



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular

***Rol de la actividad neuronal en el control de la
neurogénesis del cerebro adulto***

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

Lic. María Soledad Espósito

Director de tesis: Dr. Alejandro F. Schinder
Consejero de estudios: Dr. Fernando Pitossi
Lugar de Trabajo: Fundación Instituto Leloir

Ciudad de Buenos Aires 2008

Rol de la actividad neuronal en el control de la neurogénesis del cerebro adulto

El giro dentado del hipocampo es una de las dos regiones del cerebro que continua generando neuronas nuevas durante la adultez. Con el fin de caracterizar el proceso de desarrollo que lleva a la integración funcional de las neuronas nuevas en el giro dentado adulto, se marcaron *in vivo* los progenitores neurales en división utilizando un retrovirus que expresa la proteína fluorescente verde (GFP), permitiendo una precisa determinación de la edad neuronal. Las propiedades funcionales de neuronas GFP⁺ de 1 a 45 días de edad fueron estudiadas mediante la técnica de patch clamp en configuración whole-cell. Los hallazgos obtenidos demuestran que el desarrollo neuronal toma más de cuatro semanas y sigue una secuencia precisa de ensamblado de sus conexiones sinápticas que comienza con neuronas sinápticamente silentes, que primero reciben aferentes GABAérgicos sobre sus dendritas, luego se desarrolla la conectividad glutamatérgica y finalmente arriban los aferentes GABAérgicos perisomáticos. Llamativamente, el establecimiento de la conectividad aferente es semejante a la secuencia descrita durante el desarrollo hipocampal pero la duración del proceso se encuentra duplicada en el adulto. Esto sugiere que podría existir un programa genético intrínseco en los progenitores neurales que regula la secuencia de desarrollo pero además que las claves ambientales podrían modular la tasa de maduración. Para estudiar la hipótesis de que la actividad del circuito puede modular el desarrollo neuronal en el adulto, se redujo su excitabilidad utilizando un retrovirus que expresa un canal de potasio de rectificación interna (Kir2.1) y GFP. El análisis histológico y electrofisiológico de las neuronas que sobreexpresan Kir2.1 reveló un retraso en el desarrollo neuronal a partir de la tercera semana de edad. Estos resultados demuestran que la despolarización y/o el disparo de potenciales de acción inducido por la actividad del circuito son necesarios para desencadenar las últimas etapas del desarrollo neuronal en el hipocampo adulto.

Palabras claves: sinaptogénesis, hipocampo, glutamato, GABA, excitabilidad

Role of neuronal activity in the regulation of adult neurogenesis

The dentate gyrus in the hippocampus is one of the two brain regions that continue to generate new neurons during adulthood. In order to characterize the developmental process that leads to functional integration of newborn neurons into the adult dentate gyrus, dividing progenitor cells were labeled *in vivo* with a retrovirus that expresses green fluorescent protein (GFP), allowing accurate birth dating. Functional properties of GFP⁺ newborn neurons from 1 to 45 days old were measured by the whole-cell patch clamp technique. Our observations indicate that neuronal development takes more than 4 weeks and follows a precise sequence of synaptic afferent assembly, starting from a synaptically silent neuron, first receiving GABAergic afferents onto their dendrites, followed by the onset of glutamatergic connectivity and ending with the arrival of perisomatic GABAergic afferents. Notably, the establishment of afferent connectivity takes twice the time during adulthood but the sequence still resembles that of hippocampal development. This observation suggests an intrinsic genetic program that regulates the developmental sequence followed by progenitor cells, where external cues and electrical activity may act to modulate the rate of maturation. To address the hypothesis that circuit activity can modulate the development of adult-born neurons, their excitability was reduced by means of retroviral expression of an inward rectifying potassium channel (Kir2.1) together with GFP. The electrophysiological and histological characterization of Kir2.1-expressing neurons shows a delay in their development that becomes evident by the third week of age. These results demonstrate that the excitability induced by circuit activity is a key modulator of the last steps of neuronal development in the adult hippocampus.

Keywords: synaptogenesis, hippocampus, glutamate, GABA, excitability

Durante los años en que estuve realizando mi tesis doctoral hubieron muchos más resultados de los que se pueden y deben escribir: hubo alegría, risas, amistad, crecimiento y a veces frustración. En todo ese camino estuve siempre acompañada y a esas personas les quiero agradecer:

A mi mamá y a mi papá, porque sin ellos no hubiera podido seguir el camino que elegí.

A Cristian por su amor y por ayudarme constantemente a disfrutar la vida además del trabajo.

A Ale por haber decidido volver a Argentina y darme la oportunidad de trabajar con él, por apoyarme, formarme y respetarme siempre.

A todos mis compañeros porque cada uno aportó algo especial: a Diego por su capacidad científica, su música (a veces) y sus eternas discusiones sobre política académica; a Vero por ser mi hermanita del corazón; a Nico por las perfusiones, la tranquilidad y el cariño que regala; a Gabi por acompañarme en el sinuoso camino de la biología molecular; a Lukita porque siempre está dispuesto a ayudarme en el set up y a discutir resultados; a Marie por su alegría y entusiasmo; a Georgi por ser mi segunda mano derecha, siempre dispuesta y contenta.

Pero además del laboratorio, hubo mucha más gente que me ayudó a lo largo de todo el pasillo... a todos ellos les agradezco, pero en especial quiero agradecer a todo el 106 por ser mi refugio, por los mates y el telar, y al 109 por hacer divertidas tantas reuniones y talleres compartidos.

Quiero agradecer a mis amigos de escalada porque la montaña es más hermosa si la comparto con ellos. Le agradezco a Fede por su gran corazón, a Chris y Marie por acompañarme siempre, a Quique y a Silvia, porque la vuelta a los hielos fue un viaje hermoso que me dio pilas para llegar a donde estoy.

A Jonny, Claudia, Valentina y Jerónimo... por todo el cariño que nos tenemos.

A toda la familia Smulski por apoyarme y quererme siempre.

A todos mis primos, tíos y amigos por estar al lado mío.

1. Introducción General	1
Hipocampo: Estructura y función	2
Desarrollo del Giro Dentado	7
Revisión histórica del descubrimiento de la neurogénesis adulta	9
2. Capítulo I	
2.1 <i>Introducción</i>	13
Neurogénesis en el giro dentado adulto	14
Rol funcional de la neurogénesis adulta	15
Neurogénesis en el desarrollo perinatal	17
Objetivos y Estrategia experimental	20
2.2 <i>Resultados</i>	23
Desarrollo funcional de las neuronas nacidas en el giro dentado adulto	24
Desarrollo de la conectividad de las neuronas nacidas en el giro dentado adulto	27
Neuronas sin conectividad aferente	28
Desarrollo de la conectividad GABAérgica	31
Inicio de la conectividad glutamatérgica	35
Conclusiones	43
2.3 <i>Discusión</i>	45
Secuencia de desarrollo neuronal	46
Rol funcional de la neurogénesis adulta	52
3. Capítulo II	
3.1 <i>Introducción</i>	55
Rol de la actividad del circuito en la neurogénesis durante el desarrollo perinatal	56
Rol de la actividad del circuito en la neurogénesis adulta	58
Mecanismos de acción de los neurotransmisores en la regulación del desarrollo neuronal	63
Canales de potasio de rectificación entrante (Kir)	66
Hipótesis, Objetivos y Estrategia	70
3.2 <i>Resultados</i>	72
Clonado de Kir2.1 y Kir2.1 mutado	73
Funcionalidad de los clonados en cultivos celulares	75
Expresión de Kir2.1 in vivo	80
Expresión de Kirmut in vivo	85
Efectos de la sobreexpresión de Kir2.1 en la excitabilidad neuronal	86
Efectos homeostáticos de la sobreexpresión de Kir2.1	90
Efectos de la sobreexpresión de Kir2.1 en el desarrollo neuronal	91
Resumen de los resultados	96
Conclusiones	96

3.3 <i>Discusión</i>	97
4. Materiales y Métodos	104
Retrovirus	105
Animales y cirugía estereotáxica	106
Electrofisiología	107
Biología molecular: modificación del genoma retroviral	111
Perfusión, inmunohistoquímica y microscopía confocal:	116
Análisis estadístico	117
5. Abreviaturas	119
6. Referencias	122

1. Introducción General

Hipocampo: Estructura y Función

El hipocampo es una estructura cerebral que se encuentra situada en el lóbulo temporal, cuyo nombre deriva del griego (hippos = caballo, campos = monstruo) debido a su característica forma curva, semejante a la de un caballito de mar (Figura 1.1 A). Dicha estructura es una de las más antiguas filogenéticamente y forma parte del sistema límbico junto con el tálamo, el hipotálamo, la amígdala, el cuerpo caloso, el séptum y el mesencéfalo (Figura 1.1 B).

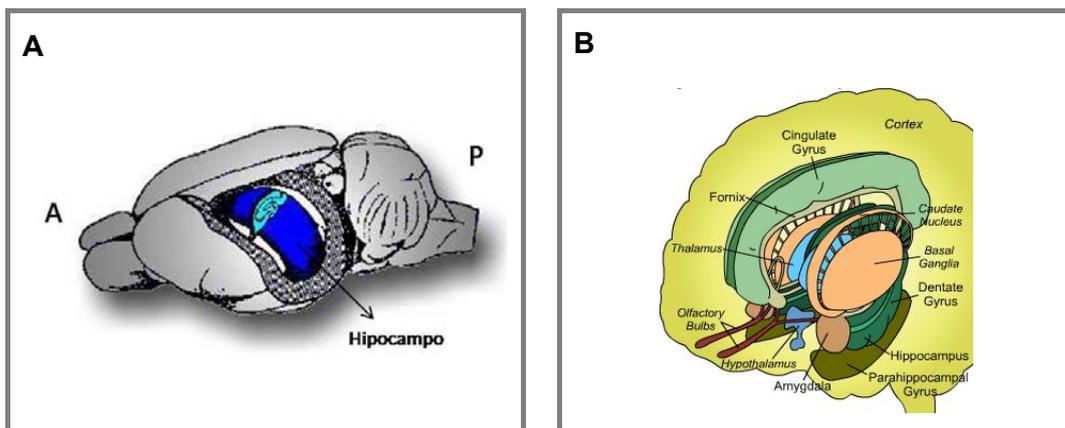


Figura 1.1 A: Esquema mostrando la localización del hipocampo en los lóbulos temporales del cerebro de roedores, y la ubicación dentro de esta estructura de la capa piramidal (CA1-3) y de la capa granular. A: anterior; P: posterior. B: Esquema donde se muestra la ubicación del hipocampo en relación con otras áreas del cerebro.

El hipocampo presenta una estructura laminar bien definida que puede ser subdividida en dos grandes regiones: el hipocampo propiamente dicho y el giro dentado. A su vez el hipocampo propiamente dicho puede subdividirse en tres subregiones: CA1, CA2, y CA3, donde CA es la abreviatura de *cornu ammonis* (asta de Amón). Las neuronas principales de proyección de las regiones CA1, CA2, y CA3 son neuronas piramidales excitatorias glutamatérgicas, mientras que las neuronas principales de proyección del giro dentado son conocidas como células granulares y también son excitatorias glutamatérgicas. Las células granulares se ubican ordenadamente con sus somas formando una capa denominada capa granular, en forma de “V” o “C”, según el tipo corte cerebral realizado. Estas neuronas son bipolares y ubican su árbol dendrítico hacia afuera de la capa granular, en la capa molecular. En cambio su árbol axonal se ubica en sentido opuesto, hacia adentro del giro dentado, en la región denominada hilus (Figura 1.2).

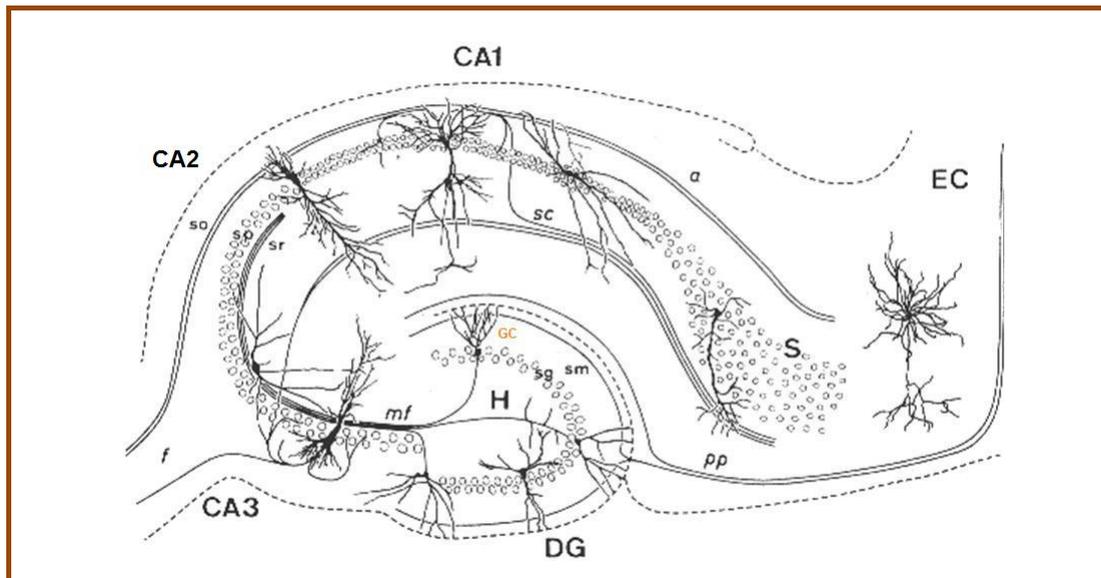


Figura 1.2: Esquema que representa la organización del hipocampo. Se quiere hacer hincapié en la estructura del giro dentado (DG), donde se detalla la ubicación de las células granulares (GC) en la capa granular (sg), con sus dendritas proyectadas hacia la capa molecular (sm) y su axón dirigido hacia el hilus (H). Abreviaturas restantes: EC: corteza entorrinal; mf: fibras musgosas; pp: vía perforante; S: subiculum; sc: colaterales de schaffer; so: stratum oriens; sr: stratum radiatum.

La principal aferencia del hipocampo proviene de la corteza entorrinal, cuyas neuronas excitatorias glutamatérgicas proyectan axones que descienden por la vía perforante hacia el hipocampo (Figura 1.3). Existen principalmente dos capas de la corteza entorrinal que proyectan hacia el hipocampo: la capa II, formada por las neuronas estelares espinosas que forman conexiones con el giro dentado y la región CA3; y la capa III, formada por neuronas piramidales cuyos axones contactan a las neuronas de la región CA1. La capa II puede ser dividida de acuerdo a su localización y función en medial (relacionada con la información espacial) y lateral (involucrada en la información no espacial) (Ferbinteanu J *et al.* 1999, Hafting T *et al.* 2005). Los axones provenientes de las dos regiones de la capa II se mantienen separados al descender por la vía perforante y hacen sinapsis directamente con las dendritas de las células granulares del giro dentado en diferentes porciones de la capa molecular: la región medial de la capa II contacta dendritas ubicadas en la porción medial de la capa molecular, mientras que la región lateral proyecta sus terminales sobre el tercio más externo de la capa molecular (Figura 1.3).

Las células granulares del giro dentado transmiten la información recibida desde la corteza a las neuronas piramidales de la región CA3 a través de sus axones denominados *mossy fibers* (fibras musgosas) (Figura 1.3). Dichos axones también contactan con interneuronas locales excitatorias (células musgosas o *mossy cells*)

localizadas en el hilus, quienes a su vez reinervan a las dendritas de las neuronas granulares a la altura de la capa molecular interna.

La región CA3 integra esta información con la que recibe directamente de la capa II de la corteza entorrinal. Los axones de las neuronas piramidales de CA3, denominados colaterales de Schaffer, contactan a las neuronas piramidales de CA1 pero también forman conexiones recurrentes con las propias neuronas piramidales de la región (Figura 1.3).

Por último, las neuronas de CA1 integran la información proveniente de CA3 con la que reciben directamente de la capa III de la corteza entorrinal y la retransmiten a dicha corteza a través del subiculum (Figura 1.3).

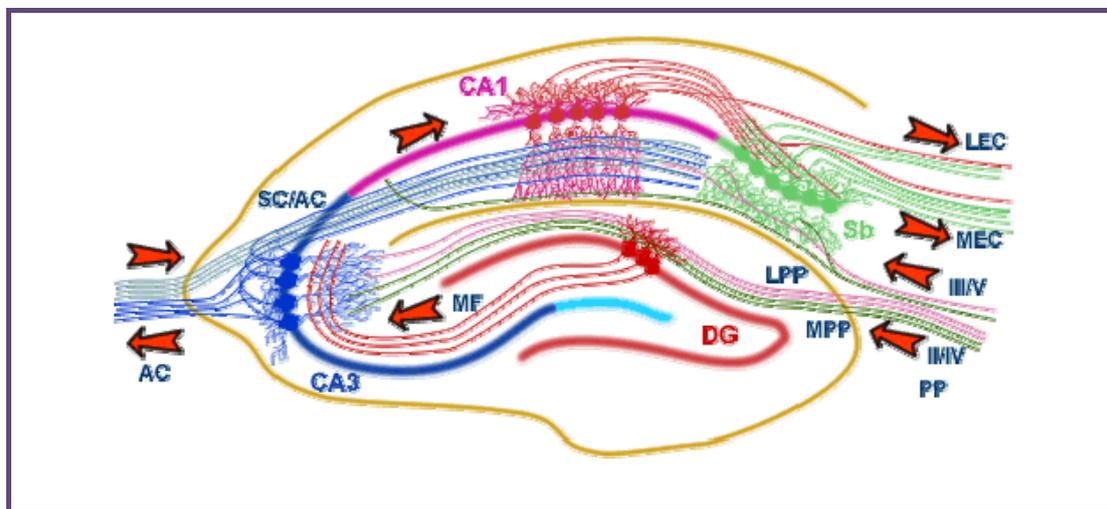


Figura 1.3: Esquema que representa la conectividad del hipocampo. La vía perforante (PP), principal aferencia del giro dentado (DG), proviene de la corteza entorrinal (EC). Los axones que provienen de la capa II de la EC lateral (LPP por lateral perforant path, color lila) conectan con las dendritas de la capa molecular externa del DG, mientras que los que provienen de la EC medial (MPP por medial perforant path, color verde) inervan la capa molecular intermedia. La capa II de la corteza entorrinal también proyecta en forma directa sobre CA3. Los axones de las células granulares (MF, mossy fibers, color rojo) contactan con las células piramidales de CA3. Estas a su vez proyectan sus axones (sc: schaffer collaterals, color azul) sobre las neuronas de CA1 del hipocampo ipsilateral, o del contralateral a través de las proyecciones comisurales (AC). Las neuronas de CA1 también reciben aferencias directas de la corteza entorrinal, y proyectan sus axones (color rojo) hacia el subiculum (Sb, color verde) que a su vez completa el loop enviando sus axones de vuelta a la corteza entorrinal.

El flujo de la información a través del hipocampo se encuentra controlado por una gran diversidad de interneuronas inhibitorias GABAérgicas que se clasifican en función de la localización de su inervación axonal (Figura 1.4) (Freund TF y Buzsáki G 1996; Freund TF y Katona I 2007). En particular en el giro dentado hay dos grande grupos de interneuronas: aquellas que inervan las dendritas de las neuronas granulares y que

controlarían el input, y las que proyectan sobre la región perisomática controlando y sincronizando el output poblacional (Cobb SR *et al.* 1995, Freund TF y Katona I 2007).

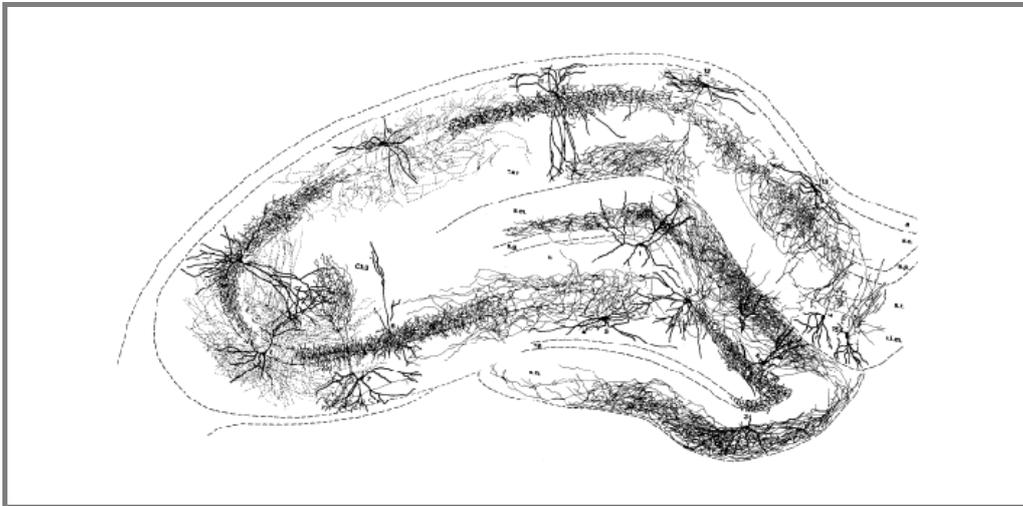


Figura 1.4: Superposición realizada a partir de dibujos de *camera lucida* de los diferentes tipos de interneuronas del giro dentado con el fin de mostrar la localización de sus somas y la distribución estratificada de sus proyecciones (Freund TF y Buzsáki G 1996).

El hipocampo también recibe información de diversas regiones subcorticales que cumplirían un rol modulador de su actividad. Entre ellas se destacan la innervación proveniente de la amígdala, del septum medial y la banda diagonal de Broca, del tálamo, del área tegmental ventral, de los núcleos de raphe, y de las proyecciones comisurales provenientes del hipocampo contralateral.

Por muchos años, el hipocampo fue considerado como una estructura relacionada con la emoción, al igual que el resto del sistema límbico. Uno de los primeros científicos en adjudicarle al hipocampo un rol en la memoria fue el ruso Vladimir Bekhterev, basado en observaciones de un paciente con problemas graves de memoria. Años más tarde, el paciente HM llamó la atención de los investigadores hacia la importancia del hipocampo en la formación de la memoria. El paciente HM fue sometido a una cirugía bilateral del área temporal, que abarcó la corteza cerebral, la amígdala y 2/3 del hipocampo, como tratamiento para su severa epilepsia. Sin embargo, luego de la cirugía, desarrolló una amnesia anterógrada total caracterizada por la incapacidad de generar nuevas memorias estables, y amnesia retrógrada parcial, especificada por la pérdida de las memorias pasadas cercanas a la cirugía (Scoville WB y Milner B 1957). Dicho paciente presentó una completa pérdida de la memoria de largo término sin ser afectada su memoria de corto término, su capacidad para aprender nuevas tareas, ni su inteligencia. Trabajos posteriores mostraron que

lesiones limitadas a la región del hipocampo también generan amnesia global (Zola-Morgan S y Squire LR 1986; Zola-Morgan S *et al.* 1986).

El estudio de estos pacientes permitió definir dos sistemas de memorias bien diferenciados: la memoria episódica, relacionada con el recuerdo de eventos, lugares, tiempo, y la memoria procedural que se desarrolla con la práctica de una actividad. Ambos tipos de memoria involucran diferentes áreas del cerebro: la memoria episódica de largo plazo involucra al hipocampo, siendo éste necesario para transferir la memoria luego de su consolidación a áreas corticales donde es almacenada permanentemente (Alvarez P y Squire LR 1994); la memoria de procesamiento, en cambio, involucra al estriado (Squire LR y Zola SM 1998).

Con el paso de los años emergió un nuevo rol del hipocampo a partir de los estudios pioneros de O'Keefe y Nadel (1978): la codificación espacial. Registros extracelulares de potenciales de acción *in vivo* han demostrado que ciertas neuronas principales del hipocampo tienen la capacidad de aumentar su tasa de disparo cuando el animal se encuentra en una posición espacial específica (O'Keefe J y Dostrovsky J 1971). Estas neuronas son denominadas "célula del lugar" (*place cells*), y son caracterizadas por tener campos receptivos (*place fields*) que dependen de la posición espacial del animal independientemente de la dirección del recorrido. Células con estas propiedades han sido descritas en las neuronas piramidales de CA3 y CA1 y en las neuronas granulares del giro dentado. Recientemente, también ha sido caracterizada la existencia de células del lugar en humanos (Ekstrom AD *et al.* 2003). La existencia de las células del lugar hace posible definir la posición de un animal con el solo estudio de su actividad, originando la idea de que el hipocampo podría funcionar como un mapa cognitivo capaz de representar de manera mental al espacio físico (Figura 1.5 A).

Actualmente, el modelo de mapa cognitivo está sometido a amplio debate. Un modelo alternativo, denominado "codificación nodal", define al hipocampo como un mapa cognitivo generado a partir de la representación de eventos temporalmente próximos en un determinado contexto espacial pero incluyendo también información no espacial (Figura 1.5 B,C) (Eichenbaum H *et al.* 1999, Smith DM y Mizumori SJ 2006). En este contexto las células de lugar previamente definidas por su activación ante una localización espacial determinada, estarían en cambio, respondiendo ante la vinculación de la localización actual con episodios previos ocurridos en igual lugar. Más aún, estas nuevas células de lugar también serían capaces de identificar episodios pasados y presentes que comparten eventos en común independientemente de la información espacial. Además, su relación con la capacidad de navegación

estaría dada por la memoria de lugares y caminos previamente transitados. Notablemente, este modelo logra una visión general del hipocampo, vinculándolo con la generación de memorias espaciales y no espaciales, unificando su rol funcional.

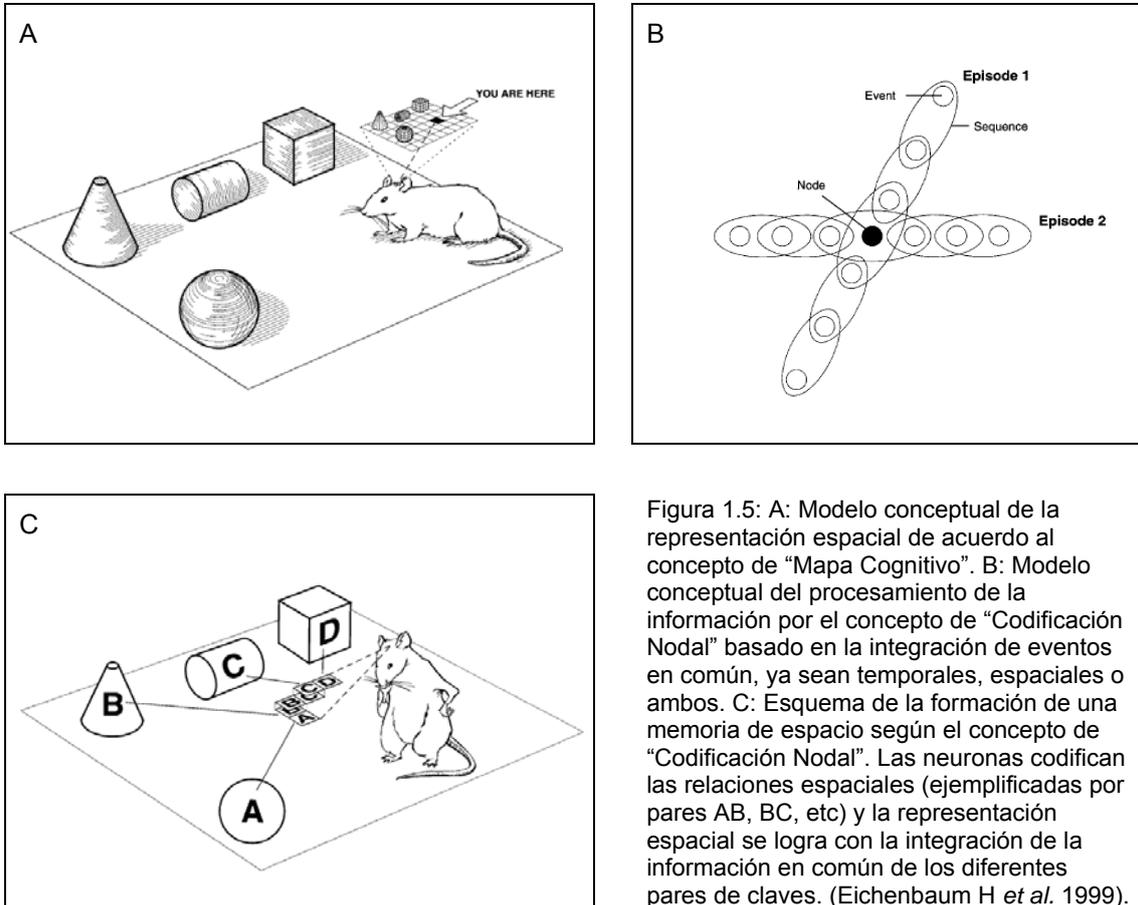


Figura 1.5: A: Modelo conceptual de la representación espacial de acuerdo al concepto de "Mapa Cognitivo". B: Modelo conceptual del procesamiento de la información por el concepto de "Codificación Nodal" basado en la integración de eventos en común, ya sean temporales, espaciales o ambos. C: Esquema de la formación de una memoria de espacio según el concepto de "Codificación Nodal". Las neuronas codifican las relaciones espaciales (ejemplificadas por pares AB, BC, etc) y la representación espacial se logra con la integración de la información en común de los diferentes pares de claves. (Eichenbaum H *et al.* 1999).

Desarrollo del Giro Dentado

El desarrollo del giro dentado es un proceso muy interesante porque está muy relacionado a la complejidad de su estructura. Si bien la mayoría de las regiones cerebrales se desarrollan durante periodos embrionarios específicos, el desarrollo del giro dentado, en cambio, comienza en el embrión y se prolonga hasta luego del nacimiento, continuando durante toda la vida del individuo. El conocimiento detallado del desarrollo de esta región en ratón y rata se lo debemos principalmente a los trabajos de Angevine, Schlessinger y colaboradores, y Altman y Bayer (Figura 1.6) (Angevine JB 1965, Schlessinger AR *et al.* 1975, Altman J y Bayer SA 1990).

La morfogénesis del giro dentado comienza a los 14 días de gestación (estadio embrionario E14) a partir de la migración de neuroblastos de la matriz dentada primaria para dar origen a la matriz dentada secundaria, localizada cerca del neuroepitelio adyacente a la fimbria (óvalo violeta, Figura 1.6 A). Luego, neuronas postmitóticas inmaduras y progenitores migran desde la matriz secundaria y se alinean para formar la capa externa del brazo superior o *upper blade* de la futura capa granular (línea violeta, Figura 1.6 A). Esta primera migración tangencial ocurre a finales del estadio embrionario (~E19).

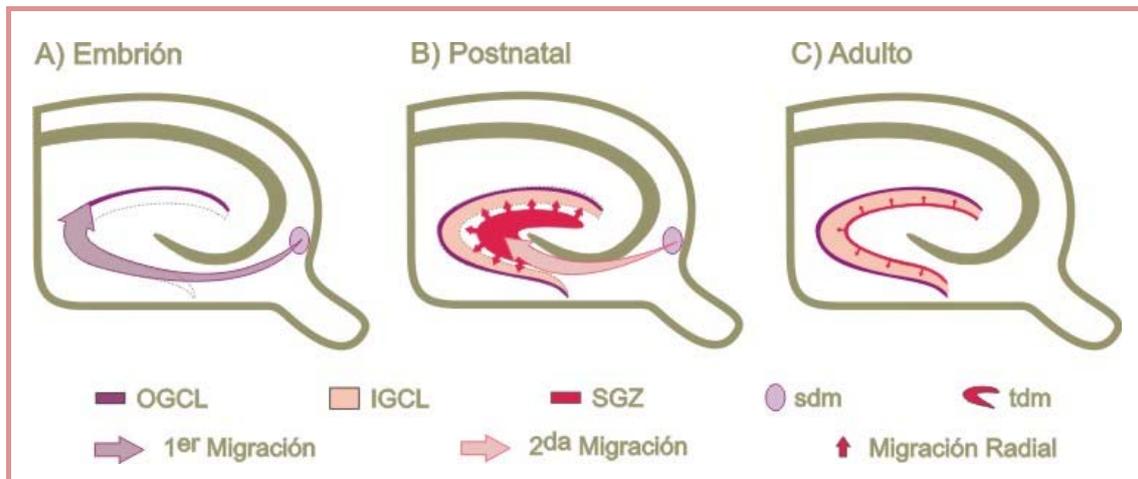


Figura 1.6: Esquema del desarrollo del giro dentado. OGCL: capa granular externa; IGCL: capa granular interna; SGZ: zona subgranular; sdm: matriz dentada secundaria; tdm: matriz dentada terciaria. Modificado de Piatti VC *et al.* 2006.

Luego del nacimiento, se genera una segunda ola de migración tangencial que da origen a la matriz dentada terciaria (ubicada en lo que será el hilus), y al brazo inferior o *lower blade* de la futura capa granular (Figura 1.6 B). Posteriormente, los progenitores de la matriz dentada terciaria migran radialmente para terminar de dar origen a la capa granular (porción rosa, Figura 1.6 B,C). Finalmente los progenitores neurales se ubican en la zona subgranular donde continuarán generando neuronas nuevas durante toda la vida del individuo (Kempermann G *et al.* 2003). La mayor proporción de neuronas granulares es generada en el periodo postnatal temprano al final de la primera semana postnatal, y decae en las semanas subsiguientes.

En conclusión, la combinación de las corrientes migratorias tangenciales y radiales genera un gradiente bidimensional de desarrollo neuronal en el que neuronas con diferentes estadios de desarrollo coexisten en un mismo tiempo en la capa granular. En particular, las neuronas localizadas en el *upper blade* de la capa granular son más

maduras que las del *lower blade* y también lo son las neuronas de la capa más externa respecto de la interna. Actualmente sabemos que este último gradiente se mantiene durante toda la vida del individuo debido al aporte continuo de neuronas nuevas por la neurogénesis adulta.

Es destacable que dentro del circuito hipocampal solo las neuronas granulares se desarrollan luego del nacimiento. Por ejemplo, el pico de neurogénesis de las interneuronas GABAérgicas del giro dentado ocurre a mediados del desarrollo embrionario, de manera tal que sus axones se encuentran bien desarrollados para el momento en que la mayoría de las neuronas granulares comienza a diferenciarse (Lubbers K *et al.* 1985, Lubbers K y Frotscher M 1988). Además, los axones de la corteza entorrinal medial y lateral, principal input excitatorio, arriban a la capa molecular del giro dentado a mediados de la primer semana postnatal (Fricke R y Cowan WM 1977) manteniendo desde el comienzo de su desarrollo la segregación espacial que los caracteriza.

Revisión histórica del descubrimiento de la neurogénesis adulta

Durante casi 100 años luego del establecimiento de la teoría neuronal por Ramón y Cajal, se mantuvo intacto el dogma que establece que la generación de neuronas está confinada al periodo de desarrollo. Dicho dogma se sustentaba en la complejidad de las conexiones del sistema nervioso que se creía incompatible con la integración de nuevas neuronas.

Los primeros estudios que postularon la generación de neuronas nuevas en animales adultos datan de la primera mitad del siglo XX (Hamilton A 1901; Sugita N 1918; Bryans WA 1959). La hipótesis de estos trabajos se basaba en la observación de células no diferenciadas o en mitosis, muchas de ellas ubicadas en la capa subependimal del ventrículo lateral. Sin embargo, la falta de herramientas para distinguir el fenotipo celular (neurona de glía) y estudiar el destino de estas células en el tiempo, provocó que dichos trabajos terminen siendo ignorados.

A mediados del siglo XX se desarrolló un nuevo método para marcar células en división, que se basa en la incorporación de timidina-³H en el DNA durante la fase S del ciclo celular. Esta marcación es transmitida a la progenie celular y puede ser visualizada mediante autoradiografía (Sidman *et al.* 1959). Esta técnica le permitió a Altman y colaboradores evidenciar la generación de neuronas nuevas en tres regiones del cerebro de ratas adultas: el giro dentado del hipocampo, el bulbo olfatorio y la

neocorteza (Altman J y Das GD1965, Altman J 1969). Sin embargo la falta de evidencias a favor de un rol funcional de la neurogénesis adulta puso en juicio la importancia del hallazgo. Una década después Kaplan y Hinds demostraron que las neuronas nacidas en el giro dentado y en el bulbo olfatorio de ratas adultas son capaces de sobrevivir por lo menos un mes (Kaplan MS y Hinds JW 1977). Con el paso de los años más evidencias se fueron acumulando en contra del dogma establecido. Realizando microscopía electrónica de neuronas maduras del hipocampo (20 días después de la marcación con Timidina-³H) se logró demostrar que las neuronas nacidas en un individuo adulto reciben sinapsis sobre su soma y dendritas (Kaplan MS y Bell DH1983) y extienden proyecciones axonales (Stalfield BB y Trice JE 1988). Mientras tanto, fue descrita la generación de neuronas en el centro vocal superior (HVC, high vocal center) de canarios adultos, donde se pudo demostrar su rol funcional en el aprendizaje del canto (Goldman SA y Nottebohm F1983, Paton JA y Nottebohm FN 1984). Sin bien los aportes del grupo de Nottebohm fueron aceptados por la comunidad científica, se los consideró como una especialización evolutiva en el cerebro de las aves, irrelevante para las funciones cerebrales de mamíferos y primates. En paralelo, la descripción de la existencia de neurogénesis adulta en primates parecía dar un nuevo paso en contra del dogma, (Kaplan MS 1983) pero la rotunda oposición a este hallazgo por otros científicos volvió a fortalecer el paradigma tradicional (Rakic P 1985). Años más tarde, el descubrimiento de progenitores neurales aislados de tejido cerebral adulto capaces de diferenciarse a neurona en cultivo vuelve a abrir el debate en contra del dogma (Reynolds BA y Weiss S 2002; Richards LJ *et al.* 1992; Lois C y Alvarez-Buylla A 1993).

Un nuevo desarrollo tecnológico permitiría el redescubrimiento de la neurogénesis en mamíferos. La revolucionaria técnica permitió la identificación de células en división basándose en la incorporación de un análogo sintético de la timidina, denominado bromodeoxiuridina (BrdU), que se incorpora en la fase S del ciclo celular y es heredado por las células hijas, aunque su marca se diluye luego de múltiples rondas de división celular (Gratzner HG 1982). La ventaja particular de este método es que la marcación con BrdU puede ser detectada mediante inmunohistoquímica permitiendo la identificación del tipo celular por la coexpresión de otros marcadores celulares. Gage y colaboradores fueron los primeros en confirmar mediante esta técnica la generación de neuronas nuevas en el giro dentado de ratas y ratones adultos (Kuhn HG *et al.* 1996, Kempermann G *et al.* 1997). Posteriormente, la existencia de neurogénesis en el giro dentado de primates adultos también fue reafirmada (Gould E *et al.* 1998, Kornack DR y Rakic P 1999). Sin embargo, el hallazgo de neurogénesis en la neocorteza de

roedores adultos no pudo ser repetido en condiciones fisiológicas, sino únicamente bajo la inducción localizada de apoptosis celular (Magavi SS *et al.* 2000). El revolucionario hallazgo de neuronas nuevas en el giro dentado de muestras humanas (Eriksson PS *et al.* 1998) sentó las bases para la aceptación general de la existencia e importancia de la neurogénesis adulta.

