

Tesis Doctoral

Maduración neuronal en el giro dentado del hipocampo adulto

Piatti, Verónica del Carmen

2009

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:

Piatti, Verónica del Carmen. (2009). Maduración neuronal en el giro dentado del hipocampo adulto. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Piatti, Verónica del Carmen. "Maduración neuronal en el giro dentado del hipocampo adulto". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2009.



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**MADURACIÓN NEURONAL EN EL GIRO DENTADO
DEL HIPOCAMPO ADULTO**

**Tesis presentada para optar al título de Doctor de la
Universidad de Buenos Aires en el área CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Verónica del Carmen Piatti

Directores de Tesis: Dr. Alejandro F. Schinder

Dra. Lidia Szczupak

Consejero de Estudios: Dr. Arturo Romano

Lugar de Trabajo: Fundación Instituto Leloir

Buenos Aires, 2009

Maduración neuronal en el giro dentado del hipocampo adulto

El giro dentado del hipocampo es una de las áreas del cerebro adulto capaz de generar neuronas durante toda la vida. Al momento de comenzar la presente tesis se desconocía completamente el fenómeno por el cual una célula progenitora neural (NPC) se transforma en una neurona integrada en el circuito local. Se planteó entonces el objetivo de investigar de qué manera un proceso de desarrollo neuronal se integraría en un entorno completamente funcional como el giro dentado adulto. Para caracterizar este fenómeno se marcaron las NPCs del giro dentado de ratones adultos mediante un retrovirus modificado para expresar la proteína fluorescente verde en las neuronas nuevas. Inicialmente se estudió la progenie celular a diferentes intervalos post marcado retroviral analizando la progresión temporal de marcadores neuronales, la migración, y los cambios morfológicos subyacentes. Se encontró que la determinación del destino neuronal ocurre durante los primeros días. La migración radial y el crecimiento de neuritas ocurren durante la segunda semana, momento en que se evidencia una incipiente morfología neuronal. El fenotipo neuronal maduro se alcanza durante la cuarta semana. Notablemente, la secuencia de maduración encontrada recapitula los principales eventos que ocurren durante el desarrollo perinatal, sólo que con una cinética más lenta. A partir de estas observaciones planteamos una nueva hipótesis: *la velocidad de maduración de las neuronas nuevas es modulada por la actividad neuronal del circuito local*. Dado que el hipocampo dorsal y ventral se especializan en diferentes funciones, se estudió la expresión de ARC (cuya inducción depende de actividad) y se encontró una mayor actividad y una maduración neuronal más rápida en el giro dentado dorsal. A su vez, se utilizó el ejercicio voluntario para incrementar la actividad del hipocampo y se observó una aceleración significativa de la maduración neuronal. Por lo tanto, concluimos que la tasa de maduración neuronal es modulada por la actividad del circuito local. Este fenómeno representa un nuevo mecanismo de plasticidad neuronal del hipocampo adulto.

Palabras claves: Neurodesarrollo, neurogénesis adulta, sinaptogénesis, plasticidad neuronal, microscopia confocal, actividad neuronal.

Neuronal maturation in the dentate gyrus of the adult hippocampus

The dentate gyrus is one of the areas of the adult mammalian brain that maintains the capacity to generate new neurons throughout life. At the time in which this thesis was started it was still unknown how neural progenitor cells (NPCs) become mature neurons that integrate in the local circuitry. Our initial goal was to investigate how neural development occurs in a fully functional environment such as the adult dentate gyrus. To approach this problem we labeled NPCs of the adult mouse dentate gyrus using a retroviral vector that was modified to express green fluorescent protein in newborn neurons. First, we studied the progeny of NPCs at different intervals after retroviral labeling, analyzing the temporal progression of neuronal markers, migration, and the accompanying morphological changes. We found that neuronal fate determination occurs during the first few days. Radial migration and neuritic growth occur during the second week, at which time the incipient neuronal morphology becomes evident. The mature neuronal phenotype arises during the fourth week of development. Notably, the events taking place during neuronal maturation in the adult hippocampus recapitulate the main hallmarks of perinatal development, but at a slower pace. These observations led us to put forward the hypothesis that *the rate of neuronal maturation is modulated by the activity of local circuits*. Given the functional specialization of the dorsal and ventral hippocampus, we studied ARC expression (a gene with activity-dependent induction) and found a higher level of activity and faster maturation in the dorsal dentate gyrus. Moreover, voluntary exercise was used as a behavioral tool to increase hippocampal activity, and rendered a significant acceleration in neuronal maturation. Therefore, we conclude that the rate of neuronal maturation is shaped by the activity of local circuits. This phenomenon reveals a novel mechanism of neuronal plasticity in the adult hippocampus.

Keywords: Neural development, adult neurogenesis, synaptogenesis, neuronal plasticity, confocal microscopy, neuronal activity.

AGRADECIMIENTOS

A mi Director Alejandro Schinder,

por haberme dado un lugar al inicio de su equipo
y haberme permitido entrar al mundo de las neurociencias,

por haberme guiado y ayudado en todo momento
durante estos años, con una actitud crítica y sincera que mejoró mi crecimiento
desde lo personal a lo profesional,

por su respeto, alegría, tranquilidad y mente
abierta que me ayudó a valorar y disfrutar mi trabajo potenciándolo.

A todos mis compañeros de trabajo, por haber formado un ambiente agradable
para disfrutar día a día y un excelente equipo de trabajo, sin el cual no hubiera
sido posible la realización de esta tesis.

A Sole y Diego, porque han sido mis hermanos mayores en el desarrollo de toda mi
tesis.

Al Instituto Leloir, por haber sido mi segunda casa.

A mi Mamá biológica y espiritual por la energía de todos los días.

A mi Papá y hermanos por todo el apoyo.

Además, en el transcurso de ésta tesis,

A Diego Viale, mi compañero cordobés que me ayudó a contactarme con Ale,

A Lidia Szczupak, por haber sido mi codirectora y con ello poder realizar el
doctorado en esta facultad,

A Carina Ferrari, que me enseñó con criterio a trabajar en tejido fijado y a
reconocer las células de la glía y mi primera neurona de 7 días,

A mis amigos Claudia y Edgardo que me ayudaron en los primeros tiempos duros de la ciencia,

A Nicolás Morgenstern, que con dedicación y paciencia, me ayudó en la primera parte de mi tesis obteniendo la mejor calidad de secciones de cerebro fijado listo para analizar,

A mi comité de seguimiento de tesis, Arturo Romano, Eduardo Castaño y Graciela Boccaccio y, que me aconsejaron y guiaron en la realización de esta tesis. En particular a Arturo, con quien nos pasamos horas discutiendo sobre tareas de comportamiento,

A Mariela Trinchero, que me ayudó a contar miles de espinas y neuronas ARC⁺ de la segunda parte de esta tesis,

A Georgina Davies Sala, por aconsejarme y enseñarme ítems sencillos pero fundamentales y por las discusiones de resultados e ideas en constante “brainstorming”, las cuales le dieron un marco excelente a mis resultados,

A Lucas Mongiat y Antonia Burgin, por su ayuda incondicional, consejos y discusiones,

A Guille Lanuza, que me aconsejo con criterio y me ayudó a lograr de manera exitosa la realización de algunos experimentos, como el de los progenitores,

A Sebastián Dylon, por las discusiones de estadística,

A mi amiga Nuria Romero por ayudarme a enfrentar los momentos difíciles con calma y claridad,

A Gloria Gandolfo, por ayudarme a valorar mis eventos y tener una estimación real del tiempo.

DEDICATORIA

*A mis padres, Elmo y Zulema,
Que me enseñaron desde pequeña a seguir una meta con fuerza hasta el final.*

*A mis hermanos mayores, Eleonora y Luis
Que me enseñaron a seguir mi vocación.*

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN GENERAL	11
Arreglo estructural del hipocampo.....	13
El hipocampo y su función.....	14
Desarrollo del hipocampo.....	16
Neurogénesis adulta.....	18
CAPÍTULO I: SECUENCIA DE MADURACIÓN NEURONAL	
<i>Introducción</i>	20
<i>Objetivos y estrategia experimental</i>	21
<i>Materiales y métodos</i>	
Producción de vectores virales.....	25
Animales y cirugía estereotáxica.....	26
Perfusión e inmunofluorescencia.....	26
Microscopía confocal y análisis de imágenes.....	28
Análisis estadístico.	29
<i>Resultados</i>	30
Neuronas de 7 días: selección del destino neuronal.....	30
Neuronas de 14 días: migración radial y desarrollo neurítico.....	32
Neuronas de 28 días: fenotipo maduro e integración funcional.....	35
Maduración neuronal en el giro dentado adulto.....	37
<i>Conclusiones y discusión</i>	
Determinación temprana del fenotipo neuronal.....	39

La maduración neuronal en el giro dentado adulto es una secuencia lenta y precisa.	40
La secuencia de maduración neuronal depende del tipo de neurona generada en el cerebro adulto.	42
El patrón de desarrollo neuronal perinatal y adulto del giro dentado son similares pero ocurren a velocidades diferentes	
Distribución anatómica de las poblaciones neuronales.	43
Maduración neuronal.....	45
Velocidad de maduración neuronal.....	46

**CAPÍTULO II: LA ACTIVIDAD DE LOS CIRCUITOS LOCALES REGULA
LA VELOCIDAD DE MADURACIÓN NEURONAL**

<i>Introducción</i>	49
<i>Objetivos y estrategia experimental</i>	51
<i>Materiales y métodos</i>	
Producción de vectores virales.....	53
Animales.	53
Experimentos con ARC.....	54
Marcado retroviral.....	55
Marcado con BrdU.....	55
Perfusión e inmunofluorescencias.....	56
Microscopía confocal y análisis de imágenes.....	59
Análisis estadístico.	61

Resultados

Estudio de la actividad neuronal en la GCL

Diferencias en la actividad neuronal a largo del eje longitudinal del hipocampo en condiciones basales.	62
Modificaciones en la actividad de la GCL por ejercicio voluntario.	63
<i>Mayor madurez neuronal en los microambientes más activos</i>	
Diferencias de madurez morfológica a los 21dpi.	64
Diferencias dorsoventrales en la maduración neuronal analizadas según la expresión de marcadores neuronales específicos.	68
<i>Mayor tasa de maduración neuronal en el hipocampo dorsal en condiciones sedentarias.....</i>	
Comportamiento similar de las NPCs en las regiones dorsal y ventral.	72
Las neuronas del hipocampo dorsal y ventral alcanzan el mismo estadio final de madurez.	74
Las neuronas del giro dentado ventral se desarrollan a una tasa más lenta que aquellas de la zona dorsal.	75
 <i>Conclusiones y discusión</i>	
Diferentes niveles de actividad neuronal a lo largo del eje longitudinal del hipocampo.	78
El giro dentado presenta diferentes tasas de maduración neuronal a lo largo de su eje longitudinal.	79
El ejercicio físico aumenta la actividad basal del giro dentado ventral.	82
La actividad local acelera la maduración neuronal.	83
 DISCUSIÓN GENERAL.	87
Rol funcional de la neurogénesis en el hipocampo adulto.....	87
Asociación de estímulos diferentes.	89
Mejoramiento de la calidad de los aprendizajes de experiencias futuras.	90
Regulación de la ansiedad y depresión.	90

Discriminación y reconocimiento de estímulos similares.	91
Propiedades únicas de las neuronas nuevas inmaduras del hipocampo adulto....	93
Relevancia fisiológica de tasas de maduración diferentes en el giro dentado adulto.	
.....	94
Ventaja funcional del hipocampo: Regulación de la tasa de maduración neuronal.	
.....	99
REFERENCIAS.....	102
TRABAJOS PUBLICADOS EN EL MARCO DE ESTA TESIS.	116
ABREVIATURAS.	117

INTRODUCCIÓN GENERAL

El descubrimiento de la neurogénesis en un cerebro adulto significó la ruptura de un dogma y ocurrió luego del advenimiento de la técnica de marcado in vivo de la síntesis del ADN con timidina tritiada (SIDMAN et al., 1959). Aquel dogma establecía que sólo se producirían neuronas durante el desarrollo, y estaba basado en la teoría neuronal de Ramón y Cajal de 1913 sustentada por la complejidad de las conexiones del sistema nervioso e incompatible con la integración de nuevas neuronas. En los años 60 se evidenció por primera vez la generación de neuronas nuevas en el cerebro de roedores adultos (Altman, 1963; Altman, 1969) y en los '80 en canarios adultos, donde se logró demostrar que las nuevas neuronas eran funcionales y procesaban señales aferentes en respuesta a estímulos sonoros (Goldman and Nottebohm, 1983; Paton and Nottebohm, 1984). Sin embargo, por estudios de Pasko Rakic en los que se negaba la existencia de neurogénesis adulta en primates (Rakic, 1985) el antiguo dogma prevaleció en mamíferos y, en cuanto a las aves, solo se consideró a la neurogénesis adulta una especialización evolutiva. En los años '90 el debate en contra del dogma volvió a abrirse ya que se observó diferenciación neuronal en cultivo a partir de células progenitoras neurales (NPCs) obtenidas de tejido cerebral de mamífero adulto (Reynolds and Weiss, 1992; Richards et al., 1992; Lois and Alvarez-Buylla, 1993). Finalmente, el grupo de Fred Gage confirmó y cuantificó el fenómeno en el cerebro adulto de roedores y humanos (Kuhn et al., 1996; Kempermann et al., 1997; Eriksson et al., 1998), sentando las bases para la aceptación general de la existencia e importancia de la neurogénesis adulta.

Actualmente hay un amplio consenso sobre la generación de neuronas nuevas a lo largo de la vida de los mamíferos. Sin embargo, los progenitores neurales tienen la capacidad de generar neuronas nuevas solo en dos regiones del cerebro adulto en condiciones fisiológicas, la zona subventricular lateral (SVZ) y la zona subgranular (SGZ) del giro dentado del hipocampo (Zhao et al., 2008) (Fig. 1C). En otras áreas del cerebro este fenómeno solo se observó en respuesta a daño neuronal (Magavi et al., 2000). Las neuronas nacidas en la SVZ migran grandes distancias por la vía migratoria rostral y se incorporan al bulbo olfatorio (Fig. 1C). Las neuronas nuevas de la SGZ, en cambio, se integran en el mismo circuito donde se originaron, en la propia capa granular (GCL) del giro dentado (Zhao et al., 2008) (Fig. 1D). Dado que esta tesis se

enfocó en la neurogénesis en el giro dentado del hipocampo adulto, es relevante destacar en primer lugar ciertos detalles acerca de la estructura, función y desarrollo del hipocampo.

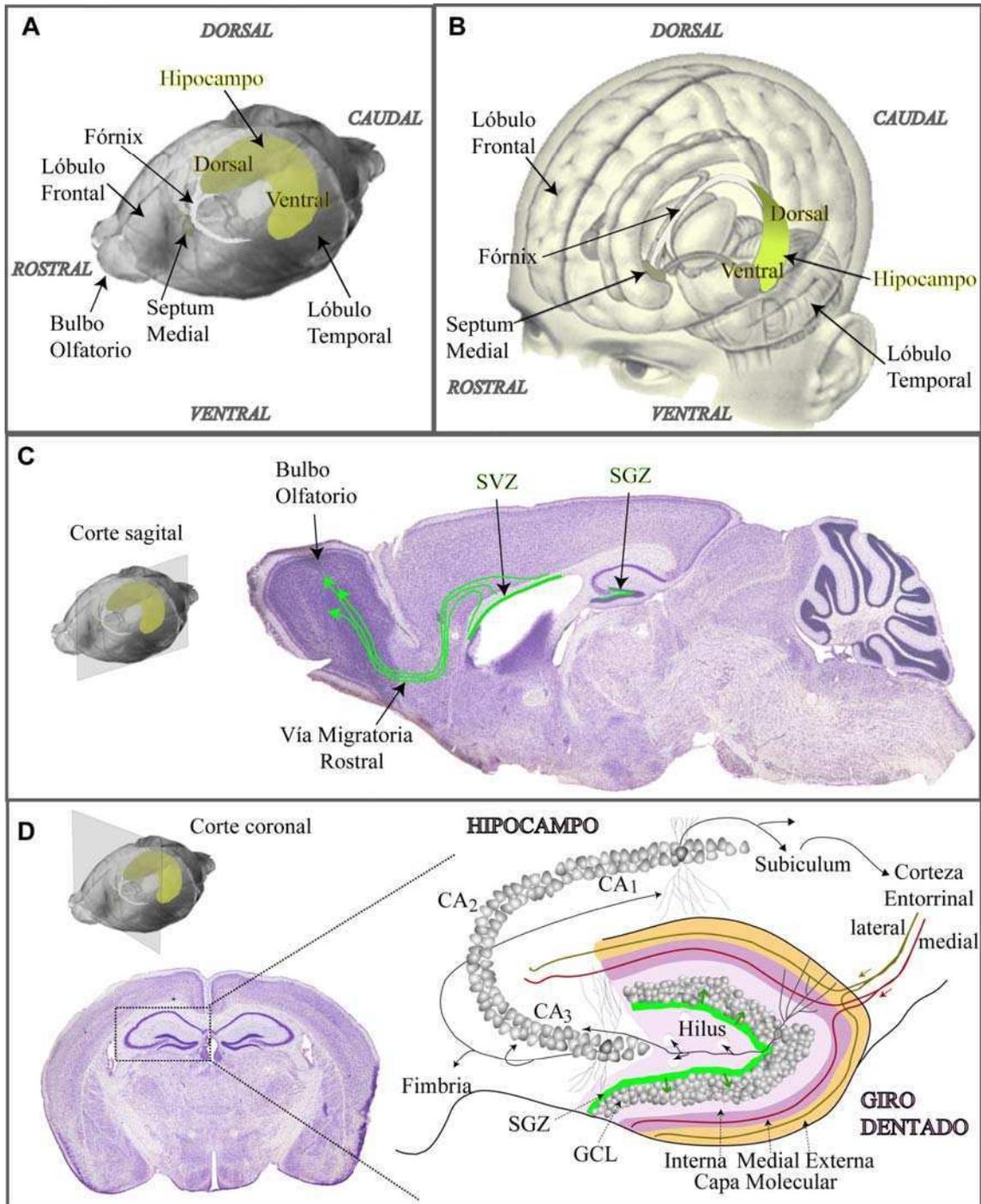


Figura 1: Identificación del hipocampo y las zonas neurogénicas en el cerebro adulto. **A.** Esquema de la anatomía 3D del hipocampo en el cerebro de ratón. El eje longitudinal se extiende desde el septum (dorso-rostral) al lóbulo temporal (ventro-caudal) del cerebro. **B.** Esquema de la anatomía 3D del hipocampo en el cerebro humano. Notar que el extremo más dorsal del eje longitudinal ya no está cerca del septum y ahora es caudal. **C.** Zonas neurogénicas en el cerebro adulto. A la izquierda, se muestra el eje de corte sagital en el cerebro de ratón. A la derecha, imagen de un corte sagital con tinción de Nissl, del atlas del cerebro de ratón de G. Paxinos y K. Franklin. La cual indica en verde las zonas de

neurogénesis y la corriente migratoria (flechas) de neuroblastos y neuronas nuevas hacia el bulbo olfatorio. **D.** Organización anatómica del hipocampo. A la izquierda superior, se muestra el eje de corte coronal en el cerebro de ratón. A la izquierda inferior, imagen de un corte coronal con tinción de Nissl del atlas de Paxinos y Franklin, remarcando un hipocampo que se detalla anatómicamente a la derecha. Los axones de las neuronas de la capa II de la corteza entorrinal (principal aferencia) se segregan en la capa molecular medial o externa del giro dentado de acuerdo a su proveniencia; medial o lateral, respectivamente. Los mismos axones también proyectan en forma directa sobre CA₃. Los axones de las células granulares se ramifican y contactan a las interneuronas del hilus y a las células piramidales de CA₃. Estas a su vez ramifican y proyectan sus axones a otras neuronas de CA₃ recurrentes, al hipocampo contralateral a través de la fimbria comisurales y a las neuronas de CA₁ *schaffer collaterals*. Las neuronas de CA₁ ya sea a través del subiculum o directamente, proyectan sus axones hacia la corteza entorrinal completando el *loop* glutamatérgico cortical. Por simplificación se representó de manera cualitativa una neurona principal dentro de cada subdivisión del hipocampo y el giro dentado con su árbol dendrítico y axonal. En verde se detalla la zona neurogénica y con flechas la integración de las neuronas nuevas en la GCL.

Arreglo estructural del hipocampo

La formación hipocampal comprende cuatro estructuras corticales; el giro dentado, el hipocampo propiamente dicho que se divide en las subregiones *cornu ammonis* (CA) 1,, 2 y 3, el complejo subicular que incluye al subículo, parasubículo y presubículo y por último la corteza entorrinal que en roedores se divide en lateral y medial. La forma tridimensional de dicha estructura es relativamente compleja, ya que su eje longitudinal se dobla formando una “C” y se extiende desde el septum (dorso-rostral) al lóbulo temporal (ventro-caudal) del cerebro, denominándose eje “septo-temporal” en roedores (Amaral and Witter, 1989) (Fig. 1A). En los primates dicho eje rotó 90° rostro-caudalmente por el mayor desarrollo de los lóbulos frontal y temporal (Fig. 1B). Para facilitar entonces la lectura de la tesis hablaremos del eje longitudinal del hipocampo como “dorso-ventral” para poder utilizarlo en toda la escala de mamíferos y llamaremos “hipocampo” a la estructura que incluye además el giro dentado.

El hipocampo se distingue por su organización anatómica laminar con límites definidos, que lo convirtió en un excelente objeto de estudio. Las neuronas principales son glutamatérgicas y comprenden las granulares en el giro dentado, y las piramidales localizadas en CA₁, CA₂ y CA₃ todas ellas dispuestas en una única capa de somas. Las neuronas granulares presentan su aferencia en la capa molecular y su eferencia (*mossy fibers*) en el hilus y CA₃ (Fig. 1D). A su vez la capa molecular comprende 3 sub-capas (interna, medial y externa) con axones de diferente procedencia que proporcionan especificidad de los estímulos que llegan a cada porción del árbol dendrítico de las células granulares (Forster et al., 2006). La capa molecular interna presenta las fibras

comisurales y de asociación que se originan en el hilus ipsi y contralateral y contactan segmentos dendríticos proximales de las neuronas granulares. Los axones capa medial pertenecen a las neuronas más superficiales de la corteza entorrinal medial y transmiten principalmente información espacial (Hargreaves et al., 2005). Y por último, en el tercio más externo se encuentran los axones que contactan los segmentos dendríticos más distales y se originan en las neuronas más superficiales de la corteza entorrinal lateral.

Además, las proyecciones aferentes y eferentes del hipocampo también se encuentran organizadas en el eje longitudinal. La principal aferencia, la corteza entorrinal, inerva con su banda más dorso-lateral al hipocampo más dorsal y la banda más ventro-medial a la región más ventral del hipocampo (Amaral and Witter, 1989). Estas bandas presentan diferente conectividad: mientras que la región que proyecta al hipocampo dorsal recibe proyecciones de la neocorteza, la región que proyecta al hipocampo ventral recibe aferentes de núcleos subcorticales, como la amígdala (Dolorfo and Amaral, 1998a; Dolorfo and Amaral, 1998b). Más aún, hay conexiones directas entre el hipocampo ventral y la corteza prefrontal, la amígdala, el hipotálamo y otros núcleos subcorticales, ausentes en la región más dorsal del hipocampo (Verwer et al., 1997; Pitkanen et al., 2000; Kishi et al., 2006; Cenquizca and Swanson, 2006) lo cual contribuye a la marcada diferencia anatómica y funcional que caracteriza al eje longitudinal del hipocampo.

El hipocampo y su función

¿De qué nos sirve tener un hipocampo? La respuesta a dicha pregunta es relevante a la hora de tratar de responder la siguiente ¿por qué o para qué hay neurogénesis en el hipocampo adulto? Aunque muchos trabajos recientes investigaron esta última pregunta, ninguna de las respuestas es clara y existen controversias. Incluso, a la hora de explicar el rol funcional del hipocampo. Lo cual se tratará de explicar a continuación, dejando para la discusión final el rol de las neuronas nuevas.

Curiosamente y de acuerdo con la segregación estructural mencionada previamente, el hipocampo se diferencia funcionalmente en su eje longitudinal, siendo la región dorsal la más involucrada en el procesamiento espacial y la región ventral en

los procesos de ansiedad y control inhibitorio del comportamiento (Bast and Feldon, 2003; Bannerman et al., 2004). Por ejemplo, lesiones específicas en la región dorsal y no en la ventral en las ratas determinan deficiencias en el aprendizaje espacial del test de navegación de Morris (MWM), el cual consiste en un estanque con agua opaca y una plataforma sumergida que el animal debe aprender a localizar a través de sucesivas pruebas utilizando claves espaciales del ambiente (Moser et al., 1995a). En cambio, ratas con lesiones específicas en la región ventral y no en la dorsal presentaron menor respuesta neuroendocrina durante la exposición a una caja en el centro de una pileta iluminada y menor ansiedad en el test elevado de cuatro brazos (paradigma que mide la exploración del animal en un dispositivo de 4 brazos radiales, 2 abiertos y 2 cerrados, que se encuentra iluminado y elevado) (Kjelstrup et al., 2002). Las diferencias funcionales favorecen la idea de una segregación funcional, con posibilidad de múltiples representaciones de un mismo evento a lo largo del eje dorso-ventral. La capacidad de codificar diferentes estímulos con una única representación topográfica a lo largo del eje longitudinal del hipocampo proporcionaría un re-acceso a las diferentes regiones de la neocorteza asociadas con cada estímulo a posteriori. De acuerdo con ello, se observó que si un aprendizaje requiere la asociación de dos estímulos que separados presentaron patrones de activación opuestos en el eje longitudinal del hipocampo en humanos, el patrón de activación resultante de la asociación, no es una adición, sino un patrón diferente en la región central del eje longitudinal (Small et al., 2001). Esto sugiere que el hipocampo podría actuar como una zona de convergencia de datos codificados en zonas anatómicamente distantes en la neocorteza, contribuyendo a su activa asociación.

Interesantemente, si se hubiera preguntado de qué sirve tener un hipocampo hace 300 millones de años, la respuesta de mejor elección hubiera sido algún rol en la memoria espacial (Bingman, 1992). Esto proviene de la observación de que los peces teleósteos y reptiles procesan información espacial con la estructura homóloga al hipocampo (Rodríguez et al., 2002b; Rodríguez et al., 2002a; Treves et al., 2008a). Las aves también han conservado dicha función en la misma estructura homóloga (Bingman and Jones, 1994; Vargas et al., 2004). Las primeras evidencias de que el hipocampo provee un mapa de referencia espacial provino de los experimentos de O'Keefe en los años 70 (O'Keefe and Dostrovsky, 1971; O'Keefe, 1976). Utilizando multielectrodos implantados en el hipocampo de ratas se describieron células que se activan

específicamente cuando el animal ocupa una determinada posición del espacio (*place cell*) mientras el animal explora un ambiente determinado. Por lo tanto el rol del hipocampo en la memoria espacial se encuentra totalmente aceptado.

La capacidad de poder trazar un mapa físico mentalmente podría facilitar la formación de memoria episódica de los eventos que ocurrieron en cada lugar. De hecho, se demostró que el hipocampo es crítico en éste procesamiento mnésico en humanos (Lehn et al., 2009; Heckers et al., 2004; Scoville and Milner, 2000). El caso clínico más famoso, fue el del paciente H. M., quien después de la remoción bilateral de gran parte del hipocampo se olvidaba de todos los eventos de su vida diaria luego de pocos minutos. La consistencia con diversos pacientes con el mismo tipo de cirugía puso en evidencia el rol del hipocampo en el procesamiento de memorias recientes (Scoville and Milner, 2000). También se demostró que ratas con el hipocampo lesionado no pueden discriminar el orden temporal de una secuencia de 4 eventos (olores asociados a un lugar) mientras que las ratas control no muestran inconvenientes (Ergorul and Eichenbaum, 2004). Por ello se postuló que el hipocampo podría ser un organizador de representaciones temporales (Eichenbaum et al., 1999) que luego serían almacenadas a largo plazo en otros centros corticales, probablemente aquellos con los que el hipocampo se interrelacionó durante la consolidación de dichas memorias (Alvarez and Squire, 1994).

Desarrollo del hipocampo

La mayoría de de las áreas del cerebro se desarrolla completamente durante la embriogénesis. En el hipocampo de ratón, la neurogénesis de las interneuronas GABAérgicas finaliza en el día embrionario 15 (Soriano et al., 1986), mientras que la producción de neuronas piramidales termina en el día embrionario 18. A su vez, los axones de la corteza entorrinal medial y lateral, principal aferencia excitatoria, arriban a la capa molecular del giro dentado a mediados de la primer semana postnatal (Fricke and Cowan, 1977), manteniendo desde el comienzo de su desarrollo la segregación espacial que los caracteriza. Sin embargo, la GCL del giro dentado se desarrolla en un 80 % durante las primeras semanas postnatales y continúa generando neuronas durante toda la vida del individuo, aunque disminuyendo la tasa de neurogénesis drásticamente

durante la vejez. De esta manera, cuando la mayoría de las neuronas granulares se desarrollan la estructura del circuito ya ha sido finalizada (Lubbers et al., 1985; Lubbers and Frotscher, 1988).

El desarrollo del giro dentado comienza a partir de la migración de NPCs del neuroepitelio dentado primario, las cuales forman una matriz dentada secundaria adyacente a la fimbria, durante la embriogénesis (Fig. 2A). En los últimos estadios embrionarios, neuroblastos migran desde la matriz secundaria al primordio del giro dentado y se alinean para formar la capa externa superior de la futura GCL (Fig. 2A). Luego del nacimiento, se genera una segunda ola de migración tangencial que da origen a la matriz dentada terciaria (ubicada donde se formará el hilus) y a la GCL inferior (Fig. 2B). Los neuroblastos de la matriz terciaria migran radialmente para formar la parte más interna de la GCL (Fig. 2B). Finalmente, alrededor del día postnatal 20 los progenitores neurales se acumulan en la SGZ donde continúan generando neuronas nuevas durante toda la vida del individuo (Fig. 2C) (Altman and Bayer, 1990; Kempermann et al., 2003).

En conclusión, la GCL resultante presenta un gradiente bidimensional de desarrollo formado por la combinación de corrientes migratorias tangenciales y radiales que determina poblaciones neuronales de diferentes edades. En el eje tangencial, las neuronas localizadas en la GCL superior son más viejas que las de la capa inferior. En el eje radial, las neuronas más internas adyacentes a la SGZ son más nuevas que las más externas. Este patrón de desarrollo en el eje radial se denomina “*outside-in*”, indicando que la región más externa de la capa antecede a la interna, característica distintiva de las neuronas granulares del giro dentado. Por el contrario, el resto de las corticales siguen el patrón inverso de desarrollo “*inside-out*”, donde las neuronas más nuevas migran hacia la parte más externa de la capa (Soriano et al., 1994).

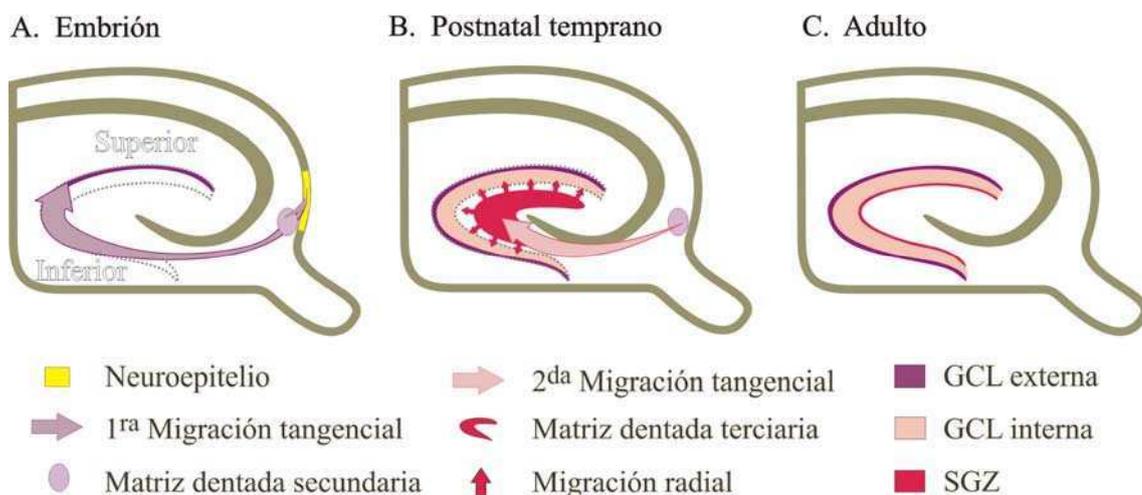


Figura 2: *Desarrollo del hipocampo.* Esquema del hipocampo representando el desarrollo del giro dentado. La zona de punteada representa la futura GCL. Notar que lo primero en formarse es la parte externa de la GCL superior. Modificado de Piatti et al., 2006.

Neurogénesis adulta

La neurogénesis en el hipocampo adulto es un fenómeno conservado durante la evolución de los vertebrados. Por ejemplo, en el hipocampo homólogo de lagartijas adultas se reportó generación de nuevas neuronas con características similares a las neuronas granulares del giro dentado de mamíferos. Más interesante aún es que se haya encontrado neurogénesis adulta en la formación hipocampal homóloga de las aves, cuando no tienen ninguna estructura parecida al giro dentado o al menos es mucho más debatida (Treves et al., 2008a). Por lo tanto, a pesar que aún se desconoce el significado fisiológico del nuevo aporte neuronal en las regiones del cerebro adulto que lo reciben, parece haber sido una estrategia evolutiva favorable para el procesamiento de información que llevan a cabo.

Por otro lado, la generación de neuronas nuevas en los mamíferos podría ser un proceso marginal del giro dentado por su desarrollo neuronal tardío. Por ello las neuronas nuevas no llegarían a ser funcionales en el circuito del animal adulto. Sin embargo se demostró fehacientemente que las neuronas nuevas son capaces de procesar información de la misma manera que las neuronas granulares preexistentes en el hipocampo adulto (van Praag et al., 2002). Más aún, se produce un significativo número de neuronas por mes (3-6 % respecto de la población total de neuronas granulares) en condiciones basales (Cameron and McKay, 2001) y la tasa de

neurogénesis es regulada por estímulos fisiológicos. Por ejemplo, la actividad física voluntaria, el ambiente enriquecido, algunos paradigmas de aprendizaje y condiciones patológicas como la epilepsia y la isquemia aumentan el número de neuronas nuevas (van Praag et al., 1999b; Parent and Lowenstein, 2002; Kokaia and Lindvall, 2003). En cambio situaciones de estrés, depresión y envejecimiento disminuyen la tasa de generación de neuronas nuevas (Duman, 2004; Morgenstern et al., 2008). Por último, manipulaciones que reducen la neurogénesis también alteran comportamientos dependientes del hipocampo y el desempeño en paradigmas de aprendizaje espacial (Shors et al., 2001; Snyder et al., 2005; Dupret et al., 2008).

En resumen, una vasta literatura demuestra la importancia de la neurogénesis adulta en el hipocampo de mamíferos, siendo un proceso que puede regular la función del hipocampo, así como en feedback el funcionamiento de éste pueden regular el proceso de neurogénesis. A pesar de ello, los mecanismos y tiempos de modulación no están claros. Por lo cual, primero es necesario caracterizar la secuencia de desarrollo que una célula debe seguir para llegar a ser una neurona funcional en el circuito adulto (capítulo I), para luego tratar de entender su modulación (capítulo II).

CAPÍTULO I

SECUENCIA DE MADURACIÓN NEURONAL

Introducción

La neurogénesis es un proceso complejo de desarrollo que involucra varias etapas comenzando por la proliferación de las NPCs, la posterior adquisición de fenotipo (astrocito, oligodendrocito o neurona) por la progenie celular y posteriormente la maduración hasta completar su desarrollo. Durante la maduración las células migran, establecen las conexiones apropiadas con la red inhibitoria y excitatoria, adquieren excitabilidad y comienzan a sintetizar y liberar el neurotransmisor apropiado, en un tiempo determinado. A pesar que en todo el cerebro adulto hay NPCs, solo en las zonas neurogénicas, la SGZ y la SVZ adquieren el fenotipo neuronal en condiciones normales (Zhao et al., 2008; Gage, 2000) (Fig. 1C). Si se aíslan células progenitoras del hipocampo adulto y luego de expandirlas *in vitro* se transplantan en regiones no neurogénicas como el cerebelo o el cuerpo estriado la progenie solo se diferencia a células gliales mientras que si se transplantan en las zonas neurogénicas se diferencian al tipo de neurona apropiada de cada región (Gage, 2000).

En particular el giro dentado adulto es el único donde se sustenta el proceso completo de neurogénesis ya que las neuronas nuevas se generan en la SGZ y se integran a la misma GCL, mientras que las neuronas generadas en la SVZ migran grandes distancias para integrarse al bulbo olfatorio (Fig. 1C). Con el desarrollo de la técnica de marcación retroviral se observó que en el giro dentado se generan células granulares funcionalmente integradas como las neuronas preexistentes (van Praag et al., 2002). El retrovirus, genéticamente modificado para expresar de manera constitutiva GFP, es capaz de integrarse únicamente al genoma de células en división. Por lo cual, los progenitores y su progenie expresan GFP permanentemente en toda la célula facilitando estudios morfo-funcionales. De ese modo se demostró que las neuronas nuevas generadas en la SGZ poseen una morfología característica de célula granular madura al mes de desarrollo en el hipocampo adulto (Fig. 3). Más aún, se observaron

las mismas propiedades electrofisiológicas y de plasticidad sináptica con la aferencia glutamatergica entre las neuronas granulares preexistentes y las neuronas nuevas de 1 a 2 meses de desarrollo (van Praag et al., 2002). Por otro lado, aunque se desconocía la conectividad eferente funcional, la proyección axonal de las neuronas nuevas de 1 a 3 meses de edad se encontró en el hilus y CA₃ como la de las neuronas granulares maduras (Markakis and Gage, 1999; van Praag et al., 2002).

