción de células que expresan el marcador neuronal β -III tubulina, mientras que la preincubación de las células con el adenovector que expresa Smad7 previene este aumento (Figura IV.4). De la misma manera, al analizar la proporción de células que expresaban el marcador de CMN Nestina, como índice de proliferación de las CMN, se observó que la presencia de TGF- β ₁ causaba una disminución en este parámetro (Figura IV.5).

En base a estos resultados, es posible concluir que la vía Smad 2/3 se encuentra involucrada en los efectos pro-neurogénicos de TGF- β ₁ sobre las CMN, ya que su activación produce una mayor diferenciación neuronal; y al disminuir la proporción de células positivas para Nestina en la población, presumiblemente favorecería la división asimétrica de las CMN para generar neuronas, por sobre la división simétrica para autorrenovar el pool de CMN.

En este sentido, datos de nuestro laboratorio mostraron que TGF- β ₁, además de poseer un rol pro-neurogénico, ejercía efectos anti-proliferativos sobre un cultivo primario de CMN (Battista et al., 2006). Del mismo modo, se han reportado efectos pro-diferenciadores hacia fenotipos neuronales y anti-proliferativos por parte de TGF- β ₁ en cultivos primarios de hipocampo, a través de la activación de la vía Smad 2/3 (Lu et al., 2005). Además, se ha observado que TGF- β ₁ puede afectar el ciclo celular en numerosos tipos celulares (Roussa y Krieglstein, 2004), y los efectos anti-proliferativos

en varios tipos celulares han sido asociados a un aumento en la diferenciación celular (Lee y Bae, 2002). Por lo tanto, nuestro dato es consistente con estudios anteriores en otros modelos, e indica que los efectos de esta vía sobre la diferenciación neuronal de las CMN, se realizarían a expensas de su proliferación. En otras palabras, los efectos pro-neurogénicos de la vía Smad 2/3 estarían relacionados con la inhibición de la división simétrica y la promoción de la división asimétrica para generar células de linaje neuronal.

Resulta llamativo el hecho de que la administración *in vivo* de TGF- β_1 no resulta en un aumento de la neurogénesis adulta per se en el GD, sino que rescata su disminución debida a la administración prenatal de LPS (Figura II.3.10A y B), mientras que en las condiciones de cultivo utilizadas, la presencia de TGF- β_1 promueve la diferenciación neuronal (Figura IV.4). Del mismo modo, estudios previos de nuestro laboratorio muestran que TGF- β_1 posee efectos pro-neurogénicos per se sobre la ZSV (Mathieu et al., 2010), donde se ha observado neurogénesis adulta además del GD.

El hecho de que TGF- β_1 no aumente el número de neuronas nuevas por encima del nivel basal en el GD sugiere que el tratamiento con LPS prenatal podría afectar una subpoblación de CMN del GD particularmente susceptible a los efectos del TGF- β_1 . Alternativamente, factores adicionales del nicho neurogénico del GD estarían involucrados en modular conjuntamente el grado de diferenciación neuronal de estas células. De esta manera, el conjunto de componentes moleculares de cada zona neurogénica modula diferencialmente el nacimiento de neuronas nuevas en el cerebro adulto. En particular, TGF- β_1 resultaría central como orquestador del mantenimiento de los niveles basales de neurogénesis en el GD, ya que la disminución de la neurogénesis que se observa junto con la deficiencia local de esta citoquina, es capaz de retornar a sus valores originales solo con la reversión en los niveles de TGF- β_1 en este entorno neurogénico. De esta manera, TGF- β_1 no sería un componente aislado en la regulación de los niveles de neurogénesis adulta en el GD, sino que se integraría dentro de un perfil de expresión de citoquinas y factores tróficos cuyo resultante genera efectos netos sobre la neurogénesis adulta. La deficiencia local de TGF- β_1 implicaría una desregulación de este perfil molecular presente en el entorno neurogénico del GD que resulta en defectos en el mantenimiento de los niveles de neurogénesis adulta y como consecuencia en su disminución sostenida.

Al respecto, como se ha descrito en la Introducción, los TGF- β s ejercen diversos efectos en conjunto con otras neurotrofinas -como FGF-2, FGF-8 y GDNF-

(Krieglstein et al., 1998; Roussa y Krieglstein, 2004), y a su vez modulan la expresión de citoquinas pro-inflamatorias –como IL-1 β , TNF- α (Fadok et al., 1998) e IL-6 (Benveniste et al., 1994). En este sentido, es posible especular con el hecho de que algunas de estas moléculas sean candidatas en modular junto con TGF- β_1 los niveles de neurogénesis adulta.

Conclusiones generales

El período prenatal posee un conjunto de características particulares que le confieren una susceptibilidad en varios aspectos de la formación del SNC. De este modo, diversos estímulos administrados durante este período tendrán un impacto sobre las características de regiones específicas del SNC, y su funcionamiento permanente. También afectarán a nivel sistémico las relaciones que se establecen entre los sistemas nervioso, inmune, endócrino y su constante regulación recíproca. Como consecuencia, estas alteraciones se verán reflejadas en comportamientos adultos que dependan de alguno de los parámetros alterados.

En esta tesis nos propusimos abordar de manera integradora la interacción entre los sistemas inmune y nervioso, en particular el establecimiento temprano de una homeostasis a nivel sistémico y local en el entorno neurogénico, y su susceptibilidad a estímulos administrados durante la etapa prenatal, que causarán cambios permanentes en el establecimiento de estas relaciones.

Uno de los principales aportes de esta tesis fue el de destacar al período prenatal como etapa de vulnerabilidad a estímulos pro-inflamatorios que tienen consecuencias relevantes en la neurogénesis adulta. La formación del GD y del nicho neurogénico ocurre durante la etapa postnatal temprana. En efecto, se ha demostrado que CMN proliferan en el hilus y posteriormente migran hacia la capa granular durante la primera semana de vida (Namba et al., 2005). El resultado es la formación del GD en el animal adulto, en el cual ocurre el nacimiento de neuronas nuevas. Este proceso es modulado por células y moléculas presentes en el entorno local, y se encuentra asociado a distintos tipos de comportamientos (Santarelli et al., 2003; Jessberger et al., 2009). El LPS administrado durante este período impacta en el cerebro fetal, produciendo en primer lugar alteraciones agudas en el componente inmune celular y molecular del cerebro. De esta manera observamos un aumento en la expresión de citoquinas pro-inflamatorias en el cerebro fetal, al igual que otros grupos que han reportado efectos agudos similares ante estas condiciones (Cai et al., 2000; Meyer et al., 2006b). En el adulto, estas alteraciones persisten, y se manifiestan, entre otros, en una activación permanente de la microglía específicamente en el GD, en la disminución de la expresión local de TGF- β_1 en esta región, y en los menores niveles de neurogénesis adulta. Además, estos animales

muestran un desempeño más pobre en el test NOR, un paradigma de memoria y aprendizaje (Figura iii).