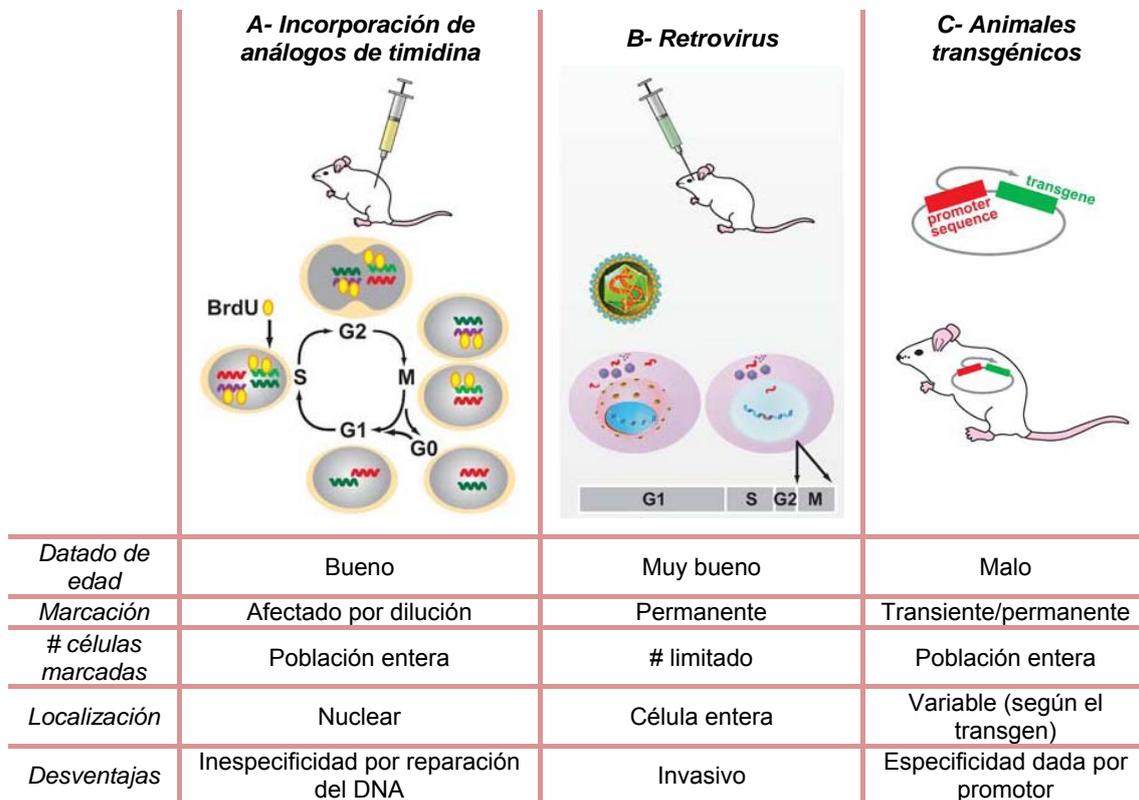


Figura 1.7 Metodologías para la identificación de neuronas nuevas en ratones adultos. Adaptado de Ming GL y Song H 2005.

Sin bien el desarrollo de la marcación con BrdU permitió un notable avance en el campo de la neurogénesis, este progreso se encontraba restringido al estudio en tejido fijado. A comienzos del nuevo milenio el desarrollo de dos nuevas herramientas permitió la identificación de neuronas nuevas en tejido vivo. Una de ellas se basa en la utilización de un retrovirus (capaz de integrarse únicamente en el genoma de células en división) cuyo genoma es modificado para expresar de manera constitutiva una proteína fluorescente (Sanes JR *et al.* 1986, Price J *et al.* 1987, van Praag H *et al.* 2002). Este método es invasivo ya que requiere que el retrovirus sea inyectado en la región del cerebro en estudio, pero tiene como ventajas que no sólo permite la visualización morfológica en tejido vivo de las neuronas nuevas sino que también es posible conocer la edad de dicha neurona. El segundo método se basa en la generación de líneas de animales transgénicos en las que un promotor específico de

neuronas nuevas es utilizado para expresar la proteína fluorescente verde (GFP) (Yamaguchi M *et al.* 2000, Overstreet LS *et al.* 2004). Las ventajas y desventajas de los tres métodos son resumidas en la Figura 1.7.

En la actualidad la generación de neuronas nuevas en individuos adultos está ampliamente aceptada desde crustáceos (Harzsch S y Dawirs RR 1996), hasta vertebrados superiores incluyendo pájaros, roedores, primates y humanos. Sin embargo, es destacable que el número de áreas cerebrales que posee regeneración en el animal adulto decrece con el aumento de la complejidad de su sistema nervioso (Lledo PM *et al.* 2006). En condiciones fisiológicas la neurogénesis adulta de mamíferos está confinada a dos regiones del cerebro: la zona subventricular del ventrículo lateral que da origen a neuronas que se incorporan al circuito del bulbo olfatorio, y la zona subgranular del giro dentado del hipocampo.

La revisión histórica del estudio de la neurogénesis adulta evidencia el progresivo cambio en el paradigma de la neurociencia a partir del cual la plasticidad no es solo una propiedad del sistema nervioso sino una característica esencial para su correcto funcionamiento, incluyendo en el concepto de plasticidad a la neurogénesis adulta.

Capítulo I

2.1 Introducción

Neurogénesis en el giro dentado adulto

En la actualidad la comunidad científica acepta que el giro dentado es una de las pocas regiones del cerebro de mamíferos en los que el proceso de neurogénesis continúa aún en la adultez. En esta región la células granulares son originadas a partir de células progenitoras localizadas en la zona subgranular, definida como la región ubicada entre el hilus y la capa granular. Dichas células progenitoras son denominadas neurales porque son capaces de proliferar y luego diferenciarse en astrocitos, oligodendrocitos o neuronas (Gage FH 2000; Zhao C *et al.* 2008).

Los niveles basales de neurogénesis en el giro dentado adulto producen un número significativo de neuronas nuevas, alcanzando ~4500 células por día en ratas jóvenes (Cameron HA y McKay RD 2001). Esto genera una tasa basal de neurogénesis mensual de ~3-6% respecto de la población total de neuronas granulares (Cameron HA y McKay RD 2001; Tashiro A *et al.* 2007). Sin embargo, un alto porcentaje de las neuronas generadas (50 – 75 %) muere antes de llegar a la madurez (Biebl M *et al.* 2000; Dayer AG *et al.* 2003; Kempermann G *et al.* 2003).

Uno de los principales hallazgos que avala la existencia de un rol funcional de la neurogénesis adulta es la capacidad de regulación de la proliferación y/o sobrevivencia neuronal por estímulos fisiológicos. Por ejemplo, la actividad física voluntaria es capaz de aumentar la proliferación celular generando finalmente un mayor número de neuronas nuevas (van Praag H *et al.* 1999, Brown J *et al.* 2003; Kronenberg G *et al.* 2003); también el ambiente enriquecido puede aumentar la cantidad de neuronas nuevas a través de un aumento en la proliferación de los progenitores y la sobrevivencia neuronal (Kempermann G *et al.* 1997; Kempermann G *et al.* 1998; van Praag H *et al.* 2000, Brown J *et al.* 2003; Tashiro A *et al.* 2007; Kronenberg G *et al.* 2003). Además, el aprendizaje dependiente de hipocampo específicamente puede aumentar o disminuir la sobrevivencia neuronal dependiendo del tipo de paradigma utilizado y de la edad de las células en cuestión (Gould E *et al.* 1999; Döbrössy MD *et al.* 2003; Leuner B *et al.* 2004; Olariu A *et al.* 2005; Dupret D *et al.* 2007; Epp JR *et al.* 2007). En cambio, la tasa de generación de neuronas nuevas es disminuida durante el envejecimiento (Kempermann G *et al.* 1998; Morgenstern NA *et al.* en prensa), en situaciones de estrés (revisado por Mirescu C y Gould E 2006), aislamiento (Lu L *et al.* 2003) y depresión (Duman RS 2004). Por último, ciertas condiciones patológicas como la presencia de convulsiones o la isquemia también son capaces de incrementar el número de neuronas nuevas en el giro dentado adulto (Parent JM y Lowenstein DH 2002; Kokaia Z y Lindvall O 2003).

En resumen, todos estos trabajos demuestran que la experiencia puede regular el proceso de neurogénesis de manera muy compleja a pesar de que hasta el presente los mecanismos de modulación distan de estar claros.

Rol funcional de la neurogénesis adulta

Es notable que luego de dos décadas del redescubrimiento de la neurogénesis adulta su significancia fisiológica en el cerebro de mamíferos aún no haya sido esclarecida. Dada la aceptada función hipocampal en los procesos de memoria y aprendizaje, se han dedicado grandes esfuerzos para dilucidar el rol de la neurogénesis en dichos procesos.

Como un primer paso en esta dirección algunos laboratorios buscaron correlacionar la tasa de neurogénesis con la performance en tareas dependientes de hipocampo. Entre ellos, el trabajo de van Praag y colaboradores demostró que el aumento de la neurogénesis inducido por el ejercicio genera un aumento en la amplitud de la potenciación de largo término (LTP) y una mejora en el aprendizaje espacial (van Praag H *et al.* 1999). Recíprocamente, la inducción de LTP aumenta la cantidad de neuronas generadas (Bruehl-Jungerman E *et al.* 2006). También fue demostrado que el incremento del número de neuronas nuevas por un ambiente enriquecido produce una mejor performance en paradigmas de aprendizaje dependientes de hipocampo (Nilsson M *et al.* 1999). Un estudio posterior evidenció que la disminución en la neurogénesis como consecuencia de la edad se encuentra correlacionada con un déficit en el desempeño de tareas espaciales (Drapeau E *et al.* 2003). Además, diferencias intrínsecas en la tasa de neurogénesis entre diversas cepas de ratones correlacionan positivamente con la adquisición de la memoria espacial (Kempermann G y Gage FH 2002).

En búsqueda de un camino más directo hacia la función de la neurogénesis varios estudios han intentado manipular la tasa de generación de neuronas con el fin de estudiar las alteraciones comportamentales generadas en consecuencia. Estos estudios utilizaron farmacología (inhibidores de la proliferación), irradiación con rayos X o estrategias genéticas para eliminar a las células en división y así bloquear la generación de neuronas nuevas en el giro dentado adulto. En el trabajo pionero de Shors y colaboradores, la utilización de una droga que bloquea la división celular (MAM) logró una reducción sustancial en los niveles de neurogénesis, resultando en el impedimento de la adquisición de ciertos tipos de memoria dependientes de

hipocampo (Shors TJ *et al.* 2001; Shors TJ *et al.* 2002). En cambio, trabajos posteriores utilizando la misma droga o irradiación describieron como único efecto la incapacidad de evocación de la memoria a largo término (Bruehl-Jungerman E *et al.* 2005; Snyder JS *et al.* 2005). Otros trabajos mostraron que el bloqueo de la neurogénesis adulta puede disminuir, no afectar o aún mejorar el aprendizaje dependiendo del tipo de paradigma comportamental utilizado (Saxe MD *et al.* 2006; Saxe MD *et al.* 2007). Finalmente, en un estudio reciente se desarrolló una nueva estrategia para abolir la neurogénesis de manera específica que consiste en la generación de un ratón transgénico que sobreexpresa una proteína proapoptótica de manera inducible en los progenitores neurales (Dupret D *et al.* 2008). Este trabajo demostró que la neurogénesis adulta es necesaria para la adquisición de memorias espaciales complejas que dependen del aprendizaje de relaciones entre claves espaciales, mientras que memorias simples de reconocimiento del espacio no fueron afectadas.

Por lo tanto, a pesar de la falta de comprensión de los mecanismos específicos, los experimentos de correlación y los controversiales resultados de la manipulación de la neurogénesis coinciden en que la generación de neuronas nuevas es necesaria para ciertos tipos de aprendizajes dependientes de hipocampo. Las variaciones observadas entre resultados de diversos laboratorios podrían deberse a las diferentes especies o cepas de animales utilizados, diferencias entre los protocolos de aprendizaje, o efectos secundarios adversos de las técnicas utilizadas. Más aún, dada la diferente conectividad del hipocampo en su eje dorso-ventral es posible que las neuronas nuevas cumplan funciones distintas de acuerdo a la región donde se integran.

Para comprender el rol específico de la neurogénesis en el procesamiento de la información por el hipocampo es necesario caracterizar las propiedades fisiológicas de las neuronas nuevas. Al comienzo de la presente tesis, el desarrollo de la técnica de marcado retroviral había hecho posible la demostración de que las neuronas de un mes de edad nacidas en el giro dentado adulto se integran al circuito hipocampal ya que presentan actividad espontánea y son capaces de responder a la estimulación extracelular de axones aferentes (van Praag H *et al.* 2002). Además, dichas neuronas poseen una morfología característica de célula granular madura. Posteriormente, la expresión de proteínas derivadas de los genes de respuesta inmediata (immediate early genes, IEGs) por las neuronas BrdU⁺ como consecuencia del aprendizaje espacial o la inducción de convulsiones, fortaleció la demostración de la integración funcional de las neuronas nuevas (Jessberger S y Kempermann G 2003). Sin embargo, no fue hasta hace poco que el estudio de la conectividad eferente confirmó

la capacidad de las neuronas nuevas de transmitir la información hacia los siguientes eslabones del circuito hipocampal (Toni N *et al.* en prensa).

Habiendo sido demostrada la capacidad de las neuronas nuevas de integrarse al circuito del hipocampo, la búsqueda de su rol funcional abre dos grandes posibilidades: 1) la neurogénesis representa la adición de unidades funcionales nuevas con propiedades similares a las ya existentes; 2) el aporte fundamental de la neurogénesis radica en el agregado de unidades con propiedades únicas, originando la existencia de subpoblaciones con funciones diferentes. En este último caso, las neuronas nuevas podrían presentar propiedades diferenciales una vez maduras o bien, las características intrínsecas del proceso de desarrollo podrían contribuir a la generación transitoria de neuronas con propiedades exclusivas. Si bien el desarrollo neuronal en el giro dentado adulto no se encontraba estudiado al inicio de esta tesis, la caracterización del proceso de neurogénesis durante el desarrollo embrionario y postnatal temprano estaba bien esclarecida.

Neurogénesis en el desarrollo perinatal

A pesar que el desarrollo del giro dentado comienza en el embrión, la mayoría de las neuronas granulares (~80%) son generadas hacia el final de la primera semana postnatal (Angevine JB 1965; Schlessinger AR *et al.* 1975, Altman J y Bayer SA 1990). Esto genera una situación en la cual neuronas con diferentes estadios de madurez coexisten en el giro dentado en desarrollo. Estudios electrofisiológicos en esta población heterogénea de neuronas granulares determinaron que la resistencia de membrana puede ser utilizada como parámetro para identificar el grado de madurez neuronal (Liu YB *et al.* 1996; Liu X *et al.* 2000). En particular, las neuronas con alta resistencia de membrana (>1000 M Ω) poseen un potencial de reposo despolarizado y un potencial de acción de baja amplitud y larga duración, mientras que su árbol dendrítico esta poco desarrollado. En cambio, las neuronas con baja resistencia (<350 M Ω) poseen características opuestas, en concordancia con estudios realizados en otras regiones del cerebro en desarrollo (Spigelman I *et al.* 1992).

Notablemente, las neuronas granulares están rodeadas por interneuronas GABAérgicas bien desarrolladas (Lubbers K y Frostcher M 1988) mientras que los axones glutamatérgicos de la corteza entorrinal comienzan a penetrar en la capa molecular a mediados de la primer semana postnatal (Fricke R y Cowan WM 1977). Esto hace posible la división de las neuronas granulares en desarrollo según su

conectividad, pudiéndose identificar cuatro grandes grupos de neuronas: 1) sin aferencia sináptica; 2) con inervación GABAérgica exclusivamente; 3) con conectividad GABAérgica y una pequeña respuesta mediada por NMDA; 4) con respuestas evocadas mediadas por la activación de receptores AMPA y NMDA junto con la aferencia GABAérgica, siendo éstas las únicas neuronas con características maduras de resistencia de membrana y potencial de reposo (Figura 2.1) (Liu YB *et al.* 1996; Hollrigel GS y Soltesz I 1997; Liu YB *et al.* 1998; Ye GL *et al.* 2000; Ye GL *et al.* 2005). Interesantemente, esta secuencia de sinaptogénesis es similar a la descrita en neuronas piramidales e interneuronas GABAérgicas de CA1 durante el desarrollo temprano (Tyzio R *et al.* 1999; Hennou S *et al.* 2002).

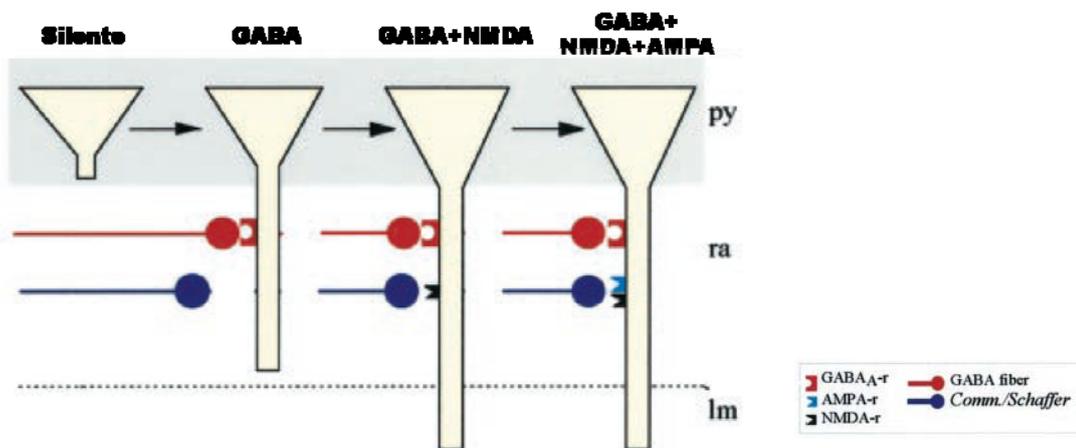


Figura 2.1 Esquema de la secuencia de desarrollo de la conectividad en neuronas piramidales durante el desarrollo hipocámpal (adaptado de Tyzio R *et al.* 1999). py: capa piramidal; ra: stratum radiatum; lm: stratum lacunosum moleculare.

Si bien los terminales GABAérgicos son los primeros en inervar las células granulares en desarrollo, las propiedades de estas conexiones cambian significativamente durante la maduración neuronal. Durante las dos primeras semanas de desarrollo la cinética de las corrientes GABAérgicas es lenta y su potencial de reversión es despolarizado mientras que a partir de la tercera semana la cinética se acelera y el potencial de reversión se hiperpolariza, volviéndose semejante al de neuronas granulares maduras (Zhang L *et al.* 1991; Hollrigel GS y Soltesz I 1997; Hollrigel GS *et al.* 1998). Estudios anatómicos indican que la inervación GABAérgica sobre las neuronas granulares inmaduras se localiza principalmente sobre las dendritas (Lübbers K y Frotscher M 1988) sugiriendo que cambios en la localización de la aferencia GABAérgica podrían ser responsables de las variaciones en las propiedades cinéticas durante el desarrollo neuronal.

En el caso en que las neuronas granulares generadas en el adulto siguieran un patrón similar de maduración que las neuronas en el desarrollo temprano, las propiedades intrínsecas y de conectividad de las neuronas inmaduras les permitirían cumplir un rol fisiológico único como parte de la función hipocampal. Sin embargo, las enormes diferencias circuitales entre el desarrollo y el adulto brindan condiciones ambientales muy diferentes que muy posiblemente podrían modificar el proceso de desarrollo neuronal. Durante el desarrollo temprano, no solo los progenitores neurales continúan proliferando, diferenciándose y migrando, sino que la principal actividad del circuito se caracteriza por la presencia de grandes olas de despolarización sincrónica GABAérgica, que desaparecen luego de la segunda semana postnatal (Leinekugel X *et al.* 1998; Leinekugel X *et al.* 2002; Garaschuk O *et al.* 1998; Ben-Ari Y 2001; Overstreet-Wadiche LS *et al.* 2006). Anatómicamente, la estructura laminar típica del giro dentado no se encuentra definida totalmente y aún las bien desarrolladas interneuronas GABAérgicas continúan migrando hacia su localización final (Dupuy-Davies S y Houser CR 1999; Morozov YM y Freund TF 2003).

Por lo tanto, la caracterización del proceso de desarrollo neuronal en el giro dentado adulto es de fundamental importancia para comprender el rol de la neurogénesis en la función hipocampal, así como los mecanismos que subyacen a la incorporación de nuevas neuronas en circuitos ya existentes del cerebro adulto.

Objetivos

Al inicio de la presente tesis la existencia de la neurogénesis en el giro dentado adulto se encontraba ampliamente aceptada por la comunidad científica, gracias a la demostración de la existencia de neuronas nuevas mediante la incorporación de análogos de timidina y la marcación retroviral.

Más aún, la integración funcional de las neuronas nacidas en el giro dentado adulto y la regulación fisiológica del proceso de neurogénesis validaban la hipótesis de su rol funcional como parte de la actividad del circuito hipocampal. A favor de esta hipótesis, estudios de correlación y de ablación de la neurogénesis permitían postular un rol fundamental de este proceso en el aprendizaje espacial dependiente de hipocampo.

Cabe preguntarse entonces cuál es el mecanismo específico a través del cual las neuronas nuevas contribuirían a la función del hipocampo. En el caso más simple, la incorporación de neuronas idénticas a un circuito preestablecido implica un grado de plasticidad adicional a los ya descritos mecanismos de plasticidad sináptica. Sin embargo, las características del proceso de neurogénesis durante el desarrollo temprano del giro dentado permitían postular la existencia de estadios de maduración neuronal intermedia con propiedades únicas, que ampliarían el rango de funciones posibles para la neurogénesis adulta.

Por lo tanto, el objetivo principal del primer capítulo de esta tesis es caracterizar el desarrollo neuronal en el giro dentado adulto. La descripción de estadios de desarrollo neuronal intermedio permitirá, además, la demostración definitiva de la generación de neuronas en el giro dentado adulto.

Finalmente, la existencia en el cerebro adulto de mamíferos de dos regiones capaces de generar neuronas nuevas funcionales abre la posibilidad de su estudio en busca de factores regulatorios que permitan el desarrollo de terapias neuroregenerativas. En este contexto, la descripción del proceso de neurogénesis adulta y su comparación con la información existente sobre el desarrollo temprano es de fundamental importancia para la posterior búsqueda de los factores ambientales y genéticos que regulan el desarrollo neuronal.

Estrategia experimental

Con el fin de caracterizar el desarrollo neuronal en el giro dentado adulto nos propusimos estudiar las propiedades intrínsecas y la conectividad de las neuronas nuevas mediante estudios de electrofisiología en rebanadas de hipocampo. Para poder identificar a las neuronas nuevas en tejido vivo se utilizó un retrovirus que codifica a la proteína fluorescente verde (GFP) y es capaz de integrarse únicamente en el genoma de células en división (van Praag H *et al.* 2002). Dicho retrovirus fue inyectado en el giro dentado de ratones C57BL/6 de 6-7 semanas de edad mediante una inyección estereotáxica. La expresión de GFP permitió identificar inequívocamente a las neuronas nacidas en el giro dentado adulto en tejido vivo y fue posible estimar la edad neuronal de acuerdo al tiempo transcurrido después de la inyección (Figura 2.2).

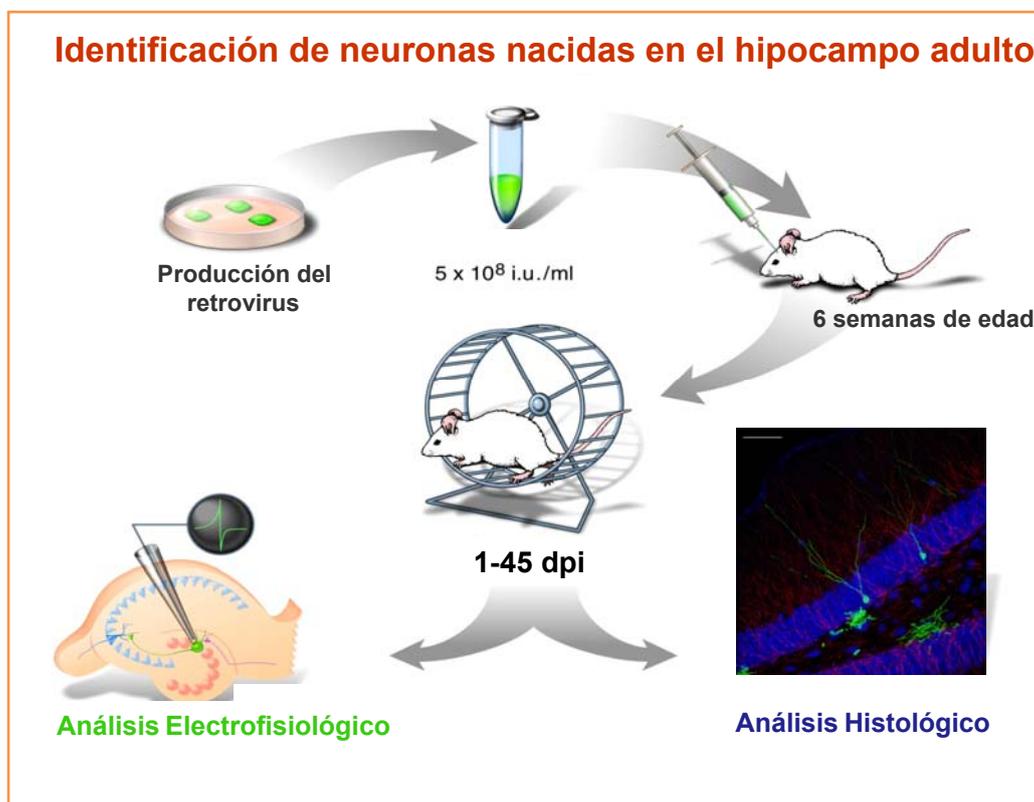


Figura 2.2. Esquema de la estrategia de marcado retroviral de neuronas nuevas del giro dentado adulto. El retrovirus que expresa GFP fue producido en células en cultivo y luego inyectado estereotáxicamente en el giro dentado de ratones adultos. Los ratones fueron mantenidos con ruedas giratorias para aumentar la tasa de neurogénesis. Luego de un tiempo variable se estudiaron las propiedades funcionales de las neuronas GFP⁺ mediante la técnica de patch clamp en configuración whole-cell. El estudio histológico de las neuronas nuevas fue realizado por Verónica Piatti y es parte de su tesis doctoral.

Los ratones fueron mantenidos en jaulas conteniendo ruedas giratorias hasta la realización de los experimentos, con el fin de aumentar la tasa de neurogénesis y de esta manera aumentar el número de células infectadas con el retrovirus (van Praag H

et al. 1999). Las propiedades electrofisiológicas de las neuronas GFP⁺ identificadas bajo microscopio de fluorescencia fueron medidas mediante la técnica de patch clamp en configuración whole-cell en secciones agudas de hipocampo de 300 μm de espesor. Con el fin de establecer el curso temporal del desarrollo funcional se midieron las propiedades eléctricas de neuronas GFP⁺ desde 1 a 45 días postinyección (dpi). Los valores obtenidos de las neuronas en desarrollo fueron comparados con las mediciones realizadas en neuronas maduras GFP⁻ localizadas en los dos tercios más externos de la capa granular.

Capítulo I

2.2 Resultados

Desarrollo funcional de las neuronas nacidas en el giro dentado adulto

Con el fin de describir el proceso de desarrollo neuronal en el giro dentado adulto se midieron las propiedades funcionales de neuronas GFP⁺ desde 1 a 45 días luego de la inyección.

Los progenitores neurales del giro dentado adulto son capaces de diferenciarse tanto en neurona como en astrocitos y oligodendrocitos (Gage FH 2000). Dado que el promotor que dirige la expresión de GFP es constitutivo, toda la progenie derivada de la célula progenitora neural expresará GFP. Durante la primera semana de desarrollo la morfología neuronal es muy diferente respecto de la conocida neurona granular madura. La falta de una caracterización morfológica del desarrollo neuronal al inicio de la tesis hizo necesario el establecimiento de un criterio funcional para identificar a las neuronas inmaduras en tejido vivo dentro de la población total de células GFP⁺. Por lo tanto se utilizó la capacidad de disparo de potenciales de acción como parámetro funcional del fenotipo neuronal. Sorprendentemente, la determinación neuronal es un proceso muy rápido ya que se encontraron células GFP⁺ excitables tan temprano como a 1 día luego de la inyección (ver más adelante, en Figura 2.6 B,C).

Una vez identificada la población neuronal se estudió el desarrollo de sus propiedades electrofisiológicas intrínsecas dado que estas determinan su capacidad de integrar la información recibida. En particular se midieron los siguientes parámetros: 1) la resistencia de membrana (R_m), que es función principalmente del número de canales de K⁺ abiertos en el reposo y determina el grado de despolarización generado por una corriente eléctrica; 2) la capacitancia de membrana (C_m), que es proporcional al área del soma y dendritas proximales y determina, junto con la resistencia, el tiempo de respuesta de la membrana; y 3) el potencial de reposo (V_r) que está determinado por las concentraciones iónicas y sus permeabilidades relativas (Figura 2.3).

Durante las primeras etapas del desarrollo las neuronas granulares inmaduras mostraron una baja capacitancia y una muy alta resistencia de membrana, indicando que poseen un pequeño tamaño y una baja expresión de canales de fuga. Estas propiedades intrínsecas son características de las neuronas inmaduras ya que también fueron reportadas durante el desarrollo embrionario y en la neurogénesis adulta del bulbo olfatorio (Spigelman I *et al.* 1992; Owens DF *et al.* 1996; Liu YB *et al.* 1996; Liu X *et al.* 2000; Carleton A *et al.* 2003; Zhang ZW 2004). En el transcurso del desarrollo neuronal se observó un progresivo aumento en la capacitancia y una disminución en la resistencia de membrana hasta alcanzar valores similares a los de neuronas granulares maduras recién a la sexta semana de edad (Figura 2.3).

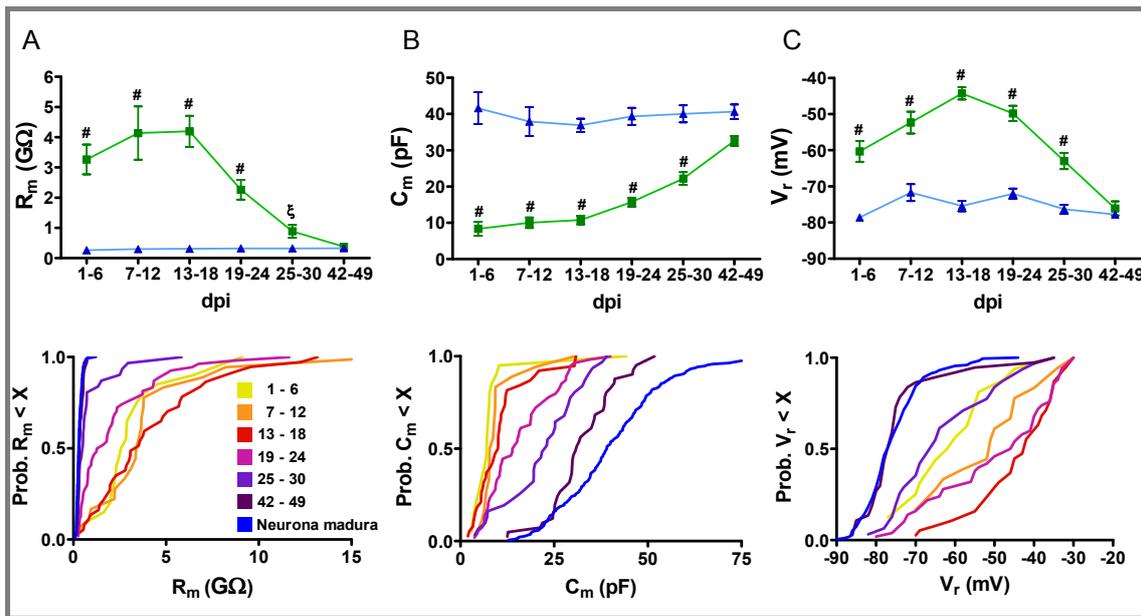


Figura 2.3 Desarrollo de las propiedades intrínsecas de membrana. Paneles superiores: resistencia de membrana (A), capacitancia de membrana (B) y potencial de reposo (C) de neuronas GFP⁺ (cuadrados verdes, n=198) o GFP⁻ (triángulos azules, n=187) en función del tiempo postinyección. Cada punto representa el promedio ± ES. Se comparó el valor de las neuronas GFP⁺ de cada edad con el valor promediado de todas las células GFP⁻ utilizando el test de Kruskal-Wallis seguido del post-test de Dunn's. ξ p<0.01, # p<0.001. Paneles inferiores: distribución acumulativa de los datos mostrados en los paneles superiores. En colores se identifican los distintos intervalos de edad neuronal. Los datos de las neuronas GFP⁻ fueron agrupados en una única curva (neurona madura).

El potencial de reposo de las neuronas inmaduras resultó ser más despolarizado que el de las neuronas GFP⁻ logrando valores maduros a la sexta semana de desarrollo (Figura 2.3 C). Sin embargo, es necesario notar que la medición del potencial de reposo por whole-cell en neuronas con alta resistencia de membrana presenta dificultades técnicas y su estimación resulta en valores más despolarizados que el valor real (Tyzio R *et al.* 2003). En cambio, mediciones realizadas en la configuración cell-attach han dado como resultado valores de potencial de reposo constantes a lo largo del desarrollo neuronal, aunque con un potencial de membrana estimado más despolarizado que el encontrado por nuestro grupo (Ge S *et al.* 2006).

Las propiedades pasivas registradas en células GFP⁺ sin capacidad de disparo de potenciales de acción fueron muy diferentes respecto al de las neuronas inmaduras, caracterizadas por una baja resistencia de membrana (mediana = 105 MΩ, rango: 12-9100 MΩ), una pequeña capacitancia (mediana = 8.8 pF, rango: 2.1-73.5 pF) y un potencial de reposo más hiperpolarizado (mediana = -71 mV, rango: -30 mV a -89 mV). La gran variabilidad encontrada en los valores medidos refleja la existencia de numerosos tipos celulares diferentes que pueden originarse a partir de los progenitores neurales del giro dentado adulto. Esta población podría incluir

progenitores no diferenciados, astrocitos y oligodendrocitos en desarrollo, glía radial, y neuronas inmaduras sin potenciales de acción. Estos tipos celulares no fueron incluidos en el análisis realizado en la presente tesis.

Además, se caracterizó el desarrollo de las propiedades activas de la población neuronal GFP⁺ ya que éstas determinan su capacidad de transmitir la información recibida a los siguientes eslabones del circuito hipocampal (Figura 2.4). En particular, se midió en voltage-clamp la amplitud de las corrientes de sodio y potasio activables por voltaje a partir del pico de la corriente entrante (I_{entrante}) y el valor en el estado estacionario de la corriente saliente (I_{saliente}) respectivamente (ver ejemplos en Figura 2.6 D, 2.9 D y 2.12 E). Las corrientes medidas reflejan la expresión funcional de los canales de Na⁺ y K⁺ dependientes de voltaje, los cuales determinan las propiedades de excitabilidad neuronal. Como medida del desarrollo de la excitabilidad se evaluó en current-clamp la amplitud pico de la primera espiga disparada.

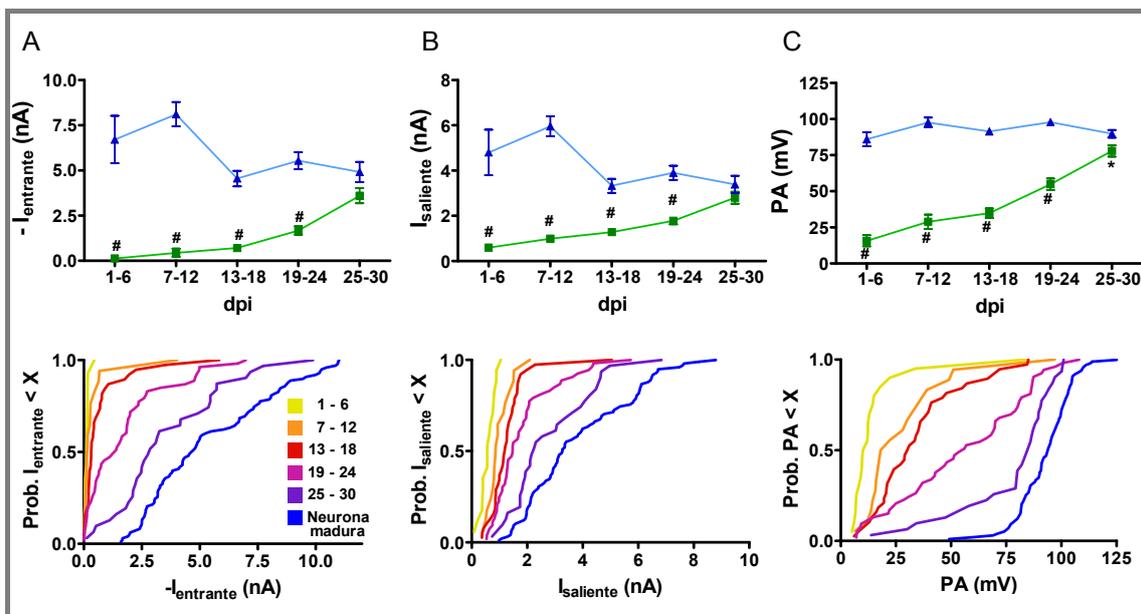


Figura 2.4 Desarrollo de las propiedades activas de membrana. Paneles superiores: pico de la corriente entrante de Na⁺ obtenido a -20 mV (A), valor promedio de la corriente saliente de K⁺ medida a 70 mV en el estado estacionario (B), amplitud pico del potencial de acción (C), en función del tiempo postinyección. Cada punto representa el promedio \pm ES. Se comparó el valor de las neuronas GFP⁺ (cuadrados verdes) de cada edad con el valor promediado de todas las células GFP⁻ (triángulos azules) utilizando el test de Kruskal-Wallis seguido del post-test de Dunns. *p<0.05, #p<0.001. Paneles inferiores: distribución acumulativa de los datos mostrados en los paneles superiores. En colores se identifican los distintos intervalos de edad neuronal. Los datos de las neuronas GFP⁻ fueron agrupados en una sola curva (Neurona madura).

A comienzos del desarrollo neuronal las corrientes de Na⁺ y K⁺ fueron de muy pequeña amplitud, aumentando progresivamente hasta alcanzar valores semejantes a los de neuronas granulares maduras a la cuarta semana de edad (Figura 2.4 A,B). La maduración de la amplitud de los potenciales de acción (PA) siguió un desarrollo

paralelo a las corrientes activables por voltaje (Figura 2.4 C). Sin embargo, la propiedad de disparo repetitivo se presentó recién a partir de los 18 días de edad (ver ejemplo en Figura 2.12 C).

Es llamativo el largo transcurso de maduración de las propiedades pasivas y activas de las neuronas nacidas en el giro dentado adulto. Esta característica podría brindarle a las neuronas inmaduras propiedades funcionales únicas de integración y transmisión sináptica. Sin embargo, para comprender la relevancia de dichas propiedades es necesario conocer el desarrollo de su conectividad.

Desarrollo de la conectividad de las neuronas nacidas en el giro dentado adulto

La conectividad aferente de las neuronas GFP⁺ fue evaluada midiendo las corrientes evocadas en respuesta a la estimulación extracelular de la capa granular, de manera tal de poder activar tanto axones glutamatérgicos como GABAérgicos. La naturaleza de las conexiones sinápticas fue determinada farmacológicamente utilizando ácido kinurénico 4 mM (kyn), antagonista de los receptores de glutamato AMPA y NMDA, o bicuculina 20 μM (BMI), antagonista de los receptores GABA_A.