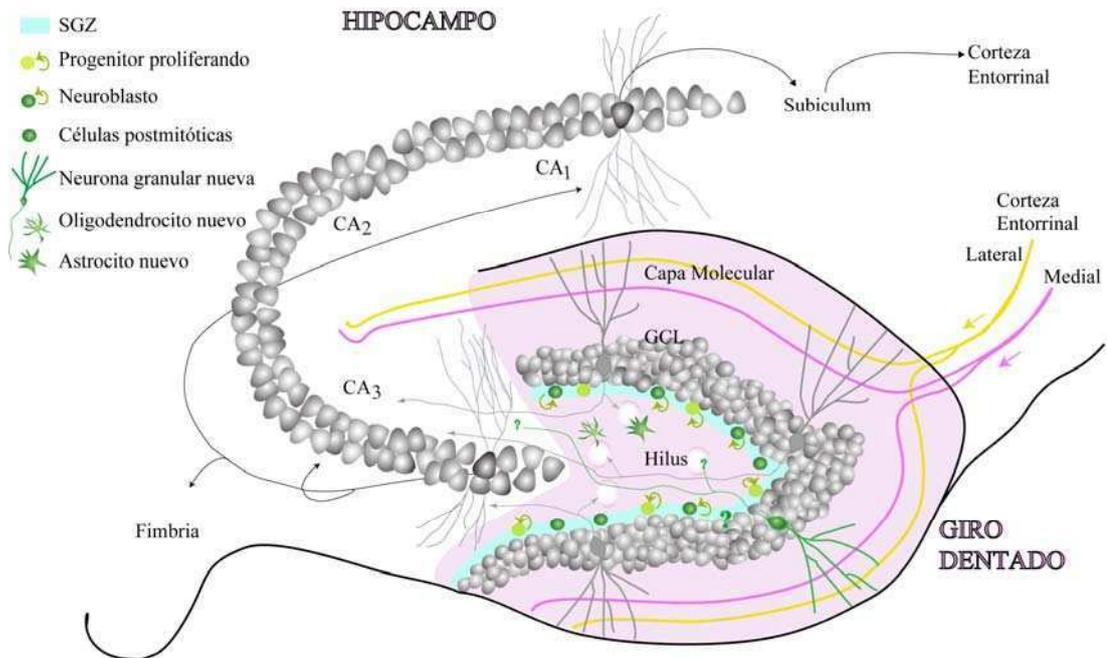


Figura 3: *Neurogénesis adulta en el giro dentado.* Esquema del hipocampo representando la continua neurogénesis en un circuito funcional. NPCs en la SGZ dan origen a las células gliales, astrocitos y oligodendrocitos, y a neuroblastos que continúan proliferando para luego diferenciarse a neuronas granulares. Las neuronas nuevas se integran a la capa granular con características morfofuncionales típicas de neuronas granulares. Los signos de interrogación indican el desconocido proceso de maduración neuronal y conectividad eferente funcional, al inicio de la presente tesis. Esquema armado con la ayuda de MG Davies Sala.

Por otro lado, se mostró que el 80-90 % de la progenie celular de las NPCs en el giro dentado adquiere un fenotipo neuronal entre el 1^{ro} y 7^{mo} día después del marcado de los progenitores con una única inyección con bromodeoxiuridina (BrdU) (Brown et al., 2003; Brandt et al., 2003; Kempermann et al., 2003) (Fig. 3). BrdU es un análogo sintético de la timidina, que se incorpora al ADN en la fase S del ciclo celular, logrando la posterior identificación de las células en división y su progenie. De ese modo, la

técnica de marcado con BrdU permitió el redescubrimiento de la existencia de neurogénesis en el cerebro adulto de mamíferos (Kuhn et al., 1996; Kempermann et al., 1997). Sin embargo, dicha técnica ofreció limitaciones para analizar las propiedades morfológicas y funcionales de las neuronas nuevas ya que solo marca el núcleo de las células una vez fijadas.

Interesantemente, solo el 25 al 50 % de las neuronas granulares nuevas del giro dentado adulto sobrevive al primer mes de desarrollo y luego permanecen estables por largos períodos (hasta 11 meses testeados). En cambio las neuronas nacidas durante el desarrollo temprano del individuo continúan muriendo a largo plazo (Dayer et al., 2003; Kempermann et al., 2003). Dado que los neuroblastos salen del ciclo celular como máximo al 4^{to} día de desarrollo (Dayer et al., 2003) la etapa de maduración neuronal debería estar finamente controlada para lograr la correcta integración neuronal en el circuito funcional del animal adulto. Sin embargo al inicio de la presente tesis, se desconocía cómo y cuándo ocurría el dicho proceso de maduración. Nos propusimos entonces, caracterizar los eventos claves de dicho proceso como primer objetivo de la presente tesis.

Objetivos y estrategia experimental

La maduración neuronal en el giro dentado adulto debería ser un proceso muy preciso y controlado, ya que al mismo tiempo distintas cohortes de neuronas nuevas deben leer apropiadamente las diferentes claves ambientales para lograr su integración y estabilidad en la GCL. Entonces, nos propusimos caracterizar la secuencia de desarrollo neuronal en el hipocampo adulto con los siguientes objetivos específicos:

- Identificar los distintos estadios de maduración neuronal evaluando la expresión de marcadores neuronales;
- Analizar la migración neuronal en el giro dentado adulto, estudiando la distribución celular en la GCL a distintos tiempos de desarrollo;
- Estudiar las características morfológicas de las neuronas nuevas durante su transición hacia el fenotipo de neurona granular madura.

Para lograr éstos objetivos específicos propuestos se contó con las siguientes estrategias (Fig. 4):

1- Inyección estereotáxica en el giro dentado de ratones adultos jóvenes (entre 6 y 7 semanas de edad) de un retrovirus que codifica GFP para marcar específicamente las NPCs y su progenie (van Praag et al., 2002). Para lograr tener mayor número de células marcadas se agregaron ruedas a las cajas de los animales 3 días antes de la cirugía ya que se demostró que correr aumenta la tasa de neurogenesis (van Praag et al., 1999b; Parent and Lowenstein, 2002; Kokaia and Lindvall, 2003) (Fig. 4A-C).

2- Se sacrificó a los animales a los 7, 14 y 28 días post inyección (dpi) para obtener poblaciones de células nuevas en distinto estadio del desarrollo. Debido a que las NPCs no se mantienen proliferando por largos periodos (Dayer et al., 2003), los diferentes tiempos post inyección nos permitió seguir la dinámica de maduración neuronal a través del tejido fijado.

3- Se analizó la extensión de la inflamación que podría ocasionar la cirugía en cada ratón y se consideraron solamente las secciones que presentaron bajos niveles de inflamación. Los signos de inflamación se evidenciaron por el aumento en la reactividad de GSA, lectina que se expresa en la microglía activada, entre el hemisferio inyectado y el contralateral (Streit and Kreutzberg, 1987; Boya et al., 1991) (Fig. 4D).

4- Se identificó el fenotipo neuronal de la progenie celular GFP⁺ a través de triples inmunofluorescencias para marcadores neuronales utilizando microscopía confocal en el tejido saludable. Los marcadores que se utilizaron fueron: doublecortin (DCX), proteína asociada a los microtúbulos que se expresa en el citoplasma celular durante la migración neuronal (Brown et al., 2003) y el factor de transcripción nuclear NeuN, proteína neuronal constitutiva (Mullen et al., 1992) (Fig. 4E).

Una vez lograda la identificación de las neuronas nuevas entre las células GFP⁺, se analizó su ubicación en la GCL y su morfología. La migración neuronal se estudió asignando cada neurona GFP⁺ a la SGZ o a una de las tres divisiones de la GCL (Fig. 4F).

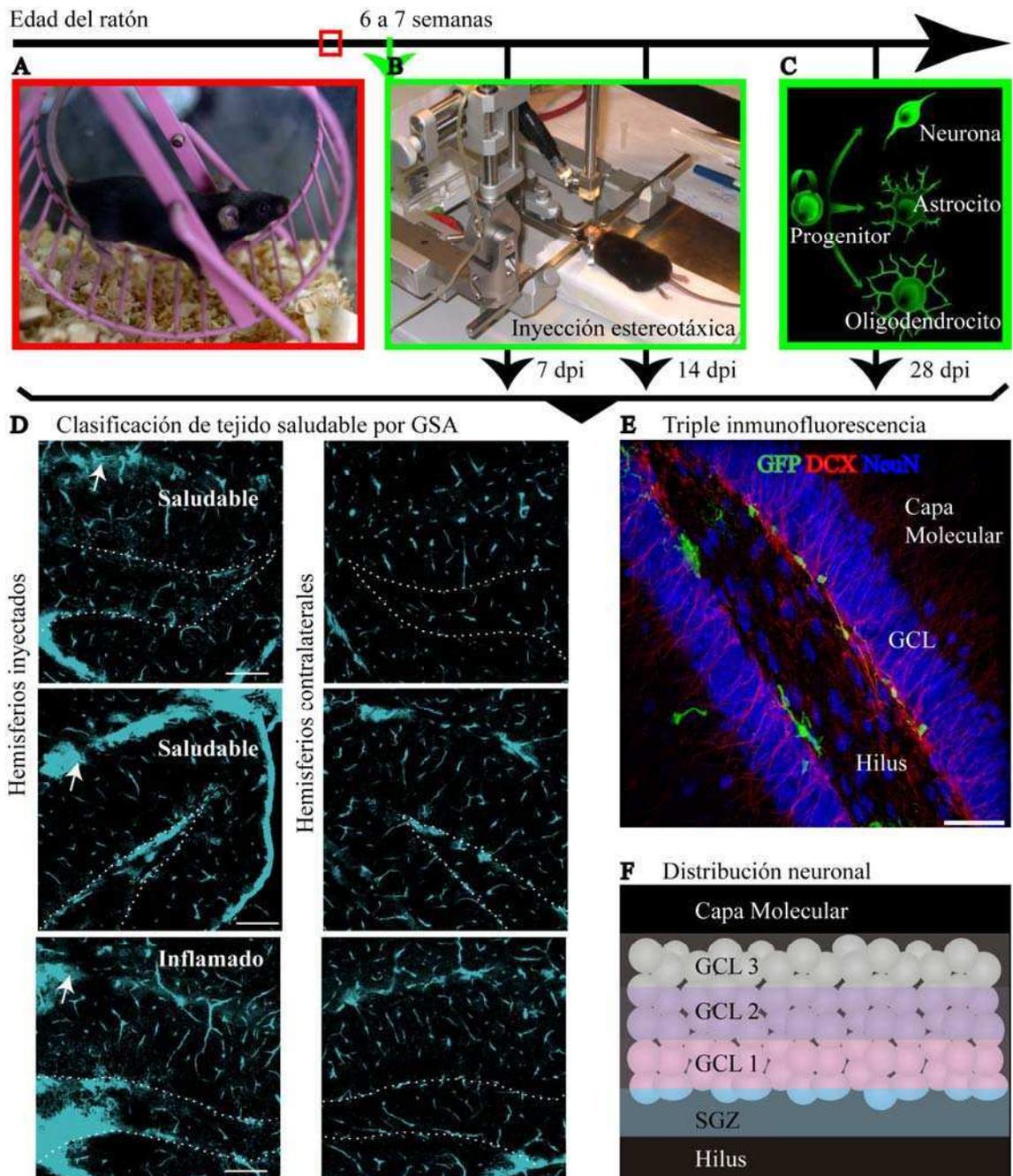


Figura 4: Estrategia experimental. **A.** Ratones hembra de 6 a 7 semanas de edad comenzaron a correr en ruedas ubicadas en sus cajas 3 días previos a la cirugía. **B.** Los animales se sometieron a una cirugía estereotáxica para inyectar el retrovirus que expresa GFP específicamente en el giro dentado. **C.** Las NPCs infectados por el retrovirus dan origen a neuronas, astrocitos y oligodendrocitos que expresan permanentemente GFP (esquema). **D.** A los 7, 14 y 28 dpi se sacrificaron los animales y se realizaron las inmunofluorescencias para evaluar la inflamación producida por la cirugía en cada animal. Las imágenes son ejemplos pareados del hipocampo inyectado y su contralateral con diferentes niveles de reactividad a GSA. Los paneles superiores muestran la máxima reactividad de GSA que se consideró en las secciones saludables, cuando no hubo señal inespecífica en el hemisferio contralateral (primer par) o cuando hubo (segundo par). El tercer par de imágenes muestra el nivel de GSA mínimo, comparado con la señal inespecífica del contralateral, que se consideró inflamado. Las imágenes son planos ópticos de 1 μm de espesor obtenidas con microscopía confocal. Las líneas punteadas indican la SGZ y las flechas indican la fisura hipocampal que suele presentar signos de inflamación. Escalas: 100 μm . **E.** Se analizó el desarrollo neuronal en las triples inmunofluorescencias de las secciones consideradas saludables de 7, 14 y 28 dpi. La imagen es una proyección en el eje vertical (Z) de 33 planos confocales de una sección coronal del giro dentado a 7 dpi como ejemplo del triple marcado GFP (verde), DCX (rojo) y NeuN

(azul). Escala: 50 μm . Nota: Observar la distribución en la SGZ de todas las células GFP⁺ a los 7 dpi. **F.** Esquema de la SGZ y las divisiones equidistantes de la GCL que se utilizaron para analizar la distribución de las neuronas GFP⁺ a los 7, 14 y 28 dpi. La GCL fue dividida en tercios, desde la zona más interna adyacente al hilus “GCL 1”, a la zona más externa adyacente a la capa molecular “GCL3”.

Materiales y métodos

Producción de vectores virales

En el presente capítulo se utilizó un retrovirus desarrollado por H. van Praag en el laboratorio de F. H. Gage (Salk Institute, La Jolla, California) y cedido gentilmente para su uso en nuestro laboratorio. Es un retrovirus no replicativo derivado del Moloney murine leukemia virus (MMLV) que expresa la proteína GFP bajo el promotor de citomegalovirus (CMV), promotor constitutivo medianamente fuerte (van Praag et al., 2002). Para la producción del virus contamos con células HEK (*human embryonic kidney*) 293T establemente transfectadas usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) con un plásmido conteniendo el gen que codifica para la proteína de la cápside. Dicho plásmido se produjo en condiciones libres de endotoxina a partir de bacterias *E. coli* XL1-blue transformadas, siguiendo un protocolo comercial modificado del protocolo de lisis alcalina (*Maxiprep endotoxin-free, Qiagen*).

Las células HEK 293T fueron cultivadas en DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Gibco, Invitrogen) suplementado con: 10 % de suero fetal bovino, glutamina (200 mM) y gentamicina (50 mg/ml). Luego de 48 hs el sobrenadante conteniendo el virus fue cosechado, filtrado y concentrado mediante dos rondas de ultracentrifugación. Finalmente, el virus fue resuspendido en DPBS estéril (*Dulbecco's phosphate buffered saline*) y conservado a -80° C hasta el momento de su uso. La producción del virus fue realizada por AF Schinder y DA Laplagne.

Animales y cirugía estereotáxica

Se utilizaron ratones C57Bl6/J hembra de 6 a 7 semanas de edad (al momento de la cirugía) en jaulas grupales de 3 a 6 animales habituados a nuestra sala de bioterio desde una semana previa a todos los experimentos. Tres días antes de la cirugía se colocaron ruedas en las jaulas para correr (una rueda cada tres individuos, Fig. 4A). Las ruedas permanecieron en las jaulas hasta el final de los experimentos.

Para la cirugía, los ratones se anestesiaron intramuscularmente con 100 µg de ketamina y 10 µg de xilazina en 10 µl de PBS (*Phosphate buffered saline*) por gramo de peso corporal. Una vez anestesiado cada ratón fue colocado en el aparato estereotáxico (Stoelting), donde se procedió a marcar bajo lupa las coordenadas de la inyección. Todas las inyecciones fueron realizadas en el giro dentado del hemisferio derecho utilizando las siguientes coordenadas tomadas desde el Bregma: -2 mm antero-posterior, 1.5 mm lateral y 1.9 mm ventral. En la coordenada marcada se afinó el hueso craneal con un taladro y se levantó el hueso restante realizando un troquelado con una aguja fina, logrando no dañar la corteza y sin retirar la duramadre. Luego, se inyectó 1 µl de virus en 7 minutos utilizando un capilar calibrado (Drummond Scientific) estirado por calor con un puller (Fig. 4B). La piel del animal se cerró utilizando cemento ultrarrápido en base a cianocrilato “La Gotita”. Finalmente se observó la recuperación adecuada de los animales.

Perfusión e inmunofluorescencia

Los animales fueron anestesiados con la misma composición de la anestesia utilizada para la cirugía. La perfusión cardíaca se realizó por el ventrículo izquierdo durante 25 minutos, primero con 50 ml de solución fisiológica con heparina (2.5 U/ml) y luego con 100 ml de paraformaldehído (PFA) 4 % en buffer fosfato (PB) 0.1 M pH 7.2 que fue preparado inmediatamente antes de la perfusión. Al finalizar, se removió el cerebro y se lo dejó en PFA 4 % a 4° C por toda la noche. Al día siguiente, los cerebros fijados se pasaron a sacarosa 30 % en PB 0.1 M y se mantuvieron a 4° C hasta que descendieron al fondo del tubo. Luego, se secaron y se congelaron en 3 minutos con isopentano contenido en un recipiente con hielo seco y etanol 96 %. Los cerebros

congelados se mantuvieron a -20°C hasta que fueron cortados con un crióstato (Leica CM 1850) en rodajas coronales de $40\ \mu\text{m}$. Por último, las rodajas se mantuvieron a -20°C en solución criopreservadora (3 volúmenes de glicerol, 3 volúmenes de etilenglicol y 4 volúmenes de PB 0.2 M) hasta el momento de realizarse la inmunofluorescencias.

Las inmunofluorescencias fueron realizadas con la técnica de “*free-floating*” (rodajas libres en solución) utilizando secciones a través de todo el hipocampo. Se utilizaron 1 cada 3 secciones hasta obtener más de 50 células GFP⁺ por ratón. El protocolo consistió en:

Elección de las secciones en PB 0.1 M,

- 1) 3 lavados de 5 minutos con TBS 1 X con agitación a temperatura ambiente (Tamb).
- 2) 1 hora de bloqueo (Solución de bloqueo: TBS 1 X con 3 % de suero de burro y 0.25 % de Tritón X-100) con agitación a Tamb.
- 3) 48 horas de incubación con los anticuerpos primarios con agitación a 4°C .
- 4) 2 lavados de 15 minutos con TBS 1 X con agitación a Tamb.
- 5) 15 minutos de bloqueo con agitación a Tamb.
- 6) 2 horas de incubación con el anticuerpo secundario con agitación a Tamb.
- 7) 3 lavados de 5 minutos con TBS 1 X con agitación a Tamb.
- 8) 10 minutos de incubación con DAPI para contratinción fluorescente.
- 9) 4 lavados de 5 minutos con TBS 1 X con agitación a Tamb.
- 10) Montaje con PVA-DABCO.
- 11) Secado de los portaobjetos en oscuridad por una noche a Tamb.
- 12) Secado de los portaobjetos en oscuridad por 2 a 5 días a 4°C . Los portaobjetos permanecen a 4°C hasta completar los análisis debido a una mayor estabilidad de los fluoróforos.

Todos los anticuerpos fueron aplicados en la solución de bloqueo. Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: NeuN, anticuerpo monoclonal de ratón (1:50, FH Gage); DCX, anticuerpo policlonal de conejo (1:750, cedido gentilmente por

C. Walsh, Harvard Medical School, Cambridge, MA); GFP, anticuerpo policlonal de pollo (1:500, Invitrogen). Se utilizaron los siguientes anticuerpos secundarios (1:250, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA): ratón Cy5 (cyanine 5), conejo Cy3 y pollo Cy2 todos hechos en burro. GSA (1:100, Vector Laboratories) y estreptoavidina Cy5 (1:200, Jackson ImmunoResearch) se utilizaron para evaluar la inflamación producida por la cirugía. Para la realización de las perfusiones e inmunohistoquímicas se contó con la ayuda de NA Morgenstern. Las soluciones utilizadas fueron las siguientes:

- TBS 10 X, 132.2 g de Trizma HCl, 19.4 g de Trizma Base y 90 g de NaCl, pH 7.5;
- DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, Sigma D9542), 3 μ l del stock en 30 ml de TBS 1 X (Stock en -20° C: 1 mg/ml, 3 mM) y
- PVA-DABCO, 2.5 % de polyvinyl alcohol (PVA) y 2.5 % de 1.4 diazabicyclo (2.2.2) octane (DABCO) (Sigma D2522) con glicerol y 0.2 M de Tris-HCL pH 8/ 8.5.

Microscopía confocal y análisis de imágenes

Los estudios se realizaron agrupando todos los datos obtenidos de cortes coronales sin signos de inflamación por la cirugía. Previo al análisis del desarrollo neuronal se determinó la extensión de dicha inflamación en cada ratón, por el estudio comparativo de reactividad a GSA en el hemisferio inyectado versus no inyectado para cada cerebro. Los límites de la extensión se asignaron con las coordenadas del Atlas del cerebro de ratón de Paxinos & Franklin (Fig. 4D).

Las imágenes de inmunofluorescencias triples (GFP, DCX y NeuN) se adquirieron con un microscopio confocal Zeiss LSM 5 Pascal (Zeiss, Jena, Alemania) (Fig. 4E). En los análisis se incluyeron sólo las células GFP⁺ localizadas en la SGZ (10 μ m) y en la GCL. La colocalización de marcadores se analizó a través de todo el eje Z de cada célula GFP⁺ en planos ópticos únicos de espesor 0.7 a 1 μ m para los distintos fluoróforos, con un aumento digital de 2 utilizando el objetivo de 40 X, apertura numérica (nA) 1.2 inmersión en agua. Cada neurona GFP⁺ analizada se asignó a la SGZ o a una de las 3 divisiones equidistantes de la GCL (Fig. 4F) en el plano óptico central de su soma celular.

La morfología neuronal se analizó mediante una reconstrucción tridimensional, la cual es un set de 16 proyecciones panorámicas en los ejes X-Y a diferentes ángulos del *Z-stack*. Los *Z-stacks* involucraron diferente número de planos ópticos (1 μm de espesor c/u) de acuerdo al tamaño de la neurona analizada. Cada *Z-stack* se adquirió con 1 μm de intervalo entre planos, salvo para los detalles de espinas dendríticas (0.7 μm), con el objetivo de 40 X y aumentos digitales variables de acuerdo a la morfología. La primera proyección del eje Z en los ejes X-Y a 0° fue la que se utilizó para las mediciones morfológicas de árbol dendrítico, así como para todos los ejemplos de proyecciones en las figuras. Todos los análisis de imágenes se realizaron utilizando el software Zeiss LSM Image Browser.

Análisis estadístico

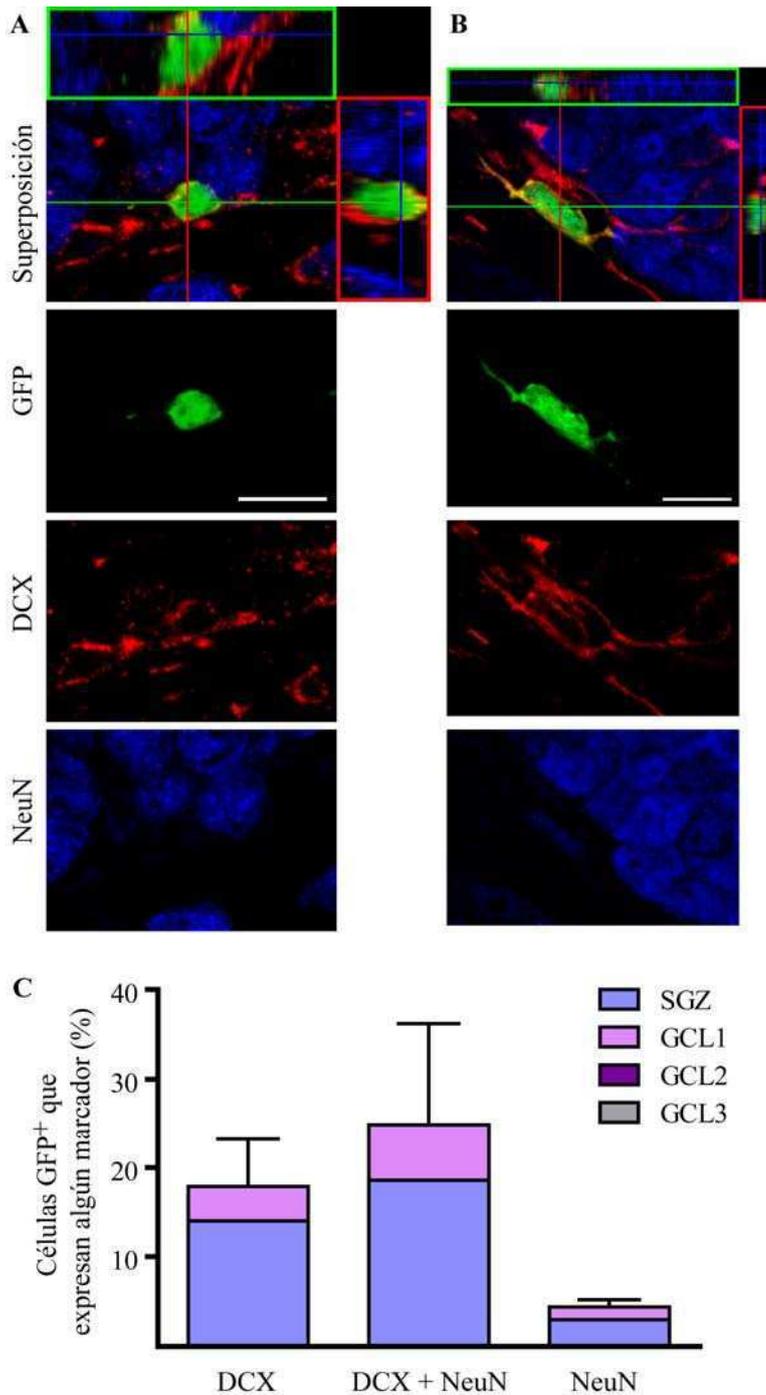
Todos los gráficos y análisis de datos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 5. Los datos se analizaron con el test de Kolmogorov Smirnov para evaluar la normalidad y con el test de Bartlett para evaluar la homogeneidad de varianzas. Debido a que en general, los datos no tuvieron distribución normal y/o igualdad de varianzas (datos no paramétricos), las comparaciones estadísticas se realizaron con pruebas no paramétricas para todas las variables por igual. Cada variable se analizó independientemente con el test de Mann Whitney, para comparaciones entre 2 grupos y con el test de Kruskal Wallis seguido del post-hoc test de comparación múltiple de Dunns, para comparaciones de 3 grupos experimentales. Todos los test estadísticos tuvieron un intervalo de confianza del 95 % en los dos extremos de la distribución de los datos.

Resultados

Para caracterizar el desarrollo de células granulares generadas en el giro dentado adulto se utilizó el marcado retroviral de NPCs y se estudió la progenie marcada a los 7, 14 y 28 dpi por inmunofluorescencias y microscopía confocal.

Neuronas de 7 días: selección del destino neuronal

La identidad neuronal y el grado de madurez se evaluaron por el análisis simultáneo de dos marcadores neuronales en múltiples planos confocales en todo el eje vertical (Z) del soma celular y de los procesos proximales en 310 células GFP⁺ obtenidas de secciones provenientes de 5 ratones (Fig. 5A,B). A su vez, se determinó la localización dividiendo la GCL en tercios y asignando cada neurona al primero, segundo o tercer tercio o a la SGZ (Fig. 5C). El 17 % de las células GFP⁺ expresó solamente DCX, el 4 % solamente NeuN y un 25 % expresó los dos marcadores simultáneamente, “dobles”, por lo que un 50 % de la progenie celular marcada ya había adquirido el fenotipo neuronal a los 7 dpi. La expresión de NeuN en general fue de menor intensidad de fluorescencia que en las neuronas de mayor edad (comparar Fig. 5B con Fig. 7C y 8C). De todas maneras, la expresión de NeuN es postmitótica y la expresión de DCX comienza antes de salir del ciclo celular (Kempermann et al., 2004), por lo que se consideró a las neuronas que expresaron los dos marcadores con un grado intermedio de madurez y se las clasificó como un fenotipo separado.



Independiente del marcador que expresaron, la mayoría de las neuronas nuevas de 7 dpi se encontraron en la SGZ y solo algunas se encontraron en la capa más interna de la granular (GCL1) (Fig. 5C y 6A) por lo que podemos sugerir que la migración radial fue limitada en este estadio, aunque no podemos descartar la migración tangencial. Sin embargo, la frecuente observación de células agrupadas sugiere que si la migración tangencial ocurriese, sería poco frecuente (Fig. 6A).

La morfología neuronal se analizó por reconstrucciones tridimensionales de múltiples planos confocales de 64 neuronas completas. A los 7 dpi se identificaron dos formas representativas; neuronas de clase A (41.5 %) y de clase B (58.5 %). Las neuronas de clase A tuvieron soma irregular sin procesos o con procesos cortos paralelos a la GCL y de espesor variable (Fig. 6A (flecha), B). Las neuronas de clase B presentaron soma ovalado y procesos más largos, de origen bipolar, paralelos a la GCL (Fig. 6A,C). Sin embargo también se consideraron de clase B, algunas pocas neuronas que presentaron su soma y/o uno de sus procesos dentro de la GCL, debido a que sus somas eran ovalados y el origen de sus procesos bipolar (Fig. 6A y 10). No se encontraron morfologías neuronales más maduras, incluso en la minoría que solo expresó NeuN.

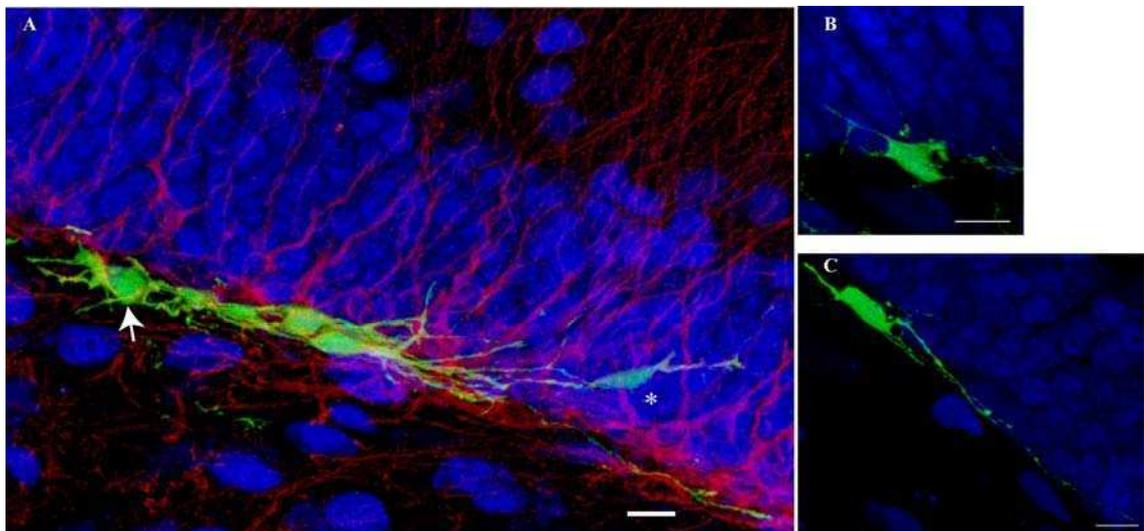


Figura 6: *Morfología neuronal a 7 dpi.* **A.** Ejemplo representativo de los frecuentes grupos de neuronas en la SGZ. La imagen es una proyección de 32 planos confocales. Nota: En el grupo mostrado todas las neuronas GFP⁺ son de clase B, salvo la señalada por la flecha que es de clase A. La neurona GFP⁺ dentro de la GCL (asterisco) fue observada en pocos casos, sin embargo por su morfología se la consideró de clase B. **B y C.** Ejemplos típicos de neuronas GFP⁺ de morfología A (B) y B (C). Proyecciones de 30 planos confocales. GFP (verde), DCX (rojo) y NeuN (azul). Escalas: 10 μ m.

Neuronas de 14 días: migración radial y desarrollo neurítico

El porcentaje de neurogénesis se mantuvo constante a los 14 dpi (50 % de 399 células GFP⁺ de 6 ratones), en cambio la morfología cambió drásticamente. Las neuronas nuevas adquirieron un fenotipo más diferenciado, siendo más fácil diferenciarlas de la progenie GFP⁺ no neuronal (Fig. 7A). Las neuronas nuevas aumentaron considerablemente la expresión de NeuN, aunque mantuvieron la expresión de DCX,

por lo que el grupo de neuronas predominante fue el de las “dobles” (Fig. 7B,C). Por otro lado la localización en la GCL también cambió notoriamente. La mayoría de las neuronas nuevas migraron radialmente hacia adentro de la GCL, localizándose en la porción más interna (GCL 1) (Fig. 7B).

La distintiva morfología neuronal se caracterizó por el notorio proceso apical que se origina y se extiende perpendicular a la GCL alcanzando la capa molecular más interna (Fig. 7D,E). Esta morfología se denominó clase C y la presentaron el $68 \pm 5 \%$ de 60 neuronas analizadas de esta edad. El proceso apical formó un árbol dendrítico rudimentario con una longitud máxima desde el soma de $81 \pm 7 \mu\text{m}$, un largo total (suma de las longitudes de todas las dendritas) de $185 \pm 13 \mu\text{m}$ y 6 ± 1.3 bifurcaciones que en su mayoría se encontraron en la intersección entre la GCL y la capa molecular ($N = 5$ neuronas GFP^+). En general se observó un solo proceso apical y dendritas basales que se originaron desde el soma o desde el segmento más proximal del proceso apical (flechas, Fig. 7D,E). En algunos pocos casos se observaron dos procesos apicales (asteriscos, Fig. 7E). Notoriamente, no se encontraron espinas en ninguno de los procesos dendríticos, lo cual sugiere que en esta etapa del desarrollo no se habrían formado aún las sinapsis glutamatérgicas. En cambio, sí se evidenciaron varicosidades en los árboles dendríticos, típicas de los procesos de neuronas inmaduras descriptas durante el desarrollo perinatal (Jones et al., 2003) (flechas en magnificaciones, Fig. 7D,E).