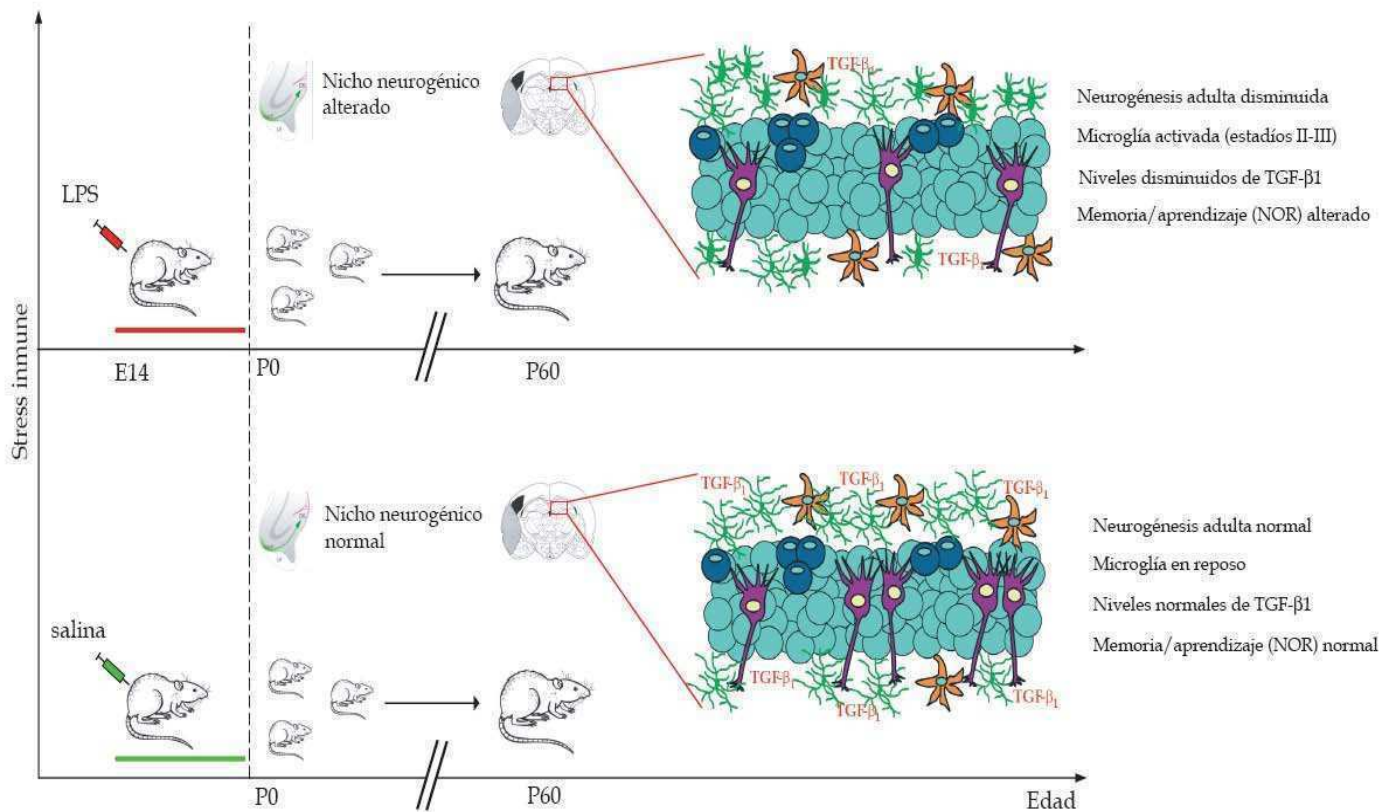


Figura iii: Esquema de los principales efectos de la exposición prenatal a LPS. La administración prenatal de LPS durante la última semana de gestación, provoca alteraciones agudas en el perfil de citoquinas pro-inflamatorias en el cerebro fetal (E14) y en el hipocampo neonatal (P0), que evidencian una homeostasis alterada en el hipocampo y en particular en el nicho neurogénico del hipocampo. En la adultez (P60), los animales prenatalmente tratados con LPS muestran un mayor grado de activación de la microglía, y niveles disminuidos de expresión de TGF-β₁, que participan en la neurogénesis adulta disminuida y en las alteraciones en el desempeño en el test NOR, paradigma de memoria/aprendizaje. Células de color violeta: neuronas; azules: CMN; verdes: microglía; naranja: astrocitos.

Hemos demostrado que los menores niveles de TGF-β₁ en el GD participan en la disminución de la neurogénesis adulta debido al tratamiento prenatal con LPS. También la expresión de TGF-β₁ en el GD está involucrada en los efectos del LPS prenatal sobre este test comportamental. Debido a que en un estudio previo se adjudicó a la neurogénesis adulta un rol determinante en este comportamiento (Jessberger et al., 2009), sugerimos que TGF-β₁ modula este comportamiento a través de sus efectos sobre la neurogénesis. Sin embargo, no es posible afirmar que este mecanismo sea el único

que media estos efectos. Futuros experimentos que profundicen sobre la integración de las neuronas nuevas a circuitos funcionales, y vinculen el funcionamiento de estos circuitos a comportamientos como el NOR, serán necesarios para verificar esta hipótesis.

Por otra parte, la inflamación provocada por la administración de LPS en el adulto, en contraste con la inflamación prenatal, causó una disminución de la neurogénesis y activación de la microglía en forma aguda, ya que estos efectos se observaron luego de 7 días, pero no luego de 60 días de la administración adulta de LPS. La comparación entre ambos modelos sugiere que existe una susceptibilidad preferencial a la inflamación durante el período prenatal, en relación con el período adulto. En conjunto, estos resultados contribuyen a destacar la importancia de la vulnerabilidad del SNC durante el período prenatal a sufrir alteraciones a largo plazo en sus funciones como consecuencia de estímulos pro-inflamatorios durante esta etapa. Por lo tanto, de acuerdo a nuestros datos, la inflamación prenatal debería ser considerada un factor de riesgo de futuras alteraciones en la neurogénesis adulta y comportamientos asociados.

Estas observaciones en conjunto podrían poseer implicancias evolutivas. Dentro de una población, animales prenatalmente expuestos a un estímulo inmune, al presentar menor neurogénesis adulta y un comportamiento asociado a memoria alterado poseerían un menor valor adaptativo que sus pares. De esta manera, frente a una determinada fuerza evolutiva o presión de selección, estos animales se verían relativamente desfavorecidos en su amplitud y diversidad de respuestas. Estudios poblacionales que consideren las implicancias de una infección materna sobre capacidades adaptativas de su progenie ahondaran sobre esta hipótesis.

Existen también posibles implicancias clínicas de estas observaciones. La vaginosis bacteriana es una condición común durante la etapa de gestación. Se ha reportado que un 14% de mujeres embarazadas sufren durante esta etapa alguna infección en la que el feto entra en contacto con el agente infeccioso (Dammann y Leviton, 1997; Purwar et al., 2001; Thorsen et al., 1998; Romero et al., 1989). La vaginosis bacteriana puede llevar a daños tisulares, limitaciones cognitivas, y hasta a parálisis cerebral (Yoon et al., 1997; Dammann y Leviton, 1997). En base a estos

antecedentes y a nuestros datos es posible especular que una exposición a LPS durante la gestación, como consecuencia de una vaginosis bacteriana, puede causar efectos en el SNC en desarrollo que no sean evidentes en una primera instancia, pero que en el organismo adulto se manifiesten en una menor tasa de neurogénesis adulta, y alteraciones en comportamientos asociados a ella. Estudios que utilicen técnicas no invasivas de imágenes resultarán útiles en analizar una posible correlación entre la ocurrencia de infecciones bacterianas prenatales y los niveles de neurogénesis adulta en humanos. En este sentido, y como se discutió previamente, se deberían considerar las condiciones de la exposición prenatal al agente infeccioso/inflamatorio, como la ventana temporal de exposición, el tipo, dosis, y tiempo de duración de la infección, en la evaluación de potenciales efectos adversos en la neurogénesis adulta y otros aspectos del SNC. Del mismo modo, futuras investigaciones que profundicen en los diversos aspectos de estos efectos, y en sus mecanismos moleculares de acción, serán de gran importancia en la prevención o el tratamiento de las disfunciones del SNC en el organismo adulto causadas por infecciones prenatales.

Lic. Mariana Graciarena

Tesista

Dr. Fernando Pitossi

Director de Tesis

Referencias

- Aarum J, Sandberg K, Haeberlein SL, Persson MA (2003) Migration and differentiation of neural precursor cells can be directed by microglia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:15983-15988.
- Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E (2006) Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 7:41-53.
- Akassoglou K, Probert L, Kontogeorgos G, Kollias G (1997) Astrocyte-specific but not neuron-specific transmembrane TNF triggers inflammation and degeneration in the central nervous system of transgenic mice. *J Immunol* 158:438-445.
- Allan SM, Rothwell NJ (2001) Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* 2:734-744.
- Allen E (1912) The cessation of mitosis in the central nervous system of the albino rat. *J comp Neurol* 22:547-568.
- Altman J (1963) Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats. *Anat Rec* 145:573-591.
- Altman J (1969) Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol* 137:433-457.
- Altman J, Das GD (1965a) Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124:319-335.
- Altman J, Das GD (1965b) Post-natal origin of microneurons in the rat brain. *Nature* 207:953-956.
- Altman J, Das GD (1967) Postnatal neurogenesis in the guinea-pig. *Nature* 214:1098-1101.
- Alvarez-Buylla A, Lim DA (2004) For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron* 41:683-686.
- Baker S, Chebli M, Rees S, Lemarec N, Godbout R, Bielajew C (2008) Effects of gestational stress: 1. Evaluation of maternal and juvenile offspring behavior. *Brain Res* 1213:98-110.
- Barbazanges A, Piazza PV, Le Moal M, Maccari S (1996) Maternal glucocorticoid secretion mediates long-term effects of prenatal stress. *J Neurosci* 16:3943-3949.
- Barkho BZ, Song H, Aimone JB, Smrt RD, Kuwabara T, Nakashima K, Gage FH, Zhao X (2006) Identification of astrocyte-expressed factors that modulate neural stem/progenitor cell differentiation. *Stem Cells Dev* 15:407-421.

- Barnea A, Nottebohm F (1994) Seasonal recruitment of hippocampal neurons in adult free-ranging black-capped chickadees. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:11217-11221.
- Barnes CA (1994) Normal aging: regionally specific changes in hippocampal synaptic transmission. *Trends Neurosci* 17:13-18.
- Battista D, Ferrari CC, Gage FH, Pitossi FJ (2006) Neurogenic niche modulation by activated microglia: transforming growth factor beta increases neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Eur J Neurosci* 23:83-93.
- Bedard A, Gravel C, Parent A (2006) Chemical characterization of newly generated neurons in the striatum of adult primates. *Exp Brain Res* 170:501-512.
- Benraiss A, Chmielnicki E, Lerner K, Roh D, Goldman SA (2001) Adenoviral brain-derived neurotrophic factor induces both neostriatal and olfactory neuronal recruitment from endogenous progenitor cells in the adult forebrain. *J Neurosci* 21:6718-6731.
- Benveniste EN, Kwon J, Chung WJ, Sampson J, Pandya K, Tang LP (1994) Differential modulation of astrocyte cytokine gene expression by TGF-beta. *J Immunol* 153:5210-5221.
- Besedovsky HO, del Rey A (1996) Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocr Rev* 17:64-102.
- Besedovsky HO, Rey AD (2007) Physiology of psychoneuroimmunology: a personal view. *Brain Behav Immun* 21:34-44.
- Biebl M, Cooper CM, Winkler J, Kuhn HG (2000) Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain. *Neurosci Lett* 291:17-20.
- Bilbo SD, Schwarz JM (2009) Early-life programming of later-life brain and behavior: a critical role for the immune system. *Front Behav Neurosci* 3:14.
- Bilbo SD, Yirmiya R, Amat J, Paul ED, Watkins LR, Maier SF (2008) Bacterial infection early in life protects against stressor-induced depressive-like symptoms in adult rats. *Psychoneuroendocrinology* 33:261-269.
- Block ML, Zecca L, Hong JS (2007) Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci* 8:57-69.
- Bommireddy R, Doetschman T (2004) TGF-beta, T-cell tolerance and anti-CD3 therapy. *Trends Mol Med* 10:3-9.