En contraste con el desarrollo progresivo de las propiedades de membrana pasivas y activas, el desarrollo de la conectividad ocurre en etapas discretas que permiten determinar tres estadios de maduración neuronal:

- neuronas sin conexiones sinápticas aferentes o “silentes”
- neuronas con conectividad GABAérgica exclusivamente (se las denominará “GABA”)
- neuronas con aferencia GABAérgica y glutamatérgica (se las denominará “GABA+glu”)

Dada la homogeneidad en las propiedades intrínsecas de las neuronas pertenecientes a un estadio de conectividad dado, se tomó la decisión de agrupar a las neuronas de acuerdo a su aferencia, como se describe a continuación.

Neuronas sin conectividad aferente

Una neurona GFP⁺ fue considerada silente cuando no mostró corrientes postsinápticas (PSCs) en respuesta a una estimulación extracelular saturante (30 V) mientras que una neurona GFP⁻ adyacente sí lo hizo (Figura 2.5) (n = 42 células). Además, las neuronas silentes tampoco presentaron actividad sináptica espontánea (n = 7).

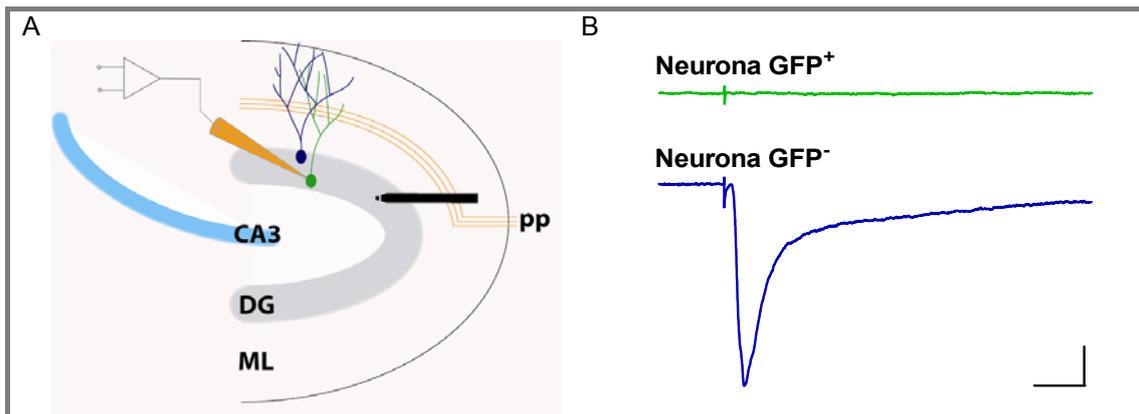


Figura 2.5 Ausencia de conectividad aferente en neuronas inmaduras GFP⁺. A: Esquema del diseño experimental. En verde se representa una neurona GFP⁺ siendo registrada, en azul se representa una neurona GFP⁻ adyacente que será registrada como control, en negro esta esquematizado el electrodo de estimulación, en gris se delinea la ubicación de la capa granular (DG). ML: capa molecular; pp: vía perforante. B: Trazo superior: Ausencia de respuesta a la estimulación extracelular de la capa granular de una neurona GFP⁺ de 7 días de edad (30 V, 50 μ s). Trazo inferior: Respuesta evocada ante el mismo estímulo en una neurona GFP⁻ vecina. Escalas: 20 ms, 50 pA.

La morfología de las neuronas silentes presentó características muy diferentes a las de una neurona granular madura, incluyendo la extensión de sus procesos de manera paralela a la capa granular (Figura 2.6 A). Es destacable que la mayoría de las neuronas silentes registradas tenían aproximadamente una semana de edad (Figura 2.6 B). Más aún, todas las neuronas estudiadas entre 1 y 7 días luego de la inyección no mostraron PSCs, demostrando que las neuronas más inmaduras no poseen conectividad aferente. Sin embargo, neuronas silentes fueron encontradas hasta la tercera semana de desarrollo. Posiblemente esto se deba a la diferenciación tardía de algunos progenitores neurales del giro dentado o quizás a una variabilidad intrínseca en el tiempo de desarrollo neuronal.

Respecto de las propiedades pasivas de membrana, las neuronas silentes mostraron una alta resistencia y una baja capacitancia (Tabla 2.1), consistente con su incipiente grado de madurez.

La excitabilidad de estas neuronas también se encontró poco desarrollada, ya que la inyección de corriente creciente en registros de current-clamp produjo una única espiga de poca amplitud y larga duración (Figura 2.6 C, Tabla 2.1).

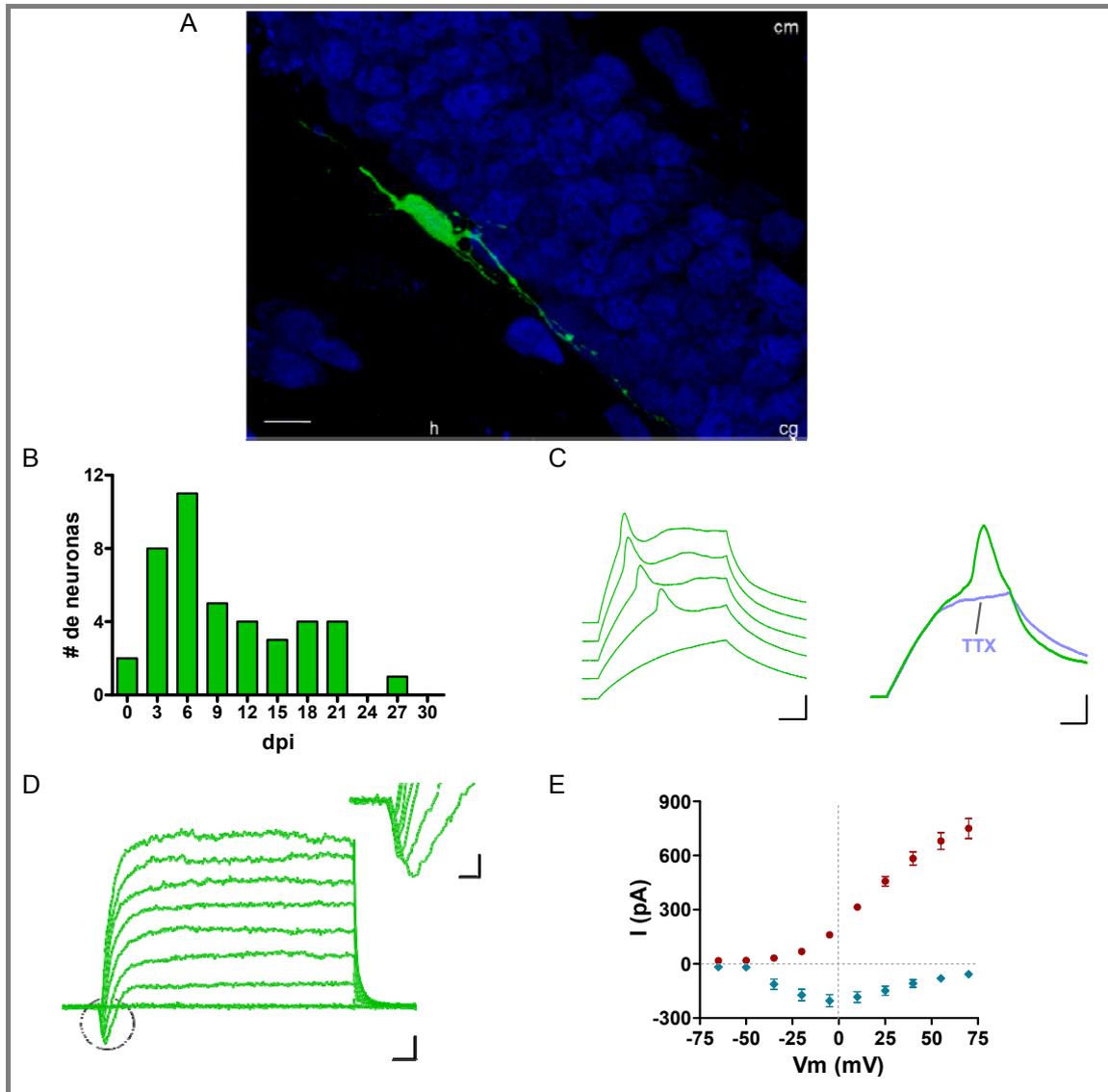


Figura 2.6 Propiedades de membrana de las neuronas silentes. A: Proyección en el eje Z de imágenes confocales de plano único de una neurona GFP⁺ de 7 dpi, adquirida por Verónica Piatti. En verde se muestra la expresión de GFP y en azul la expresión de NeuN, factor de transcripción de neuronas maduras. La capa densa de neuronas NeuN⁺ corresponde a la capa granular (cg). h: hilus, cm: capa molecular. Escala: 10 μ m. B: Distribución de las edades de las neuronas GFP⁺ con potenciales de acción y sin aferencia sináptica. C, izquierda: Ejemplo de potenciales de acción inducidos en respuesta a escalones despolarizantes crecientes (10 pA) en una neurona de 5 dpi. Escalas: 10 ms y 15 mV. Derecha: Ejemplo del bloqueo de potenciales de acción inmaduros por TTX 1 μ M (trazo celeste). Escalas: 10 ms y 10 mV. D: Ejemplo de las corrientes entrantes y salientes inducidas por 10 escalones sucesivos de despolarización creciente de a 15 mV en una neurona de 4 dpi. Escalas: 2.5 ms y 100 pA. Inset: Magnificación de la corriente entrante. Escalas: 0.5 ms y 50 pA. E: Curva de corriente en función del voltaje aplicado (I-V). Los rombos celestes corresponden al pico de la corriente entrante y lo círculos rojos a la corriente saliente en el estado estacionario. Se grafica el promedio \pm ES (n = 35 células).

Estos potenciales de acción inmaduros fueron bloqueados totalmente por la aplicación de tetrodotoxina (TTX, bloqueo = 101.0 ± 3.5 %, n = 7), demostrando estar

originados por canales de sodio activables por voltaje (Figura 2.6 C). De acuerdo con las propiedades de excitabilidad observadas, las corrientes inducidas por escalones de voltaje despolarizantes dieron como resultado una pequeña corriente entrante de Na⁺ y una corriente saliente de K⁺ comparativamente mayor, según se demuestra en las curvas corriente-voltaje (I-V; Figura 2.6 D,E). Por lo tanto, las propiedades de todos los parámetros medidos en las neuronas sin conectividad sináptica demuestran que las mismas poseen un bajo grado de madurez funcional.

	Silente	GABA	GABA + glu	Neurona GFP ⁻
Edad (dpi)¹	7	18	26	---
V_r (mV)	-50.6 ± 2.3 (37)	-45.6 ± 2.3 (24) *	-63.2 ± 2.8 (24) ***	-74.3 ± 0.7 (118)
C_m (pF)	6.4 ± 0.4 (42)	11.7 ± 1.2 (24) *	24.6 ± 1.4 (24) ***	38.8 ± 1.2 (126)
R_m (GΩ)	4.3 ± 0.5 (42)	2.9 ± 0.4 (24) **	0.62 ± 0.10 (24) **	0.31 ± 0.14 (126)
G_m/C_m (pS/pF)	65 ± 8 (42)	54 ± 8 (24) **	110 ± 19 (24)	111 ± 6 (126)
PA (mV)²	17.0 ± 1.7 (41)	43.8 ± 3.7 (23) **	83.5 ± 3.1 (24)	92.9 ± 1.2 (98)
I_{entrante} (nA)³	-0.17 ± 0.03 (36)	-1.04 ± 0.30 (24) ***	-4.2 ± 0.5 (23)	5.4 ± 0.3 (98)
I_{saliente} (nA)⁴	0.72 ± 0.05 (39) *	1.5 ± 0.2 (24) **	3.4 ± 0.3 (23)	3.8 ± 0.2 (98)

Tabla 2.1. Propiedades pasivas y activas de neuronas GFP⁺ agrupadas de acuerdo a su conectividad y de neuronas GFP⁻ registradas desde 1 a 29 dpi. ¹ Se indica la mediana de los valores de dpi. ² Amplitud pico del primer potencial de acción; ³ Pico de I_{Na} medido a -20 mV; ⁴ Pico de I_K medido a +70 mV. Promedio ± ES (# de células). Estadística: test de Kruskal-Wallis seguido por el test de Dunns.

La falta de respuesta sináptica evocada y espontánea en las neuronas inmaduras puede ser el resultado de la ausencia de terminales sinápticos funcionales o bien la falta de expresión de receptores a neurotransmisores. Con el fin de responder estas preguntas se registró la presencia de corrientes inducidas en respuesta a la aplicación localizada de los principales neurotransmisores del hipocampo, GABA y glutamato (Figura 2.7 A).

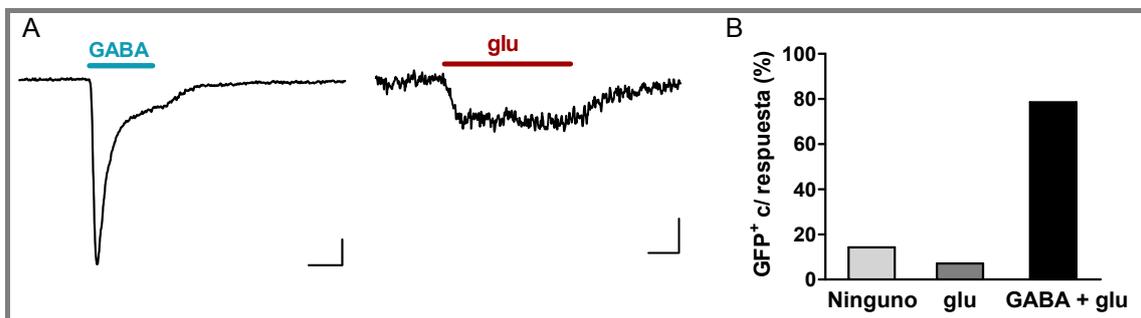


Figura 2.7 Expresión de receptores a neurotransmisores. A: Respuesta de una neurona de 4 dpi a la aplicación localizada de GABA 0.5 mM (izquierda) o glutamato 0.5 mM (derecha). Escalas: 5 ms, 25 pA (izquierda) o 5 pA (derecha). B: Porcentaje de neuronas GFP⁺ que respondieron a la aplicación de GABA y/o glutamato (n = 14 células).

La mayoría de las neuronas registradas presentó respuesta a ambos neurotransmisores, demostrando que la expresión de receptores funcionales antecede al desarrollo de la conectividad aferente (Figura 2.7 B). La corriente inducida por la

apertura de receptores de glutamato (amplitud pico = 12.12 ± 2.46 pA, $n = 11$) fue mucho menor que la corriente provocada por la aplicación de GABA (amplitud pico = 98.56 ± 24.54 pA, $n = 11$, $p < 0.01$, t-test). Teniendo en cuenta que en nuestras condiciones experimentales la fuerza impulsora de las corrientes de glutamato es mayor que la de GABA es posible pensar que las neuronas granulares silentes expresan mayor número de receptores ionotrópicos de GABA que de glutamato. La presencia temprana en el desarrollo neuronal de dichos receptores también fue demostrada en neuronas corticales y piramidales de CA1 en el embrión, y neuroblastos de la zona subventricular de animales adultos (LoTurco JJ *et al.* 1995; Tyzio R *et al.* 1999; Carleton A *et al.* 2003).

En conclusión, estos resultados demuestran que la expresión de receptores a neurotransmisores y el desarrollo de la excitabilidad son eventos tempranos en el proceso de desarrollo neuronal y ocurren previamente al establecimiento de conexiones sinápticas.

Desarrollo de la conectividad GABAérgica

En una subpoblación de neuronas inmaduras, la estimulación extracelular de la capa granular evocó una corriente entrante de cinética lenta que es insensible a la aplicación de kyn (bloqueo = $3.4 \pm 3.1\%$, $n = 11$) pero se bloquea completamente por BMI (bloqueo = $94.6 \pm 1.3\%$, $n = 10$, Figura 2.8 A,B). En cambio, la misma estimulación en neuronas GFP⁻ adyacentes indujo una respuesta mixta GABAérgica y glutamatérgica, demostrando que la estimulación extracelular fue capaz de activar terminales que liberan ambos neurotransmisores. Estas observaciones indicaron la existencia de neuronas inmaduras con conectividad GABAérgica exclusivamente.

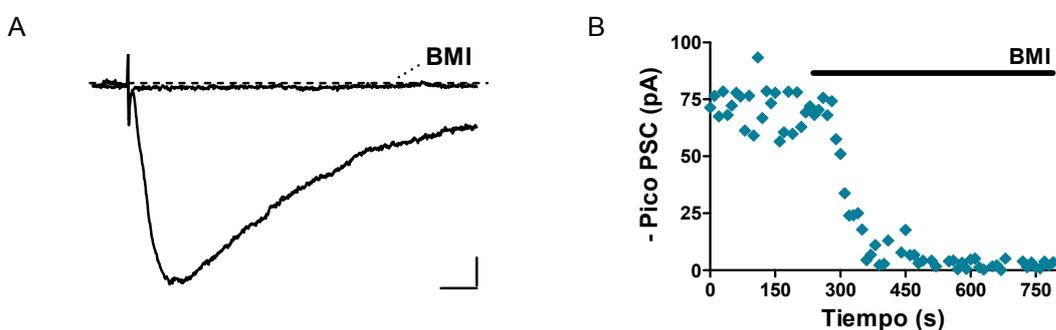


Figura 2.8 Conectividad GABAérgica en neuronas GFP⁺ de madurez intermedia. A: Corriente postsináptica GABAérgica de una neurona GFP⁺ de 22 dpi en respuesta a la estimulación extracelular de la capa granular (20 V, 0.1 Hz). La respuesta postsináptica es bloqueada completamente por BMI 20 μ M. Escalas: 15 ms, 10 pA. B: Pico de la corriente GABAérgica del registro mostrada en A antes y durante la aplicación de BMI (indicada por la barra horizontal).

Neuronas GFP⁺ con aferencia puramente GABAérgica fueron encontradas desde 8 dpi, aunque la mayoría de ellas fueron halladas luego de la segunda semana de desarrollo (Figura 2.9 B). Estas neuronas presentaron una morfología más madura que la de neuronas silentes, caracterizada por la proyección de las dendritas hacia la capa molecular (Figura 2.9 A).

Las neuronas inmaduras con conectividad GABAérgica mostraron una menor resistencia de membrana que las neuronas silentes y una mayor capacitancia de membrana (Tabla 2.1). La disminución en la resistencia puede deberse únicamente al incremento en la superficie neuronal o también a un aumento de la densidad de canales de fuga en la membrana. Por lo tanto, la densidad de estos canales fue calculada relativizando la conductancia de membrana en función de la capacitancia (G_m/C_m) (Tabla 2.1). Dado que no se observaron diferencias en la densidad calculada entre las neuronas silentes y las neuronas con PSCs GABAérgicas, los cambios en las propiedades intrínsecas de membrana indican solamente un aumento en el tamaño neuronal, en concordancia con las observaciones morfológicas.

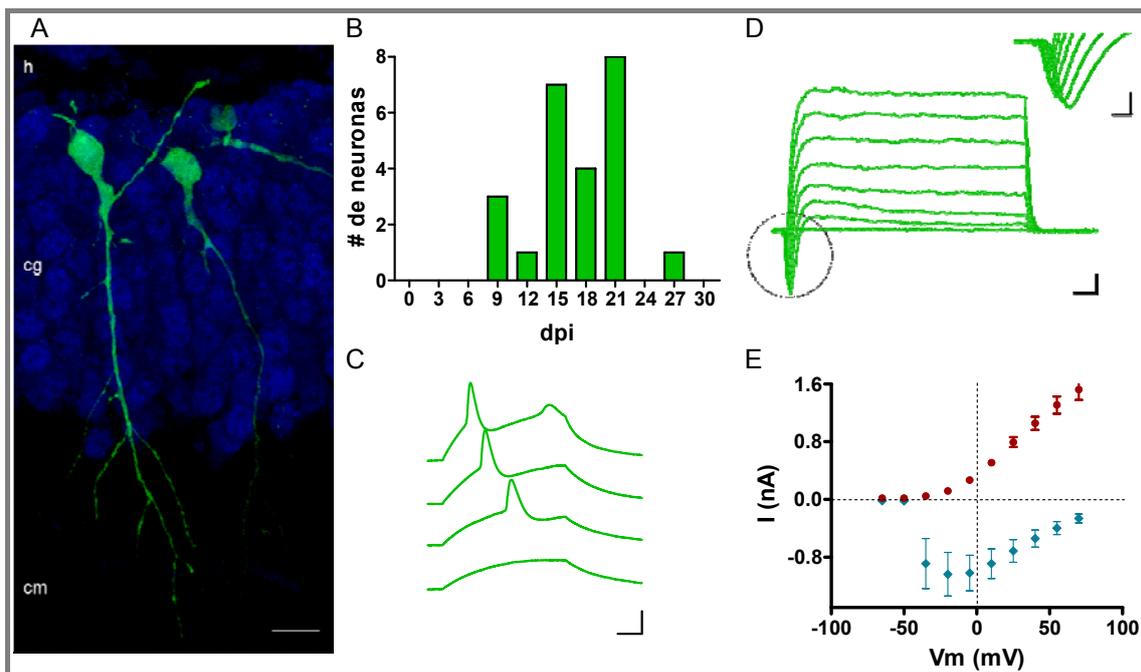


Figura 2.9 Propiedades de membrana de las neuronas con aferencia GABAérgica. A: Proyección en el eje Z de imágenes confocales de plano único de dos neuronas GFP⁺ (verde) de 14 dpi adquiridas por Verónica Piatti. En azul se muestra la expresión de NeuN por las neuronas de la capa granular (cg). h: hilus, cm: capa molecular. Escala: 10 μ m. B: Distribución de las edades de las neuronas GFP⁺ que solo poseen aferencia GABAérgica. C: Ejemplo de potenciales de acción inducidos en respuesta a escalones despolarizantes crecientes (10 pA) en una neurona de 20 dpi. Escalas: 10 ms y 25 mV. D: Ejemplo de las corrientes entrantes y salientes inducidas por 10 escalones sucesivos de despolarización creciente de a 15 mV en una neurona de 19 dpi. Escalas: 2.5 ms y 200 pA. Inset: Magnificación de la corriente entrante. Escalas: 0.5 ms y 200 pA. E: Curva de corriente en función del voltaje aplicado (V_m). Los rombos celestes corresponden al pico de la corriente entrante y los círculos rojos a la corriente saliente en el estado estacionario. Se grafica el promedio \pm ES (n = 24 células).

Las propiedades activas de las neuronas con aferencia GABAérgica también demostraron un progresivo aumento en su madurez en comparación con las neuronas silentes, caracterizado por un aumento en la amplitud de las corrientes de Na⁺ y K⁺ activables por voltaje y una mayor amplitud de sus potenciales de acción (Figura 2.9 C-E, Tabla 2.1). Además, los experimentos realizados en current-clamp evidenciaron el desarrollo incipiente de la hiperpolarización posterior al disparo de espigas (AHP, amplitud pico = -6.1 ± 1.1 mV, n = 8). Sin embargo, los escalones de corriente despolarizante solo fueron capaces de inducir el disparo de algunos pocos potenciales de acción, sin alcanzar el típico patrón repetitivo de disparo de alta frecuencia de una neurona granular madura.

Las propiedades de la inervación GABAérgica en el hipocampo han sido estudiadas ampliamente, haciendo posible la descripción de dos tipos de respuestas postsinápticas, una con cinética rápida que se localiza en la región perisomática (soma y dendritas proximales), y otra caracterizada por corrientes lentas de origen dendrítico (Pearce RA 1993; Soltesz I *et al.* 1995; Banks MI *et al.* 1998). Estas diferencias en la cinética de las respuestas evocadas pueden atribuirse a la composición de las subunidades del receptor GABA_A (Pearce RA 1993; Soltesz I *et al.* 1995) y/o ser debidas al filtrado dendrítico electrotonico. Dado que los receptores GABA_A conducen principalmente Cl⁻ (Kaila K 1994), es posible distinguir entre ambas componentes en experimentos de whole-cell gracias al gradiente iónico generado entre el soma y el compartimento dendrítico. Dicho gradiente intracelular se genera debido a que las concentraciones iónicas del soma y las dendritas principales quedan determinadas por las concentraciones de la solución interna de la pipeta de patch, mientras que en las dendritas distales los transportadores de Cl⁻ son capaces de mantener la concentración de dicho ion en niveles fisiológicos (Pearce RA 1993; Jarolimek W *et al.* 1999; Khirug S *et al.* 2005). Este gradiente en la concentración de Cl⁻ se ve reflejado en una diferencia en el potencial de reversión de las corrientes GABAérgicas (E_{GABA}) localizadas en diferentes compartimentos celulares, de acuerdo a la ley de Nerst:

$$E_{GABA} \cong -\frac{RT}{F} \ln \frac{[Cl^{-}]_{out}}{[Cl^{-}]_{in}}$$

Por lo tanto, estudiando las propiedades cinéticas de las corrientes GABAérgicas y su potencial de reversión es posible deducir su localización subcelular.

La estimulación extracelular de las neuronas GFP⁺ con aferencia GABAérgica exclusivamente generó una corriente postsináptica de una única componente de

cinética lenta (Figura 2.10 A,C). La amplitud de la corriente medida sobre el pico del PSC para cada potencial de membrana (curva I-V) permite obtener el potencial de reversión de la corriente GABAérgica (Figura 2.10 B). El valor de E_{GABA} obtenido, corregido por el potencial de juntura del electrodo (11 mV), fue semejante al potencial de equilibrio de cloro calculado para nuestras condiciones experimentales de whole-cell ($E_{Cl} = -36$ mV). Esto podría significar que las conexiones GABAérgicas son originadas en o cerca del soma, donde la concentración de Cl^- es impuesta por la solución de la pipeta de patch. Sin embargo, la cinética lenta de las corrientes registradas permite proponer una hipótesis alternativa en la que los terminales GABAérgicos harían sinapsis sobre las dendritas de las neuronas inmaduras, las cuales tendrían un E_{GABA} despolarizado debido a la mayor concentración de Cl^- respecto de las neuronas maduras, como ha sido descrito durante la maduración neuronal en neuronas piramidales del hipocampo en desarrollo (Rivera C *et al.* 1999).

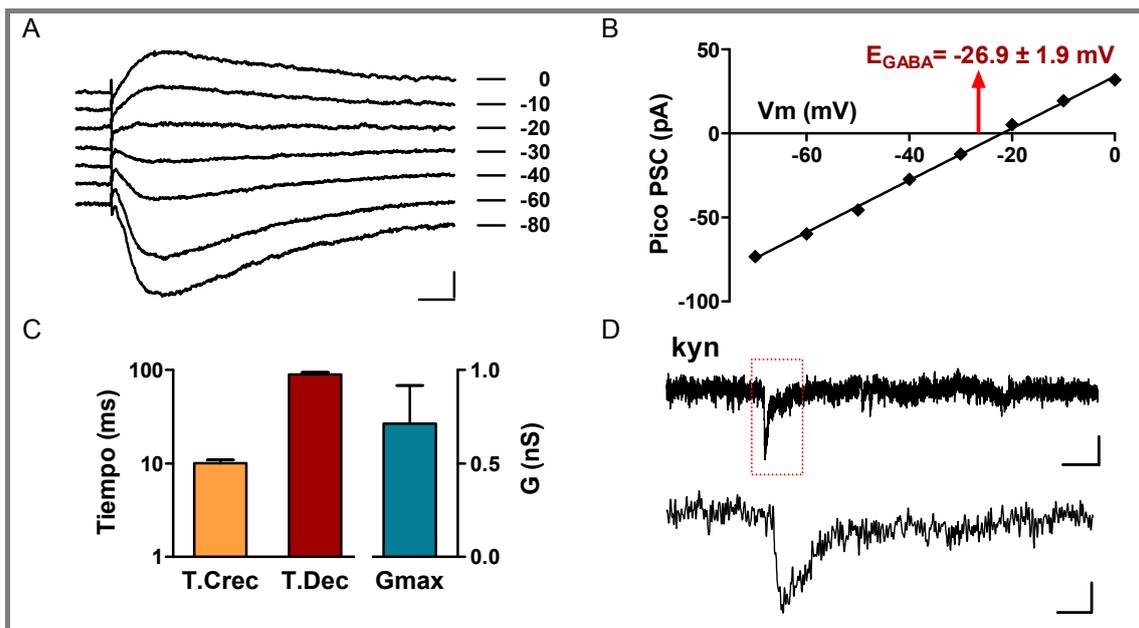


Figura 2.10 Propiedades de la aferencia GABAérgica. A: Ejemplo de la corriente GABAérgica evocada registrada en una neurona de 22 dpi a diferentes potenciales de membrana (señalados a la derecha). Escalas: 15 ms, 20 pA. B: Gráfico I-V obtenido de la curva mostrada en A. La flecha roja señala el promedio \pm ES de E_{GABA} ($n = 10$ células). C: Tiempo de crecimiento (T.Crec), tiempo de decaimiento (T.Dec) ($n = 24$ células) y conductancia máxima ($n = 10$ células) de la corriente GABAérgica evocada. Se muestra el promedio \pm ES. D: Corrientes GABAérgicas espontáneas, insensibles al ácido kinurénico 4mM, registradas en una neurona de 25 dpi. El trazo inferior es una magnificación de la región recuadrada en el trazo superior. Escalas superiores: 200 ms, 3 pA. Escala inferiores: 20 ms, 2 pA.

La localización de la invasión GABAérgica es de gran importancia ya que la inhibición somática y dendrítica es ejercida por diferentes tipo de interneuronas y tendrían un rol particular en la función neuronal: mientras que la aferencia dendrítica regularía la capacidad de integración de las neuronas granulares, las conexiones

somáticas controlarían la generación de potenciales de acción, es decir su output (Freund TF y Buzsaki G 1996; Miles R *et al.* 1996).

Los experimentos de estimulación extracelular permiten estudiar principalmente las propiedades de los aferentes ubicados en las cercanías del electrodo de estimulación, por lo que están sesgados a la ubicación donde se decide colocar el electrodo. Un análisis más completo de la inervación GABAérgica puede ser logrado midiendo las propiedades de la actividad espontánea originada por el disparo de potenciales de acción en la rodaja o por la fusión espontánea de vesículas en los terminales. La presencia de actividad espontánea GABAérgica insensible a la aplicación de kyn (Figura 2.10 D) pero bloqueada completamente por BMI en estas neuronas GFP⁺, demostró nuevamente la existencia de aferencia GABAérgica funcional. Sin embargo, la baja frecuencia de los eventos espontáneos (0.05 ± 0.02 Hz, n = 6) evidenció el bajo grado de desarrollo de la conectividad GABAérgica alcanzada por las neuronas inmaduras (frecuencia de PSCs en neuronas maduras = 0.23 ± 0.07 Hz, n = 10). Por último, el prolongado tiempo de crecimiento y decaimiento de las corrientes espontáneas (12.1 ± 2.5 ms y 34 ± 6.8 ms, respectivamente) fue consistente con la cinética descrita para las respuestas evocadas (Figura 2.15 A).

En conclusión, las neuronas con aferencia exclusivamente GABAérgica presentaron un grado de madurez intermedio, caracterizado por una alta resistencia de membrana que les permitiría responder con grandes variaciones de potencial ante las señales eléctricas ambientales. Sin embargo, la incapacidad de disparar potenciales de acción repetidamente indicó que su excitabilidad no se encuentra desarrollada completamente. Por último, estos resultados demuestran que las primeras conexiones sinápticas formadas sobre las neuronas granulares del giro dentado adulto provienen de interneuronas GABAérgicas y se localizarían sobre las dendritas distales. Este hallazgo es consistente con lo descrito en las neuronas piramidales y granulares durante el desarrollo embrionario y postnatal temprano (Tyzio R *et al.* 1999; Khazipov R *et al.* 2001; Gozlan H y Ben Ari Y 2003).

Inicio de la conectividad glutamatérgica

La existencia de neuronas GFP⁺ con aferencia GABAérgica y glutamatérgica fue demostrada a través del bloqueo parcial de la estimulación extracelular tanto por la aplicación de kyn (bloqueo = 53.7 ± 5.3 %, n = 15) como de BMI (bloqueo = 33.5 ± 4.9 %, n = 8) (Figura 2.11).

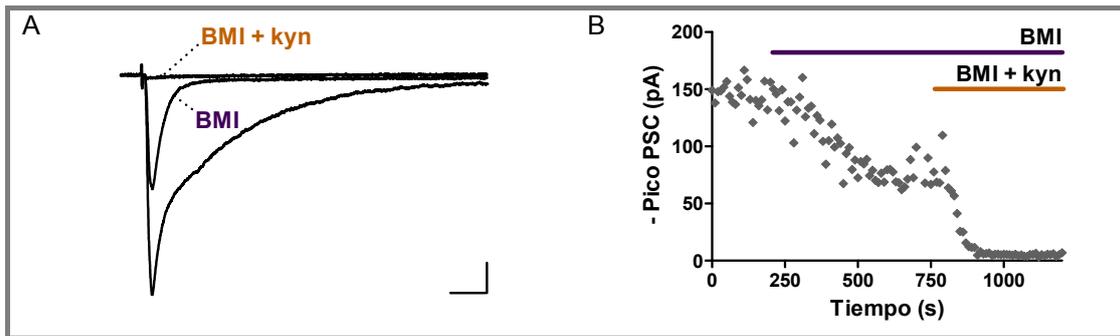


Figura 2.11 Aferencia GABAérgica y glutamatérgica en neuronas GFP⁺ maduras. A: Corriente postsináptica evocada en una neurona GFP⁺ de 28 dpi en respuesta a la estimulación extracelular de la capa granular (20 V, 0.1 Hz). La respuesta postsináptica es bloqueada completamente por BMI (20 μ M) + kyn (4mM). Escalas: 25 ms, 20 pA. B: Amplitud pico de la corriente evocada de la neurona mostrada en A antes y durante la aplicación de los antagonistas indicados (barras horizontales).

Las primeras neuronas con conectividad glutamatérgica fueron detectadas a los 18 dpi (Figura 2.12 B). Notablemente, solo una de un total de 90 células estudiadas mostró respuesta evocada glutamatérgica exclusivamente, demostrando la invasión tardía de dichos aferentes sobre las neuronas granulares nacidas en el giro dentado adulto. Hacia la cuarta semana de desarrollo, la mayoría de las neuronas GFP⁺ recibieron aferentes sinápticos glutamatérgicos y GABAérgicos. La morfología de estas neuronas presentó características maduras, incluyendo un árbol dendrítico complejo que se extiende hasta el final de la capa molecular, caracterizado por la presencia de espinas, correlato morfológico de la aferencia excitatoria (Figura 2.12 A).

Las propiedades pasivas del grupo neuronal con aferencia GABAérgica y glutamatérgica exhibieron el mayor grado de madurez con respecto a los grupos anteriormente descritos (Tabla 2.1). En particular se observó una significativa reducción en la resistencia de membrana y una duplicación del valor de capacitancia. Dado que la densidad de la conductancia de membrana también se vio aumentada, es posible afirmar que no sólo se incrementó el tamaño neuronal sino que también hubo un aumento significativo en la expresión de canales de fuga. Sin embargo, las propiedades intrínsecas de estas neuronas no llegaron a alcanzar valores semejantes a los de neuronas granulares maduras (Tabla 2.1). Posiblemente esto se deba a la existencia de neuronas con diferente grado de madurez dentro del grupo con aferencia GABA + glu. Pero además, las propiedades pasivas de las neuronas nuevas agrupadas por edad mostraron valores semejantes a los de neuronas GFP⁻ recién a la sexta semana de desarrollo (Figura 2.3 A-B), evidenciando que son las características neuronales que más tardan en madurar.

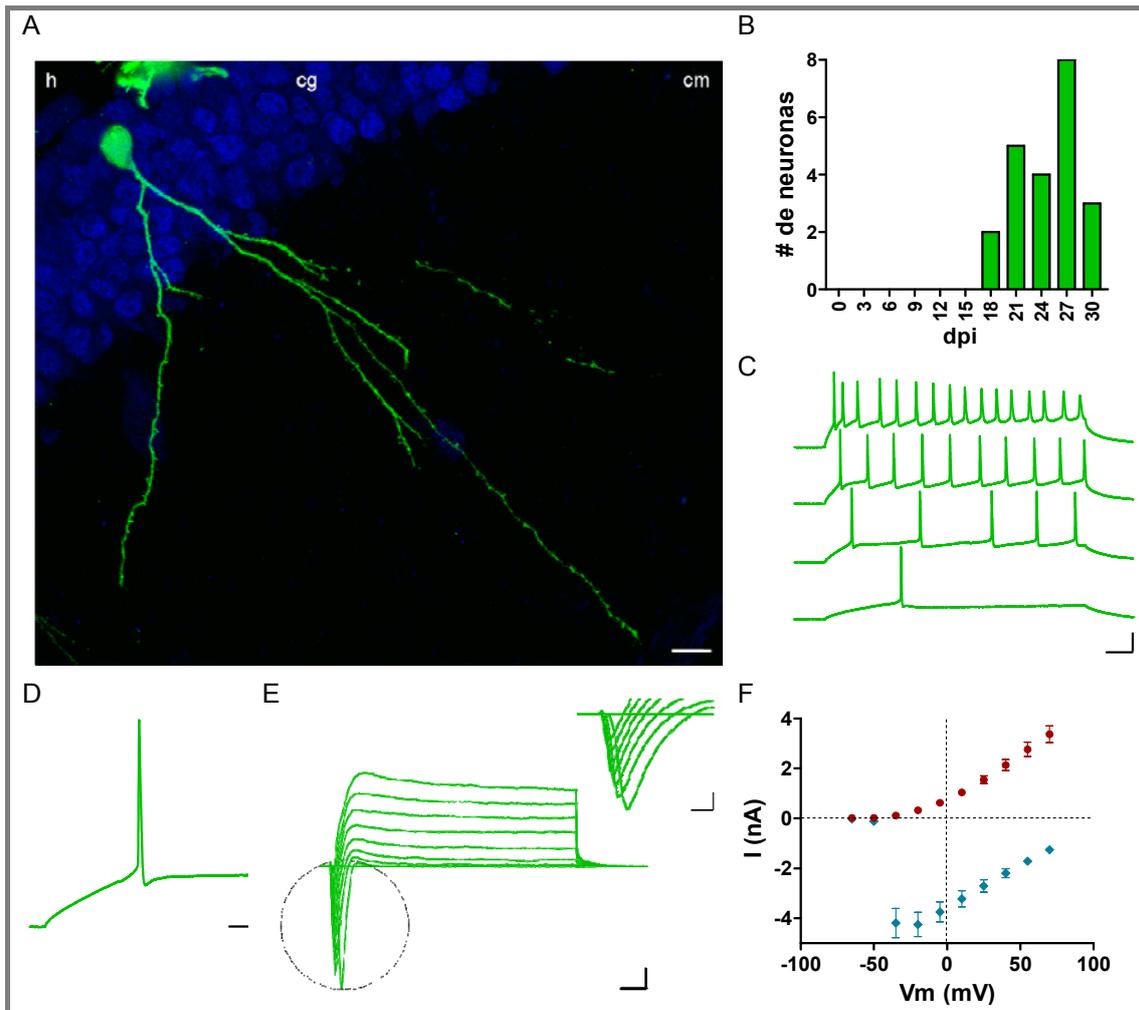


Figura 2.12 Propiedades de membrana de las neuronas con aferencia GABAérgica y glutamatérgica. A: Proyección de imágenes confocales de una neuronas GFP⁺ (verde) de 28 dpi, adquirida por Verónica Piatti. La expresión de NeuN (azul) señala la ubicación de la capa granular (cg). h: hilus, cm: capa molecular. Escala: 10 μ m. B: Distribución de las edades de las neuronas GFP⁺ con aferencia GABAérgica y glutamatérgica. C: Potenciales de acción en respuesta a escalones despolarizantes (20, 40, 50 y 100 pA) en una neurona de 18 dpi. Escalas: 50 ms y 30 mV. D: Magnificación de la primera espiga del segundo trazo mostrado en C. Escalas: 15 ms, 15 mV. E: Ejemplo de las corrientes entrantes y salientes en una neurona de 18 dpi. Escalas: 3 ms y 1 nA. Inset: Magnificación de la corriente entrante. Escalas: 0.5 ms y 1 nA. F: Curva I-V correspondiente al pico de la corriente entrante (rombos celestes) o a la corriente saliente en el estado estacionario (círculos rojos). Se grafica el promedio \pm ES (n = 23 células).