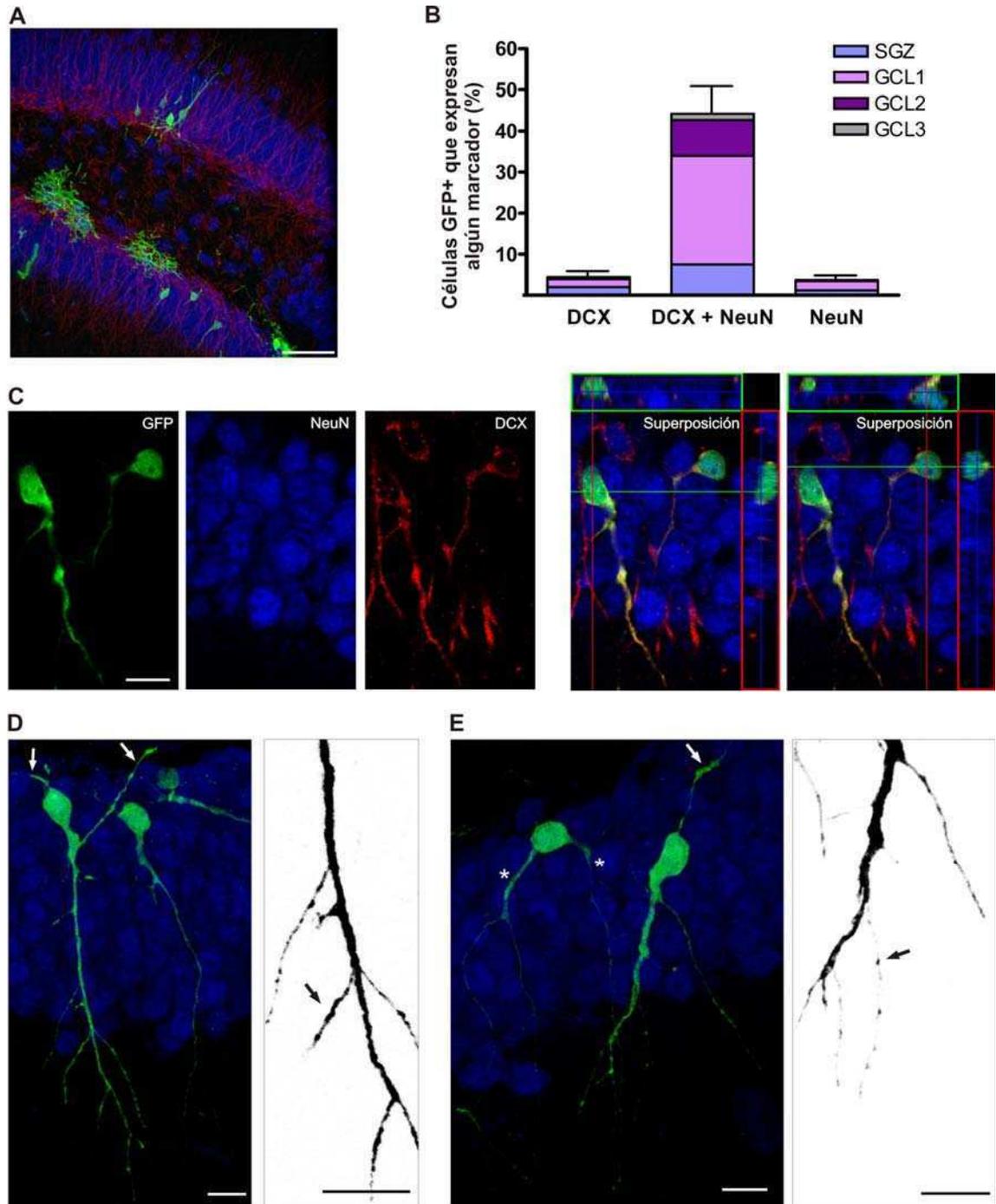


Figura 7: Identificación, distribución y morfología neuronal a 14 dpi. **A.** Panorama representativo de del giro dentado mostrando la diferenciación y distribución de las células GFP⁺. La imagen es una proyección de 27 planos confocales. Escala: 50 μ m. **B.** Distribución de células GFP⁺ de acuerdo a los marcadores neuronales que expresan. Cada barra denota el porcentaje promedio \pm SEM de células GFP⁺ colocalizando con los correspondientes marcadores normalizados al número total de células GFP⁺ para cada ratón (N = 399 células de 6 ratones). **C.** Ejemplo de dos neuronas nuevas que expresan DCX y NeuN. Los paneles horizontales son planos ópticos únicos mostrando los 3 canales de fluorescencia por separado y su superposición a la derecha. Cada superposición muestra la proyección ortogonal de cada neurona “doble”. **D y E.** Ejemplos típicos de neuronas GFP⁺ de morfología C. Las flechas indican las dendritas basales y los asteriscos los dos procesos apicales. Las imágenes son proyecciones de 23 (D) y 12 (E) planos confocales. A la derecha de cada panel se muestran los árboles dendríticos de las respectivas neuronas, las cuales carecen de espinas pero presentan varicosidades (flechas). Proyecciones de 11 (D) y 5 (E) planos. Nota: Las células mostradas en (E) son las mismas que en (C) pero rotadas 180° para mayor claridad. GFP (verde), DCX (rojo) y NeuN (azul). Escalas: (C-D), 10 μ m.

Neuronas de 28 días: fenotipo maduro e integración funcional

Durante la cuarta semana de desarrollo las neuronas nuevas presentaron características morfológicas de neuronas granulares maduras (Fig. 8A) consistente con lo observado en el trabajo de van Praag y col., 2002. Aunque se mantuvo la proporción de células marcadas que adquirieron un fenotipo neuronal en el 50 % (369 células GFP⁺ de 6 ratones), la mayoría de las neuronas de 28 dpi no expresaron el marcador de inmadurez DCX y solo expresaron NeuN (Fig. 8B,C). Esto es consistente con los estadios finales de maduración. Por otro lado, no hubo cambios en cuanto a la migración radial, ya que la mayoría de las neuronas nuevas permaneció en los estratos más internos de la GCL (GCL 1 y 2) (Fig. 8), en forma similar a lo hallado para las neuronas de 14 dpi (Fig. 7). Conjuntamente con la disminución en la expresión de DCX, estas observaciones indican que la migración radial habría finalizado alrededor de los 14 dpi.

La morfología neuronal más representativa a los 28 dpi se denominó clase D. Solo presentaron morfología clase D las neuronas nuevas que expresaron únicamente NeuN (90 ± 6.7 %, $N = 39$ células GFP⁺) y no se observó en aquellas que aún expresaban DCX, que eran de forma C como las de 14 dpi. Las neuronas clase D presentaron un soma redondeado y una conspicua proyección axonal hacia el hilus (flecha, Fig. 8E). Sin embargo la característica más distintiva fue la presencia de un árbol dendrítico complejo cubierto de espinas (flechas en magnificaciones, Fig. 8D,E), alcanzando las áreas más externas de la capa molecular (Fig. 8A,D,E). El largo dendrítico total (627 ± 82 μm) y la distancia máxima desde el soma (186 ± 15 μm) fueron significativamente mayores a las neuronas de clase C de 14 dpi ($N = 5$; $p = 0.008$, Mann Whitney test, en ambos casos). En cambio, el número de bifurcaciones (7.0 ± 0.5) fue similar en neuronas de clase C y D de 14 y 28 dpi, respectivamente ($N = 5$; $p = 0.9$), indicando que el establecimiento de la complejidad del árbol se establece temprano y ocurre en la porción más interna de la capa molecular.

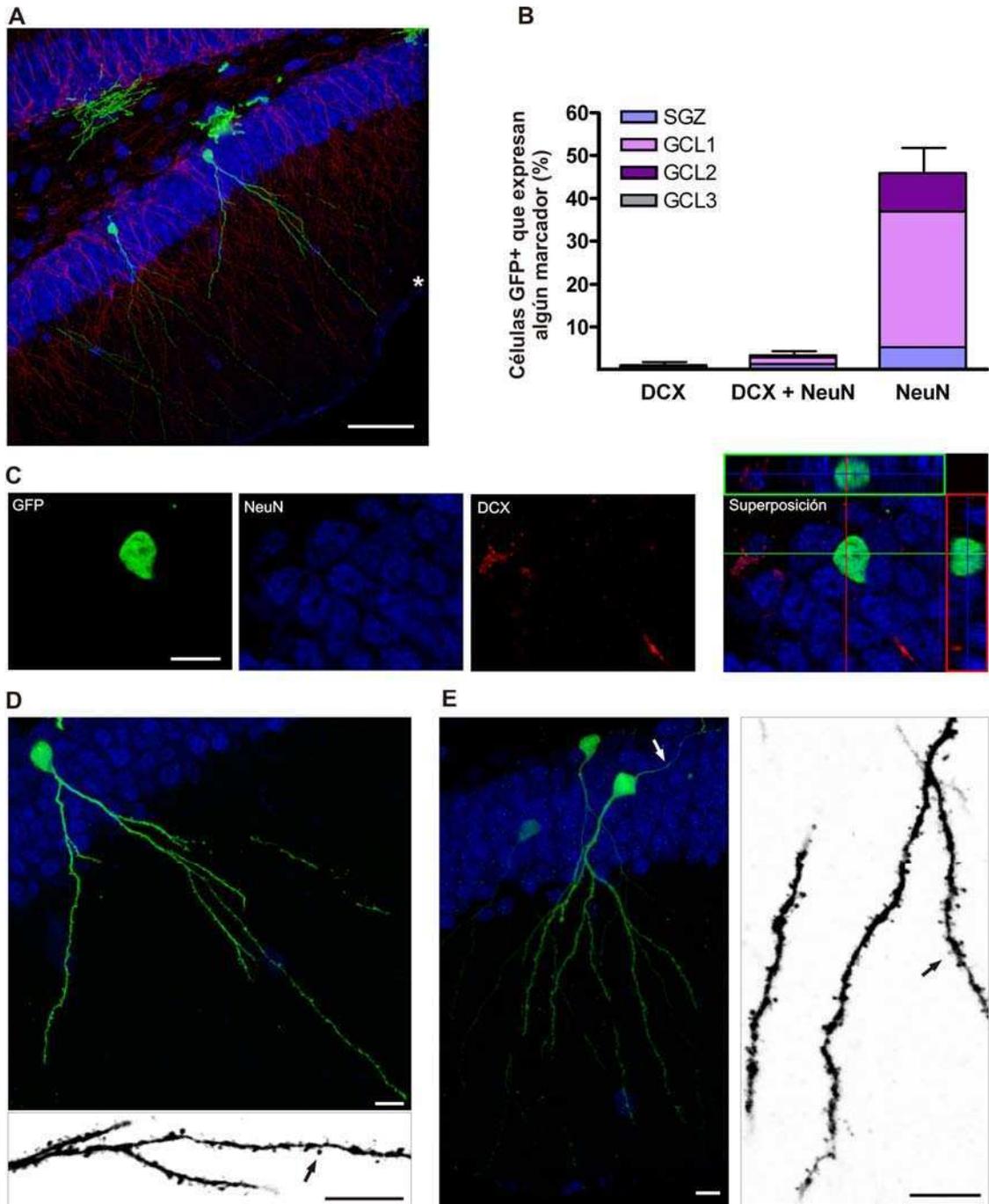


Figura 8: *Identificación, distribución y morfología neuronal a 28 dpi.* **A.** Panorama representativo de una sección coronal del giro dentado mostrando la diferenciación y distribución de las células GFP⁺ a los 28 dpi. El asterisco señala el borde entre de la capa molecular y el ventrículo. Proyecciones de 34 planos confocales. Escala: 50 μ m. **B.** Distribución de células GFP⁺ de acuerdo a los marcadores neuronales que expresan. Cada barra denota el porcentaje promedio \pm SEM de células GFP⁺ colocalizando con los correspondientes marcadores normalizados al número total de células GFP⁺ en cada ratón (N = 369 células GFP⁺ totales de 6 ratones). **C.** Ejemplo en un único plano confocal de una neurona nueva que expresa únicamente el marcador NeuN. Se muestra cada canal de fluorescencia y su superposición a la derecha con su respectiva proyección ortogonal. **D y E.** Ejemplos típicos de neuronas GFP⁺ de morfología D. La flecha en (E) indica el axón. Proyecciones de 32 (D) y 28 (E) planos confocales. Abajo o a la derecha de cada panel se muestran imágenes amplificadas de los árboles dendríticos cubiertos de espinas (flechas). Proyecciones de 8 (D) y 9 (E) planos confocales. GFP (verde), DCX (rojo) y NeuN (azul). Escalas: (C-D), 10 μ m.

Maduración neuronal en el giro dentado adulto

La diferenciación neuronal hacia una célula granular con características maduras es un proceso lento que requiere varias semanas, a pesar que la adquisición de su fenotipo neuronal ocurrió en la primer semana de desarrollo (Fig. 9). El grado de madurez se determinó analizando la expresión conjunta de marcadores neuronales y la morfología. Por ejemplo, si se considerase solamente los marcadores neuronales sin la morfología (Fig. 9B), no se podría discriminar entre las neuronas inmaduras de 7 y 14 dpi, ya que hay una gran proporción de “dobles” en los dos poblaciones neuronales (Fig. 9A). Por otro lado, si se observase solo la morfología no se podría discriminar cual es más madura a 7 dpi, ya que no hubo diferencias entre la proporción de neuronas de clase A y B (Fig. 9B). Incluso, las neuronas de clase A o B analizadas expresaron indistintamente DCX o los dos marcadores neuronales “dobles”. Sin embargo, se encontraron algunas neuronas de clase B con su soma o procesos dentro de la GCL, mientras que nunca se observó para las de la clase A (Fig. 6A). Por lo que se puede sugerir el siguiente orden de la secuencia morfológica de las neuronas nuevas: clase A, B, C y D (Fig. 10).

A pesar que la expresión de marcadores y la morfología mostraron dramáticos cambios entre 7 y 28 dpi, se observó una pequeña población (< 10 %) de neuronas con morfología inmadura y expresión de DCX a 28 dpi (Fig. 9A,B). Dicha población podría originarse de NPCs que permanecen quiescentes y/o con menor tasa de división, alternativamente podrían ser neuronas nuevas con una maduración más lenta.

La migración neuronal ocurrió durante la segunda semana de desarrollo, ya que después de los 14 dpi las neuronas nuevas permanecieron en la misma localización (Fig. 9C). Interesantemente, los estratos más internos de la GCL (GCL 1 y 2) fueron los que recibieron un continuo aporte de neuronas nuevas. En cambio, en el estrato más externo adyacente a la capa molecular (GCL 3) prácticamente no se incorporaron nuevas neuronas. Por lo tanto, el distintivo patrón de migración radial “*outside-in*” de las neuronas granulares postnatales tempranas se mantuvo en el adulto.

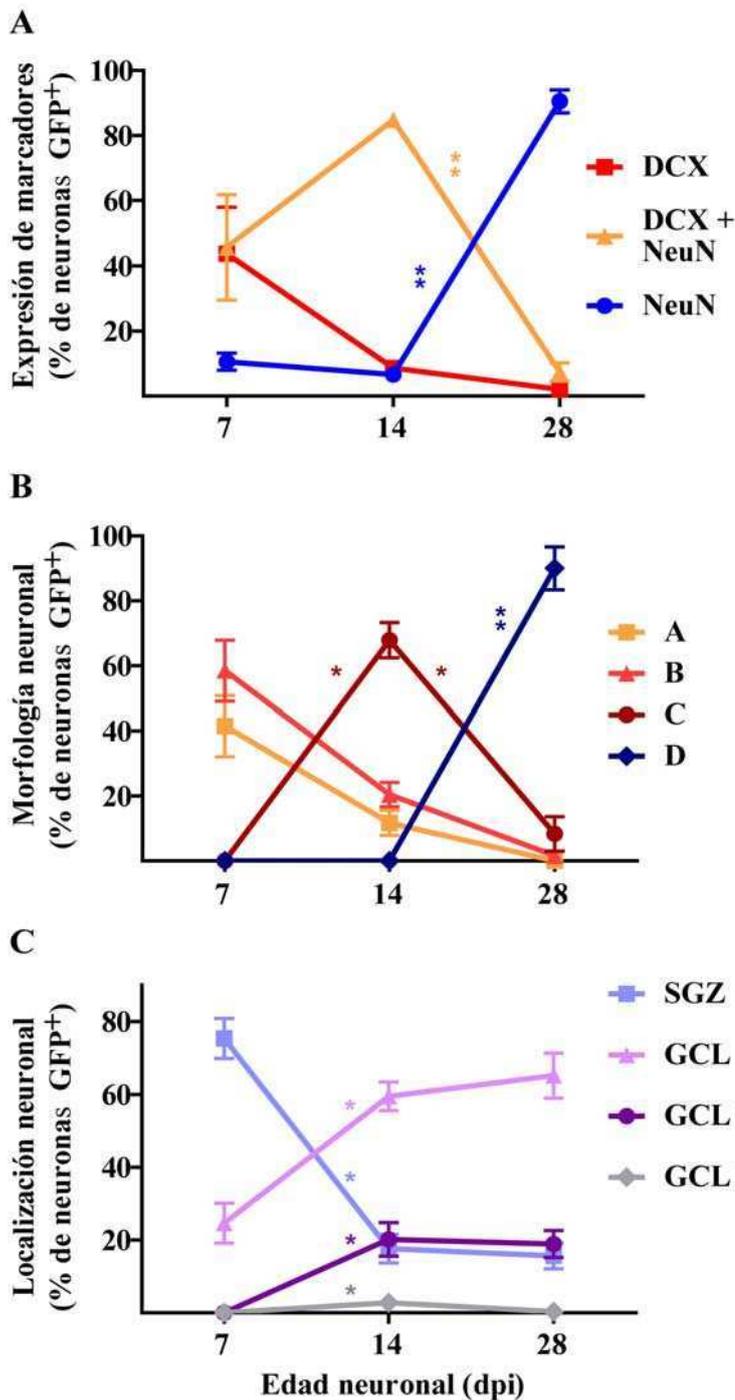


Figura 9: *Dinámica de la maduración neuronal.*

A. Expresión de marcadores neuronales en los distintos estadios del desarrollo. Los datos muestran los porcentajes promedios \pm SEM (N = 154, 208 y 192 neuronas GFP⁺ provenientes de 5, 6 y 6 ratones, para 7, 14 y 28 dpi). **B.** Clasificación morfológica para los 3 tiempos analizados. Se muestran los porcentajes promedios \pm SEM (N = 64, 88 y 39 neuronas GFP⁺ totales de 3, 6 y 5 ratones para 7, 14 y 28 dpi). **C.** Localización de las neuronas nuevas a lo largo de su maduración. Porcentajes promedios \pm SEM (el número de neuronas analizadas fue el mismo que el mostrado en "A").

Cada variable se analizó por "dpi" usando el test de Kruskal-Wallis seguido por el test de comparación múltiple de Dunns, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Los asteriscos graficados corresponden a comparaciones de intervalos de tiempo adyacentes. Entre 7 y 28 dpi se

observó significancia estadística en la expresión de DCX (*) del gráfico A, en la morfología A (**), B (**), C (*) y D (*) del gráfico B y en la distribución neuronal de SGZ (*), GCL 1 (**) y GCL 2 (*) del gráfico C.

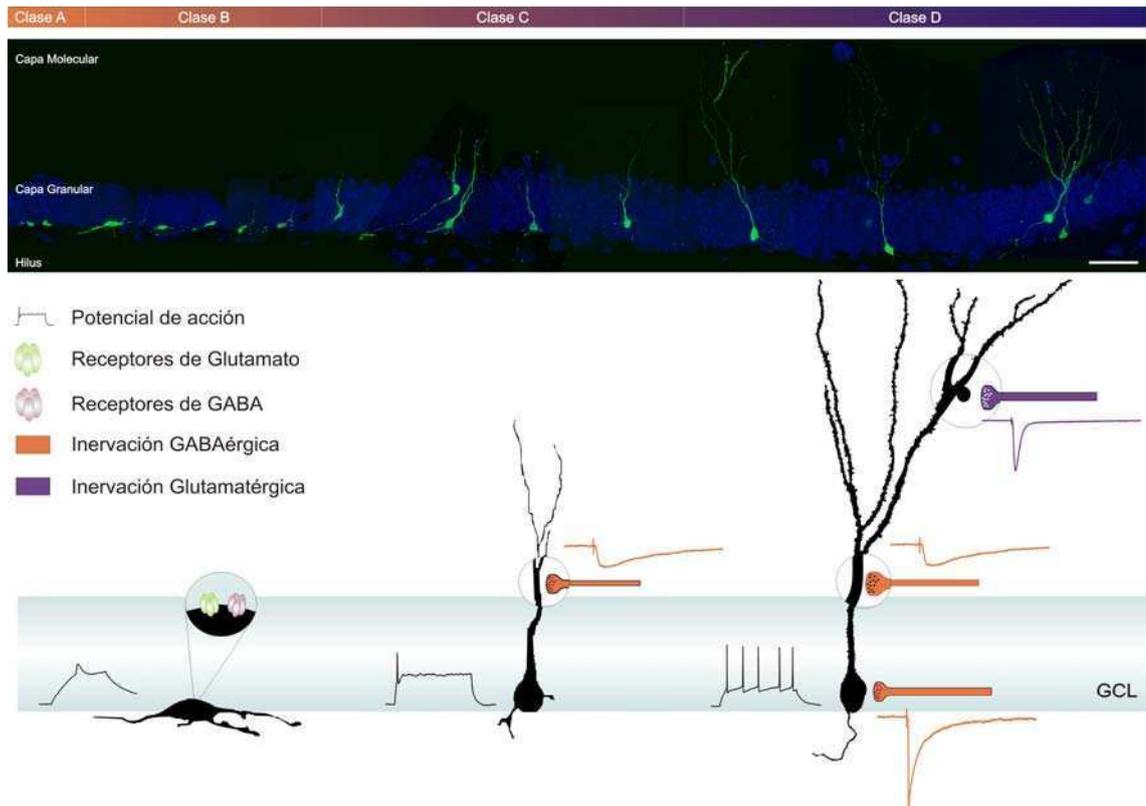


Figura 10: *Secuencia de maduración neuronal en el giro dentado adulto.* **Panel superior,** composición de 12 imágenes de neuronas granulares nuevas ordenadas en secuencia desde la clase A hasta la D (identificación indicada en el margen superior). Cada imagen es una proyección confocal de 16 a 30 planos tomadas del giro dentado de animales de 7, 14 y 28 dpi. GFP (verde) y NeuN (azul). Escala: 50 μ m. **Panel inferior,** representación esquemática de los eventos característicos de morfología, excitabilidad y conectividad aferente del desarrollo de las neuronas nuevas. Las neuronas son ejemplos representativos de morfología B, C y D de proyecciones confocales de 7, 14 y 28 dpi respectivamente. Los trazos son representativos de potenciales de acción y corrientes postsinápticas de cada estadio del desarrollo, registrados por Soledad Espósito (Espósito et al., 2005).

Conclusiones y discusión

Determinación temprana del fenotipo neuronal

El porcentaje de neurogénesis se mantuvo constante desde 7 a 28 dpi consistente con una determinación temprana del fenotipo neuronal (Brown et al., 2003; Brandt et al., 2003; Kempermann et al., 2003) y en acuerdo con el hallazgo de que células GFP⁺ de tan solo 1 dpi mostraron potenciales de acción incipientes en registros electrofisiológicos realizados por M. S. Espósito, con quien se abordó en forma

colaborativa la caracterización del desarrollo utilizando diferentes aproximaciones experimentales (Espósito et al., 2005).

Por otro lado el hecho de que solamente un 50 % de las células marcadas con el retrovirus se diferenciara a neurona fue menor al observado en otros trabajos tanto con la técnica de marcado retroviral como con BrdU (van Praag et al., 1999b; Brown et al., 2003; Ge et al., 2006). Sin embargo, es posible sea debido al promotor utilizado para expresar el reportero en este retrovirus. De hecho, se ha demostrado un silenciamiento del transgen de los MMLV retrovirus, la cual depende del grado de diferenciación y el sitio de integración viral en la célula huésped (Xu et al., 1989). En acuerdo con ello, en el trabajo de van Praag H y col., 2002 también obtuvieron bajos porcentajes utilizando el mismo retrovirus. Incluso al cambiar el promotor del virus para el capítulo II, observamos un 90 % de neurogénesis de acuerdo con la literatura.

La maduración neuronal en el giro dentado adulto es una secuencia lenta y precisa

Trabajando en equipo se logró describir por primera vez la secuencia de maduración de las neuronas granulares nacidas en el giro dentado adulto (Fig. 10) (Espósito et al., 2005). Los distintos estadios de maduración morfo-funcional descriptos fueron los mismos que los evidenciados en otros trabajos utilizando técnicas similares de marcado retroviral (Ge et al., 2006; Zhao et al., 2006) o por clasificación de las propiedades electrofisiológicas en la GCL en un momento dado (Ambrogini et al., 2004). Estos hallazgos demuestran que el proceso continuo de neurogénesis determina que la GCL esté formada por neuronas de características heterogéneas, lo cual favorecería la codificación de información de tipo dispersa (ver discusión del capítulo II).

Durante la primera semana las NPCs de la SGZ se determinaron al fenotipo neuronal y extendieron procesos paralelos a la GCL. En consistencia con la morfología neuronal inmadura, los registros electrofisiológicos mostraron potenciales de acción rudimentarios durante este estadio. Por otro lado, las neuronas GFP⁺ de esta edad presentaron receptores para GABA y glutamato pero no se encontraron conectadas al circuito ya que no respondieron a ningún tipo de estimulación extracelular ni presentaron actividad espontánea (Fig. 10) (Espósito et al., 2005).

En la segunda semana las neuronas inmaduras migraron a la zona más interna de la GCL, donde estabilizaron su soma, lo cual concuerda con la drástica disminución en la expresión de DCX (marcador que se expresa en neuronas en estado de migración) a partir de los 14 días. Observaciones similares fueron reportadas usando el mismo modelo (Ge et al., 2006), así como en ratas utilizando BrdU (Brown et al., 2003). Durante este estadio las neuronas en desarrollo comenzaron a extender sus dendritas hacia la capa molecular, donde se ramificaron para formar un árbol dendrítico rudimentario sin espinas. La falta de espinas fue coincidente con la ausencia de corrientes sinápticas glutamatérgicas observada en los registros electrofisiológicos de M. S. Espósito. Sin embargo, sí se observaron corrientes mediadas por GABA dendrítico, evidenciando una temprana integración de las neuronas nuevas al circuito de interneuronas de inervación dendrítica (Fig. 10) (Espósito et al., 2005). Consistentemente, otros trabajos también reportaron respuestas GABAérgicas despolarizantes y no glutamatérgicas en neuronas de alrededor 14 días de edad de morfología inmadura (como la clase C). En este caso las neuronas fueron identificadas por la expresión de GFP bajo el promotor de la proopiomelanocortina (POMC) en ratones transgénicos adultos (Overstreet Wadiche et al., 2005). Más aún, se demostró que dicha inervación GABAérgica en las neuronas nuevas es excitatoria y que ejercería efectos tróficos en la maduración tanto a nivel morfológico como funcional (Overstreet Wadiche et al., 2005; Ge et al., 2006).

Las neuronas de cuatro semanas mostraron una morfología y excitabilidad típica de una neurona granular madura. Extendieron su árbol dendrítico a través de toda la capa molecular y desarrollaron espinas, integrándose al circuito glutamatérgico, en acuerdo con la bibliografía (van Praag et al., 2002; Seri et al., 2001). Por último, también se observó que una vez conectadas a la aferencia glutamatérgica las neuronas nuevas comenzaron a recibir aferencias inhibitorias perisomáticas (Fig. 10) (Espósito et al., 2005).

Por lo tanto, a pesar que el proceso de determinación neuronal fue rápido (menor a 7 días), la etapa de maduración fue un proceso lento, requiriéndose cuatro semanas para generar nuevas unidades funcionales de fenotipo maduro. Incluso, se observó que las neuronas nuevas continuaron madurando por un tiempo más largo. Las propiedades pasivas, tales como la resistencia de membrana (medida de la cantidad de canales iónicos y área celular) y el potencial de reposo (determinado por las

concentraciones iónicas y las permeabilidades a cada ión) alcanzaron valores similares a las neuronas maduras preexistentes recién entre la 6^{ta} y 7^{ma} semana de desarrollo (Espósito et al., 2005). ,Más aún, se observó que los procesos dendríticos perdieron completamente sus varicosidades, engrosaron su diámetro y aumentaron su densidad de espinas, alcanzando un *plateau* hacia la octava semana (Zhao et al., 2006).

La secuencia de maduración neuronal depende del tipo de neurona generada en el cerebro adulto

En el cerebro adulto de mamíferos se generan continuamente tres tipos de neuronas diferentes: las neuronas granulares del giro dentado, las interneuronas periglomerulares y las interneuronas granulares del bulbo olfatorio (Ma et al., 2009b). A pesar de que las primeras se generan y se integran en el mismo giro dentado y las otras nacen en la SVZ y migran grandes distancias hasta llegar al bulbo olfatorio (Fig. 1C), todas comparten muchos eventos en común en su secuencia de desarrollo. Entre ellos, la determinación temprana del fenotipo neuronal y la expresión de receptores de GABA y glutamato durante el estadio morfológico bipolar. La aferencia GABAérgica temprana durante la ramificación del incipiente árbol dendrítico. La elongación dendrítica con el desarrollo de espinas y la consecuente inervación glutamatérgica (Petreanu and Alvarez-Buylla, 2002; Lledo et al., 2006). Finalmente, otra característica interesante en común entre las neuronas granulares generadas en ambas regiones es su localización en la zona interna de la capa granular con respecto a las mismas nacidas durante la etapa perinatal, que se ubican en la capa más externa (Lemasson et al., 2005; Mathews et al., 2009).

Por otro lado, mientras que las neuronas granulares del giro dentado adulto y las periglomerulares del bulbo olfatorio alcanzan su fenotipo maduro en la cuarta semana de desarrollo, las neuronas granulares del bulbo olfatorio lo hacen a la tercer semana (Petreanu and Alvarez-Buylla, 2002; Lledo et al., 2006). Más interesante aún es que mientras las dos primeras desarrollan potenciales de acción previo al desarrollo de la conectividad sináptica, las células granulares del bulbo olfatorio desarrollan su conectividad previo al desarrollo de potenciales de acción (Carleton et al., 2003; Lledo et al., 2006). Dicha característica no es trivial ya que es crítica para transmitir información a las neuronas postsinápticas. El desarrollo tardío de la excitabilidad

podría funcionar como un mecanismo para prevenir la disrupción del circuito preexistente con unidades funcionales inmaduras. Sin embargo, lo curioso es por qué no ocurre lo mismo en la maduración de los otros dos tipos de neuronas nuevas generadas en el cerebro adulto. Las neuronas granulares del bulbo olfatorio no tienen axones (Jahr and Nicoll, 1982; Woolf et al., 1991), con lo cual la generación de potenciales de acción después del desarrollo de la conectividad aferente podría asegurar la correcta integración al circuito correspondiente. Por lo tanto, la secuencia de eventos en el proceso de maduración neuronal podría estar determinada por el tipo particular de neurona que se genera en el sistema funcional preexistente.

El patrón de desarrollo neuronal perinatal y adulto del giro dentado son similares pero ocurren a velocidades diferentes

Distribución anatómica de las poblaciones neuronales

Los resultados de distribución neuronal en conjunto con la expresión de DCX (Fig. 9 A,C) mostraron que GCL 3 no renueva su población de neuronas granulares en el giro dentado adulto. Sin embargo, cabría la posibilidad de que a largo plazo, GCL 3 se renovase en forma lenta por la muerte y sucesivo reemplazo neuronal, aún cuando las neuronas nuevas hayan completado su migración entre la 2^{da} y 3^{ra} semana de desarrollo (Fig. 9C). Dicha posibilidad parece poco probable ya que otros investigadores han demostrado que las neuronas nuevas que han sido marcadas con BrdU en el adulto mantienen su localización en la GCL al menos por 11 meses (Kempermann et al., 2003). Más aún, resultados recientes de nuestro laboratorio demostraron que las neuronas nuevas marcadas a través de expresión retroviral conservaron la misma posición hasta 15 meses después de la inyección en el animal adulto (Mathews et al., 2009).

Estos hallazgos sugirieron fuertemente la continuidad del patrón de desarrollo “*outside-in*” perinatal en el giro dentado adulto. Esto se demostró fehacientemente marcando las distintas cohortes de neuronas granulares durante la neurogénesis embrional, postnatal temprana y postnatal adulta combinando las técnicas de BrdU y marcado retroviral. Mientras que las neuronas nacidas durante la embriogénesis mostraron una distribución homogénea en toda la GCL del giro dentado adulto, las

neuronas nacidas postnatalmente (temprana o adulta) se localizaron preferentemente en las zonas más internas (GCL 1 y 2) (Fig. 11) (Muramatsu et al., 2007; Mathews et al., 2009). Por lo tanto, la GCL del giro dentado adulto mantiene un mosaico celular organizado, donde las neuronas granulares se encuentran segregadas espacialmente siguiendo un gradiente temporal.

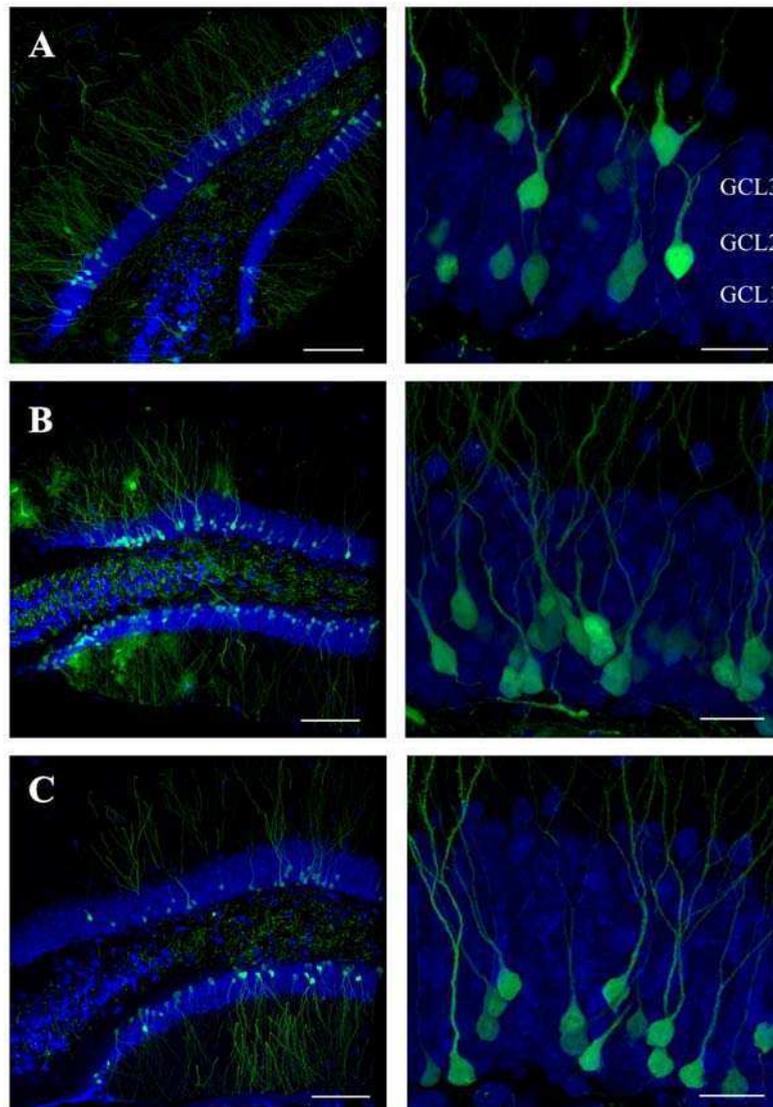


Figura 11: *GCL heterogénea, organizada en gradientes de edades.* Imágenes globales de secciones coronales del giro dentado adulto mostrando neuronas granulares maduras nacidas durante la embriogénesis (A), la etapa postnatal temprana (B) y la etapa adulta (C). A la derecha de cada panel se muestra una imagen ampliada obtenida de los mismos cerebros. La GCL se identificó por inmunofluorescencia para NeuN (azul) y cada población neuronal se marcó por inyección del retrovirus expresando GFP (verde) en el día embrional 15, día postnatal 7 y día postnatal 46, respectivamente. Todas las neuronas mostradas tienen como mínimo 6 semanas de edad. Las imágenes son proyecciones de 16 a 20 planos ópticos. Escalas: 100 μm y 20 μm , para paneles izquierdos y derechos, respectivamente. Mathews et al. Enviado

Maduración neuronal

La secuencia de eventos que ocurren durante la maduración de las neuronas nuevas del giro dentado adulto fue semejante a lo ya descrito ampliamente para el desarrollo perinatal, como lo fue la distribución neuronal previamente mencionada. El primer estudio de diferenciación morfológica de las neuronas granulares del giro dentado se realizó con la impregnación de Golgi en el día postnatal 5 (Lubbers and Frotscher, 1988). Debido a la continua neurogénesis los autores lograron diferenciar neuronas granulares de diferente grado de madurez coexistiendo al mismo tiempo. Otros trabajos posteriores, analizaron características morfológicas de inmadurez en neuronas granulares de alta resistencia de membrana (Liu et al., 2000) o por marcación retrograda (Jones et al., 2003). En los 3 trabajos mencionados las características de inmadurez fueron: dendritas de diámetro pequeño con varicosidades, formación transitoria de dendritas basales, progresivo aumento en el número de espinas así como en la longitud del dominio dendrítico en la capa molecular y el desarrollo axonal previo o en conjunto con el dendrítico. Más aún, utilizando microscopía electrónica se observó que las dendritas inmaduras reciben principalmente sinapsis GABAérgicas (Lubbers and Frotscher, 1988). Todas estas características también se observaron en las neuronas nuevas nacidas en el giro dentado adulto (Fig. 10) (Espósito et al., 2005; Zhao et al., 2006).

El orden de conectividad “silentes - GABA dendrítico - glutamato” en neuronas que ya presentan potenciales de acción (Fig. 10B) también se observó durante el desarrollo de interneuronas y neuronas piramidales de CA₁ (Tyzio et al., 1999; Khazipov et al., 2001; Hennou et al., 2002). Las propiedades de las corrientes GABAérgicas de cinética lenta y potencial de reversión despolarizados se encontraron en las neuronas granulares inmaduras (~ 2 semanas) del giro dentado postnatal, (Hollrigel and Soltesz, 1997; Hollrigel et al., 1998) al igual que las del giro dentado adulto. Por último, la invasión por interneuronas perisomáticas también parece ser lo último en ocurrir en el orden de conectividad de las neuronas granulares de etapa perinatal ya que estas interneuronas arriban y se establecen en el giro dentado alrededor del día postnatal 30 (Dupuy-Davies and Houser, 1999; Morozov and Freund, 2003). Sin embargo, este no es el caso en la neurogénesis adulta, ya que los circuitos aferentes GABAérgico y glutamatérgico están presentes antes de que las neuronas comiencen a desarrollarse.

Por lo tanto, a pesar de las diferencias que presuponen un circuito funcional establecido (adulto) y otro en formación (desarrollo perinatal), nuestras observaciones indican que la secuencia de maduración neuronal en el giro dentado adulto es la misma que en etapas perinatales. El hecho de que la inervación perisomática sea el último evento en completar la conectividad al circuito local, cuando todas las interneuronas ya están establecidas, sugeriría que los sucesivos eventos de maduración responden a un programa autónomo de célula.