- Bottner M, Kriegstein K, Unsicker K (2000) The transforming growth factor-betas: structure, signaling, and roles in nervous system development and functions. *J Neurochem* 75:2227-2240.
- Bredy TW, Grant RJ, Champagne DL, Meaney MJ (2003) Maternal care influences neuronal survival in the hippocampus of the rat. *Eur J Neurosci* 18:2903-2909.
- Brionne TC, Tesseur I, Masliah E, Wyss-Coray T (2003) Loss of TGF-beta 1 leads to increased neuronal cell death and microgliosis in mouse brain. *Neuron* 40:1133-1145.
- Bruel-Jungerman E, Rampon C, Laroche S (2007) Adult hippocampal neurogenesis, synaptic plasticity and memory: facts and hypotheses. *Rev Neurosci* 18:93-114.
- Burd GD, Nottebohm F (1985) Ultrastructural characterization of synaptic terminals formed on newly generated neurons in a song control nucleus of the adult canary forebrain. *J Comp Neurol* 240:143-152.
- Butovsky O, Ziv Y, Schwartz A, Landa G, Talpalar AE, Pluchino S, Martino G, Schwartz M (2006) Microglia activated by IL-4 or IFN-gamma differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells. *Mol Cell Neurosci* 31:149-160.
- Cai Z, Pan ZL, Pang Y, Evans OB, Rhodes PG (2000) Cytokine induction in fetal rat brains and brain injury in neonatal rats after maternal lipopolysaccharide administration. *Pediatr Res* 47:64-72.
- Cameron HA, McKay RD (1999) Restoring production of hippocampal neurons in old age. *Nat Neurosci* 2:894-897.
- Cameron HA, Woolley CS, McEwen BS, Gould E (1993) Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* 56:337-344.
- Caronia G, Wilcoxon J, Feldman P, Grove EA (2010) Bone morphogenetic protein signaling in the developing telencephalon controls formation of the hippocampal dentate gyrus and modifies fear-related behavior. *J Neurosci* 30:6291-6301.
- Carroll BJ, Martin FI, Davies B (1968) Resistance to suppression by dexamethasone of plasma 11-O.H.C.S. levels in severe depressive illness. *Br Med J* 3:285-287.
- Chambers CB, Peng Y, Nguyen H, Gaiano N, Fishell G, Nye JS (2001) Spatiotemporal selectivity of response to Notch1 signals in mammalian forebrain precursors. *Development* 128:689-702.

- Champagne FA, Meaney MJ (2006) Stress during gestation alters postpartum maternal care and the development of the offspring in a rodent model. *Biol Psychiatry* 59:1227-1235.
- Champagne FA, Weaver IC, Diorio J, Sharma S, Meaney MJ (2003) Natural variations in maternal care are associated with estrogen receptor alpha expression and estrogen sensitivity in the medial preoptic area. *Endocrinology* 144:4720-4724.
- Chapouton P, Skupien P, Hesl B, Coolen M, Moore JC, Madelaine R, Kremmer E, Faus-Kessler T, Blader P, Lawson ND, Bally-Cuif L (2010) Notch activity levels control the balance between quiescence and recruitment of adult neural stem cells. *J Neurosci* 30:7961-7974.
- Chin J, Liu RY, Cleary LJ, Eskin A, Byrne JH (2006) TGF-beta1-induced long-term changes in neuronal excitability in aplysia sensory neurons depend on MAPK. *J Neurophysiol* 95:3286-3290.
- Chmielnicki E, Benraiss A, Economides AN, Goldman SA (2004) Adenovirally expressed noggin and brain-derived neurotrophic factor cooperate to induce new medium spiny neurons from resident progenitor cells in the adult striatal ventricular zone. *J Neurosci* 24:2133-2142.
- Ciccolini F, Svendsen CN (1998) Fibroblast growth factor 2 (FGF-2) promotes acquisition of epidermal growth factor (EGF) responsiveness in mouse striatal precursor cells: identification of neural precursors responding to both EGF and FGF-2. *J Neurosci* 18:7869-7880.
- Cirulli F, Berry A, Alleva E (2003) Early disruption of the mother-infant relationship: effects on brain plasticity and implications for psychopathology. *Neurosci Biobehav Rev* 27:73-82.
- Clark RE, Zola SM, Squire LR (2000) Impaired recognition memory in rats after damage to the hippocampus. *J Neurosci* 20:8853-8860.
- Clelland CD, Choi M, Romberg C, Clemenson GD, Jr., Fragniere A, Tyers P, Jessberger S, Saksida LM, Barker RA, Gage FH, Bussey TJ (2009) A functional role for adult hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation. *Science* 325:210-213.
- Coe CL, Kramer M, Czeh B, Gould E, Reeves AJ, Kirschbaum C, Fuchs E (2003) Prenatal stress diminishes neurogenesis in the dentate gyrus of juvenile rhesus monkeys. *Biol Psychiatry* 54:1025-1034.

- Colak D, Mori T, Brill MS, Pfeifer A, Falk S, Deng C, Monteiro R, Mummery C, Sommer L, Gotz M (2008) Adult neurogenesis requires Smad4-mediated bone morphogenic protein signaling in stem cells. *J Neurosci* 28:434-446.
- Colton CA, Gilbert DL (1987) Production of superoxide anions by a CNS macrophage, the microglia. *FEBS Lett* 223:284-288.
- Couillard-Despres S, Winner B, Schaubeck S, Aigner R, Vroemen M, Weidner N, Bogdahn U, Winkler J, Kuhn HG, Aigner L (2005) Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. *Eur J Neurosci* 21:1-14.
- Cui K, Ashdown H, Luheshi GN, Boksa P (2009) Effects of prenatal immune activation on hippocampal neurogenesis in the rat. *Schizophr Res* 113:288-297.
- Cunningham C, Boche D, Perry VH (2002) Transforming growth factor beta1, the dominant cytokine in murine prion disease: influence on inflammatory cytokine synthesis and alteration of vascular extracellular matrix. *Neuropathol Appl Neurobiol* 28:107-119.
- Dammann O, Leviton A (1997) Does prepregnancy bacterial vaginosis increase a mother's risk of having a preterm infant with cerebral palsy? *Dev Med Child Neurol* 39:836-840.
- Dantzer R (2004) Cytokine-induced sickness behaviour: a neuroimmune response to activation of innate immunity. *Eur J Pharmacol* 500:399-411.
- Dantzer R, Wollman E, Vitkovic L, Yirmiya R (1999) Cytokines and depression: fortuitous or causative association? *Mol Psychiatry* 4:328-332.
- Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML, Gan WB (2005) ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci* 8:752-758.
- Dayer AG, Cleaver KM, Abouantoun T, Cameron HA (2005) New GABAergic interneurons in the adult neocortex and striatum are generated from different precursors. *J Cell Biol* 168:415-427.
- Dayer AG, Ford AA, Cleaver KM, Yassaee M, Cameron HA (2003) Short-term and long-term survival of new neurons in the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol* 460:563-572.
- de Graaf-Peters VB, Hadders-Algra M (2006) Ontogeny of the human central nervous system: what is happening when? *Early Hum Dev* 82:257-266.
- De Lella Ezcurra AL, Chertoff M, Ferrari C, Graciarena M, Pitossi F (2010) Chronic expression of low levels of tumor necrosis factor-alpha in the substantia nigra