En cambio, las corrientes de sodio y potasio de las neuronas con conectividad GABAérgica y glutamatérgica no presentaron diferencias significativas con respecto a las neuronas granulares maduras y fueron significativamente mayores que las de neuronas con aferencia GABAérgica únicamente (Figura 2.12 E,F, Tabla 2.1). El aumento en la amplitud de las corrientes activables por voltaje se vio reflejado en un incremento en la amplitud de los potenciales de acción, alcanzando valores similares a los de neuronas GFP⁻ (Tabla 2.1). Es destacable que todas las neuronas pertenecientes a este grupo presentaron una excitabilidad madura, caracterizada por el disparo repetitivo de potenciales de acción y la presencia de adaptación a altas

frecuencias (Figura 2.12 C,D). Dado que durante el AHP los canales de sodio activables por voltaje se recuperan de su inactivación, es posible que el desarrollo de las propiedades del AHP esté relacionado con la madurez en la excitabilidad. Sin embargo, la amplitud del AHP en las neuronas GABA+glu (amplitud pico = -5.8 ± 0.7 pA, n = 8) fue similar al de las neuronas con conectividad GABAérgica ($p > 0.05$) y significativamente menor al de las neuronas maduras (amplitud pico = -10.3 ± 0.9 pA, n = 8, $p < 0.01$, test de Bonferroni), sugiriendo la existencia de otros mecanismo responsables del disparo de espigas repetidas.

Por lo tanto, queda demostrado que las neuronas con conectividad GABAérgica y glutamatérgica presentaron el mayor grado de madurez, evidenciado a través de sus propiedades intrínsecas y de excitabilidad.

Con el fin de analizar el desarrollo de la conectividad glutamatérgica se midieron las propiedades de las PSCs en presencia de BMI (Figura 2.13 A,B). Los tiempos de crecimiento y decaimiento observados corresponden a la clásica transmisión glutamatérgica rápida y sus valores son similares a los de neuronas granulares maduras (tpo. crecimiento = 1.84 ± 0.08 ms, tpo. decaimiento = 11.68 ± 0.53 ms, n = 14, $p > 0.05$, t-test) indicando la ausencia de variaciones cinéticas durante el desarrollo. Sin embargo, la amplitud de estas corrientes fue significativamente menor que la de neuronas GFP⁻ (amplitud pico = -284 ± 33.9 pA, n = 15, $p < 0.001$, t-test), sugiriendo que si bien las propiedades cinéticas son maduras, habría un menor número de contactos sinápticos establecidos sobre las neuronas GFP⁺. En cambio, neuronas de 6 semanas de edad muestran una conectividad similar a las neuronas maduras demostrando que la diferencia observada es consecuencia del desarrollo neuronal incompleto y no una propiedad diferencial de las neuronas nacidas en el hipocampo adulto (Laplagne, Espósito *et al.* 2006, Laplagne DA *et al.* 2007). Notablemente, todas las neuronas con aferencia glutamatérgica exhibieron conectividad GABAérgica, demostrando que el desarrollo de la innervación GABAérgica antecede a la glutamatérgica (Figura 2.16 A).

La conectividad GABAérgica de neuronas GABA+glu fue estudiada mediante la caracterización de las corrientes evocadas a diferentes potenciales de membrana en presencia de kyn. Este protocolo evidenció la existencia de dos componentes de la corriente GABAérgica, una con cinética rápida y otra lenta (Figura 2.13 C,D).

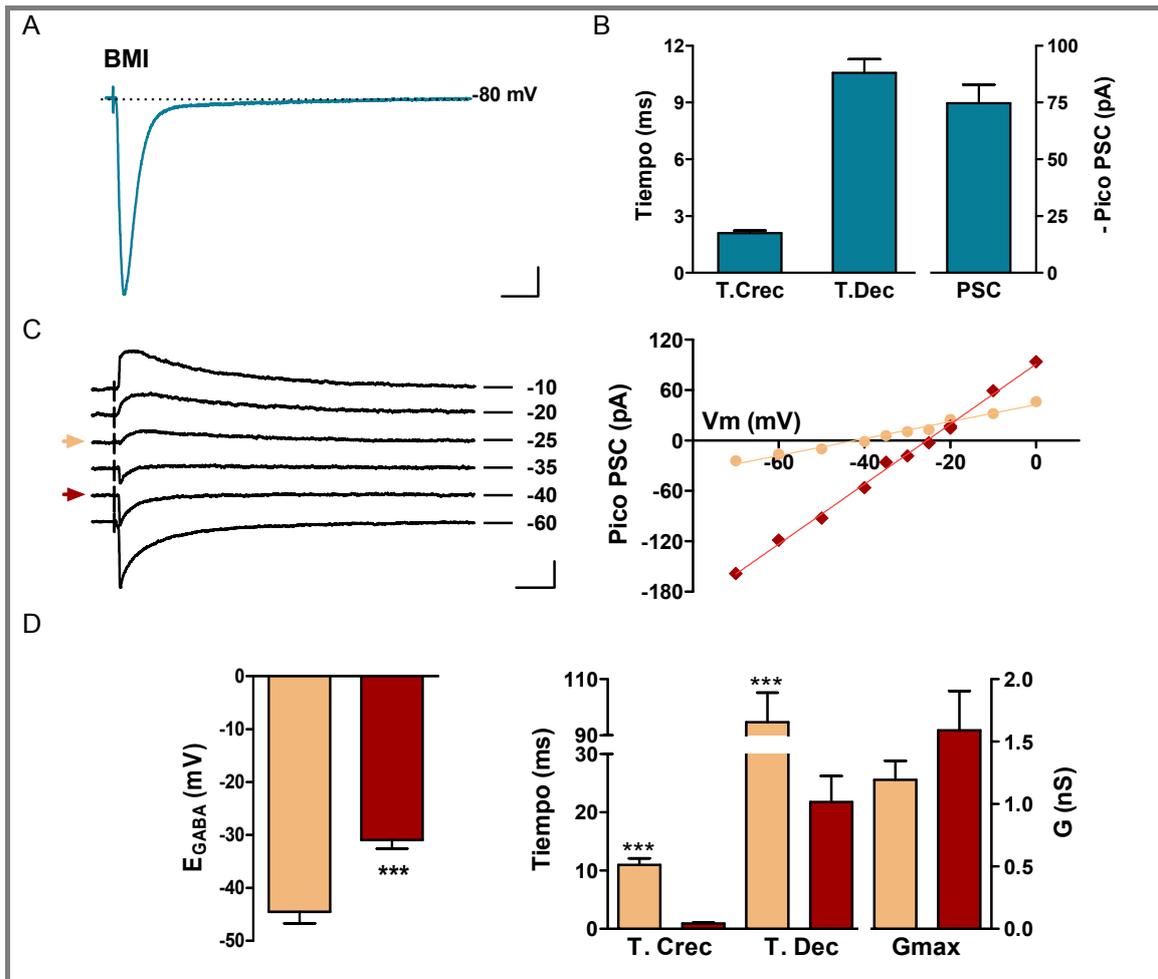


Figura 2.13 Propiedades de la aferencia glutamatergica y GABAérgica de las neuronas GABA + glu. A: Corriente postsináptica glutamatergica evocada en una neurona GFP⁺ de 18 dpi en respuesta a la estimulación extracelular de la capa granular (20 V, 0.1 Hz) en presencia de BMI (20 μ M). Escalas: 25 ms, 15 pA. B: Tiempo de crecimiento (T. Crec), tiempo de decaimiento (T. Dec) y amplitud pico de las corrientes glutamatergicas evocadas (n = 21 células). C, izquierda: Corrientes GABAérgicas evocadas por la estimulación extracelular de la capa granular de una neurona de 27 dpi registradas a diferentes potenciales de membrana (señalados a la derecha). Se indican con flechas la componente tardía de cinética puramente lenta (flecha naranja), y la componente temprana de cinética puramente rápida (flecha bordo). Escalas: 25 ms, 50 pA. Derecha: Gráfico I-V de la componente rápida (triángulos bordo) y lenta (círculos naranjas) correspondientes a los trazos de izquierda. D: Potencial de reversión de la componente rápida (bordo) y lenta (naranja) de las corrientes postsinápticas GABAérgicas. Cinética y conductancia máxima de las dos componentes de la corriente GABAérgica evocada medida en el potencial de reversión de la componente opuesta (ver materiales y métodos). Se muestra el promedio \pm ES. ***p<0.0001 (t-test).

Con el fin de identificar el posible origen de las dos componentes de la PSC se realizó una curva I-V para cada una de ellas. Dado que el pico de la respuesta postsináptica está dominado por la componente rápida, se utilizó dicho valor para la realización de la curva I-V, mientras que la componente lenta se midió a un tiempo fijo donde la contribución de la componente rápida ya es mínima (Figura 2.13 C). El valor de E_{GABA} obtenido para la componente rápida fue despolarizado y semejante al potencial de reversión calculado para las soluciones utilizadas en los experimentos (Figura 2.13 D, Tabla 2.2). En cambio, el E_{GABA} correspondiente a la componente lenta exhibió un valor significativamente más hiperpolarizado. La diferencia en estos valores

es consistente con la existencia de un gradiente intracelular en la concentración de cloro entre los compartimentos somático y dendrítico como consecuencia de la técnica de whole-cell. En resumen, la existencia de una componente rápida de las corrientes GABAérgicas con reversión despolarizada es consistente con un origen perisomático de las mismas, mientras que la componente lenta con E_{GABA} hiperpolarizado provendría de la aferencia localizada en las dendritas. Es remarcable que en las neuronas maduras la concentración de Cl^- intracelular disminuye debido a la expresión de KCC2, transportador de Cl^- y K^+ que extrae cloro en contra de su gradiente, determinando un E_{GABA} más hiperpolarizado que en las neuronas inmaduras (Tabla 2.2) (Rivera C *et al.* 1999). Otra manera de probar el origen dendrítico para las corrientes lentas y somático para las rápidas surgió de las observaciones de Diego Laplagne, quien mediante la aplicación localizada de BMI sobre el soma de neuronas GFP⁺ logró bloquear específicamente la componente rápida de la aferencia GABAérgica quedando intacta la componente lenta (Espósito MS *et al.* 2005).

	GABA	GABA + glu		Neurona GFP⁺	
	<i>c. lenta</i>	<i>c. lenta</i>	<i>c. rápida</i>	<i>c. lenta</i>	<i>c. rápida</i>
T. Crec (ms)	10.07 ± 0.81	11.00 ± 1.09	0.89 ± 0.16	10.04 ± 0.84	1.33 ± 0.33
T. Dec (ms)	89.5 ± 4.8	94.7 ± 10.5	21.7 ± 4.5	96.41 ± 7.84	15.95 ± 2.43
G _{max} (nS)	0.71 ± 0.20	1.19 ± 0.15	1.59 ± 0.32	1.20 ± 0.12	0.95 ± 0.12
E _{GABA} (mV)	-26.9 ± 1.9	-44.5 ± 2.1	-30.9 ± 1.6	-60.2 ± 1.8 *	-39.61 ± 1.7

Tabla 2.2 Desarrollo de la conectividad GABAérgica. Se realizaron comparaciones estadísticas entre las mismas componente de los diferentes grupos neuronales encontrándose diferencias significativas únicamente entre el E_{GABA} de la componente lenta (*c. lenta*) de GABA + glu y neurona GFP⁺, $p < 0.01$.

También fue posible a partir de la curva I-V medir las propiedades cinéticas de las dos componentes de la respuesta GABAérgica por separado. Para ello se utilizó el trazo del PSC evocado en el potencial de membrana más cercano a la reversión de la componente opuesta (Figura 2.13 C,D). Este análisis permitió cuantificar las diferencias cinéticas entre las dos componentes y compararlas con las propiedades de neuronas granulares maduras y de neuronas inmaduras con conectividad GABAérgica exclusivamente (Tabla 2.2). Los valores de tiempo de crecimiento y decaimiento de las neuronas GABA+glu no presentaron diferencias significativas con las neuronas maduras demostrando su origen en común ($p > 0.1$, t-test). Notablemente, la cinética de la corriente evocada en las neuronas con aferencia GABAérgica exclusivamente fue similar a la componente lenta de las células GFP⁺ y de las neuronas maduras (ANOVA de una vía, $p > 0.7$), demostrando que durante el desarrollo neuronal los primeros aferentes GABAérgicos se localizan sobre las dendritas.

La existencia de sinapsis funcionales GABAérgicas y glutamatérgicas sobre las neuronas GFP⁺ fue avalado por la detección de eventos espontáneos en presencia de kyn o BMI, mientras que estos fueron bloqueados completamente por la aplicación simultánea de kyn y BMI (Figura 2.14 A-B). La frecuencia de la actividad espontánea GABAérgica en las neuronas GABA+glu (0.23 ± 0.06 Hz, n = 7), fue significativamente mayor que la registrada en las neuronas "GABA" (0.05 ± 0.02 , p<0.03) y semejante a las neuronas GFP⁻ (0.23 ± 0.07 Hz, n = 10) (test de Kruskal-Wallis y post-test de Dunns) demostrando que las neuronas GFP⁺ que poseen inervación glutamatérgica ya desarrollaron el máximo número de sinapsis GABAérgicas.

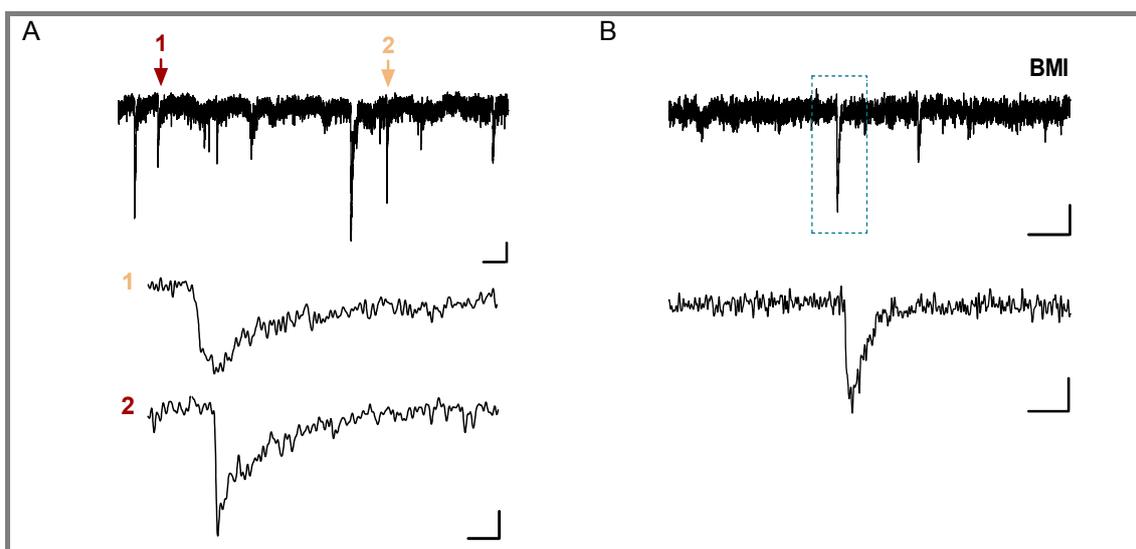


Figura 2.14 Conectividad de las neuronas GABA + glu. A: Corrientes GABAérgicas espontáneas registradas en presencia de kyn 4mM. Los trazos inferiores son magnificaciones de eventos de cinética lenta (1) o rápida (2). Escalas superiores: 1 s, 3 pA. Escalas inferiores: 15 ms, 3 pA. B: Corrientes glutamatérgicas espontáneas registradas en presencia de BMI 20 μM. El trazo inferior es una magnificación de la región recuadrada en el trazo superior. Escalas superiores: 200 ms, 2.5 pA. Escalas inferiores: 20 ms, 2.5 pA.

El registro de la actividad espontánea GABAérgica realizado a un potencial de membrana de -80 mV también evidenció la presencia de dos poblaciones de eventos, rápidos y lentos, tanto en neuronas GFP⁺ GABA+glu como en neuronas maduras (Figura 2.14 A, 2.15 B,C). En cambio, las neuronas con inervación GABAérgica exclusivamente mostraron una única población de eventos de cinética lenta en concordancia con las propiedades de la respuesta evocada (Figura 2.15 A). Notablemente, las corrientes espontáneas rápidas ausentes en las neuronas inmaduras se volvieron predominantes en las neuronas con aferencia GABAérgica y glutamatérgica.

Con el fin de verificar si los eventos espontáneos GABAérgicos rápidos y lentos se originan en diferentes compartimentos celulares, se realizaron registros en condiciones de Cl⁻ simétrico (igual concentración de Cl⁻ interna y externa) de manera tal de imponer

en la región perisomática un $E_{GABA} = 0$ mV. Con estas condiciones experimentales la realización de registros a 0 mV de potencial de membrana permite identificar exclusivamente eventos de origen dendrítico, facilitando su detección por el aumento de su fuerza impulsora (Pearce RA 1993). La totalidad de la actividad espontánea registrada en estos experimentos exhibió largos tiempos de crecimiento y decaimiento evidenciando el origen dendrítico de los eventos de cinética lenta (Figura 2.15 D). Más aún, las características cinéticas de la población de eventos dendríticos coincide con la distribución de la actividad espontánea en neuronas con invasión GABAérgica únicamente, quedando demostrado a través de un segundo experimento la localización dendrítica de dicha invasión.

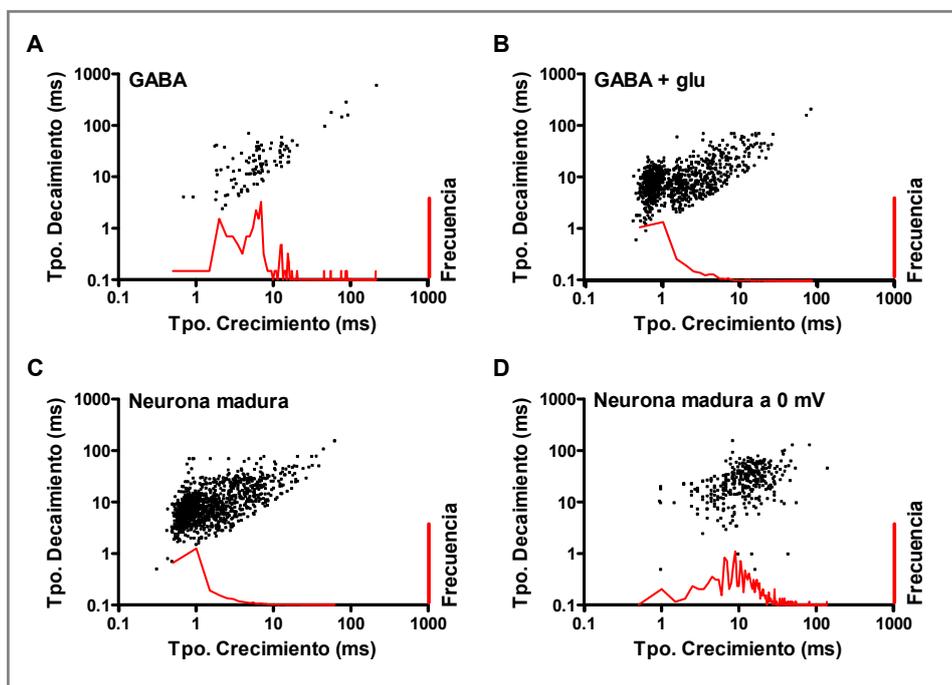


Figura 2.15 Cinética de las corrientes GABAérgicas espontáneas. A-D Gráficos de dispersión del tiempo de decaimiento vs el tiempo de crecimiento de las corrientes espontáneas registradas en presencia de kyn (4mM) correspondientes a los siguientes grupos neuronales: A) neuronas GFP⁺ con aferencia GABAérgica únicamente (n = 6 células), B) neuronas GFP⁺ con aferencia GABAérgica y glutamatérgica (n = 9 células), C y D) neuronas GFP⁻. A-C: registros realizados a -80mV (n = 11 células). D: registros realizados a 0mV con Cl⁻ simétrico (n = 5 células). En rojo se muestran las frecuencias relativas de los eventos espontáneos versus el tiempo decaimiento.

Finalmente, es importante destacar que la presencia de corrientes GABAérgicas rápidas solo fue detectada en neuronas GFP⁺ con aferencia glutamatérgica. Sin embargo, 4 de 13 neuronas con conectividad glutamatérgica presentaron respuestas GABAérgicas puramente lentas. Estos resultados indican que el desarrollo de la conectividad GABAérgica sobre la región perisomática es posterior a la invasión glutamatérgica.

En conclusión, las propiedades fisiológicas de las neuronas agrupadas según su conectividad permitieron demostrar su progresivo avance hacia la madurez neuronal.

Si además se compara la distribución de estos grupos neuronales en función de la edad es posible determinar el comienzo de los diferentes tipos de aferencia sináptica (Figura 2.16 A,B).

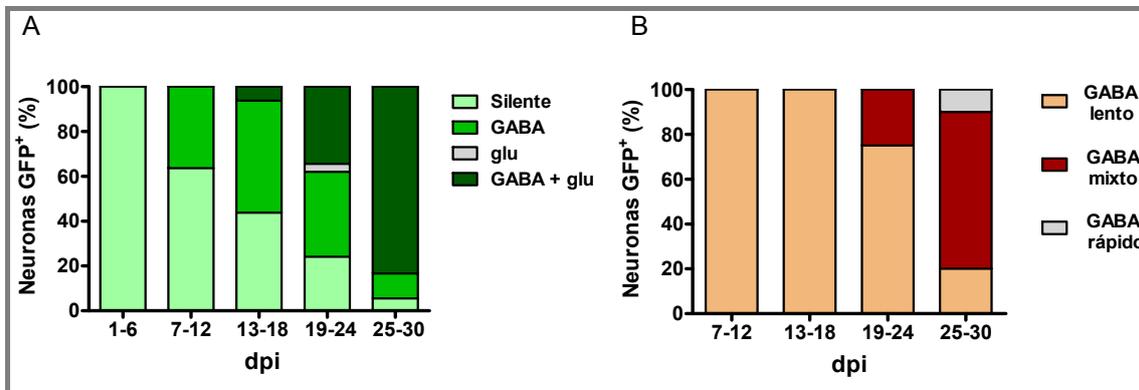


Figura 2.16 Desarrollo de la conectividad. A: Distribución de las neuronas GFP⁺ de acuerdo a su tipo de conectividad aferente normalizado al número total de neuronas de cada grupo de edades (n = 84). B: Distribución de las neuronas GFP⁺ en función de la cinética de sus corrientes GABAérgicas evocadas normalizado al número total de neuronas con aferencia GABAérgica (n = 62).

Conclusiones

Los resultados descriptos permitieron conocer por primera vez la secuencia de desarrollo de una neurona granular en el giro dentado adulto (Figura 2.17):

- Durante la primera semana de desarrollo las neuronas granulares poseen una excitabilidad inmadura y carecen de aferencias sinápticas. Sin embargo poseen receptores para GABA y glutamato, pudiendo ser capaces de responder a la acción tónica de estos neurotransmisores (Ge S *et al.* 2006).

- A partir de la segunda semana de edad las neuronas comienzan a recibir aferencia GABAérgica sobre las dendritas, aunque sus propiedades pasivas y de excitabilidad siguen teniendo características inmaduras.

- Alrededor de la tercera semana de desarrollo las neuronas comienzan a recibir invasión glutamatérgica y maduran las propiedades de excitabilidad caracterizadas por potenciales de acción repetitivos.

- Finalmente se desarrolla la conectividad GABAérgica de localización perisomática.

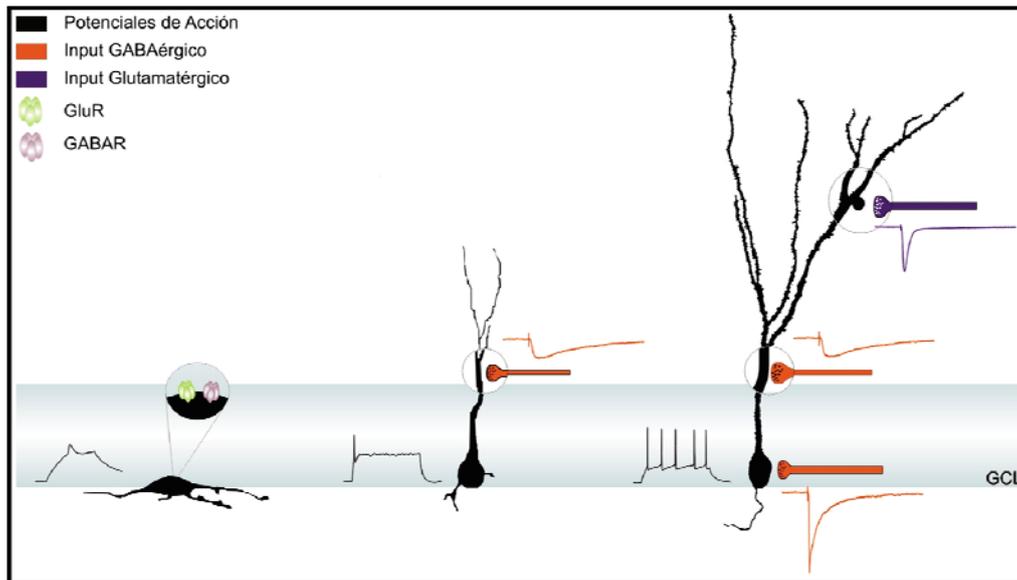


Figura 2.17 Esquema de la secuencia de desarrollo neuronal en el giro dentado adulto detallando las características más representativas de dicho proceso (Espósito MS *et al.* 2005).

Por lo tanto, el desarrollo de la conectividad de una neurona granular en el cerebro adulto es un proceso lento que puede tomar alrededor de cuatro semanas, aunque la maduración completa se hace evidente recién a las 6-8 semanas.

Notablemente, la secuencia de establecimiento de la conectividad descrita es similar a la caracterizada en el hipocampo en desarrollo.

Capítulo I

2.3 Discusión

La caracterización del proceso de desarrollo de una neurona granular en el giro dentado adulto es un estudio fundamental para la comprensión del rol que juega la neurogénesis en la función del hipocampo. Con el fin de abordar esta problemática, muchos trabajos fueron realizados simultáneamente utilizando diferentes estrategias, que validan y completan los resultados de la presente tesis. En particular, uno de estos estudios describió la conectividad aferente de neuronas granulares al azar distribuidas a lo ancho de la capa granular (Ambrogini P *et al.* 2004). Si bien la falta de un indicador de la edad neuronal impidió a los autores determinar una secuencia de desarrollo temporal, es destacable que este grupo haya encontrado neuronas granulares con características similares a los estadios descritos en esta tesis. Un método alternativo se basó en la utilización de ratones transgénicos que expresan GFP bajo el promotor de pro-opiomelanocortina (POMC) en neuronas granulares inmaduras (Overstreet-Wadiche LS *et al.* 2005; Karten YJ *et al.* 2006). Debido a la expresión transitoria de GFP en las neuronas nuevas, la utilización de esta herramienta solo permite realizar una descripción parcial del desarrollo neuronal que incluye células de hasta dos semanas de edad. La generación de un segundo ratón transgénico que expresa GFP bajo el promotor de nestina permitió la identificación de los progenitores neurales del giro dentado y una pequeña proporción de neuronas con propiedades inmaduras (Wang LP *et al.* 2005). Posteriormente, otros trabajos fueron publicados utilizando la técnica de marcado retroviral (Ge S *et al.* 2006; Zhao C *et al.* 2006; Toni N *et al.* 2007; Toni N *et al.* en prensa). En resumen, la comprensión del proceso de desarrollo neuronal se ve favorecida por la visión integrada de todos los resultados publicados (Figura 2.18).

Secuencia de desarrollo neuronal

Uno de los primeros hallazgos de este trabajo es que la determinación de los progenitores neurales hacia un fenotipo neuronal es un proceso rápido, ya que células con potenciales de acción inmaduro fueron encontradas 24 horas después de la inyección retroviral. Este resultado está sustentado por el análisis histológico de las células GFP⁺ que muestra que el porcentaje de neuronas, identificadas a través de la expresión de marcadores específicos, no varía entre 7 y 28 dpi, demostrando que la determinación neuronal ocurre a pocos días de que la célula abandona su etapa proliferativa (Espósito MS *et al.* 2005). Más aún, una observación similar fue reportada estudiando el porcentaje de células BrdU⁺ que expresan marcadores neuronales (Kempermann G *et al.* 2003). Estas neuronas inmaduras se localizan en la región

subgranular y se caracterizan por su alta resistencia de membrana y por la expresión de receptores funcionales de GABA y glutamato (Espósito MS *et al.* 2005; Wang LP *et al.* 2005; Overstreet-Wadiche LS *et al.* 2005). Si bien no poseen invasión aferente, la presencia de GABA ambiental es capaz de generar corrientes tónicas en las neuronas inmaduras, a través de la activación de los receptores GABA_A (Ge S *et al.* 2006).

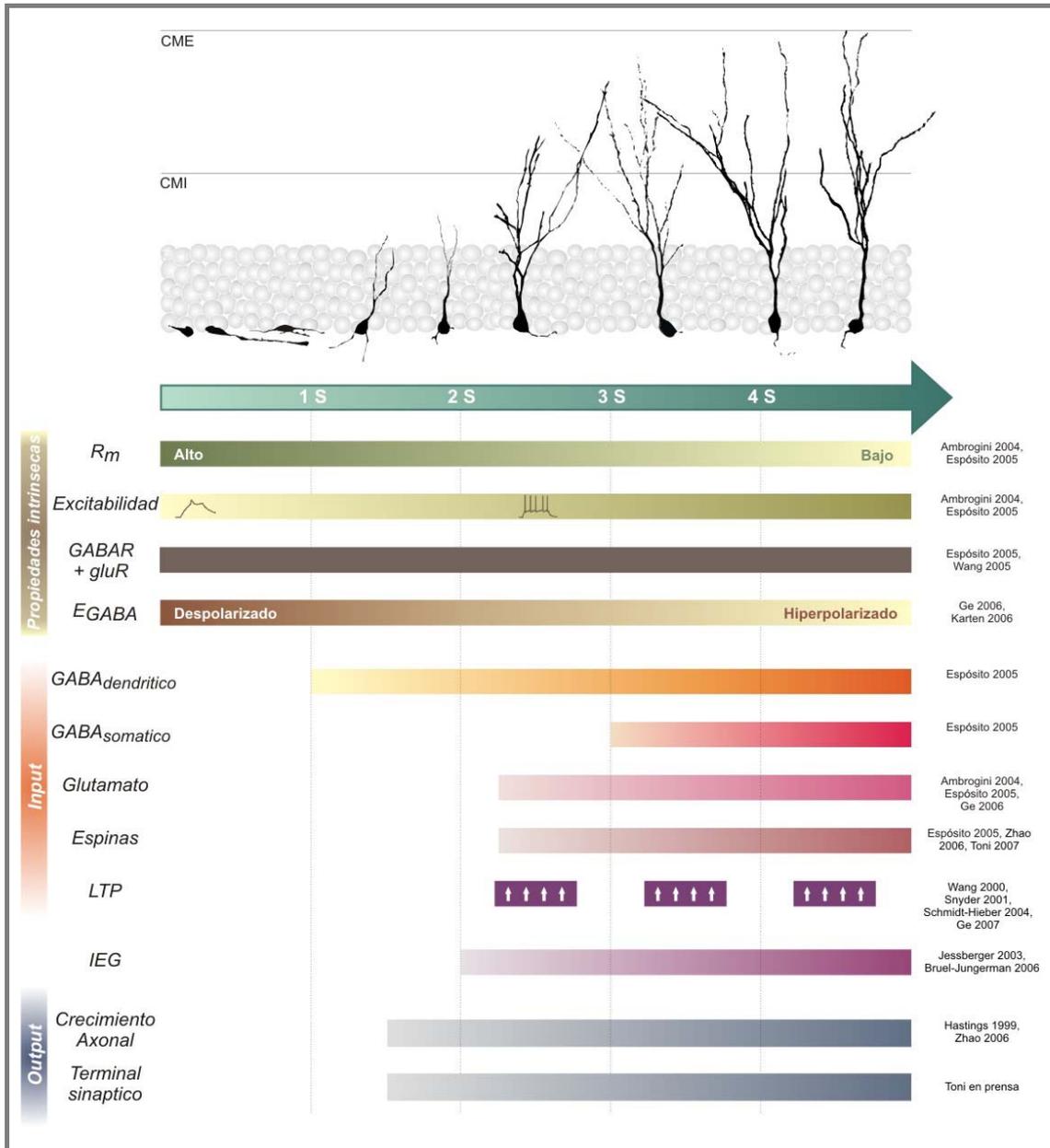


Figura 2.18. Resumen del proceso de desarrollo neuronal en el giro dentado adulto. Panel superior: Maduración morfológica de las neuronas nuevas identificadas por la expresión de GFP a través de la transfección retroviral. Panel inferior: Representación esquemática de la secuencia de maduración neuronal. Las barras indican el intervalo temporal en que cada propiedad fue detectada. La intensidad de color simboliza el número o la fuerza de cada parámetro. CME: capa molecular externa; CMI: capa molecular interna (modificado de Piatti VC *et al.* 2006).

Durante la segunda semana de desarrollo las neuronas nuevas se localizan en el estrato más interno de la capa granular y despliegan espigas de Na⁺ inmaduras

dependientes de canales de Ca^{++} de tipo T (Ambrogini P *et al.* 2004; Schmidt-Hieber C *et al.* 2004; Espósito MS *et al.* 2005). Estas neuronas reciben innervación GABAérgica de propiedades cinéticas lentas y origen dendrítico (Ambrogini P *et al.* 2004; Espósito MS *et al.* 2005; Overstreet-Wadiche LS *et al.* 2005; Wang LP *et al.* 2005; Ge S *et al.* 2006; Karten YJ *et al.* 2006). Registros de patch perforado con gramicidina demostraron que el valor de E_{GABA} en estas neuronas inmaduras es más despolarizado que su potencial de reposo, evidenciando la naturaleza despolarizante de GABA en este estadio de madurez (Overstreet-Wadiche LS *et al.* 2005; Ge S *et al.* 2006; Karten YJ *et al.* 2006). El valor despolarizado de E_{GABA} es consecuencia directa de la elevada concentración de Cl^- intracelular en las neuronas inmaduras, la cual se origina debido a la elevada expresión de NKCC1 (transportador de Na^+ , K^+ y Cl^- que incorpora Cl^- al interior celular), y a la baja densidad del transportador KCC2 (transportador de K^+ y Cl^- que extruye Cl^- en contra del gradiente) (Figura 2.19) (Ge S *et al.* 2006). La acción despolarizante de GABA sobre las neuronas inmaduras ha sido descrita en múltiples sistemas en desarrollo incluyendo a las neuronas granulares del giro dentado (Leinekugel X *et al.* 1995; Obrietan K y van den Pol AN 1995; Garaschuk O *et al.* 1998; Ben-Ari Y *et al.* 2007).

Durante las dos primeras semanas de desarrollo las neuronas migran desde la zona subgranular para incorporarse principalmente a los estratos más internos (cerca del hilus) de la capa granular (Espósito MS *et al.* 2005). Notablemente, la migración es escasa entre la segunda y la cuarta semana de desarrollo, y casi ninguna neurona se ubica en la cara externa de la capa granular. Más aún, la proporción de células BrdU^+ en las diferentes porciones de la capa granular permanece estable entre 1 y 11 meses de desarrollo (Kempermann G *et al.* 2003). Por lo tanto, las neuronas nacidas en el adulto alcanzan su localización final alrededor de la segunda semana de desarrollo, quedando restringidas a los estratos más internos de la capa granular. A partir del trabajo de Martin y colaboradores se pudo concluir que durante el desarrollo perinatal existen dos poblaciones de progenitores neurales diferentes: aquellos que dan origen al estrato más externo de la capa granular, y los que forman la capa interna (Martin LA *et al.* 2002), sugiriendo que los progenitores neurales del giro dentado adulto podrían estar relacionados con estos últimos. Si se tiene en consideración que como consecuencia del proceso de desarrollo del giro dentado las neuronas más externas poseen origen embrionario mientras que las más internas tienen un origen postnatal, es interesante postular que la neurogénesis adulta está contribuyendo a mantener un gradiente de madurez a lo ancho de la capa granular.

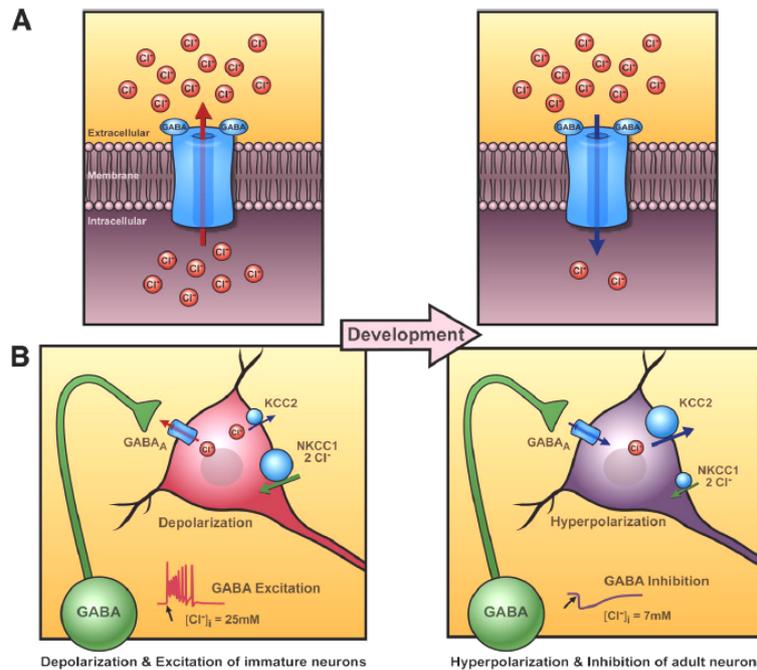


Figura 2.19 Cambios homeostáticos en la concentración intracelular de Cl^- durante el desarrollo neuronal. A: Durante el desarrollo la concentración intracelular de Cl^- decrece generando un cambio en el E_{GABA} hacia valores más hiperpolarizados. Por lo tanto, en las neuronas inmaduras el E_{GABA} es mayor que el potencial de reposo y entonces la apertura del receptor GABA_A permite la salida de iones Cl^- originando la despolarización de la célula. En la neurona madura, el E_{GABA} es menor que el potencial de reposo por lo que GABA a través de su receptor GABA_A genera una hiperpolarización en la neurona. B: los cambio en la concentración de Cl^- se deben a la expresión temprana de NKCC1 y tardía de KCC2 (Ben Ari Y 2007).

