



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL IPN
UNIDAD SUR**

Departamento de Farmacobiología

**“POSIBLES MECANISMOS MOLECULARES DEL CONTROL DE LA
EXPRESIÓN DEL FENOTIPO NEUROTRANSMISOR DE LAS CÉLULAS
GRANULARES DEL HIPOCAMPO”.**

Tesis que presenta

Licenciada en biología molecular, Dafne Itzel Domínguez Sánchez

Para obtener el grado de

Maestra en ciencias

en la especialidad de

Neurofarmacobiología y Terapéutica Experimental

Director de tesis:

Dr. Rafael Gutiérrez Aguilar

Agradecimientos

A CONACYT por su apoyo económico para la realización de este proyecto.

Al Dr. Rafael Gutiérrez Aguilar por recibirme en el proyecto de investigación de plasticidad fenotípica.

A la Dra. Gisela Gómez Lira por su apoyo e interés en el desarrollo de este trabajo.

Dedicatoria

A mis padres Pablo Domínguez Hernández y Carolina Sánchez Díaz por el apoyo incondicional.

A Santos Arturo López Guzmán por ser un impulso durante el desarrollo y la obtención del grado de maestra en ciencias.

índice

I. Introducción	11
I.i. Formación hipocampal	11
I.ii. Células Granulares	12
I.iii. Co-liberación de GABA y Glutamato de células granulares	12
I.iv. Liberación de GABA y glutamato de las células granulares durante el desarrollo.	15
I.v. Factores de transcripción asociados al fenotipo GABAérgico y Glutamatérgico	17
II. Justificación	24
III. Hipótesis	25
IV. Objetivos	26
V. Materiales y métodos	27
V.i Cultivo Celular	27
V. ii Electrofisiología	28
V.iii Tratamiento de las células granulares <i>in vitro</i>.	28

V.iv RT-PCR de célula única	29
V.v. Inmunofluorescencia	30
VI. Resultados	31
VI.i. Caracterización electrofisiológica de células en cultivo.	31
VI.ii. Expresión de los factores de transcripción en células del cultivo celular.	33
VI.iii. Expresión de los factores de transcripción en células del hipocampo.	45
V.iv. Resumen de resultados	49
VI. Discusión de resultados	50
VII. Conclusión	56
VIII. Perspectivas	58
IX. Referencias	59

Índice de figuras

Figura 1. Esquema de la formación hipocampal.	11
Figura 2. Respuestas sinápticas de las células piramidales a la estimulación de las fibras musgosas.	13
Figura 3. Respuestas sinápticas glutamatérgicas y GABAérgicas de las células piramidales por la estimulación de las fibras musgosas en donde se presenta la co-liberación. Esquema de PPSE y PPSI.	14
Figura 4. Esquema de PPSI monosináptico a diferentes días postnatales.	16
Figura 5. Registro electrofisiológico de patch clamp en la configuración de célula completa de una célula granular, piramidal y una interneurona	32
Figura 6. Gel de agarosa al 1.5% de RT-PCR de célula única para el factor de transcripción prox1.	33
Figura 7. Inmunofluorescencia del factor de transcripción Prox1.	33
Figura 8. Geles de agarosa al 1.5% de RT-PCR de célula única para los factores de transcripción Tlx1, Lbx1y Pax2.	35
Figura 9. Inmunofluorescencia del cultivo celular para Prox1 y GAD67.	36
Figura 10. Inmunofluorescencia de cultivo celular para el factor de transcripción Tlx1.	38

Figura 11. Inmunofluorescencia del factor de transcripción Lbx1.	40
Figura 12. Inmunofluorescencia del factor de transcripción Pax2.	42
Figura 13. Inmunofluorescencia de GAD67/Tlx1, GAD67/Lbx1 y GAD67/Pax2.	44
Figura 14. Inmunofluorescencia del factor de transcripción Tlx1 de tejido hipocampal.	46
Figura 15. Inmunofluorescencia del factor de transcripción Lbx1 de tejido hipocampal.	47
Figura 16. Inmunofluorescencia del factor de transcripción Pax2 de tejido hipocampal.	48

Índice de tablas

Tabla 1. Factores de transcripción que determinan la identidad neuronal.	17
Tabla 2. Oligonucleótidos	29
Tabla 3. Resumen de resultados	49

Lista de abreviaturas

AK	Ácido kaínico
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GAD	Glutamato Descarboxilasa
GD	Giro Dentado
GFP	Proteína verde fluorescente
MPM	Marcador de peso molecular
SNC	Sistema nervioso central
VGAT	Transportador vesicular de glutamato
VGlut	Transportador vesicular de GABA

Abstract

The granule cells of the dentate gyrus express a GABAergic phenotype during first 5 postnatal days after which a dual glutamatergic / GABAergic phenotype emerges. The GABAergic phenotype is turned off at 21-22 days old, whereby a purely glutamatergic phenotype remains. In addition, the glutamatergic / GABAergic phenotype can be expressed in adulthood after induction of seizures. A preliminary observation in our laboratory was that the transcription factor TLx1 (associated with the glutamatergic phenotype) decreases its expression in the dentate gyrus (GD) dissected after exposure to kainic acid and the factors Lbx1 and Pax2 (which have been associated with the GABAergic phenotype) increase their expression suggesting that these transcription factors could be associated with the change of phenotype in granular cells. In this work we analyze in co-cultures of cells of the GD and the CA3 region, the expression of the mentioned transcription factors, in granular cells identified by expression of Prox1 in control conditions and after their exposure to KA. Using single-cell RT-PCR and immunofluorescence, we determined that granular cells express the transcription factors Tlx1 (associated with the glutamatergic phenotype), Lbx1 and Pax2 (associated with the GABAergic phenotype) in cell culture in both conditions. We conclude that the hyperexcitability produced by KA does not modify their expression, thus, establishing that they are not involved in their neurotransmitter phenotype specification.

Resumen

Las células granulares del giro dentado expresan un fenotipo GABAérgico hasta los 5 días de edad, un fenotipo dual glutamatérgico/GABAérgico hasta los 22-23 días, cuando desaparece el GABAérgico pero permanece el fenotipo glutamatérgico en edad adulta. Este fenotipo dual glutamatérgico/GABAérgico puede expresarse en la edad adulta después de la inducción de crisis convulsivas. Estudios previos de nuestro laboratorio mostraron que el factor de transcripción Tlx1 (asociado al fenotipo glutamatérgico) disminuye su expresión en el giro dentado (GD) disectado después de la exposición a ácido kaínico y los factores Lbx1 y Pax2 (que se han asociado al fenotipo GABAérgico) incrementan su expresión, lo que sugiere que estos factores de transcripción pudieran estar asociados al cambio de fenotipo en las células granulares. Por tanto, en este trabajo se analizó, en co-cultivos de células del GD y de la región de CA3, la expresión de los factores de transcripción mencionados, en células granulares identificadas electrofisiológicamente y por la expresión de Prox1, cuando son glutamatérgicas, y cuando se induce la expresión de los marcadores del fenotipo GABAérgico con ácido kaínico. Mediante RT-PCR de célula única e inmunofluorescencia se determinó que las células granulares expresan los factores Tlx1 (asociado al fenotipo glutamatérgico), Lbx1 y Pax2 (asociados al fenotipo GABAérgico) en cultivo celular, en condiciones basales y después del tratamiento con AK. Estos factores son identificados por primera vez en células hipocampales y concluimos que su expresión no es modulada por la hiperexcitabilidad producida por AK, por lo que no participan en la especificación de su fenotipo neurotransmisor.

I. Introducción

I.i. Formación hipocampal

La formación hipocampal es una estructura del sistema límbico implicada en procesos de aprendizaje y memoria, y en ella convergen daños anatomofuncionales en tres patologías del sistema nervioso central (SNC): la epilepsia, la enfermedad Alzheimer y la esquizofrenia. Esta estructura está conformada por el *subiculum*, *presubiculum*, *parasubiculum*, la corteza entorrinal, el giro dentado y el hipocampo [Andersen *et al*, 2007] (figura 1).

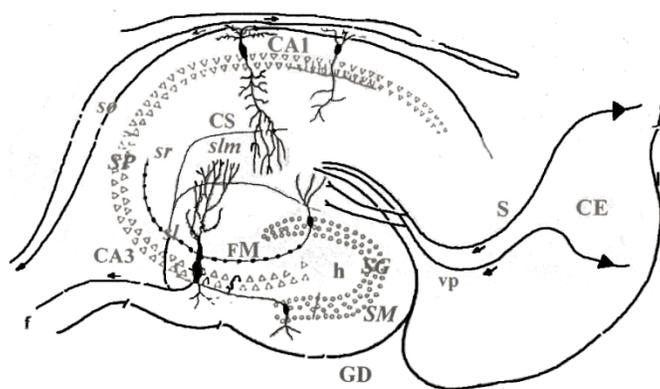


Figura 1. Esquema de la formación hipocampal. Muestra la distribución de las regiones y capas celulares. CE, corteza entorrinal; S, *subiculum*; vp, vía perforante; GD, giro dentado; SM, *stratum moleculare*; SG, *stratum granulare*; h, *hilus*; FM, fibras musgosas; SP, *stratum pyramidae*; sl, *stratum lucidum*; sr, *stratum radiatum*; slm, *stratum lacunosum-moleculare*; so, *stratum oriens*; CS, colaterales de Schaffer [O'Keefe, 1978].

El giro dentado controla la transferencia de información sensorial proveniente de la corteza entorrinal hacia el hipocampo, es decir, es el primer paso del

procesamiento y filtro de la información que concluirá en la formación de memorias episódicas y declarativas [Spiers, 2012]. Esta estructura consta de tres capas; el *stratum moleculare* (SM), donde se ramifica el árbol dendrítico de las células granulares; el *stratum granulare* (SG) que contiene los somas de las células granulares y el *hilus* (H), el cual contiene interneuronas y células musgosas [Andersen *et al*, 2007] (figura 1).

I.ii. Células Granulares

Las células granulares son el principal tipo celular del giro dentado [Amaral y Lavenex, 2007] y sus axones no mielinizados, conocidos como fibras musgosas [Lyndsay y Scheibel, 1981; Johnston y Amaral, 1998; Henze y *et al.*, 2000], constituyen la proyección glutamatérgica a la región de CA3 del hipocampo de rata adulta. Estas neuronas son glutamatérgicas caracterizadas por contener marcadores como el glutamato, la enzima responsable de sintetizar este neurotransmisor, el transportador vesicular de glutamato (VGLUT-1) y el transportador membranal EAAT3/EAAC1 [Crawford y Connor, 1973, Ni *et al.*, 1994; Bellocchino *et al.*, 1998; Fremeau *et al*, 2002; Gómez-Lira *et al.*, 2005]. Sin embargo, se ha descrito que las células granulares expresan de manera transitoria marcadores del fenotipo GABAérgico, lo que las hace capaces de co-liberar glutamato y GABA durante el desarrollo o, en el adulto, por el incremento de excitabilidad [Sandler y Smith, 1991; Sloviter, *et al.*, 1996; Gutiérrez 2000, 2001; Lamas *et al.*, 2001; Walker, 2001; Gutiérrez, 2002; Gutiérrez *et al.*, 2003; Gómez-Lira *et al.*, 2005; Safiulina *et al.*, 2006].

I.iii. Co-liberación de GABA y Glutamato de células granulares

Sandler y Smith [1991] y Sloviter, *et al.* [1996] mostraron que la enzima responsable de sintetizar GABA, la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD, por sus siglas en inglés) y el aminoácido GABA se encuentran presentes en células granulares del giro dentado de la rata y de primates. También se reportó que las células granulares sobreexpresan transitoriamente el ARNm de GAD y la proteína

misma después de crisis convulsivas [Sandler y Smith, 1991; Sloviter, *et al.*, 1996; Lehmann *et al.*, 1996; Schwarzer y sperk, 1995]. Sin embargo, ninguno de estos reportes atribuyó a las células granulares la propiedad de liberar GABA.

Las células piramidales de la zona CA3 normalmente responden a la estimulación del giro dentado con un potencial post-sináptico excitador (PPSE) monosináptico seguido de potenciales post-sinápticos inhibidores (PPSI). En presencia de bloqueadores de receptores a glutamato, NBQX (antagonista de receptores no NMDA) y APV (antagonista de receptores tipo NMDA) no se evocan las respuestas postsinápticas [Gutiérrez, 2002]. Esto se debe a que el PPSE se origina por la activación directa de los receptores a glutamato que se localizan en las células piramidales, mientras que los PPSI son debidos a la activación directa de las fibras musgosas de las interneuronas de la zona CA3 que, a su vez liberan GABA sobre las células piramidales y activan receptores GABAérgicos, GABAA y GABAB; estas respuestas son, por tanto, polisinápticas (Figura 2) [Andersen *et al*, 2007].

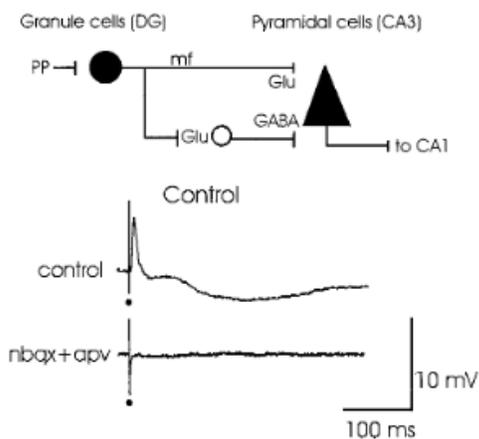


Figura . Respuestas sinápticas de las células piramidales a la estimulación de las fibras musgosas. El potencial posináptico excitatorio de células piramidales se debe a la acción del glutamato proveniente de las fibras musgosas y el PPSI por la acción de GABA proveniente de interneuronas activadas por las fibras musgosas. También muestra el bloqueo del PPSE y el PPSI por la acción de NBQX y APV[Gutiérrez, 2002]:

tomado [Gutiérrez, 2002].