- elicits progressive neurodegeneration, delayed motor symptoms and microglia/macrophage activation. *Neurobiol Dis* 37:630-640.
- de Sampaio e Spohr TC, Martinez R, da Silva EF, Neto VM, Gomes FC (2002) Neuro-glia interaction effects on GFAP gene: a novel role for transforming growth factor-beta1. *Eur J Neurosci* 16:2059-2069.
- del Rey A, Furukawa H, Monge-Arditi G, Kabiersch A, Voigt KH, Besedovsky HO (1996) Alterations in the pituitary-adrenal axis of adult mice following neonatal exposure to interleukin-1. *Brain Behav Immun* 10:235-248.
- Deng W, Saxe MD, Gallina IS, Gage FH (2009) Adult-born hippocampal dentate granule cells undergoing maturation modulate learning and memory in the brain. *J Neurosci* 29:13532-13542.
- Depino A, Ferrari C, Pott Godoy MC, Tarelli R, Pitossi FJ (2005) Differential effects of interleukin-1beta on neurotoxicity, cytokine induction and glial reaction in specific brain regions. *J Neuroimmunol* 168:96-110.
- Depino AM, Earl C, Kaczmarczyk E, Ferrari C, Besedovsky H, del Rey A, Pitossi FJ, Oertel WH (2003) Microglial activation with atypical proinflammatory cytokine expression in a rat model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci* 18:2731-2742.
- Derynck R, Zhang YE (2003) Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 425:577-584.
- Dinkel K, MacPherson A, Sapolsky RM (2003) Novel glucocorticoid effects on acute inflammation in the CNS. *J Neurochem* 84:705-716.
- Dobrossy MD, Drapeau E, Aurousseau C, Le Moal M, Piazza PV, Abrous DN (2003) Differential effects of learning on neurogenesis: learning increases or decreases the number of newly born cells depending on their birth date. *Mol Psychiatry* 8:974-982.
- Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1997) Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci* 17:5046-5061.
- Doetsch F, Caille I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1999) Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97:703-716.
- Doetsch F, Verdugo JM, Caille I, Alvarez-Buylla A, Chao MV, Casaccia-Bonnel P (2002) Lack of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 results in selective increase of transit-amplifying cells for adult neurogenesis. *J Neurosci* 22:2255-2264.

- Dong Y, Benveniste EN (2001) Immune function of astrocytes. *Glia* 36:180-190.
- Drapeau E, Mayo W, Aourousseau C, Le Moal M, Piazza PV, Abrous DN (2003) Spatial memory performances of aged rats in the water maze predict levels of hippocampal neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:14385-14390.
- Dugovic C, Maccari S, Weibel L, Turek FW, Van Reeth O (1999) High corticosterone levels in prenatally stressed rats predict persistent paradoxical sleep alterations. *J Neurosci* 19:8656-8664.
- Dunn AJ, Swiergiel AH, de Beaurepaire R (2005) Cytokines as mediators of depression: what can we learn from animal studies? *Neurosci Biobehav Rev* 29:891-909.
- Dupret D, Revest JM, Koehl M, Ichas F, De Giorgi F, Costet P, Abrous DN, Piazza PV (2008) Spatial relational memory requires hippocampal adult neurogenesis. *PLoS One* 3:e1959.
- Eckenstein FP (1994) Fibroblast growth factors in the nervous system. *J Neurobiol* 25:1467-1480.
- Ehninger D, Kempermann G (2003) Regional effects of wheel running and environmental enrichment on cell genesis and microglia proliferation in the adult murine neocortex. *Cereb Cortex* 13:845-851.
- Ekdahl CT, Kokaia Z, Lindvall O (2009) Brain inflammation and adult neurogenesis: the dual role of microglia. *Neuroscience* 158:1021-1029.
- Ekdahl CT, Claasen JH, Bonde S, Kokaia Z, Lindvall O (2003) Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:13632-13637.
- Encinas JM, Vaahtokari A, Enikolopov G (2006) Fluoxetine targets early progenitor cells in the adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:8233-8238.
- Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4:1313-1317.
- Esposito MS, Piatti VC, Laplagne DA, Morgenstern NA, Ferrari CC, Pitossi FJ, Schinder AF (2005) Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. *J Neurosci* 25:10074-10086.
- Fabel K, Tam B, Kaufer D, Baiker A, Simmons N, Kuo CJ, Palmer TD (2003) VEGF is necessary for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis. *Eur J Neurosci* 18:2803-2812.
- Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM (1998) Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory

- cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest* 101:890-898.
- Farkas LM, Dunker N, Roussa E, Unsicker K, Kriegstein K (2003) Transforming growth factor-beta(s) are essential for the development of midbrain dopaminergic neurons in vitro and in vivo. *J Neurosci* 23:5178-5186.
- Farmer J, Zhao X, van Praag H, Wodtke K, Gage FH, Christie BR (2004) Effects of voluntary exercise on synaptic plasticity and gene expression in the dentate gyrus of adult male Sprague-Dawley rats in vivo. *Neuroscience* 124:71-79.
- Ferrari CC, Pott Godoy MC, Tarelli R, Chertoff M, Depino AM, Pitossi FJ (2006) Progressive neurodegeneration and motor disabilities induced by chronic expression of IL-1beta in the substantia nigra. *Neurobiol Dis* 24:183-193.
- Ferrari CC, Depino AM, Prada F, Muraro N, Campbell S, Podhajcer O, Perry VH, Anthony DC, Pitossi FJ (2004) Reversible demyelination, blood-brain barrier breakdown, and pronounced neutrophil recruitment induced by chronic IL-1 expression in the brain. *Am J Pathol* 165:1827-1837.
- Fetler L, Amigorena S (2005) Neuroscience. Brain under surveillance: the microglia patrol. *Science* 309:392-393.
- Finch CE (2003) Neurons, glia, and plasticity in normal brain aging. *Neurobiol Aging* 24 Suppl 1:S123-127; discussion S131.
- Flanders KC, Ren RF, Lippa CF (1998) Transforming growth factor-betas in neurodegenerative disease. *Prog Neurobiol* 54:71-85.
- Fogal B, Hewett SJ (2008) Interleukin-1beta: a bridge between inflammation and excitotoxicity? *J Neurochem* 106:1-23.
- Fowler CD, Liu Y, Ouimet C, Wang Z (2002) The effects of social environment on adult neurogenesis in the female prairie vole. *J Neurobiol* 51:115-128.
- Fox K (1992) A critical period for experience-dependent synaptic plasticity in rat barrel cortex. *J Neurosci* 12:1826-1838.
- Francis DD, Champagne FA, Liu D, Meaney MJ (1999) Maternal care, gene expression, and the development of individual differences in stress reactivity. *Ann N Y Acad Sci* 896:66-84.
- Fujioka H, Akema T (2010) Lipopolysaccharide acutely inhibits proliferation of neural precursor cells in the dentate gyrus in adult rats. *Brain Res* 1352C:35-42.

- Fukushima T, Liu RY, Byrne JH (2007) Transforming growth factor-beta2 modulates synaptic efficacy and plasticity and induces phosphorylation of CREB in hippocampal neurons. *Hippocampus* 17:5-9.
- Gadient RA, Otten U (1994) Expression of interleukin-6 (IL-6) and interleukin-6 receptor (IL-6R) mRNAs in rat brain during postnatal development. *Brain Res* 637:10-14.
- Gage FH, Dunnett SB, Bjorklund A (1984) Spatial learning and motor deficits in aged rats. *Neurobiol Aging* 5:43-48.
- Garcia A, Steiner B, Kronenberg G, Bick-Sander A, Kempermann G (2004) Age-dependent expression of glucocorticoid- and mineralocorticoid receptors on neural precursor cell populations in the adult murine hippocampus. *Aging Cell* 3:363-371.
- Ge S, Goh EL, Sailor KA, Kitabatake Y, Ming GL, Song H (2006) GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature* 439:589-593.
- Gobeske KT, Das S, Bonaguidi MA, Weiss C, Radulovic J, Disterhoft JF, Kessler JA (2009) BMP signaling mediates effects of exercise on hippocampal neurogenesis and cognition in mice. *PLoS One* 4:e7506.
- Goldman SA, Nottebohm F (1983) Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:2390-2394.
- Gomes FC, Sousa Vde O, Romao L (2005) Emerging roles for TGF-beta1 in nervous system development. *Int J Dev Neurosci* 23:413-424.
- Goshen I, Kreisel T, Ben-Menachem-Zidon O, Licht T, Weidenfeld J, Ben-Hur T, Yirmiya R (2008) Brain interleukin-1 mediates chronic stress-induced depression in mice via adrenocortical activation and hippocampal neurogenesis suppression. *Mol Psychiatry* 13:717-728.
- Gould E, Reeves AJ, Graziano MS, Gross CG (1999a) Neurogenesis in the neocortex of adult primates. *Science* 286:548-552.
- Gould E, Vail N, Wagers M, Gross CG (2001) Adult-generated hippocampal and neocortical neurons in macaques have a transient existence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:10910-10917.
- Gould E, Cameron HA, Daniels DC, Woolley CS, McEwen BS (1992) Adrenal hormones suppress cell division in the adult rat dentate gyrus. *J Neurosci* 12:3642-3650.