Una vez avanzado el desarrollo, las neuronas nuevas comienzan a recibir aferencias glutamatérgicas, y madura su capacidad de disparo de potenciales de acción caracterizados por espigas repetitivas con adaptación a altas frecuencias (Ambrogini P *et al.* 2004; Espósito MS *et al.* 2005; Ge S *et al.* 2006). El análisis de espinas dendríticas, correlato morfológico de las sinapsis excitatorias, determinó que las mismas comienzan a desarrollarse ~17 días luego de la inyección retroviral, en concordancia con el transcurso temporal descrito en la presente tesis (Zhao C *et al.* 2006). A pesar de la semejanza en la secuencia de desarrollo, existe una diferencia temporal de ~1 semana en el comienzo de la invasión glutamatérgica entre los resultados de esta tesis y los de Ge y colaboradores. Esta discrepancia podría ser consecuencia del estudio de diferentes aferentes, determinados por la ubicación del electrodo de estimulación. Dado que la activación de axones de la capa molecular produce respuestas glutamatérgicas a los 14 días de edad (Ge S *et al.* 2006), es posible especular que la conectividad excitatoria se desarrollaría primero en las dendritas distales y posteriormente en los procesos cercanos al soma, de manera similar al desarrollo de la invasión GABAérgica. Por lo contrario, también es posible que las discrepancias encontradas no tengan relevancia fisiológica y sean

consecuencia de diferencias experimentales. Por último, Ambrogini y colaboradores encontraron que todas las neuronas con aferencias glutamatérgicas poseen respuestas mediadas por AMPA y NMDA. Sin embargo, la ausencia de neuronas con innervación glutamatérgica mediada por NMDA exclusivamente (como sucede en el desarrollo perinatal) podría ser consecuencia de la falta de un método de identificación de las neuronas nacidas en el giro dentado adulto en dicho trabajo.

Finalmente el desarrollo de la conectividad se completa con el establecimiento de conexiones GABAérgicas sobre la región perisomática, de acción netamente inhibitoria (Espósito MS *et al.* 2005; Ge S *et al.* 2006). En estas neuronas la concentración de Cl^- intracelular disminuye por el aumento de la expresión de KCC2 (Ben-Ari Y *et al.* 2007), generando la hiperpolarización del valor de E_{GABA} (Ge S *et al.* 2006). En el caso que dicho valor sea menor que el potencial de reposo la activación del receptor GABA_A produciría una corriente de Cl^- entrante y la hiperpolarización de la membrana (Figura 2.19). Sin embargo, también es posible que el valor de E_{GABA} sea mayor que el potencial de reposo pero menor que el umbral de disparo de potenciales de acción, en cuyo caso la inhibición es establecida a través del fijado del potencial de membrana en el valor de E_{GABA} , efecto conocido con el nombre de “shunting inhibition”.

La existencia de dos estadios discretos de desarrollo de la conectividad GABAérgica podría indicar que ambas aferencias cumplen diferentes funciones durante el desarrollo neuronal. En las etapas tempranas del desarrollo, la transmisión GABAérgica podría estar jugando un rol trófico a través de su acción despolarizante, de manera semejante a la función del GABA ambiental en las neuronas silentes (Lo turco JJ *et al.* 1995; Marty S *et al.* 1996; Ganguly K *et al.* 2001; Ben-Ari Y 2002; Ge S *et al.* 2006). En cambio, la innervación tardía e inhibitoria de la región perisomática sugiere una función diferente a la de modulador de la maduración neuronal. Teniendo en cuenta que la inhibición perisomática es capaz de controlar el output en las neuronas maduras (Freund TF 2003), su desarrollo tardío podría ser crítico una vez que la conectividad glutamatérgica se vuelve fisiológicamente relevante.

Luego de 7 semanas de desarrollo, las proyecciones excitatorias de la corteza entorrinal y las inhibitorias de las interneuronas locales que innervan a las células granulares nacidas en el adulto exhiben propiedades similares a las neuronas originadas en el desarrollo perinatal (Laplagne DA *et al.* 2006; Laplagne DA *et al.* 2007). Sin embargo, la caracterización detallada de las propiedades anatómicas de las sinapsis glutamatérgicas demuestra que estas continúan madurando más allá del segundo mes de desarrollo (van Praag H *et al.* 2002; Zhao C *et al.* 2006; Toni N *et al.*

2007). Finalmente las neuronas incorporadas al circuito forman parte de una población estable capaz de sobrevivir por más de un año (Kempermann G *et al.* 2003; Zhao C *et al.* 2006). La falta de diferencias cuantitativas en las propiedades de conectividad no necesariamente indica que la neurogénesis contribuye al circuito con unidades equivalentes ya que las neuronas nacidas en el adulto se desarrollaron en un ambiente funcional, donde los mecanismos dependientes de actividad sináptica pueden permitir la selección de aferentes y eferentes específicos.

La descripción de la conectividad aferente solo cobra relevancia fisiológica en el contexto de la existencia de un output funcional. Notablemente, un trabajo reciente de nuestro laboratorio demostró que las neuronas granulares maduras nacidas en el adulto establecen sinapsis funcionales glutamatérgicas con las interneuronas locales y con las células piramidales de CA3 (Toni N *et al.* en prensa). Sin embargo, el proceso de desarrollo axonal se describió solamente en forma anatómica debido a las dificultades de la aproximación electrofisiológica. Trabajos previos habían utilizado marcadores retrógrados aplicados en la región CA3 con el fin de identificar neuronas BrdU⁺ cuyos axones hayan alcanzado su blanco principal. Esta estrategia permitió describir que los axones de las neuronas nuevas comienzan a llegar a la región CA3 a los 10 días de edad, logrando una máxima colocación a los 17 días (Hastings NB y Gould E 1999; Markakis EA y Gage FH 1999). Más recientemente, el estudio de las proyecciones axonales de neuronas GFP⁺ marcadas con un retrovirus arrojó resultados similares (Zhao C *et al.* 2006). Posteriormente, el análisis por microscopía electrónica de la estructura sináptica demostró la presencia de botones sinápticos funcionales sobre las dendritas de CA3 provenientes de neuronas de 17 dpi, cuyas propiedades continúan madurando hasta las ~10 semanas de desarrollo (Toni N *et al.* en prensa). Dado que las primeras neuronas con aferencia glutamatérgica poseen 18 dpi (Espósito MS *et al.* 2005), y que la visualización de espinas dendríticas comienza a los ~16/17 dpi (Zhao C *et al.* 2006), es factible argumentar que los terminales sinápticos de las neuronas nuevas se desarrollan simultáneamente con la inervación glutamatérgica. Notablemente, las neuronas nacidas en el giro dentado adulto se integrarían al circuito hipocampal cuando aún poseen propiedades inmaduras, como ser una mayor resistencia de membrana, una menor capacitancia, y una baja o ausente inervación GABAérgica perisomática (Espósito MS *et al.* 2005). Surge entonces la pregunta de si estas neuronas inmaduras con propiedades únicas cumplen alguna función dentro del procesamiento de la información por el hipocampo.

Rol funcional de la neurogénesis adulta

De acuerdo a lo descrito es posible que las propiedades particulares de las neuronas nuevas durante su desarrollo aporten al circuito hipocampal características únicas que le permitan realizar tareas específicas. A favor de esta hipótesis estudios de plasticidad en la capa granular revelaron propiedades heterogéneas entre su capas externas e internas: mientras que las neuronas de la capa externa solo presentan LTP cuando la inhibición GABAérgica se encuentra bloqueada, las neuronas de la capa interna poseen inducción de LTP aún en presencia de inhibición (Wang S *et al.* 2000). Estos autores postulan que las células con mayor plasticidad corresponden a neuronas nacidas en el adulto debido a que poseen un árbol dendrítico de baja complejidad con presencia de varicosidades, y por la expresión de un marcador de neurona inmadura. Posteriormente, este mismo grupo de investigación demostró la existencia de un tipo particular de LTP que desaparece cuando la neurogénesis es bloqueada mediante un protocolo de irradiación con rayos γ , 3 semanas antes de la inducción de plasticidad (Snyder JS *et al.* 2001). Siguiendo la misma línea de pensamiento, un trabajo más reciente demostró que neuronas inmaduras, definidas por su alta resistencia de membrana y la expresión de un marcador de neurona joven, poseen un umbral más bajo para la inducción de LTP en ausencia de inhibición GABAérgica (Schmidt-Hieber C *et al.* 2004). En conjunto, estos resultados sugieren fuertemente que las neuronas menores de 3 semanas de edad tendrían un umbral más bajo para la inducción de LTP y/o una menor inhibición GABAérgica. Dichas propiedades podrían ser una consecuencia intrínseca de su proceso de desarrollo, vinculadas a la mayor resistencia de membrana y a la inervación tardía de la aferencia GABAérgica perisomática. Notablemente, un estudio reciente describió las propiedades de inducción de LTP durante el desarrollo neuronal en el giro dentado adulto demostrando que la plasticidad se encuentra aumentada en las neuronas nuevas hasta las 6 semanas de edad (Ge S *et al.* 2007). Por lo tanto, las neuronas en desarrollo completamente integradas al circuito hipocampal poseen mecanismos de plasticidad únicos durante una ventana temporal restringida. Esta ventana temporal podría estar determinada entre el establecimiento de la aferencia glutamatérgica (período en el cual las sinapsis serían “potenciables”) y el arribo tardío de la aferencia GABAérgica perisomática descrita en esta tesis.

La existencia de una población de neuronas jóvenes con mayor plasticidad en el giro dentado adulto abre la pregunta de si esta propiedad es relevante para su propia maduración o es importante para la función del hipocampo (Schinder AS y Gage FH 2004). Dado que los mecanismos de desarrollo de la conectividad dependientes de

actividad están ampliamente establecidos, la mayor plasticidad de las neuronas nuevas podría serles útil para seleccionar las conexiones aferentes y eferentes en un ambiente altamente competitivo. De esta manera, la conectividad de las neuronas nuevas estaría siendo determinada por la actividad del circuito, introduciendo en el mismo un factor de plasticidad adicional. Sin embargo, es esta propiedad necesaria para el funcionamiento del hipocampo?

Muchos trabajos recientes sustentan la idea de que las neuronas jóvenes son necesarias para ciertos tipos de aprendizaje. Esto queda demostrado porque los déficits cognitivos son encontrados entre la segunda y la cuarta semana luego de abolida la neurogénesis (Shors TJ *et al.* 2001; Shors TJ *et al.* 2002; Snyder JS *et al.* 2005; Dupret D *et al.* 2008). Consistentemente con estos resultados, dos trabajos recientes donde utilizan como marcador de actividad celular la expresión de IEGs indicaron que el reclutamiento de las neuronas nuevas depende de su experiencia previa durante un cierto estadio discreto de su proceso de maduración (Kee N *et al.* 2007; Tashiro A *et al.* 2007). A pesar de que la determinación del estadio de desarrollo específico es aún controversial, estos hallazgos sugieren la existencia de una ventana temporal donde las neuronas nuevas participarían del procesamiento de la información. Más aún, este periodo crítico podría estar determinado por las propiedades únicas de plasticidad y conectividad de las neuronas jóvenes.

Para comprender el rol último de la neurogénesis es necesario integrarlo al conocimiento de la función del hipocampo. El modelo moderno de “codificación nodal” define al hipocampo como un mapa cognitivo que se genera a partir de la representación de eventos temporalmente próximos incluyendo tanto información espacial como no espacial (Eichenbaum H *et al.* 1999, Smith DM y Mizumori SJ 2006). El aporte fundamental del giro dentado a la función hipocampal es la generación de códigos de activación neuronal específicos ante contextos diferentes que dirigen la respuesta de CA3 a la información proveniente de la corteza. En este contexto la incorporación de neuronas nuevas al circuito del giro dentado podría simplemente aumentar el número de códigos diferentes posibles, incrementando de esta manera la capacidad de memoria. En cambio, Aimone y colaboradores propusieron que dada las propiedades funcionales distintivas de las neuronas nuevas, éstas serían capaces de responder más inespecíficamente a diferentes patrones de información (Aimone JB *et al.* 2006). Por lo tanto, la misma neurona joven podría participar en la codificación de eventos diferentes durante un periodo de tiempo definido de su desarrollo. Dado que a diferentes tiempos la población de neuronas que se encuentra dentro de su periodo crítico de desarrollo cambia, no habría solapamiento entre eventos alejados en el

tiempo. Como consecuencia, se generaría una superposición de los patrones de activación de eventos no relacionados temporalmente cercanos, incrementando la capacidad de codificación temporal de la estructura hipocampal. En conclusión, la existencia de un periodo crítico de mayor excitabilidad neuronal estaría directamente relacionada con la manera en que la experiencia es codificada en el hipocampo.

Notablemente, la secuencia de maduración neuronal en el giro dentado adulto es similar a la descrita en el desarrollo perinatal. Dada las grandes diferencias entre los ambientes en los que se diferencian las neuronas es posible especular que la secuencia de desarrollo está determinada por un programa genético intrínseco conservado en los diferentes progenitores neurales. Desde este punto de vista, las propiedades originales que les permiten a las neuronas nuevas cumplir con funciones específicas dentro de la estructura del hipocampo serían consecuencia de un mecanismo concertado y rígido de desarrollo neuronal. Por lo tanto, es posible pensar que la función de la neurogénesis adulta como codificador temporal es una propiedad emergente surgida a partir de un mecanismo de desarrollo ancestral. Sin embargo, el proceso de neurogénesis adulta no es estático ya que puede ser regulado por muchas condiciones fisiológicas y patológicas. Es interesante preguntarse, entonces, cuáles son los factores ambientales que regulan el proceso de desarrollo neuronal. Este será el foco de la segunda parte de esta disertación.

Capítulo II

3.1 Introducción

Rol de la actividad del circuito en la neurogénesis durante el desarrollo perinatal

A partir del trabajo pionero de Hubel y Wiesel (Wiesel TN 1982) sobre los efectos de la privación monocular en el desarrollo del sistema visual se logró develar el rol esencial de la actividad eléctrica en el desarrollo de circuitos neuronales en el cerebro. En la actualidad, la existencia de mecanismos dependientes de actividad que controlan el crecimiento dendrítico y la conectividad sináptica durante el desarrollo del sistema nervioso se encuentra ampliamente establecida (Wong RO y Ghosh A 2002; Cohen-Cory S 2002). Podemos dividir el papel de la actividad eléctrica en el desarrollo del sistema nervioso en dos grandes periodos: 1) durante las primeras etapas del desarrollo, antes de la formación de sinapsis, la actividad espontánea juega un papel fundamental en el ensamblado del sistema; y 2) una vez desarrolladas las conexiones neuronales, la activación específica del circuito sináptico a través de la experiencia determina el refinamiento de la conectividad (Penn AA y Shatz CJ 1999; Lohof AM *et al.* 1996).

En la mayoría de las neuronas en desarrollo la presencia de receptores postsinápticos funcionales antecede a la llegada de los aferentes presinápticos, sugiriendo que la neurona inmadura está recibiendo información del medio extracelular y que puede comunicarse con los terminales en crecimiento, desencadenando los eventos que finalmente llevan a la formación de la sinapsis. Esta comunicación intercelular temprana está basada en la difusión y en la acción distal parácrina de los neurotransmisores, que contrasta con la comunicación rápida y local de la sinapsis. La actividad eléctrica espontánea en el desarrollo está caracterizada por grandes aumentos del Ca^{++} intracelular producidos por la liberación endógena de neurotransmisores. La existencia de actividad espontánea intrínseca fue descrita en múltiples circuitos neuronales en desarrollo como el sistema visual (Katz LC y Shatz CJ 1996), el sistema motor (Khazipov R *et al.* 2004), el bulbo olfatorio (Yu CR *et al.* 2004), y la corteza (Adelsberger H *et al.* 2005). En particular, las regiones CA1 y CA3 del hipocampo poseen una elevada actividad espontánea sincrónica (denominada GDPs por *giant depolarizing potentials*) únicamente durante el desarrollo postnatal temprano, desapareciendo luego de la segunda semana postnatal (Leinekugel X *et al.* 1998; Leinekugel X *et al.* 2002; Garaschuk O *et al.* 1998; Ben-Ari Y 2001).

GABA, el principal neurotransmisor inhibitorio del cerebro de mamíferos, ha recibido especial atención como regulador del desarrollo neuronal (Ben-Ari Y *et al.* 2007). Esto se debe a que todos los componentes para la señalización GABAérgica están presentes en estadios tempranos del desarrollo embrionario (~E15) en la mayoría de

las regiones del sistema nervioso (Cobas A *et al.* 1991; Van Eden CG *et al.* 1989). Además, las neuronas en desarrollo presentan corrientes GABAérgicas no sinápticas o tónicas previamente a la formación de conexiones sinápticas, como ha sido demostrado en rodajas de hipocampo de embrión (Demarque M *et al.* 2002). En algunos sistemas en desarrollo se ha descrito que GABA puede modular la proliferación de los progenitores neurales (LoTurco JJ *et al.* 1995; Weissman TA *et al.* 2004; Liu X *et al.* 2005), o la migración neuronal (Manent JB *et al.* 2005; Bolteus AJ *et al.* 2004), jugando un rol trófico al comienzo del desarrollo (Represa A y Ben-Ari Y 2005). Si bien la fuente de liberación de GABA no está clara, en ciertos casos se postula un mecanismo de liberación no canónico independiente de vesículas sinápticas (Manent JB *et al.* 2005). Todos estos hechos favorecen la hipótesis de un rol temprano de GABA en el desarrollo neuronal. En etapas posteriores del desarrollo también es GABA quien ejercería la primera señal sináptica, ya que los primeros aferentes funcionales de la mayoría de las neuronas principales e interneuronas son GABAérgicos (Ben-Ari Y *et al.* 2007).

La acción de GABA en el desarrollo está determinada por la progresiva reducción de la concentración de cloro (Cl^-) intracelular que a su vez provoca una reducción gradual en el potencial de reversión del Cl^- . Durante las primeras etapas del desarrollo neuronal la acción de GABA a través de su receptor GABA_A es despolarizante y es capaz de generar un aumento en la concentración de calcio intracelular por la apertura de canales de calcio activables por voltaje (Leinekugel X *et al.* 1995; Obrietan K y van den Pol AN 1995; Garaschuk O *et al.* 1998; Ben-Ari Y *et al.* 2007). En algunos casos, la despolarización inducida por GABA puede ser excitatoria ya que puede generar el disparo de potenciales de acción de manera directa o amplificada por la activación de canales dependientes de voltaje (Gao XB y van den Pol AN 2001; Khazipov R *et al.* 2004; Tyzio R *et al.* 2007).

Además, en las sinapsis inmaduras, caracterizadas por la ausencia de receptores AMPA (Wu G *et al.* 1996; Isaac JT *et al.* 1997), la despolarización inducida por GABA es capaz de reducir el bloqueo por magnesio del canal NMDA (Figura 3.1) (Leinekugel X *et al.* 1997). De esta manera, la acción sinérgica entre glutamato y GABA es capaz de regular la maduración sináptica al inducir la incorporación de receptores AMPA a la sinapsis (Liao D *et al.* 1995).

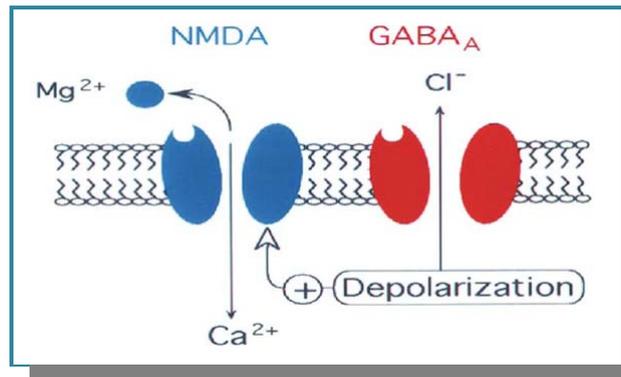


Figura 3.1 Esquema de la interacción entre los receptores $GABA_A$ y NMDA en sinapsis inmaduras en respuesta a la acción simultánea de GABA y glutamato. La activación del receptor $GABA_A$ genera una despolarización capaz de desbloquear de Mg^{++} al receptor NMDA que al ser activado por glutamato permite la entrada de Ca^{++} a la neurona (Ben-Ari Y *et al.* 2007).

Glutamato también es un neurotransmisor importante en el desarrollo neuronal temprano ya que la activación de sus receptores modula la proliferación de progenitores neuronales (LoTurco JJ *et al.* 1995) y la migración neuronal (Komuro H y Rakic P 1996). Más tarde en el desarrollo neuronal, la activación del receptor NMDA es crucial para el correcto desarrollo dendrítico y la formación de sinapsis (Rajan I y Cline HT 1998; Sin WC *et al.* 2002), mientras que la activación de los receptores AMPA parece regular el crecimiento del árbol dendrítico de manera dependiente de la actividad (Haas K *et al.* 2006). Por último, glutamato también regula el crecimiento y la ramificación de los axones en desarrollo (Ruthazer ES *et al.* 2003; Hua JY *et al.* 2005).

En resumen, está ampliamente demostrado que la actividad del circuito durante la gestación es capaz de regular la mayoría de las etapas del desarrollo neuronal a través de la acción directa de los principales neurotransmisores, GABA y glutamato. Sin embargo, aún se desconocen los receptores específicos y los mecanismos de acción determinados que participarían en las diferentes etapas del desarrollo neuronal.

Rol de la actividad del circuito en la neurogénesis adulta

Dada la reciente caracterización del proceso de desarrollo neuronal en el cerebro adulto, el estudio de los factores que regulan dicho proceso está recién comenzando. La neurogénesis puede ser entendida desde un punto de vista celular, como una sucesión de estadios discretos de desarrollo, incluyendo la proliferación de los progenitores neurales, su diferenciación al fenotipo neuronal, su migración, supervivencia, y, finalmente, maduración e integración funcional al circuito (van Praag H *et al.* 2002; Ming GL y Song H 2005; Abrous DN *et al.* 2005; Overstreet-Wadiche LS y Westbrook GL 2006; Lledo PM *et al.* 2006). Cada una de dichas etapas podría estar regulada por

la actividad del circuito a través de mecanismos específicos. Si bien la secuencia de desarrollo de las neuronas granulares es similar durante la gestación y la adultez la complejidad del ambiente que las rodea es muy diferente. Cabe preguntarse entonces si la actividad del circuito cumple los mismos roles en el proceso de neurogénesis adulta que durante el desarrollo embrionario. El conocimiento de los factores que regulan las diferentes etapas de la neurogénesis adulta es sumamente importante para el potencial desarrollo de terapias regenerativas en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas o daño cerebral, con el fin de inducir la diferenciación dirigida de células madre de regiones no neurogénicas en neurona, o el posible trasplante de células madre exógenas en las regiones cerebrales afectadas.

Proliferación:

Desde el redescubrimiento de la neurogénesis en el giro dentado adulto, se ha dado especial atención al estudio de las señales bioquímicas que regulan la proliferación de las células madre y su progenie. En consecuencia, numerosas señales tanto intrínsecas como extrínsecas han sido descritas, entre las que se destacan los neurotransmisores, las hormonas y los factores de crecimiento (Figura 3.2). Sin embargo, exceptuando los estudios en proliferación, la regulación del resto de las etapas del desarrollo neuronal sólo comenzó a ser estudiada hace pocos años.

Sobrevida:

El proceso de generación de neuronas nuevas es muy costoso ya que solo un 25-50% de las neuronas nacidas en el giro dentado adulto es capaz de sobrevivir más allá de un mes de su desarrollo (Petreanu L y Alvarez-Buylla A 2002; Dayer AG *et al.* 2003). Esto generó un gran interés en los factores que regulan la sobrevida neuronal. A pesar de su gran importancia, se ha encontrado un número limitado de claves extrínsecas capaces de regular la sobrevida (Figura 3.2). En el giro dentado, la experiencia parece ser uno de los reguladores fundamentales de la sobrevida neuronal en una ventana de tiempo específica del desarrollo que ocurre entre la primera y tercera semana de edad de la neurona (Tashiro A *et al.* 2007). Un posible mecanismo de regulación de la sobrevida neuronal por la experiencia es la señalización a través del receptor de NMDA (Tashiro A *et al.* 2006). De manera similar, la sobrevida neuronal en el bulbo olfatorio depende del input sensorial (Petreanu L y Alvarez-Buylla A 2002).

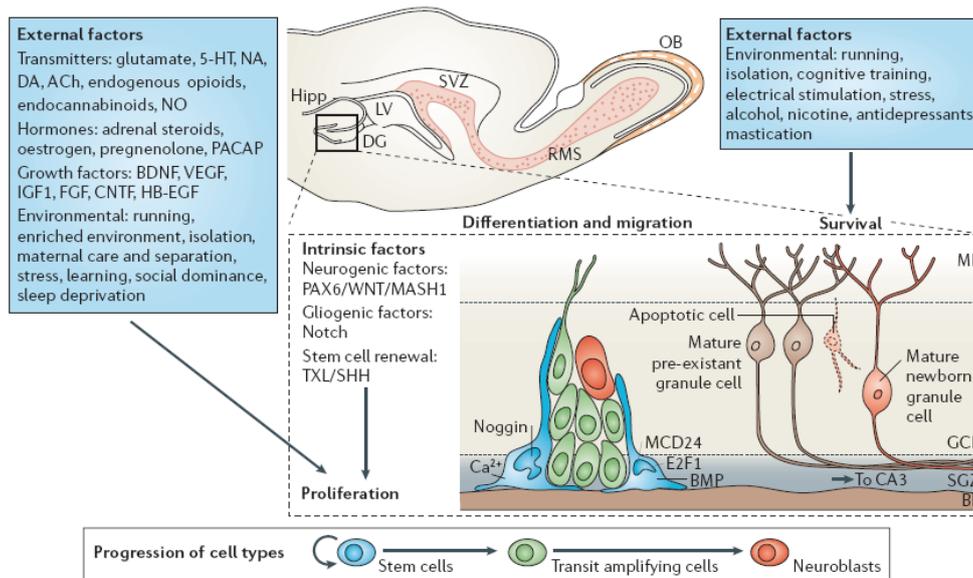


Figura 3.2: Factores intrínsecos y extrínsecos que regulan diferentes etapas de la neurogénesis adulta en el giro dentado. Se muestra un esquema de un corte sagital de cerebro de roedores, señalando la localización del giro dentado (DG) del hipocampo (Hipp) con una ampliación de su capa granular (GCL, granule cell layer). En la zona subgranular (SGZ) se localizan las células madre (stem cells, color celeste) que al dividirse dan origen a células de amplificación transiente (Transit amplifying cells, color verde) que a su vez dan origen a los neuroblastos (Neuroblast, color rojo) que se diferenciarán en neuronas maduras. La proliferación de las células se da en un nicho ampliamente caracterizado y regulado por numerosas señales que se muestran en la figura.

Factores de regulación: 5-HT, 5-hidroxitriptamina (serotonina); ACh, acetilcolina; BDNF (brain-derived neurotrophic factor), factor neurotrófico derivado de cerebro; BMP (bone morphogenetic protein), proteína morfogénica de hueso; CNTF (ciliary neurotrophic factor), factor neurotrófico ciliar; DA, dopamina; E2F1, E2F factor de transcripción 1; FGF (fibroblast growth factor), factor de crecimiento de fibroblasto; HB-EGF (heparin-binding epidermal growth factor), factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina; IGF1 (insulin growth factor 1), factor de crecimiento insulínico; MASH1 (mammalian achaete-scute homologue 1); MCD24 (glycosylphosphatidyl-inositol-anchored highly glycosylated molecule); NA, noradrenalina; NO, óxido nítrico; PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide); PAX6 (paired box 6); SHH (sonic hedgehog); TXL (thioredoxin-like 1); VEGF (vascular endothelial growth factor), factor de crecimiento endotelial.

Abreviaturas: BL, lámina basal; LV, ventrículo lateral; ML, capa molecular; OB, bulbo olfatorio; RMS, rostral migratory stream. (LLedo PM *et al.* 2006).

Maduración neuronal:

Es interesante destacar que si bien la secuencia de desarrollo neuronal en el ambiente neonatal es similar a la de un individuo adulto, indicando la existencia de un programa genético intrínseco, el curso temporal de dicho proceso es muy diferente. A comienzos de 2006 Zhao y colaboradores compararon las propiedades morfológicas de neuronas granulares de dos semanas de edad nacidas en ratones neonatos o adultos encontrando en estos últimos un retraso en el desarrollo dendrítico y axonal de 4 días (Figura 3.3) (Zhao C *et al.* 2006). Dicho retraso podría deberse a una diferencia en las propiedades de las células madre de los dos estadios de desarrollo analizados (Kruger GM y Morrison SJ 2002), o a cambios en las señales ambientales, y/o a variaciones en la actividad del circuito hipocampal. Sin embargo, otro trabajo demostró

que las neuronas nuevas de ratas de mediana o avanzada edad (12 y 24 meses) se desarrollan más lentamente aún que las de individuos jóvenes (4 meses) (Rao MS *et al.* 2005). Por lo tanto, la neurogénesis en el giro dentado podría ser entendida como un proceso que continúa desde el desarrollo postnatal temprano hasta la adultez y senescencia, manteniendo constante la secuencia de desarrollo pero enlentecida en el tiempo. Cabe preguntarse entonces cuáles son los factores que regulan la tasa de desarrollo neuronal. Algunos estudios recientes demuestran el rol crítico de la actividad eléctrica sobre el proceso de la neurogénesis en el giro dentado (Figura 3.3). Uno de estos trabajos corresponde a Overstreet-Wadiche y colaboradores, quienes correlacionaron la mayor velocidad del desarrollo neuronal en neonatos con la presencia de actividad espontánea GABAérgica de alta frecuencia, similar a los GDPs de las regiones CA3 y CA1 del hipocampo (Overstreet-Wadiche LS *et al.* 2006). Dado que para estos estudios se utilizaron ratones knock-out de la enzima GAD65 (glutamic acid decarboxylase 65, enzima encargada de la síntesis de GABA vesicular) no es posible postular de manera inequívoca la acción de GABA como mecanismo de control de la velocidad de desarrollo en el neonato. Otro trabajos estudiaron el rol de GABA tónico en la diferenciación de los progenitores neurales del giro dentado adulto *in vivo* (Tozuka Y *et al.* 2005), donde la despolarización inducida a través de la apertura de los receptores GABA_A induciría la expresión del factor de transcripción NeuroD, desencadenando la diferenciación neuronal (Liu M *et al.* 2000). Por lo tanto, GABA podría estar actuando de manera directa sobre los progenitores neurales del giro dentado adulto estimulando su diferenciación y acelerando la maduración neuronal en consecuencia, o bien, podría estar regulando de manera independiente tanto la diferenciación como la maduración neuronal de acuerdo a la etapa del desarrollo en la que se vea involucrado.

Una evidencia fuerte a favor de la actividad del circuito como reguladora de la maduración neuronal fue obtenida a través de la inducción de epilepsia en ratones adultos que expresan GFP en sus células granulares inmaduras (transgénicos POMC-GFP), en los que el proceso de neurogénesis se vio acelerado dramáticamente (Figura 3.3) (Overstreet-Wadiche LS *et al.* 2006). En estos animales la epilepsia no solo aumenta la velocidad de maduración neuronal, sino que también produce una migración aberrante de neuronas hacia el hilus, la aparición de dendritas basales y la formación de conexiones recurrentes entre células granulares (Scharfman HE *et al.* 2000 y 2003; Overstreet-Wadiche LS *et al.* 2006b; Shapiro LA y Ribak CE 2006). Estos cambios en la conectividad y morfología de las neuronas nuevas aparecen únicamente en neuronas que se desarrollan en un ambiente ya modificado por la actividad

epiléptica y permanecen estables en el tiempo (Jessberger S *et al.* 2007). Sin embargo, en este sistema experimental la velocidad de maduración podría estar acelerada por el aumento de GABA y/o glutamato en respuesta a la hiperexcitabilidad, o bien, podría deberse a la inducción de cambios locales en el microambiente, como ser el aumento de expresión de factores tróficos (Ernfors P *et al.* 1991; Isackson PJ *et al.* 1991; Elliott RC *et al.* 2003; Tongiorgi E *et al.* 2004).

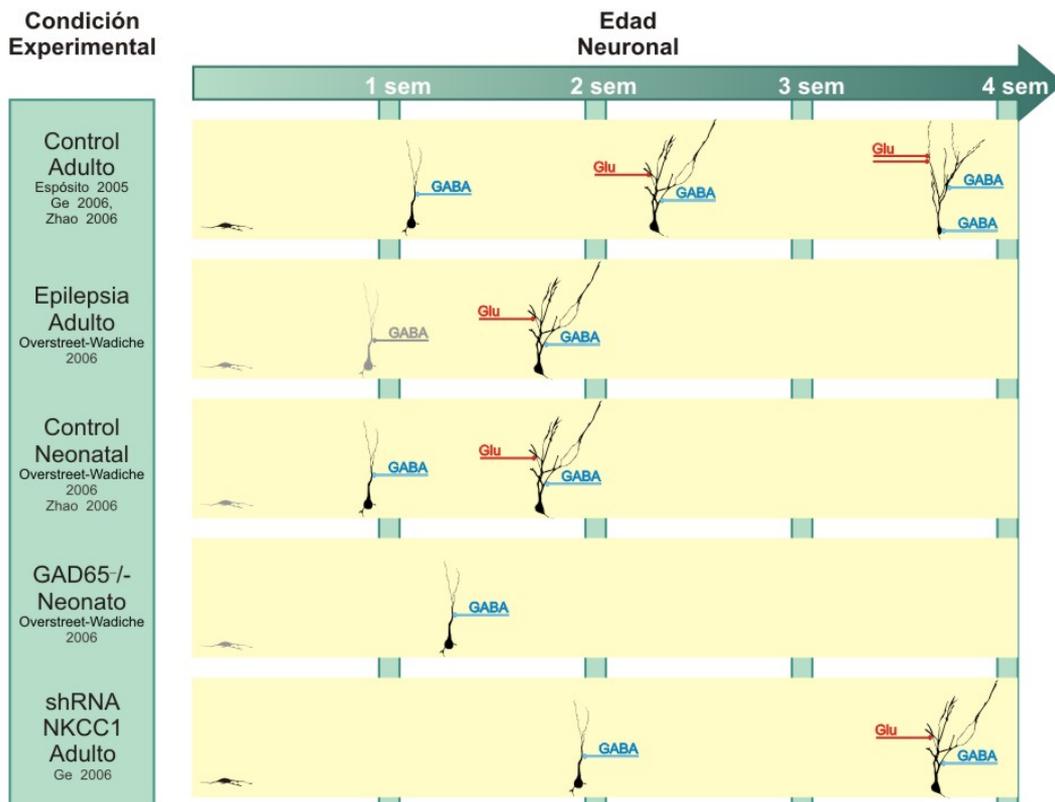


Figura 3.3: Condiciones experimentales que alteran la tasa de maduración de las neuronas acelerándola o retrasándola respecto de la situación control. La aparición de la aferencia GABAérgica se indica con terminales azules, y con terminales rojos el comienzo de la aferencia glutamatergica. Los esquemas en gris indican estadios hipotéticos (modificado de Piatti VC *et al.* 2006)

Independientemente de los mecanismos específicos, estos resultados demuestran la existencia de un proceso dependiente de la actividad como mecanismo involucrado en la maduración de las neuronas granulares del giro dentado tanto en el desarrollo como en la adultez.

Mecanismos de acción de los neurotransmisores en la regulación del desarrollo neuronal

Gracias a los avances logrados en el estudio del desarrollo embrionario hoy se sabe que la actividad del circuito regula el proceso de neurogénesis a través de la liberación de neurotransmisores. La activación de los receptores de neurotransmisores puede generar dos grandes mecanismos de señalización: 1) a través de cambios en el potencial de membrana inducidos por la apertura de canales iónicos; 2) a través de la activación de segundos mensajeros. Para poder comprender si la despolarización neuronal en si misma afecta al desarrollo neuronal sería necesario modificar la respuesta neuronal a los neurotransmisores sin alterar las señales que reciben ni el ambiente que las rodea. Hoy en día se desarrollaron varias herramientas moleculares muy útiles para responder esta pregunta, la mayoría de las cuales han sido utilizadas en el estudio de la neurogénesis durante el desarrollo perinatal. Podemos dividir a estas herramientas en dos grandes categorías:

A- Estrategias que alteran las propiedades de despolarización de la membrana de la neurona en desarrollo, reduciendo la frecuencia de disparo de potenciales de acción y por ende la liberación sináptica:

A1- *Sobreexpresión de un canal de potasio de rectificación entrante (Kir2.1)*: su expresión produce la hiperpolarización de la neurona y la reducción en su resistencia de membrana, logrando así disminuir su excitabilidad. Esta metodología afecta a la acción de los neurotransmisores excitatorios e inhibitorios, ya que estos últimos tienen acción despolarizante durante las primeras etapas del desarrollo neuronal. Esta estrategia afecta específicamente a los cambios de voltaje inducidos por la acción de los neurotransmisores sin alterar la posible señalización a través de receptores metabotrópicos o mecanismos de transducción de señales no canónicos (Johns DC *et al.* 1999; Holt JR *et al.* 1999; Paradis S *et al.* 2001; Burrone J *et al.* 2002; Yu CR *et al.* 2004; Hua JY *et al.* 2005; Hartman KN *et al.* 2006; Cancedda L *et al.* 2007; Mizuno H *et al.* 2007; Pratt *et al.* 2007; Wang CL *et al.* 2007).

A2- *Sobreexpresión del cotransportador de Cl⁻/K⁺ KCC2*: su expresión temprana reduce la concentración intracelular de Cl⁻, evitando la acción despolarizante de GABA en el desarrollo neuronal (Cancedda L *et al.* 2007).

A3- *Expresión de shRNA (short hairpin RNA) contra el transportador de Na⁺/Cl⁻/K⁺ NKCC1*: la falta de expresión de este transportador produce una reducción del

Cl⁻ intracelular, logrando el mismo efecto final que la estrategia anterior (Ge S *et al.* 2006).

B- Estrategias que afectan específicamente la liberación vesicular de neurotransmisor de la neurona en desarrollo:

B1- *Expresión de la cadena liviana de la toxina tetánica (TeTxLC)*: esta toxina tiene la propiedad de cortar específicamente a la proteína VAMP2, la cual es esencial para la fusión vesicular en el terminal sináptico, impidiendo la liberación vesicular tanto evocada como espontánea (Yamamoto M *et al.* 2003; Yu CR *et al.* 2004; Wang CL *et al.* 2007).

B2- *Expresión de un dominante negativo de VAMP*: bloquea la liberación vesicular de neurotransmisores (Hua JY *et al.* 2005).

B3- *Expresión de iRNA contra el canal de sodio activable por voltaje (Nav)*: el bloqueo simultáneo en la expresión de 3 isoformas de Nav (Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3) produce la ausencia completa de potenciales de acción (Hartman KN *et al.* 2006).

Los dos grupos de estrategias definidos permiten estudiar diferentes etapas del desarrollo neuronal: con el primer grupo de herramientas es posible estudiar el efecto de la actividad a partir de las primeras etapas de diferenciación, gracias a la expresión temprana de receptores a neurotransmisores funcionales; en cambio, el segundo grupo de herramientas permiten el estudio de la función de la liberación de neurotransmisores en etapas más tardías del desarrollo neuronal. Por lo tanto, la combinación de estas herramientas permite obtener resultados muy interesantes acerca de los mecanismos dependientes de actividad que gobiernan el proceso de neurogénesis.