Velocidad de maduración neuronal

Cabe destacar que cuando se comparó la maduración de las neuronas granulares nacidas durante el desarrollo perinatal con las nacidas en el animal adulto se observó que en el último caso el proceso ocurre más lentamente (Fig. 12A,B). Jones y col. mostraron que las primeras espinas dendríticas de las neuronas granulares del giro dentado pueden observarse al 5^{to} día postnatal y la morfología madura al 7^{mo} día en la rata (Jones et al., 2003). Considerando que la rata tiene 22 días de gestación y la primera corriente migratoria neurogénica ocurre entre el día embrional 19 y 20 (Altman and Bayer, 1990), podría concluirse que las primeras espinas se formarían en neuronas de 10 días y la maduración se completaría a los 12 días como máximo. Con el desarrollo de la técnica de marcado retroviral se logró comparar neuronas granulares inmaduras de la misma edad pero nacidas en el neonato o en el adulto. Se observó que mientras las neuronas granulares del giro dentado adulto formaron sus primeras espinas a los 16 dpi, las del postnatal lo hicieron a los 12 dpi en el ratón. Además, en este estadio las neuronas postnatales también mostraron dendritas y axones más largos que las neuronas de 12 dpi del ratón adulto (Zhao et al., 2006).

En los ratones transgénicos POMC-GFP, también se observó una maduración neuronal más acelerada en el neonato que en el adulto, comparando la ventana de expresión de GFP y los porcentajes de expresión de NeuN en neuronas BrdU⁺ de 12 días (Overstreet-Wadiche et al., 2006a). Cabe destacar que las neuronas granulares preexistentes en el neonato presentaron una mayor activación de factores de transcripción dependientes de actividad y frecuentes descargas de actividad sináptica espontánea, que no fue evidente en el giro dentado adulto (Ben Ari, 2002; Overstreet-Wadiche et al., 2006a). Por ello se ha postulado que la actividad del ambiente donde se desarrollan las neuronas nuevas podría inducir un aceleramiento de la maduración

neuronal. Es sabido que el hipocampo postnatal temprano presenta frecuentes descargas de actividad espontánea, conocidas como GDPs (*giant depolarizing potentials*), ausentes en el hipocampo adulto. Los GDPs forman el primer patrón de actividad sináptica sincrónica en el hipocampo durante el desarrollo y están mediados tanto por GABA como por glutamato, debido a que GABA es excitatorio en neuronas inmaduras (Ben Ari, 2002). En acuerdo con ello, se demostró que la falta de GAD 65, la enzima que sintetiza GABA, disminuye la actividad local espontánea y prolonga la ventana de expresión de GFP en los ratones $GAD65^{-/-}/POMC-GFP$, indicando un retraso de maduración neuronal (Overstreet-Wadiche et al., 2006a) (Fig. 12C).

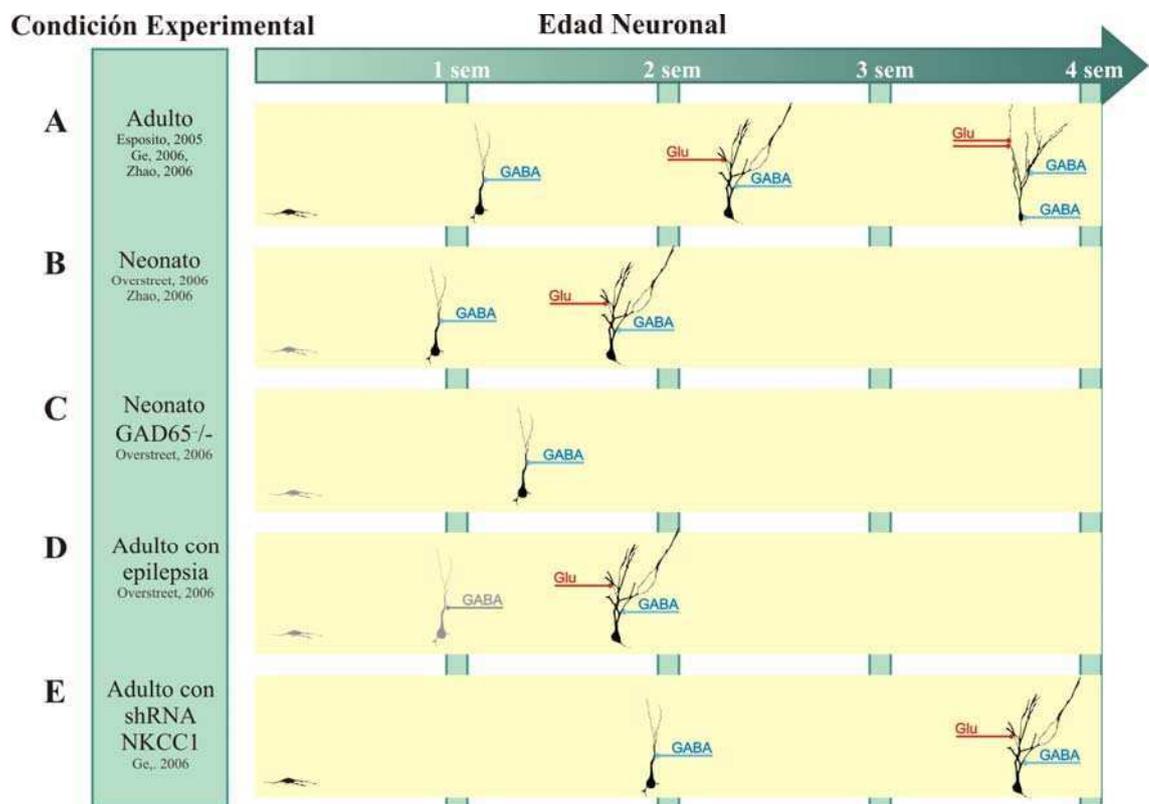


Figura 12: Regulación de la *velocidad de maduración neuronal*. Esquemas representando el cambio en la tasa de maduración debido a diferentes condiciones experimentales analizadas en los trabajos que se detallan en el margen izquierdo. Modificado de Piatti et al., 2006. El comienzo de inervación GABAérgica y glutamatérgica se indican con terminales azules y rojos, respectivamente. Más de un terminal indica aumento de inervación. Las neuronas son ejemplos de morfología representativos de cada estadio analizado en Esposito et al., 2005. Los eventos de la secuencia de maduración mostrados en gris (previos) o ausentes (posteriores) indican estadios hipotéticos que no fueron evaluados en los trabajos citados. **A.** Secuencia de maduración de neuronas granulares nuevas, marcadas por retrovirus expresando GFP, en el giro dentado de ratones hembra adultos. **B.** Eventos de la maduración de neuronas granulares nuevas, marcadas por retrovirus expresando GFP en el giro dentado de ratones hembra neonatales y por la expresión transitoria de POMC-GFP en ratones transgénicos POMC-GFP neonatales. **C.** Eventos observados en neuronas granulares nuevas, marcadas por la expresión transitoria de POMC-GFP, en el giro dentado de ratones transgénicos $GAD65^{-/-}/POMC-GFP$ neonatal. **D.** Eventos en neuronas granulares nuevas marcadas por la expresión transitoria de POMC-GFP, en el giro dentado de ratones transgénicos POMC-GFP adultos con epilepsia. **E.** Eventos descritos en neuronas marcadas por retrovirus coexpresando GFP y un RNA de interferencia para el transportador NKCC1 en el giro dentado de ratones hembra adultos.

Por lo tanto, proponemos la hipótesis de que la secuencia de eventos que ocurre durante el desarrollo de las neuronas granulares del giro dentado podría estar determinada por un programa autónomo de célula, pero la velocidad con la que ocurre dicho desarrollo podría ser modulada por la actividad eléctrica del ambiente. Con lo cual, la neurogénesis adulta además de proporcionar nuevas unidades funcionales podría ofrecer un mecanismo adicional de plasticidad neuronal a través de la modulación del tiempo de maduración.

CAPÍTULO II

LA ACTIVIDAD DE LOS CIRCUITOS LOCALES REGULA LA VELOCIDAD DE MADURACIÓN NEURONAL

Introducción

Las neuronas granulares nuevas del hipocampo siguen una secuencia ordenada de eventos para alcanzar la madurez independientemente del momento en que esto ocurre, ya sea durante el desarrollo temprano o la adultez. Es interesante notar, sin embargo, que el tiempo requerido para alcanzar la madurez sí es una variable que difiere radicalmente ya que todo ocurre más rápido durante el desarrollo temprano (Espósito et al., 2005; Overstreet-Wadiche et al., 2006a; Zhao et al., 2006). Por este motivo se podría pensar que el tiempo en que una neurona nueva se integra al circuito podría estar modulado por alguna característica del ambiente donde ella se desarrolla.

De acuerdo con esta idea, una serie de trabajos mostró que la actividad del nicho neurogénico o la actividad que las neuronas inmaduras sensan de su ambiente, puede modificar su velocidad de maduración (Piatti et al., 2006). Por ejemplo, en el giro dentado de ratones epilépticos, un ambiente patológico hiperexcitado, las neuronas nuevas maduran más rápido que las comparadas en los animales controles (Overstreet-Wadiche et al., 2006b) (Fig. 12D). Por otra parte, la tasa de desarrollo también pudo afectarse alterando el sensado de GABA específicamente en las neuronas nuevas del giro dentado adulto. El efecto excitatorio o inhibitorio de GABA depende de la concentración intracelular de Cl^- y ésta a su vez de los transportadores de membrana NKCC1 y KCC2 (que median el influjo y eflujo de Cl^-). De ese modo se utilizó la disminución o “*knockdown*” de NKCC1 en neuronas nuevas para convertir el temprano efecto excitatorio de GABA, en inhibitorio y se observó un significativo retraso en la maduración neuronal (Ge et al., 2006) (Fig. 12E).

Más aún, recientemente se presentaron evidencias de un nuevo gen de expresión inmediata dependiente de actividad, *Gadd45b*, que medió los efectos promotores de la actividad en inducir la proliferación y el desarrollo dendrítico en las

neuronas nuevas del hipocampo adulto. Además, se sugirió una conexión entre la actividad del circuito neuronal y la neurogénesis adulta a través de la secreción parácrina de factores tróficos inducida por mayor actividad en las neuronas maduras. Se observó un efecto de Gadd45b en la desmetilación específica de algunos promotores de factores tróficos como; el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) y el factor 1B del crecimiento de fibroblastos, con un consecuente aumento en la expresión del ARNm y las proteínas correspondientes (Ma et al., 2009a).

Sin embargo, los trabajos previos realizaron manipulaciones para aumentar la actividad del circuito, como los estados epilépticos, que producen efectos aberrantes en la conectividad de todas las neuronas granulares (Scharfman et al., 2003) o modificaciones genéticas que afectaron la sobrevivencia de las neuronas nuevas además de su maduración (Jagasia et al., 2009). Por estos motivos nos propusimos analizar la maduración de las neuronas granulares nuevas en ambientes que presenten diferentes niveles de actividad en su circuito en condiciones fisiológicas.

El hipocampo adulto en si mismo presenta diferencias regionales de estructura y función a lo largo de su eje longitudinal (Fig. 1A), ya mencionadas en la introducción general. Incluso, estudios de electrofisiología *in vivo* mostraron que en la región dorsal del hipocampo hay un mayor número de neuronas piramidales activas y /o con mayor tasa de disparo que en la región ventral del mismo cuando el animal explora un ambiente en busca de comida (Jung et al., 1994). Por otro lado, la función más ancestral del hipocampo es su rol en la memoria espacial, ya que se ha observado en casi toda la escala de vertebrados (Treves et al., 2008b). Para generar una memoria espacial el animal necesita moverse en un entorno, con lo cual va generando mapas cognitivos asociando distintos estímulos en cada posición y movimiento. Interesantemente, se demostró con registros *in vivo* que la mayoría de las *place cells* se activa cuando el animal recorre un espacio determinado en forma voluntaria y no así, si el mismo animal es movido por un operador en el mismo espacio (Foster et al., 1989). Más aún, si se mantienen fijas las claves ambientales pero el animal corre activamente en una rueda, las neuronas piramidales del hipocampo no solo se mantienen activas durante todo el período que el animal se encuentra en movimiento, sino también aumentan su tasa de disparo cuando el animal corre más rápido (Czurko et al., 1999).

Por lo tanto, el simple hecho de correr podría ser una tarea fisiológica que aumente los niveles de actividad del circuito donde se desarrollan las neuronas

granulares nuevas del giro dentado. Más aún, las diferencias funcionales del hipocampo en el eje longitudinal podrían proporcionar diferentes ambientes activos para estudiar la velocidad de maduración neuronal dependiente de actividad

Objetivos y estrategia experimental

La existencia de sólo dos regiones con propiedades neurogénicas en el cerebro adulto de mamíferos (siendo el hipocampo una de ellas), acentúa la necesidad de conocer los microambientes donde las neuronas nuevas se desarrollan y de los parámetros esenciales para su regulación. Debido a los trabajos previos ya mencionados, la hipótesis que nos propusimos fue que la actividad eléctrica del ambiente donde se desarrollan las neuronas nuevas tiene un efecto promotor en la velocidad de su maduración. Por esto resultó de gran interés analizar los siguientes objetivos consecutivos:

- Comparar si la actividad neuronal es regionalmente diferente en el giro dentado de animales adultos “corredores” y aquellos que permanecen en sus cajas sin perturbar “sedentarios”.
- Analizar las diferencias de madurez de las neuronas granulares nuevas que se desarrollan en la región dorsal y ventral del hipocampo de animales sedentarios y corredores.
- Determinar si la velocidad de maduración depende de las diferencias de actividad en el hipocampo adulto.

Para analizar si la velocidad de maduración de las neuronas granulares nuevas es dependiente de la actividad del ambiente, se llevaron a cabo los siguientes experimentos:

1º- Se evaluó la actividad neuronal en la GCL de los extremos longitudinales del giro dentado de ratones adultos sedentarios y corredores utilizando la expresión de un gen de respuesta inmediata (IEG) inducido por actividad neuronal, ARC (*activity*

regulated cytoskeletal associated protein) (Lyford et al., 1995; Guzowski et al., 1999; Moga et al., 2004).

2º- Se analizó el grado de madurez neuronal entre las diferentes regiones del hipocampo en animales sedentarios y corredores. Para marcar la mayor cantidad posible de NPCs en todo el eje longitudinal del giro dentado en las dos condiciones y realizar estudios morfológicos se utilizó la técnica de marcado retroviral con un retrovirus que expresa GFP bajo un promotor fuerte. La maduración neuronal se evaluó a los 21 dpi debido a que es ese el momento donde se producen los mayores cambios en los parámetros fisiológicos y morfológicos:

- Cambio de expresión en los transportadores de cloro NKCC1 y KCC2, determinando el efecto inhibitorio de GABA (Ge et al., 2006),
- Cambio en la expresión de proteínas que regulan el calcio citoplasmático, calretinina y calbindin, (Brandt et al., 2003),
- Disminución de la expresión de marcadores de inmadurez neuronal como DCX (Brown et al., 2003) y PSA-NCAM (*Poly-Sialated Neural Cell Adhesion Molecule*) (Seki, 2002) y
- Sinaptogénesis (formación de espinas) y expansión del árbol dendrítico en toda la capa molecular (Zhao et al., 2006; Espósito et al., 2005).

3º- Se estudió el efecto de la actividad del circuito local en la velocidad de maduración de las neuronas granulares nuevas del hipocampo adulto. Para ello se analizó el proceso de neurogénesis a distintos tiempos, desde la proliferación de los NPCs hasta la culminación de la maduración neuronal, en ambientes con diferentes niveles de actividad neuronal.

Materiales y métodos

Producción de vectores virales

En el presente capítulo se utilizó un retrovirus con un promotor diferente al utilizado en el capítulo I, desarrollado por Chunmei Zhao en el laboratorio de Fred Gage (Salk Institute, La Jolla, California) y cedido como parte de una colaboración para su uso en nuestro laboratorio. Este nuevo vector también es un retrovirus no replicativo derivado del MMLV pero fue modificado para expresar la proteína GFP bajo el control del promotor de actina de pollo (CAG) (Zhao et al., 2006). El promotor CAG es un promotor constitutivo fuerte que contiene las secuencias *enhancers* del promotor CMV, el promotor de β -actina de pollo y un intrón sintético. Además, este vector contiene un elemento posttranscripcional del virus de la hepatitis (WPR) que estabiliza al transcripto y por lo tanto aumenta la producción de la proteína. Para la producción de dicho retrovirus se realizó una triple transfección de células HEK 293T con los siguientes plásmidos: un plásmido conteniendo los genes para las proteínas de la cápside (CMV-vsug), otro conteniendo los genes de las enzimas virales (CMV-gag/pol) y un tercer plásmido conteniendo el genoma viral (vCAG-GFP). Dichos plásmidos también fueron producidos en condiciones libres de endotoxina, como se indicó en capítulo I.

Los cultivos de las células HEK 293T, la transfección y la producción final del virus fueron realizados por MG Lombardi y M Veggetti de la misma manera que se detalló en capítulo I.

Animales

Se utilizaron ratones C57Bl6/J hembra agrupados de a 5 en jaulas grandes, desde la 5^{ta} a 6^{ta} semana de edad en nuestra sala de bioterio. Los animales se habituaron por una semana antes de la realización de los experimentos.

Experimentos con ARC

Una semana más tarde a la habituación de los animales a nuestra sala de bioterio, se colocó en la mitad de las jaulas dos ruedas para correr (ratones corredores) y los demás se mantuvieron en las mismas condiciones sin ruedas (ratones sedentarios) (Fig. 13A,B). Las ruedas permanecieron en las jaulas hasta el final de los experimentos. Entre la 9^{na} y 10^{ma} semana de edad de los animales (24 días posteriores al colocado de las ruedas en sus jaulas) se sacrificaron todos los grupos para las inmunofluorescencias para ARC. Se eligieron estos tiempos para que coincidieran con los elegidos en el capítulo I y para el estudio de maduración neuronal a los 21 días.

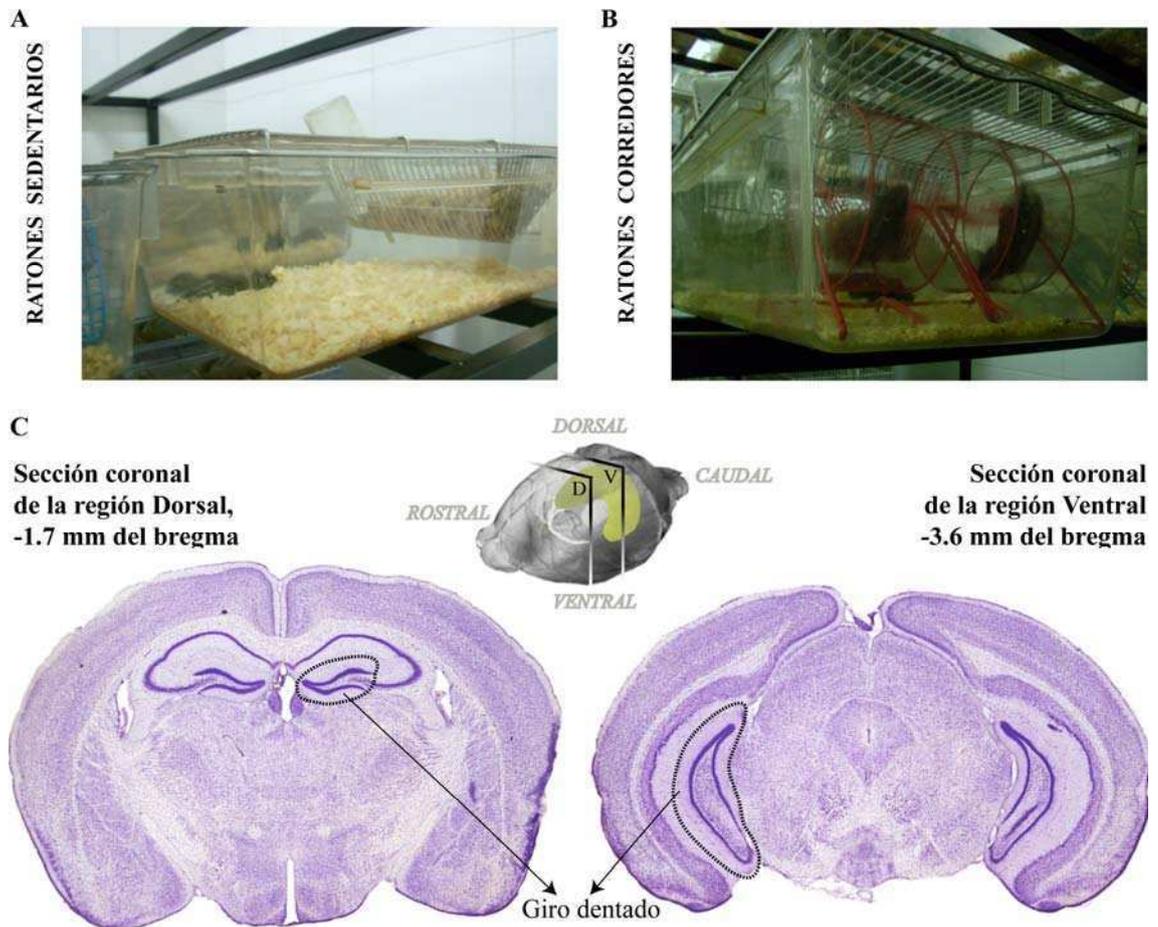


Figura 13: Condiciones experimentales. A y B. Ratones de 6 a 7 semanas de edad, habituados a nuestra sala de bioterio, permanecieron sin perturbar (ratones sedentarios, A) o comenzaron a correr en ruedas ubicadas en sus cajas (ratones corredores, B). Las imágenes son fotografías digitales obtenidas a la misma hora para los dos casos, en días posteriores a la habituación de las ruedas. Notar el activo ejercicio físico de los dos animales corriendo en cada rueda. C. Ejemplos de secciones coronales, tomadas del atlas de cerebro de ratón de Paxinos y Franklin, representativas de la región dorsal (septal y rostral) y la región ventral (temporal y caudal) del hipocampo adulto. Tinción de Nissl. En línea de puntos se marcó el giro dentado de uno de los hemisferios de cada sección. El esquema del cerebro de ratón indica las posiciones de los planos de corte para cada sección; dorsal (D) y ventral (V).

Marcado retroviral

Tres días previos a la cirugía se colocaron dos ruedas por jaula para correr, o se dejó los animales sin rueda (Fig. 13A,B). Las ruedas permanecieron en las jaulas hasta el final de los experimentos. Todas las inyecciones estereotáxicas del retrovirus se realizaron en el giro dentado del hemisferio derecho de ratones de 6 a 7 semanas de edad, de la misma manera y utilizando las mismas coordenadas que las descritas en el capítulo I. Los animales se sacrificaron a 14, 21 y 56 dpi para realizar las inmunofluorescencias del análisis de maduración neuronal.

Marcado con BrdU

Entre la 6^{ta} y 7^{ma} semana de vida de los animales se realizaron las inyecciones intraperitoneales de BrdU, con una dosis de 50 µg por gramo del animal, para marcar las NPCs del giro dentado adulto. A estos animales nunca se les agregó ruedas en sus cajas (Fig. 13A). BrdU (Sigma) se disolvió en solución fisiológica (0.9 % NaCl) y luego se filtro en esterilidad (0.22 µm), previo a cada inyección.

Para estudiar el fenotipo neuronal (experimentos de la Fig. 20) los ratones recibieron 2 inyecciones por día (separadas 8 hs) durante 2 días y se sacrificaron a los 21 días posteriores de la 1^{ra} inyección. En cambio, para el análisis de las NPCs (experimentos de la Fig. 21) se marcaron diferentes cohortes de progenitores en un solo día. Para ello se aplicaron 3 dosis de BrdU en un día (separadas 6 hs). Se eligió este tiempo debido a que es el descripto para la duración del ciclo celular de las NPCs del giro dentado de ratones adultos (Burns and Kuan, 2005). De ese modo se marcaron la mayor cantidad de células en división con la menor manipulación de los animales en un único día. Los animales se sacrificaron a los 2 y 4 días posteriores.

Perfusión e inmunofluorescencias

Los cerebros de los diferentes animales fueron fijados y procesados de la misma manera que para el capítulo I, con la salvedad de que una vez que descendieron en la solución de sacarosa, se secaron y congelaron directamente en un micrótopo de deslizamiento Leica SM 2000R, con hielo seco finamente molido. Los cerebros se cortaron en secciones coronales de 40 μm y se mantuvieron a -20°C en solución criopreservadora hasta el momento de realizarse las inmunofluorescencias. Las inmunofluorescencias fueron realizadas con la técnica de “*free-floating*” utilizando 1 de cada 6 secciones hasta obtener 13 o más células GFP⁺ o BrdU⁺ para cada región; dorsal y ventral del hipocampo de cada ratón (Fig. 13C).

Se realizaron dobles o triples inmunofluorescencias utilizando los siguientes anticuerpos primarios: ARC (policlonal de conejo 1:500, Synaptic Systems), BrdU (monoclonal de rata 1:200; Abcam), calbindin D-28k (Cb) (policlonal de conejo 1:1000, Swant), DCX (policlonal de conejo 1:750, cedido por C. Walsh), GFP (policlonal de conejo 1:100, Invitrogen; o policlonal de pollo 1:500, Millipore), Ki67 (rabbit monoclonal 1:250, Vector Laboratories) y NeuN (monoclonal de ratón 1:50, cedido por F. H. Gage). De acuerdo a cada anticuerpo primario se utilizaron los siguientes anticuerpos secundarios: anti-ratón Cy5, anti-conejo Cy3, y anti-pollo Cy2 (policlonales de burro 1:250, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). GSA (1:100, Vector Laboratories) y estreptoavidina Cy5 (1:200, Jackson ImmunoResearch) se utilizaron para evaluar la inflamación en los ratones que se sometieron a cirugía.

En general, el protocolo utilizado para las inmunofluorescencias fue el mismo que el detallado en el capítulo I. Para las combinaciones en que se utilizó el anticuerpo primario contra Cb se realizó una serie de pasos previos para aumentar la penetrabilidad en el tejido: al inicio del protocolo las secciones se incubaron 15 minutos con metanol (100 %) y posteriormente se realizaron 3 lavados de 5 minutos con TBS con agitación a Tamb antes de continuar con los siguientes pasos. Para la realización de las perfusiones e inmunofluorescencias sencillas se contó con la ayuda de MF Trinchero y M Veggetti.

Las inmunofluorescencias para BrdU se realizaron mediante dos protocolos; el estándar, para las combinaciones con los primarios DCX y NeuN (experimentos de la Fig. 20), y el seriado, que para la combinación con el primario Ki67 (experimentos de

la Fig. 21). Esto se debe a que la incubación de formamida del protocolo estándar produce una inmunoreactividad inespecífica del anticuerpo primario Ki67 que impide su análisis adecuado.

Protocolo de inmunofluorescencias de BrdU estándar:

Elección de las secciones en PB 0.1 M,

- 1) 3 lavados de 5 minutos con TBS con agitación a Tamb.
- 2) 1 hora y media de incubación con formamida (50 % formamida en buffer SSC 2 X) con agitación a 65° C.
- 3) 1 lavado de 15 minutos con SSC 2X con agitación a Tamb.
- 4) 20 minutos de incubación con HCl 2 N con agitación a 37° C.
- 5) 1 lavado de 10 minutos con buffer borato 0.1 M pH 8.5. con agitación a Tamb.
- 6) 6 lavados de 15 minutos con TBS 1 X con agitación a Tamb.
- 7) 1 hora de bloqueo (Solución de bloqueo: TBS con 3 % de suero de burro y 0.25 % de Tritón X-100) con agitación a Tamb.
- 8) 72 horas de incubación con los anticuerpos primarios con agitación a 4° C.
- 9) 2 lavados de 15 minutos con TBS con agitación a Tamb.
- 10) 15 minutos de bloqueo con agitación a Tamb.
- 11) 2 horas de incubación con el anticuerpo secundario con agitación a Tamb.
- 12) 3 lavados de 5 minutos con TBS con agitación a Tamb.
- 13) 10 minutos de incubación con DAPI para contratinción fluorescente.
- 14) 4 lavados de 5 minutos con TBS con agitación a Tamb.
- 15) Montaje con PVA-DABCO.
- 16) Secado de los portaobjetos en oscuridad por una noche a Tamb.
- 17) Secado de los portaobjetos en oscuridad por 2 a 5 días a 4° C. Los portaobjetos permanecen a 4° C hasta completar los análisis debido a una mayor estabilidad de los fluoróforos.

Todos los anticuerpos fueron aplicados en la solución de bloqueo.

Protocolo de inmunofluorescencias de BrdU seriado:

Elección de las secciones en PB 0.1 M,

- 1) 3 lavados de 5 minutos con TBS 1 X con agitación a Tamb.
- 2) 1 hora de bloqueo (Solución de bloqueo: TBS 1 X con 3 % de suero de burro y 0.25 % de Tritón X-100) con agitación a Tamb.
- 3) 1 hora de incubación a Tamb y una noche a 4° C con agitación, con el anticuerpo primario Ki67 en la solución de bloqueo.
- 4) 2 lavados de 15 minutos con TBS 1 X con agitación a Tamb.
- 5) 15 minutos de bloqueo con agitación a Tamb.
- 6) 2 horas de incubación con el anticuerpo secundario con agitación a temperatura ambiente en la solución de bloqueo.
- 7) 3 lavados de 5 minutos con TBS 1 X con agitación a Tamb.
- 8) 15 minutos de incubación con PFA 4 % en PB 0.1M pH 7.2. con agitación a Tamb.
- 9) 4 lavados de 5 minutos con TBS 1 X con agitación a Tamb.
- 10) 20 minutos de incubación con HCl 2 N con agitación a Tamb.
- 11) 1 lavado de 10 minutos con buffer borato 0.1 M pH 8.5. con agitación a Tamb.
- 12) 6 lavados de 15 minutos con TBS 1 X con agitación a temperatura ambiente
- 13) Chequeo al microscopio de fluorescencia la inmunoreactividad de Ki67 y decidir continuar.
- 14) 1 hora de bloqueo (Solución de bloqueo sin detergente: TBS 1 X con 3 % de suero de burro) con agitación a Tamb.
- 15) 1 hora de incubación a Tamb y una noche a 4° C con agitación, con los anticuerpos primarios BrdU y NeuN en solución de bloqueo sin detergente.
- 16) 2 lavados de 15 minutos con TBS 1 X con agitación a Tamb.
- 17) 15 minutos de bloqueo sin detergente, con agitación a Tamb.
- 18) 2 horas de incubación con el anticuerpo secundario con agitación a temperatura ambiente en solución de bloqueo sin detergente.

- 19) 3 lavados de 5 minutos con TBS 1 X con agitación a Tamb.
- 20) 10 minutos de incubación con DAPI para contratinción fluorescente.
- 21) 4 lavados de 5 minutos con TBS 1 X con agitación a Tamb.
- 22) Montaje con PVA-DABCO.
- 23) Secado de los portaobjetos en oscuridad por una noche a Tamb.
- 24) Secado de los portaobjetos en oscuridad por 2 a 5 días a 4° C. Los portaobjetos permanecen a 4° C hasta completar los análisis debido a una mayor estabilidad de los fluoróforos.

Las soluciones utilizadas fueron las mismas que para el capítulo I, salvo las indicadas y la SSC 20 X: NaCl 3 M y Citrato de Sodio (Sal Trisódica) 300 mM, pH 7.

Microscopía confocal y análisis de imágenes

Los estudios se realizaron utilizando las secciones coronales de la región más dorsal (-0.9 a -1.9 mm del bregma) y de la región ventral (-2.7 a -3.88 del bregma) del eje longitudinal del hipocampo, de acuerdo al atlas del cerebro de ratón de Paxinos & Franklin (Fig. 13C). Las secciones coronales que presentaron signos de inflamación utilizando GSA fueron descartadas, tal como se describió en el capítulo I (Fig. 4D). Las imágenes se adquirieron usando dos microscopios confocales: Zeiss LSM 5 Pascal y Zeiss LSM 510 Meta (Zeiss, Jena, Alemania). En los análisis se incluyeron sólo las células GFP⁺ o BrdU⁺ localizadas en la SGZ (espesor 10 µm) y en la GCL. Para el análisis de los progenitores neurales se consideró un ancho de 20 µm para la SGZ, por la cantidad de grupos de células en división. La colocalización con los diferentes marcadores y la morfología neuronal se evaluó tal como ya se describió en el capítulo I. Salvo que los planos ópticos (1 µm de espesor) de los *Z-stacks* se adquirieron a 0.9 µm de intervalo entre cada uno, para aumentar la resolución de las imágenes proyectadas.

La densidad de espinas se midió en fragmentos dendríticos GFP⁺ localizados en la capa molecular medial, debido a que el principal aferente glutamatérgico del giro dentado proviene de la corteza entorrinal medial y lateral (Amaral and Witter, 1989) (Fig. 1D) pero las neuronas granulares inmaduras solo alcanzan dicha capa. Para

determinar la posición del fragmento dendrítico, primero se adquirieron *Z-stacks* de las neuronas GFP⁺ en el giro dentado marcado con DAPI a 20 X. En las proyecciones Z de dichos *stacks* se dividió la capa molecular en tercios y se eligieron dentro de la capa molecular medial entre 4 a 9 fragmentos dendríticos de 40 a 50 µm de largo, para cada región, dorsal y ventral de cada animal. Se tuvo en cuenta una distancia mínima de 150 µm entre fragmentos para evitar muestrear repetidamente dendritas de la misma neurona. Se eligieron números similares de segmentos en la GCL superior e inferior (supra e infrapiramidal) de cada sección analizada. Para minimizar la pérdida de señal de fluorescencia por blanqueado al adquirir las imágenes, en todos los casos se eligieron los fragmentos de mayor intensidad. Además se utilizó la combinación más fuerte y estables de anticuerpos y fluoróforos (anti GFP de conejo y anti-conejo Cy3).

Se procedió luego a adquirir las imágenes de alta resolución en el microscopio confocal LSM 510 Meta con un objetivo de 63 X (nA 1.4, inmersión en aceite). Primero se realizó una adquisición de múltiples planos (*Z-stack*) de la neurona o fragmento GFP⁺ elegido, sin aumento digital. Se localizó el segmento y se ajustó un aumento digital sobre el *Z-stack* previo, específico al fragmento GFP⁺ elegido. Se adquirió el segmento completo en *Z-stacks* de 40 - 200 planos ópticos (1 µm de espesor) con 0.1 µm de intervalo entre planos. Posteriormente se proyectaron todos los planos de dicho segmento GFP⁺ en el eje Z y se cuantificaron las espinas en la proyección X-Y. Se consideraron todas las espinas localizadas hasta una distancia de 2 µm en forma perpendicular a la dendrita.

La proporción de neuronas granulares expresando ARC en el eje longitudinal del giro dentado se calculó de la siguiente manera:

1) Se midió el área de la GCL (NeuN⁺ o DAPI⁺) de secciones coronales de la región dorsal y ventral de cada ratón y se contó el número de células ARC⁺. Se obtuvo así una densidad de células ARC⁺ para cada región. Las mediciones se realizaron en las proyecciones del eje Z en X-Y de *Z-stacks* adquiridos a 20 X con un aumento digital de 0.7. Los planos fueron de 3 µm de espesor con un espaciado de 2.5 µm.

2) Se obtuvo una densidad de células NeuN⁺ en muestras de la GCL superior e inferior de la región dorsal y ventral del giro dentado de secciones coronales, en planos ópticos únicos de 1 µm. La densidad de neuronas granulares (NeuN⁺) fue significativamente diferente en cada región; 17800 ± 900 y 12700 ± 900 células/mm² en la región dorsal y

ventral, respectivamente ($p < 0.0001$, test de Mann Whitney, $N > 7$ muestreos en cada región de 3 ratones).

3) Se relativizó la densidad de células ARC⁺ a la densidad de células NeuN⁺ (en μm^2) para cada región del giro dentado, y se graficó la expresión de ARC cada 100 neuronas granulares (NeuN⁺). De ese modo se independizaron los datos de las diferencias del ángulo de corte del tejido y de las posibles diferencias de tamaño que podrían tener los somas de las neuronas granulares en cada región.

Para la adquisición de datos de expresión de Cb, la contabilización de espinas en los segmentos dendríticos y ARC en la GCL se contó con la ayuda de MF Trinchero. Todos los análisis de imágenes se realizaron utilizando el software Zeiss LSM Image Browser.

Análisis estadístico

En general, el análisis se realizó según lo descrito en el capítulo I. Para las comparaciones entre las regiones dorsal y ventral del hipocampo de los mismos ratones se realizaron test pareados, *t*-test (para los datos paramétricos) y Wilcoxon signed rank (para los datos no paramétricos). Para las comparaciones entre dos grupos en la misma región del hipocampo o cuando las comparaciones dorsal vs. ventral se realizaron con datos provenientes de distintos animales se realizaron *t*-test no pareados (datos paramétricos) o test de Mann Whitney (datos no paramétricos). Por último, para la comparación de la expresión de Cb en más de dos grupos experimentales (14, 21 y 56 dpi) se realizó un ANOVA de una vía seguido de la comparación múltiple del post-hoc test de Bonferroni para cada región dorsal y ventral por separado (datos paramétricos). Todos los test estadísticos tuvieron un intervalo de confianza del 95 % en los dos extremos de la distribución.

Resultados

Estudio de la actividad neuronal en la GCL

Diferencias en la actividad neuronal a largo del eje longitudinal del hipocampo en condiciones basales

Para determinar el nivel de actividad de la GCL, donde se desarrollan las neuronas generadas en el hipocampo adulto, se utilizó a modo de sensor la expresión de ARC en las neuronas granulares. En ratones adultos jóvenes que permanecieron en sus cajas habituales se evaluó a la 9^{na} y 10^{ma} semana de vida la actividad basal presente en la GCL de la región más dorsal y la más ventral del giro dentado (Fig. 13A,C). Se observó un mayor porcentaje de neuronas granulares expresando ARC en la región dorsal que en la ventral en los 10 animales analizados (Fig. 14).

Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas de expresión de ARC entre la GCL superior y la inferior del giro dentado en condiciones normales. Los porcentajes promedio de 9 ratones fueron; 1.8 ± 0.2 % vs. 2.2 ± 0.3 % respectivamente en la región dorsal y 0.7 ± 0.2 % vs. 0.8 ± 0.1 % respectivamente en la región ventral.

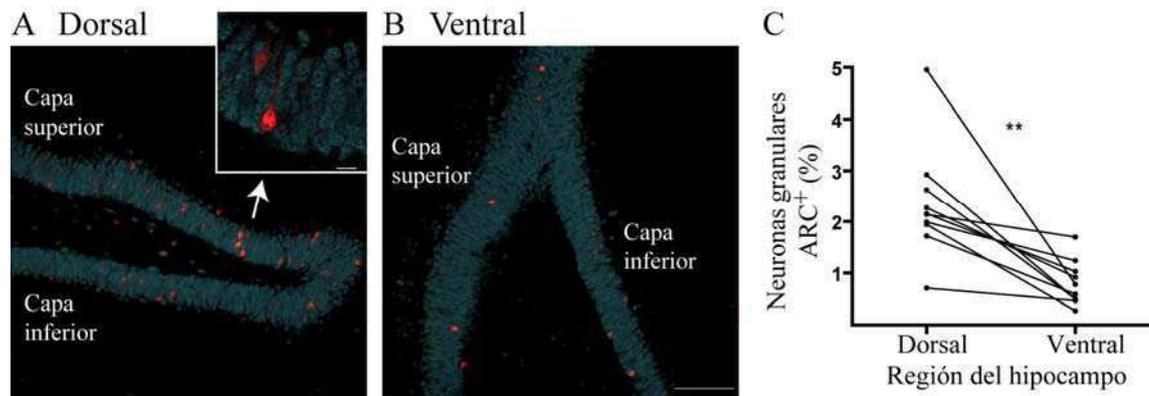


Figura 14: Actividad de la GCL del eje longitudinal del giro dentado en condiciones basales. **A y B.** Imágenes comparativas tomadas del mismo cerebro mostrando la expresión de ARC (rojo) en neuronas granulares en el giro dentado dorsal (-1.7 mm del bregma; A) y en unas pocas neuronas en el giro dentado ventral (-3.4 mm; B). Las imágenes son proyecciones de 6 a 7 planos ópticos. Escala: 100 µm. **Imagen magnificada:** Ejemplo magnificado de expresión de ARC en las neuronas granulares señaladas con la flecha. La imagen es un plano óptico único. Escala: 10 µm. NeuN (azul). **C.** Cuantificación de la expresión de ARC considerando las variaciones de densidad de neuronas en la GCL de ambas regiones (ángulos de corte diferentes). Cada par de puntos unidos por una línea representa los datos correspondientes a un cerebro. (**) indica $p = 0.002$, test de Wilcoxon, $N = 10$ ratones sedentarios

.Modificaciones en la actividad de la GCL por ejercicio voluntario

Cuando los ratones se mantuvieron en jaulas conteniendo rueditas para ejercicio físico voluntario, condición en la que corren varios kilómetros todas las noches (Allen et al., 2001) (Fig. 13B), se observó una mayor densidad de neuronas granulares ARC⁺ en el giro dentado ventral y no así en el dorsal (Fig. 15). La mayoría de los ratones analizados en estas condiciones presentaron iguales niveles de actividad en la GCL del giro dentado dorsal y ventral (solo en dos casos la expresión aumentó en ambas regiones) (Fig. 15C). Los porcentajes promedio de expresión de ARC fueron 2.3 ± 0.7 % para la GCL dorsal y 2 ± 0.5 % para la ventral, de 9 ratones analizados. Por lo tanto, mientras que los niveles de activación de la GCL dorsal de animales sedentarios vs. corredores permanecieron constantes, la actividad en la GCL ventral aumentó significativamente debido al ejercicio físico (Fig. 15D). Por otro lado, tampoco se observaron cambios significativos en la inducción de ARC por el ejercicio, al comparar la GCL superior e inferior de cada región; 2.8 ± 0.5 % vs. 2.1 ± 0.9 % respectivamente en la región dorsal y 2 ± 0.5 % vs. 2 ± 0.3 % respectivamente en la región ventral (N = 9 animales). Estas observaciones indican que el ejercicio físico activa selectivamente la región ventral del giro dentado y, por lo tanto, equilibra los niveles globales de actividad neuronal a lo largo del eje longitudinal del hipocampo.

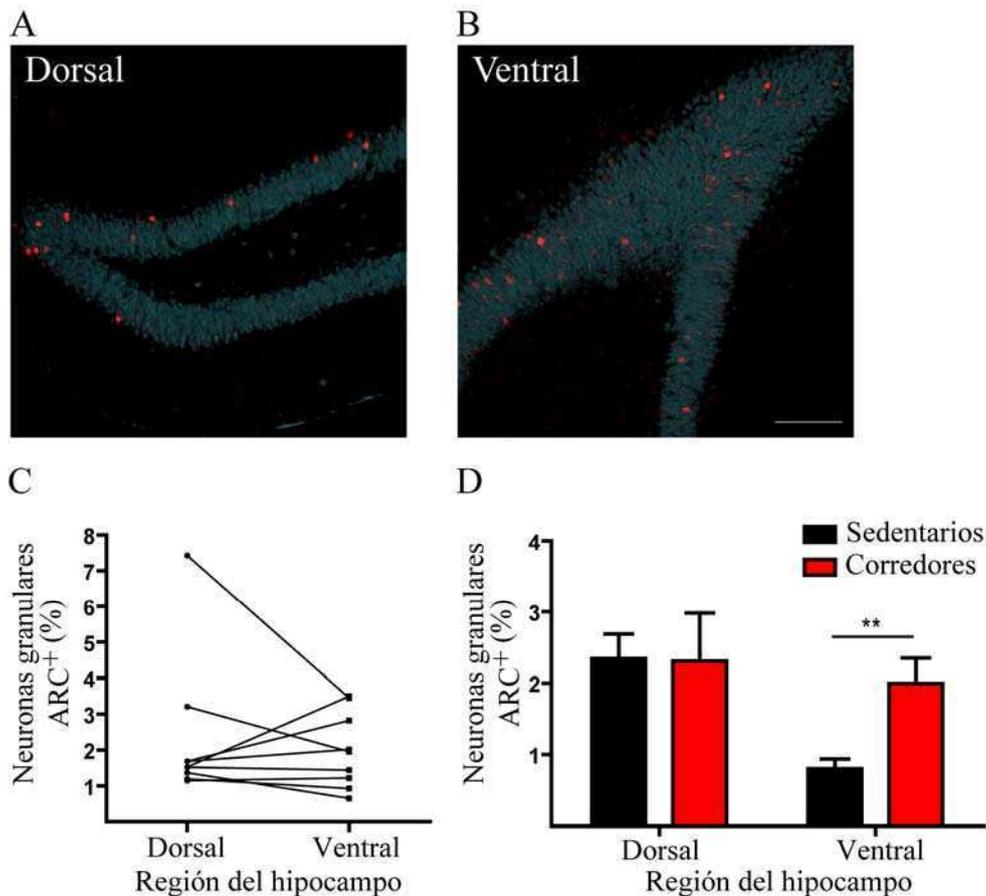


Figura 15: Actividad neuronal de la GCL en condiciones de ejercicio voluntario. **A y B.** Imágenes del giro dentado mostrando niveles similares de expresión de ARC (rojo) en neuronas granulares (NeuN⁺, azul) del giro dentado dorsal (-1.7 mm del bregma; A) y ventral (-3.4 mm; B). Las imágenes son proyecciones de 6 a 7 planos ópticos. Escala: 100 μ m. **C.** Cuantificación de la expresión de ARC. Los puntos unidos por una línea representan los datos correspondientes a un cerebro. Los datos no son significativamente diferentes ($p = 0.73$, test de Wilcoxon, $N = 9$). **D.** Las barras representan los datos promedio \pm SEM mostrados en Fig. 14C y 15C, para 9 animales sedentarios y 9 corredores. (**) indica $p = 0.004$, test de Mann Whitney.

Mayor madurez neuronal en los microambientes más activos

Diferencias de madurez morfológica a los 21dpi

La morfología de las neuronas granulares en desarrollo a los 21dpi en el hipocampo adulto de animales sedentarios mostró diferentes características de madurez a lo largo del eje longitudinal del hipocampo (Fig. 16 a 18). Mientras que las neuronas nuevas de la región dorsal se caracterizaron por su árbol dendrítico expandido en toda la capa molecular, solo algunas de las neuronas de la región ventral alcanzaron la capa

molecular más externa otras mostraron dendritas que apenas llegaron a la región más interna (Fig. 16A,B). Por el contrario, en el giro dentado de animales corredores no se observaron estas diferencias a lo largo del eje longitudinal; independientemente de la región las neuronas GFP⁺ alcanzaron la capa molecular más externa a los 21dpi (Fig. 16C,D).

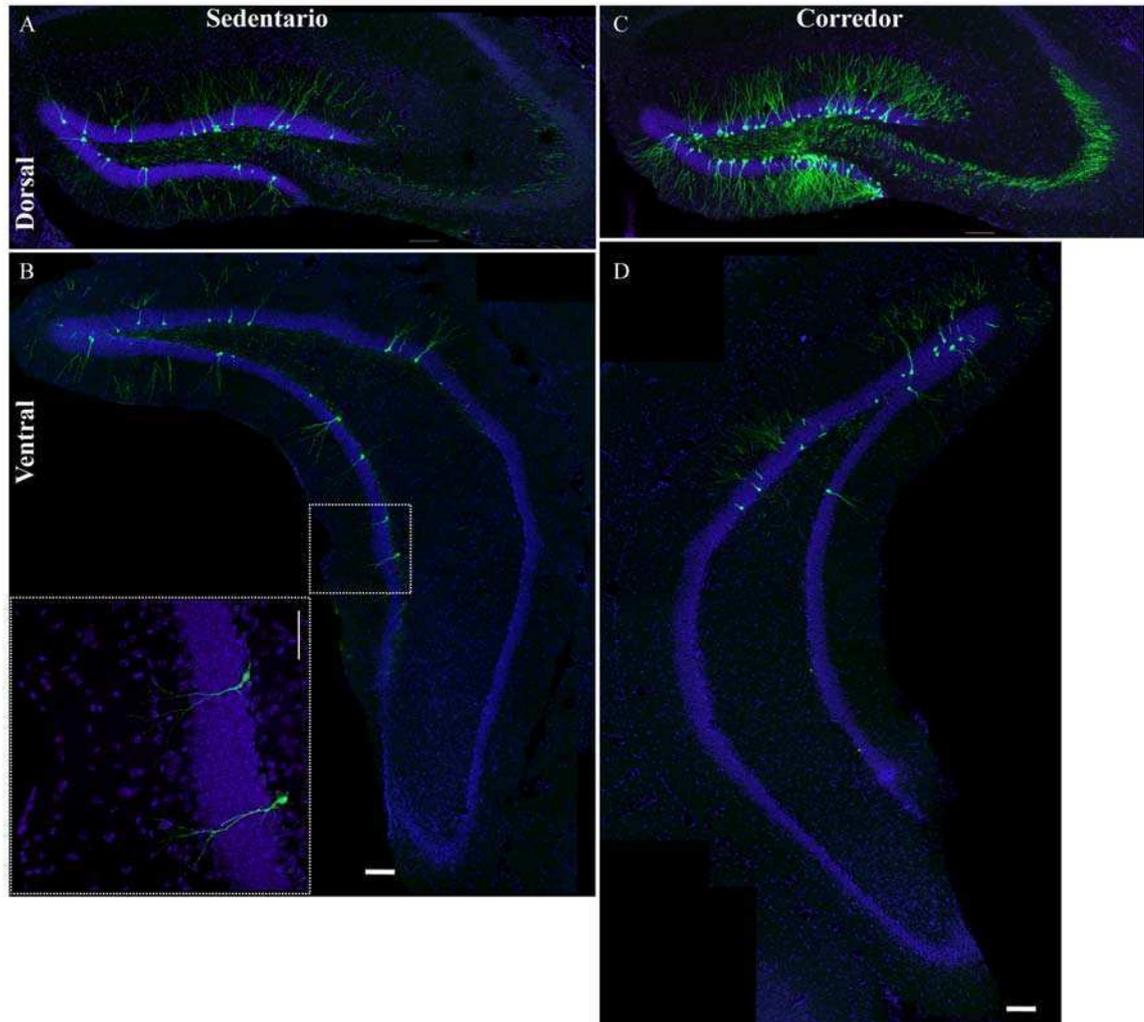


Figura 16: Neuronas granulares de 21 dpi en el giro dentado dorsal y ventral. **A y C.** Ejemplos de secciones coronales mostrando neuronas GFP⁺ en la región dorsal (-1.7 mm del bregma) para un ratón sedentario y uno corredor. **B y D.** Ejemplos de secciones coronales mostrando neuronas GFP⁺ en la región ventral (-3.6 mm del bregma) para un ratón sedentario y uno corredor. Tinción de la GCL con DAPI (azul) y amplificación de GFP por inmunofluorescencia. Cada panel es una composición de 3 (A y C) y 7 (C y D) proyecciones de alrededor de 35 planos ópticos. Escala: 100 μm. **Imagen magnificada en B:** muestra detalles morfológicos de las neuronas nuevas del recuadro punteado en B. Proyección de 19 planos. Escala: 50 μm. Nota: Las secciones dorsales y ventrales mostradas en A y B provienen del mismo animal sedentario y las mostradas en C y D del mismo animal corredor.

Por lo tanto las neuronas nuevas de 21 dpi de los animales que corrieron (en las dos regiones analizadas) y las neuronas dorsales de los ratones sedentarios son morfológicamente similares: árbol dendrítico complejo cubiertos de espinas sin dendritas basales y con somas redondeados (Fig. 17A,C,D). Por el contrario, las neuronas de 21 dpi de la región ventral de animales sedentarios presentaron una morfología más inmadura, como dendritas basales desde el soma o desde el proceso proximal apical, árbol dendrítico más rudimentario con varicosidades, y pocas o ninguna espina (Fig. 16C recuadro, Fig. 17B).

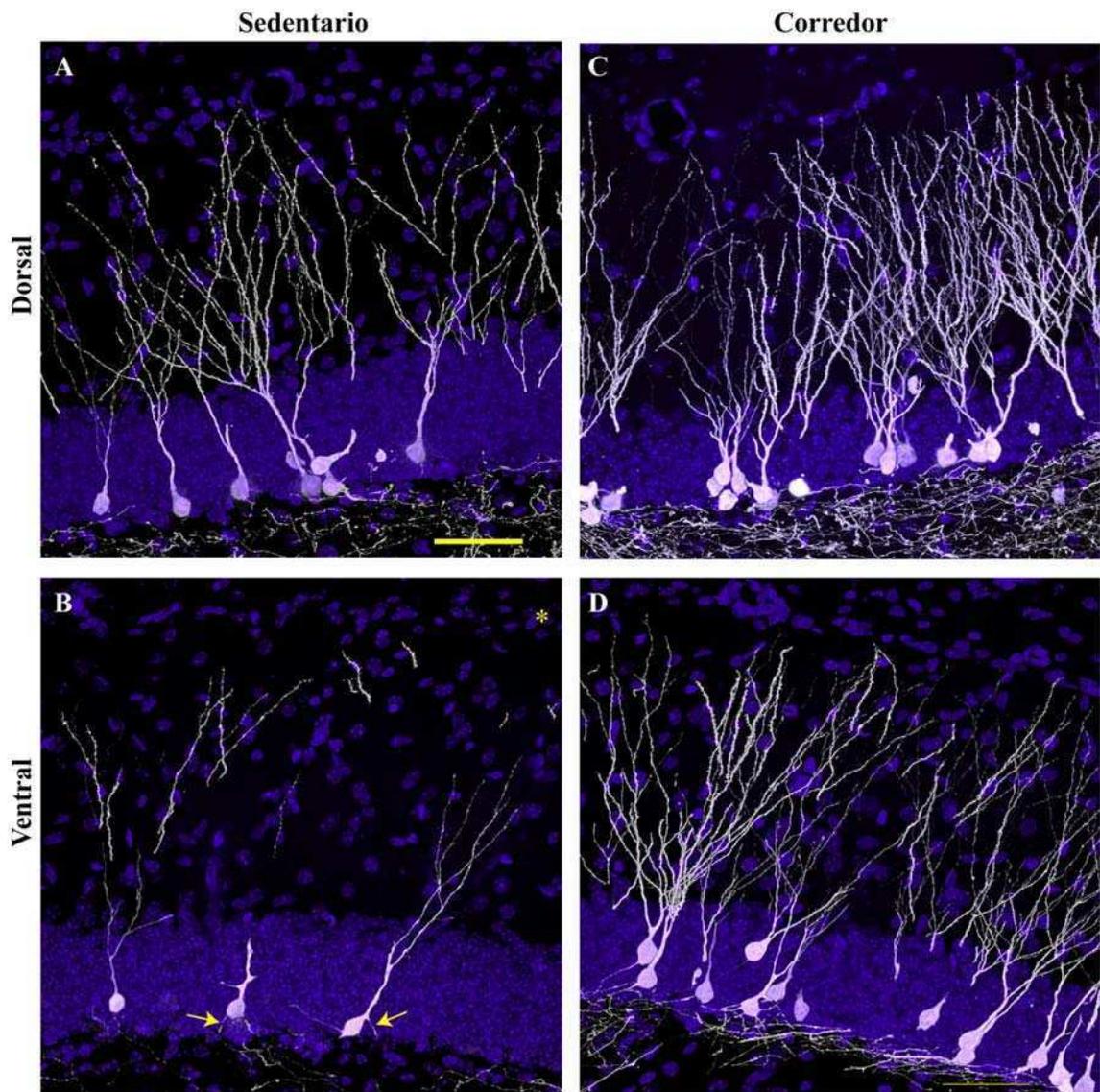
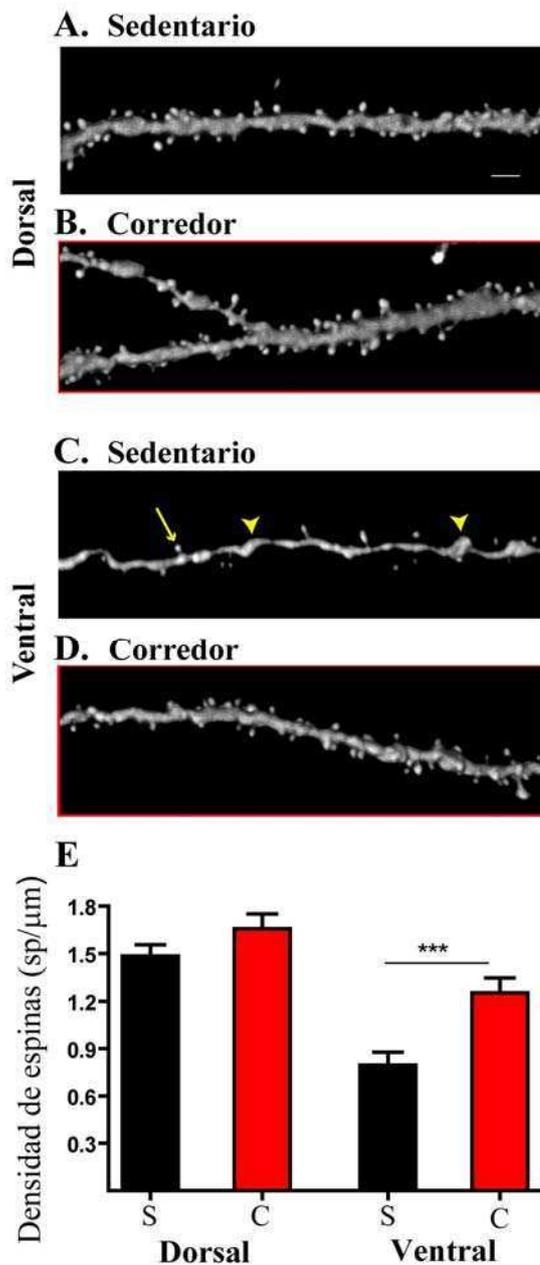


Figura 17: *Morfología inmadura en neuronas de 21 dpi del giro dentado ventral.* **A y C.** Ejemplos de secciones coronales mostrando neuronas GFP⁺ en la región dorsal (-1.7 mm del bregma) para un ratón sedentario y uno corredor. **B y D.** Ejemplos de secciones coronales mostrando neuronas GFP⁺ en la región ventral (~ -3.5 mm del bregma) para un ratón sedentario y uno corredor. Tinción de la GCL con DAPI (azul) y amplificación de GFP por inmunofluorescencia (blanco). Asterisco en B, señala el borde externo de la capa molecular y las flechas indican las dendritas basales. Cada panel es una proyección de alrededor de 30 planos ópticos. Escala: 50 μ m.



La densidad de espinas, además de ser el correlato fisiológico de conectividad con la aferencia glutamatérgica, es un parámetro morfológico cuantitativo que permite evaluar el grado de madurez de las neuronas nuevas, especialmente cuando éstas se encuentran en el pico de sinaptogénesis. Se tomaron entonces imágenes de alta resolución de fragmentos dendríticos GFP⁺ y se cuantificó la densidad de espinas (Fig. 18).

Figura 18: Densidad de espinas dendríticas en neuronas de 21 dpi de ratones sedentarios y corredores. **A - D.** Ejemplos representativos de segmentos dendríticos GFP⁺ de un animal sedentario (A,C) y uno corredor (B,D). La flecha en C señala una espina y las cabezas de flecha las varicosidades típicas de las dendritas inmaduras. Cada imagen es una proyección de alrededor de 76 planos ópticos. Escala: 2 μm. **E.** Cuantificación de la densidad de espinas. Cada barra muestra el promedio ± SEM con N = 22 a 31 fragmentos para cada área y condición experimental. N = 5 animales sedentarios y 4 corredores. (***) indica $p = 0.0006$, t -test no pareado.

De acuerdo con los resultados del análisis morfológico, las únicas dendritas claramente diferentes fueron las de neuronas de la región ventral de animales sedentarios, ya que mostraron varicosidades y pocas espinas, signos típicos de un estadio de desarrollo inmaduro (Fig. 18C). Por otra parte, las dendritas de neuronas desarrollándose en ambientes más activos presentaron un espesor más homogéneo y un notorio aumento en la densidad de espinas (Fig. 18A,B,D), signos de un mayor nivel de madurez. El análisis de densidad de espinas mostró una significativa diferencia regional en los animales sedentarios ($p < 0.0001$, t -test), con un promedio de ~1.5 espinas/μm en el giro dentado dorsal y ~0.8 espinas/μm en la región ventral. En

cambio, los animales sometidos a ejercicio voluntario revelaron una diferencia regional significativa pero menor ($p = 0.007$, t -test) en la densidad de espinas: 1.6 espinas/ μm en el giro dentado dorsal versus 1.25 espinas/ μm en la región ventral. Por lo que se observó un aumento significativo en la densidad de espinas de las neuronas nuevas de la región ventral inducidas por el ejercicio y no así en la región dorsal, donde no hubo diferencia estadística entre animales sedentarios y corredores (Fig. 18 E).

Diferencias dorsoventrales en la maduración neuronal analizadas según la expresión de marcadores neuronales específicos

A lo largo de varias décadas, los marcadores neuronales han mostrado ser una excelente herramienta no sólo para identificar los diferentes fenotipos celulares sino también para evaluar el grado de maduración neuronal (Zhao et al., 2008). En particular, la expresión de Cb, proteína que regula las concentraciones citoplasmáticas de calcio en las neuronas maduras, se observó desde la tercera semana del desarrollo neuronal en la neurogenesis del hipocampo adulto (Sloviter, 1989; Brandt et al., 2003). Por tal motivo se estudió su expresión en neuronas GFP⁺ de 21 dpi en el hipocampo de animales sedentarios y corredores para ampliar los resultados obtenidos en estudios morfológicos.

De acuerdo con los resultados anteriores, en la región dorsal del giro dentado no hubo diferencias en el porcentaje de neuronas nuevas que expresaron Cb (~75 %) a los 21 dpi entre los animales sedentarios y corredores. Sin embargo, en la región ventral se observó una diferencia significativa de madurez determinada por la actividad física. Mientras que en los animales corredores se observó un ~74 % de expresión de Cb, en los animales sedentarios solamente el ~21 % de las neuronas nuevas de 21 dpi fueron positivas para Cb, indicando un estado más inmaduro para la mayoría de estas neuronas (Fig. 19).

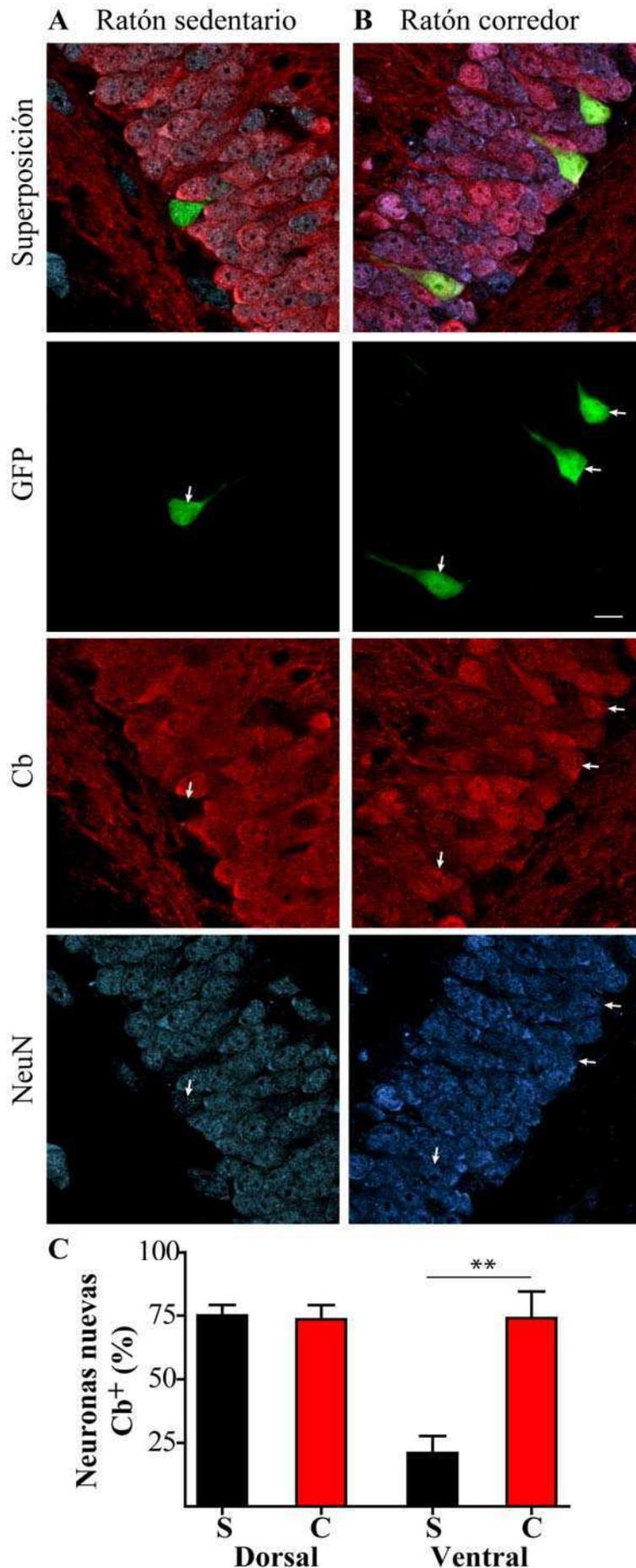


Figura 19: Análisis de la expresión de Cb en las neuronas de 21 dpi del giro dentado dorsal y ventral. **A.** Ejemplo de una neurona de la región ventral de un animal sedentario que no expresa Cb y expresa NeuN con baja intensidad (comparar con las neuronas granulares vecinas). Los paneles verticales son planos ópticos únicos mostrando los 3 canales de fluorescencia por separado y su superposición en el panel superior. **B.** Ejemplo de neuronas nuevas de la región ventral de un animal corredor que expresan Cb y NeuN (comparar con las neuronas granulares vecinas). Los paneles en vertical son planos ópticos únicos. Escala: 10 μ m. **C.** Expresión de Cb en neuronas nuevas de 21 dpi. Cada barra es el porcentaje promedio \pm SEM para las regiones y condiciones indicadas (N = 224 y 219 neuronas GFP⁺ totales de 4 animales sedentarios y 4 corredores, respectivamente). (**) indica $p = 0.006$, t -test no pareado.

Las observaciones obtenidas analizando la expresión de Cb se validaron con el análisis de expresión de DCX y NeuN, previamente utilizado en el capítulo I. Cabe destacar que los experimentos presentados en lo que resta de esta tesis se realizaron en animales sedentarios. Consistentemente con una mayor inmadurez de las neuronas de 21 dpi de la región ventral, más del 90 % de la población expresó DCX. En cambio en la región dorsal sólo la mitad de las neuronas fue DCX⁺ y el resto solo expresó NeuN (Fig. 20A-C).

Los experimentos discutidos hasta ahora fueron realizados marcando las neuronas mediante inyección retroviral en el giro dentado. Dado que las inyecciones intrahipocampales son invasivas y producen una herida e inflamación, estos eventos podrían contribuir en sí mismos a las diferencias encontradas en la tasa de maduración en distintas áreas del giro dentado. Para investigar esta posibilidad se repitió el mismo experimento anterior pero marcando las NPCs y su progenie con inyecciones intraperitoneales de BrdU, una técnica inocua para el microambiente del giro dentado. Los animales se sacrificaron 21 días posteriores al marcado. Cabe destacar que con este método se obtuvieron resultados consistentes a aquellos reportados utilizando el retrovirus. Mientras que en la región ventral el 74 % de las neuronas BrdU⁺ colocalizó con el marcador de inmadurez, DCX, en la región dorsal de los mismos animales el ~46 % de las neuronas nuevas expresó dicho marcador y el resto ya solo expresó NeuN a los 21 días (Fig. 20D-F). Estas observaciones demuestran que la diferencia en la tasa de maduración dorsal vs. ventral se debe a un fenómeno que ocurre en condiciones fisiológicas y no a un artefacto de la técnica de marcado de las NPCs.

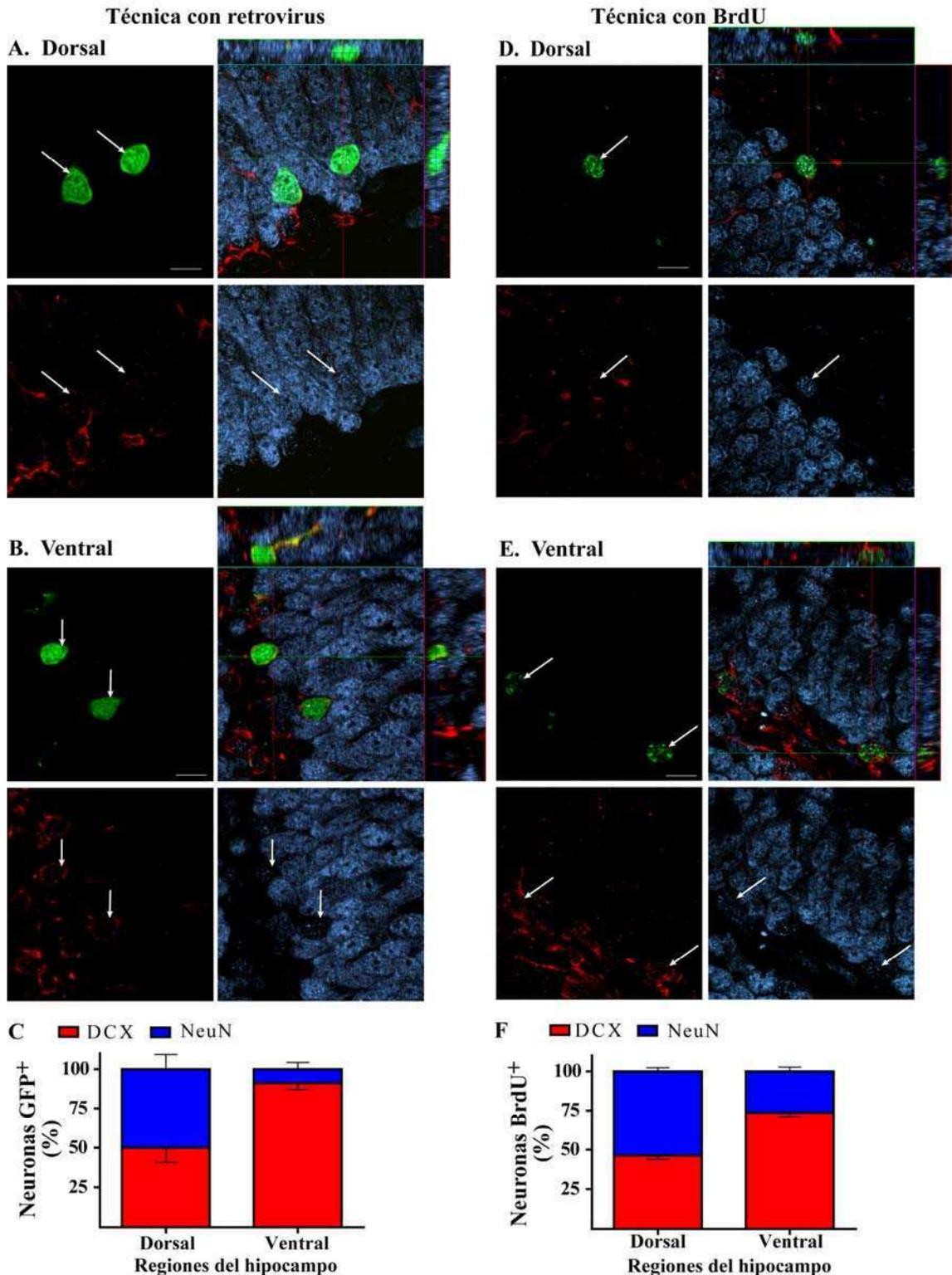


Figura 20: Expresión de DCX en las neuronas de 21dpi en animales sedentarios. Análisis de neuronas marcadas con GFP (A-C) y BrdU (D-F). **A.** Ejemplo de neuronas GFP⁺ adyacentes en la GCL dorsal expresando NeuN, pero no DCX. Los 4 paneles son planos ópticos únicos mostrando los 3 canales de fluorescencia por separado y su superposición en el panel superior derecho junto con la proyección ortogonal de una de las neuronas. **B.** Ejemplo de neuronas GFP⁺ en el mismo plano mostrando expresión de DCX y baja expresión de NeuN en la GCL ventral. Paneles igual que en (A). **C.** Expresión de DCX en neuronas GFP⁺ de 21 dpi. Cada división de la barra representa el promedio ± SEM de neuronas que colocalizan con DCX según la región del giro dentado. Notar que las neuronas nuevas que no expresaron DCX⁺ sí colocalizaron con NeuN. N = 191 neuronas en la región dorsal y 174 en la ventral de 7 ratones; $p = 0.015$ para la expresión de DCX dorsal vs. ventral, test de Wilcoxon. **D.**

Ejemplo de una neurona BrdU⁺ en la GCL dorsal expresando NeuN, pero negativa para DCX. Paneles igual que en (A). **E.** Ejemplo de neuronas BrdU⁺ en el mismo plano óptico mostrando expresión de DCX y baja expresión de NeuN en la GCL ventral. **F.** Expresión de DCX en neuronas BrdU⁺ de 21 días. Gráfico similar a (C). N = 85 neuronas BrdU⁺ en la región dorsal y 122 en la ventral de 5 ratones, con $p < 0.0001$ para DCX, *t*-test pareado. Neuronas nuevas (verdes, flechas), DCX (rojo) y NeuN (azul). Escalas: 10 μ m.

Mayor tasa de maduración neuronal en el hipocampo dorsal en condiciones sedentarias

Consistentemente los resultados de expresión de marcadores estuvieron de acuerdo con los de morfología neuronal avalando la hipótesis de un efecto promotor de la actividad del ambiente en la maduración. Sin embargo, aún quedaría por determinarse si la actividad eléctrica del circuito modificó realmente la tasa de maduración neuronal. Dos posibilidades alternativas podrían explicar los resultados mostrados más arriba sin alterar realmente la velocidad en la que la maduración ocurre: 1) podría haberse afectado la temporalidad en que las NPCs abandonan el ciclo celular; por ejemplo, resultados similares se obtendrían si las neuronas nuevas del giro dentado ventral comenzaran su diferenciación neuronal más tarde y 2) las neuronas granulares del giro dentado ventral podrían madurar a la misma tasa pero el desarrollo podría quedar interrumpido antes de alcanzar el estadio maduro o alcanzar un fenotipo de madurez diferente. Estas posibilidades fueron discriminadas en el análisis que se discute a continuación.