- Gould E, McEwen BS, Tanapat P, Galea LA, Fuchs E (1997) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J Neurosci* 17:2492-2498.
- Gould E, Tanapat P, McEwen BS, Flugge G, Fuchs E (1998) Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:3168-3171.
- Gould E, Beylin A, Tanapat P, Reeves A, Shors TJ (1999b) Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat Neurosci* 2:260-265.
- Gould E, Reeves AJ, Fallah M, Tanapat P, Gross CG, Fuchs E (1999c) Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:5263-5267.
- Gray JA, McNaughton N (1983) Comparison between the behavioural effects of septal and hippocampal lesions: a review. *Neurosci Biobehav Rev* 7:119-188.
- Hanisch UK, Kettenmann H (2007) Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* 10:1387-1394.
- Heine VM, Maslam S, Joels M, Lucassen PJ (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. *Neurobiol Aging* 25:361-375.
- Heupel K, Sargsyan V, Plomp JJ, Rickmann M, Varoqueaux F, Zhang W, Kriegstein K (2008) Loss of transforming growth factor-beta 2 leads to impairment of central synapse function. *Neural Dev* 3:25.
- Hodyl NA, Krivanek KM, Lawrence E, Clifton VL, Hodgson DM (2007) Prenatal exposure to a pro-inflammatory stimulus causes delays in the development of the innate immune response to LPS in the offspring. *J Neuroimmunol* 190:61-71.
- Hofer MA (1984) Relationships as regulators: a psychobiologic perspective on bereavement. *Psychosom Med* 46:183-197.
- Hopkins SJ, Rothwell NJ (1995) Cytokines and the nervous system. I: Expression and recognition. *Trends Neurosci* 18:83-88.
- Hortega PDR (1932) Microglia. In *Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System*. W Penfield ed (New York Hoeber):482-534.
- Hsieh J, Aimone JB, Kaspar BK, Kuwabara T, Nakashima K, Gage FH (2004) IGF-I instructs multipotent adult neural progenitor cells to become oligodendrocytes. *J Cell Biol* 164:111-122.

- Imayoshi I, Sakamoto M, Yamaguchi M, Mori K, Kageyama R (2010) Essential roles of Notch signaling in maintenance of neural stem cells in developing and adult brains. *J Neurosci* 30:3489-3498.
- Imayoshi I, Sakamoto M, Ohtsuka T, Takao K, Miyakawa T, Yamaguchi M, Mori K, Ikeda T, Itohara S, Kageyama R (2008) Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. *Nat Neurosci* 11:1153-1161.
- Iosif RE, Ekdahl CT, Ahlenius H, Pronk CJ, Bonde S, Kokaia Z, Jacobsen SE, Lindvall O (2006) Tumor necrosis factor receptor 1 is a negative regulator of progenitor proliferation in adult hippocampal neurogenesis. *J Neurosci* 26:9703-9712.
- Jack CS, Arbour N, Manusow J, Montgrain V, Blain M, McCrea E, Shapiro A, Antel JP (2005) TLR signaling tailors innate immune responses in human microglia and astrocytes. *J Immunol* 175:4320-4330.
- Jakubs K, Bonde S, Iosif RE, Ekdahl CT, Kokaia Z, Kokaia M, Lindvall O (2008) Inflammation regulates functional integration of neurons born in adult brain. *J Neurosci* 28:12477-12488.
- Jessberger S, Toni N, Clemenson GD, Jr., Ray J, Gage FH (2008) Directed differentiation of hippocampal stem/progenitor cells in the adult brain. *Nat Neurosci* 11:888-893.
- Jessberger S, Clark RE, Broadbent NJ, Clemenson GD, Jr., Consiglio A, Lie DC, Squire LR, Gage FH (2009) Dentate gyrus-specific knockdown of adult neurogenesis impairs spatial and object recognition memory in adult rats. *Learn Mem* 16:147-154.
- Jiao J, Chen DF (2008) Induction of neurogenesis in nonconventional neurogenic regions of the adult central nervous system by niche astrocyte-produced signals. *Stem Cells* 26:1221-1230.
- Jin K, Zhu Y, Sun Y, Mao XO, Xie L, Greenberg DA (2002) Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:11946-11950.
- Johnston GR, Webster NR (2009) Cytokines and the immunomodulatory function of the vagus nerve. *Br J Anaesth* 102:453-462.
- Kaplan MS, Hinds JW (1977) Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science* 197:1092-1094.
- Kaplan MS, Bell DH (1984) Mitotic neuroblasts in the 9-day-old and 11-month-old rodent hippocampus. *J Neurosci* 4:1429-1441.

- Kaplan MS, McNelly NA, Hinds JW (1985) Population dynamics of adult-formed granule neurons of the rat olfactory bulb. *J Comp Neurol* 239:117-125.
- Karrow NA (2006) Activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and autonomic nervous system during inflammation and altered programming of the neuroendocrine-immune axis during fetal and neonatal development: lessons learned from the model inflammagen, lipopolysaccharide. *Brain Behav Immun* 20:144-158.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH (1997) More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386:493-495.
- Kempermann G, Brandon EP, Gage FH (1998) Environmental stimulation of 129/SvJ mice causes increased cell proliferation and neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Curr Biol* 8:939-942.
- Kempermann G, Gast D, Kronenberg G, Yamaguchi M, Gage FH (2003) Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development* 130:391-399.
- Kerschensteiner M, Meinl E, Hohlfeld R (2009) Neuro-immune crosstalk in CNS diseases. *Neuroscience* 158:1122-1132.
- King JA, Edwards E (1999) Early stress and genetic influences on hypothalamic-pituitary-adrenal axis functioning in adulthood. *Horm Behav* 36:79-85.
- Klassen HJ, Imfeld KL, Kirov, II, Tai L, Gage FH, Young MJ, Berman MA (2003) Expression of cytokines by multipotent neural progenitor cells. *Cytokine* 22:101-106.
- Kokoeva MV, Yin H, Flier JS (2005) Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: potential role in energy balance. *Science* 310:679-683.
- Konsman JP, Parnet P, Dantzer R (2002) Cytokine-induced sickness behaviour: mechanisms and implications. *Trends Neurosci* 25:154-159.
- Koo JW, Duman RS (2008) IL-1beta is an essential mediator of the antineurogenic and anhedonic effects of stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:751-756.
- Kornack DR, Rakic P (1999) Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:5768-5773.
- Kornack DR, Rakic P (2001) Cell proliferation without neurogenesis in adult primate neocortex. *Science* 294:2127-2130.
- Kreutzberg GW (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19:312-318.

- Kriegelstein K, Suter-Crazzolara C, Fischer WH, Unsicker K (1995) TGF-beta superfamily members promote survival of midbrain dopaminergic neurons and protect them against MPP+ toxicity. *Embo J* 14:736-742.
- Kriegelstein K, Reuss B, Maysinger D, Unsicker K (1998) Short communication: transforming growth factor-beta mediates the neurotrophic effect of fibroblast growth factor-2 on midbrain dopaminergic neurons. *Eur J Neurosci* 10:2746-2750.
- Kuhn CM, Pauk J, Schanberg SM (1990) Endocrine responses to mother-infant separation in developing rats. *Dev Psychobiol* 23:395-410.
- Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH (1996) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* 16:2027-2033.
- Kuhn HG, Winkler J, Kempermann G, Thal LJ, Gage FH (1997) Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *J Neurosci* 17:5820-5829.
- Kulkarni AB, Huh CG, Becker D, Geiser A, Lyght M, Flanders KC, Roberts AB, Sporn MB, Ward JM, Karlsson S (1993) Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:770-774.
- Laplagne DA, Esposito MS, Piatti VC, Morgenstern NA, Zhao C, van Praag H, Gage FH, Schinder AF (2006) Functional convergence of neurons generated in the developing and adult hippocampus. *PLoS Biol* 4:e409.
- Lasala N, Zhou H (2007) Effects of maternal exposure to LPS on the inflammatory response in the offspring. *J Neuroimmunol* 189:95-101.
- Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Gordon S (1990) Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 39:151-170.
- Lee C, Agoston DV (2009) Inhibition of VEGF receptor 2 increased cell death of dentate hilar neurons after traumatic brain injury. *Exp Neurol* 220:400-403.
- Lee KY, Bae SC (2002) TGF-beta-dependent cell growth arrest and apoptosis. *J Biochem Mol Biol* 35:47-53.
- Lemaire V, Koehl M, Le Moal M, Abrous DN (2000) Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:11032-11037.

- Lemaire V, Lamarque S, Le Moal M, Piazza PV, Abrous DN (2006) Postnatal stimulation of the pups counteracts prenatal stress-induced deficits in hippocampal neurogenesis. *Biol Psychiatry* 59:786-792.
- Leong SK, Ling EA (1992) Amoeboid and ramified microglia: their interrelationship and response to brain injury. *Glia* 6:39-47.
- Leuner B, Kozorovitskiy Y, Gross CG, Gould E (2007) Diminished adult neurogenesis in the marmoset brain precedes old age. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:17169-17173.
- Leuner B, Mendolia-Loffredo S, Kozorovitskiy Y, Samburg D, Gould E, Shors TJ (2004) Learning enhances the survival of new neurons beyond the time when the hippocampus is required for memory. *J Neurosci* 24:7477-7481.
- Li W, Cogswell CA, LoTurco JJ (1998) Neuronal differentiation of precursors in the neocortical ventricular zone is triggered by BMP. *J Neurosci* 18:8853-8862.
- Licinio J, Wong ML (1997) Pathways and mechanisms for cytokine signaling of the central nervous system. *J Clin Invest* 100:2941-2947.
- Lie DC, Colamarino SA, Song HJ, Desire L, Mira H, Consiglio A, Lein ES, Jessberger S, Lansford H, Dearie AR, Gage FH (2005) Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. *Nature* 437:1370-1375.
- Lindsten T, Golden JA, Zong WX, Minarcik J, Harris MH, Thompson CB (2003) The proapoptotic activities of Bax and Bak limit the size of the neural stem cell pool. *J Neurosci* 23:11112-11119.
- Ling EA, Wong WC (1993) The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts. *Glia* 7:9-18.
- Ling MH, Perry PJ, Tsuang MT (1981) Side effects of corticosteroid therapy. Psychiatric aspects. *Arch Gen Psychiatry* 38:471-477.
- Liu D, Diorio J, Day JC, Francis DD, Meaney MJ (2000a) Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats. *Nat Neurosci* 3:799-806.
- Liu D, Caldji C, Sharma S, Plotsky PM, Meaney MJ (2000b) Influence of neonatal rearing conditions on stress-induced adrenocorticotropin responses and norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus. *J Neuroendocrinol* 12:5-12.
- Lochmuller H, Jani A, Huard J, Prescott S, Simoneau M, Massie B, Karpati G, Acsadi G (1994) Emergence of early region 1-containing replication-competent adenovirus in stocks of replication-defective adenovirus recombinants (delta E1 + delta E3) during multiple passages in 293 cells. *Hum Gene Ther* 5:1485-1491.