Sin embargo, al realizar registros intracelulares de las células piramidales de rebanadas de hipocampo provenientes de ratas con crisis convulsivas inducidas con el método de kindling, se observó que después del bloqueo de la transmisión excitadora con NBQX y APV, la estimulación de las fibras musgosas no evoca el PPSE pero sí un PPSI. Este PPSI tiene la misma latencia que el PPSE que fue bloqueado, lo que indica que es monosináptico y puede ser bloqueado con el antagonista a receptores GABAA, bicuculina (Figura 3). En trabajos posteriores se estableció que la liberación de GABA de las fibras musgosas no se debe a que las ratas sean epilépticas sino que: 1) es dependiente del desarrollo; 2) puede inducirse después de provocar una crisis convulsiva con pentilenetetrazol *in vivo*; 3) puede inducirse en rebanadas tomadas de ratas control aplicando estimulación repetitiva tipo LTP; 4) puede inducirse en rebanadas tomadas de ratas control por incubación con BDNF *in vitro*; 5) el cambio de fenotipo depende de síntesis de proteínas y 6) la co-liberación de glutamato y GABA puede originarse de botones sinápticos únicos [Beltrán y Gutiérrez, 2012].

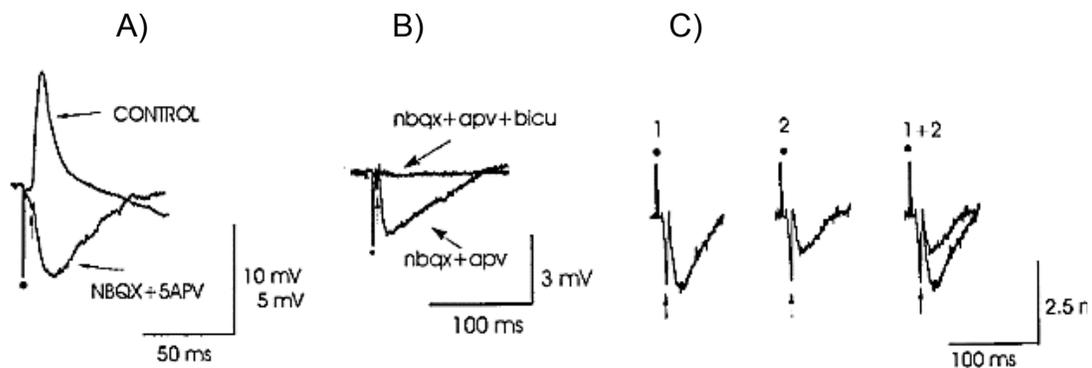


Figura 3. Respuestas sinápticas glutamatérgicas y GABAérgicas de las células piramidales por la estimulación de las fibras musgosas en donde se presenta la co-liberación. Esquema de PPSE y PPSI. A. Sobreposición del EPSP y del IPSP aislado farmacológicamente donde se observa que tienen latencias similares. B. El PPSI aislado con bloqueadores de glutamato (NBQX y APV) puede ser bloqueado con bicuculina. C. El PPSI puede deprimirse con el agonista de mGluR-3 L-AP 4. 1.- PPSI aislado; 2.- Efecto de L-AP4 sobre PPSI; 3.- Comparación entre 1 y 2 [Gutiérrez, 2000].

Además de la extensa caracterización funcional de la co-liberación de glutamato y GABA de las fibras musgosas (Gutiérrez, 2002: Beltrán y Gutiérrez; Galván y Gutiérrez), el mismo grupo determinó la presencia de los mecanismos de vesiculación de GABA en las fibras musgosas (Lamas *et al.*; Gómez-Lira *et al.*; Zander *et al.*)

Sumado a lo anterior, Gutiérrez [2000] demostró que el PPSI se deprime por L-AP 4 (Figura 3 C), un agonista de los receptores metabotrópicos del grupo III (mGluR3) expresados selectivamente en las terminales de las fibras musgosas [Manzoni *et al.*, 1995]. Esto constituye la primera evidencia de que las fibras musgosas pueden liberar GABA hacia las células piramidales de CA3 después de la inducción de crisis convulsivas.

Posteriormente, Lamas *et al.* [2001] demostró la expresión de ARNm del transportador vesicular de GABA (VGAT) en el giro dentado, después de la estimulación repetitiva de esta estructura y evaluó la expresión del ARNm del transportador en sinaptosomas de fibras musgosas. Sus resultados mostraron un incremento en la expresión del ARNm de VGAT y su presencia en sinaptosomas de fibras musgosas de ratas con crisis convulsivas generalizadas inducidas con PTZ o *kindling*. Además, Ramírez *et al.* [2001] demostró que las células granulares del giro dentado expresan GAD67 después de crisis convulsivas inducidas con el método de *kindling* de manera transitoria.

I.iv. Liberación de GABA y glutamato de las células granulares durante el desarrollo.

Gutiérrez *et al.* [2003] mostró que a los 6 días postnatales la activación de las células granulares evoca un potencial monosináptico despolarizante en las células piramidales que es bloqueado parcialmente por antagonistas de los receptores glutamatérgicos (NBQX y APV) y completamente con bicuculina (antagonista de receptores GABAérgicos). Sumado a esto, demostró que a los 10 días postnatales se puede observar tanto la liberación de glutamato como la de GABA de las fibras musgosas hacia las células piramidales de CA3. En el registro intracelular, se observó la presencia de un PPSE que es bloqueado con NBQX y APV, y un PPSI

monosináptico que se puede bloquear con bicuculina. Este fenómeno de co-liberación de GABA y glutamato de las fibras musgosas se puede observar hasta los 22-23 días postnatales (Figura 4).

También se determinó que la expresión del ARNm de VGAT es detectado a los 6, 10 y 15 días postnatales y desaparece en el tejido obtenido de ratas adultas. Sin embargo, puede ser inducido por la activación de los receptores de kaínato y TrKB de células granulares en cultivo [Gutiérrez et al., 2003]. Un análisis densitométrico de la relación del ARNm de VGAT/ARNm de VGLUT mostró que el BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro) induce una mayor expresión del ARNm de VGAT en comparación con el ácido kaínico (AK) [Gómez et al., 2005].

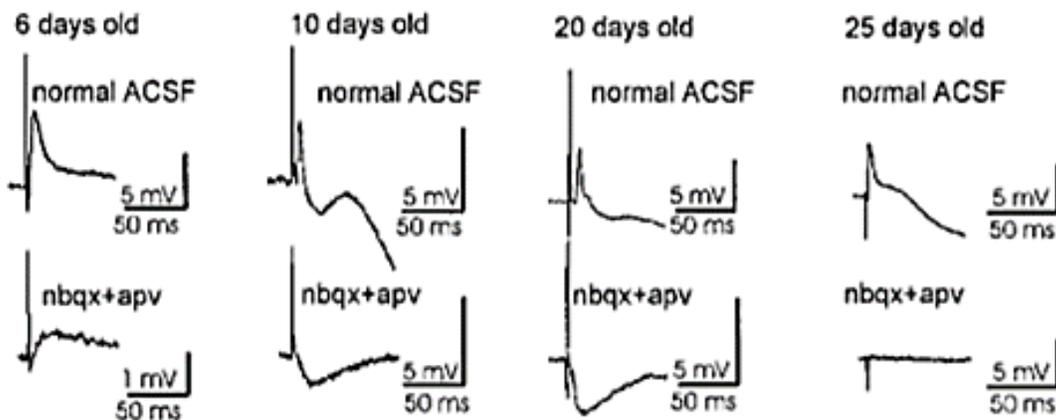


Figura 4. Esquema de PPSI monosináptico a diferentes días postnatales (6, 10, 20, 25). Se puede observar que a los 6 días el PPSE no es bloqueado con NBQX y APV además se muestra que a los 25 días el PPSI es bloqueado con NBQX y APV lo cual no se observa a los diez y 20 días [Gutiérrez et al., 2003].

Como ya se mencionó, durante las primeras semanas de vida las células granulares expresan un fenotipo dual (GABA/glutamato) que posteriormente se pierde en ratas adultas, conservándose solo el fenotipo glutamatérgico [Gutiérrez,

2003]. Además, se ha demostrado que este fenotipo dual en las ratas adultas se puede volver a expresar y es dependiente de la actividad [Gutiérrez, 2002].

I.v. Factores de transcripción asociados al fenotipo GABAérgico y Glutamatérgico

Los factores de transcripción son los responsables de la especificación de la identidad neuronal durante el desarrollo celular. La expresión conjunta de algunos factores de transcripción pertenecientes a las familias bHLH, homeobox, algunos factores de la familia AP-1, entre otros, resulta en su identidad neuronal [Paina *et al.*, 2011; Ooi y Woos, 2008] (ver tabla 1). Por ejemplo, Prox-1 (factor de transcripción de tipo homeobox, homólogo al gen prospero en *Drosophila*) se expresa de manera constitutiva en el linaje de las células granulares del giro dentado [Pleasure *et al.*, 2000; Roybon *et al.*, 2009]. La eliminación post-mitótica de Prox-1 genera la pérdida de identidad de las células granulares, ya que induce la diferenciación terminal de los progenitores de células de CA3 confiriendo un fenotipo de célula piramidal, mientras que la sobreexpresión de Prox-1 induce la diferenciación terminal hacia células granulares [Iwano *et al.*, 2012].

Tabla 1. Factores de transcripción que determinan la identidad neuronal.

Factores que determinan la identidad de las células granulares	que la	Prox1 [Pleasure <i>et al.</i> , 2000; Roybon <i>et al.</i> , 2009; Iwano <i>et al.</i> , 2012]. ND1 [Lee <i>et al.</i> , 1995; Pleasure <i>et al.</i> , 2000; Bertrand <i>et al.</i> , 2002; Kuwabara <i>et al.</i> , 2009].
Factores que determinan el fenotipo glutamatérgico	que el	Tlx1 [Dear <i>et al.</i> , 1993; Maconochie <i>et al.</i> , 1996; Cheng <i>et al.</i> , 2004] Ngn [Ma <i>et al.</i> , 1996; Kim <i>et al.</i> , 2011; Pérez <i>et al.</i> , 1999; Fode <i>et al.</i> , 2000; Parras <i>et al.</i> , 2002; Britz <i>et al.</i> , 2006; Kovach <i>et al.</i> , 2013; Schuurmans <i>et al.</i> , 2004]
Factores que determinan el fenotipo GABAérgico	que el	c-Jun [Marek <i>et al.</i> , 2010]. Lbx1 [Krüger <i>et al.</i> , 2002; Müller <i>et al.</i> , 2002; Cheng <i>et al.</i> , 2004].

	<p>Pax2 [Marichic & Herrup, 1999; Cheng et al., 2004; Guo et al., 2012; Huang et al; 2008].</p> <p>Mash1 [Parras et al, 2004; 2007; Casarosa et al., 1999; Grimaldi et al., 2009].</p> <p>Dlx1 [Kraus y Lufkin, 2006; Paina et al., 2011; Cobos et al, 2005].</p> <p>Ptf1a [Hoshino et al., 2005; Guo et al., 2012].</p>
--	--

Los cambios en la identidad neurotransmisora, así como la co-liberación de diversos neurotransmisores son una característica común durante el desarrollo del sistema nervioso y algunas condiciones patológicas recrean este fenómeno [Gutiérrez 2003; 2005; Borondinsky *et al.*, 2014]. Sumado a esto se han identificado factores de transcripción involucrados en la especificación de la identidad neurotransmisora. Por ejemplo, en el sistema nervioso central y periférico de mamíferos se han descrito varios factores de transcripción que determinan la identidad de las células glutamatérgicas o GABAérgicas (tabla 1).

Factores de transcripción implicados en la especificación del fenotipo glutamatérgico

Neurogenina 1 (Ngn)

La Ngn1 es un factor de transcripción esencial para la diferenciación celular que se expresa durante el desarrollo embrionario y la especificación de células piramidales y granulares en la formación hipocampal.

La mayor parte de los linajes celulares que expresan Ngn1 son restringidos hacia el fenotipo glutamatérgico [Kim *et al.*, 2011] y la sobreexpresión de este factor induce la formación de células glutamatérgicas (DI2) en la médula espinal [Pérez *et al.*, 1999].

Las neurogeninas en conjunto con Tlx y Pax6 son requeridas para inducir la especificación glutamatérgica y para reprimir la expresión de marcadores de fenotipo GABAérgico [Schuurmans *et al.*, 2004].

Tlx

Los genes de la familia Tlx codifican para homeoproteínas, que se caracterizan por tener la secuencia homeobox (180 pb) [Dear *et al.*, 1993]. Las homeoproteínas están involucradas en procesos como la regulación del crecimiento y la diferenciación celular en el desarrollo de vertebrados, determinación de la identidad de segmentos o el sitio de los órganos, la identidad celular y la proliferación [Maconochie *et al.*, 1996].

Los genes homeobox Tlx1 y Tlx3 actúan como “conmutadores” genéticos que, en el desarrollo, seleccionan el fenotipo glutamatérgico sobre el GABAérgico en la médula espinal de ratón. Además, Tlx3 es requerido para la especificación de las neuronas glutamatérgicas y su sobreexpresión es suficiente para suprimir la diferenciación GABAérgica. El transportador vesicular de glutamato VGLUT2 no se expresa en la médula espinal de ratones deficientes en Tlx1/3. Por el contrario, marcadores como Pax2 (factor de transcripción necesario para la diferenciación GABAérgica), GAD65/67 y VGAT se sobreexpresan en estos animales, lo cual indica que los factores Tlx suprimen la diferenciación GABAérgica [Cheng *et al.*, 2004].