Comportamiento similar de las NPCs en las regiones dorsal y ventral

Las neuronas granulares nuevas en el hipocampo adulto se originan a partir de NPCs presentes en la SGZ. Estos progenitores comienzan a determinar su destino neuronal mientras se encuentran en activa división, la cual una vez finalizada da lugar al desarrollo neuronal (Brown et al., 2003; Brandt et al., 2003; Kempermann et al., 2003; Kempermann et al., 2004). Por lo tanto, el momento en que una célula comienza a ser postmitótica es un buen parámetro para determinar el comienzo de la maduración neuronal. Mientras que dicho momento ya ha sido evaluado en otros trabajos, posibles

diferencias regionales nunca fueron estudiadas. En ratas adultas se observó que la mitad de las NPCs del giro dentado salen del ciclo celular al día siguiente del marcado con BrdU, y al 4^{to} día solo el 4 % permanece proliferando (Dayer et al., 2003). En ratones adultos inyectados con retrovirus expresando GFP se encontró que prácticamente todos los progenitores abandonaron el ciclo celular al 7^{mo} dpi y solo un 4.5 % continuó dividiéndose (Jagasia et al., 2009)

Para analizar esta situación en nuestro esquema experimental se marcó la gran mayoría de las NPCs durante 1 día con 3 inyecciones de BrdU y se evaluó la proporción de células que continuó proliferando al 2^{do} y 4^{to} día. El estudio se realizó cuantificando la expresión de Ki67, marcador del ciclo celular (Scholzen and Gerdes, 2000) (Fig. 21A). Se analizaron más de 1000 células BrdU⁺ en la SGZ (considerando 40 µm de ancho) de 5 animales para cada condición (2^{do} y 4^{to} día) y no se observaron diferencias significativas en la expresión de Ki67 entre las distintas regiones del giro dentado. Independientemente de la región del giro dentado analizada el ~30 % de las células BrdU⁺ se encontró proliferando a los 2 días posteriores al marcado con BrdU y el ~ 14 % se mantuvo expresando Ki67 a los 4 días (Fig. 21B).

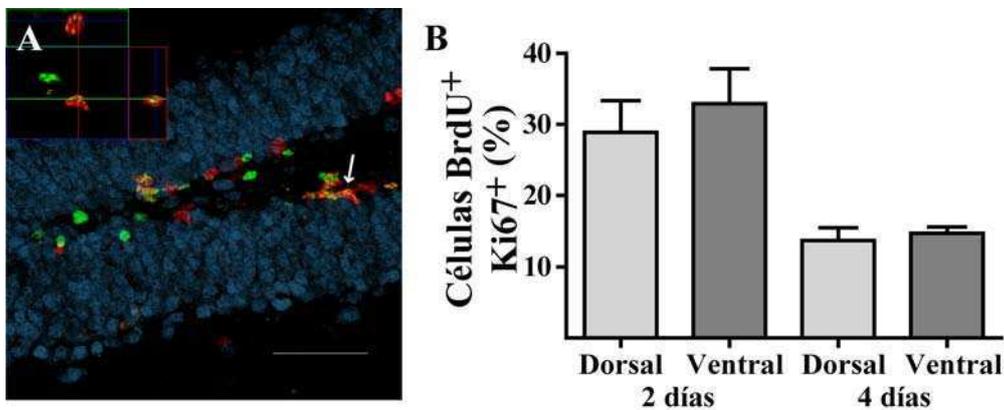


Figura 21: Los progenitores de todo el hipocampo abandonan el ciclo celular al mismo tiempo. **A.** Imagen representativa de expresión de BrdU (verde) y Ki67 (rojo) en la SGZ. Se observan grupos de células que continúan proliferando (amarillas; dobles marcadas) después de 4 días de la inyección con BrdU. La imagen es una proyección de 34 planos confocales de la región dorsal. NeuN (azul). Escala: 50 µm. **Imagen magnificada:** colocalización de BrdU y Ki67 en un mismo plano óptico de la célula señalada con una flecha. Los márgenes superior y derecho muestran la proyección ortogonal en X-Z e Y-Z correspondiente. **B.** Proporción de células BrdU⁺ que continúan en el ciclo celular (coexpresan Ki67) después de 2 y 4 días. Cada barra muestra promedio ± SEM de expresión de Ki67 del total de células BrdU⁺ en la SGZ y GCL de cada región, 5 animales para cada tiempo. N = 502 y 584 células BrdU⁺ a 2 días, 734 y 892 células BrdU⁺ a 4 días (5 ratones por cada día).

Por lo tanto estos resultados nos permiten descartar la posibilidad de que el momento de abandonar el ciclo celular sea la causa de las diferencias dorso-ventrales observadas. Por el contrario, nos indican que las células granulares nuevas comienzan su maduración al mismo tiempo en todo el hipocampo.

Las neuronas del hipocampo dorsal y ventral alcanzan el mismo estadio final de madurez

La maduración de las células granulares generadas en el giro dentado adulto es un proceso prolongado que finaliza alrededor de la 8^{va} semana, con neuronas que adquieren características morfológicas y fisiológicas indistinguibles a las preexistentes (Espósito et al., 2005; Zhao et al., 2006; Laplagne et al., 2006; Laplagne et al., 2007). Sin embargo, los estudios mencionados se realizaron sin considerar esta segregación dorso-ventral y, a la luz de nuestras recientes observaciones, cabría la posibilidad que las neuronas de la región ventral alcancen características diferentes de maduración o queden arrestadas en un nivel previo de su desarrollo.

Para resolver esta pregunta se estudió la morfología de neuronas GFP⁺ del giro dentado dorsal y ventral a los 56dpi. No se encontró diferencia alguna entre las áreas dorsal y ventral. Todas las neuronas nuevas mostraron un árbol dendrítico cubierto de espinas extendiéndose en toda la capa molecular, un soma redondeado y su axón proyectándose desde el soma hacia el hilus (Fig. 22A,B). A diferencia de las neuronas de 21 dpi, todas las neuronas de 56 dpi mostraron dendritas completamente maduras con un alto número de espinas, sin varicosidades y de un diámetro homogéneo, independientemente de la región analizada (Fig. 22C,D). La cuantificación de la densidad de espinas confirmó estas observaciones, ya que fue similar en ambos grupos de neuronas (dorsales y ventrales; Fig. 22E). Estas observaciones demuestran que las células granulares nuevas alcanzan el mismo nivel de madurez a lo largo de todo el hipocampo.

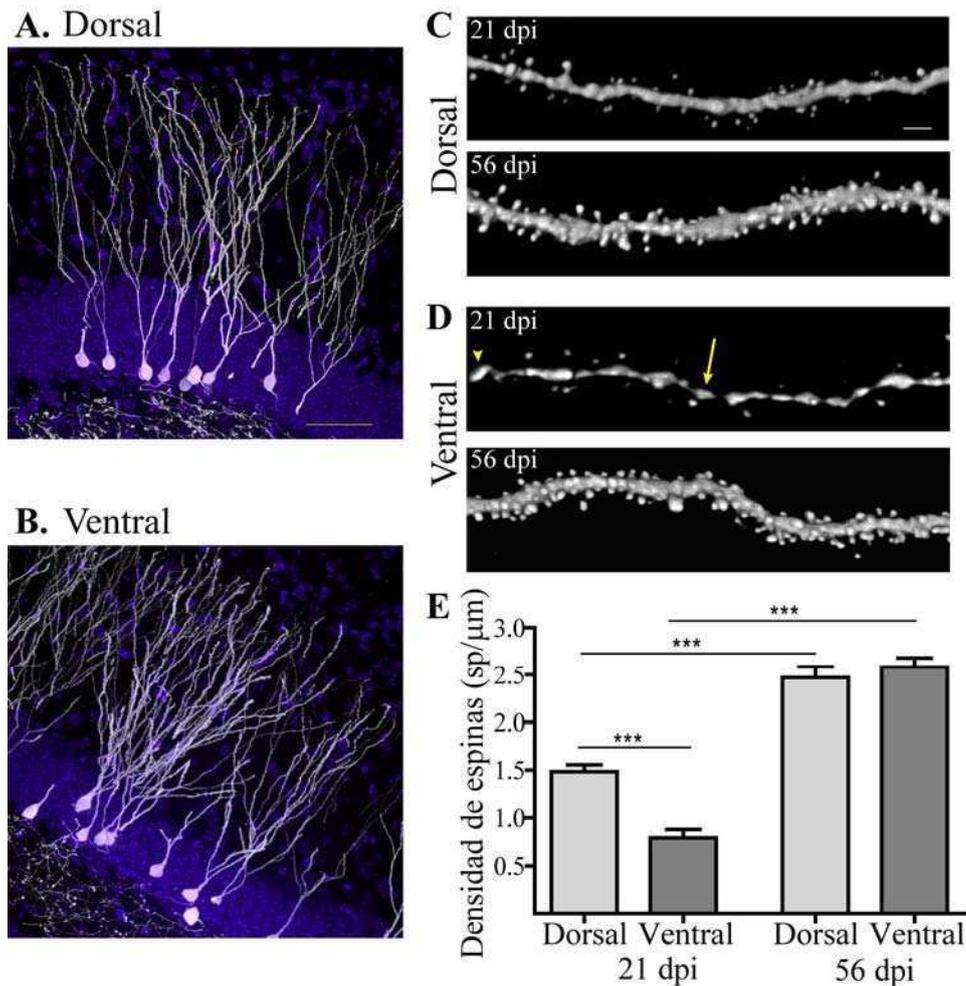


Figura 22: Todas las neuronas nuevas alcanzan el mismo nivel de madurez morfológica a los 56 dpi. **A** y **B.** Morfologías de neuronas GFP⁺ de 56 dpi de la región dorsal (A) y ventral (B) del giro dentado. La GCL fue marcada con DAPI (azul) y la señal de GFP amplificada con inmunofluorescencia (blanco). Proyecciones de ~ 30 planos ópticos. Escala: 50 μm. **C** y **D.** Ejemplos representativos de segmentos dendríticos de neuronas nuevas de 56 dpi junto con un fragmento de 21 dpi para una mejor comparación, en el giro dentado dorsal (C) y ventral (D). La flecha en D señala una varicosidad y las cabezas de flecha el final del proceso dendrítico en la capa molecular medial. Cada imagen es una proyección de ~ 107 planos ópticos. Escala: 2 μm. **E.** Cuantificación de la densidad de espinas. Las barras muestran el promedio ± SEM. N = 13 fragmentos para cada región (dorsal y ventral) de 56 dpi de 3 animales sedentarios. Los datos de 21 dpi son los mismos que en Fig. 18E de animales sedentarios. (***) p < 0.0001, *t*-test no pareado para comparaciones de la misma región entre 21 y 56 dpi y *t*-test pareado para la comparación dorsal vs. ventral de 21 dpi.

Las neuronas del giro dentado ventral se desarrollan a una tasa más lenta que aquellas de la zona dorsal

Los resultados descritos más arriba indican que si bien las neuronas granulares comenzaron su maduración neuronal al mismo tiempo y alcanzaron el mismo nivel de desarrollo a la 8^{va} semana tanto en la región dorsal como en la ventral del hipocampo

adulto, a los 21 dpi las neuronas nuevas de la región dorsal avanzaron hacia un grado de maduración mayor. Para corroborar esta aparente diferencia en la tasa de maduración se analizó el curso temporal de la expresión de Cb a los 14, 21 y 56 dpi en el giro dentado adulto dorsal y ventral.

Se encontraron niveles de expresión variables de Cb en las neuronas granulares maduras independientemente si fuesen nuevas (56 dpi) o pre-existentes en la capa granular (Fig. 23A). Por ello se consideró positiva toda célula que presentase marca en todo el soma y en diferentes planos confocales y negativa cuando la inmunoreactividad se limitó a unos pocos píxeles discontinuos. De acuerdo con los resultados previos del análisis morfológico, no hubo diferencias entre la región dorsal y ventral a 56 dpi, momento en que la gran mayoría de las neuronas expresó Cb (Fig. 23E). En cambio a los 21 dpi se observó un marcado contraste siendo positivas la mayoría de las neuronas nuevas dorsales y negativas las ventrales (Fig. 23B,C,E). Incluso, mientras que no hubo diferencias significativas en el porcentaje de neuronas de 21 y 56 dpi que expresaron Cb en la región dorsal, sí hubo un marcado aumento en la expresión de Cb en la región ventral ($p < 0.0001$, ANOVA y post-hoc Bonferroni).

Independientemente de la región analizada, se encontró una expresión de Cb muy marginal en las neuronas nuevas de 14 dpi, ya que se observó un ~9 y ~3 % de colocalización en el giro dentado dorsal y ventral, respectivamente (Fig. 23D,E). Interesantemente, los porcentajes de expresión de Cb entre las neuronas nuevas de 14 y 21 dpi de la región ventral no fueron significativamente diferentes. En cambio, sí hubo una marcada diferencia entre los mismos tiempos para la región dorsal ($p = 0.0003$, ANOVA y test de Bonferroni a posteriori). Notablemente, la expresión de Cb en la región dorsal a 14 dpi fue básicamente similar a la observada en la región ventral a 21 dpi, por lo que podría inferirse que las neuronas nuevas del giro dentado ventral mostraron aproximadamente una semana de atraso en su maduración.

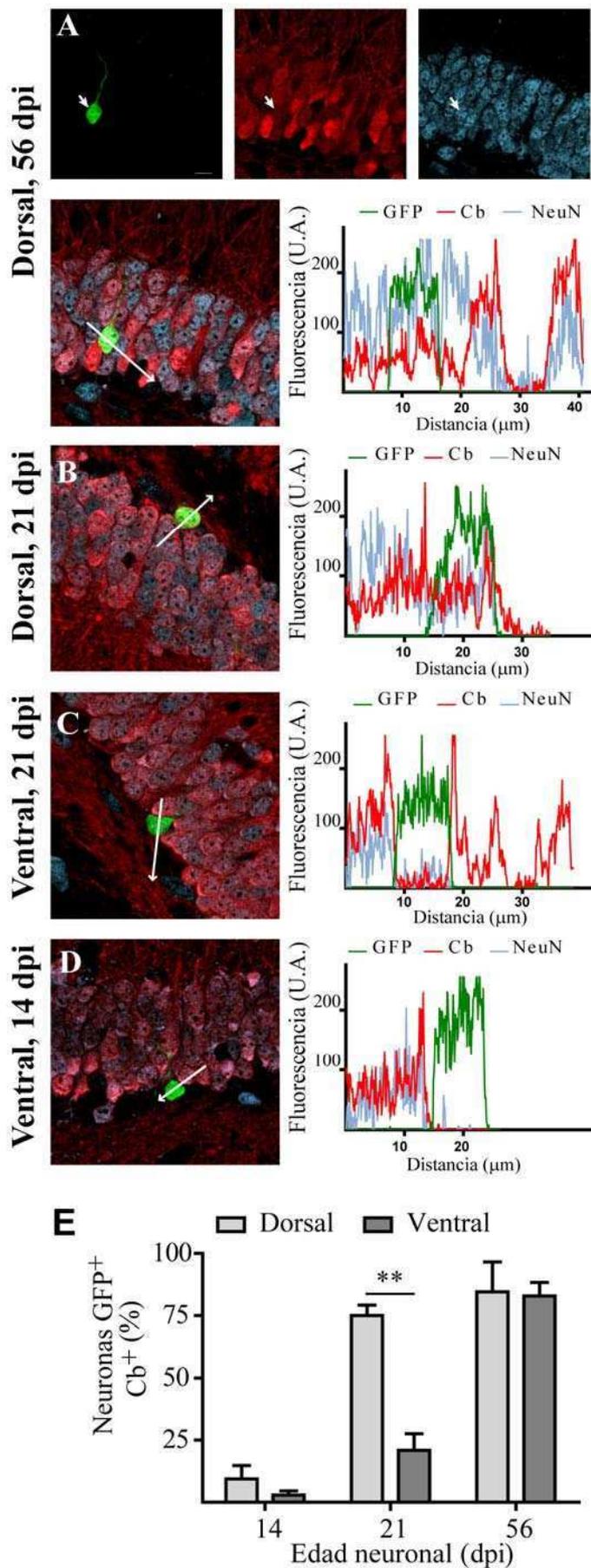


Figura 23: *Diferentes tasas de maduración reveladas por la expresión de Cb.* **A.** Ejemplo de triple colocalización, GFP (verde), Cb (rojo) y NeuN (azul) en una neurona de 56 dpi de la región dorsal. Los paneles muestran planos únicos para cada fluoróforo y su superposición en el panel inferior izquierdo. Escala: 10 μ m. El gráfico muestra el perfil de fluorescencia de los 3 fluoróforos sobre la flecha trazada en la imagen superpuesta. Notar que la expresión de Cb en neuronas maduras puede ser de mediana o alta intensidad. U.A. significa unidades arbitrarias. **B-D.** Ejemplos de expresión positiva (B) y negativa de Cb (C y D) de neuronas nuevas de edades y regiones indicadas a la izquierda de cada panel. Se muestran sólo las superposiciones de plano único y perfiles de fluorescencia. **E.** Cuantificación de la expresión de Cb a los 14, 21 y 56 dpi de cada región. Cada barra indica el promedio \pm SEM. (**) denota $p = 0.0015$, t -test. A 14 dpi se analizaron 4 ratones con $N = 122$ y 135 neuronas GFP⁺ para la región dorsal y ventral, respectivamente. A los 21 dpi se cuantificaron 3 ratones para la región dorsal ($N = 104$ neuronas GFP⁺) y 4 ratones para la ventral ($N = 120$). A los 56 dpi, 3 ratones para la región dorsal ($N = 77$) y 4 para la ventral ($N = 106$).

Conclusiones y discusión

Diferentes niveles de actividad neuronal a lo largo del eje longitudinal del hipocampo

Las diferencias regionales de actividad observadas en la GCL en condiciones sedentarias se correlacionaron con diferencias de actividad en la capa piramidal en registros *in vivo* (Jung et al., 1994). De acuerdo con estos resultados, recientemente Snyder y col. reportaron una mayor expresión de c-fos (un IEG dependiente de actividad similar a ARC) en la GCL del extremo dorsal comparado con las neuronas granulares del resto del giro dentado (Snyder et al., 2009a; Snyder et al., 2009b).

Nuestros resultados respecto a los bajos porcentajes de activación de la GCL también son consistentes con la literatura, al menos para el giro dentado dorsal (previamente más estudiado). Chawla y col., observaron un 0.5 % de neuronas granulares expresando el mRNA de ARC en ratas sedentarias de 9 meses de edad, sin diferencias entre la GCL superior e inferior de dicha región del giro dentado (Chawla et al., 2005). Esa escasa proporción de neuronas granulares activas también se observó mediante registros electrofisiológicos *in vivo* que mostraron tasas de actividad muy bajas (< 0.5 Hz) o directamente silentes en esta región, durante exploración espacial (Jung et al., 1994; Leutgeb et al., 2007).

Por lo tanto los resultados presentados apoyan el modelo ampliamente documentado de que el giro dentado utiliza un esquema de codificación de la información del tipo dispersa u ortogonal. El escaso número de neuronas granulares activas minimiza las probabilidades de que dos estímulos similares se superpongan y de ese modo ayudarían a discriminar sucesos de características similares. En el giro dentado ventral no se han realizado aún estudios *in vivo*, por lo que se desconoce su función a este respecto. Nuestros resultados y los de Snyder y col. (2009) sugieren que dicha región tendría un mejor esquema de codificación ortogonal que la región dorsal, debido al reducido número de neuronas activas. Sin embargo, estudios de *place cells* piramidales de la región ventral revelaron un menor número de neuronas activas pero de menor especificidad que en la región dorsal (Jung et al., 1994; Kjelstrup et al.,

2008). Por lo tanto el giro dentado ventral podría tener un sistema de procesamiento diferente de la información que el mismo en la región dorsal.

El giro dentado presenta diferentes tasas de maduración neuronal a lo largo de su eje longitudinal

Se concluyó que la velocidad de maduración neuronal es diferente en los extremos del mismo hipocampo en ratones adultos en condiciones basales o sedentarias, básicamente por tres observaciones:

Primera observación. La maduración neuronal comienza sincronizadamente en todas las neuronas nuevas del eje longitudinal del giro dentado marcadas en un momento determinado. Esto es así ya que tanto en la región dorsal como en la ventral la expresión de Cb comienza aproximadamente a los 14 dpi y las NPCs abandonan al mismo tiempo el ciclo celular. En general, la tasa de proliferación de las NPCs en diferentes momentos (2 y 4 días) así como la frecuente presencia de grupos de células en división son consistentes con trabajos recientes de otros laboratorios (Fig. 21A). Por ejemplo, Jagasia y col. observaron un 22 % de expresión de Ki67 en células de 3 dpi en el giro dentado de ratones adultos, así como frecuentes grupos de células GFP⁺/Ki67⁺ entre los 2 y 5 dpi (Jagasia et al., 2009).

Segunda observación. A la tercer semana de desarrollo las neuronas granulares de la región dorsal se observaron en un estadio más avanzado de madurez que las neuronas de la misma edad en la región ventral. La población de neuronas marcadas en la región dorsal presentó árboles dendríticos cubriendo la capa molecular, mayor densidad de espinas y un patrón de marcadores neuronales característicos de mayor madurez, mayor expresión de Cb y menor expresión de DCX. En cambio la mayoría de las neuronas de la región ventral mostró árboles dendríticos más pequeños, dendritas basales, menor densidad de espinas y el patrón de marcadores opuesto.

De acuerdo con estos resultados, los registros electrofisiológicos realizados por Lucas Mongiat en nuestro laboratorio revelaron una mayor madurez fisiológica en las neuronas nuevas de la región dorsal *versus* la ventral a los 21 dpi en los animales sedentarios (Fig. 24) (Piatti y col., manuscrito en preparación). Por ejemplo, la resistencia de membrana, medida inversamente proporcional al número de canales

iónicos abiertos en reposo, fue el triple en las neuronas nuevas de la región ventral respecto de la dorsal (~1896 y ~644 MΩ), indicando un nivel más avanzado de maduración. Consistente con ello, las neuronas nuevas de la región dorsal mostraron potenciales de acción maduros y en promedio dispararon hasta 5 espigas cuando se inyectó un escalón de 70 pA. En cambio las neuronas de 21 dpi de la región ventral dispararon a lo sumo dos potenciales de acción con el mismo estímulo (Fig. 24A,B). Por otra parte, Las neuronas nuevas dorsales presentaron una mayor frecuencia (pero igual amplitud) de corrientes excitatorias postsinápticas espontáneas (sEPSCs) (~10 Hz dorsal vs. ~0.24 Hz ventral) (Fig. 24C-E). La amplitud similar de los sEPSC indica propiedades similares en la densidad postsináptica. Sin embargo la mayor frecuencia de eventos sinápticos en la región dorsal indica una mayor conectividad aferente proveniente del circuito glutamatérgico, consistente con la mayor densidad de espinas descrita más arriba.

Por todo lo expuesto concluimos que las características morfológicas y fisiológicas de las neuronas nuevas coinciden en indicar que las neuronas de 21 dpi del giro dentado dorsal son más maduras y están más integradas al circuito local.

Tercera observación. Las neuronas granulares nuevas de todo el giro dentado alcanzan el mismo *plateau* de maduración morfológica a los 56 dpi. Los valores de densidad de espinas (Fig. 22) se condicen con lo reportado por Zhao et al. (2006) en neuronas nuevas de 56 y 126 dpi, y es también similar a lo descrito para las neuronas granulares preexistentes (Trommald and Hulleberg, 1997). Finalmente, todas las neuronas nuevas de 56 dpi expresan Cb (Fig. 23), también consistente con lo que sucede con las neuronas granulares maduras preexistentes (Sloviter, 1989).

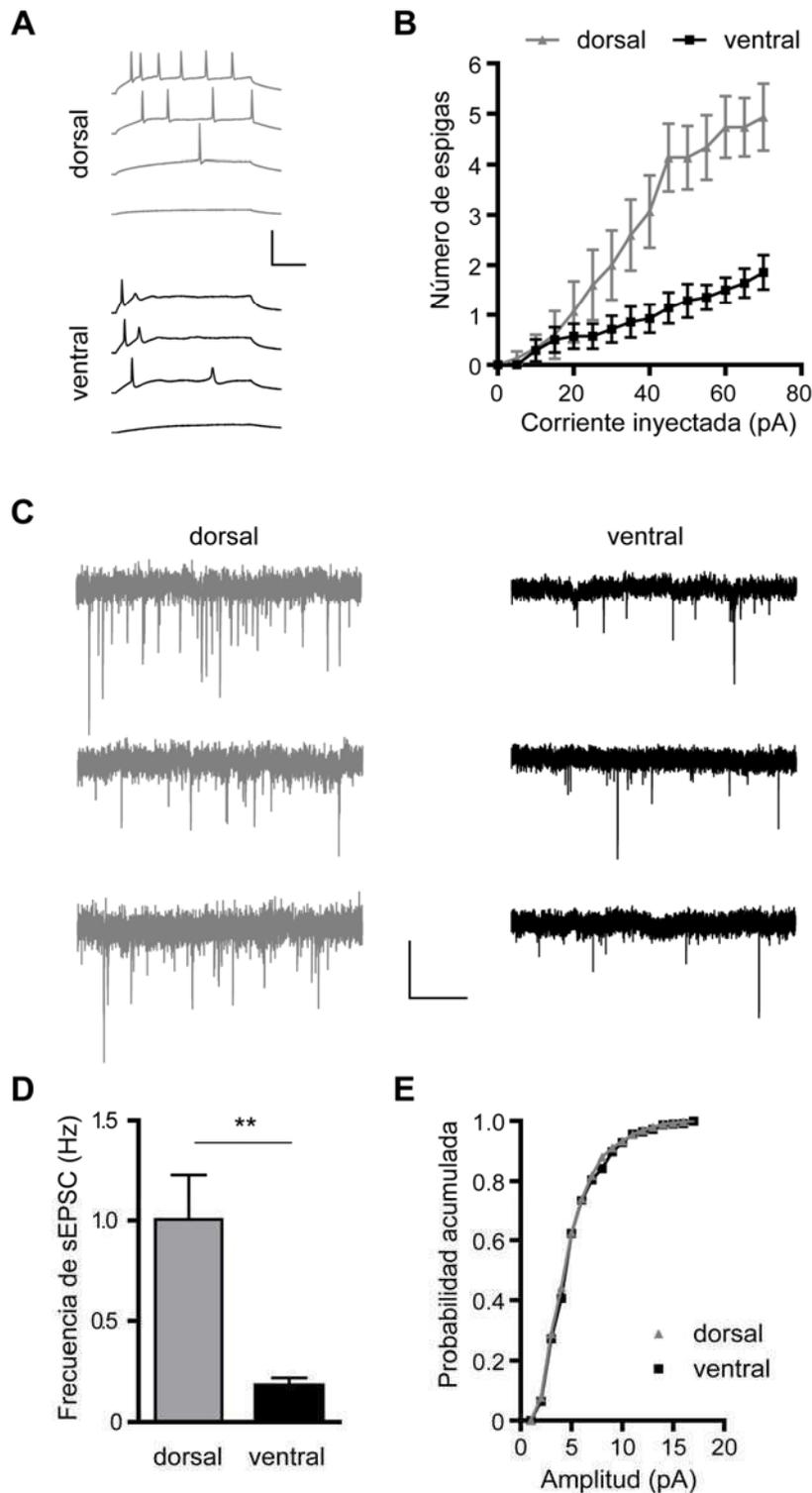


Figura 24. Diferentes grados de maduración funcional a 21 dpi en el giro dentado dorsal y ventral. **A.** Trazos representativos de registros en configuración *current clamp* mostrando potenciales de acción inducidos en respuesta a escalones de corriente despolarizante (10, 30, 50 y 70 pA, de abajo hacia arriba) en una neurona GFP⁺ de la región dorsal y otra de la ventral. Escalas: 50 ms y 100 mV. **B.** Cuantificación del número de potenciales de acción inducidos por pulsos crecientes de corriente. Los datos indican el promedio \pm SEM, con N = 14 (región dorsal) y 15 neuronas (región ventral). **C.** Ejemplos de actividad sináptica espontánea de diferentes neuronas en configuración *voltage-clamp* en presencia de 100 μ M de picrotoxin

(antagonista de los receptores GABA_A). Escala: 2 s y 5 pA. **D.** Frecuencia de sEPSCs para 14 neuronas dorsales y 12 ventrales. (**) indica $p = 0.032$, *t*-test no pareado. **E.** Histograma acumulativo de amplitudes de sEPSC registradas en (D). Todos los registros fueron realizados por de LA Mongiat usando la técnica de *patch clamp* en configuración *whole-cell* (Piatti et al., en preparación).

El ejercicio físico aumenta la actividad basal del giro dentado ventral

Además de recibir e integrar información sensorial de múltiple sitios corticales a través de la corteza entorrinal (Canto et al., 2008), el hipocampo integra señales de movimiento intrínsecas del animal (McNaughton et al., 2006). Por lo tanto, aumentar la tasa de movimiento al correr es aumentar un estímulo básico procesado en el hipocampo. De hecho los primeros registros realizados *in vivo* en el hipocampo demostraron que la actividad eléctrica oscilatoria lenta (ritmo theta) se acopla específicamente al movimiento voluntario del animal (Vanderwolf, 1969). Más aún, movimientos intensos como correr y saltar aumentan la amplitud de dicha actividad eléctrica (Whishaw and Vanderwolf, 1973) y la tasa de disparo de las neuronas piramidales del hipocampo dorsal y del más medial (Czurko et al., 1999; Maurer et al., 2005). Sin embargo, no hay bibliografía en este sentido respecto de lo que sucede en el giro dentado.

Nuestros resultados mostraron una diferencia dorsoventral en la actividad neuronal del giro dentado inducida por el ejercicio. Mientras que el giro dentado ventral reveló una mayor densidad de neuronas granulares expresando ARC (de acuerdo con lo esperado), en el giro dentado dorsal no se observaron cambios. Sin embargo, no podemos descartar que haya ocurrido un aumento en la tasa de disparo de las neuronas ARC⁺ del giro dentado dorsal. Hasta la fecha es conocido que la expresión de ARC revela el número de neuronas activas en un período de alrededor de 2 horas (Rodríguez et al., 2005), pero no la intensidad con la que dispararon dichas neuronas activas. De todas maneras nuestros resultados indican claramente que el ejercicio produjo un aumento pronunciado de la actividad neuronal en el giro dentado ventral.

Es interesante que el aumento en la actividad de las neuronas piramidales en animales corredores está acompañado de una mayor tasa de disparo de las interneuronas del hipocampo dorsal (Maurer et al., 2005). Esto indicaría un mayor control inhibitorio sobre el hipocampo dorsal, el cual podría ser responsable del incremento selectivo de la actividad del giro dentado ventral en condiciones de ejercicio voluntario. De acuerdo a esta hipótesis, se ha descrito un mayor número de interneuronas GABAérgicas somáticas por cada neurona granular en el giro dentado dorsal (Seress and Pokorny, 1981).

La actividad local acelera la maduración neuronal

La velocidad de maduración mostró una buena correlación con el nivel de actividad del circuito local donde se desarrollan las neuronas granulares nuevas del giro dentado adulto. En el giro dentado ventral de animales sedentarios se observó una menor actividad basal en la GCL y una maduración más lenta que en el giro dentado dorsal de los mismos animales. Más aún, en condiciones de mayor movimiento voluntario la actividad neuronal de la GCL del giro dentado ventral aumentó y la maduración neuronal se aceleró alcanzando el mismo grado de desarrollo que en la región dorsal, en la que no se observaron cambios. Estos resultados sugieren que las diferentes tasas de maduración observadas en el eje dorsoventral de animales sedentarios se deben a los diferentes niveles de actividad del circuito local y no a diferentes programas celulares intrínsecos. Estos hallazgos avalan también la hipótesis del efecto promotor de la actividad neuronal en la tasa de maduración de las neuronas granulares del giro dentado.

El efecto del ejercicio físico en la maduración neuronal fue previamente evaluado considerando el giro dentado adulto en su totalidad (Zhao et al., 2006; Wu et al., 2008). En el trabajo de Zhao y col., utilizaron la técnica retroviral para marcar las neuronas nuevas y observaron un aumento selectivo de la densidad de espinas con morfología madura (*mushroom*) a los 56 dpi en ratones corredores. Sin embargo, no reportaron diferencias en la densidad total de espinas entre ratones corredores y sedentarios en ningún tiempo analizado. El valor promedio reportado fue de ~0.4 espinas/ μm en neuronas GFP⁺ de 21 dpi, mientras que lo reportado en esta tesis es de ~1.1 espinas/ μm para los animales sedentarios y ~1.4 espinas/ μm para los animales que corrieron con diferencias significativas ($p < 0.001$, *t*-test no pareado). La subestimación del número de espinas reportada por Zhao y col. podría deberse a la adquisición de fragmentos dendríticos de diferentes partes de la capa molecular, pero más aún a la falta de amplificación de la señal de fluorescencia de GFP, ya que las dendritas inmaduras presentan un diámetro menor y, por lo tanto, una fluorescencia más débil en el microscopio confocal. De hecho, Zhao y col. obtuvieron un valor promedio de ~2,6 espinas/ μm en fragmentos GFP⁺ de mayor espesor de las neuronas maduras de 56 dpi, el cual es el mismo que el reportado en nuestro trabajo. En el trabajo de Wu y col., evaluaron la maduración de neuronas DCX⁺ en ratones de mediana y avanzada edad

sometidos a una cinta para correr (treadmiller) durante 5 semanas de manera controlada. El ejercicio aumento el porcentaje de neuronas DCX⁺ con dendritas extendiéndose a través de la GCL y disminuyó la proporción de neuronas DCX⁺ con procesos paralelos a la capa, lo cual es compatible con un claro avance en la secuencia de maduración neuronal (Espósito et al., 2005; Ge et al., 2006). Más aún, Wu y col. observaron que el ejercicio aumenta la concentración de la neurotrofina *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) y su receptor TrkB en el suero de los ratones de las dos edades analizadas, sugiriendo que el efecto promotor del ejercicio en la maduración neuronal sería mediado por la vía BDNF-TrkB.

BDNF es conocido por promover la proliferación, diferenciación y supervivencia neuronal (Ahmed et al., 1995; Cotman and Berchtold, 2002; Li et al., 2008). En ratones transgénicos carentes de BDNF o TrkB se demostró que ambas proteínas son necesarias para el desarrollo y conectividad sináptica normal de las neuronas granulares del giro dentado adulto, ya sean nuevas (Chan et al., 2008) o preexistentes (Danzer et al., 2008). Más aún la depleción específica inducible de TrkB en las NPCs del giro dentado adulto disminuyó la supervivencia, el crecimiento dendrítico y la densidad de espinas de las neuronas nuevas (Bergami et al., 2008). Por lo tanto la mayor madurez neuronal observada en los animales corredores en el giro dentado ventral podría explicarse alternativamente por un aumento de BDNF independientemente de la actividad neuronal. Sin embargo, esto es poco probable ya que se ha demostrado que el ejercicio aumenta la expresión del ARN mensajero y la proteína de BDNF en todo el hipocampo (Cotman and Berchtold, 2002); más aún aumenta los niveles sistémicos de BDNF (Wu et al., 2008; Winter et al., 2007). De ser así, nuestros experimentos deberían haber revelado que el ejercicio voluntario acelera la maduración de las neuronas granulares nuevas de la región dorsal de la misma manera que las de la región ventral. El hecho de que no hayamos encontrado cambios en la tasa de maduración del hipocampo dorsal sugiere fuertemente que un aumento de BDNF independiente de actividad neuronal no sería el mecanismo que explicaría nuestros hallazgos.

La síntesis y secreción de BDNF es dependiente y regulada por actividad neuronal (Schinder and Poo, 2000; Chen et al., 2003a; Chen et al., 2003b; Kuczewski et al., 2008; Matsuda et al., 2009). Más aún, recientemente se ha propuesto una conexión entre la actividad neuronal y la expresión de factores tróficos en la modulación de la neurogénesis del hipocampo adulto (Ma et al., 2009a). Ma y col., describieron un

nuevo IEG, *Gadd45b*, que al igual que *ARC* y otros IEGs se induce rápido y transitoriamente por actividad neuronal. Mientras que en condiciones basales no encontraron efectos en la proliferación y el desarrollo dendrítico de las neuronas nuevas del giro dentado adulto en los ratones transgénicos carentes de *Gadd45b*, sí se observó una falta del aumento inducido por actividad convulsiva. Del mismo modo se observó una falta de expresión de BDNF inducida por el mismo tipo de actividad, lo cual sugirió que las mismas neuronas activas del nicho neurogénico controlarían la neurogénesis de manera parácrina (Ma et al., 2009a).

Entonces, la actividad neuronal estaría modulando indirectamente el desarrollo de las neuronas nuevas del giro dentado a través de la liberación de neurotrofinas. Sin embargo, esto tampoco parece muy probable debido a que las neuronas granulares nuevas con reducida excitabilidad mediada por GABA por expresión del ARN de interferencia para *NKCC1* tiene defectos en la maduración (Ge et al., 2006) (Fig. 12E). Por lo tanto es posible que el aumento de la tasa de maduración neuronal en el giro dentado sea mediado por la acción conjunta de la actividad eléctrica y BDNF, tal como fue propuesto para el desarrollo de la corteza (McAllister et al., 1996). McAllister y col., demostraron que la inhibición de la actividad eléctrica espontánea, la transmisión sináptica o los canales de Ca^{++} tipo L, bloquean el efecto de BDNF en el desarrollo de la complejidad dendrítica de las neuronas corticales.