La expresión de TeTxLC o un dominante negativo de VAMP ha sido utilizada principalmente para el estudio *in vivo* del crecimiento axonal durante la gestación (Yu CR *et al.* 2004; Hua JY *et al.* 2005; Wang CL *et al.* 2007). En estos trabajos se encontró que el crecimiento axonal hacia su target no está afectado por la falta de transmisión sináptica. Sin embargo, se observa una reducción en la capacidad de ramificación del axón, y una progresiva desestabilización de las sinapsis formadas que, en algunos casos, produce la muerte neuronal. Estos efectos desaparecen en condiciones donde todas las neuronas se encuentran afectadas por el tratamiento. Por lo tanto, y en semejanza con lo que ocurre con la inervación muscular, la desestabilización de los terminales no funcionales parece estar dada por proceso de competencia en el que se seleccionan las conexiones más activas (Buffelli M *et al.*

2004). Estos autores además compararon los resultados anteriores con los obtenidos luego de la sobreexpresión de Kir2.1, encontrando un retraso en el crecimiento axonal sumado a los defectos anteriormente mencionados. Una hipótesis posible sería que inicialmente la actividad neuronal podría regular la expresión de receptores para las claves ambientales que guían el crecimiento axonal, y una vez formadas las sinapsis estas serían mantenidas a través de señales retrogradas dependientes de la actividad sináptica específicamente. Si bien en estos trabajos solo se analizan las propiedades del crecimiento axonal, estudios posteriores utilizando la estrategia de sobreexpresión de Kir2.1 y KCC2 *in vivo*, demostraron una alteración en el desarrollo del árbol dendrítico sin ser alterada la migración neuronal (Cancedda L *et al.* 2007). De esta manera queda evidenciado que la actividad neuronal puede tener diferentes roles en el proceso de desarrollo embrionario.

El trabajo reciente de Ge y colaboradores resalta la importancia de la actividad GABAérgica despolarizante en la maduración neuronal en el giro dentado adulto (Ge S *et al.* 2006). En las neuronas inmaduras la concentración de Cl⁻ intracelular es más elevada que en las neuronas maduras debido a una alta expresión de NKCC1, que transporta Cl⁻ al interior celular de manera tal que el potencial de equilibrio del Cl⁻ es más despolarizado. Estos autores bloquearon la expresión de NKCC1 en las neuronas nuevas utilizando un retrovirus conteniendo un shRNA específico con el fin de impedir la acción despolarizante de GABA durante las primeras etapas del desarrollo. Como consecuencia del tratamiento la maduración neuronal se vio retrasada más de una semana, alterando el desarrollo de la aferencia GABAérgica y glutamatérgico, y el crecimiento del árbol dendrítico (Figura 3.3). Dado que el retraso en la maduración ocurre antes que el desarrollo de la aferencia GABAérgica, es posible que el mecanismo de regulación involucre la acción de GABA tónico o ambiental. Estas observaciones apuntan hacia un rol permisivo en vez de instructivo del GABA despolarizante ya que si bien la velocidad de maduración está afectada, las neuronas en desarrollo finalmente logran integrarse al circuito. Sin embargo, dada la reciente descripción del rol estructural de KCC2 en el desarrollo de las espinas dendríticas (Li H *et al.* 2007), es posible que el mecanismo involucrado en este trabajo no esté mediado por la acción de GABA sino por alguna función específica de NKCC1 aún no conocida.

En conclusión, con las herramientas actuales es posible estudiar de manera específica el mecanismo de acción de los neurotransmisores en las diferentes etapas del desarrollo neuronal.

Canales de potasio de rectificación entrante (Kir)

Los canales de potasio con rectificación entrante fueron descritos por primera vez por Katz en 1949 en músculo esquelético. Estos canales tienen la propiedad de conducir mayor corriente entrante que saliente dando como resultado una curva I-V característica (Figura 3.4 A). Su dependencia del voltaje se debe al bloqueo del poro por el Mg^{++} y las poliaminas intracelulares cuando la corriente es saliente (Doupnik CA *et al.* 1995). En cambio, se postula

que cuando la corriente es entrante el K^+ puede desplazar a los agentes bloqueantes de sus sitios de unión al canal. Por lo tanto, la conductancia de los canales Kir depende del voltaje aunque no son activables por voltaje, ya que su apertura o cierre no cambia en función del potencial de membrana. Más aún, cuando la concentración de K^+ extracelular cambia, el potencial de equilibrio de K^+ cambia siguiendo la ecuación de Nerst, y la dependencia del voltaje del canal también se modifica de manera tal de preservar su propiedad de rectificación entrante (Figura 3.4 B) (Isomoto *et al.* 1997). Este tipo de dependencia del voltaje le permite a los canales Kir cumplir no solo un rol fundamental en el establecimiento del potencial de reposo y la resistencia de la membrana, sino que además, están involucrados en el procesamiento somatodendrítico actuando como un filtro, ya que la conductancia del canal será mayor cuando las respuestas sinápticas sean pequeñas, favoreciendo los inputs fuertes y repetidos (Takigawa T y Alzheimer C 2002). Sin embargo, la expresión de los canales Kir no se limita a células excitables. También se expresa en glía, donde cumple un rol fundamental manteniendo constantes los niveles de K^+ del medio extracelular, en cardiomiocitos donde regula la frecuencia cardíaca, en músculo regulando el tono muscular, en el páncreas regulando la liberación de insulina y en riñón participando en el flujo de K^+ .

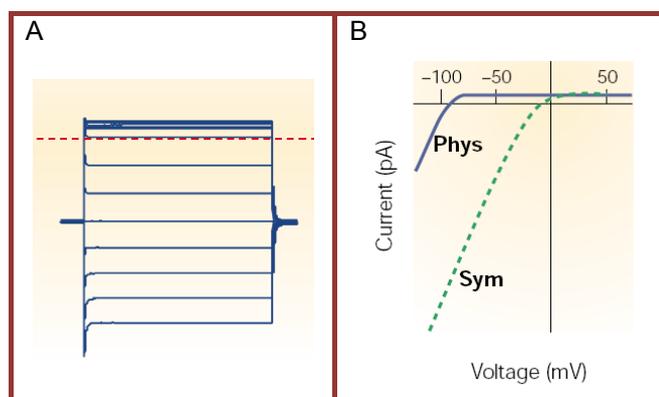


Figura 3.4 A: Ejemplo ideal de las corrientes inducidas por la aplicación de escalones de voltajes sucesivos desde -80 hasta 60 mV en condiciones de K^+ simétrico. La línea punteada roja demarca los 0 mV. Notar la pequeña corriente saliente y la gran corriente entrante característica de los canales Kir. B: Gráfico I-V obtenido a partir de los resultados de A (trazo verde punteado). El trazo azul representa la respuesta inducida por la aplicación del mismo protocolo pero a concentraciones de K^+ fisiológicas. (Goldstein SA *et al.* 2001).

En 1993 se logró el primer clonado de un canal de rectificación entrante permitiendo el conocimiento de su estructura molecular (Kubo Y *et al.* 1993). Hoy se sabe que todos los canales Kir poseen una misma estructura, caracterizada por la presencia de dos regiones de paso transmembrana (M1 y M2) y una región formadora de poro (P o H5), y la ausencia de un dominio sensor de voltaje (Figura 3.5 a). El canal activo está formado por 4 subunidades, pudiendo formarse tanto un homo- como un heterotetrámero pero siempre combinando subunidades de una misma subfamilia (Figura 3.5 b y c) (MacKinnon R 1991; Yang J *et al.* 1995).

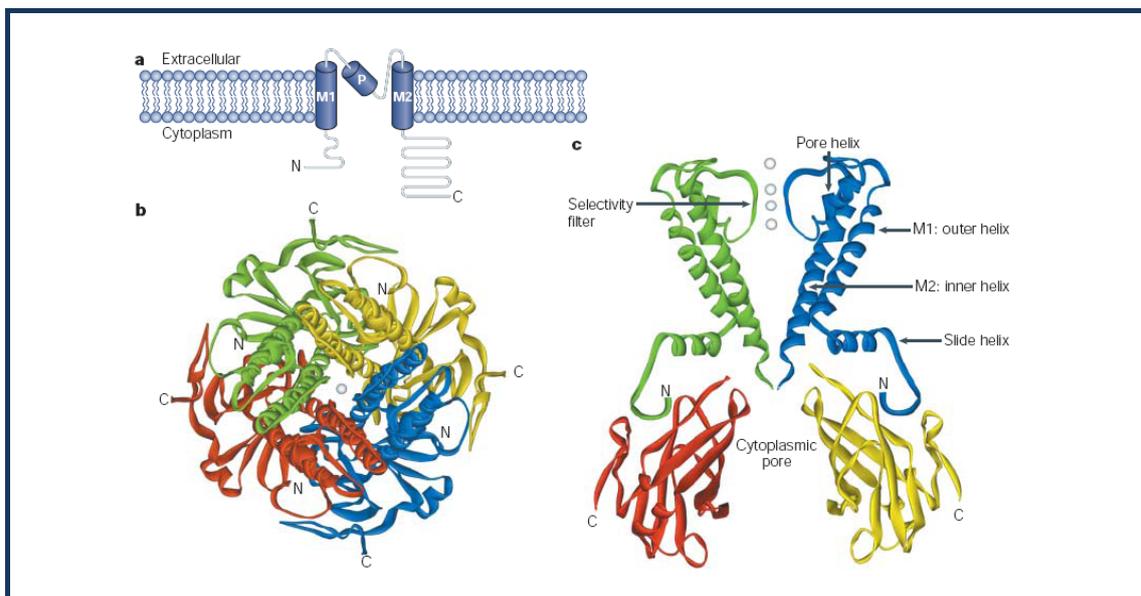


Figura 3.5 Estructura de los canales Kir. A: Esquema de la localización en la membrana de una subunidad del canal de Kir. Cada subunidad está compuesta por dos regiones α hélice (M1 y M2), la región del poro (P) y los dominios citoplasmáticos formados por los extremos amino y carboxi terminal (N y C respectivamente). B: Vista superior desde el lado extracelular de la estructura tetramérica del canal Kir. Cada monómero está individualizado por un color diferente (rojo, azul, amarillo, y verde). La región del poro está marcada por una esfera blanca que representa al ion K^+ . C: Vista lateral del canal Kir mostrando solo los dominios transmembrana de dos subunidades (verde y azul) y los dominios citoplasmáticos de las subunidades vecinas (rojo y amarillo). Se destaca la hélice que forma el filtro de selectividad del poro (Bichet D *et al.* 2003).

Los canales de potasio pueden discriminar entre los dos cationes más abundantes del medio, K^+ y Na^+ . La selectividad está dada por las propiedades del filtro, definido como la parte más angosta del canal de conducción en el estado abierto.

Un alineamiento de secuencia de la región del poro revela un dominio aminoacídico de 8 residuos altamente conservados (TxxTxGYG) que estaría cumpliendo la función de filtro de selectividad iónica de los canales Kir (Figura 3.6) (Doyle DA *et al.* 1998; Isomoto *et al.* 1997; Bichet D *et al.* 2003). Por lo tanto este dominio es el principal blanco de mutaciones con el fin de obtener versiones no conductivas del canal.

	8	9	10	11	12	13	14	15
Kv channels	T(S)	M	T	T	V(L)	G	Y	G
Mouse <i>slo</i>	T	M	S	T	V	G	Y	G
Mouse <i>eag</i>	S	L	T	S	V	G	F	G
Mouse IRK1 (Kir2.1)	T	Q	T	T	I	G	Y	G
Mouse IRK2 (Kir2.2)	T	Q	T	T	I	G	Y	G
Mouse IRK3 (Kir2.3)	T	Q	T	T	I	G	Y	G
Mouse GIRK1 (Kir3.1)	T	E	A	T	I	G	Y	G
Mouse GIRK2 (Kir3.2)	T	E	T	T	I	G	Y	G
Mouse GIRK3 (Kir3.3)	T	E	T	T	I	G	Y	G
Rat GIRK4 (Kir3.4)	T	E	T	T	I	G	Y	G
Mouse uK _{ATP} -1 (Kir6.1)	V	Q	V	T	I	G	F	G
Mouse BIR (Kir6.2)	V	Q	V	T	I	G	F	G
Rat ROMK1 (Kir1.1)	T	Q	V	T	I	G	Y	G
Rat K _{ATP} -2 (Kir4.1)	S	Q	T	T	I	G	Y	G
Rat BIR9 (Kir5.1)	T	Q	T	T	I	G	Y	G
Human TWIK-1(P1)	V	L	S	T	T	G	Y	G
Human TWIK-1(P2)	S	L	S	T	I	G	L	G

Figura 3.6 Alineamiento de los residuos aminoacídicos de la región del poro de varios canales de K⁺ (Isomoto *et al.*1997).

A partir del avance en los clonados de los diferentes tipos de canales Kir se pudieron definir 7 subfamilias (Kir1-7) (Xie LH *et al.* 2007):

- Kir1.x (o ROMK): son canales de rectificación débil y dependientes de ATP, localizados principalmente en riñón pero también en cerebro. Su activación está regulada por kinasas (PKA y PKC) y son sensibles a pH.
- Kir2.x (o IRKx): son los canales conocidos como clásicos. Son de rectificación fuerte y se localizan en cerebro y cardiomiocitos.
- Kir3.x (o GIRKx): son canales de rectificación fuerte activables por acetilcolina vía proteína G y regulan la frecuencia cardíaca. Además, son regulados por Na⁺.
- Kir4.1 y Kir5.1: son expresados predominantemente en el tallo cerebral y son regulados por pH.
- Kir6.x: son parte del canal de potasio sensible a ATP (K_{ATP}) junto con el receptor de sulfonilurea (SUR). Son de rectificación débil y se localizan en neuronas, células β del páncreas, y miocitos en general.
- Kir7: está ampliamente distribuido (cerebro, riñón, intestino).

Si bien las 7 subfamilias de Kir poseen la misma estructura molecular, su distribución y regulación es muy diferente. En particular, en el giro dentado del hipocampo se expresan fuertemente las subunidades Kir3.x y Kir2.x, tanto en la capa granular, como en la molecular y en el hilus (Horio Y *et al.* 1996; Karschin C *et al.* 1996; Miyashita T y Kubo Y 1997).

A pesar de ser definidos originariamente como canales de fuga, la conductancia de los canales Kir posee múltiples señales regulatorias que abarcan desde el nivel de

energía intracelular hasta la acción de neurotransmisores. De todos ellos, la subunidad Kir2.1 posee la regulación más simple, ya que la apertura de este canal es modulada únicamente por la presencia de fosfatidilinositolbifosfato (PIP₂) en la membrana (Xie LH *et al.* 2007; Rapedius M *et al.* 2007).

Hipótesis

Teniendo en cuenta la similitud en la secuencia de desarrollo neuronal del giro dentado adulto y del desarrollo postnatal temprano, es válido pensar que los progenitores neurales poseen un programa intrínseco de desarrollo que determinaría el establecimiento sucesivo de la conectividad aferente. En favor de esta hipótesis, la totalidad de los trabajos realizados en busca de factores extrínsecos que regulen el proceso de neurogénesis no lograron modificar la secuencia de desarrollo descrita. Sin embargo, dichos trabajos sí describieron cambios temporales en el proceso de desarrollo neuronal. Por lo tanto, nosotros postulamos que el desarrollo neuronal está organizado en forma de escalones discretos y sucesivos, que incluyen:

- 1) determinación del fenotipo neuronal
- 2) capacidad de disparo de potenciales de acción
- 3) innervación GABAérgica sobre las dendritas
- 4) desarrollo de la conectividad glutamatérgica y maduración de la excitabilidad
- 5) innervación GABAérgica perisomática

En este esquema de desarrollo las propiedades de cada etapa están determinadas genéticamente, pero el desencadenamiento del plan genético depende de señales ambientales. Más aún, el programa genético de cada etapa incluiría la expresión de receptores o sensores de señales específicas de forma tal de garantizar la secuencia del proceso de desarrollo.

Basándonos en los estudios realizados sobre el desarrollo embrionario y en las regiones neurogénicas del adulto, hemos propuesto la hipótesis de que la actividad del circuito que rodea a una neurona es capaz de *modular* su proceso de desarrollo en el giro dentado adulto. En particular, postulamos que la activación (spiking) de una neurona como consecuencia de la actividad circundante es señal suficiente para desencadenar mecanismos que modulan su desarrollo neuronal.

Objetivos generales

Dado que la expresión de receptores para neurotransmisores comienza desde el inicio del desarrollo neuronal y que el establecimiento de los aferentes sinápticos es un proceso secuencial, es posible postular que los neurotransmisores cumplen diferentes funciones a lo largo de la maduración neuronal. Además, teniendo en cuenta que las

neuronas nuevas son capaces de disparar potenciales de acción, aunque inmaduros, desde el comienzo de su desarrollo, la actividad del circuito podría generar el disparo de espigas durante cualquier estadio de la maduración neuronal.

Por lo tanto, nuestro principal objetivo es estudiar si el disparo de potenciales de acción es capaz de modular el desarrollo neuronal en el giro dentado adulto. De ser así, nos proponemos analizar en qué etapas la excitabilidad es necesaria para el correcto desarrollo neuronal y qué efectos específicos posee.

Estrategia

Para poder estudiar el rol específico de la excitabilidad en el proceso de desarrollo neuronal es necesario modificar la capacidad de respuesta de la neurona en desarrollo, sin alterar las señales ambientales que recibe. Nuestro principal objetivo fue reducir la excitabilidad de las neuronas nacidas en el giro dentado adulto sobreexpresando el canal Kir2.1 en forma autónoma de célula. Mediante esta estrategia se buscó reducir la resistencia de membrana de la neurona en desarrollo y, en consecuencia, su capacidad de disparo de potenciales de acción ante estímulos fisiológicos intactos. Para dirigir la sobreexpresión de Kir2.1 a las neuronas nacidas en el giro dentado de ratones adultos fue necesario modificar el genoma retroviral para codificar el cDNA de Kir2.1 y de GFP bajo un promotor constitutivo fuerte. De esta manera fue posible identificar las neuronas nuevas que sobreexpresan Kir2.1 a través de la expresión de GFP tanto en tejido vivo como fijado. Dado que la sobreexpresión de Kir2.1 podría generar efectos inespecíficos no relacionados con la reducción en la excitabilidad, se utilizó como control la sobreexpresión de una versión mutada del canal Kir2.1 que no es capaz de conducir corriente.

Objetivos específicos

El primer objetivo fue realizar la modificación del genoma retroviral y comprobar el funcionamiento de la estrategia descrita en cultivo e *in vivo*. Luego, nos propusimos estudiar posibles alteraciones en el desarrollo neuronal. Para ello se estudiaron las propiedades intrínsecas, morfológicas y la conectividad de las neuronas con excitabilidad reducida a lo largo de su desarrollo.

Capítulo II

3.2 Resultados

Clonado de Kir2.1 y Kir2.1 mutado

Para realizar la modificación del genoma del retrovirus se utilizaron dos plásmidos:

- un plásmido comercial conteniendo el cDNA de Kir2.1.
- un plásmido del genoma viral conteniendo el promotor CAG (promotor constitutivo fuerte) seguido de algunos sitios de clonado y río abajo una secuencia IRES (sitio de unión interno para ribosomas) seguida de la secuencia del gen de GFP.

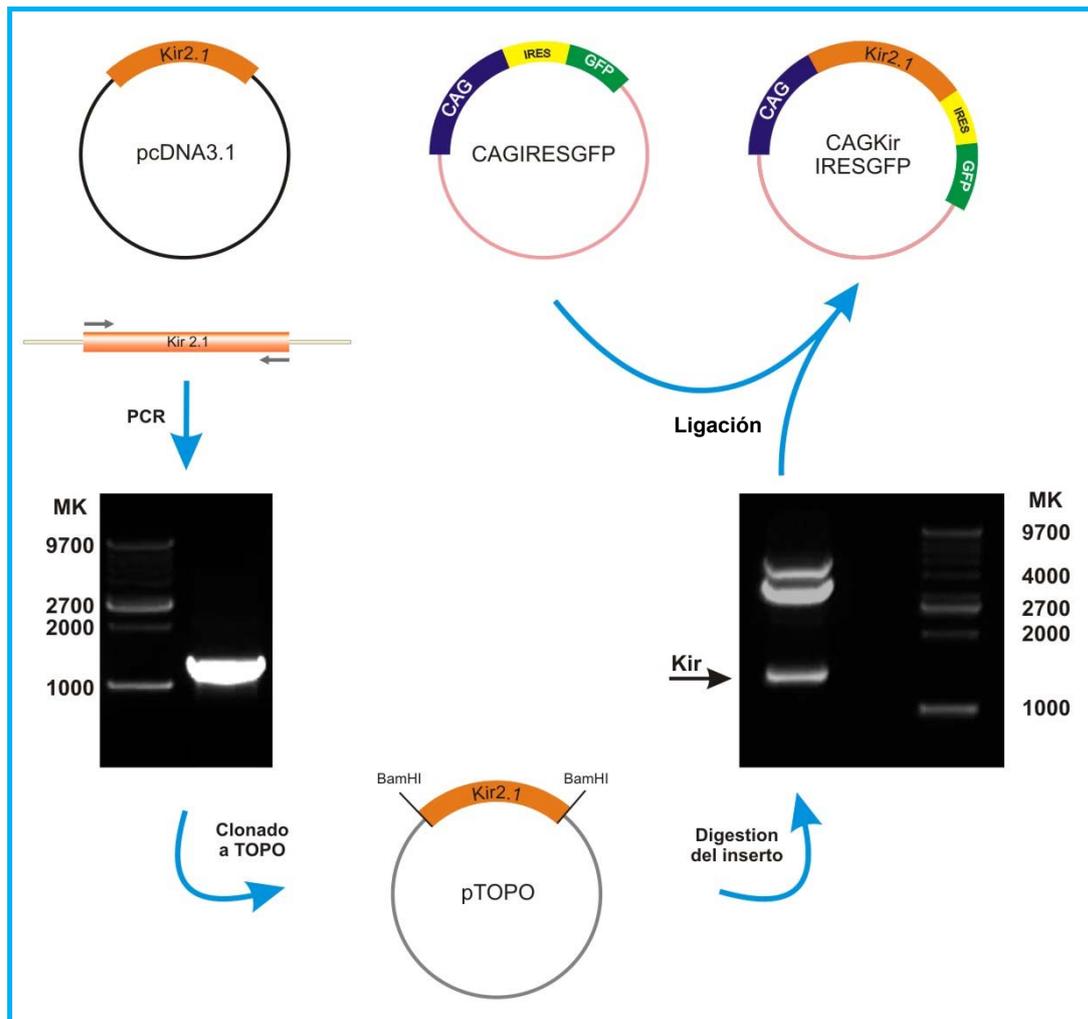


Figura 3.7 Esquema del clonado del cDNA de Kir2.1 en el genoma retroviral. pcDNA3.1 Kir2.1 es un plásmido comercial que contiene el cDNA de Kir2.1, CAGIRESGFP es el plásmido correspondiente al genoma retroviral, pTOPO Kir2.1 es un vector comercial en el que se subclonó el cDNA de Kir2.1, y CAGKir2.1IRESGFP es el plásmido del genoma viral conteniendo el cDNA de Kir2.1. MK: marcador de peso molecular.

Básicamente, el objetivo consistió en clonar el cDNA de Kir2.1 entre el promotor CAG y la secuencia IRES. Dado que el plásmido del genoma viral posee un limitado número de sitios de restricción, se agregó por PCR la secuencia de la enzima de restricción BamHI en los extremos del cDNA de Kir2.1. Luego, el fragmento amplificado fue subclonado en el vector comercial TOPO, y las colonias obtenidas

fueron testeadas mediante el análisis de patrones de restricción y por secuenciación. Finalmente, el DNA plasmídico proveniente de la colonia positiva fue cortado con BamHI para aislar el fragmento conteniendo el cDNA de Kir2.1 y luego ligarlo al vector del genoma viral. El esquema de los vectores usados y los pasos del clonado se muestran en la Figura 3.7. Los detalles del procedimiento están descritos en la sección de materiales y métodos.

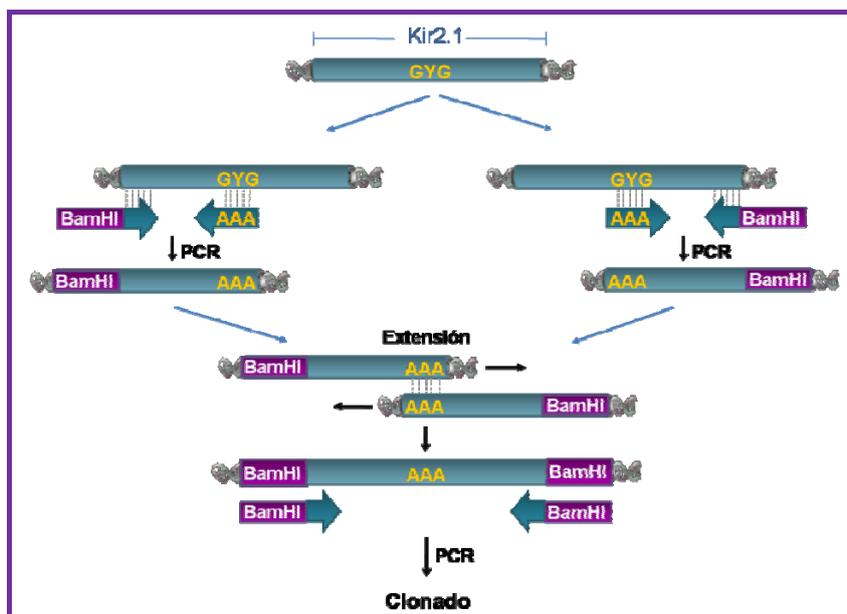


Figura 3.8 Esquema del procedimiento de mutagénesis del cDNA de Kir2.1 por “PCR overlap”. Se diseñaron primers que aparean en la región del poro del canal pero con 4 nucleótidos cambiados, de forma tal que codifiquen para 3 alaninas en vez de glicina-tirosina-glicina. Los primers que contienen la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción BamHI son los mismos que los utilizados para el clonado de Kir2.1. El protocolo consistió en realizar dos PCRs con los primers mutados y los primers conteniendo la secuencia BamHI. Luego se juntaron los productos de las PCRs, que tienen en común parte de la secuencia de la región del poro, y se realizó la extensión de los mismos. Una vez obtenido el cDNA de Kir2.1 mutado, se amplificó dicho producto por PCR y luego se procedió al clonado del mismo de igual manera que en el clonado de Kir2.1 salvaje.

Dado que la sobreexpresión de una proteína en una célula puede tener muchos efectos secundarios, se utilizó como control de los experimentos la sobreexpresión de una versión mutada de Kir2.1 (Kirmut) no funcional, ya utilizada y caracterizada por otros trabajos (Burrone J *et al.* 2002; Hua JY *et al.* 2005; Hartman KN *et al.* 2006; Wang CL *et al.* 2007). En esta proteína mutante los aminoácidos GYG (glicina-tirosina-glicina) de la región del poro fueron modificados por AAA (alaninas). Dado que los residuos GYG forman parte del filtro de selectividad del poro (ver Figura 3.6 en la introducción del presente capítulo), su mutación generó un canal que no conduce corriente. Por lo tanto, esta mutación sería un excelente control de especificidad en nuestros experimentos. Sin embargo, dado que los canales Kir forman tetrámeros y que las células granulares expresan Kir2.x, podría darse el caso en el que la

sobreexpresión de Kirmut actúe como dominante negativo. De ser así, la sobreexpresión de Kirmut podría aumentar la resistencia de la membrana provocando un aumento en la excitabilidad neuronal. Este control sería aún más interesante, ya que nos permitiría comparar los efectos en el desarrollo neuronal producto de manipulaciones antagónicas en la excitabilidad.

La generación del mutante y su clonado en el vector del genoma retroviral fueron realizados por María Georgina Davies. Como estrategia de mutación se utilizó la técnica de PCR overlap (Figura 3.8) para luego seguir la misma estrategia de clonado del Kir2.1, exceptuando que el genoma viral donde se clonó Kirmut posee como reportero al gen de la proteína fluorescente roja (RFP) en lugar de GFP.

Funcionalidad de los clonados en cultivos celulares

Una vez finalizados y secuenciados los clonados, se utilizaron células en cultivo para confirmar la expresión funcional de los transgenes. Con este fin se transfectaron de manera transitoria células HEK 293T con el vector retroviral modificado para la expresión de Kir2.1 y GFP (vector Kir), o con el vector que expresa la versión mutada de Kir2.1 y RFP (vector Kirmut). Luego de dos días de la transfección se verificó por medio de microscopía de fluorescencia la expresión de GFP y RFP como indicadores de la expresión del RNA bicistrónico.

Una vez que fue confirmada la expresión funcional de las proteínas fluorescentes, se estudió la funcionalidad de los canales expresados mediante la técnica de patch clamp en configuración whole-cell (Figura 3.9). Mediante esta técnica es posible identificar la expresión de Kir2.1 por su característica curva I-V de rectificación entrante (ver Figura 3.4 en la introducción del presente capítulo). Para esto se transfectaron células HEK 293T en forma transitoria con los siguientes vectores:

- 1) Vector retroviral sin modificar (CAG-GFP): para ser utilizado como control de los experimentos.
- 2) Vector Kir (CAG-Kir-IRES-GFP): para estudiar si Kir2.1 es funcional.
- 3) Vector Kirmut (CAG-Kirmut-IRES-RFP): para determinar la funcionalidad de la proteína mutante.
- 4) Los vectores Kir y Kirmut en igual proporción: para estudiar si Kirmut podría actuar como dominante negativo en células que expresan Kir2.1. De esta manera además se lograría verificar la expresión de Kir2.1mut.

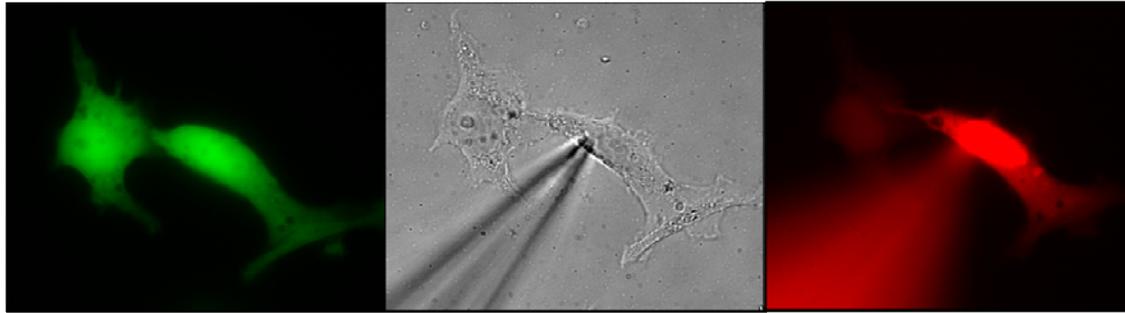


Figura 3.9 Ejemplo de whole-cell patch clamp en células en cultivo. Izquierda: Ejemplo de dos células HEK 293T GFP⁺ transfectadas con el vector CAG-Kir-IRES-GFP. Medio: Imagen de las mismas células con luz transmitida. Se observa la pipeta de patch tocando el citoplasma de la célula derecha. Derecha: Foto de las células tomada luego del registro en whole-cell patch clamp. En rojo se observa la fluorescencia del colorante Alexa 594 en la pipeta de patch y en la célula registrada.

Luego de 2 días de transfección se midieron las propiedades eléctricas de las células transfectadas, identificadas por la expresión de la proteína fluorescente correspondiente. Para identificar la presencia de canales Kir se realizó un protocolo en voltage-clamp que consiste en aplicar escalones de voltaje creciente desde -130mV a -10mV y medir la corriente inducida en respuesta a dichos escalones (Figura 3.10 A-D). Una célula que no posee canales dependientes de voltaje debería responder con una corriente proporcional al escalón aplicado independientemente de si la corriente es entrante o saliente. Este fue el caso de las células transfectadas con el vector CAG-GFP (Figura 3.10 A), por lo que se pudo concluir que las células HEK 293T no expresan canales de rectificación entrante endógenos.

En cambio, las células transfectadas con el vector Kir presentaron una corriente entrante de mayor amplitud que la saliente, demostrando que dicho vector es capaz de expresar canales Kir2.1 funcionales (Figura 3.10 B). Cuando se analizaron las corrientes inducidas por este protocolo en las células transfectadas con el vector Kirmut se encontró que las corrientes entrantes y salientes registradas eran proporcionales a los escalones de voltaje aplicados (Figura 3.10 C). La falta de rectificación entrante podría indicar que la mutación de Kir2.1 dio, como esperábamos, un canal no funcional, o bien que el canal Kirmut no se está expresando o está siendo degradado. Finalmente, en las células que fueron transfectadas con los dos vectores se observó la presencia de una corriente rectificante pero de menor amplitud que en las células transfectadas con el vector Kir únicamente (Figura 3.10 D), lo cual permite concluir que Kirmut se está expresando normalmente pero es un canal no conductor (ver más adelante).

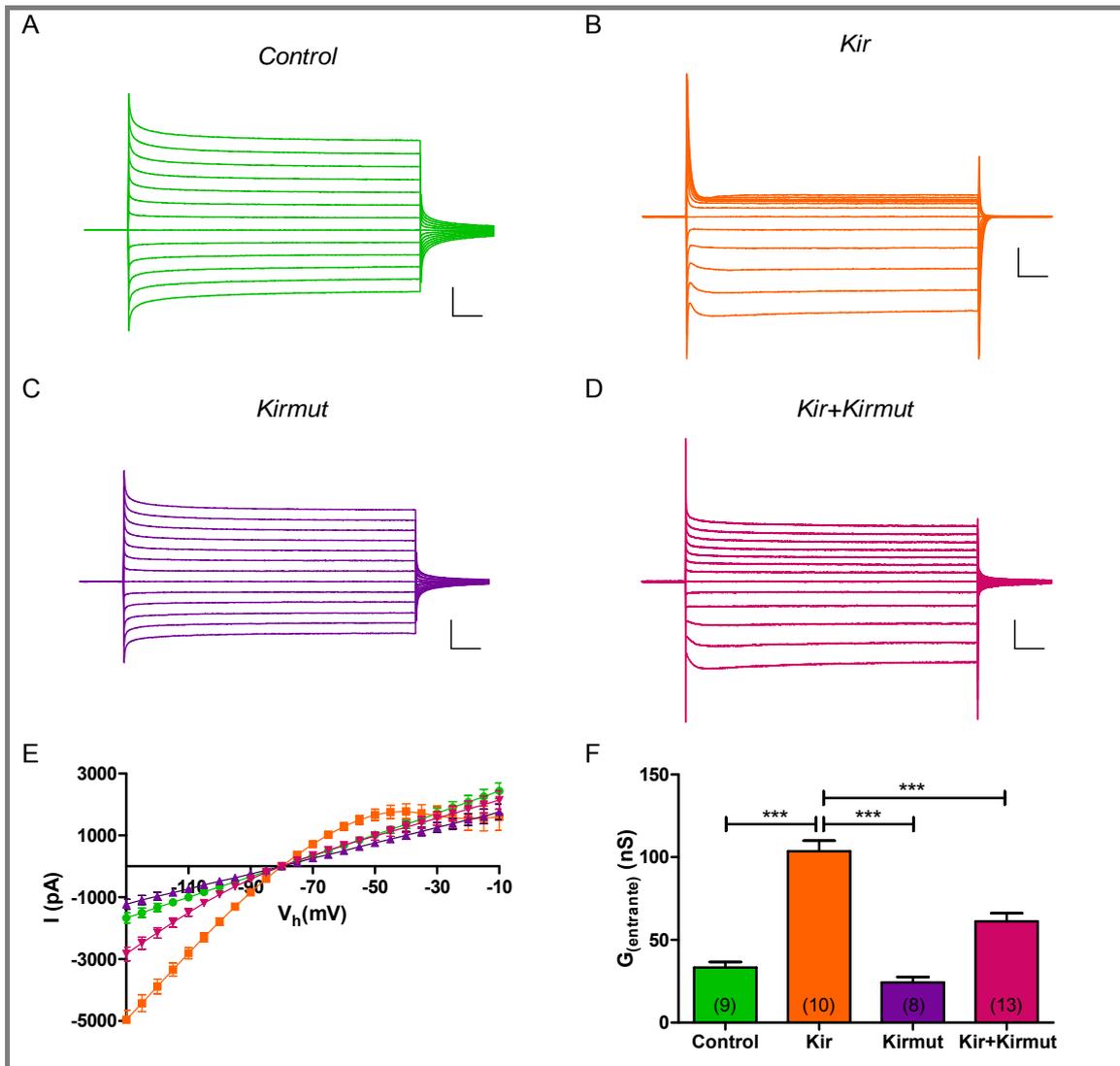


Figura 3.10 Corrientes de rectificación entrante en células en cultivo. A-D: Ejemplos representativos de las corrientes inducidas en respuesta a escalones de voltaje creciente desde -130 mV a -10 mV, partiendo desde -80 mV, en células HEK 293T transfectadas con los siguientes vectores: CAG-GFP (A, control), Kir (B), Kirmut (C), y Kir + Kirmut (D). Los escalones de voltaje son de 10 mV de amplitud y 100 ms de duración. Las escalas corresponden a 10 ms y 1 nA en todos los gráficos. E: Curva I-V obtenida a partir de la corriente en el estado estacionario en función del voltaje aplicado en el escalón (V_h). Cada punto representa el promedio \pm ES de la corriente medida en cada célula por grupo. F: Promedio de los valores de conductancia entrante obtenidos a partir de la curva I-V de cada célula individualmente. El valor de conductancia entrante fue medido como la pendiente de la curva I-V desde -130 mV a -90 mV mediante una regresión lineal. En paréntesis se indica el número de células de cada grupo experimental. Las comparaciones estadísticas fueron realizadas mediante un ANOVA de una vía ($p < 0.0001$) y un post-test de Bonferroni ($***p < 0.001$). Todas las comparaciones dieron significativas a excepción de la comparación control vs Kirmut. El gráfico muestra el promedio \pm ES y las comparaciones estadísticas más relevantes.

Una manera simple de representar estos datos es realizando una curva I-V, donde la corriente es medida en el estado estacionario y graficada en función del voltaje del escalón correspondiente (Figura 3.10 E). Cuando las corrientes entrantes y salientes son proporcionales a los escalones aplicados la curva I-V es una recta, demostrando la ausencia de canales dependientes de voltaje. Este fue el caso para las células transfectadas con los vectores CAG-GFP y Kirmut. En cambio, en las curvas I-V de las células transfectadas con el vector Kir únicamente o con los vectores Kir + Kirmut se

observó la característica curva de rectificación entrante. Sin embargo, la corriente promedio obtenida durante los escalones hiperpolarizantes en las células que expresan Kir2.1 es notablemente mayor que la corriente de las células doblemente transfectadas, sugiriendo que Kirmut estaría actuando como dominante negativo en células en cultivo.

Finalmente, es posible obtener un valor de conductancia máxima de la corriente entrante (G_{entrante}) de cada célula calculando la pendiente de las curvas I-V a voltajes hiperpolarizantes por medio de una regresión lineal. De esta manera pudimos comparar cuantitativamente a los 4 grupos estudiados y confirmar las observaciones descritas anteriormente (Figura 3.10 F).

Para verificar que la G_{entrante} observada en las células transfectadas con el vector Kir estaba mediada por canales Kir2.1 específicamente, se estudió el efecto de la aplicación de BaCl_2 200 μM , bloqueante de la familia de canales de rectificación entrante (Figura 3.11). Como era de esperar, la aplicación de BaCl_2 en células controles no afectó la amplitud de las corrientes ni la linealidad de la curva I-V (Figura 3.11 A y C). En cambio, la administración de BaCl_2 en células transfectadas con Kir redujo las corrientes entrantes y eliminó la rectificación de sus curvas I-V (Figura 3.11 B). Más aún, la conductancia de las células que sobreexpresan Kir2.1 en presencia de BaCl_2 se redujo alcanzando valores similares a las células controles. (Figura 3.11 D).