- Loddick SA, Wong ML, Bongiorno PB, Gold PW, Licinio J, Rothwell NJ (1997) Endogenous interleukin-1 receptor antagonist is neuroprotective. *Biochem Biophys Res Commun* 234:211-215.
- Lois C, Alvarez-Buylla A (1993) Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:2074-2077.
- Lopez-Garcia C, Molowny A, Martinez-Guijarro FJ, Blasco-Ibanez JM, Luis de la Iglesia JA, Bernabeu A, Garcia-Verdugo JM (1992) Lesion and regeneration in the medial cerebral cortex of lizards. *Histol Histopathol* 7:725-746.
- Lu J, Wu Y, Sousa N, Almeida OF (2005) SMAD pathway mediation of BDNF and TGF beta 2 regulation of proliferation and differentiation of hippocampal granule neurons. *Development* 132:3231-3242.
- Luo J, Ho PP, Buckwalter MS, Hsu T, Lee LY, Zhang H, Kim DK, Kim SJ, Gambhir SS, Steinman L, Wyss-Coray T (2007) Glia-dependent TGF-beta signaling, acting independently of the TH17 pathway, is critical for initiation of murine autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest* 117:3306-3315.
- Luzzati F, De Marchis S, Fasolo A, Peretto P (2006) Neurogenesis in the caudate nucleus of the adult rabbit. *J Neurosci* 26:609-621.
- Ma DK, Ming GL, Song H (2005) Glial influences on neural stem cell development: cellular niches for adult neurogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 15:514-520.
- Ma YY, Li KY, Wang JJ, Huang YL, Huang Y, Sun FY (2009) Vascular endothelial growth factor acutely reduces calcium influx via inhibition of the Ca²⁺ channels in rat hippocampal neurons. *J Neurosci Res* 87:393-402.
- Maccari S, Piazza PV, Kabbaj M, Barbazanges A, Simon H, Le Moal M (1995) Adoption reverses the long-term impairment in glucocorticoid feedback induced by prenatal stress. *J Neurosci* 15:110-116.
- Madronal N, Lopez-Aracil C, Rangel A, del Rio JA, Delgado-Garcia JM, Gruart A (2010) Effects of enriched physical and social environments on motor performance, associative learning, and hippocampal neurogenesis in mice. *PLoS One* 5:e11130.
- Manganas LN, Zhang X, Li Y, Hazel RD, Smith SD, Wagshul ME, Henn F, Benveniste H, Djuric PM, Enikolopov G, Maletic-Savatic M (2007) Magnetic resonance spectroscopy identifies neural progenitor cells in the live human brain. *Science* 318:980-985.

- Mason JL, Suzuki K, Chaplin DD, Matsushima GK (2001) Interleukin-1beta promotes repair of the CNS. *J Neurosci* 21:7046-7052.
- Massague J, Gomis RR (2006) The logic of TGFbeta signaling. *FEBS Lett* 580:2811-2820.
- Mathieu P, Battista D, Depino A, Roca V, Graciarena M, Pitossi F (2010) The more you have, the less you get: the functional role of inflammation on neuronal differentiation of endogenous and transplanted neural stem cells in the adult brain. *J Neurochem* 112:1368-1385.
- McCoy MK, Tansey MG (2008) TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease. *J Neuroinflammation* 5:45.
- McKee RD, Squire LR (1993) On the development of declarative memory. *J Exp Psychol Learn Mem Cogn* 19:397-404.
- Meyer U, Feldon J, Schedlowski M, Yee BK (2005) Towards an immuno-precipitated neurodevelopmental animal model of schizophrenia. *Neurosci Biobehav Rev* 29:913-947.
- Meyer U, Schwendener S, Feldon J, Yee BK (2006a) Prenatal and postnatal maternal contributions in the infection model of schizophrenia. *Exp Brain Res* 173:243-257.
- Meyer U, Nyffeler M, Engler A, Urwyler A, Schedlowski M, Knuesel I, Yee BK, Feldon J (2006b) The time of prenatal immune challenge determines the specificity of inflammation-mediated brain and behavioral pathology. *J Neurosci* 26:4752-4762.
- Miller BH, Schultz LE, Gulati A, Cameron MD, Pletcher MT (2008) Genetic regulation of behavioral and neuronal responses to fluoxetine. *Neuropsychopharmacology* 33:1312-1322.
- Miller FD, Gauthier-Fisher A (2009) Home at last: neural stem cell niches defined. *Cell Stem Cell* 4:507-510.
- Mira H, Andreu Z, Suh H, Lie DC, Jessberger S, Consiglio A, San Emeterio J, Hortiguera R, Marques-Torres MA, Nakashima K, Colak D, Gotz M, Farinas I, Gage FH (2010) Signaling through BMPRII regulates quiescence and long-term activity of neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell* 7:78-89.
- Mirescu C, Gould E (2006) Stress and adult neurogenesis. *Hippocampus* 16:233-238.
- Mirescu C, Peters JD, Gould E (2004) Early life experience alters response of adult neurogenesis to stress. *Nat Neurosci* 7:841-846.

- Mirescu C, Peters JD, Noiman L, Gould E (2006) Sleep deprivation inhibits adult neurogenesis in the hippocampus by elevating glucocorticoids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:19170-19175.
- Monje ML, Toda H, Palmer TD (2003) Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science* 302:1760-1765.
- Montaron MF, Petry KG, Rodriguez JJ, Marinelli M, Arousseau C, Rougon G, Le Moal M, Abrous DN (1999) Adrenalectomy increases neurogenesis but not PSA-NCAM expression in aged dentate gyrus. *Eur J Neurosci* 11:1479-1485.
- Morgan SC, Taylor DL, Pockock JM (2004) Microglia release activators of neuronal proliferation mediated by activation of mitogen-activated protein kinase, phosphatidylinositol-3-kinase/Akt and delta-Notch signalling cascades. *J Neurochem* 90:89-101.
- Morley-Fletcher S, Darnaudery M, Koehl M, Casolini P, Van Reeth O, Maccari S (2003) Prenatal stress in rats predicts immobility behavior in the forced swim test. Effects of a chronic treatment with tianeptine. *Brain Res* 989:246-251.
- Morshead CM, Craig CG, van der Kooy D (1998) In vivo clonal analyses reveal the properties of endogenous neural stem cell proliferation in the adult mammalian forebrain. *Development* 125:2251-2261.
- Moustakas A, Heldin CH (2009) The regulation of TGFbeta signal transduction. *Development* 136:3699-3714.
- Mu Y, Lee SW, Gage FH (2010) Signaling in adult neurogenesis. *Curr Opin Neurobiol*.
- Munoz-Fernandez MA, Fresno M (1998) The role of tumour necrosis factor, interleukin 6, interferon-gamma and inducible nitric oxide synthase in the development and pathology of the nervous system. *Prog Neurobiol* 56:307-340.
- Nacher J, Gomez-Climont MA, McEwen B (2004) Chronic non-invasive glucocorticoid administration decreases polysialylated neural cell adhesion molecule expression in the adult rat dentate gyrus. *Neurosci Lett* 370:40-44.
- Namba T, Mochizuki H, Onodera M, Mizuno Y, Namiki H, Seki T (2005) The fate of neural progenitor cells expressing astrocytic and radial glial markers in the postnatal rat dentate gyrus. *Eur J Neurosci* 22:1928-1941.
- Napoli I, Neumann H (2009) Protective effects of microglia in multiple sclerosis. *Exp Neurol*.
- Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA (2003) New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci* 26:523-530.

- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F (2005) Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308:1314-1318.
- Oomen CA, Mayer JL, de Kloet ER, Joels M, Lucassen PJ (2007) Brief treatment with the glucocorticoid receptor antagonist mifepristone normalizes the reduction in neurogenesis after chronic stress. *Eur J Neurosci* 26:3395-3401.
- Oomen CA, Soeters H, Audureau N, Vermunt L, van Hasselt FN, Manders EM, Joels M, Lucassen PJ, Krugers H (2010) Severe early life stress hampers spatial learning and neurogenesis, but improves hippocampal synaptic plasticity and emotional learning under high-stress conditions in adulthood. *J Neurosci* 30:6635-6645.
- Packard M, Mathew D, Budnik V (2003) Wnts and TGF beta in synaptogenesis: old friends signalling at new places. *Nat Rev Neurosci* 4:113-120.
- Palmer TD, Ray J, Gage FH (1995) FGF-2-responsive neuronal progenitors reside in proliferative and quiescent regions of the adult rodent brain. *Mol Cell Neurosci* 6:474-486.
- Palmer TD, Willhoite AR, Gage FH (2000) Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol* 425:479-494.
- Palmer TD, Markakis EA, Willhoite AR, Safar F, Gage FH (1999) Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS. *J Neurosci* 19:8487-8497.
- Pascalis O, Bachevalier J (1999) Neonatal aspiration lesions of the hippocampal formation impair visual recognition memory when assessed by paired-comparison task but not by delayed nonmatching-to-sample task. *Hippocampus* 9:609-616.
- Peng H, Wen TC, Tanaka J, Maeda N, Matsuda S, Desaki J, Sudo S, Zhang B, Sakanaka M (1998) Epidermal growth factor protects neuronal cells in vivo and in vitro against transient forebrain ischemia- and free radical-induced injuries. *J Cereb Blood Flow Metab* 18:349-360.
- Perry VH, Cunningham C, Boche D (2002) Atypical inflammation in the central nervous system in prion disease. *Curr Opin Neurol* 15:349-354.
- Perry VH, Nicoll JA, Holmes C (2010) Microglia in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* 6:193-201.
- Peters DA (1982) Prenatal stress: effects on brain biogenic amine and plasma corticosterone levels. *Pharmacol Biochem Behav* 17:721-725.

- Pitossi F, del Rey A, Kabiersch A, Besedovsky H (1997) Induction of cytokine transcripts in the central nervous system and pituitary following peripheral administration of endotoxin to mice. *J Neurosci Res* 48:287-298.
- Plotkin SR, Banks WA, Kastin AJ (1996) Comparison of saturable transport and extracellular pathways in the passage of interleukin-1 alpha across the blood-brain barrier. *J Neuroimmunol* 67:41-47.
- Plotkin SR, Banks WA, Maness LM, Kastin AJ (2000) Differential transport of rat and human interleukin-1alpha across the blood-brain barrier and blood-testis barrier in rats. *Brain Res* 881:57-61.
- Plotsky PM, Meaney MJ (1993) Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Brain Res Mol Brain Res* 18:195-200.
- Pott Godoy MC, Ferrari CC, Pitossi FJ (2010) Nigral neurodegeneration triggered by striatal AdIL-1 administration can be exacerbated by systemic IL-1 expression. *J Neuroimmunol* 222:29-39.
- Pott Godoy MC, Tarelli R, Ferrari CC, Sarchi MI, Pitossi FJ (2008) Central and systemic IL-1 exacerbates neurodegeneration and motor symptoms in a model of Parkinson's disease. *Brain* 131:1880-1894.
- Purwar M, Ughade S, Bhagat B, Agarwal V, Kulkarni H (2001) Bacterial vaginosis in early pregnancy and adverse pregnancy outcome. *J Obstet Gynaecol Res* 27:175-181.
- Qin L, Liu Y, Cooper C, Liu B, Wilson B, Hong JS (2002) Microglia enhance beta-amyloid peptide-induced toxicity in cortical and mesencephalic neurons by producing reactive oxygen species. *J Neurochem* 83:973-983.
- Rao MS, Shetty AK (2004) Efficacy of doublecortin as a marker to analyse the absolute number and dendritic growth of newly generated neurons in the adult dentate gyrus. *Eur J Neurosci* 19:234-246.
- Ray J, Gage FH (2006) Differential properties of adult rat and mouse brain-derived neural stem/progenitor cells. *Mol Cell Neurosci* 31:560-573.
- Reif A, Fritzen S, Finger M, Strobel A, Lauer M, Schmitt A, Lesch KP (2006) Neural stem cell proliferation is decreased in schizophrenia, but not in depression. *Mol Psychiatry* 11:514-522.
- Reilly JF, Maher PA, Kumari VG (1998) Regulation of astrocyte GFAP expression by TGF-beta1 and FGF-2. *Glia* 22:202-210.

- Ren L, Lubrich B, Biber K, Gebicke-Haerter PJ (1999) Differential expression of inflammatory mediators in rat microglia cultured from different brain regions. *Brain Res Mol Brain Res* 65:198-205.
- Reul JM, Stec I, Wiegers GJ, Labeur MS, Linthorst AC, Arzt E, Holsboer F (1994) Prenatal immune challenge alters the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis in adult rats. *J Clin Invest* 93:2600-2607.
- Reuss B, von Bohlen und Halbach O (2003) Fibroblast growth factors and their receptors in the central nervous system. *Cell Tissue Res* 313:139-157.
- Reynolds BA, Weiss S (1992) Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255:1707-1710.
- Roceri M, Hendriks W, Racagni G, Ellenbroek BA, Riva MA (2002) Early maternal deprivation reduces the expression of BDNF and NMDA receptor subunits in rat hippocampus. *Mol Psychiatry* 7:609-616.
- Rodriguez JJ, Montaron MF, Petry KG, Arousseau C, Marinelli M, Premier S, Rougon G, Le Moal M, Abrous DN (1998) Complex regulation of the expression of the polysialylated form of the neuronal cell adhesion molecule by glucocorticoids in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 10:2994-3006.
- Romero E, Guaza C, Castellano B, Borrell J (2010) Ontogeny of sensorimotor gating and immune impairment induced by prenatal immune challenge in rats: implications for the etiopathology of schizophrenia. *Mol Psychiatry* 15:372-383.
- Romero R, Sirtori M, Oyarzun E, Avila C, Mazor M, Callahan R, Sabo V, Athanassiadis AP, Hobbins JC (1989) Infection and labor. V. Prevalence, microbiology, and clinical significance of intraamniotic infection in women with preterm labor and intact membranes. *Am J Obstet Gynecol* 161:817-824.
- Rosenblatt JS (1994) Psychobiology of maternal behavior: contribution to the clinical understanding of maternal behavior among humans. *Acta Paediatr Suppl* 397:3-8.
- Rossi F, Cattaneo E (2002) Opinion: neural stem cell therapy for neurological diseases: dreams and reality. *Nat Rev Neurosci* 3:401-409.
- Roumier A, Pascual O, Bechade C, Wakselman S, Poncer JC, Real E, Triller A, Bessis A (2008) Prenatal activation of microglia induces delayed impairment of glutamatergic synaptic function. *PLoS One* 3:e2595.
- Roussa E, Kriegstein K (2004) Induction and specification of midbrain dopaminergic cells: focus on SHH, FGF8, and TGF-beta. *Cell Tissue Res* 318:23-33.

- Sahay A, Hen R (2007) Adult hippocampal neurogenesis in depression. *Nat Neurosci* 10:1110-1115.
- Sandi C (2004) Stress, cognitive impairment and cell adhesion molecules. *Nat Rev Neurosci* 5:917-930.
- Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, Belzung C, Hen R (2003) Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* 301:805-809.
- Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS (1986) The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis. *Endocr Rev* 7:284-301.
- Sawada M, Kondo N, Suzumura A, Marunouchi T (1989) Production of tumor necrosis factor-alpha by microglia and astrocytes in culture. *Brain Res* 491:394-397.
- Saxe MD, Battaglia F, Wang JW, Malleret G, David DJ, Monckton JE, Garcia AD, Sofroniew MV, Kandel ER, Santarelli L, Hen R, Drew MR (2006) Ablation of hippocampal neurogenesis impairs contextual fear conditioning and synaptic plasticity in the dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:17501-17506.
- Schmitz C, Rhodes ME, Bludau M, Kaplan S, Ong P, Ueffing I, Vehoff J, Korr H, Frye CA (2002) Depression: reduced number of granule cells in the hippocampus of female, but not male, rats due to prenatal restraint stress. *Mol Psychiatry* 7:810-813.
- Scoville WB, Milner B (2000) Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. 1957. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 12:103-113.
- Seaberg RM, van der Kooy D (2002) Adult rodent neurogenic regions: the ventricular subependyma contains neural stem cells, but the dentate gyrus contains restricted progenitors. *J Neurosci* 22:1784-1793.
- Seabrook TJ, Jiang L, Maier M, Lemere CA (2006) Minocycline affects microglia activation, Abeta deposition, and behavior in APP-tg mice. *Glia* 53:776-782.
- Seri B, Garcia-Verdugo JM, Collado-Morente L, McEwen BS, Alvarez-Buylla A (2004) Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus. *J Comp Neurol* 478:359-378.
- Shanks N, Windle RJ, Perks PA, Harbuz MS, Jessop DS, Ingram CD, Lightman SL (2000) Early-life exposure to endotoxin alters hypothalamic-pituitary-adrenal function and predisposition to inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:5645-5650.
- Shors TJ, Miesegaes G, Beylin A, Zhao M, Rydel T, Gould E (2001) Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature* 410:372-376.

- Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, Allen R, Sidman C, Proetzel G, Calvin D, et al. (1992) Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 359:693-699.
- Sierra A, Encinas JM, Deudero JJ, Chancey JH, Enikolopov G, Overstreet-Wadiche LS, Tsirka SE, Maletic-Savatic M (2010) Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell Stem Cell* 7:483-495.
- Simard AR, Soulet D, Gowing G, Julien JP, Rivest S (2006) Bone marrow-derived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease. *Neuron* 49:489-502.
- Smith SE, Li J, Garbett K, Mirnics K, Patterson PH (2007) Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6. *J Neurosci* 27:10695-10702.
- Smith TD, Adams MM, Gallagher M, Morrison JH, Rapp PR (2000) Circuit-specific alterations in hippocampal synaptophysin immunoreactivity predict spatial learning impairment in aged rats. *J Neurosci* 20:6587-6593.
- Son JH, Chun HS, Joh TH, Cho S, Conti B, Lee JW (1999) Neuroprotection and neuronal differentiation studies using substantia nigra dopaminergic cells derived from transgenic mouse embryos. *J Neurosci* 19:10-20.
- Song H, Stevens CF, Gage FH (2002) Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature* 417:39-44.
- Spijker AT, van Rossum EF (2009) Glucocorticoid receptor polymorphisms in major depression. Focus on glucocorticoid sensitivity and neurocognitive functioning. *Ann N Y Acad Sci* 1179:199-215.
- Stavreva DA, Wiench M, John S, Conway-Campbell BL, McKenna MA, Pooley JR, Johnson TA, Voss TC, Lightman SL, Hager GL (2009) Ultradian hormone stimulation induces glucocorticoid receptor-mediated pulses of gene transcription. *Nat Cell Biol* 11:1093-1102.
- Sternberg EM (1997) Neural-immune interactions in health and disease. *J Clin Invest* 100:2641-2647.
- Stolp HB, Dziegielewska KM, Ek CJ, Potter AM, Saunders NR (2005) Long-term changes in blood-brain barrier permeability and white matter following prolonged systemic inflammation in early development in the rat. *Eur J Neurosci* 22:2805-2816.
- Streit WJ (2002) Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia* 40:133-139.

- Suhonen JO, Peterson DA, Ray J, Gage FH (1996) Differentiation of adult hippocampus-derived progenitors into olfactory neurons in vivo. *Nature* 383:624-627.
- Sullivan R, Wilson DA, Feldon J, Yee BK, Meyer U, Richter-Levin G, Avi A, Michael T, Gruss M, Bock J, Helmeke C, Braun K (2006) The International Society for Developmental Psychobiology annual meeting symposium: Impact of early life experiences on brain and behavioral development. *Dev Psychobiol* 48:583-602.
- Suzumura A, Sawada M, Yamamoto H, Marunouchi T (1993) Transforming growth factor-beta suppresses activation and proliferation of microglia in vitro. *J Immunol* 151:2150-2158.
- Szelenyi J (2001) Cytokines and the central nervous system. *Brain Res Bull* 54:329-338.
- Takahashi LK, Kalin NH, Barksdale CM, Vanden Burgt JA, Brownfield MS (1988) Stressor controllability during pregnancy influences pituitary-adrenal hormone concentrations and analgesic responsiveness in offspring. *Physiol Behav* 42:323-329.
- Thorsen P, Jensen IP, Jeune B, Ebbesen N, Arpi M, Bremmelgaard A, Moller BR (1998) Few microorganisms associated with bacterial vaginosis may constitute the pathologic core: a population-based microbiologic study among 3596 pregnant women. *Am J Obstet Gynecol* 178:580-587.
- Tikka T, Fiebich BL, Goldsteins G, Keinanen R, Koistinaho J (2001) Minocycline, a tetracycline derivative, is neuroprotective against excitotoxicity by inhibiting activation and proliferation of microglia. *J Neurosci* 21:2580-2588.
- Tikka TM, Koistinaho JE (2001) Minocycline provides neuroprotection against N-methyl-D-aspartate neurotoxicity by inhibiting microglia. *J Immunol* 166:7527-7533.
- Toni N, Laplagne DA, Zhao C, Lombardi G, Ribak CE, Gage FH, Schinder AF (2008) Neurons born in the adult dentate gyrus form functional synapses with target cells. *Nat Neurosci* 11:901-907.
- Town T, Nikolic V, Tan J (2005) The microglial "activation" continuum: from innate to adaptive responses. *J Neuroinflammation* 2:24.
- Tureyen K, Vemuganti R, Bowen KK, Sailor KA, Dempsey RJ (2005) EGF and FGF-2 infusion increases post-ischemic neural progenitor cell proliferation in the adult rat brain. *Neurosurgery* 57:1254-1263; discussion 1254-1263.
- Vallieres L, Lacroix S, Rivest S (1997) Influence of interleukin-6 on neural activity and transcription of the gene encoding corticotrophin-releasing factor in the rat brain: an effect depending upon the route of administration. *Eur J Neurosci* 9:1461-1472.

- Vallieres L, Campbell IL, Gage FH, Sawchenko PE (2002) Reduced hippocampal neurogenesis in adult transgenic mice with chronic astrocytic production of interleukin-6. *J Neurosci* 22:486-492.
- van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage FH (1999) Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:13427-13431.
- van Praag H, Shubert T, Zhao C, Gage FH (2005) Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *J Neurosci* 25:8680-8685.
- van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH (2002) Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 415:1030-1034.
- Vazquez DM, Eskandari R, Phelka A, Lopez JF (2003) Impact of maternal deprivation on brain corticotropin-releasing hormone circuits: prevention of CRH receptor-2 mRNA changes by desipramine treatment. *Neuropsychopharmacology* 28:898-909.
- Vitkovic L, Bockaert J, Jacque C (2000) "Inflammatory" cytokines: neuromodulators in normal brain? *J Neurochem* 74:457-471.
- Wang DD, Bordey A (2008) The astrocyte odyssey. *Prog Neurobiol* 86:342-367.
- Wang X, Hagberg H, Nie C, Zhu C, Ikeda T, Mallard C (2007) Dual role of intrauterine immune challenge on neonatal and adult brain vulnerability to hypoxia-ischemia. *J Neuropathol Exp Neurol* 66:552-561.
- Warner-Schmidt JL, Duman RS (2006) Hippocampal neurogenesis: opposing effects of stress and antidepressant treatment. *Hippocampus* 16:239-249.
- Whitney NP, Eidem TM, Peng H, Huang Y, Zheng JC (2009) Inflammation mediates varying effects in neurogenesis: relevance to the pathogenesis of brain injury and neurodegenerative disorders. *J Neurochem* 108:1343-1359.
- Wilkinson B, Koenigsknecht-Talboo J, Grommes C, Lee CY, Landreth G (2006) Fibrillar beta-amyloid-stimulated intracellular signaling cascades require Vav for induction of respiratory burst and phagocytosis in monocytes and microglia. *J Biol Chem* 281:20842-20850.
- Winocur G, Wojtowicz JM, Sekeres M, Snyder JS, Wang S (2006) Inhibition of neurogenesis interferes with hippocampus-dependent memory function. *Hippocampus* 16:296-304.
- Wong RW, Guillaud L (2004) The role of epidermal growth factor and its receptors in mammalian CNS. *Cytokine Growth Factor Rev* 15:147-156.

- Wu DC, Jackson-Lewis V, Vila M, Tieu K, Teismann P, Vadseth C, Choi DK, Ischiropoulos H, Przedborski S (2002) Blockade of microglial activation is neuroprotective in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson disease. *J Neurosci* 22:1763-1771.
- Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei XF, Achong MK (1998) IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest* 101:311-320.
- Yan E, Castillo-Melendez M, Nicholls T, Hirst J, Walker D (2004) Cerebrovascular responses in the fetal sheep brain to low-dose endotoxin. *Pediatr Res* 55:855-863.
- Yan Q, Zhang J, Liu H, Babu-Khan S, Vassar R, Biere AL, Citron M, Landreth G (2003) Anti-inflammatory drug therapy alters beta-amyloid processing and deposition in an animal model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 23:7504-7509.
- Yang SZ, Zhang LM, Huang YL, Sun FY (2003) Distribution of Flk-1 and Flt-1 receptors in neonatal and adult rat brains. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 274:851-856.
- Yoon BH, Kim CJ, Romero R, Jun JK, Park KH, Choi ST, Chi JG (1997) Experimentally induced intrauterine infection causes fetal brain white matter lesions in rabbits. *Am J Obstet Gynecol* 177:797-802.
- Zhao C, Deng W, Gage FH (2008) Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 132:645-660.
- Zhao C, Teng EM, Summers RG, Jr., Ming GL, Gage FH (2006) Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *J Neurosci* 26:3-11.
- Zhu HJ, Burgess AW (2001) Regulation of transforming growth factor-beta signaling. *Mol Cell Biol Res Commun* 4:321-330.
- Ziv Y, Avidan H, Pluchino S, Martino G, Schwartz M (2006a) Synergy between immune cells and adult neural stem/progenitor cells promotes functional recovery from spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:13174-13179.
- Ziv Y, Ron N, Butovsky O, Landa G, Sudai E, Greenberg N, Cohen H, Kipnis J, Schwartz M (2006b) Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. *Nat Neurosci* 9:268-275.