Factores de transcripción implicados en la especificación del fenotipo GABAérgico

Mash1

Mash1 es un factor de transcripción que se expresa en subgrupos de precursores neuronales en el sistema nervioso [Lo *et al.*, 1991; Ma *et al.*, 1997]. En el telencéfalo tiene tres funciones principales: promover la proliferación, inducir el fenotipo GABAérgico o el de oligodendrocitos [Parras *et al.*, 2004; 2007]. Este factor es requerido para la producción de una subpoblación de neuronas GABAérgicas en la neocorteza y el cuerpo estriado. La pérdida de Mash1 reduce drásticamente el número de interneuronas GABAérgicas corticales y estriales [Casarosa *et al.*, 1999]. Además, se expresa en la médula espinal donde es requerido para la generación de interneuronas [Parras *et al.*, 2004; 2007].

Dlx1

Los genes Dlx participan en el desarrollo craneofacial, de extremidades y del SNC temprano y tardío [Bendall & Abate-Shen, 2000]. En el SNC de mamíferos, se expresan los genes Dlx1/2/5/6 que participan en el control del desarrollo de neuronas GABAérgicas del prosencéfalo [Kraus & Lufkin, 2006]. Los factores de transcripción Dlx promueven la diferenciación de progenitores GABAérgicos del bulbo olfatorio de ratón al regular la expresión de la glicoproteína Wnt5a, la cual favorece la diferenciación de interneuronas olfatorias GABAérgicas de manera exógena [Paina *et al.*, 2011].

Dlx1 puede ser activado por Mash1 y al inducir la transcripción de Dlx5/6, éstos inducen la transcripción de la enzima GAD65/67 en cultivos de corteza cerebral de ratón en etapa embrionaria [Stühmer *et al.*, 2002; Schuurmans *et al.*, 2004]. Ratones Dlx1/2 *-/-* pierden la mayoría de las interneuronas GABAérgicas neocorticales, hipocampales y del bulbo olfatorio debido a defectos en la maduración y migración de neuronas desde la zona subventricular de los ganglios basales al telencéfalo basal [Potter *et al.*, 2009]. Además, Cobos *et al.* [2005] demostraron que ratones adultos Dlx1*-/-* desarrollan una pérdida selectiva de las interneuronas GABAérgicas que expresan calretinina, neuropéptido Y y somatostatina en la corteza cerebral.

Lbx1

Los genes Lbx tienen funciones esenciales durante el desarrollo, incluyendo la especificación neural y del mesodermo. Se han identificado dos genes, Lbx1 y Lbx2, que participan en el desarrollo del músculo y el SNC (en el ratón y en el humano). Lbx1 es un miembro de la familia de genes Ladybird-like homeobox y es homólogo al gen en *Drosophila* ladybird [Jagla *et al.*, 1995; Dietrich *et al.*, 1998]. El gen Lbx1 humano codifica para una proteína de 280 aminoácidos que muestra 94% de identidad con la proteína en ratón [Jagla *et al.*, 1995]. Durante la etapa embrionaria temprana, Lbx1 es requerido para la especificación de diversas poblaciones de interneuronas GABAérgicas de la médula espinal dorsal, así como para el cierre del tubo neural [Krüger *et al.*, 2002]. En etapas tardías de la

neurogénesis, la expresión de Lbx1 en la región dorsal de la médula espinal, determina la diferenciación neuronal GABAérgica en un subgrupo de neuronas post-mitóticas conocidas como clase B. [Müller *et al.*, 2002].

Cheng *et al.* [2005] demostraron que el gen homeobox Lbx1 determina el destino celular GABAérgico en la médula espinal dorsal en la etapa embrionaria temprana del ratón. En animales que no expresan Lbx1, las neuronas que debieran ser GABAérgicas son glutamatérgicas, mientras que al sobreexpresar este factor, las células adquieren el fenotipo neurotransmisor GABAérgico.

Se ha mostrado que el factor de transcripción Tlx antagoniza el efecto de la expresión de Lbx1, lo que dirige la diferenciación celular hacia la formación de neuronas glutamatérgicas [Cheng *et al.*, 2005].

Pax2

Se ha identificado en mamíferos un total de nueve genes Pax, que conservan una secuencia de 384 pares de bases. Los genes Pax son proto-oncogenes y su desregulación contribuye a la formación de tumores [Stuart *et al.*, 1994]. Pax2 es requerido para regular la sobrevivencia celular y la morfogénesis de los tejidos en desarrollo [Fletcher *et al.*, 2005]. Se expresa en neuronas GABAérgicas del cerebelo durante el desarrollo [Marichic & Herrup, 1999], y en la región dorsal de la médula espinal [Cheng *et al.*, 2004; Guo *et al.*, 2012]. Huang *et al.* [2008] encontraron que la expresión ectópica de Pax2, además de promover la diferenciación GABAérgica en médula espinal de pollo, incrementa la expresión de la enzima GAD67.

Además, Cheng *et al.* [2004] reportaron una eliminación casi completa de la expresión de GAD67 en el cuerno dorsal de la médula espinal de ratones Pax2 ^{-/-}, así como una reducción de los marcadores GABAérgicos GAD65 y VGAT, pero no una modificación del marcador glutamatérgico VGLUT1, lo cual podría indicar que este factor regula la especificación del fenotipo GABAérgico. Estos autores también reportaron que Pax2 puede ser reprimido por el factor Tlx, lo cual induce la expresión del fenotipo glutamatérgico.

c-Jun

c-Jun pertenece a la familia de factores de transcripción AP-1, que son regulados por múltiples señales incluyendo citosinas, factores de crecimiento, hormonas polipeptídicas y estímulos como estrés físico y químico.

c-Jun participa en la diferenciación neuronal y la sobrevivencia durante el desarrollo embrionario y postnatal [Mellström *et al.*, 1991] La expresión de c-Jun incrementa durante las convulsiones, la adicción, el dolor y en eventos de potenciación y depresión a largo plazo, así como en la formación de memorias [Herdegen *et al.*, 1991] Tras la actividad convulsiva, la fosforilación de c-Jun incrementa y una vez que es fosforilado, induce la transcripción de sus genes blanco [Hagemann & Blank, 2001].

Marek, *et al.* [2010] encontraron que en neuronas de la médula espinal de *Xenopus tropicalis* en desarrollo, c-Jun fosforilado, se une a una variante de la región consenso CRE y reprime la transcripción de Tlx1/3 cuando hay un incremento de actividad neuronal; esto se asocia a un incremento del número de células que expresan marcadores de fenotipo GABAérgico.

Los mecanismos moleculares que controlan el cambio de fenotipo de las células granulares no se conocen; sin embargo, en un trabajo previo del laboratorio se observaron cambios en la expresión de factores de transcripción asociados a la identidad de los fenotipos GABAérgico o glutamatérgico [Franco; 2016]. En este trabajo se obtuvo el ARNm del giro dentado de ratas de diferentes edades, y se observó que durante el desarrollo y después de inducir crisis convulsivas los factores TLx1, Lbx1 y Pax2 modifican su expresión significativamente.

El ARNm del factor de transcripción Tlx1 disminuye a lo largo del desarrollo, y la inducción de crisis convulsivas produce una disminución significativa con respecto a su control. Mientras que Lbx1 y Pax2 disminuyen su expresión a lo largo del desarrollo en el giro dentado, la incrementan después de la inducción de crisis convulsivas en el adulto [Franco; 2016]. Aunque estos resultados sugieren que Tlx1, Lbx1 y Pax2 están asociados con los cambios en el fenotipo de las células

granulares, en dichos ensayos se utilizaron preparaciones del giro dentado, que contenían tanto células granulares como interneuronas y axones de otros tipos celulares.

II. Justificación

Previamente se hizo la observación, en nuestro laboratorio, que los factores Tlx1 (que determina el fenotipo glutamatérgico), Lbx1 y Pax2 (que determinan el fenotipo GABAérgico) están expresados en el GD disectado del hipocampo. Sin embargo, el GD disectado contiene, adicionalmente a las células granulares, varios tipos de interneuronas. Por ello es necesario determinar en células

granulares identificadas, los factores de transcripción que expresan en condiciones control, cuando son glutamatérgicas, y cuando se induce la expresión de la enzima GAD67, que es un marcador del fenotipo GABAérgico. Por ello, en este trabajo determinamos la expresión de los factores de transcripción Tlx1, Lbx1 y Pax2, mediante RT-PCR de célula única e inmunofluorescencia, en células granulares cultivadas y fisiológicamente caracterizadas.

III. Hipótesis

Las células granulares glutamatérgicas en cultivo expresan exclusivamente Tlx1, el factor de transcripción asociado a la expresión del fenotipo glutamatérgico.

La exposición de células granulares glutamatérgicas en cultivo a ácido kaínico induce la expresión de factores de transcripción de los que depende la expresión

del fenotipo GABAérgico (Lbx1 y Pax2) y de la GAD67 (enzima característica del fenotipo GABAérgico).

IV. Objetivos

Analizar la expresión de la enzima GAD67 en células granulares en cultivo, en respuesta a tratamiento con ácido kaínico.

Analizar mediante la técnica de RT-PCR de célula única, la expresión de ARNm de Tlx1, Lbx1 y Pax2 en las células granulares maduras en cultivo.

Analizar mediante inmunofluorescencia la expresión de las proteínas Tlx1, Lbx1 y Pax2 en las células granulares en respuesta al tratamiento con ácido kaínico

V. Materiales y métodos

V.i Cultivo Celular.

Los cultivos de células hipocampales se realizaron como fue descrito por Osorio et al. [2013]. Se realizó la disección del giro dentado de ratas transgénicas de la cepa

Sprague-Dawley GFP+ que (expresa la proteína verde fluorescente [GFP] de forma constitutiva) de 1 a 3 días de edad y de la zona CA3 de ratas nativas de la cepa *Sprague-Dawley*. El tejido se colocó en una caja de *Petri* con solución salina balanceada de Hank (SSBH). El tejido se incubó en papaína al 0.1% en SSBH a 37°C durante 10 minutos y posteriormente se realizaron lavados con SSBH. El tejido se trituró suavemente en medio de cultivo (mediante pipeteo) hasta obtener células disociadas y estas se filtraron con una malla de Nylon de 40 µm. Se colocó una gota de la suspensión celular filtrada en un cubreobjetos de vidrio de 10 x 10 mm² pretratados con *Matrigel* (0.1 mg/mL, *BD Biosciences*). Los cubreobjetos se colocaron en una caja de *Petri* y se incubaron en carbógeno (95% oxígeno y 5% de dióxido de carbono) durante 2 horas a 37°C. Se agregó 2 mL del medio de cultivo (medio mínimo esencial de Eagle suplementado con 100 µg/ml de transferrina humana; 25 µg/ml de insulina; 2 mM *glutamax*; suero fetal bovino al 10%; todo lo anterior de *Gibco*) y 24 horas después se disminuyó la concentración de suero fetal bovino al 5% y se adicionó citosina-p-arabinofuranósido (4 µM, *Sigma*) y el suplemento B27 al 2% (*Gibco*). Se cambió la mitad del medio de cultivo dos veces por semana.

V. ii Electrofisiología.

Las células en cultivo maduras (21 días *in vitro*) se colocaron en un microscopio invertido y se registraron con la técnica de *patch clamp* en la configuración de célula completa. Durante el registro se mantuvo un flujo constante de solución extracelular (120 mM de NaCl, 2.5 mM de KCl, 2 mM de MgCl, 3 mM CaCl₂, 0.8 mM NaH₂PO₄, 26 mM NaHCO₃ y 10 mM de glucosa) filtrada con una membrana

de 0.22 μm (*MILLEX GV Filter Unit; SLGVV255F*) y saturada con carbógeno. Se utilizaron pipetas de borosilicato (1.0 mm de diámetro interno, *World precision Instruments, Sarasota, FL*) pretratadas con *Sigmacote (SIGMA; SL2)*, con una resistencia de 3.5 a 5 $\text{M}\Omega$ (*Puller Flaming-Brown P-97; Sutter Instrument Company, Novato, CA*). Estas fueron llenadas con solución intracelular estéril (120 mM de Gluconato de potasio, 20 mM de KCl, 10 mM de HEPES, 0.5 mM de EGTA, 0.5 mM de Na-GTP y 2 mM de $\text{Na}_2\text{-ATP}$) a pH de 7.2 [Osorio et al., 2013].

V.iii Tratamiento de las células granulares *in vitro*.

Los cultivos celulares fueron expuestos por 30 minutos a ácido kaínico (5 μM , Sigma) y una vez transcurrido el tiempo se retiró el tratamiento y se les colocó medio de cultivo. Los cultivos se mantuvieron en la incubadora durante el tratamiento y por 3 horas adicionales después de su exposición al tratamiento [Gómez-Lira et al., 2005]

V.iv RT-PCR de célula única.

El contenido citosólico de las células registradas fue extraído aplicando presión negativa en la pipeta de registro y fue colocado en un tubo de PCR con inhibidor de RNAsa (*Invitrogen*). Se agregó al tubo 10 μL de Buffer 5X (*One-Step RT-PCR kit Quiagen*), 2 μL dNTP's 10mM (*One-Step RT-PCR kit Quiagen*), 50pmol de cada oligonucleótido (previamente descritos, para amplificar los ARN seleccionados; tabla 2), 1 μL de inhibidor de RNAsa (*Invitrogen*) y 3 μL de la mezcla de la transcriptasa reversa (*Omniscript*), transcriptasa reversa (*Sensiscript*) y la

HotStarTaq ADN polimerasa ((*One-Step RT-PCR kit Quiagen*), en un volumen final de 50 µL.

Tabla 2. Oligonucleótidos

Gen	Oligonucleótido		Producto (pb)	T (°C)	Fuente de secuencia	No. de acceso
	Sentido	anti-sentido				
Prox1	TCTTAAGCCGGCAAACAAGAGGA	TTGCTCCTGGAAAAGGCATCATGG	246	61	Pleasure et al., 2000	NM_001107201.1
Tlx1	TGCCGGGTGTCAACAACCTC	AGCCCTCAATTGGGCTTGGG	529	57	Franco, 2016	NM_001109166.1
Lbx1	GGACATCCTCAACAAGCCGT	AGGTGATGACCTGTGCGTTG	398	61	Diseñado	NM_001047108.1
Pax2	CAACGGTGAGAAGAGGAAACGAG	GGGGAACCTAGTAAGCGGGG	596	63	Franco, 2016	NM_001106361.1

La reacción se realizó en un termociclador (*PCR express; Hybaid Limited*) con el siguiente perfil de temperaturas 30 minutos a 50 °C; 15 minutos a 95 °C; 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 52 °C, 1 minuto a 72 °C (40 ciclos de PCR) y finalmente 10 minutos a 72 °C.