Efectos sinérgicos de BDNF y la actividad neuronal fueron propuestos para la modulación de la conectividad y la plasticidad sináptica (Schinder and Poo, 2000). Incluso, BDNF modula la liberación de neurotransmisor en la neurona presináptica y la respuesta de la neurona postsináptica dependiendo de la actividad simultánea de ambas neuronas, de las concentraciones de calcio y de la actividad de los receptores de glutamato del tipo NMDA (Pozzo-Miller, 2006; Crozier et al., 2008; Madara and Levine, 2008). Más interesante aún es la aparente retroalimentación positiva entre la expresión de *ARC* y BDNF en la potenciación a largo plazo (LTP) en las sinapsis entre neuronas de la corteza entorrinal y las neuronas granulares del giro dentado. Mientras que la síntesis de *ARC* es requerida para la inducción y mantenimiento del LTP inducido por BDNF (Messaoudi et al., 2007), esta potenciación induce un aumento en la expresión selectiva de *ARC* en las mismas neuronas (Ying et al., 2002).

Por lo tanto la actividad neuronal no solo le conferiría especificidad sináptica a la acción de BDNF (Schinder and Poo, 2000) sino que también podría conferirle especificidad neuronal en un circuito determinado. El mecanismo podría ser una actividad despolarizante sensada por las neuronas nuevas que se potencia con la acción específica de las neurotrofinas. Esto se traduciría en un aumento de los niveles de calcio intracelular y la activación del programa de transcripción mediada por p-CREB, los cuales son conocidos por controlar el desarrollo neonatal y adulto (Konur and Ghosh, 2005; Jagasia et al., 2009).

La incorporación de neuronas nuevas a un circuito funcional en el cerebro adulto podría representar un mecanismo de plasticidad estructural que contribuye o modula funciones específicas del sistema. Si bien las neuronas nuevas incorporadas podrían ser útiles para la codificación de nuevas memorias, también podrían producir inestabilidad a las trazas de memoria preexistentes o en procesamiento (ver discusión general). Resulta entonces probable que la actividad funcional de la misma red de circuitos locales pueda modular la neurogénesis adulta para mejorar la capacidad adaptativa del individuo. De hecho varios trabajos indican que la actividad neuronal modula diferentes etapas de la neurogénesis, como proliferación y supervivencia de los dos únicos sitios de integración neuronal del cerebro adulto de mamíferos, el bulbo olfatorio y el giro dentado (Ma et al., 2009b). Nuestros resultados demostraron que el sistema funcional no solo puede modular el número de neuronas nuevas, sino también el tiempo en que esas unidades pueden integrarse y la duración con que ese proceso alcanza sus características finales (semejantes a las de las neuronas preexistentes), confiriéndole un nivel único de plasticidad a un circuito funcional a través del tiempo de maduración neuronal.

DISCUSIÓN GENERAL

En esta tesis se describió por primera vez la secuencia de desarrollo neuronal en el hipocampo adulto y la tasa diferencial con la que ocurre a lo largo del eje longitudinal del giro dentado. Estudios previos mostraron una mayor tasa de neurogénesis en la región dorsal del hipocampo adulto combinando BrdU y marcadores neuronales que se expresan en estadios inmaduros (Snyder et al., 2009a; Ferland et al., 2002). Sin embargo un estudio detallado de la maduración neuronal requiere de un análisis morfológico que se hizo posible en este trabajo por haberse utilizado la técnica de marcado retroviral.

Consistente con resultados previos (van Praag et al., 1999b) se observó mayor número de neuronas nuevas inducidas por el ejercicio físico independiente de la región analizada. Por otro lado, se aportó una función adicional al ejercicio en la neurogénesis adulta del hipocampo, que consiste en la aceleración de la maduración neuronal, hasta ahora no descrito. Este fenómeno se observó específicamente en el giro dentado ventral, donde además el ejercicio aumentó la actividad de la GCL, consistente con una maduración neuronal dependiente de la actividad del circuito local.

Rol funcional de la neurogénesis en el hipocampo adulto

La integración funcional de las neuronas nuevas en el circuito aferente del giro dentado se demostró por primera vez en el año 2002 (van Praag et al., 2002). Estudios posteriores fortalecieron este hallazgo mediante la expresión de proteínas derivadas de IEGs en neuronas BrdU⁺ (a partir de los 25 días de edad neuronal) como consecuencia del aprendizaje espacial o la inducción de convulsiones (Jessberger and Kempermann, 2003). Sin embargo, sólo recientemente se demostró fehacientemente la completa integración de las neuronas nuevas al circuito hipocampal, ya que se evidenció la conectividad eferente de las neuronas granulares nuevas nacidas en el adulto a nivel morfológico y fisiológico (Toni et al., 2008). Sin embargo, el significado biológico de la neurogénesis en el cerebro de mamíferos adultos aún no ha sido esclarecido.

Los trabajos pioneros de Shors y col., utilizaron una droga que bloquea la división celular y de ese modo lograron una reducción sustancial de los niveles de neurogénesis del hipocampo adulto. La falta de neuronas nuevas afectó la asociación temporal de dos estímulos separados en el tiempo, pero no tuvo ningún efecto cuando los mismos dos estímulos se encontraron superpuestos temporalmente (Shors et al., 2001). Estos hallazgos fueron consistentes con la dependencia del hipocampo en dichos tests; el primer caso fue un test dependiente de hipocampo, *trace memory conditioning* y el segundo no, *delay memory conditioning*. Sin embargo, la misma reducción de neurogénesis no afectó otros comportamientos dependientes del hipocampo, como el aprendizaje espacial en el test de MWM, la exploración ambiental, el miedo contextual condicionado y aquellos relacionados con la ansiedad como el test elevado de cuatro brazos (Shors et al., 2001; Shors et al., 2002).

Es curioso que trabajos más recientes hayan demostrado efectos específicos de las neuronas nuevas en algunos de estos test dependientes del hipocampo evaluados por el grupo de Shors. Por ejemplo, se observó un aumento de la ansiedad en el test elevado de cuatro brazos en animales con neurogenesis reducida por falta de TrkB específicamente en las neuronas nuevas del giro dentado adulto (Bergami et al., 2008). Sin embargo la aparente controversia parece resolverse cuando se analiza la edad de las neuronas nuevas que fue afectada. Mientras que en el trabajo de Shors y col. se analizó la función de la neuronas nuevas de 17 a 20 días de edad máxima, Bergami y col. lo hicieron con neuronas de 33 a 47 días. Por lo tanto, las neuronas nuevas del giro dentado podrían tener funciones específicas durante un período de su maduración independientes y/o diferentes de las funciones que podrían tener una vez maduras.

Trabajos más recientes reportaron efectos en el desempeño del test de navegación espacial del MWM dependientes de la edad de las neuronas nuevas afectadas mediante irradiación γ para bloquear la neurogénesis (Snyder et al., 2005). Al igual que el trabajo de Shors y col., (2002) no encontraron efectos en la adquisición de la memoria (desempeño durante el entrenamiento) pero sí observaron una reducción del mantenimiento de la memoria a largo término. Dicha reducción ocurrió solamente cuando la población neuronal afectada fue la de 48-62 días de edad y el entrenamiento había sido realizado en el período en que estas neuronas tenían 28 a 34 días de edad (Snyder et al., 2005). Aunque Snyder y col., probaron diferentes tiempos de irradiación y sólo en algunos casos encontraron efectos, no analizaron si la dependencia de la edad

neuronal es crítica durante el entrenamiento o el mantenimiento de la memoria. Posteriormente se bloqueó la neurogénesis a través de irradiación X focalizada y no se encontró ningún efecto en el aprendizaje o el mantenimiento de la memoria en el test de MWM (Saxe et al., 2006). Sin embargo, el entrenamiento en el MWM fue realizado en un momento en que las neuronas nuevas afectadas tenían 3 meses. Por lo tanto, el rol de la neurogénesis en el MWM dependería de la edad de las neuronas nuevas al momento del entrenamiento.

Entonces, resumiendo la bibliografía y en función de la edad neuronal, se puede proponer que las neuronas granulares nuevas estarían involucradas en las siguientes funciones del hipocampo adulto:

Las neuronas inmaduras serían críticas para la asociación de estímulos;

Las neuronas de ~4 a 6 semanas, en el mejoramiento de la calidad de los aprendizajes de experiencias futuras y en la regulación de la ansiedad y depresión;

Las neuronas maduras serían relevantes durante la discriminación y reconocimiento de estímulos.

Asociación de estímulos diferentes

En un estudio reciente utilizando ratones transgénicos para reducir la neurogénesis adulta se demostró que el aprendizaje de relaciones espaciales complejas depende de las neuronas granulares nuevas (Dupret et al., 2008). Los aprendizajes espaciales más simples como el reconocimiento del ambiente o el aprendizaje en el test de MWM clásico no fueron afectados por el bloqueo de la neurogénesis adulta. Sin embargo, la neurogénesis es crítica para resolver una variante más compleja del MWM que requiere una asociación de claves externas del paradigma. Dupret y col. utilizaron una estrategia para abolir la neurogénesis de manera específica que consiste en la generación de un ratón transgénico que sobreexpresa una proteína proapoptótica inducible en las NPCs. La inducción de dicha proteína se realizó desde 6 semanas previas a los experimentos y durante los mismos, por lo que los efectos en el MWM complejo podrían deberse a la reducción de neuronas nuevas de distinto grado de madurez. Sin embargo, el grupo de neuronas más inmaduro debería ser el más afectado por la mayor reducción en la población de NPCs con el tiempo del tratamiento.

Más aún, teniendo en cuenta los resultados de Shors y col. que observaron una menor asociación temporal de dos estímulos diferentes en el “*trace memory conditioning*” cuando afectaron las neuronas granulares inmaduras de ~20 días de edad sin efecto reduciendo las poblaciones de neuronas nuevas de ~12 o ~39 días (Shors et al., 2001; Shors et al., 2002), se podría sugerir que las neuronas granulares inmaduras son las que participan en las asociaciones de estímulos diferentes.

Mejoramiento de la calidad de los aprendizajes de experiencias futuras

La participación de las neuronas nuevas en el mantenimiento de la memoria a largo término (2 a 4 semanas) del aprendizaje del test de MWM es controversial (Snyder et al., 2005; Saxe et al., 2006). Sin embargo, se sugirió que las diferentes edades de las poblaciones neuronales afectadas al momento del entrenamiento podrían explicar dicha controversia. En acuerdo con esta hipótesis, se demostró una activación preferencial de las neuronas nuevas durante el testeó de memoria espacial de largo plazo (~ 4 semanas) del MWM, dependiendo de la edad que tuvieron esas neuronas al momento del entrenamiento en dicho test (Kee et al., 2007). Kee y col. observaron una mayor expresión de los IEGs, ARC y c-fos en las neuronas nuevas de 10 semanas de edad, que el resto de las neuronas granulares cuando el entrenamiento en el MWM comenzó a realizarse entre la 4^{ta} y 6^{ta} semana del desarrollo de esas neuronas y no en otro tiempos. Más aún, se observó que las neuronas nuevas maduras se activan específicamente durante la reexposición de la misma experiencia previa que transcurrió durante un período de su proceso de maduración (Tashiro et al., 2007). Por lo tanto, mientras las neuronas nuevas maduran podrían adquirir una especialización que favorece el aprendizaje de experiencias futuras. En particular, aquellas experiencias que activan los mismos circuitos que fueron activados durante su maduración, aunque en dicho momento esas neuronas no hayan sido fundamentales en el desempeño de la tarea.

Regulación de la ansiedad y depresión

Se reportó que las neuronas de ~30 días estuvieron involucradas en el comportamiento relacionado con la ansiedad del test elevado de cuatro brazos (Bergami et al., 2008). Consistente con este hallazgo, la eliminación de neuronas de 28 días por irradiación de rayos X bloqueó el efecto antidepressivo de la fluoxetina crónica, analizado utilizando el

paradigma de *novelty suppressed feeding* (Santarelli et al., 2003). Más aún, la administración crónica (28 días) de fluoxetina (inhibidor de la recaptación de la serotonina) aumenta la proliferación y maduración de las neuronas granulares del giro dentado adulto (Wang et al., 2008). Aunque los paradigmas estudiados no discriminan entre ansiedad y depresión (ya que las drogas ansiolíticas mostraron efectos similares a la fluoxetina), los hallazgos reportados impulsaron la idea de que la neurogénesis adulta es necesaria para los efectos antidepresivos de la fluoxetina. Esto explicaría que aunque el aumento de serotonina es inmediato, los efectos clínicos demoran entre 3 y 4 semanas (Wong and Licinio, 2001).

Discriminación y reconocimiento de estímulos similares

Cuando se bloquea la neurogénesis a través de dos estrategias diferentes como la irradiación X focalizada (3 meses previos al experimento) o ablación genética inducida (durante 6 semanas), se encontró el mismo efecto en el *fear contextual conditioning*. Los animales no reconocieron el contexto donde habían recibido el estímulo condicionado (shock) (Saxe et al., 2006). La falta de reducción del movimiento (*freezing*) observada en el lugar condicionado por el shock por estos animales, también podría haberse debido a la falta de miedo o a un menor nivel de ansiedad. Sin embargo Saxe y col., descartaron dichas posibilidades porque no encontraron efectos de la falta de neurogénesis en otros tests más relacionados con el estado de miedo y el de ansiedad.

Por otro lado, Dupret y col. utilizaron un modelo similar de ablación inducida de la neurogénesis adulta y no observaron efectos en el *fear contextual conditioning* (Dupret et al., 2008). La diferencia de efectos con el trabajo de Saxe y col. previamente mencionado podría radicar en las edades de los ratones con la que trabajaron, de 8 semanas en el caso de Dupret y col. y 12 en Saxe y col. Durante el envejecimiento la tasa de neurogenesis se reduce drásticamente (Wu et al., 2008; Morgenstern et al., 2008), por lo que una ablación de neuronas nuevas a mayor edad podría producir efectos más notorios en las pruebas comportamentales.

A pesar de la aparente controversia, los resultados de Saxe y col. están de acuerdo con los obtenidos por McHugh y col., que generaron un animal transgénico, carente de la subunidad NR1 del receptor NMDA específicamente en todas las

neuronas granulares. Estos animales carecen de LTP pero pueden reconocer el estímulo condicionado y responder con *freezing*, pero no pueden discriminar el contexto condicionado entre dos contextos similares (McHugh et al., 2007).

Por último se observó una paradójica influencia de la neurogénesis en la memoria de trabajo o reciente del *radial 8-arm maze* (Saxe et al., 2007). Dicho test consiste de un dispositivo con una plataforma central y 8 brazos, donde al final de algunos de los brazos se encuentra alimento. Saxe y col., realizaron una variante del test donde los animales se someten a dos brazos abiertos (uno con comida en la fase de entrenamiento y el otro en la fase de elección). En cada prueba, la elección del brazo correcto (no visitado en el entrenamiento) significa un correcto mantenimiento de la memoria reciente o de trabajo. Cada animal se somete a 6 pruebas. Luego de bloquear la neurogénesis (neuronas de hasta 3 meses de edad) los animales mostraron una mejoría en el mantenimiento de esa traza de memoria en las dos últimas pruebas (la 5^{ta} y 6^{ta}). Debido a que el test tiene solo 8 brazos, los animales deben repetir brazos ya visitados en dichas pruebas, lo que determinó una mayor interferencia en la elección del brazo correcto. Entonces, estos resultados podrían interpretarse como que más neuronas granulares reconociendo estímulos similares interfirieron la estabilidad de la memoria reciente y redujeron el desempeño de ésta tarea en las pruebas de repetición.

Las neuronas granulares del giro dentado han sido descritas como neuronas “detonadoras” de los circuitos asociativos de sus neuronas postsinápticas, imponiendo patrones nuevos de codificación (Leutgeb et al., 2007; Treves et al., 2008b). Dado que las neuronas granulares nuevas una vez que han alcanzado la completa maduración son indistinguibles de las preexistentes (Espósito et al., 2005; Laplagne et al., 2006; Laplagne et al., 2007), sería muy probable que tengan el mismo rol en el procesamiento del hipocampo adulto. Incluso recientemente, se demostró que los animales con reducido número de neuronas granulares maduras muestran una reducida discriminación de estímulos espaciales parecidos (Clelland et al., 2009).

Propiedades únicas de las neuronas nuevas inmaduras del hipocampo adulto

Durante su desarrollo, las neuronas granulares nuevas del giro dentado tienen propiedades particulares que podrían aportar al circuito hipocampal características únicas que permitan procesamientos de información en tareas específicas. En favor de esta hipótesis, estudios de plasticidad en la GCL del giro dentado adulto revelaron propiedades heterogéneas entre las zonas externa e interna de la capa: mientras que las neuronas de la capa externa solo presentan LTP cuando la inhibición GABAérgica se encuentra bloqueada, las neuronas de la capa interna muestran inducción de LTP aún en presencia de inhibición (Wang et al., 2000). Estos autores postularon que las células con mayor plasticidad (capa interna) correspondieron a neuronas nacidas en el adulto debido a que en sus estudios de las neuronas registradas, observaron que poseían expresión de un marcador de neurona inmadura. Posteriormente se demostró la existencia de un tipo particular de LTP que desaparece cuando la neurogénesis es bloqueada 3 semanas antes de la inducción de plasticidad mediante un protocolo de irradiación con rayos γ o 3 meses antes por irradiación con rayos X (Snyder et al., 2001; Saxe et al., 2006). Luego se confirmó que este LTP particular es característico de las neuronas inmaduras, las cuales poseen un umbral más bajo para la inducción de plasticidad en ausencia de inhibición GABAérgica (Schmidt-Hieber et al., 2004). Por último se describió un periodo de maduración de las neuronas granulares nuevas (desde la 4^{ta} a la 6^{ta} semana) en el que la expresión de LTP se encuentra aumentada (Ge et al., 2007). Por otra parte, los trabajos de nuestro laboratorio han demostrado recientemente que las neuronas nuevas inmaduras son mucho más excitables que las maduras (Mongiati et al., 2009). Por lo tanto, las neuronas en desarrollo integradas al circuito hipocampal poseen mecanismos de plasticidad únicos durante un período de tiempo de su maduración.

La existencia de una población de neuronas jóvenes con mayor plasticidad en el hipocampo adulto abrió la pregunta de si esta propiedad es relevante para su propia maduración o es importante para la función del hipocampo (Schinder and Gage, 2004). La sobrevivencia e integración neuronal dependen de la experiencia transcurrida y de la actividad sensada por su receptor NMDA en un período de su maduración (Tashiro et al., 2006; Tashiro et al., 2007). Por otra parte, las neuronas nuevas más maduras se activan preferentemente con las experiencias relacionadas a las que ocurrieron durante

su maduración (Tashiro et al., 2007; Kee et al., 2007). Entonces, los circuitos activos durante la maduración neuronal podrían seleccionar la conectividad de las neuronas nuevas inmaduras y a la vez ser modulados por la integración específica de nuevas unidades funcionales.

Relevancia fisiológica de tasas de maduración diferentes en el giro dentado adulto

La determinación del estadio específico de mayor plasticidad en la secuencia neuronal, aún es controversial. Sin embargo, cada vez más trabajos sustentan la hipótesis de una ventana temporal con propiedades únicas durante la maduración de las neuronas nuevas, por la cual serían capaces de proporcionar funciones específicas al hipocampo. Más aún, si dicha ventana de plasticidad única de las neuronas nuevas depende de un período de su maduración, ¿cuál sería la ventaja funcional de tener ventanas de distinta escala y duración en el mismo hipocampo?

Las propiedades de plasticidad únicas de las neuronas nuevas durante un período acotado de su maduración y el rol aceptado del hipocampo en memoria episódica (Scoville and Milner, 2000) sentaron las bases sobre las que se basa la reciente hipótesis del rol potencial de la neurogénesis adulta en la codificación temporal de memorias nuevas (Aimone et al., 2006). Esta hipótesis propone que dada la alta excitabilidad de las neuronas nuevas inmaduras, éstas serían capaces de responder más inespecíficamente a diferentes patrones de información. Por ende, serían más “asociativas” durante un período específico de su maduración, lo que estaría de acuerdo con el rol de las neuronas nuevas inmaduras en el *trace memory conditioning* y en la versión asociativa del MWM complejo (Shors et al., 2001; Dupret et al., 2008).

Por lo tanto, la misma neurona joven podría participar en la codificación de eventos diferentes durante un periodo definido de su desarrollo (Fig. 25A; observar giro dentado dorsal). Como consecuencia de ello se generaría una superposición de los patrones de activación de eventos no relacionados pero temporalmente cercanos, incrementando la asociación temporal de memorias nuevas en el procesamiento del hipocampo (Fig. 25A, cuadro izq., CA₃ dorsal).

Aimone y col. desarrollaron un modelo computacional de procesamiento de información del giro dentado incorporando la maduración neuronal como variable y

observaron que (1) las neuronas granulares inmaduras proveen asociaciones entre los estímulos diferentes de la corteza y (2) las neuronas granulares maduras efectivamente separan/disocian los patrones de información parecidos enviados por la corteza entorrinal, de acuerdo con la literatura (Leutgeb et al., 2007). Más aún, en el modelo de Aimone y col., la habilidad de asociación temporal de dos estímulos es dependiente del tiempo transcurrido entre ellos. La incorporación de neuronas nuevas en el sistema produciría un efecto dual: (A) asociación de las representaciones del giro dentado para estímulos (eventos) cercanos en el tiempo que encontraron la misma población de neuronas nuevas inmaduras y (B) separación de las representaciones del giro dentado para estímulos lejanos en el tiempo, que encontraron diferentes poblaciones de neuronas nuevas (Aimone et al., 2009).

Por lo tanto, el tiempo que una neurona nueva pasa en el estadio de alta excitabilidad podría tener un impacto fuerte en el procesamiento cognitivo del hipocampo. Más aún, el hecho de que dicho intervalo de alta excitabilidad sea variable podría tener un rol potencial de resolución temporal en la codificación de memorias nuevas. Así, una maduración neuronal más lenta como la que se observó en el giro dentado ventral (presente tesis) podría representar una escala temporal mayor, ofreciendo un marco temporal más grande dentro del cual asociar diferentes sucesos (Fig. 25A).

Las diferencias regionales a lo largo del eje longitudinal del hipocampo van desde diferentes patrones de expresión de genes hasta diferentes comportamientos asociados (Thompson et al., 2008; Kubik et al., 2007; Bannerman et al., 2004). Por ejemplo el hipocampo dorsal está involucrado en procesamiento de memoria espacial y el ventral en comportamientos defensivos (Moser et al., 1995b; Kjelstrup et al., 2002). Sin embargo, la región ventral puede ser tan eficiente como la dorsal en el procesamiento de memoria espacial cuando el entrenamiento ocurre durante un periodo más prolongado (de Hoz et al., 2003). Esto motivó la idea de que escalas de procesamiento diferentes pueden coexistir en el mismo hipocampo. De acuerdo con ello, se demostró que el tamaño de codificación espacial de las *place cells* del hipocampo varía gradualmente desde menos de 1 metro en el polo dorsal a 10 metros en el polo ventral (Kjelstrup et al., 2008). Por lo tanto, nuestros hallazgos sugieren que el hipocampo podría contar con las dos dimensiones espacio y tiempo en diferentes escalas a través de su eje longitudinal.

Por otro lado, prácticamente todas las conexiones intrínsecas del hipocampo atraviesan diversos planos transversales del eje longitudinal. Incluso, los axones de las neuronas granulares hacia CA₃ que se encuentran organizados en un mismo plano transversal, cuando se aproximan a la región de CA₁ cambian de dirección y se proyectan hasta 2 mm hacia la región ventral (Amaral and Witter, 1989; Sik et al., 1997). Dicha anatomía favorece mecanismos de procesamiento que se integran en todo el eje longitudinal. Incluso, se propuso que el hipocampo utiliza una estructura unitaria de codificación donde el *output* (su eferencia) instantáneo es un segmento de información a lo largo de su eje longitudinal, más que un dato puntual (de Hoz et al., 2003; Lubenov and Siapas, 2009).

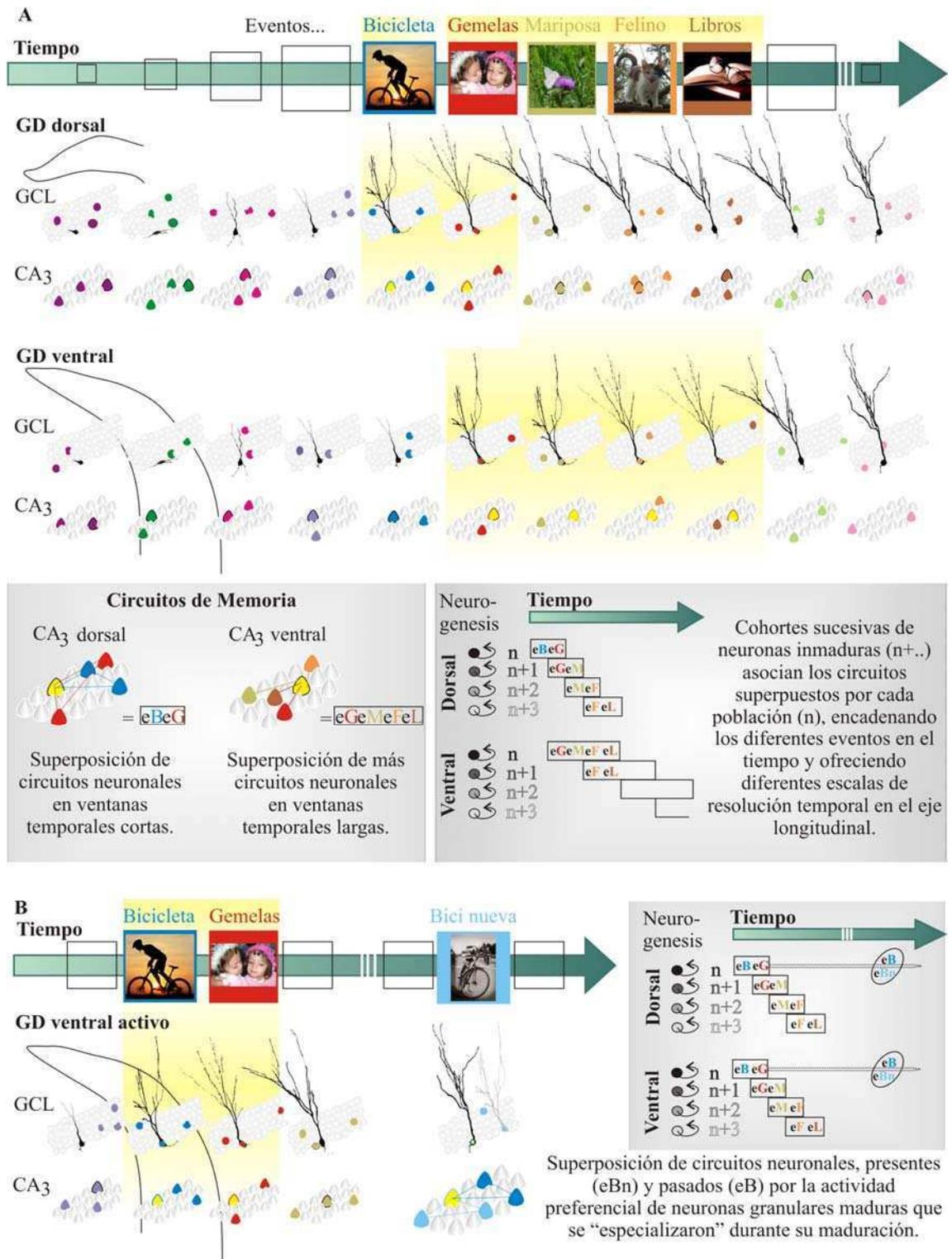


Figura 25: Rol potencial de las diferentes tasas de maduración neuronal en el giro dentado adulto. **A.** Rol hipotético de las neuronas inmaduras dorsales y ventrales en codificar diferentes escalas de tiempo en condiciones basales. Esquema representando la asociación temporal de eventos contiguos en distintas ventanas de tiempo por las neuronas nuevas durante su período de inmadurez en el eje dorso-ventral. Las neuronas son ejemplos de morfología representativas de la secuencia neuronal ajustada a los tiempos dorso-ventrales analizados en la presente tesis y ejemplifican la misma cohorte de neurogénesis (n). El código de colores representa la activación neuronal para cada evento (representados como cuadros sobre

la línea de tiempo superior) en la GCL y CA₃ dorsal y ventral. Las neuronas piramidales amarillas se activan en eventos contiguos ya que representan la eferencia de las neuronas granulares en desarrollo (más excitables). Las neuronas con soma coloreado y contorneado representan neuronas en desarrollo de diferentes cohortes ($n \pm 2$) en la GCL y su respectiva eferencia en CA₃. Para simplificar no se representaron la activación de neuronas nuevas de cohorte ($n \pm 1$), una neurona granular excita una neurona piramidal. Además, teniendo en cuenta la menor activación de la GCL ventral en condiciones basales los circuitos neuronales ejemplifica grupos de 2 o más neuronas piramidales activas que representan cada evento. **Cuadro inferior izquierdo:** La resultante de períodos de maduración (y con ello períodos de excitabilidad diferentes) determinaría la asociación de eventos en escalas de tiempo diferentes. Con los circuitos armados en la región dorsal, uno podría recordar cuando salió en “bicicleta” recordando cuando fue el cumpleaños de las “gemelas”. Con los circuitos armados en la región ventral uno podría saber en qué marco temporal sucedieron más eventos recordando solo uno, como el gato en el árbol, aunque con menor precisión. **Cuadro inferior derecho:** El constante aporte de neuronas nuevas (cohortes “n+..”) podrían tener un impacto cognitivo en la formación de memorias episódicas. Por un lado podrían asociar los eventos por la misma cohorte de neuronas inmaduras activas y por otro discriminarlos por neuronas nuevas de diferentes estados de madurez (diferentes cohortes) coexistiendo en la misma GCL. Basado en la hipótesis de Aimone et al., 2006. **B. Rol hipotético de la actividad de la región local en aumentar la “especialización” de las neuronas nuevas en desarrollo.** Representación del acortamiento de la ventana de asociación temporal por la aceleración de la maduración neuronal en el giro dentado ventral más activo y “especialización” neuronal para futuras asociaciones de eventos nuevos. La neurona nueva “especializada” se activaría preferentemente cuando es madura (neurona negra) por eventos nuevos (bici nueva = eBn) relacionados a los que ocurrieron durante su maduración (bici = eB). Entonces cuando un evento ocurre (eBn) la actividad dispersa en la GCL es una combinación de neuronas nuevas inmaduras (neurona gris) que favorecen las asociaciones temporales presentes, y neuronas maduras (negra) que mejoran la codificación del evento nuevo (eBn) con asociaciones de experiencias pasadas (eB). Códigos del esquema igual que (A). **Cuadro inferior derecho:** Representación de la ventaja adaptativa que podría tener un animal activo, reduciendo el tiempo de maduración neuronal. La ventaja sería crear una “base de datos” de mayor información, que cuente con más neuronas nuevas “especializadas” de mayor precisión para futuras asociaciones “eBeBn” (comparar esquema ventral de cuadro inferior derecho de A). Basado en la hipótesis de Aimone et al., 2009.

Asociando todas las evidencias, poblaciones de maduración neuronal heterogénea a lo largo del eje longitudinal del hipocampo podrían favorecer (1) las asociaciones de diferente rango temporal por la misma cohorte de neuronas nuevas en cada región, (2) las discriminaciones de los estímulos por la diversidad de poblaciones coexistiendo en la misma GCL y (3) la integración de los eventos en escalas de diferente resolución temporal (Fig. 25A, cuadro derecho). De ese modo, en conjunto

con el procesamiento espacial, el *output* del hipocampo proporcionaría la resolución espacio-temporal necesaria a cada evento guiando a una eficiente codificación de memorias episódicas. El hipocampo dorsal proporcionaría suficiente resolución para discriminar los detalles y el ventral enmarcaría los eventos detallados en contextos espacio-temporal diferentes.

Ventaja funcional del hipocampo: Regulación de la tasa de maduración neuronal

Si el tiempo de maduración neuronal tiene un impacto fuerte en el procesamiento cognitivo del hipocampo, la actividad del mismo debería poder modularlo. Esto se demostró en la presente tesis en el giro dentado ventral, donde la actividad del circuito aumentó específicamente por el ejercicio físico y aceleró la tasa de maduración neuronal.

Un animal activo (en este caso realizando ejercicio), realiza más actividades por intervalo de tiempo que un animal sedentario. Por lo tanto su hipocampo debería proporcionar mecanismos rápidos de discriminación, asociación y evaluación de múltiples eventos para futuras experiencias. Mayor resolución temporal podría ser uno de ellos. Dicha resolución podría lograrse acelerando el tiempo de maduración de las neuronas granulares del giro dentado del hipocampo adulto (Fig. 25B). A pesar de que, en primera instancia, la pérdida de una mayor escala temporal de codificación parecería desventajoso, la generación y sobrevida de un mayor número de neuronas nuevas impulsadas también por el ejercicio físico (van Praag et al., 1999a) compensarían y mejorarían dicha pérdida.

Ventanas temporales cortas (maduración rápida) no solo favorecerían la mayor discriminación entre diferentes eventos sino también determinarían “especializaciones neuronales” más precisas. Debido a la influencia del ambiente en la sobrevida de las neuronas nuevas (Tashiro et al., 2006) la función de estas neuronas seleccionadas estaría determinada por la experiencia atravesada durante su etapa de maduración. Estos resultados fueron la base de la segunda hipótesis de Aimone y col., quienes proponen que la maduración neuronal permite la especialización en la codificación de ambientes familiares a largo plazo (Aimone et al., 2009).

Los resultados del modelo de Aimone et al., (2009) mostraron que la maduración dependiente de actividad resulta en la generación de grupos especializados de neuronas granulares maduras que podrían mejorar la codificación de ambientes relacionados en el futuro, consistente con los estudios experimentales (discutidos en la sección previa). Por lo tanto las poblaciones de neuronas especializadas representarían dimensiones diferentes que el giro dentado podría utilizar para la codificación de memorias nuevas (Fig. 25B, ejemplo “eBeBn”). De ese modo, las neuronas nuevas representarían dimensiones creadas según la demanda del mismo sistema, para tener de base de datos y mejorar la codificación de futuros eventos (Aimone et al., 2009). Desde este punto de vista, el acortamiento de la maduración neuronal podría ser muy beneficioso en un animal activo, por favorecer la creación de una base de datos mayor y más precisa (Fig. 25B, cuadro).

Curiosamente, se ha propuesto que la representación anatómica del tiempo en el cerebro adulto de las aves debería coincidir con el tiempo de sobrevida de una neurona que codifica cambios. Incluso se encontró que la experiencia en las aves regula las tasas de recambio neuronal en el complejo hipocampal rostro-caudal y el caudale nidopallium. Por ejemplo, el recambio neuronal de un particular grupo de aves (*Parus atricapillus*) de Norteamérica aumentó durante el periodo en que esta ave debe cambiar su dieta de insectos y comenzar a almacenar semillas durante el otoño y todas las claves espaciales de su ambiente se encuentran cambiando drásticamente. El aumento de reemplazo neuronal podría ser una estrategia adaptativa que permitiría actualizar la información que las aves necesitan en su ecosistema cambiante (Barnea and Nottebohm, 1994; Barnea and Nottebohm, 1996; Barnea et al., 2006). En los mamíferos, la sobrevida neuronal del hipocampo adulto se determina durante el primer mes de desarrollo y luego permanecen estables a largo plazo (Dayer et al., 2003; Zhao et al., 2008). Por lo tanto, el acortamiento de la maduración neuronal podría ser una estrategia adaptativa diferente para mantener la información actualizada cuando el sistema está más activo. Incluso proporcionaría ventajas en la codificación de memorias a largo plazo.

A pesar de que estas hipótesis serían posibles, aún necesitan la comprobación del principal supuesto de que *efectivamente las neuronas nuevas se activan inespecíficamente (en forma más asociativa) durante un período de su maduración*. Varios estudios han intentado abordar ésta temática. Sin embargo el escaso número de células granulares activas debido a la codificación dispersa del giro dentado dificultan la identificación de estas ventanas de mayor excitabilidad. Sin embargo, resultados preliminares de nuestro laboratorio (LA Mongiat y AM Burgin) han demostrado que las neuronas nuevas inmaduras serían en efecto más asociativas.

REFERENCIAS

- Ahmed,S., Reynolds,B.A., and Weiss,S. (1995). BDNF enhances the differentiation but not the survival of CNS stem cell-derived neuronal precursors. *J. Neurosci.* *15*, 5765-5778.
- Aimone,J.B., Wiles,J., and Gage,F.H. (2006). Potential role for adult neurogenesis in the encoding of time in new memories. *Nat. Neurosci.* *9*, 723-727.
- Aimone,J.B., Wiles,J., and Gage,F.H. (2009). Computational influence of adult neurogenesis on memory encoding. *Neuron* *61*, 187-202.
- Allen,D.L., Harrison,B.C., Maass,A., Bell,M.L., Byrnes,W.C., and Leinwand,L.A. (2001). Cardiac and skeletal muscle adaptations to voluntary wheel running in the mouse. *J. Appl. Physiol* *90*, 1900-1908.
- 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. and Bayer,S.A. (1990). Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods. *J. Comp Neurol.* *301*, 365-381.
- Alvarez,P. and Squire,L.R. (1994). Memory consolidation and the medial temporal lobe: a simple network model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *91*, 7041-7045.
- Amaral,D.G. and Witter,M.P. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* *31*, 571-591.
- Ambrogini,P., Lattanzi,D., Ciuffoli,S., Agostini,D., Bertini,L., Stocchi,V., Santi,S., and Cuppini,R. (2004). Morpho-functional characterization of neuronal cells at different stages of maturation in granule cell layer of adult rat dentate gyrus. *Brain Res.* *1017*, 21-31.
- Bannerman,D.M., Rawlins,J.N., McHugh,S.B., Deacon,R.M., Yee,B.K., Bast,T., Zhang,W.N., Pothuizen,H.H., and Feldon,J. (2004). Regional dissociations within the hippocampus--memory and anxiety. *Neurosci. Biobehav. Rev.* *28*, 273-283.
- Barnea,A., Mishal,A., and Nottebohm,F. (2006). Social and spatial changes induce multiple survival regimes for new neurons in two regions of the adult brain: An anatomical representation of time? *Behav. Brain Res.* *167*, 63-74.
- Barnea,A. and 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.