Es importante notar que el valor de G_{entrante} calculado incluye a la conductancia de los canales de rectificación entrante (si los hay) y al resto de los canales de fuga de la membrana. Es posible calcular el valor de conductancia de Kir específicamente (G_{Kir}) restando la G_{entrante} total menos la G_{entrante} luego del bloqueo por BaCl_2 . Dicho análisis nos proporcionó un valores de G_{Kir} igual a 75.8 ± 15.6 nS, que corresponde a un 84.1% de la G_{entrante} total. Por lo tanto, para el estudio subsiguiente en neuronas del giro dentado se asumirá el uso de G_{entrante} como medida estimada de G_{Kir} . Si bien el valor de conductancia estará sobreestimado, esto permitirá el registro de las neuronas presentes en una misma rebanada sin el peligro de subestimación por un lavado incompleto del BaCl_2 , facilitando la adquisición de datos dado el bajo número de neuronas marcadas. Más aún, en algunos tipos neuronales se ha demostrado que la aplicación de BaCl_2 puede bloquear otros canales de potasio de fuga (Goldstein SA *et al.* 2001), evidenciando que la obtención de G_{Kir} mediante una resta también podría sobreestimar el valor real. La falta de bloqueantes específicos para los canales de potasio de rectificación entrante hace imposible una estimación de G_{Kir} con mayor precisión.

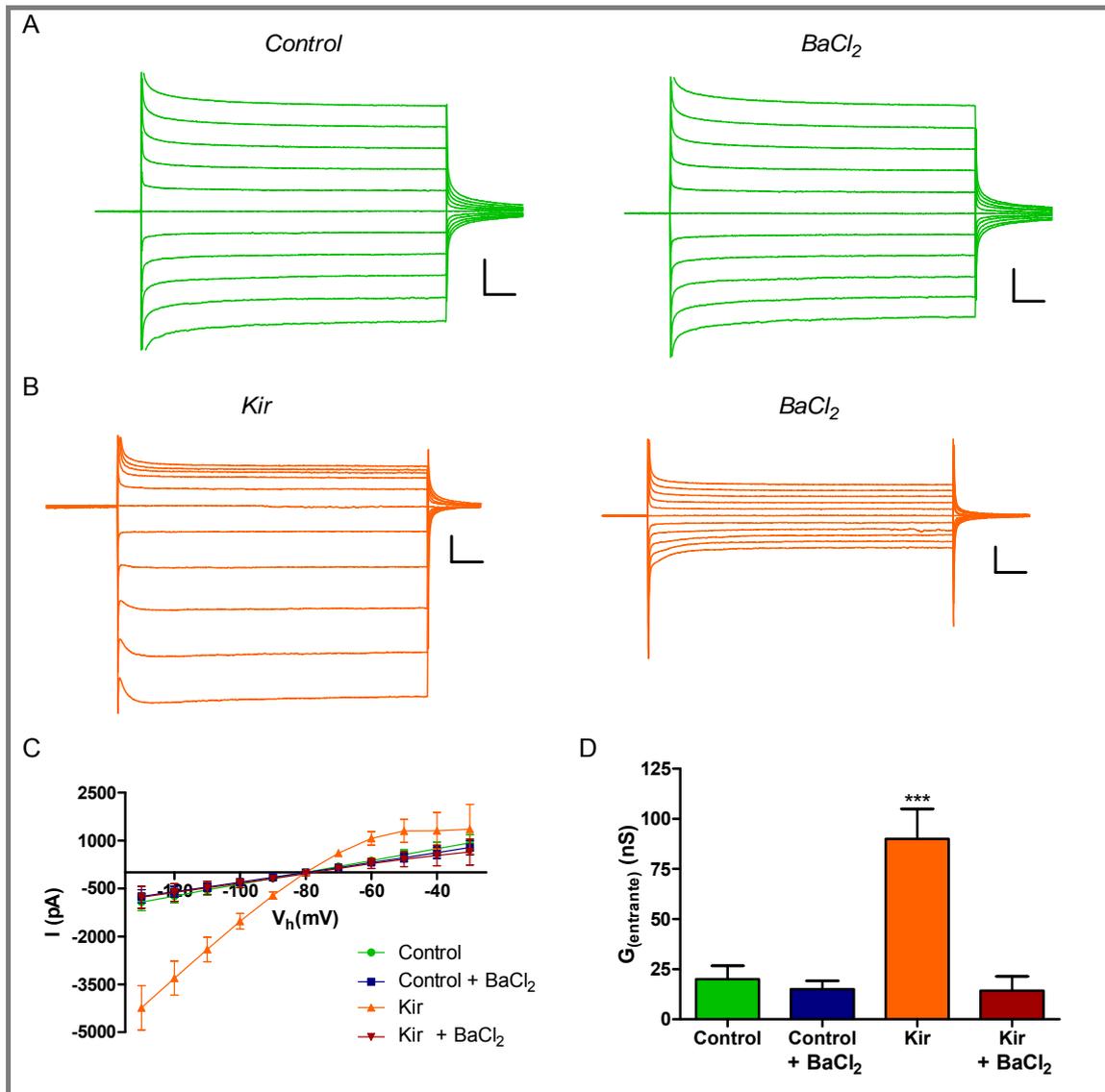


Figura 3.11 Bloqueo de canales de rectificación entrante en cultivo. A y B, izquierda: Ejemplo representativo de las corrientes inducidas en respuesta a escalones de voltaje creciente desde -130 mV a -30 mV, en células HEK 293T transfectadas con el vector CAG-GFP (A, control) o con el vector Kir (B). Derecha: respuestas de las mismas células luego del tratamiento con BaCl₂ 200 μM. Los escalones de voltaje son de 10 mV de amplitud y 100 ms de duración y el voltaje de partida es -80 mV. Las escalas corresponden a 10 ms y 0.5 nA en todos los gráficos. C: Curva I-V obtenida a partir de la corriente en el estado estacionario en función del voltaje aplicado en el escalón. Cada punto representa el promedio ± ES. D: Promedio de los valores de conductancia entrante obtenidos a partir de la curva I-V de cada célula individualmente (control n = 4; Kir n = 5). El valor de conductancia entrante fue medido como la pendiente de la curva I-V desde -130 mV a -90mV mediante una regresión lineal. Las comparaciones estadísticas fueron realizadas mediante un ANOVA de una vía (p<0.0001) seguido del post-test de Bonferroni (***)p<0.001).

Es interesante observar la dependencia del voltaje de los canales Kir2.1 exclusivamente (Figura 3.12). En particular es importante destacar que sólo una pequeña proporción de la corriente de Kir2.1 persiste a potenciales de membrana mayores a -80 mV y luego decrece progresivamente.

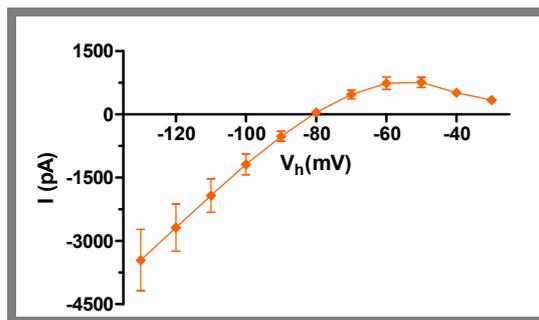


Figura 3.12 Curva I-V de los canales Kir2.1. La curva I-V fue obtenida a partir de la resta de las corrientes inducidas antes y después del bloqueo por BaCl₂ en función del voltaje aplicado en el escalón. Cada punto representa el promedio \pm ES de la corriente medida en cada célula.

Expresión de Kir2.1 *in vivo*

Una vez demostrado que los clonados son funcionales en cultivo, se evaluó si la sobreexpresión de Kir2.1 es funcional *in vivo*. Para ello se aplicó el retrovirus que porta la secuencia CAG-Kir-IRES-GFP en el giro dentado de ratones C57BL/6 de 6-7 semanas de edad mediante una inyección estereotáxica. Tal como se hizo en el capítulo anterior, los ratones fueron mantenidos en jaulas conteniendo ruedas giratorias hasta la realización de los experimentos con el fin de aumentar la tasa de neurogénesis. El nivel de expresión de los canales de rectificación entrante fue estudiado *in vivo* realizando registros de whole-cell patch clamp en rebanadas agudas de hipocampo, como se describió en el capítulo I. El protocolo utilizado para medir las corrientes rectificantes *in vivo* fue idéntico al utilizado en células en cultivo.

Dado que las propiedades eléctricas de las neuronas en desarrollo cambian progresivamente durante su maduración, fue necesario comparar los valores obtenidos en neuronas transducidas con el retrovirus que expresa Kir2.1 con neuronas controles de la misma edad. Para ello también se inyectaron ratones adultos con el retrovirus que expresa sólo GFP bajo el control del promotor CAG (grupo control).

Dado que la expresión de Kir2.1 exógeno está regulada por un promotor constitutivo fuerte, dicho canal debería expresarse desde el inicio del desarrollo neuronal. Por lo tanto, los experimentos de electrofisiología fueron realizados desde 1 a 5 semanas postinyección (spi). Se midieron además las propiedades de rectificación entrante de células granulares maduras no fluorescentes localizadas en la capa más externa de la granular, ya que éstas poseen origen embrionario (Angevine JB Jr 1965, Schlessinger *et al.* 1975, Altman y Bayer 1990; Kempermann G *et al.* 2003).

Si bien es sabido que las neuronas granulares del giro dentado adulto expresan numerosos tipos de canales de rectificación entrante diferentes (Horio Y *et al.* 1996; Karschin C *et al.* 1996; Miyashita T y Kubo Y 1997), poco se sabe del curso temporal del desarrollo de dichos canales. Estudiando las propiedades eléctricas de neuronas de 1 semana de edad transducidas con el vector control, se encontró que las corrientes registradas desde -130 a -40 mV son lineales (Figura 3.13 A, paneles izquierdo y derecho). Una semana más tarde las neuronas nuevas presentaron una pequeña rectificación entrante en sus curvas I-V (Figura 3.13 B, paneles izquierdo y derecho) que aumentó progresivamente con el desarrollo neuronal (Figura 3.13 C-E, paneles izquierdo y derecho). Por lo tanto, es posible concluir que la expresión de canales de rectificación entrante comienza durante la segunda semana del desarrollo neuronal.

Dado que las neuronas granulares del giro dentado adulto de 1 semana de edad no expresan canales de rectificación entrante, este sería un estadio muy adecuado para evaluar la eficacia de la sobreexpresión de Kir2.1 por transducción retroviral. Se estudió entonces qué ocurre en las neuronas infectadas con el retrovirus CAG-Kir-IRES-GFP en dicha etapa del desarrollo. En los experimentos realizados se encontró que dichas neuronas presentan una curva I-V de rectificación entrante característica, demostrando que la sobreexpresión de Kir2.1 produce canales funcionales *in vivo* (Figura 3.13 A, paneles medio y derecho).

Una vez demostrada la funcionalidad de nuestro sistema retroviral *in vivo*, nos preguntamos si la sobreexpresión de Kir2.1 se mantiene durante todo el desarrollo neuronal o si por el contrario, la neurona es capaz de desarrollar mecanismos de compensación que mantengan invariables los niveles de canales de rectificación entrante. Se compararon entonces las propiedades de las corrientes de rectificación entrante de neuronas maduras (sin transducir) y neuronas de 2 a 5 semanas de edad transducidas con el retrovirus que expresa Kir2.1 o el retrovirus control. Se observó que las corrientes de rectificación entrante son significativamente mayores en las células que sobreexpresan Kir2.1 respecto de las células controles durante todo el desarrollo neuronal (Figura 3.13). Por lo tanto, no parece haber mecanismos de compensación homeostáticos que impidan la sobreexpresión de Kir2.1.

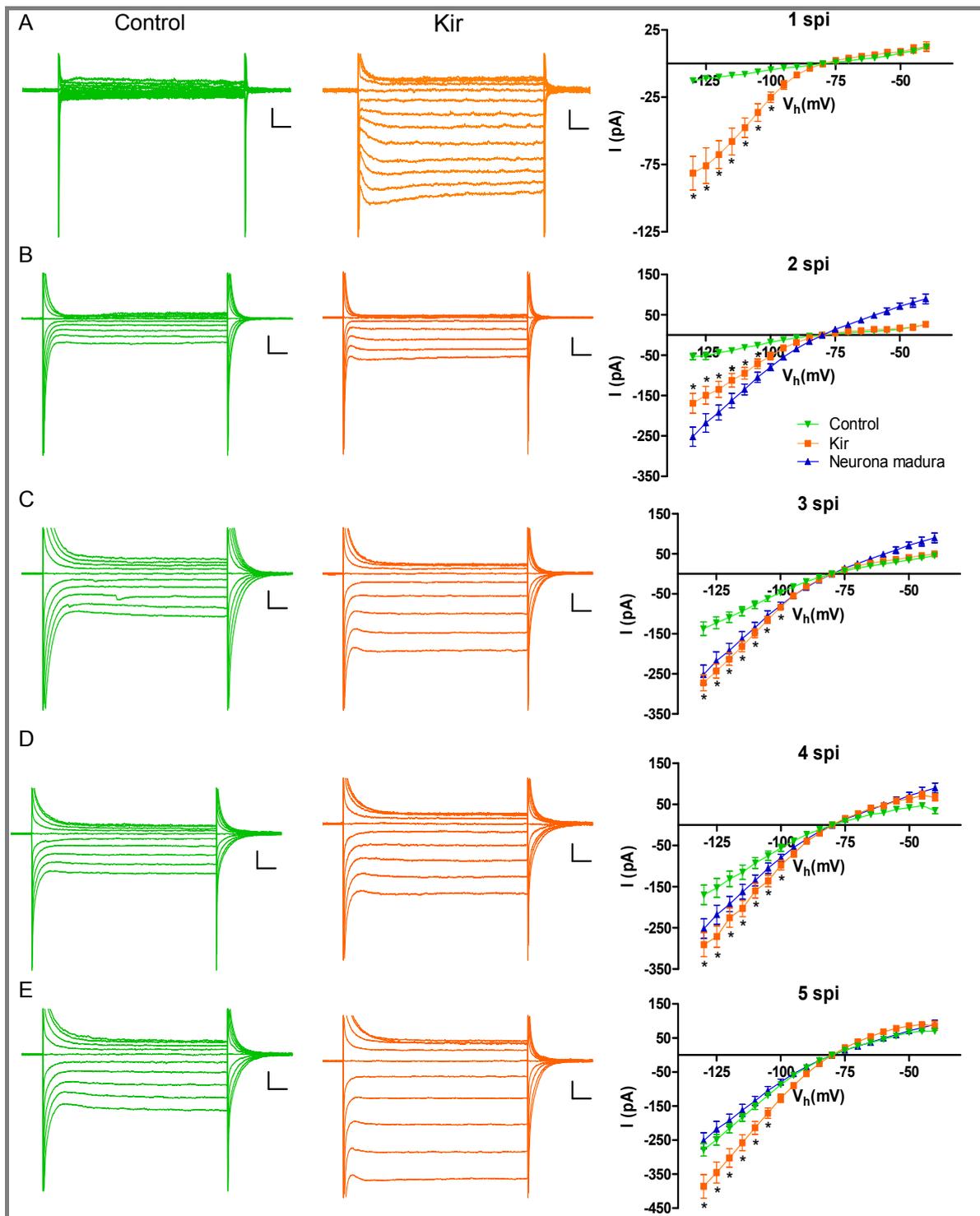


Figura 3.13 Corrientes con rectificación entrante en neuronas nacidas en el giro dentado de ratones adultos. Izquierda y medio: Ejemplo de la respuesta a escalones de voltaje desde -130 a -40 mV de una célula infectada con el retrovirus CAG-GFP (Control, verde) o con el retrovirus CAG-Kir-IRES-GFP (Kir, naranja). Derecha: Curvas I-V promedio obtenidas con el mismo protocolo de los paneles contiguos. Estas propiedades fueron medidas en neuronas de 1 a 5 semanas de edad (A a E respectivamente). En azul se muestra la respuesta a dicho protocolo de neuronas granulares maduras. Cada punto representa el promedio \pm ES, los asteriscos ($p < 0.01$) corresponden a la comparación de las curvas control vs Kir realizada con un ANOVA de dos vías de mediciones repetidas (RM ANOVA) y un post-test de Bonferroni. Número de células registradas y de ratones utilizados (#cel/#ratones): 19/4, 15/4, 18/4, 13/5, 15/3 de 1-5 spi respectivamente del grupo control; 19/5, 13/4, 15/3, 12/5, 15/3 de 1-5 spi respectivamente del grupo Kir; 14/8 del grupo de neuronas maduras. Escalas: 10 ms y 25 pA en A, 10 ms y 75 pA de B a E.

Con el fin de comprobar que la no-linealidad de las curvas I-V era debida específicamente a la conductancia a través de canales de rectificación entrante en las neuronas granulares, se estudió el efecto de la aplicación de BaCl₂ 200 μM en neuronas controles y neuronas que sobreexpresan Kir2.1 de 4 semanas de edad. La administración de BaCl₂ redujo principalmente las corrientes entrantes, dando como resultado del bloqueo curvas I-V lineales (Figura 3.14 A, B). Esto demuestra farmacológicamente la presencia de canales de rectificación entrante en dichas neuronas. Es importante destacar que las curvas I-V de las neuronas controles y las neuronas que sobreexpresan Kir2.1 luego del bloqueo con BaCl₂ fueron idénticas, demostrando que la diferencia en sus curvas I-V era debida a los distintos niveles de expresión de canales de rectificación entrante.

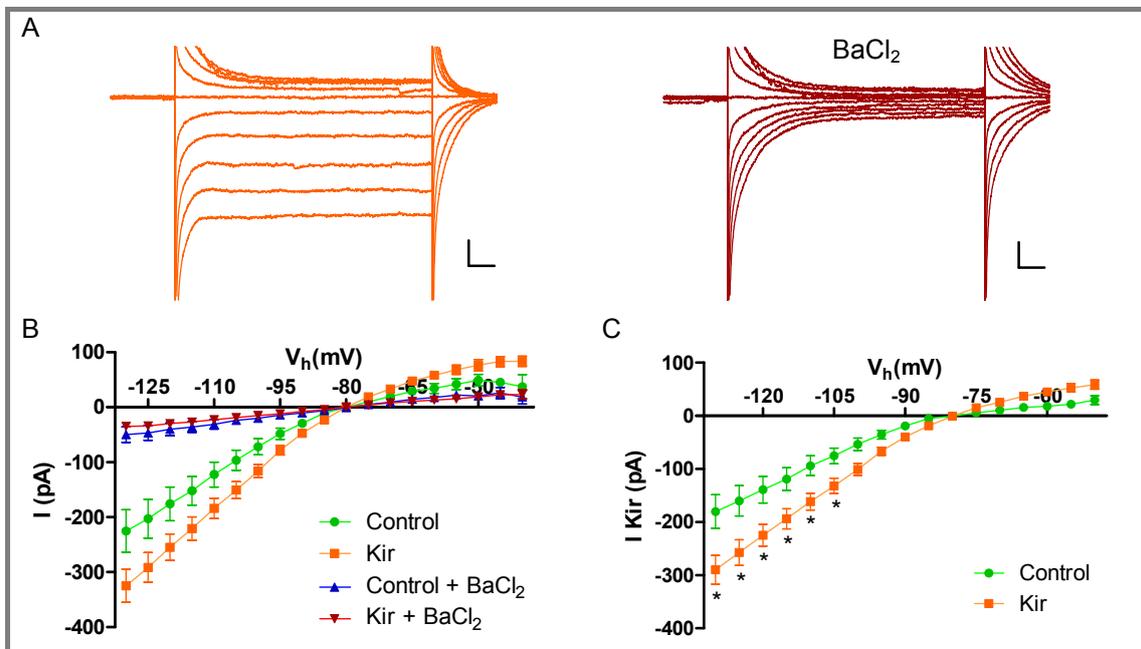


Figura 3.14 Bloqueo de canales de rectificación entrante *in vivo*. A: Ejemplo de la respuesta a escalones de voltaje desde -130 a -40 mV de una célula infectada con el retrovirus CAG-Kir-IRES-GFP antes (Kir, naranja) y después de la aplicación de BaCl₂ (rojo oscuro). Escalas: 10 ms y 50 pA. B: Curvas I-V promedio obtenidas con el mismo protocolo del panel A en neuronas de 4 semanas de edad controles o con sobreexpresión de Kir2.1. Cada punto representa el promedio ± ES. C: Curvas I-V promedio de los canales de rectificación entrante, obtenidas a partir de la resta de los datos mostrados en B. *p<0.01, RM ANOVA y post-test de Bonferroni.

El tratamiento con BaCl₂ también nos permitió obtener la curva I-V de los canales de rectificación entrante exclusivamente, restando la componente correspondiente a los canales de fuga de la membrana (correspondiente a la curva I-V luego del bloqueo con BaCl₂) de la corriente total. Este análisis permitió visualizar la dependencia del voltaje de los canales de rectificación entrante en neuronas granulares y obtener su

valor de conductancia máxima. El valor de G_{Kir} obtenido para neuronas controles (4.11 ± 0.67 nS) de 4 semanas fue significativamente menor que el valor medido en las células que sobreexpresan Kir2.1 (6.27 ± 0.58 nS) ($p < 0.05$, t-test) (Figura 3.14 C). Por último, en neuronas granulares el valor de $G_{entrante}$ también está dominado por la G_{Kir} , ya que G_{Kir} corresponde al $81.9 \pm 2.0\%$ de la conductancia total en neuronas controles, y al $90,9 \pm 1.5\%$ en neuronas que sobreexpresan Kir, justificando el uso de $G_{entrante}$ como medida estimada de G_{Kir} . Sin embargo, cabe destacar que la aplicación de $BaCl_2$ también redujo la componente saliente de la curva I-V tanto en neuronas controles como en aquellas con sobreexpresión de Kir2.1. Esto podría deberse al bloqueo de otros tipos de canales de potasio de fuga, como los KCNK (Goldstein SA *et al.* 2001), demostrando que la medición de G_{Kir} a partir de la resta del bloqueo con $BaCl_2$ también daría una medición sobreestimada.

Los valores de conductancia observados en neuronas son un orden de magnitud menor a los observados en células en cultivo. Esto es esperable ya que la transfección transitoria de células HEK 293T permite la expresión de múltiples copias del plásmido, mientras que la transducción retroviral de neuronas *in vivo* requiere de la integración del transgen y su promotor en el genoma de la célula, posiblemente en simple copia.

Luego se compararon las propiedades de rectificación entrante durante el desarrollo neuronal calculando el valor de $G_{entrante}$ para los puntos de tiempo estudiados.

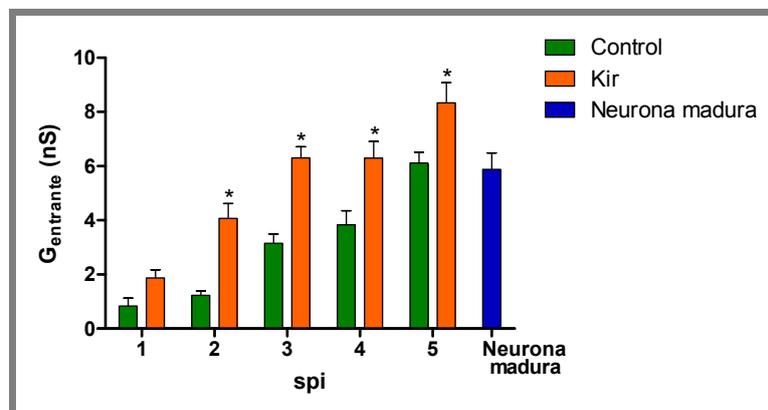


Figura 3.15 Promedio de los valores de $G_{entrante}$ durante el desarrollo neuronal. Los valores de conductancia fueron obtenidos a partir de la curva I-V de cada célula individualmente como la pendiente de la regresión lineal de dicha curva I-V desde -130 mV a -90 mV. Los asteriscos denotan el resultado de las comparaciones estadísticas realizadas entre el grupo Control y Kir mediante un ANOVA de dos vías ($p < 0.0001$) y un post-test de Bonferroni (* $p < 0.01$).

Durante la primera semana de desarrollo no se encontraron diferencias significativas en las conductancias de las células controles y las que sobreexpresan Kir2.1. Sin embargo, las curvas I-V mostraron inequívocamente que a diferencia de las

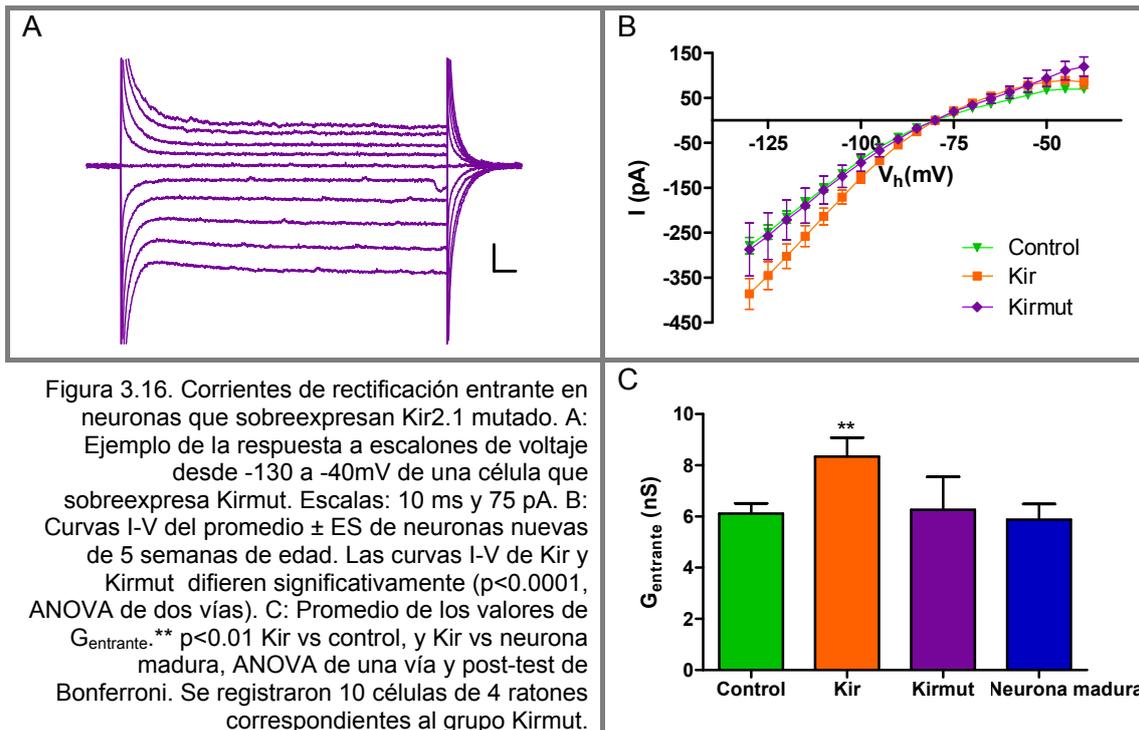
neuronas controles las células que sobreexpresan Kir2.1 sí poseen rectificación entrante (Figura 3.13 A). Posteriormente en el desarrollo, las neuronas que sobreexpresan Kir2.1 presentaron una conductancia significativamente mayor a la de los controles, en concordancia con las diferencias observadas en sus curvas I-V (Figura 3.15). Cabe destacar que la conductancia de las neuronas controles alcanzó valores maduros recién a las cinco semanas de desarrollo (ANOVA de una vía y post-test de Bonferroni). En cambio, en las neuronas que sobreexpresan Kir2.1 se lograron valores maduros de conductancia en la tercera semana de desarrollo mientras que a las 5 semanas la G_{entrante} fue capaz de superar los valores máximos endógenos (ANOVA de una vía y post-test de Bonferroni, $p < 0.05$). Por lo tanto, queda demostrado que nuestro sistema experimental no sólo permite adelantar la expresión de Kir2.1 en el desarrollo, sino que la sobreexpresión es mantenida aún en la neurona madura.

Expresión de Kirmut in vivo

Habiendo demostrado que el retrovirus modificado para la sobreexpresión de Kir2.1 es funcional, se quiso evaluar la funcionalidad del retrovirus conteniendo Kirmut *in vivo*. Por lo tanto, se generó el retrovirus que contiene al vector CAG-Kirmut-IRES-RFP y se lo inyectó en ratones adultos de la manera descripta anteriormente. Luego de 5 semanas de la inyección se prepararon rodajas agudas de hipocampo y se realizaron los experimentos de electrofisiología con el mismo protocolo ya mencionado.

Cuando se observaron las secciones bajo el microscopio de fluorescencia se encontró que las pocas células RFP⁺ encontradas poseían una fluorescencia muy tenue que se extinguía muy rápidamente, dificultando los experimentos de patch clamp. A pesar de ello, la presencia de neuronas RFP⁺ evidenció que el retrovirus es funcional. De todas maneras fue posible medir las propiedades de rectificación de algunas neuronas RFP⁺ que fueron comparadas con los datos ya obtenidos. Los resultados de la Figura 3.16 muestran que tanto la curva I-V como la G_{entrante} de las neuronas que sobreexpresan Kirmut fueron similares a los controles.

En conclusión, pudimos demostrar que la sobreexpresión de Kir2.1 mutado no está actuando como dominante negativo en neuronas granulares de 5 semanas de edad y por lo tanto, será utilizado como control de especificidad de los experimentos posteriores.



La falta de función de Kirmut como dominante negativo *in vivo* podría deberse a que esta subunidad solo puede tetramerizar con subunidades de la misma subfamilia Kir2.x (MacKinnon R 1991; Yang J *et al.* 1995). Dado que la conductancia rectificante medida corresponde a la población total de canales con rectificación entrante es posible especular que la proporción de canales afectados en este periodo de desarrollo no es suficiente como para observar un cambio en la conductancia. Sin embargo, sería interesante probar la acción de Kirmut en estadios más tempranos del desarrollo, donde diferencias en los patrones de expresión de los canales Kir podrían permitir desenmascarar la función de Kirmut como dominante negativo.

Efectos de la sobreexpresión de Kir2.1 en la excitabilidad neuronal

La estrategia de sobreexpresión de Kir2.1 tiene como objetivo final reducir la resistencia de membrana y por lo tanto disminuir la excitabilidad neuronal. Como era de esperar, la resistencia de la membrana de las células que sobreexpresan Kir2.1 fue menor que la de células controles (Tabla 3.1). Además, las neuronas de 5 semanas de edad que sobreexpresan Kirmut presentaron una resistencia similar a las de los controles y significativamente mayor que la de células que sobreexpresan Kir2.1 de la misma edad.

Dado que el potencial de reposo de una neurona está determinado por las concentraciones iónicas y las permeabilidades relativas de dichos iones, esperábamos que la sobreexpresión de un canal de potasio como Kir2.1 redujera el valor de V_r . Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los puntos de tiempo estudiados (Tabla 3.1). Posiblemente, la falta de cambios en el V_r de las células que sobreexpresan Kir2.1 se deba a una alta permeabilidad al cloro en las neuronas granulares, de manera tal que el aumento de la conductancia de potasio no se vea reflejada directamente en esta medición.

Spi	Control		Kir		Kirmut	
	V_r (mV)	R_m (M Ω)	V_r (mV)	R_m (M Ω)	V_r (mV)	R_m (M Ω)
1	-42.3 \pm 1.5 (12)	5530 \pm 830 (13)	-46.5 \pm 3.4 (18)	2250 \pm 350 (19)		
2	-60.1 \pm 3.3 (14)	1980 \pm 260 (15)	-68.9 \pm 2.3 (13)	797 \pm 170 (15)		
3	-73.2 \pm 1.4 (18)	665 \pm 110 (18)	-74.1 \pm 1.8 (15)	318 \pm 32 (15)		
4	-77.5 \pm 0.8 (12)	482 \pm 79 (13)	-72.2 \pm 2.6 (12)	337 \pm 76 (12)		
5	-73.4 \pm 2.1 (12)	292 \pm 21 (15)	-76.4 \pm 1.9 (14)	220 \pm 21 (15)	-68.2 \pm 1.7 (10)	378 \pm 56 (10)

Tabla 3.1 Propiedades de membrana de los tres grupos de neuronas en estudio. Se indica el valor promedio \pm ES y el número de células registradas entre paréntesis. Se encontraron diferencias significativas en el R_m entre los grupos control y Kir de 1, 2 y 3 spi ($p < 0.05$, ANOVA de dos vías, post-test de Bonferroni). También hay diferencias significativas entre el valor de R_m de Kir y Kirmut a 5 spi ($p < 0.05$, ANOVA de una vía y post-test de Bonferroni).

Luego de estos resultados se estudió si la sobreexpresión de Kir2.1 tiene un efecto directo sobre la excitabilidad neuronal midiendo las propiedades de disparo de potenciales de acción en respuesta a escalones de corriente despolarizante. En primer lugar, se encontró que las neuronas que sobreexpresan Kir2.1 son capaces de disparar potenciales de acción a partir de una semana de su desarrollo (Figura 3.17 A). Al igual que las neuronas controles descritas en el capítulo I, los potenciales de acción de las neuronas que sobreexpresan Kir2.1 de 1 y 2 semanas de edad poseen propiedades inmaduras (PA inmaduro), caracterizadas por la incapacidad de disparar espigas repetidas durante toda la despolarización. Más aún, la capacidad de disparar espigas repetitivamente (PA maduro) surgió a las tres semanas de edad tanto en las neuronas controles como en las que sobreexpresan Kir2.1, evidenciando que la sobreexpresión de Kir2.1 no generó alteraciones en el desarrollo de la excitabilidad (Figura 3.17 B).

Si bien las neuronas que sobreexpresan Kir2.1 no fueron silenciadas completamente era posible que su excitabilidad se encontrara reducida como consecuencia de la disminución en su resistencia de membrana. Para evaluar esto, se midió la corriente necesaria para alcanzar el umbral de disparo de potencial de acción

a lo largo del desarrollo neuronal. En neuronas de una y dos semanas de edad, capaces de disparar entre 1 y 4 espigas, no se encontraron diferencias significativas en el umbral de disparo (1 spi: control = 15.2 ± 3.2 pA (n=10) y Kir = 14.9 ± 3.4 pA (n=12); 2 spi: control = 29.8 ± 4.3 pA (n=14) y Kir = 30.3 ± 4.0 pA (n=12)).

Dado que a la tercera semana de desarrollo se encontraron neuronas con diferente grado de madurez en cuanto a su excitabilidad, se decidió estudiar las propiedades de la población más representativa, que corresponde a las neuronas con potenciales de acción repetitivos (~70% de neuronas con PA maduro, Figura 3.17 B).

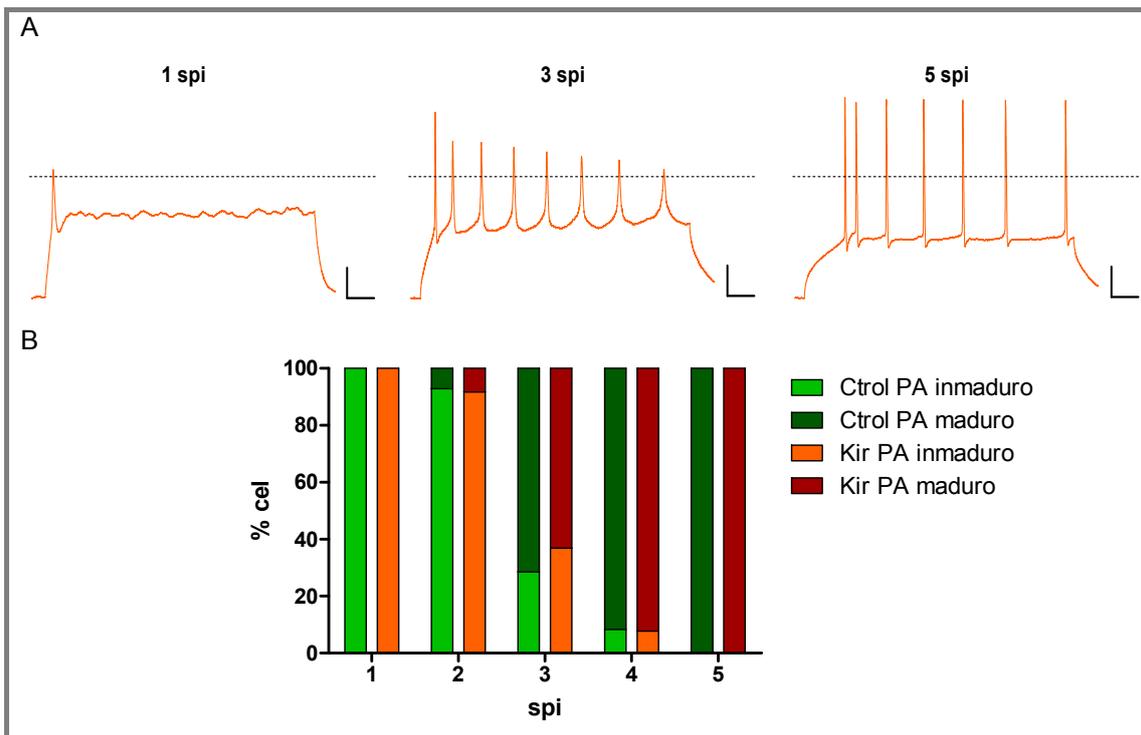


Figura 3.17. Desarrollo de la excitabilidad en neuronas que sobreexpresan Kir2.1 y neuronas controles (Ctrol). A: Ejemplo de la respuesta de neuronas que sobreexpresan Kir2.1 de 1, 3 o 5 semanas de edad ante un escalón de 100 pA de corriente por 400 ms, partiendo de un potencial de membrana de -80 mV. La línea punteada marca los 0 mV. Escalas: 40 ms y 20 mV. B: porcentaje de células que presentan potenciales de acción inmaduros o maduros en función de la edad neuronal respecto de un total de ~15 células por grupo.

Para comparar la excitabilidad de las neuronas con espigas repetitivas, se graficó el número de espigas en función de la corriente inyectada (Figura 3.18). Si bien la excitabilidad de las neuronas controles y las que sobreexpresan Kir2.1 fue similar a la tercera semana de desarrollo, a las cuatro y cinco semanas las neuronas no solo fueron diferentes en el umbral de disparo sino también en el número de espigas disparadas ante una misma corriente inyectada (Figura 3.18 A-C). Sin embargo, al calcular la frecuencia máxima de disparo de potenciales de acción de manera independiente de la corriente inyectada, se encontró que esta fue similar entre el grupo

control y el grupo Kir en los tres estadios de tiempo estudiados (Figura 3.18 D). Aunque el número de experimentos realizados con Kirmut no es suficiente para realizar una curva de excitabilidad como la mostrada en la Figura 3.18 A-C, sí fue posible comparar los valores de frecuencia máxima y umbral de disparo con el resto de las neuronas de 5 semanas de edad (Figura 3.18 D y E). La frecuencia máxima y el umbral de disparo de las neuronas que sobreexpresan Kirmut fue similar al de las neuronas controles y al de las neuronas maduras, pero mostró diferencias significativas con las células que sobreexpresan Kir2.1 salvaje.