Los controles utilizados fueron los siguientes

1. Control positivo:

Se utilizó ARN total de tejido hipocampal (ratas *Sprague-Dawley* de 3 días de edad) para realizar RT-PCR de cada uno de los factores de transcripción seleccionados (tabla 1).

2. Control negativo:

Se realizó RT-PCR en las condiciones ya mencionadas, pero sin ARN, en su lugar se colocaron 10 µL de agua libre de endonucleasas.

3. Control positivo para células granulares

Se realizó RT-PCR de célula única del factor de transcripción Prox1 para identificar a las células granulares, utilizando los oligonucleótidos mostrados en la tabla 1.

V.v. Inmunofluorescencia

Los factores de transcripción fueron identificados mediante inmunofluorescencia en cultivo celular y tejido hipocampal. Las células granulares se identificaron mediante la expresión de Prox1 y las interneuronas mediante la expresión de GAD67.

Los cultivos fueron fijados con paraformaldehído al 4% en PBS. Los anticuerpos primarios (monoclonal Anti-Prox1 [Sigma, P0089; 1:500], policlonal Anti-Tlx1 [GeneTex, GTX85867; 1:250], policlonal Anti-Lbx1 [GeneTex, GTX60163; 1:250], monoclonal Anti-Pax2 [Abcam, ab79389; 1:250] y Anti-GAD67 [Chemicon, AB5082; 1:250]) se incubaron con TBSr (50Mm Tris-HCl pH 7.4 [Research organics, 9680T] + 1.5% NaCl + 6.3% Triton [Sigma, X-100]); Suero de caballo (5%) y BSA (Sigma; A9539; 5%) a temperatura ambiente durante toda la noche. Los anticuerpos secundarios (anti-Rabbit 568 [SAB4600084; Sigma] y anti-mouse dylight 488 [A11126; Thermo Fisher]) se incubaron 1:250 durante dos horas a temperatura ambiente. Los cultivos son montados con Vectashiel y DAPI. Las preparaciones fueron analizadas en un microscopio confocal.

En el caso del tejido, se sacrificaron ratas *Sprague-Dawley* GFP+ de 21 días de edad, se disectó el hipocampo y se realizaron rebanadas de 25 μ m y posteriormente se realizó la inmunofluorescencia utilizando la metodología mencionada.

VI. Resultados

VI.i. Caracterización electrofisiológica de células granulares en cultivo.

Con el propósito de identificar los tipos celulares presentes en el cultivo celular se realizaron registros electrofisiológicos en donde se identificaron tres tipos

celulares: células granulares, interneuronas y células piramidales, con características fisiológicas similares a las descritas previamente [Osorio y col., 2013]. Las células granulares (n=30) presentaron un potencial de membrana en reposo de -71.2 ± 1.2 mV y su resistencia de entrada fue de 501 ± 7.1 M Ω . Su potencial de acción tuvo una amplitud de 69.9 ± 5.4 mV y una duración media de 2.4 ± 0.08 ms (figura 5). Las células piramidales (n=10) presentaron un potencial de membrana en reposo de -68.4 ± 0.5 mV y su resistencia de entrada fue de 293.3 ± 6.7 M Ω . Su potencial de acción tuvo una amplitud de 71.8 ± 7 mV y una duración media de 2.5 ± 0.2 ms (figura 5). Por otro lado, las interneuronas (n=17) presentaron un potencial de membrana en reposo de -68.4 ± 0.9 mV y su resistencia de entrada fue de 344.5 ± 60.7 M Ω . Su potencial de acción tuvo una amplitud de 65.7 ± 5.6 mV y una duración media de 2.3 ± 0.3 ms. En la figura 5 se puede observar el patrón de disparo de una célula granular, de una célula piramidal y de una interneurona. Cada célula presenta un patrón de disparo diferente, lo que permite identificarlas electrofisiológicamente.

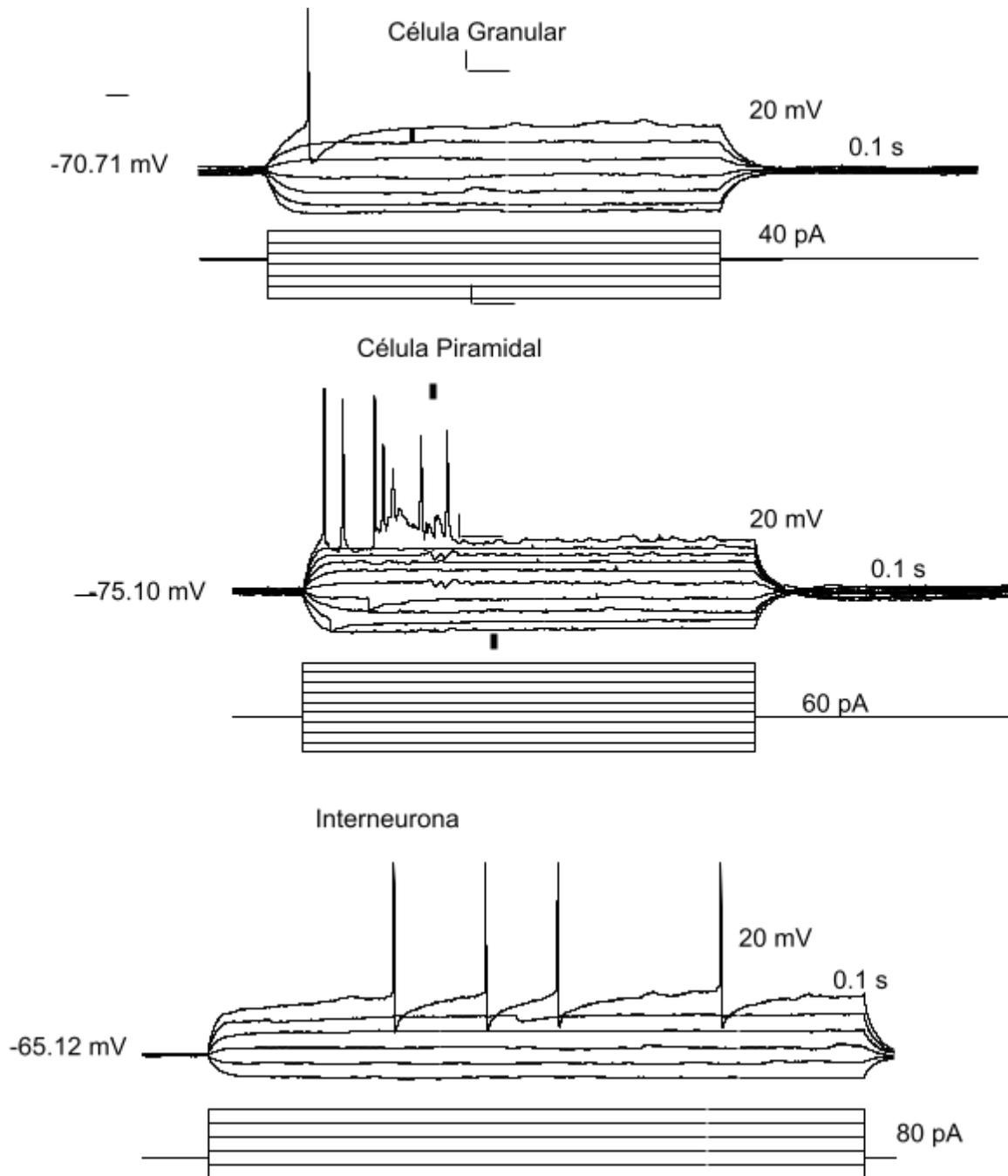


Figura . Registro electrofisiológico de patch clamp en la configuración de célula completa de una célula granular, piramidal y una interneurona.

VI.ii. Expresión de factores de transcripción en células granulares en cultivo.

Las células granulares son las únicas células del cultivo que expresan Prox1.

Con la finalidad de identificar a las células granulares mediante técnicas de biología molecular, se realizó RT-PCR de célula única de células granulares, piramidales e interneuronas (en condiciones control) para el factor de transcripción Prox1 (factor de transcripción constitutivo en las células granulares [Pleasure *et al.*, 2000; Roybon *et al.*, 2009; Iwano *et al.*, 2012]). En la figura 6 se observa la expresión de Prox1 únicamente en las células granulares (n=3) por lo tanto, este factor se utilizó como marcador positivo de este tipo celular.



También se analizó la presencia de la proteína Prox1 mediante inmunofluorescencia y se determinó que el $52.7\% \pm 4.6$ (s.e.m) de las células en el cultivo celular expresaban ese marcador (n=3 figura 7).

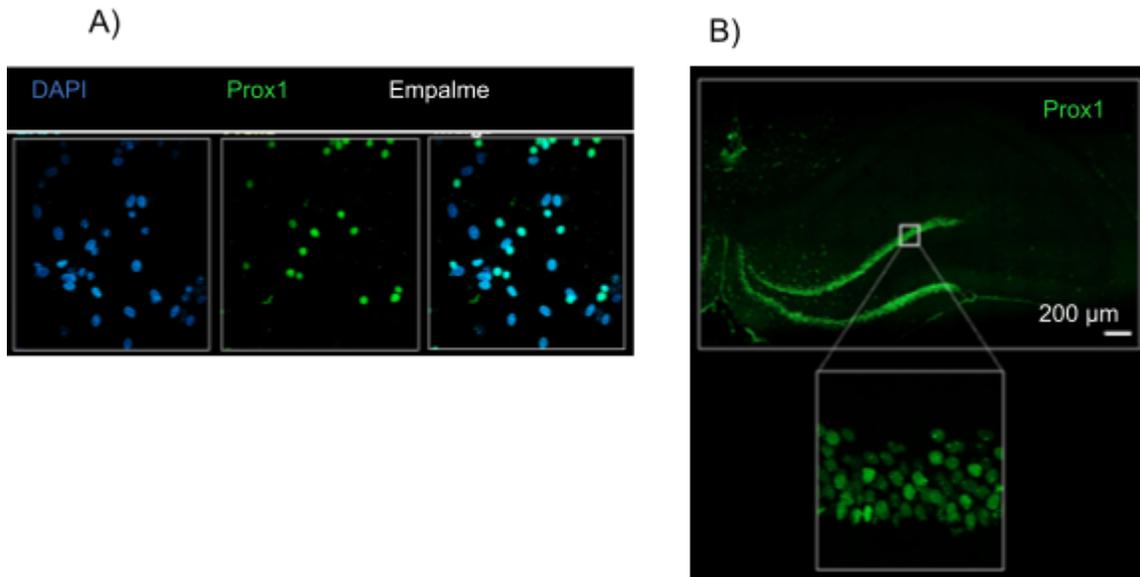


Figura 7. Inmunofluorescencia del factor de transcripción Prox1. A) Expresión de Prox1 en cultivo celular (azul, DAPI; verde, Prox1).B) Expresión del factor de transcripción Prox1 (color verde) en todo el giro dentado (en las células granulares) en rebanada de tejido hipocámpal. Se observa que las células granulares en cultivo expresan la proteína Prox1 en el núcleo de la célula (n=3).

El ARNm de los factores de transcripción Tlx1, Lbx1 y Pax2 está presente en las células granulares.

Como primer paso se realizó RT-PCR de célula única para los factores de transcripción Tlx1, Lbx1 y Pax2 de células granulares (en condiciones control) y se observó que expresan el ARNm de los tres factores de transcripción (figura 8; n=3).

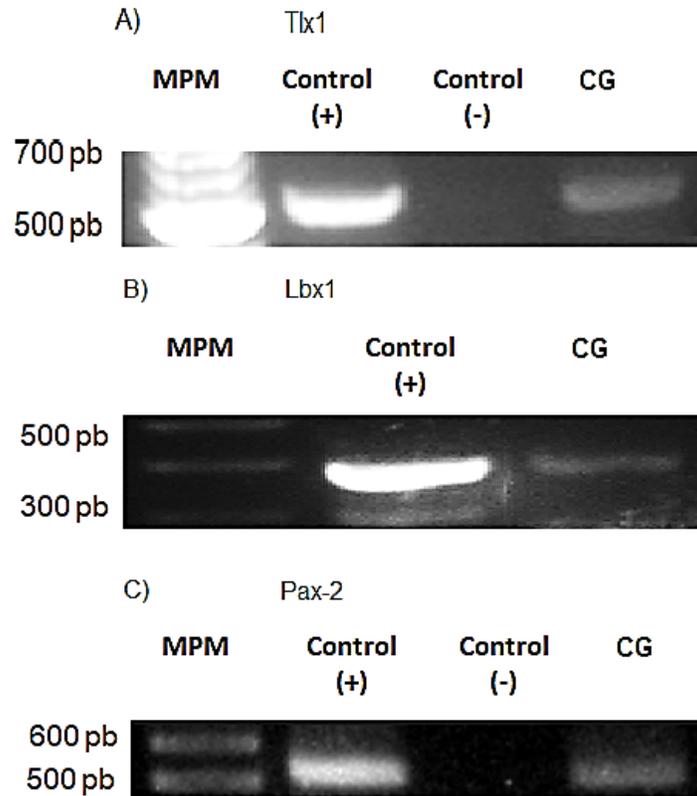


Figura 8. Expresión de los factores de transcripción Tlx1, Lbx1y Pax2 en células granulares. Se muestran geles de agarosa al 1.5% A) Marcador de peso molecular (MPM; pb), el control positivo del factor de transcripción Tlx1 (RT-PCR de ARN total de tejido hipocampal), el control negativo (-) y una célula Granular (CG; n=3). B) MPM (pb), el control positivo del factor de transcripción Lbx1 (RT-PCR de ARN total de tejido hipocampal) y una célula Granular (CG; n=3). C) MPM (pb), el control positivo del factor de transcripción Pax2 (RT-PCR de ARN total de tejido hipocampal), el control negativo (-) y una célula Granular (CG; n=3). Este resultado muestra la presencia del ARNm de los tres factores de transcripción en las células granulares.