- Barnea,A. and Nottebohm,F. (1996). Recruitment and replacement of hippocampal neurons in young and adult chickadees: an addition to the theory of hippocampal learning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *93*, 714-718.
- Bast,T. and Feldon,J. (2003). Hippocampal modulation of sensorimotor processes. *Prog. Neurobiol.* *70*, 319-345.
- Ben Ari,Y. (2002). Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat. Rev. Neurosci.* *3*, 728-739.
- Bergami,M., Rimondini,R., Santi,S., Blum,R., Gotz,M., and Canossa,M. (2008). Deletion of TrkB in adult progenitors alters newborn neuron integration into hippocampal circuits and increases anxiety-like behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *105*, 15570-15575.
- Bingman,V.P. (1992). The importance of comparative studies and ecological validity for understanding hippocampal structure and cognitive function. *Hippocampus* *2*, 213-219.
- Bingman,V.P. and Jones,T.J. (1994). Sun compass-based spatial learning impaired in homing pigeons with hippocampal lesions. *J. Neurosci.* *14*, 6687-6694.
- Boya,J., Calvo,J.L., Carbonell,A.L., and Borregon,A. (1991). A lectin histochemistry study on the development of rat microglial cells. *J. Anat.* *175*, 229-236.
- Brandt,M.D., Jessberger,S., Steiner,B., Kronenberg,G., Reuter,K., Bick-Sander,A., von der,B.W., and Kempermann,G. (2003). Transient calretinin expression defines early postmitotic step of neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis of mice. *Mol. Cell Neurosci.* *24*, 603-613.
- Brown,J.P., Couillard-Despres,S., Cooper-Kuhn,C.M., Winkler,J., Aigner,L., and Kuhn,H.G. (2003). Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *J. Comp Neurol.* *467*, 1-10.
- Burns,K.A. and Kuan,C.Y. (2005). Low doses of bromo- and iododeoxyuridine produce near-saturation labeling of adult proliferative populations in the dentate gyrus. *Eur. J. Neurosci.* *21*, 803-807.
- Cameron,H.A. and McKay,R.D. (2001). Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J. Comp Neurol.* *435*, 406-417.
- Canto,C.B., Wouterlood,F.G., and Witter,M.P. (2008). What does the anatomical organization of the entorhinal cortex tell us? *Neural Plast.* *2008*, 381243.
- Carleton,A., Petreanu,L.T., Lansford,R., Alvarez-Buylla,A., and Lledo,P.M. (2003). Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb. *Nat. Neurosci.* *6*, 507-518.
- Cenquizca,L.A. and Swanson,L.W. (2006). Analysis of direct hippocampal cortical field CA1 axonal projections to diencephalon in the rat. *J. Comp Neurol.* *497*, 101-114.

- Chan,J.P., Cordeira,J., Calderon,G.A., Iyer,L.K., and Rios,M. (2008). Depletion of central BDNF in mice impedes terminal differentiation of new granule neurons in the adult hippocampus. *Mol. Cell Neurosci.* 39, 372-383.
- Chawla,M.K., Guzowski,J.F., Ramirez-Amaya,V., Lipa,P., Hoffman,K.L., Marriott,L.K., Worley,P.F., McNaughton,B.L., and Barnes,C.A. (2005). Sparse, environmentally selective expression of Arc RNA in the upper blade of the rodent fascia dentata by brief spatial experience. *Hippocampus* 15, 579-586.
- Chen,W.G., Chang,Q., Lin,Y., Meissner,A., West,A.E., Griffith,E.C., Jaenisch,R., and Greenberg,M.E. (2003a). Derepression of BDNF transcription involves calcium-dependent phosphorylation of MeCP2. *Science* 302, 885-889.
- Chen,W.G., West,A.E., Tao,X., Corfas,G., Szentirmay,M.N., Sawadogo,M., Vinson,C., and Greenberg,M.E. (2003b). Upstream stimulatory factors are mediators of Ca²⁺-responsive transcription in neurons. *J. Neurosci.* 23, 2572-2581.
- Clelland,C.D., Choi,M., Romberg,C., Clemenson,G.D., Jr., Fragniere,A., Tyers,P., Jessberger,S., Saksida,L.M., Barker,R.A., Gage,F.H., and Bussey,T.J. (2009). A functional role for adult hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation. *Science* 325, 210-213.
- Cotman,C.W. and Berchtold,N.C. (2002). Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci.* 25, 295-301.
- Crozier,R.A., Bi,C., Han,Y.R., and Plummer,M.R. (2008). BDNF modulation of NMDA receptors is activity dependent. *J. Neurophysiol.* 100, 3264-3274.
- Czurko,A., Hirase,H., Csicsvari,J., and Buzsaki,G. (1999). Sustained activation of hippocampal pyramidal cells by 'space clamping' in a running wheel. *Eur. J. Neurosci.* 11, 344-352.
- Danzer,S.C., Kotloski,R.J., Walter,C., Hughes,M., and McNamara,J.O. (2008). Altered morphology of hippocampal dentate granule cell presynaptic and postsynaptic terminals following conditional deletion of TrkB. *Hippocampus* 18, 668-678.
- Dayer,A.G., Ford,A.A., Cleaver,K.M., Yassaee,M., and Cameron,H.A. (2003). Short-term and long-term survival of new neurons in the rat dentate gyrus. *J. Comp Neurol.* 460, 563-572.
- de Hoz,L., Knox,J., and Morris,R.G. (2003). Longitudinal axis of the hippocampus: both septal and temporal poles of the hippocampus support water maze spatial learning depending on the training protocol. *Hippocampus* 13, 587-603.
- Dolorfo,C.L. and Amaral,D.G. (1998a). Entorhinal cortex of the rat: organization of intrinsic connections. *J. Comp Neurol.* 398, 49-82.
- Dolorfo,C.L. and Amaral,D.G. (1998b). Entorhinal cortex of the rat: topographic organization of the cells of origin of the perforant path projection to the dentate gyrus. *J. Comp Neurol.* 398, 25-48.

- Duman,R.S. (2004). Depression: a case of neuronal life and death? *Biol. Psychiatry* 56, 140-145.
- Dupret,D., Revest,J.M., Koehl,M., Ichas,F., De Giorgi,F., Costet,P., Abrous,D.N., and Piazza,P.V. (2008). Spatial relational memory requires hippocampal adult neurogenesis. *PLoS. ONE.* 3, e1959.
- Dupuy-Davies,S. and Houser,C.R. (1999). Evidence for changing positions of GABA neurons in the developing rat dentate gyrus. *Hippocampus* 9, 186-199.
- Eichenbaum,H., Dudchenko,P., Wood,E., Shapiro,M., and Tanila,H. (1999). The hippocampus, memory, and place cells: is it spatial memory or a memory space? *Neuron* 23, 209-226.
- Ergorul,C. and Eichenbaum,H. (2004). The hippocampus and memory for "what," "where," and "when". *Learn. Mem.* 11, 397-405.
- Eriksson,P.S., Perfilieva,E., Bjork-Eriksson,T., Alborn,A.M., Nordborg,C., Peterson,D.A., and Gage,F.H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat. Med.* 4, 1313-1317.
- Espósito,M.S., Piatti,V.C., Laplagne,D.A., Morgenstern,N.A., Ferrari,C.C., Pitossi,F.J., and Schinder,A.F. (2005). Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. *J. Neurosci.* 25, 10074-10086.
- Ferland,R.J., Gross,R.A., and Applegate,C.D. (2002). Differences in hippocampal mitotic activity within the dorsal and ventral hippocampus following flurothyl seizures in mice. *Neurosci. Lett.* 332, 131-135.
- Forster,E., Zhao,S., and Frotscher,M. (2006). Laminating the hippocampus. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 259-267.
- Foster,T.C., Castro,C.A., and McNaughton,B.L. (1989). Spatial selectivity of rat hippocampal neurons: dependence on preparedness for movement. *Science* 244, 1580-1582.
- Fricke,R. and Cowan,W.M. (1977). An autoradiographic study of the development of the entorhinal and commissural afferents to the dentate gyrus of the rat. *J. Comp Neurol.* 173, 231-250.
- Gage,F.H. (2000). Mammalian neural stem cells. *Science* 287, 1433-1438.
- Ge,S., Goh,E.L., Sailor,K.A., Kitabatake,Y., Ming,G.L., and Song,H. (2006). GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature* 439, 589-593.
- Ge,S., Yang,C.H., Hsu,K.S., Ming,G.L., and Song,H. (2007). A critical period for enhanced synaptic plasticity in newly generated neurons of the adult brain. *Neuron* 54, 559-566.

- Goldman,S.A. and 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.
- Guzowski,J.F., McNaughton,B.L., Barnes,C.A., and Worley,P.F. (1999). Environment-specific expression of the immediate-early gene *Arc* in hippocampal neuronal ensembles. *Nat. Neurosci.* *2*, 1120-1124.
- Hargreaves,E.L., Rao,G., Lee,I., and Knierim,J.J. (2005). Major dissociation between medial and lateral entorhinal input to dorsal hippocampus. *Science* *308*, 1792-1794.
- Heckers,S., Zalesak,M., Weiss,A.P., Ditman,T., and Titone,D. (2004). Hippocampal activation during transitive inference in humans. *Hippocampus* *14*, 153-162.
- Hennou,S., Khalilov,I., Diabira,D., Ben Ari,Y., and Gozlan,H. (2002). Early sequential formation of functional GABA(A) and glutamatergic synapses on CA1 interneurons of the rat foetal hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* *16*, 197-208.
- Hollrigel,G.S., Ross,S.T., and Soltesz,I. (1998). Temporal patterns and depolarizing actions of spontaneous GABAA receptor activation in granule cells of the early postnatal dentate gyrus. *J. Neurophysiol.* *80*, 2340-2351.
- Hollrigel,G.S. and Soltesz,I. (1997). Slow kinetics of miniature IPSCs during early postnatal development in granule cells of the dentate gyrus. *J. Neurosci.* *17*, 5119-5128.
- Jagasia,R., Steib,K., Englberger,E., Herold,S., Faus-Kessler,T., Saxe,M., Gage,F.H., Song,H., and Lie,D.C. (2009). GABA-cAMP response element-binding protein signaling regulates maturation and survival of newly generated neurons in the adult hippocampus. *J. Neurosci.* *29*, 7966-7977.
- Jahr,C.E. and Nicoll,R.A. (1982). Noradrenergic modulation of dendrodendritic inhibition in the olfactory bulb. *Nature* *297*, 227-229.
- Jessberger,S. and Kempermann,G. (2003). Adult-born hippocampal neurons mature into activity-dependent responsiveness. *Eur. J. Neurosci.* *18*, 2707-2712.
- Jones,S.P., Rahimi,O., O'Boyle,M.P., Diaz,D.L., and Claiborne,B.J. (2003). Maturation of granule cell dendrites after mossy fiber arrival in hippocampal field CA3. *Hippocampus* *13*, 413-427.
- Jung,M.W., Wiener,S.I., and McNaughton,B.L. (1994). Comparison of spatial firing characteristics of units in dorsal and ventral hippocampus of the rat. *J. Neurosci.* *14*, 7347-7356.
- Kee,N., Teixeira,C.M., Wang,A.H., and Frankland,P.W. (2007). Preferential incorporation of adult-generated granule cells into spatial memory networks in the dentate gyrus. *Nat. Neurosci.* *10*, 355-362.
- Kempermann,G., Gast,D., Kronenberg,G., Yamaguchi,M., and Gage,F.H. (2003). Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development* *130*, 391-399.

- Kempermann,G., Jessberger,S., Steiner,B., and Kronenberg,G. (2004). Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci.* 27, 447-452.
- Kempermann,G., Kuhn,H.G., and Gage,F.H. (1997). More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386, 493-495.
- Khazipov,R., Esclapez,M., Caillard,O., Bernard,C., Khalilov,I., Tyzio,R., Hirsch,J., Dzhala,V., Berger,B., and Ben Ari,Y. (2001). Early development of neuronal activity in the primate hippocampus in utero. *J. Neurosci.* 21, 9770-9781.
- Kishi,T., Tsumori,T., Yokota,S., and Yasui,Y. (2006). Topographical projection from the hippocampal formation to the amygdala: a combined anterograde and retrograde tracing study in the rat. *J. Comp Neurol.* 496, 349-368.
- Kjelstrup,K.B., Solstad,T., Brun,V.H., Hafting,T., Leutgeb,S., Witter,M.P., Moser,E.I., and Moser,M.B. (2008). Finite scale of spatial representation in the hippocampus. *Science* 321, 140-143.
- Kjelstrup,K.G., Tuvnes,F.A., Steffenach,H.A., Murison,R., Moser,E.I., and Moser,M.B. (2002). Reduced fear expression after lesions of the ventral hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 10825-10830.
- Kokaia,Z. and Lindvall,O. (2003). Neurogenesis after ischaemic brain insults. *Curr. Opin. Neurobiol.* 13, 127-132.
- Konur,S. and Ghosh,A. (2005). Calcium signaling and the control of dendritic development. *Neuron* 46, 401-405.
- Kubik,S., Miyashita,T., and Guzowski,J.F. (2007). Using immediate-early genes to map hippocampal subregional functions. *Learn. Mem.* 14, 758-770.
- Kuczewski,N., Porcher,C., Ferrand,N., Fiorentino,H., Pellegrino,C., Kolarow,R., Lessmann,V., Medina,I., and Gaiarsa,J.L. (2008). Backpropagating action potentials trigger dendritic release of BDNF during spontaneous network activity. *J. Neurosci.* 28, 7013-7023.
- Kuhn,H.G., Dickinson-Anson,H., and Gage,F.H. (1996). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J. Neurosci.* 16, 2027-2033.
- Laplagne,D.A., Esposito,M.S., Piatti,V.C., Morgenstern,N.A., Zhao,C., van Praag,H., Gage,F.H., and Schinder,A.F. (2006). Functional convergence of neurons generated in the developing and adult hippocampus. *PLoS. Biol.* 4, e409.
- Laplagne,D.A., Kamienkowski,J.E., Esposito,M.S., Piatti,V.C., Zhao,C., Gage,F.H., and Schinder,A.F. (2007). Similar GABAergic inputs in dentate granule cells born during embryonic and adult neurogenesis. *Eur. J. Neurosci.* 25, 2973-2981.
- Lehn,H., Steffenach,H.A., van Strien,N.M., Veltman,D.J., Witter,M.P., and Haberg,A.K. (2009). A specific role of the human hippocampus in recall of temporal sequences. *J. Neurosci.* 29, 3475-3484.

- Lemasson,M., Saghatelian,A., Olivo-Marin,J.C., and Lledo,P.M. (2005). Neonatal and adult neurogenesis provide two distinct populations of newborn neurons to the mouse olfactory bulb. *J. Neurosci.* 25, 6816-6825.
- Leutgeb,J.K., Leutgeb,S., Moser,M.B., and Moser,E.I. (2007). Pattern separation in the dentate gyrus and CA3 of the hippocampus. *Science* 315, 961-966.
- Li,Y., Luikart,B.W., Birnbaum,S., Chen,J., Kwon,C.H., Kernie,S.G., Bassel-Duby,R., and Parada,L.F. (2008). TrkB regulates hippocampal neurogenesis and governs sensitivity to antidepressive treatment. *Neuron* 59, 399-412.
- Liu,X., Tilwalli,S., Ye,G., Lio,P.A., Pasternak,J.F., and Trommer,B.L. (2000). Morphologic and electrophysiologic maturation in developing dentate gyrus granule cells. *Brain Res.* 856, 202-212.
- Lledo,P.M., Alonso,M., and Grubb,M.S. (2006). Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 179-193.
- Lois,C. and 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.
- Lubbers,K. and Frotscher,M. (1988). Differentiation of granule cells in relation to GABAergic neurons in the rat fascia dentata. Combined Golgi/EM and immunocytochemical studies. *Anat. Embryol. (Berl)* 178, 119-127.
- Lubbers,K., Wolff,J.R., and Frotscher,M. (1985). Neurogenesis of GABAergic neurons in the rat dentate gyrus: a combined autoradiographic and immunocytochemical study. *Neurosci. Lett.* 62, 317-322.
- Lubenov,E.V. and Siapas,A.G. (2009). Hippocampal theta oscillations are travelling waves. *Nature* 459, 534-539.
- Lyford,G.L., Yamagata,K., Kaufmann,W.E., Barnes,C.A., Sanders,L.K., Copeland,N.G., Gilbert,D.J., Jenkins,N.A., Lanahan,A.A., and Worley,P.F. (1995). Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. *Neuron* 14, 433-445.
- Ma,D.K., Jang,M.H., Guo,J.U., Kitabatake,Y., Chang,M.L., Pow-Anpongkul,N., Flavell,R.A., Lu,B., Ming,G.L., and Song,H. (2009a). Neuronal activity-induced Gadd45b promotes epigenetic DNA demethylation and adult neurogenesis. *Science* 323, 1074-1077.
- Ma,D.K., Kim,W.R., Ming,G.L., and Song,H. (2009b). Activity-dependent extrinsic regulation of adult olfactory bulb and hippocampal neurogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1170, 664-673.
- Madara,J.C. and Levine,E.S. (2008). Presynaptic and postsynaptic NMDA receptors mediate distinct effects of brain-derived neurotrophic factor on synaptic transmission. *J. Neurophysiol.* 100, 3175-3184.

- Magavi,S.S., Leavitt,B.R., and Macklis,J.D. (2000). Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. *Nature* *405*, 951-955.
- Markakis,E.A. and Gage,F.H. (1999). Adult-generated neurons in the dentate gyrus send axonal projections to field CA3 and are surrounded by synaptic vesicles. *J. Comp Neurol.* *406*, 449-460.
- Mathews, E. A., Morgenstern, N. A., Piatti, V. C., Zhao, C., Jessberger, S., Schinder, A. F., and Gage, F. H. Distinctive layering pattern of mouse dentate granule cells generated by developmental and adult neurogenesis. Enviado. 2009.
Ref Type: Unpublished Work
- Matsuda,N., Lu,H., Fukata,Y., Noritake,J., Gao,H., Mukherjee,S., Nemoto,T., Fukata,M., and Poo,M.M. (2009). Differential activity-dependent secretion of brain-derived neurotrophic factor from axon and dendrite. *J. Neurosci.* *29*, 14185-14198.
- Maurer,A.P., Vanrhoads,S.R., Sutherland,G.R., Lipa,P., and McNaughton,B.L. (2005). Self-motion and the origin of differential spatial scaling along the septo-temporal axis of the hippocampus. *Hippocampus* *15*, 841-852.
- McAllister,A.K., Katz,L.C., and Lo,D.C. (1996). Neurotrophin regulation of cortical dendritic growth requires activity. *Neuron* *17*, 1057-1064.
- McHugh,T.J., Jones,M.W., Quinn,J.J., Balthasar,N., Coppari,R., Elmquist,J.K., Lowell,B.B., Fanselow,M.S., Wilson,M.A., and Tonegawa,S. (2007). Dentate gyrus NMDA receptors mediate rapid pattern separation in the hippocampal network. *Science* *317*, 94-99.
- McNaughton,B.L., Battaglia,F.P., Jensen,O., Moser,E.I., and Moser,M.B. (2006). Path integration and the neural basis of the 'cognitive map'. *Nat. Rev. Neurosci.* *7*, 663-678.
- Messaoudi,E., Kanhema,T., Soule,J., Tiron,A., Dageyte,G., da Silva,B., and Bramham,C.R. (2007). Sustained Arc/Arg3.1 synthesis controls long-term potentiation consolidation through regulation of local actin polymerization in the dentate gyrus in vivo. *J. Neurosci.* *27*, 10445-10455.
- Moga,D.E., Calhoun,M.E., Chowdhury,A., Worley,P., Morrison,J.H., and Shapiro,M.L. (2004). Activity-regulated cytoskeletal-associated protein is localized to recently activated excitatory synapses. *Neuroscience* *125*, 7-11.
- Mongiat,L.A., Esposito,M.S., Lombardi,G., and Schinder,A.F. (2009). Reliable activation of immature neurons in the adult hippocampus. *PLoS. ONE.* *4*, e5320.
- Morgenstern,N.A., Lombardi,G., and Schinder,A.F. (2008). Newborn granule cells in the ageing dentate gyrus. *J. Physiol* *586*, 3751-3757.
- Morozov,Y.M. and Freund,T.F. (2003). Postnatal development and migration of cholecystinin-immunoreactive interneurons in rat hippocampus. *Neuroscience* *120*, 923-939.

- Moser,M.B., Moser,E.I., Forrest,E., Andersen,P., and Morris,R.G. (1995a). Spatial learning with a minislab in the dorsal hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 9697-9701.
- Moser,M.B., Moser,E.I., Forrest,E., Andersen,P., and Morris,R.G. (1995b). Spatial learning with a minislab in the dorsal hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 9697-9701.
- Mullen,R.J., Buck,C.R., and Smith,A.M. (1992). NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 116, 201-211.
- Muramatsu,R., Ikegaya,Y., Matsuki,N., and Koyama,R. (2007). Neonatally born granule cells numerically dominate adult mice dentate gyrus. *Neuroscience* 148, 593-598.
- O'Keefe,J. (1976). Place units in the hippocampus of the freely moving rat. *Exp. Neurol.* 51, 78-109.
- O'Keefe,J. and Dostrovsky,J. (1971). The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res.* 34, 171-175.
- Overstreet Wadiche,L.S., Bromberg,D.A., Bensen,A.L., and Westbrook,G.L. (2005). GABAergic signaling to newborn neurons in dentate gyrus. *J. Neurophysiol.* 94, 4528-4532.
- Overstreet-Wadiche,L.S., Bensen,A.L., and Westbrook,G.L. (2006a). Delayed development of adult-generated granule cells in dentate gyrus. *J. Neurosci.* 26, 2326-2334.
- Overstreet-Wadiche,L.S., Bromberg,D.A., Bensen,A.L., and Westbrook,G.L. (2006b). Seizures accelerate functional integration of adult-generated granule cells. *J. Neurosci.* 26, 4095-4103.
- Parent,J.M. and Lowenstein,D.H. (2002). Seizure-induced neurogenesis: are more new neurons good for an adult brain? *Prog. Brain Res.* 135, 121-131.
- Paton,J.A. and Nottebohm,F.N. (1984). Neurons generated in the adult brain are recruited into functional circuits. *Science* 225, 1046-1048.
- Petreau,L. and Alvarez-Buylla,A. (2002). Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction. *J. Neurosci.* 22, 6106-6113.
- Piatti,V.C., Esposito,M.S., and Schinder,A.F. (2006). The timing of neuronal development in adult hippocampal neurogenesis. *Neuroscientist.* 12, 463-468.
- Pitkanen,A., Pikkarainen,M., Nurminen,N., and Ylinen,A. (2000). Reciprocal connections between the amygdala and the hippocampal formation, perirhinal cortex, and postrhinal cortex in rat. A review. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 911, 369-391.
- Pozzo-Miller,L. (2006). BDNF enhances dendritic Ca²⁺ signals evoked by coincident EPSPs and back-propagating action potentials in CA1 pyramidal neurons. *Brain Res.* 1104, 45-54.

- Rakic,P. (1985). Limits of neurogenesis in primates. *Science* 227, 1054-1056.
- Reynolds,B.A. and Weiss,S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255, 1707-1710.
- Richards,L.J., Kilpatrick,T.J., and Bartlett,P.F. (1992). De novo generation of neuronal cells from the adult mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89, 8591-8595.
- Rodriguez,F., Lopez,J.C., Vargas,J.P., Broglio,C., Gomez,Y., and Salas,C. (2002a). Spatial memory and hippocampal pallium through vertebrate evolution: insights from reptiles and teleost fish. *Brain Res. Bull.* 57, 499-503.
- Rodriguez,F., Lopez,J.C., Vargas,J.P., Gomez,Y., Broglio,C., and Salas,C. (2002b). Conservation of spatial memory function in the pallial forebrain of reptiles and ray-finned fishes. *J. Neurosci.* 22, 2894-2903.
- Rodriguez,J.J., Davies,H.A., Silva,A.T., De Souza,I.E., Peddie,C.J., Colyer,F.M., Lancashire,C.L., Fine,A., Errington,M.L., Bliss,T.V., and Stewart,M.G. (2005). Long-term potentiation in the rat dentate gyrus is associated with enhanced Arc/Arg3.1 protein expression in spines, dendrites and glia. *Eur. J. Neurosci.* 21, 2384-2396.
- Santarelli,L., Saxe,M., Gross,C., Surget,A., Battaglia,F., Dulawa,S., Weisstaub,N., Lee,J., Duman,R., Arancio,O., Belzung,C., and Hen,R. (2003). Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* 301, 805-809.
- Saxe,M.D., Battaglia,F., Wang,J.W., Malleret,G., David,D.J., Monckton,J.E., Garcia,A.D., Sofroniew,M.V., Kandel,E.R., Santarelli,L., Hen,R., and Drew,M.R. (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.
- Saxe,M.D., Malleret,G., Vronskaya,S., Mendez,I., Garcia,A.D., Sofroniew,M.V., Kandel,E.R., and Hen,R. (2007). Paradoxical influence of hippocampal neurogenesis on working memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 104, 4642-4646.
- Scharfman,H.E., Sollas,A.L., Berger,R.E., and Goodman,J.H. (2003). Electrophysiological evidence of monosynaptic excitatory transmission between granule cells after seizure-induced mossy fiber sprouting. *J. Neurophysiol.* 90, 2536-2547.
- Schinder,A.F. and Gage,F.H. (2004). A hypothesis about the role of adult neurogenesis in hippocampal function. *Physiology (Bethesda)* 19, 253-261.
- Schinder,A.F. and Poo,M. (2000). The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* 23, 639-645.
- Schmidt-Hieber,C., Jonas,P., and Bischofberger,J. (2004). Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature* 429, 184-187.
- Scholzen,T. and Gerdes,J. (2000). The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J. Cell Physiol* 182, 311-322.

- Scoville,W.B. and Milner,B. (2000). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. 1957. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* *12*, 103-113.
- Seki,T. (2002). Hippocampal adult neurogenesis occurs in a microenvironment provided by PSA-NCAM-expressing immature neurons. *J. Neurosci. Res.* *69*, 772-783.
- Seress,L. and Pokorny,J. (1981). Structure of the granular layer of the rat dentate gyrus. A light microscopic and Golgi study. *J. Anat.* *133*, 181-195.
- Seri,B., Garcia-Verdugo,J.M., McEwen,B.S., and Alvarez-Buylla,A. (2001). Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J. Neurosci.* *21*, 7153-7160.
- Shors,T.J., Miesegaes,G., Beylin,A., Zhao,M., Rydel,T., and Gould,E. (2001). Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature* *410*, 372-376.
- Shors,T.J., Townsend,D.A., Zhao,M., Kozorovitskiy,Y., and Gould,E. (2002). Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning. *Hippocampus* *12*, 578-584.
- SIDMAN,R.L., MIALE,I.L., and FEDER,N. (1959). Cell proliferation and migration in the primitive ependymal zone: an autoradiographic study of histogenesis in the nervous system. *Exp. Neurol.* *1*, 322-333.
- Sik,A., Penttonen,M., and Buzsaki,G. (1997). Interneurons in the hippocampal dentate gyrus: an in vivo intracellular study. *Eur. J. Neurosci.* *9*, 573-588.
- Sloviter,R.S. (1989). Calcium-binding protein (calbindin-D28k) and parvalbumin immunocytochemistry: localization in the rat hippocampus with specific reference to the selective vulnerability of hippocampal neurons to seizure activity. *J. Comp Neurol.* *280*, 183-196.
- Small,S.A., Nava,A.S., Perera,G.M., DeLaPaz,R., Mayeux,R., and Stern,Y. (2001). Circuit mechanisms underlying memory encoding and retrieval in the long axis of the hippocampal formation. *Nat. Neurosci.* *4*, 442-449.
- Snyder,J.S., Hong,N.S., McDonald,R.J., and Wojtowicz,J.M. (2005). A role for adult neurogenesis in spatial long-term memory. *Neuroscience* *130*, 843-852.
- Snyder,J.S., Kee,N., and Wojtowicz,J.M. (2001). Effects of adult neurogenesis on synaptic plasticity in the rat dentate gyrus. *J. Neurophysiol.* *85*, 2423-2431.
- Snyder,J.S., Radik,R., Wojtowicz,J.M., and Cameron,H.A. (2009a). Anatomical gradients of adult neurogenesis and activity: young neurons in the ventral dentate gyrus are activated by water maze training. *Hippocampus* *19*, 360-370.
- Snyder,J.S., Ramchand,P., Rabbett,S., Radik,R., Wojtowicz,J.M., and Cameron,H.A. (2009b). Septo-temporal gradients of neurogenesis and activity in 13-month-old rats. *Neurobiol. Aging.*

- Soriano,E., Cobas,A., and Fairen,A. (1986). Asynchronism in the neurogenesis of GABAergic and non-GABAergic neurons in the mouse hippocampus. *Brain Res.* 395, 88-92.
- Soriano,E., Del Rio,J.A., Martinez,A., and Super,H. (1994). Organization of the embryonic and early postnatal murine hippocampus. I. Immunocytochemical characterization of neuronal populations in the subplate and marginal zone. *J. Comp Neurol.* 342, 571-595.
- Streit,W.J. and Kreutzberg,G.W. (1987). Lectin binding by resting and reactive microglia. *J. Neurocytol.* 16, 249-260.
- Tashiro,A., Makino,H., and Gage,F.H. (2007). Experience-specific functional modification of the dentate gyrus through adult neurogenesis: a critical period during an immature stage. *J. Neurosci.* 27, 3252-3259.
- Tashiro,A., Sandler,V.M., Toni,N., Zhao,C., and Gage,F.H. (2006). NMDA-receptor-mediated, cell-specific integration of new neurons in adult dentate gyrus. *Nature* 442, 929-933.
- Thompson,C.L., Pathak,S.D., Jeromin,A., Ng,L.L., MacPherson,C.R., Mortrud,M.T., Cusick,A., Riley,Z.L., Sunkin,S.M., Bernard,A., Puchalski,R.B., Gage,F.H., Jones,A.R., Bajic,V.B., Hawrylycz,M.J., and Lein,E.S. (2008). Genomic anatomy of the hippocampus. *Neuron* 60, 1010-1021.
- Toni,N., Laplagne,D.A., Zhao,C., Lombardi,G., Ribak,C.E., Gage,F.H., and Schinder,A.F. (2008). Neurons born in the adult dentate gyrus form functional synapses with target cells. *Nat. Neurosci.* 11, 901-907.
- Treves,A., Tashiro,A., Witter,M.E., and Moser,E.I. (2008b). What is the mammalian dentate gyrus good for? *Neuroscience* 154, 1155-1172.
- Treves,A., Tashiro,A., Witter,M.E., and Moser,E.I. (2008a). What is the mammalian dentate gyrus good for? *Neuroscience* 154, 1155-1172.
- Trommald,M. and Hulleberg,G. (1997). Dimensions and density of dendritic spines from rat dentate granule cells based on reconstructions from serial electron micrographs. *J. Comp Neurol.* 377, 15-28.
- Tyzio,R., Represa,A., Jorquera,I., Ben Ari,Y., Gozlan,H., and Aniksztejn,L. (1999). The establishment of GABAergic and glutamatergic synapses on CA1 pyramidal neurons is sequential and correlates with the development of the apical dendrite. *J. Neurosci.* 19, 10372-10382.
- van Praag,H., Christie,B.R., Sejnowski,T.J., and Gage,F.H. (1999a). Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 13427-13431.
- van Praag,H., Kempermann,G., and Gage,F.H. (1999b). Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat. Neurosci.* 2, 266-270.

- van Praag,H., Schinder,A.F., Christie,B.R., Toni,N., Palmer,T.D., and Gage,F.H. (2002). Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 415, 1030-1034.
- Vanderwolf,C.H. (1969). Hippocampal electrical activity and voluntary movement in the rat. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 26, 407-418.
- Vargas,J.P., Petruso,E.J., and Bingman,V.P. (2004). Hippocampal formation is required for geometric navigation in pigeons. *Eur. J. Neurosci.* 20, 1937-1944.
- Verwer,R.W., Meijer,R.J., Van Uum,H.F., and Witter,M.P. (1997). Collateral projections from the rat hippocampal formation to the lateral and medial prefrontal cortex. *Hippocampus* 7, 397-402.
- Wang,J.W., David,D.J., Monckton,J.E., Battaglia,F., and Hen,R. (2008). Chronic fluoxetine stimulates maturation and synaptic plasticity of adult-born hippocampal granule cells. *J. Neurosci.* 28, 1374-1384.
- Wang,S., Scott,B.W., and Wojtowicz,J.M. (2000). Heterogenous properties of dentate granule neurons in the adult rat. *J. Neurobiol.* 42, 248-257.
- Whishaw,I.Q. and Vanderwolf,C.H. (1973). Hippocampal EEG and behavior: changes in amplitude and frequency of RSA (theta rhythm) associated with spontaneous and learned movement patterns in rats and cats. *Behav. Biol.* 8, 461-484.
- Winter,B., Breitenstein,C., Mooren,F.C., Voelker,K., Fobker,M., Lechtermann,A., Krueger,K., Fromme,A., Korsukewitz,C., Floel,A., and Knecht,S. (2007). High impact running improves learning. *Neurobiol. Learn. Mem.* 87, 597-609.
- Wong,M.L. and Licinio,J. (2001). Research and treatment approaches to depression. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 343-351.
- Wolf,T.B., Shepherd,G.M., and Greer,C.A. (1991). Serial reconstructions of granule cell spines in the mammalian olfactory bulb. *Synapse* 7, 181-192.
- Wu,C.W., Chang,Y.T., Yu,L., Chen,H.I., Jen,C.J., Wu,S.Y., Lo,C.P., and Kuo,Y.M. (2008). Exercise enhances the proliferation of neural stem cells and neurite growth and survival of neuronal progenitor cells in dentate gyrus of middle-aged mice. *J. Appl. Physiol* 105, 1585-1594.
- Xu,L., Yee,J.K., Wolff,J.A., and Friedmann,T. (1989). Factors affecting long-term stability of Moloney murine leukemia virus-based vectors. *Virology* 171, 331-341.
- Ying,S.W., Futter,M., Rosenblum,K., Webber,M.J., Hunt,S.P., Bliss,T.V., and Bramham,C.R. (2002). Brain-derived neurotrophic factor induces long-term potentiation in intact adult hippocampus: requirement for ERK activation coupled to CREB and upregulation of Arc synthesis. *J. Neurosci.* 22, 1532-1540.
- Zhao,C., Deng,W., and Gage,F.H. (2008). Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 132, 645-660.

Zhao,C., Teng,E.M., Summers,R.G., Jr., Ming,G.L., and Gage,F.H. (2006). Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *J. Neurosci.* 26, 3-11.

TRABAJOS PUBLICADOS EN EL MARCO DE ESTA TESIS

Piatti VC*, Esposito MS*, Laplagne DA*, Morgenstern NA, Ferrari CC, Pitossi FJ, Schinder AF. Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. *J. Neurosci.* 2005 Nov 2; 25 (44): 10074- 86.

Piatti VC, Esposito MS, Schinder AF. The timing of neuronal development in adult hippocampal neurogenesis. *Neuroscientist.* 2006 12, 463-468.

Laplagne DA, Espósito MS, **Piatti VC**, Morgenstern NA, Zhao C, van Praag H, Gage F, Schinder AF. Functional convergence of neurons generated in the developing and adult hippocampus. *PLoS Biol.* 2006 Nov 21; 4 (12): e409.

Laplagne DA, Kamienkowski JE, Espósito MS, **Piatti VC**, Zhao C, Gage F, Schinder AF. Similar GABAergic Inputs in Dentate Granule Cells Born During Embryonic and Adult Neurogenesis. *EurJ Neurosci.* 2007 May; 25 (10): 2973.

Mathews EA, Morgenstern NA, **Piatti VC**, Zhao C, Jessberger S, Schinder AF, Gage FH. Distinctive layering pattern of mouse dentate granule cells generated by developmental and adult neurogenesis. *Enviado.* 2009.

Piatti VC*, Davies Sala MG*, Espósito MS*, Mongiat LA, Trinchero MF, Schinder AF. An activity-dependent septotemporal gradient for the maturation of newborn neurons in the adult hippocampus. *Manuscrito en preparación.*

* Estos autores contribuyeron en igual medida al trabajo.

ABREVIATURAS

BrdU, Bromodeoxiuridina

Cb, calbindin D-28k

DCX, doublecortin

dpi, días post inyección

GCL, capa granular

IEG, gen de respuesta inmediata

LTP, potenciación a largo plazo

MMLV, Moloney murine leukemia virus

MWM, test de navegación espacial de Morris

NPCs, células progenitoras neurales

SEM, error estándar

SGZ, zona subgranular

SVZ, zona subventricular lateral

Tamb, temperatura ambiente