El tratamiento con AK incrementa el número de células granulares en cultivo que expresan la enzima GAD67.

Mediante experimentos de inmunofluorescencia, analizamos la expresión de la enzima GAD67, que sólo se expresa en las células que liberan GABA, después de la exposición del cultivo a AK mientras que las células granulares fueron identificadas por la expresión de Prox1. El 4.8% de las células granulares en cultivo, en condiciones control, expresa la enzima GAD67. Después de la

exposición a AK, el 33.1% de las células granulares coexpresaron Prox1 y GAD67 (figura 9; n=3).

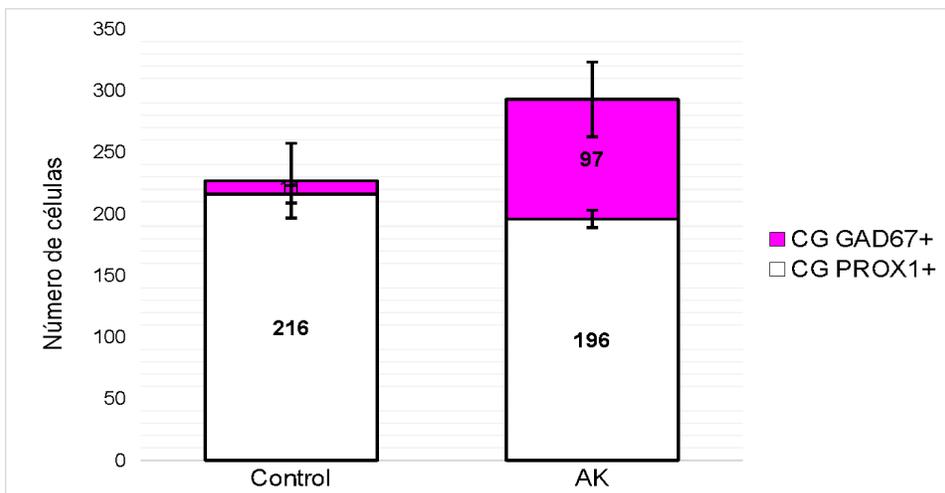
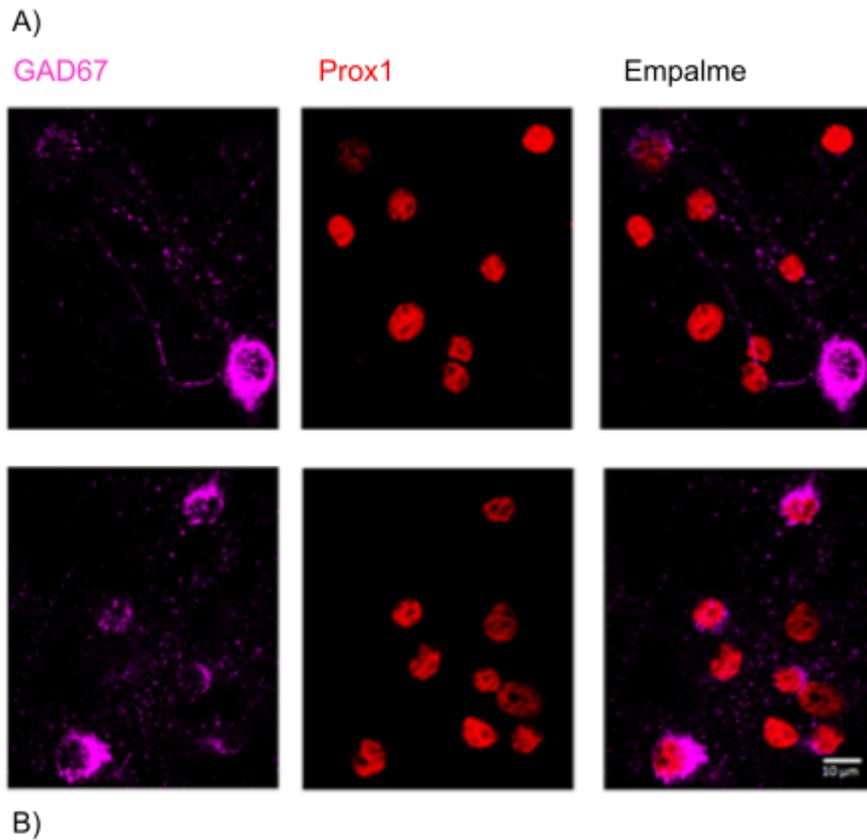


Figura 9. Inmunofluorescencia del cultivo celular para Prox1 y GAD67. A) Expresión de GAD67 (color rosa) y Prox1 (color rojo) en células en condiciones control y en células después del tratamiento con AK. B) Gráfica del número de células granulares (Prox1+) que expresan la enzima

GAD67 en condiciones control y después del tratamiento con AK. Se observa un incremento en el número de células granulares (Prox1+) positivas a GAD67, después del tratamiento con AK (n=3).

Las células granulares expresan la proteína Tlx1 en el cultivo después del tratamiento con AK.

Analizamos la expresión de la proteína Tlx1, que se asocia a la expresión del fenotipo glutamatérgico, en las células granulares del cultivo celular en condiciones basales y después del tratamiento con AK. La expresión de la proteína fue observada en todas las células granulares del cultivo, en condiciones control (n=3) y después del tratamiento con AK (n=3) también es importante mencionar que la expresión de dicho factor fue observada en toda la célula. Además, se observó que 52 de 178 células que no son granulares en el cultivo control, expresan la proteína Tlx1 (en toda la célula, n=3; figura 10).

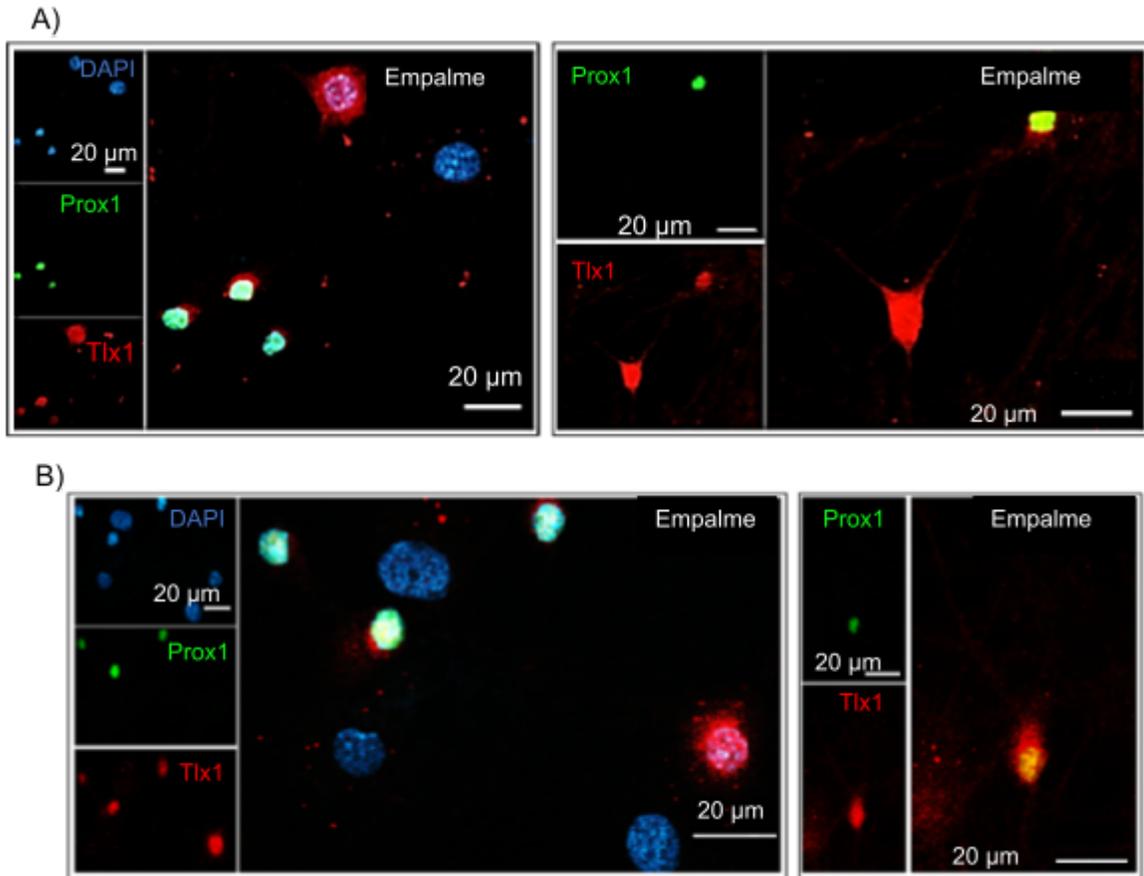


Figura 10. Inmunofluorescencia de cultivo celular para el factor de transcripción Tlx1. A. Inmunofluorescencia de cultivo celular del factor de transcripción Tlx1 en condiciones control. Expresión de Tlx1 en dos imágenes de cultivo celular en condiciones control (azul, DAPI; verde, Prox1 (marcador de células granulares); rojo, Tlx1). B. Expresión de Tlx1 en cultivo celular tratado con AK (azul, DAPI; verde, Prox1; rojo, Tlx1). Las células granulares expresan la proteína Tlx1 en condiciones control y después del tratamiento con AK.

Las células granulares expresan la proteína Lbx1 en cultivo después del tratamiento con AK.

Mediante inmunofluorescencia se observó la expresión de la proteína Lbx1, que se asocia a la expresión del fenotipo GABAérgico, en las células granulares (identificadas por la expresión del factor de transcripción Prox1). Se observó que la proteína Lbx1 se expresa en todas las células granulares, en condiciones control (n=3), y después del tratamiento con AK (n=3); además la expresión del factor de transcripción es en toda la célula. También, se observó que 53 de 168 células, que no son granulares, expresan la proteína Lbx1 (n=3; figura 11).

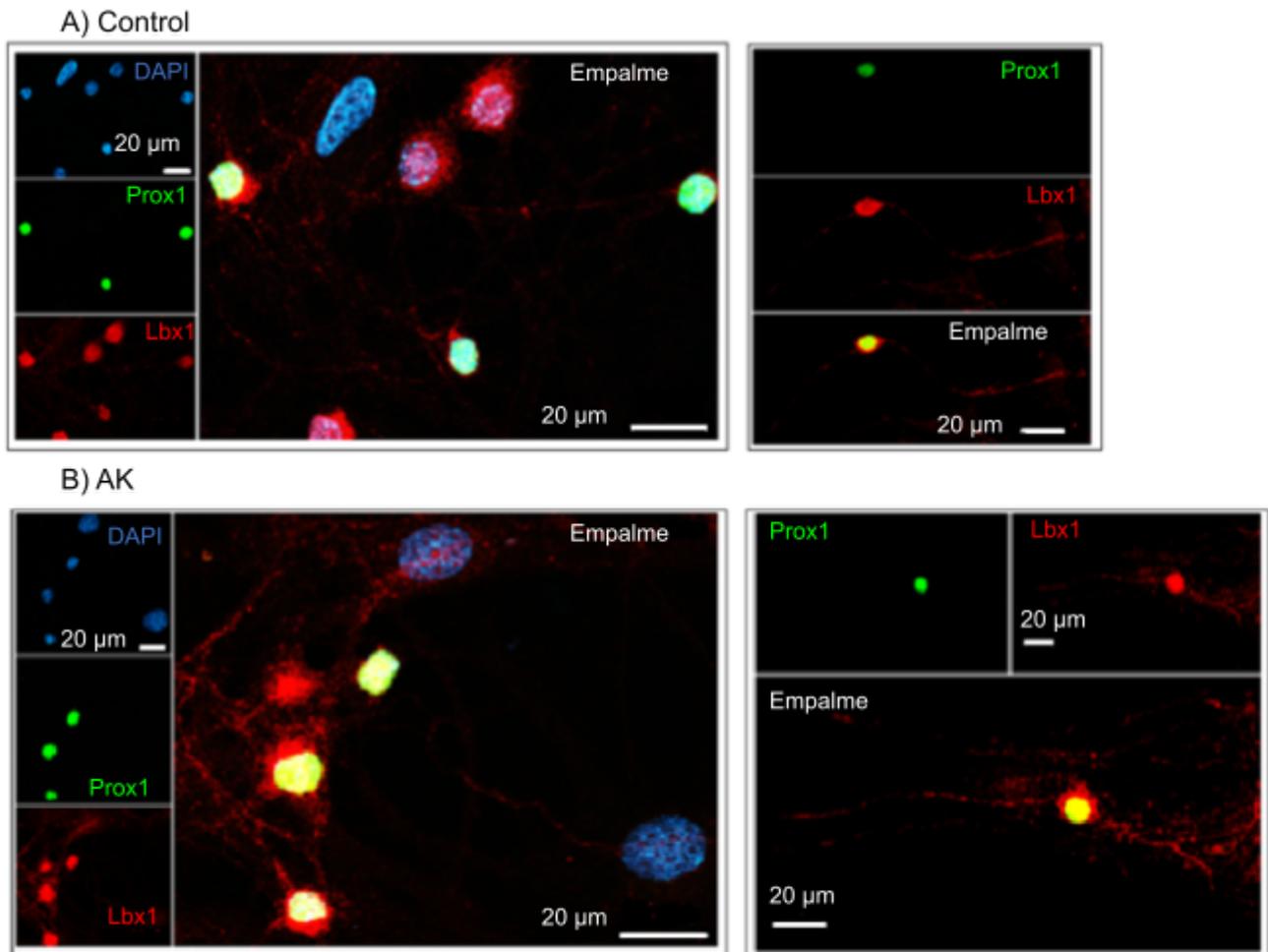
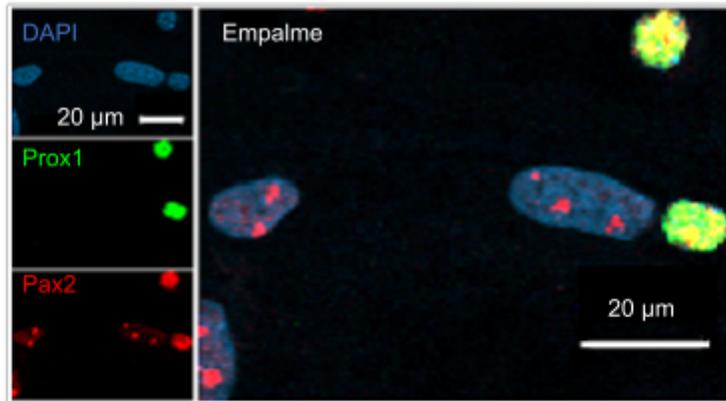


Figura 11. Inmunofluorescencia del factor de transcripción Lbx1. A) Inmunofluorescencia de la proteína Lbx1 en cultivos control (azul, DAPI; verde, prox1; rojo, Lbx1). B) Inmunofluorescencia de la proteína Lbx1 de cultivos tratados con AK, (azul, DAPI; verde, Prox1; rojo, Lbx1). Las células granulares expresan la proteína Lbx1 en condiciones control y después del tratamiento con AK.

Las células granulares expresan la proteína Pax2 en cultivo después del tratamiento con AK.

Se realizó inmunofluorescencia para identificar la proteína Pax2, que se asocia al fenotipo GABAérgico, en células granulares (identificadas por la expresión del factor de transcripción Prox1) del cultivo. Se observó que en todas las células granulares expresan el factor de transcripción Pax2, en condiciones control (n=3), y después del tratamiento con AK. Además, se pudo ver que las células, que no son células granulares, expresan la proteína Pax2 y que este factor de transcripción se expresa únicamente en los nucleolos. (n=3; figura 12).

A) Control



B) AK

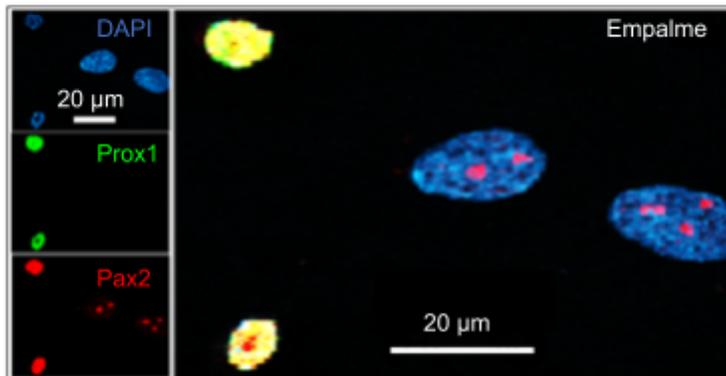


Figura 12. Inmunofluorescencia del factor de transcripción Pax2. A) Inmunofluorescencia de la proteína Pax2 de cultivo en condiciones control (azul, DAPI; verde, Prox1; rojo, Pax2). B) Inmunofluorescencia de la proteína Lbx1 de células tratadas con AK en cultivo (azul, DAPI; verde, Prox1; rojo, Pax2). Se puede ver que las células granulares expresan la proteína Pax2 en condiciones control y después del tratamiento con AK. La expresión de la proteína Pax2, en las células granulares (positivas a Prox1), es en toda la célula y en las células no granulares (que son positivas al factor de transcripción Pax2) se expresa únicamente en los nucleolos.

Las interneuronas del cultivo expresan los factores de transcripción Tlx1, Lbx1 y Pax2.

Con la finalidad de identificar la expresión de los factores de transcripción en una célula que presenta solo un fenotipo, como son las interneuronas (que expresan el fenotipo GABAérgico), se realizó inmunofluorescencia doble para GAD67-Tlx1, GAD67-Lbx1 y GAD67-Pax2. Se observó que todas las interneuronas (identificadas por la expresión de la enzima GAD67) expresan la proteína Tlx1 (proteína asociada al fenotipo glutamatérgico), 10 de 10 interneuronas expresan la proteína Lbx1 (proteína asociada al fenotipo GABAérgico) y que 12 de 12 interneuronas expresan la proteína Pax2 (proteína asociada al fenotipo GABAérgico) (n=3; figura 13).

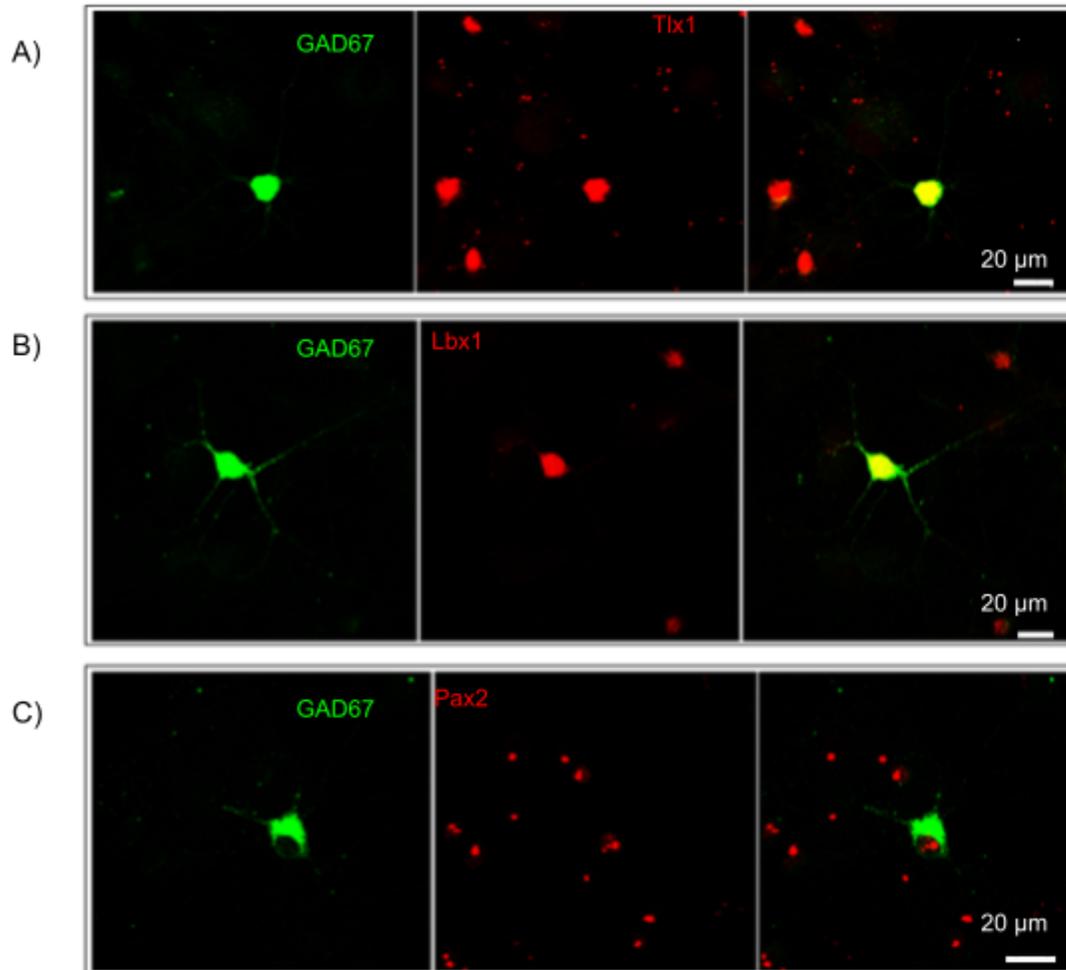


Figura 13. Inmunofluorescencia de GAD67/Tlx1, GAD67/Lbx1 y GAD67/Pax2. A) Inmunofluorescencia de la proteína Tlx1 en interneuronas (identificadas por la expresión de GAD67) del cultivo celular, donde el color verde es GAD67 y en rojo el factor de transcripción Tlx1. Se puede observar que la expresión de la proteína Tlx1 es en toda la célula. B) Inmunofluorescencia de la proteína Lbx1 en interneuronas (identificadas por la expresión de GAD67) del cultivo celular (verde, GAD67; rojo, Lbx1). La expresión de la proteína Lbx1 es en toda la célula. C) Inmunofluorescencia de la proteína Pax2 en interneuronas (identificadas por la expresión de GAD67) del cultivo celular (verde, GAD67; rojo, Pax2). La expresión de la proteína Pax2 es únicamente en los nucleolos. Este resultado muestra que las interneuronas del cultivo expresan los tres factores de transcripción (Tlx1, Lbx1 y Pax2). También se puede ver que las interneuronas expresan las proteínas Tlx1 y Lbx1 en toda la célula y la proteína Pax2 en los nucleolos.

VI.iii. Expresión de los factores de transcripción en rebanadas del hipocampo

Con la finalidad de determinar que la expresión de los factores de transcripción no depende del modelo (células granulares en cultivo), se realizó inmunofluorescencia en tejido hipocampal.

Las células granulares del giro dentado expresan la proteína Tlx1.

Mediante experimentos de inmunofluorescencia en tejido hipocampal para el factor de transcripción Tlx1 (factor de transcripción asociado al fenotipo glutamatérgico), se observó que todas las células granulares del giro dentado expresan la proteína Tlx1 (n=3). Además, se observó que las células de la región de CA3 (en la capa piramidal) también la expresan (figura 14).

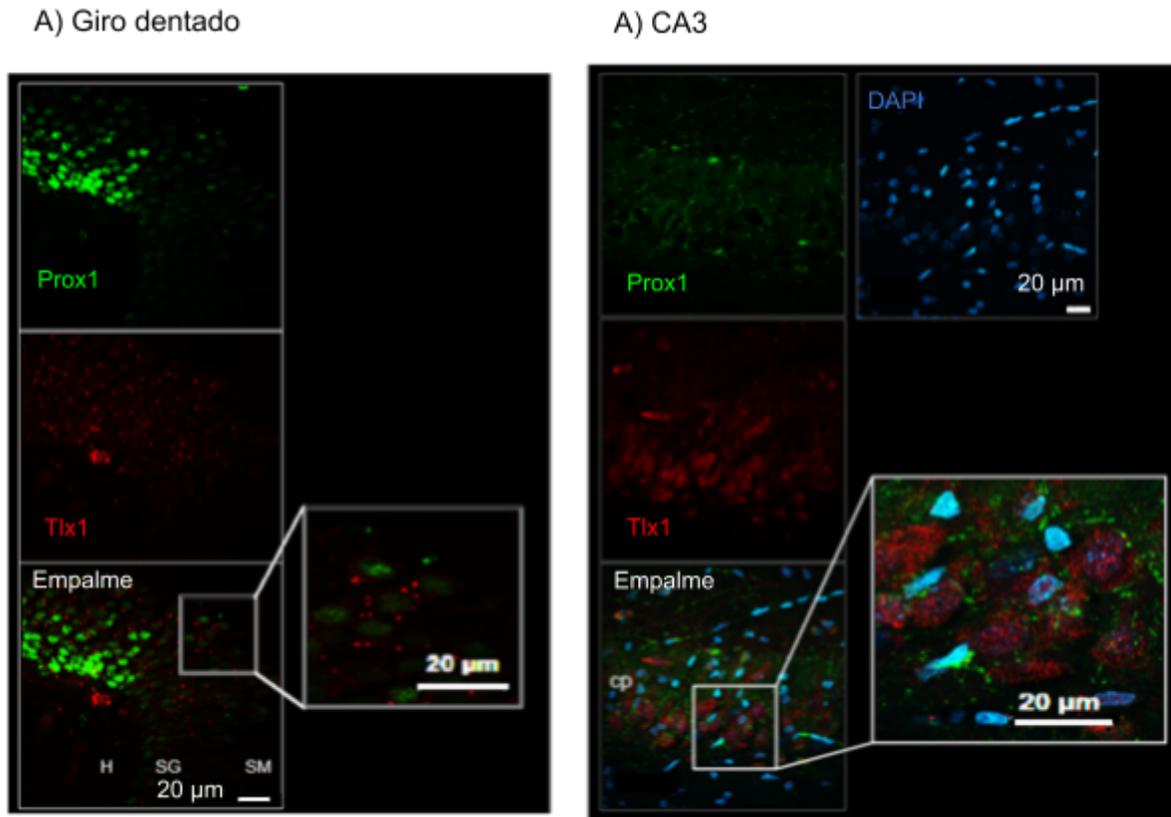


Figura 14. Inmunofluorescencia del factor de transcripción Tlx1 de tejido hipocampal. A) Inmunofluorescencia de la proteína Tlx1 del giro dentado (hilus, H; stratum granulare, SG; stratum moleculare, SM) en condiciones control (verde, Prox1; rojo, Tlx1). B) Inmunofluorescencia de la proteína Tlx1 de la región de CA3 en la capa piramidal (cp; verde, GAD67; azul, DAPI; rojo, Tlx1). Se puede observar que la expresión de la proteína Tlx1, en ambas regiones (giro dentado y CA3), es en toda la célula.

Las interneuronas de la capa Piramidal expresan Tlx1.

Con la finalidad de observar si las interneuronas en el tejido hipocampal expresan la proteína Tlx1, como se observó en el cultivo, se realizó inmunofluorescencia para GAD67-Tlx1. Se observó que las interneuronas de la región de CA3 de la capa piramidal expresan la proteína Tlx1 (n=3; figura 14).

Las células granulares del giro dentado expresan la proteína Lbx1 únicamente en el citoplasma.

Mediante inmunofluorescencia de tejido hipocampal para el factor de transcripción Lbx1 (factor asociado al fenotipo GABAérgico), se observó que todas las células granulares del giro dentado expresan la proteína Lbx1. Además, se observó que todas las células de la capa piramidal de la región de CA3 expresan la proteína Lbx1(n=3; figura 15).

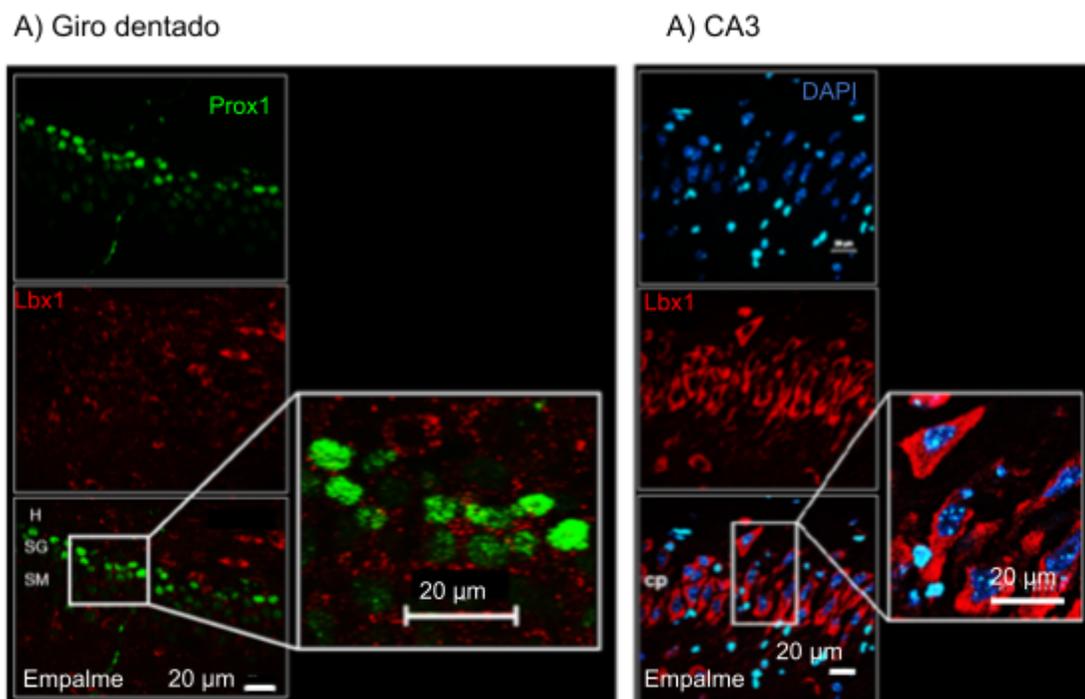


Figura 15. Inmunofluorescencia del factor de transcripción Lbx1 de tejido hipocampal. A) Inmunofluorescencia de la proteína Lbx1 del giro dentado (hilus, H; stratum granulare, SG; stratum moleculare, SM) en condiciones control (verde, Prox1; rojo, Lbx1). B) Inmunofluorescencia de la proteína Lbx1 de la región de CA3 (cp; azul, DAPI; rojo, Lbx1). Se puede observar que la expresión de la proteína Lbx1, en ambas regiones (giro dentado y CA3), es únicamente en el citoplasma.

Las células granulares del giro dentado expresan la proteína Pax2 únicamente en los nucleolos.

Determinamos la expresión del factor de transcripción Pax2, el cual está asociado al fenotipo GABAérgico, en el tejido hipocampal. Se observó que la proteína Pax2 se expresa en las células granulares del giro dentado, pero únicamente en los nucleolos, a diferencia de las células en el cultivo celular (donde se expresa en toda la célula; n=3; figura 16).

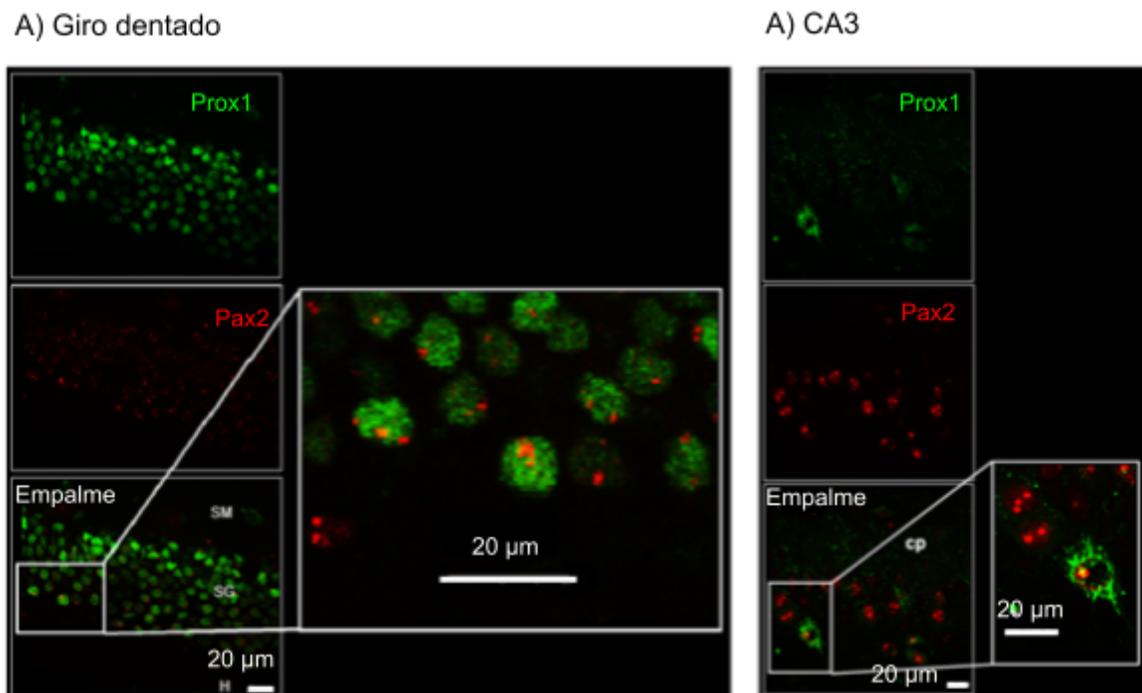


Figura 16. Inmunofluorescencia del factor de transcripción Pax2 de tejido hipocampal. A) Inmunofluorescencia de la proteína Pax2 del giro dentado (*hilus*, H; *stratum granulare*, SG; *stratum moleculare*, SM) en condiciones control (verde, Prox1; rojo, Pax2). B) Inmunofluorescencia de GAD67/Pax2 de la región de CA3 de la (*cp*; verde, GAD67; rojo, Pax2). Se puede observar que las células granulares del giro dentado y las interneuronas de la capa piramidal expresan la proteína Pax2 en los nucleolos.

Las interneuronas de la capa piramidal de la región de CA3 del hipocampo expresan la proteína Pax2.

Mediante inmunofluorescencia de GAD67-Pax2, determinamos que las interneuronas de la capa piramidal de la región de CA3 (identificadas por la expresión de GAD67) expresan la proteína Pax2(n=3; figura 16).

V.iv. Resumen de resultados

Los resultados obtenidos en este trabajo se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 3. Resumen de resultados

	Cultivo Celular	Lugar de expresión del factor de transcripción	Tejido hipocampal	Lugar de expresión del factor de transcripción
Tl x 1	Células Granulares	En toda la célula	GD (células granulares)	En toda la célula
	Interneuronas	En toda la célula	CA3 (Interneuronas)	En toda la célula
L b x 1	Células Granulares	En toda la célula	GD (Células granulares)	En el citoplasma
	Interneuronas	En toda la célula	Células del CA3	En el citoplasma
P a x 2	Células Granulares	En toda la célula	GD (Células granulares)	En los nucleolos
	Interneuronas	En los nucleolos	CA3 (Interneuronas)	En los nucleolos

VI. Discusión

Con el propósito de identificar los factores de transcripción que se asocian al cambio de fenotipo de las células granulares hipocampales se analizó la expresión de los factores de transcripción Tlx1, asociado a la especificación del fenotipo glutamatérgico [Dear et al., 1993; Maconochie et al., 1996; Cheng et al., 2004], Lbx1 y Pax2 asociados a la especificación del fenotipo GABAérgico [Krüger et al., 2002; Müller et al., 2002; Cheng et al., 2004; Marichic & Herrup, 1999; Cheng et al., 2004; Guo et al., 2012; Huang et al., 2008] en células granulares de hipocampo en cultivo celular.

El análisis de dichos factores fue basado en un trabajo previo del laboratorio donde se observó que el ARNm del factor de transcripción Tlx1 disminuye después de la inducción de crisis convulsivas mientras que Lbx1 y Pax2 incrementan su expresión en el giro dentado [Franco; 2016]. Sin embargo, estos estudios fueron realizados en el giro dentado disectado, por lo que, además de contener células granulares, contiene otros tipos celulares, como una diversidad de interneuronas, lo que impide aseverar que estos factores de transcripción se encuentran en las células granulares. Debido a esto, en este trabajo se determinó la expresión de dichos factores en células granulares, identificadas electrofisiológicamente y por la expresión del factor de transcripción Prox1, mediante RT-PCR de célula única e inmunofluorescencia.

Los resultados de este trabajo muestran que las células granulares son las únicas células en el cultivo que expresan el factor de transcripción Prox1, que ha sido demostrado ser constitutivo en este tipo celular [Pleasure et al., 2000; Roybon et al., 2009; Iwano et al., 2012]. Debido a la exclusividad en la expresión de Prox1 usamos su detección para identificar células granulares en el cultivo celular.

En este trabajo, mediante RT-PCR de célula única, se determinó que las células granulares expresan ARNm de los factores de transcripción Tlx1, Lbx1 y Pax2 en condiciones basales (figura 8). Después de esta determinación realizamos

experimentos de inmunofluorescencia para GAD67 y Prox1, con la finalidad de observar la expresión del fenotipo GABAérgico después del tratamiento con AK. En este estudio observamos un incremento en el número de células granulares que expresan la proteína GAD67 (figura 9). Esto concuerda con el resultado obtenido por Gómez et al [2005], donde se observó que el tratamiento con AK produce la expresión de VGAT en células granulares y un incremento en el número de células granulares que expresan la enzima GAD67.

Una vez que se identificó la expresión de la enzima GAD67 en las células granulares se prosiguió a evaluar la expresión de las proteínas Tlx1, Lbx1 y Pax2 en el cultivo celular en condiciones control y después del tratamiento con AK. Se observó que el factor de transcripción Tlx1 (factor asociado al fenotipo glutamatérgico [Dear *et al.*, 1993; Maconochie *et al.*, 1996]) se expresa en las células granulares del cultivo celular en condiciones basales y después del tratamiento con AK (figura 10). Este resultado era esperado ya que estas células expresan el fenotipo glutamatérgico en condiciones control y después del tratamiento con AK.

Respecto a los factores de transcripción Lbx1 y Pax2 (asociados al fenotipo GABAérgico [Jagla *et al.*, 1995; Dietrich *et al.*, 1998; Krüger *et al.*, 2002; Müller *et al.*, 2002; Cheng *et al.*, 2005]) se observó que se expresan en células granulares del cultivo tanto en condiciones control como después del tratamiento con AK (figura 11 y 12). Este resultado indica que estos factores no son privativos del fenotipo GABAérgico ya que se expresaron en condiciones control cuando las células granulares presentan un fenotipo glutamatérgico.

Se realizó inmunofluorescencia de GAD67/Tlx1, GAD67/Lbx1 y GAD67/Pax2, con la finalidad de observar la expresión de estos factores de transcripción en células que sólo expresan el fenotipo GABAérgico. Esto mostró que las interneuronas (GAD67 positivas) expresan los tres factores de transcripción (Tlx1, Lbx1 y Pax2; figura 13), lo que indica que estos factores de transcripción no pueden asociarse a un fenotipo (ya sea glutamatérgico o GABAérgico) en el cultivo celular ya que, tanto las células granulares (células glutamatérgicas en condiciones control) como

las interneuronas (células GABAérgicas) expresan los tres factores de transcripción.

Finalmente, se analizó la expresión de los factores de transcripción Tlx1, Lbx1 y Pax2 en tejido hipocampal con la finalidad de determinar si la expresión de los factores de transcripción en el tejido es diferente a la observada en cultivo celular y poder descartar que el modelo de estudio afecta la expresión de los factores de transcripción estudiados.

La inmunofluorescencia de Tlx1 mostró que las células granulares del giro dentado expresan la proteína Tlx1 en toda su extensión y que ésta también se expresa en células de la región de CA3 de la capa de cuerpos piramidales (figura 14).

En cuanto al factor de transcripción Lbx1, mediante inmunofluorescencia, se observó que se expresa en las células granulares del giro dentado, pero únicamente en el citoplasma. Este resultado sugiere que esta proteína pudiera tener una función diferente a la de factor de transcripción puesto que no se encuentra en el núcleo de la célula donde ejercen su función de factor de transcripción. Además, se observó que esta proteína se encuentra presente en todas las células de la capa piramidal (en la región de CA3), en donde se encuentran interneuronas GABAérgicas y células piramidales (células glutamatérgicas) pero al igual que en el giro dentado la expresión es únicamente en el citoplasma. Este resultado muestra que esta proteína pudiera tener una función diferente a la de factor de transcripción y no se le puede asociar a ningún fenotipo (ni glutamatérgico ni GABAérgico).

Con respecto a (Pax2), mediante inmunofluorescencia, se determinó que se expresa en las células granulares del giro dentado., a diferencia del cultivo celular, se detectó únicamente en los nucleolos por lo que se requiere hacer otros experimentos para determinar si pudiera estar o no asociado a la determinación de un fenotipo en particular en las células granulares. De igual manera se realizó inmunofluorescencia del factor Pax2 para la región de CA3 y se observó que las interneuronas de la capa piramidal expresan el factor de transcripción, pero al igual que las células granulares su expresión es en los nucleolos.

Los resultados obtenidos en el tejido hipocampal muestran que estos factores pudieran tener una función diferente a la asociación o determinación de algún fenotipo, ya sea glutamatérgico o GABAérgico.

Reportes anteriores sobre Tlx1 mencionan que este factor de transcripción actúa en el desarrollo seleccionando el fenotipo glutamatérgico sobre el GABAérgico en la médula espinal de ratón [Cheng *et al.*, 2004]. Con base en esto y otros antecedentes [Dear *et al.*, 1993; Maconochie *et al.*, 1996; Cheng *et al.*, 2005] se esperaba que, en nuestro estudio, Tlx1 estuviera asociado al fenotipo glutamatérgico. Sin embargo, en este proyecto se observó que en el hipocampo (giro dentado y la capa piramidal de la región CA3) y en células del hipocampo en el cultivo celular, Tlx1 es expresado tanto en células glutamatérgicas (células granulares en condiciones control) como en células GABAérgicas (interneuronas).

En cuanto a los factores Lbx1 y Pax2, se ha reportado que Lbx1 determina el destino celular GABAérgico en la médula espinal dorsal en la etapa embrionaria temprana del ratón [Cheng *et al.*, 2005] y que Pax2 se expresa en neuronas GABAérgicas del cerebelo durante el desarrollo [Marichic & Herrup, 1999], y en la región dorsal de la médula espinal de ratón [Cheng *et al.*, 2004; Guo *et al.*, 2012], además la expresión de Pax2 promueve la diferenciación GABAérgica en médula espinal de pollo, incrementando la expresión de la GAD67 [Huang *et al.*, 2008]. Estos antecedentes sugerían que estos factores de transcripción están asociados al fenotipo GABAérgico y que pudieran ejercer una función similar en el hipocampo y presentarse en las células granulares, después de la exposición del cultivo celular a AK. Sin embargo, se observó que las células granulares en condiciones control (cuando son únicamente glutamatérgicas) expresan Lbx1 y Pax2, en el cultivo celular. Este resultado podría deberse al modelo experimental usado debido a que, en el tejido hipocampal, sí se expresa los factores Lbx1 y Pax2 pero se localizan únicamente en el citoplasma o en los nucleolos (respectivamente), sugiriendo que pudieran tener una función diferente a la de factor de transcripción o incluso isoformas del factor que no contuvieran la señal de traslocación nuclear. Por ejemplo, CREB que pertenece a la superfamilia de

factores de transcripción que forman homo y heterodímeros que se unen a secuencias de ADN específicas por lo tanto se encuentra en el núcleo donde tiene la función de unirse a promotores de genes CRE, en respuesta a diversos estímulos extracelulares modulando la proliferación y diferenciación neuronal [Zhou et al.; 2012] sin embargo anteriormente Hermanson et al. [1996], mediante inmunohistoquímica microscópica ligera, mostraron que en varias regiones como la medula espinal, el hipotálamo, el hipocampo y la corteza olfatoria de rata el factor CREB se encontró exclusivamente en el citoplasma, en el aparato de Golgi y en las terminales axónicas, y que estas eran isoformas que carecen de la señal de traslocación nuclear y pueden estar involucradas en la regulación de la transcripción.

El hecho que los factores de transcripción no se puedan asociar a un fenotipo tampoco pueden descartarse completamente debido a que es posible que el gen diana o el promotor de dicho gen este no se encuentre disponible, esto puede ser por mecanismos epigenéticos. Por ejemplo, uno de los mecanismos epigenéticos que podrían estar involucrados es la conformación de la cromatina, esta puede estar compacta debido a metilaciones en las histonas impidiendo la transcripción del gen. Otra posibilidad es que el promotor de este gen contara con regiones metiladas que impidieran la unión de los factores de transcripción y en consecuencia impidiendo la transcripción [Alberts, 2010].

Es interesante observar la expresión de Pax2 en los nucleolos debido a que esta estructura tiene como principal función la transcripción de las subunidades ribosomales [Boisvert, 2007] para lo cual forma complejos y se han descrito factores de transcripción que están involucrados, por ejemplo, TIF-IB/SL1, [Grummt, 2019]. Sin embargo, hasta el momento no hay antecedentes de la participación de Pax2 en esta función. Los nucleolos también están involucrados en diferentes etapas del ciclo celular, lo que sugiere un papel para los nucleolos en la regulación de aspectos específicos de la progresión del ciclo celular además de que está involucrado en el procesamiento y maduración de ribonucleoproteínas celulares, incluidas la partícula de reconocimiento de señal y la telomerasa reversa [Boisvert,

2007], por lo cual sería interesante investigar la función que ejerce la expresión de Pax2 en los nucleolos.

Otro resultado a resaltar es que la localización de las proteínas Lbx1 y Pax2 se expresan de manera diferente en el cultivo con respecto al tejido. Por ejemplo, las células granulares contienen Lbx1 y Pax2 en toda la célula en el cultivo celular, en cambio en el tejido Lbx1 se detecta únicamente en el citoplasma y Pax2 únicamente en los nucleolos. Este resultado debe ser tomado en consideración en estudios próximos.

VII. Conclusión

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que las células granulares en cultivo celular pueden ser identificadas por sus características electrofisiológicas y por la expresión de Prox1 (factor constitutivo en las células granulares).

Los resultados de RT-PCR de célula única e inmunofluorescencia de los factores Tlx1, Lbx1 y Pax2 muestran que las células granulares expresan los tres factores

de transcripción en condiciones control y después del tratamiento con AK. Por lo tanto este resultado indica que los tres factores de transcripción no pueden asociarse a un solo fenotipo (glutamatérgico o GABAérgico).

Las interneuronas de la región de CA3 expresan Tlx1, Lbx1 y Pax2, lo cual apoya la idea de que no se pueden asociar a un fenotipo (glutamatérgico o GABAérgico) ya que tanto células glutamatérgicas (células granulares en condiciones control) como células GABAérgicas expresan los tres factores de transcripción.

La función de los factores de transcripción en el cambio de fenotipo de las células granulares no puede ser descartada debido a que es posible que el gen diana o el promotor de dicho gen este no sea accesible a ellos, porque la cromatina se encuentre compacta o que el promotor de este gen contara con regiones metiladas que impidieran la transcripción.

Nuestros resultados revelaron que la localización intracelular de los factores de transcripción es diferente en el tejido hipocampal y en cultivo. El factor Lbx1 se localiza en toda la célula granular en el cultivo celular y en el tejido únicamente en el citoplasma y el factor Pax2 en el cultivo se distribuye en toda la célula granular y en el tejido únicamente en los nucleolos. Sin embargo, en el tejido hipocampal tampoco se puede hacer una asociación de los factores de transcripción a alguno de los fenotipos (glutamatérgico y GABAérgico). La diferencia en la localización entre el cultivo celular y el tejido no es sorprendente ya que incluso el análisis de células que han tenido una preparación diferente puede diferir en la expresión de genes. Por ejemplo, Harris et al. [2019] compararon la expresión génica de muestras microdisecionadas de los subcampos de giro dentado (DG), CA3 y CA1 del hipocampo de ratón, preparadas por un protocolo estándar de homogeneización de tejidos o sometidas a digestión enzimática utilizada para disociar las células dentro de los tejidos. Mostraron que, en comparación con la homogeneización, la disociación enzimática altera aproximadamente 350 genes o el 2% del transcriptoma del hipocampo. Este hecho muestra que la preparación es un factor importante que se debe considerar para el análisis de la expresión génica. Sin embargo, en este caso, la localización intracelular entre el cultivo

celular y el tejido hipocampal difiere y en ambos casos no se puede asociar ninguno de los factores de transcripción a un fenotipo particular.

VIII. Perspectivas

Realizar registros pareados para confirmar la co-liberación de Glutamato/GABA de las células granulares cuando se expresen marcadores del fenotipo GABAérgico en las células granulares.

Analizar si los genes de los marcadores glutamatérgicos (VGlut, glutamato) y GABAérgicos (VGAT, GAD67 y GABA) se encuentran disponibles para la transcripción.

Observar si los factores de transcripción interaccionan con los genes diana (VGlut, glutamato, VGAT, GAD67 y GABA) activando la transcripción.

Investigar y evaluar la expresión de otros factores de transcripción que pudieran estar asociados al cambio de fenotipo tanto en condiciones de cultivo como *in situ*.

IX. Referencias

Alberts et al. (2010). *Biología Molecular de la Célula*, traducción al español de la 5a edición. Editorial Omega, Barcelona.

Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J. (2007). *The hippocampus books*. OXFORD University Press.

Borodinsky LN, Belgacem YH, Swapna I, S. E. (2014). Dynamic regulation of neurotransmitter specification: Relevance to nervous system homeostasis. *Neuropharmacology*, (78), 75–80.

Cheng L, Arata A, Mizuguchi R, Qian Y, Karunaratne A, Gray PA, Arata S, Shirasawa S, Bouchard M, Luo P, Chen CL, Busslinger M, Goulding M, Onimaru H, Ma Q. (2004). *Tlx3* and *Tlx1* are post-mitotic selector genes determining glutamatergic over GABAergic cell fates. *Nat Neurosci*. 7(5):510-7.

Cheng L, Samad OA, Xu Y, Mizuguchi R, Luo P, Shirasawa S, Goulding M, Ma Q (2005). *Lbx1* and *Tlx3* are opposing switches in determining GABAergic versus glutamatergic transmitter phenotypes. *Nat Neurosci*. 8(11):1510-5.

Dear TN, Sanchez-Garcia I, Rabbitts TH. (1993) The *HOX11* gene encodes a DNA-binding nuclear transcription factor belonging to a distinct family of homeobox genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90(10):4431-5.

Gómez-Lira G, Lamas M, Romo-Parra H, Gutiérrez R. (2005) Programmed and induced phenotype of the hippocampal granule cells. *J Neurosci*. 25(30):6939-46.

Gutiérrez R. (2002). Activity-dependent expression of simultaneous glutamatergic and GABAergic neurotransmission from the mossy fibers in vitro. *J. Neurophysiol*. 87: 2562– 2570.

Harris et al. (2019). Hippocampal transcriptomic responses to enzyme-mediated cellular dissociation. *Hippocampus*.:1-7

Herdegen T, et al. (1991) Expression of c-jun, junB and junD proteins in rat nervous system following transection of vagus nerve and cervical sympathetic trunk. *Neuroscience* 45 (2): 413-422.

Hermanson et al. (1996) Cytoplasmic CREB alpha-like antigens in specific regions of the rat brain. *ELSEVIER*. 201: 256-62

Hoshino M, Nakamura S, Mori K, Kawauchi T, Terao M, Nishimura YV, Fukuda A, Fuse T, Matsuo N, Sone M, Watanabe M, Bito H, Terashima T, Wright CV, Kawaguchi Y, Nakao K, Nabeshima Y (2005). Ptf1a, a bHLH transcriptional gene, defines GABAergic neuronal fates in cerebellum. *Neuron*. 21;47(2):201-13.

Kraus P, Lufkin T. (2006) Dlx homeobox gene control of mammalian limb and craniofacial development. *Am J Med Genet A*. 140(13):1366-74.

Lamas M, Gómez-Lira G, Gutiérrez R (2001) Vesicular GABA transporter mRNA expression in the dentate gyrus and in mossy fiber synaptosomes. *Mol Brain Res* 93:209 – 214.

Ma Q, Sommer L, Cserjesi P, Anderson DJ. (1997) Mash1 and neurogenin1 expression patterns define complementary domains of neuroepithelium in the developing CNS and are correlated with regions expressing notch ligands. *J Neurosci*. 17(10):3644-52.

Maconochie M, Nonchev S, Morrison A, Krumlauf R. (1996) Paralogous Hox genes: function and regulation. *Annu Rev Genet*. 30:529-56.

Marek KW, Kurtz LM, Spitzer NC (2010). cJun integrates calcium activity and *tlx3* expression to regulate neurotransmitter specification. *Nat Neurosci*, 13(8):944-50.

Maricich SM, Herrup K. (1999) Pax-2 expression defines a subset of GABAergic interneurons and their precursors in the developing murine cerebellum. *J Neurobiol*. 41(2):281-94.

Mellström B., et al. (1991) Differential expression of the jun family members in rat brain. *Oncogene*. 6(11): 1959-64.

Müller T, Brohmann H, Pierani A, Heppenstall PA, Lewin GR, Jessell TM, Birchmeier C. (2002) The homeodomain factor *lhx1* distinguishes two major programs of neuronal differentiation in the dorsal spinal cord. *Neuron*. 34(4):551-62.

Osorio B., León U., Galván E. J., Gutiérrez R. (2013). Cocultures of GFP⁺-granule cells with GFP pyramidal cells and interneurons for the study of mossy fiber neurotransmission with paired recordings. *Hippocampus* 23 247–252.

Parras CM1, Galli R, Britz O, Soares S, Galichet C, Battiste J, Johnson JE, Nakafuku M, Vescovi A, Guillemot F. (2004) *Mash1* specifies neurons and oligodendrocytes in the postnatal brain. *EMBO J*. 23(22):4495-505.

Ramírez M, Gutiérrez R. (2001) Activity-dependent expression of GAD67 in the granule cells of the rat hippocampus. *Brain Res* 917:139 –146.

Sloviter RS. (1994) The functional organization of the hippocampal dentate gyrus and its relevance to the pathogenesis of temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol*. 135(6):640-54.

Walker M. C., Ruiz A., Kullmann D. M. (2001). Monosynaptic GABAergic signaling from dentate to CA3 with a pharmacological and physiological profile typical of mossy fiber synapses. *Neuron* 29 703–715 10.

Zhou et al. (2012). *Neurobiology of Psychiatric Disorders. Handbook of Clinical Neurology*.