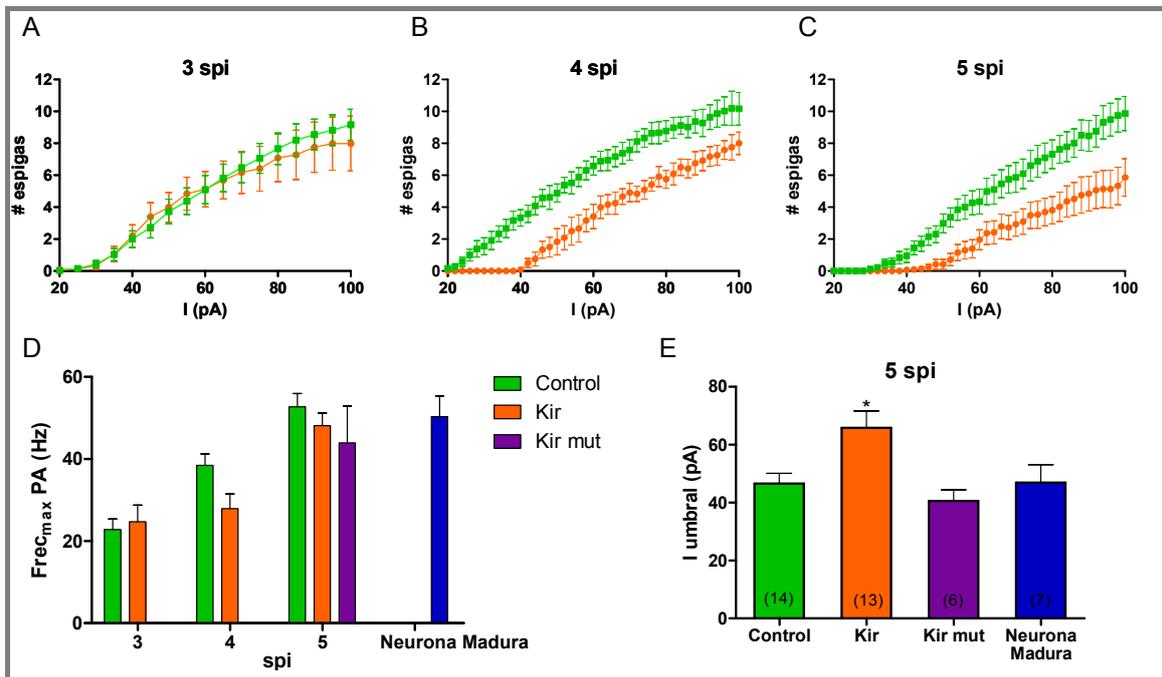


Figura 3.18 Excitabilidad en neuronas controles y neuronas que sobreexpresan Kir2.1 y Kirmut. A-C: Número promedio \pm ES de espigas disparadas en función de la corriente inyectada. Cada escalón tiene una duración de 400 ms. El grupo control es representado en verde, y el grupo de sobreexpresión de Kir2.1 en naranja. Las curvas B y C presentaron diferencias significativas ($p < 0.0001$, ANOVA de dos vías entre Control y Kir, $n = 11$ en todos los grupos salvo el control de 4 spi cuyo $n = 9$). D: Promedio de los valores de frecuencia máxima de potenciales de acción calculada como el número máximo de espigas en un escalón de 400 ms. La corriente inyectada para generar el máximo disparo de espigas fue muy diferente entre las neuronas controles y las que sobreexpresan Kir2.1. Solo fueron consideradas las células que llegaron a acomodarse. No hay diferencias significativas entre el grupo Control y Kir (ANOVA de dos vías), ni entre control, Kir y Kirmut de 5 spi (ANOVA de una vía). E: Promedio de la corriente mínima necesaria para lograr el disparo de una espiga. En paréntesis se indica el número de registros realizados. El asterisco indica una diferencia significativa entre el grupo Kir y el grupo control, o el grupo Kirmut ($p < 0.05$, ANOVA de un vía y post-test de Bonferroni).

En conclusión, la sobreexpresión de Kir2.1 produjo una reducción en la excitabilidad de las neuronas que se evidenció en la cuarta semana de desarrollo. Esta reducción en la excitabilidad fue debida específicamente a la acción de Kir2.1 como canal iónico ya que no se observaron cambios en la excitabilidad de las neuronas que sobreexpresan Kirmut.

Efectos homeostáticos de la sobreexpresión de Kir2.1

La sobreexpresión de Kir2.1 desde el comienzo del desarrollo neuronal podría traer como consecuencia cambios compensatorios en la expresión de otros canales, de manera de contrarrestar la disminución de la excitabilidad. Estas alteraciones homeostáticas podrían ser la causa de que la excitabilidad se encuentre reducida solamente a partir de la cuarta semana del desarrollo neuronal mientras que la disminución en la resistencia de membrana se evidencia desde la primera semana de edad. Por lo tanto, también se caracterizó el desarrollo de las corrientes generadas por los canales de fuga y canales de sodio y potasio activables por voltaje.

La conductancia de los canales de fuga (G_{fuga}) fue estimada utilizando valores de potencial de membrana de despolarización intermedia, donde los canales de Kir se encuentran bloqueados y los canales de potasio y sodio sensibles al voltaje permanecen cerrados. La expresión de canales de fuga se caracterizó por un aumento progresivo durante el desarrollo neuronal, alcanzando valores maduros recién a las 5 semanas de edad (Figura 3.19 A). Sin embargo, la sobreexpresión de Kir2.1 no modificó la cinética de desarrollo de estos canales ya que no se encontraron diferencias significativas respecto del grupo control.

Luego se compararon las amplitudes de las corrientes de sodio y potasio activables por voltaje entre las neuronas controles y las que sobreexpresan Kir2.1, encontrándose diferencias significativas únicamente a la tercera semana del desarrollo neuronal (Figura 3.19 B y C).

El aumento en las corrientes de sodio activables por voltaje en las neuronas con sobreexpresión de Kir2.1 de tres semanas de edad podría estar compensando el efecto en la excitabilidad producto de la reducción de la resistencia de membrana. De esta manera dichas neuronas podrían mantener su umbral de disparo inalterado. Sin embargo, esta compensación homeostática fue solo transitoria, ya que a partir de la cuarta semana de desarrollo las amplitudes de las corrientes fueron similares a los controles y la reducción en la excitabilidad quedó manifiesta.

En neuronas de 5 semanas de edad que sobreexpresan Kirmut el nivel de expresión de canales de fuga y de canales de sodio y de potasio activables por voltaje fue similar a las neuronas controles, a las neuronas con sobreexpresión de Kir2.1 y a las neuronas maduras (Figura 3.19).

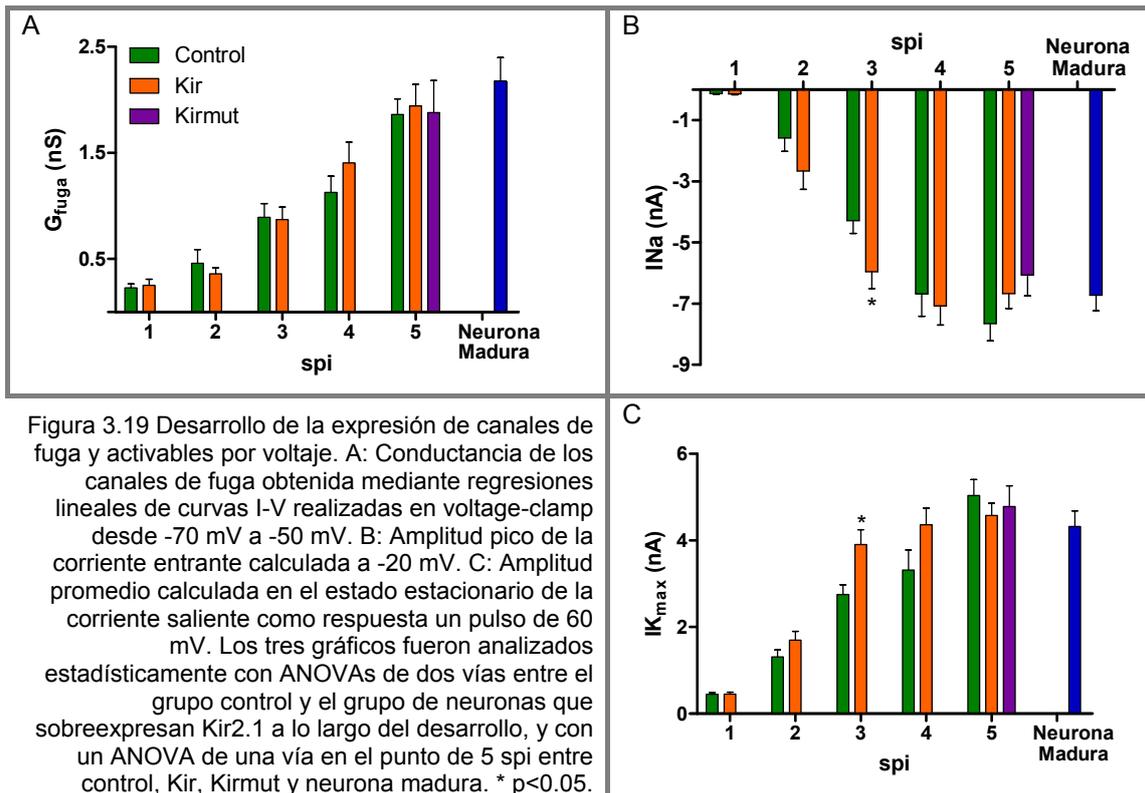


Figura 3.19 Desarrollo de la expresión de canales de fuga y activables por voltaje. A: Conductancia de los canales de fuga obtenida mediante regresiones lineales de curvas I-V realizadas en voltage-clamp desde -70 mV a -50 mV. B: Amplitud pico de la corriente entrante calculada a -20 mV. C: Amplitud promedio calculada en el estado estacionario de la corriente saliente como respuesta un pulso de 60 mV. Los tres gráficos fueron analizados estadísticamente con ANOVAs de dos vías entre el grupo control y el grupo de neuronas que sobreexpresan Kir2.1 a lo largo del desarrollo, y con un ANOVA de una vía en el punto de 5 spi entre control, Kir, Kirmut y neurona madura. * p<0.05.

En conclusión, la sobreexpresión de Kir2.1 no desencadenó grandes cambios homeostáticos en la expresión de los principales canales iónicos de las neuronas granulares del giro dentado adulto.

Efectos de la sobreexpresión de Kir2.1 en el desarrollo neuronal

Habiendo encontrado que la sobreexpresión de Kir2.1 produce una reducción en la excitabilidad neuronal a partir de la cuarta semana de desarrollo, se quiso estudiar si este efecto es capaz de producir algún cambio en la maduración neuronal.

Llamativamente, se encontró que la capacitancia de membrana de las neuronas con excitabilidad reducida es significativamente menor que la de los controles a partir de la cuarta semana de desarrollo (Figura 3.20 A). Además, esta reducción fue consecuencia de un efecto específico de la sobreexpresión de Kir2.1 sobre las propiedades eléctricas, ya que las neuronas que sobreexpresan Kirmut mostraron una capacitancia similar a la de los controles.

Dado que el valor de capacitancia está directamente relacionado con el área de la membrana del soma y dendritas distales, se llevaron a cabo mediciones morfológicas para corroborar esta observación. Para ello se realizaron inmunofluorescencias para

GFP en secciones de hipocampo de animales inyectados con el retrovirus control o con el retrovirus que expresa Kir2.1 luego de 3 o 5 semanas. Con la ayuda de María Georgina Davies se midió el área de los somas a partir de una proyección en el eje Z de una serie de micrografías confocales abarcando todo el volumen del soma neuronal (Figura 3.20 B). A partir de este análisis se encontró que las neuronas con excitabilidad reducida poseen un soma de menor tamaño que el de neuronas controles, que se evidencia desde la tercera semana de desarrollo (Figura 3.20 C). Esta reducción en el área del soma corresponde a un 15.5% del área somática de los controles a 3 spi, y a un 16.1% a 5 spi.

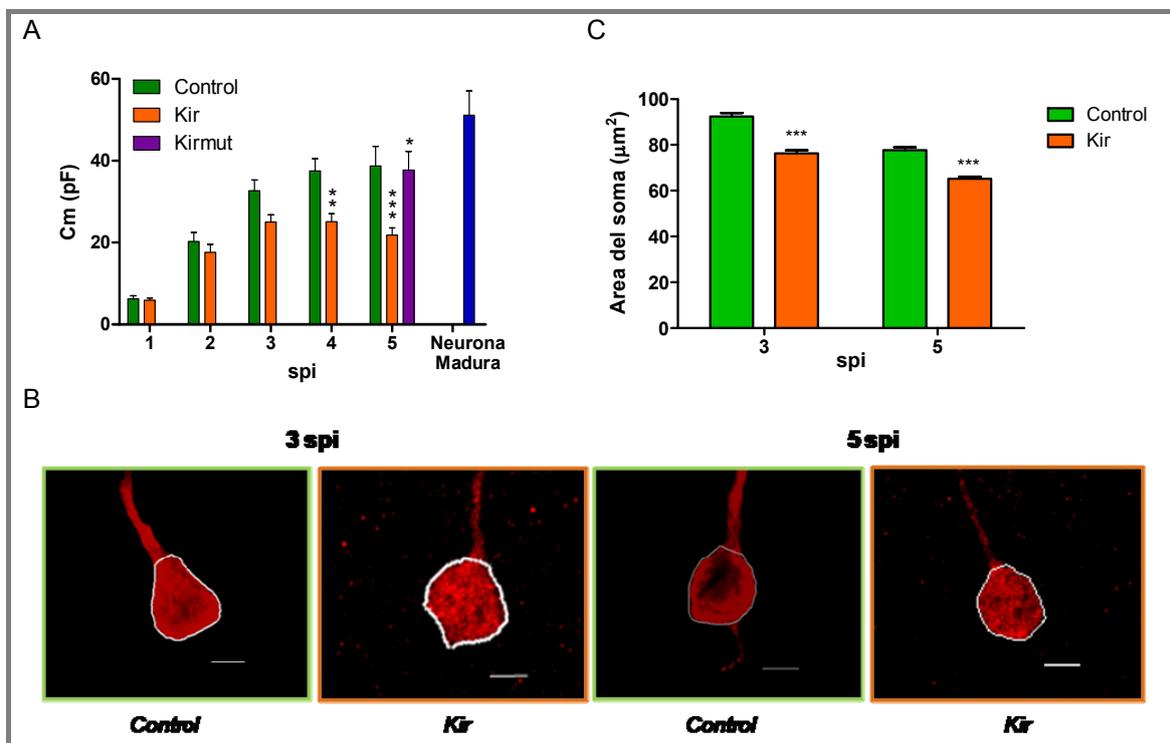


Figura 3.20 Reducción en el tamaño de las neuronas que sobreexpresan Kir2.1. A: Valores de capacitancia calculado como se detalla en materiales y métodos. La comparación estadística entre el grupo control y las neuronas que sobreexpresan Kir2.1 durante el desarrollo fue analizada con un ANOVA de dos vías y post-test de Bonferroni, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. La comparación a 5 spi entre control, Kir, Kirmut y neurona madura fue realizada mediante un ANOVA de una vía y post-test de Bonferroni, encontrando un valor $p < 0.05$ (*) entre el grupo control y Kir, y Kir vs Kirmut. B: Ejemplos de neuronas de los cuatro grupos en estudio a las que se les realizó la medición de soma (círculo blanco). En rojo se muestra la marcación de GFP obtenida por inmunofluorescencias. Escala: 5 μm . C: Promedio del área somática obtenido de 4 animales por grupo, con un mínimo de 100 células analizadas por ratón. *** $p < 0.001$, ANOVA de dos vías y post-test de Bonferroni.

Por lo tanto, se pudo demostrar a partir de dos mediciones diferentes que la morfología de las neuronas con menor excitabilidad está alterada. Si bien a la tercera semana del desarrollo neuronal la diferencia de capacitancia entre las neuronas controles y las que sobreexpresan Kir2.1 no fue significativa, la significativa reducción en el área somática apoya la idea que las alteraciones morfológicas comienzan en ese

estadio de desarrollo. La reducción observada en el área somática y en la capacitancia podría indicar que la velocidad de desarrollo se encuentra enlentecida, o bien, que el desarrollo se encuentra arrestado.

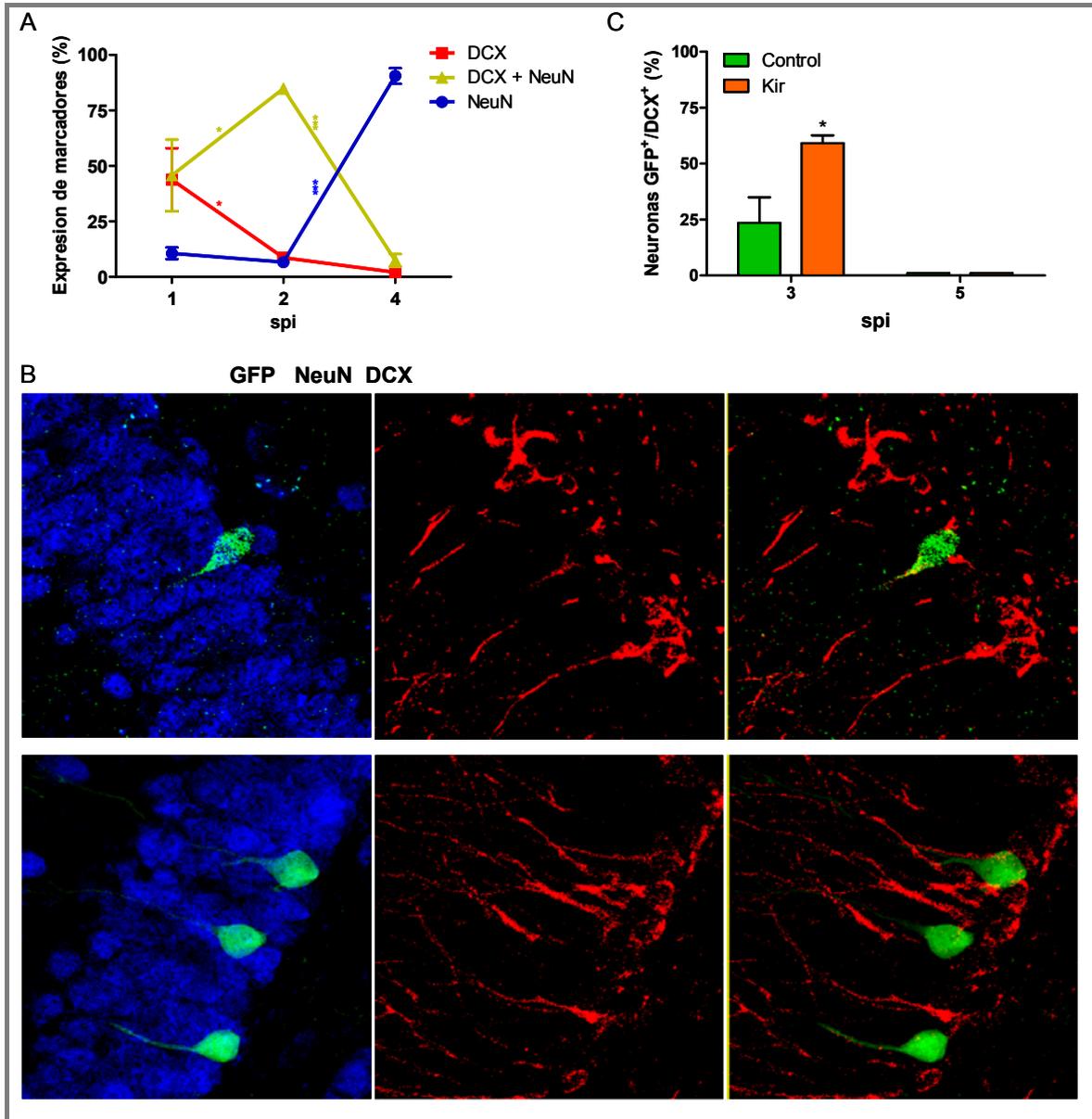


Figura 3.21 Expresión de marcadores de desarrollo neuronal. A: Porcentaje de neuronas GFP⁺ controles que colocaliza con DCX, DCX y NeuN, o NeuN solamente. Datos obtenidos por Verónica Piatti (modificado de Espósito MS *et al.* 2005). B, panel superior: Ejemplo de una neurona que sobreexpresa Kir2.1 y expresa DCX de 3 spi. Panel inferior: ejemplo de neuronas controles de 3 spi que no expresan DCX. Los paneles izquierdos detallan la localización en la capa granular de las células GFP⁺ identificada por la expresión de NeuN. Las imágenes son proyecciones en el eje Z de planos únicos obtenidos con un microscopio confocal. C: Porcentaje de neuronas GFP⁺ que colocalizan con DCX en función de la edad neuronal. Los valores corresponden al promedio de los porcentajes de 4 ratones y un total de 80 neuronas analizadas por grupo. *p<0.05 t-test no pareado.

Una manera de identificar las etapas de desarrollo neuronal es analizando la presencia de proteínas cuya expresión cambia a lo largo del tiempo de desarrollo. Uno de los marcadores de desarrollo neuronal más utilizados es la proteína doublecortin (DCX), la cual se expresa durante la migración neuronal. Su expresión durante el desarrollo neuronal en el giro dentado adulto está ampliamente caracterizada y es sabido que comienza al principio del desarrollo neuronal y decrece luego de la segunda semana para dejar de expresarse completamente a la cuarta semana de desarrollo (Figura 3.21 A, datos de Verónica Piatti, modificado de Espósito MS *et al.* 2005).

Por lo tanto, se estudió la expresión de DCX en neuronas GFP⁺ de 3 y 5 semanas de edad a partir de inmunofluorescencias analizadas con microscopía confocal. El análisis de las imágenes confocales dio como resultado un mayor porcentaje de neuronas nuevas que expresan DCX a la tercera semana de desarrollo neuronal en el grupo de neuronas que sobreexpresan Kir2.1 respecto del grupo control, mientras que luego de dos semanas todas las neuronas apagaron la expresión de DCX (Figura 3.21 B y C). Estos resultados apoyan la idea de que las neuronas con excitabilidad reducida tienen un retraso en la velocidad de desarrollo neuronal.

Es interesante notar que los efectos observados en la excitabilidad y en el tamaño del soma ocurrieron entre la tercera y cuarta semana del desarrollo neuronal, momento en el cual las neuronas comienzan a recibir input glutamatérgico. Por lo tanto se quiso evaluar si la conectividad glutamatérgica se encontraba alterada midiendo la actividad espontánea en presencia de picrotoxina (antagonista de receptores GABA_A), CGP (antagonista de receptores GABA_B) y TTX (bloqueante de canales de sodio activables por voltaje) en neuronas de cinco semanas de edad (Figura 3.22 A).

Principalmente se encontró que la frecuencia de los eventos espontáneos glutamatérgicos se vio disminuida en las neuronas que sobreexpresan Kir2.1 respecto de los controles (Figura 3.22 B), indicando que las neuronas con menor excitabilidad poseen menor número de contactos sinápticos activos. Sin embargo, la amplitud de los eventos espontáneos no se vio modificada, indicando que no hubo cambios en el número de receptores postsinápticos (Figura 3.22 C). Por último, también se encontró una sutil diferencia en la cinética de las corrientes miniatura, caracterizándose por una reducción en el tiempo de decaimiento de los eventos espontáneos de las neuronas que sobreexpresan Kir2.1, y por una tendencia no significativa de disminución en el tiempo de crecimiento (Figura 3.22 D-F).

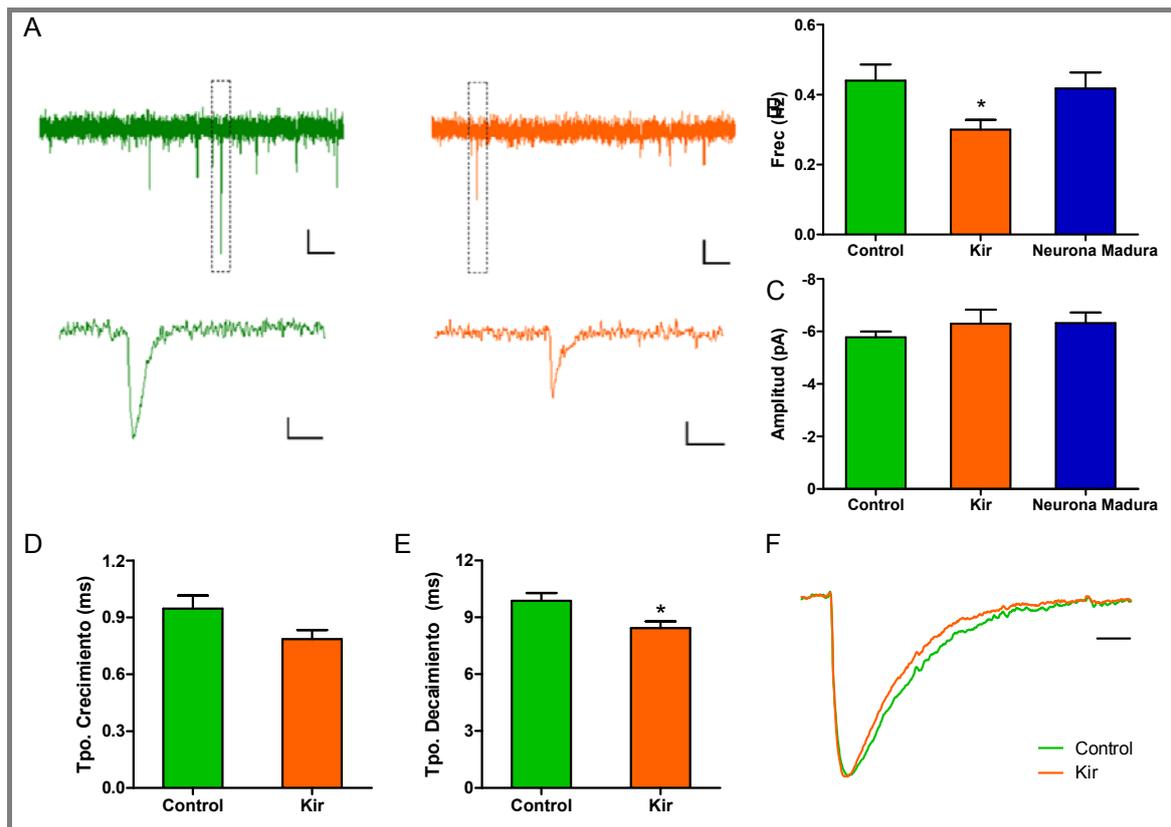


Figura 3.22 Propiedades de la actividad espontánea glutamatergica. A: Ejemplos de corrientes espontáneas registradas en neuronas controles (verde), y neuronas que sobreexpresan Kir2.1 (naranja). El rectángulo punteado en el panel superior delimita la región expandida en el panel inferior. Escalas superiores: 500 ms y 3 pA; escalas inferiores 25 ms y 3 pA. B: Frecuencia de la actividad espontánea glutamatergica. * $p < 0.05$, ANOVA de una vía entre el grupo Kir y el grupo control y las neurona madura. C: Amplitud pico del trazo promedio de las corrientes espontáneas. D: Tiempo de crecimiento del 20 al 80% del pico de los trazos promedios de los eventos espontáneos. E: Tiempo de decaimiento respecto del 60% del pico de los trazos promedios de la actividad espontánea * $p < 0.05$, t-test. F: Trazo promedio de los eventos espontáneos escalados. Escala: 5 ms. Los datos corresponden a 14 registros de 4 ratones controles y 14 registros de 5 ratones del grupo con sobreexpresión de Kir2.1.

Resumen de los resultados

- Los retrovirus modificados para la sobreexpresión de Kir2.1 y Kirmut son funcionales *in vivo*.
- La sobreexpresión de Kir2.1 reduce la excitabilidad neuronal a partir de la cuarta semana de desarrollo.
- La expresión de canales de fuga durante el desarrollo neuronal no se encuentra alterada por la sobreexpresión de Kir2.1.
- La expresión de canales de sodio y potasio activables por voltaje se ve aumentada solo en la tercera semana de desarrollo.
- La sobreexpresión de Kir2.1 produce una reducción en el área del soma y en la capacitancia de la membrana a partir de la tercera semana de desarrollo.
- A la tercera semana de desarrollo el porcentaje de neuronas que expresan DCX es mayor en las neuronas que sobreexpresan Kir2.1 que en los controles.

- Las neuronas que sobreexpresan Kir2.1 de 5 semanas de edad reciben menos input glutamatérgico y con un cinética más rápida que las neuronas controles.

Conclusiones

La reducción en la excitabilidad inducida a través de la sobreexpresión de Kir2.1 genera un enlentecimiento de la maduración neuronal a partir de la tercera semana de desarrollo. Estos resultados demuestran que el desarrollo neuronal es modulado por la actividad del circuito a través de la despolarización y/o el disparo de potenciales de acción específicamente. Notablemente, este mecanismo de regulación se hace evidente cuando las neuronas poseen una excitabilidad madura y comienza a desarrollarse la inervación glutamatérgica.

Capítulo II

3.3 Discusión

Discusión

En el capítulo II de esta tesis nos propusimos estudiar si la despolarización y el consiguiente disparo de potenciales de acción de una neurona en desarrollo en respuesta a señales ambientales es capaz de modular su proceso de maduración en el giro dentado adulto. Para testear esta hipótesis se redujo la excitabilidad neuronal *in vivo*, sin alterar el ambiente que la rodea, utilizando un retrovirus modificado para la expresión de un canal de potasio de rectificación entrante (Kir2.1). Mediante dicha estrategia se logró disminuir la resistencia de la membrana de las neuronas nacidas en el giro dentado adulto desde la primera semana de desarrollo logrando reducir su excitabilidad en forma significativa a partir de la cuarta semana. Los efectos en el desarrollo neuronal desencadenados por la reducción en la excitabilidad abarcaron tanto cambios morfológicos como de expresión de marcadores y alteraciones en la conectividad. Los cambios morfológicos se vieron expresados alrededor de la tercera semana de desarrollo a través de la reducción en la capacitancia de la membrana y del área del soma, ambos parámetros indicativos de una atrofia a nivel del soma neuronal. Estos cambios persistieron hasta la quinta semana y parecerían indicar un retraso en la maduración o un arresto del desarrollo neuronal. Una evidencia fuerte que demostró la existencia de un retraso en el desarrollo neuronal de las células con excitabilidad reducida fue el aumento en el porcentaje de células con expresión de DCX a las 3 semanas de desarrollo. En cambio, la expresión normal de canales iónicos como los canales de fuga y los canales de sodio y potasio activables por voltaje, indican que las propiedades neuronales no fueron simplemente afectadas en forma global por la reducción en la excitabilidad. Por último, la disminución en la conectividad glutamatérgica en las neuronas que sobreexpresan Kir2.1 también podría reflejar una reducción en la velocidad de desarrollo neuronal. Sin embargo, una hipótesis alternativa sería que la reducción en la aferencia excitatoria no es transitoria sino estable, ya que estaría determinada por mecanismos de competencia en los que los axones serían capaces de elegir a las neuronas más excitables. Este tipo de mecanismo fue caracterizado en cultivo de neuronas transfectadas con Kir2.1 y se manifiesta únicamente cuando la reducción en la excitabilidad es realizada antes de la formación de los contactos sinápticos (Burrone J *et al.* 2002). En acuerdo con este trabajo, las neuronas nacidas en el giro dentado adulto comienzan a recibir aferencias glutamatérgicas durante la tercera semana de desarrollo. En resumen, nuestros resultados indican que la reducción en la excitabilidad de las células granulares nacidas en el adulto reduce la velocidad de desarrollo neuronal. Sin embargo, no es posible descartar la posibilidad de que las neuronas con excitabilidad reducida posean

alteraciones permanentes tanto en su morfología como en su conectividad. Para analizar estas posibilidades es necesario estudiar la morfología y la conectividad glutamatérgica de neuronas que sobreexpresan Kir2.1 de más avanzada edad y comparar los valores obtenidos con las neuronas controles. Estos experimentos están actualmente en curso.

La reducción en la corriente umbral necesaria para el disparo de potenciales de acción durante la cuarta semana traería como consecuencia adicional la disminución en la liberación de neurotransmisores por parte del axón en desarrollo. El efecto de la sobreexpresión de Kir2.1 en el crecimiento axonal ha sido estudiado durante el desarrollo embrionario en diferentes modelos biológicos *in vivo* (Yu CR *et al.* 2004; Hua JY *et al.* 2005; Wang CL *et al.* 2007). En estos trabajos se utilizaron también otras herramientas que afectan específicamente la liberación sináptica de la neurona en desarrollo. Mediante la aplicación de dichas estrategias los autores demostraron que aquellos axones con actividad sináptica reducida poseen un retraso en su crecimiento y una desestabilización de las sinapsis formadas. En las células granulares nacidas en el giro dentado adulto los axones en crecimiento comienzan a alcanzar la región CA3 luego de 10 días de desarrollo, mientras que sinapsis con características morfológicas funcionales pueden observarse a partir de los 17 días de edad (Zhao C *et al.* 2006; Toni N *et al.* 2008). Por lo tanto, es posible que las neuronas granulares con excitabilidad reducida también posean alteraciones en su desarrollo axonal. Más aún, la conectividad eferente podría regular las etapas siguientes del desarrollo neuronal a través de señales retrogradas dependientes de actividad. Notablemente, hasta el momento no se ha estudiado si modificaciones en el desarrollo axonal son capaces de generar alteraciones en el desarrollo de otras propiedades neuronales, ya sean eléctricas, morfológicas o de conectividad. Sin embargo, dado que la reducción en el umbral de potenciales de acción en las neuronas que sobreexpresan Kir2.1 es posterior a la aparición de los primeros efectos en el desarrollo, es poco probable que las alteraciones descritas sean consecuencia de modificaciones en el crecimiento axonal. Si bien el estudio del crecimiento de las proyecciones axonales en las neuronas con excitabilidad reducida sería muy interesante, la baja expresión de GFP en estas neuronas hace muy difícil este tipo de caracterización.

En conclusión, la sobreexpresión de Kir2.1 trajo como consecuencia principal un retraso en el desarrollo neuronal que se evidenció a partir de la tercera semana de edad. Estos hallazgos permiten demostrar que la excitabilidad neuronal modula los últimos estadios del proceso de desarrollo en el giro dentado adulto a través de la acción directa de la actividad circuital. Sin embargo el mecanismo específico que

conlleva al retraso neuronal es poco claro, ya que la sobreexpresión de Kir2.1 genera tanto una reducción en la despolarización subumbral, así como una disminución en el disparo de potenciales de acción. Dado que durante las dos primeras semanas de desarrollo: 1) el umbral de disparo de potenciales de acción no se encuentra modificado; 2) existe una gran reducción en la resistencia de la membrana; y 3) no hay alteraciones evidentes en el desarrollo neuronal, es posible postular que el efecto subumbral de la sobreexpresión de Kir2.1 sobre la despolarización de las neuronas inmaduras no sería suficiente como para desencadenar alteraciones en su desarrollo. Llamativamente, a pesar de las diferencias observadas en la conductancia entrante en este estadio, no se encontró variación en la excitabilidad de las neuronas que sobreexpresan Kir2.1. Esto podría deberse a la hiperpolarización del umbral de disparo del potencial de acción, a través del cual la menor despolarización inducida en las neuronas que sobreexpresan Kir2.1 ante un determinado escalón de corriente sería suficiente como para excitar a dicha célula. Sin embargo, las características inmaduras de estas espigas hacen difícil la medición de dicho parámetro. En favor de esta hipótesis, las corrientes de sodio de neuronas de dos semanas de edad poseen una tendencia (aunque no significativa) a ser mayores en las neuronas que sobreexpresan Kir2.1 que en los controles.

Las primeras alteraciones en el desarrollo de las neuronas que sobreexpresan Kir2.1 fueron evidenciadas a la tercera semana, cuando los potenciales de acción ya presentan características maduras. Sin embargo, dichas neuronas no mostraron alteración en la corriente umbral necesaria para el disparo de potenciales de acción, posiblemente debido a la puesta en marcha de mecanismos compensatorios, como el aumento observado de las corrientes de sodio activables por voltaje. Cabe destacar que la excitabilidad medida como umbral de disparo de potenciales de acción sólo refleja aquellos cambios en las propiedades neuronales que involucran al spiking. En cambio, las alteraciones observadas en este estadio del desarrollo neuronal podrían deberse a una reducción en las despolarizaciones subumbrales en respuesta a la actividad circundante como consecuencia de la reducción en la resistencia de membrana. De acuerdo a esta hipótesis, la reducción en la actividad subumbral podría reflejarse en la disminución de las elevaciones del calcio intracelular, las cuales a su vez tendrían un rol trófico en el desarrollo neuronal. Una especulación alternativa es que la medición del umbral de disparo realizada en whole-cell no refleja la situación fisiológica debido al cerrado de los canales Kir por la dilución de factores regulatorios o simplemente por la limitación de la técnica. Finalmente, a partir de la cuarta semana del desarrollo neuronal la sobreexpresión de Kir2.1 produjo una reducción en la

excitabilidad neuronal a través de un aumento en la corriente necesaria para llegar al umbral de disparo del potencial de acción. Por lo tanto, no es posible descartar un rol directo del spiking en la modulación del desarrollo neuronal.

Notablemente la inervación glutamatérgica comienza a desarrollarse a partir de la tercera semana de edad neuronal, simultáneamente con los efectos observados de la sobreexpresión de Kir2.1. Dado que los canales de rectificación entrante participan en la integración de las señales sinápticas filtrando los inputs de pequeña amplitud (Takigawa T y Alzheimer C 2002), es factible pensar que la sobreexpresión de Kir2.1 sería capaz de reducir la respuesta celular a las señales glutamatérgicas en desarrollo. Más aún, en este estadio de desarrollo el E_{GABA} se encontraría ya hiperpolarizado y la acción de GABA sería inhibitoria, siendo la aferencia glutamatérgica en desarrollo el principal agente despolarizante (Ge S *et al.* 2006). Por lo tanto, la reducción en la respuesta postsináptica a la liberación de glutamato podría ser uno de los factores que producen la disminución en la velocidad de desarrollo neuronal.

En resumen, el retraso en el desarrollo neuronal puede ser explicado a través de una acción sub o supraumbral de la excitabilidad reducida. Pero cualquiera sea el caso, es destacable que a partir de la tercera semana de desarrollo el principal neurotransmisor con acción despolarizante es glutamato y el comienzo del desarrollo de la inervación glutamatérgica coincide con el inicio de los efectos en el desarrollo neuronal. Es posible postular entonces que la actividad del circuito a través de la acción directa del glutamato sináptico gatillaría las etapas finales de la maduración neuronal en el giro dentado adulto. Por lo tanto, el correcto desarrollo de la conectividad glutamatérgica modularía el gatillado de las etapas posteriores de maduración. Como primera aproximación a esta hipótesis sería interesante estudiar las propiedades de la conectividad GABAérgica dendrítica y perisomática a las 3 semanas de edad, ya que éstas se desarrollan antes y después de la alteración observada en el desarrollo neuronal, respectivamente. Un experimento sólido que probaría la función del glutamato sináptico como modulador del desarrollo neuronal consistiría en expresar a través del retrovirus un shRNA dirigido contra la proteína PSD-95, que cumple la función de localizar el receptor AMPA en las espinas dendríticas (Sheng M y Hoogenraad CC 2007). De esta manera se estaría afectando específicamente la función sináptica de glutamato. Alternativamente, el efecto directo del disparo de potenciales de acción podría ser estudiado bloqueando específicamente la expresión de canales de sodio activables por voltaje a través de la utilización de múltiples siRNAs codificados en el genoma retroviral (Hartman KN *et al.* 2006). La utilización de un sistema inducible proveería la ventaja adicional de poder determinar

el momento específico del desarrollo neuronal en el que el disparo de potenciales de acción es necesario.

La estrategia de sobreexpresión de Kir2.1 *in vivo* también fue utilizada para estudiar el efecto de la actividad eléctrica en el desarrollo de la conectividad durante el desarrollo embrionario. Dichos trabajos lograron describir la existencia de diferentes mecanismos homeostáticos destinados a sobrellevar la reducción en la excitabilidad. Uno de estos mecanismos compensatorios se basa en el aumento de la corriente de sodio activable por voltaje, lo cual disminuye el umbral de disparo y en consecuencia mantiene la relación input/output (Pratt KG y Aizenman CD 2007). El segundo mecanismo homeostático descrito se caracteriza por el aumento en la liberación presináptica, lo cual produce una respuesta postsináptica inalterada (Paradis S *et al.* 2001). En cambio, las neuronas granulares nacidas en el giro dentado adulto no parecen compensar completamente los efectos de Kir, ya que a las cinco semanas de edad no solo la frecuencia de la actividad espontánea glutamatérgica se encuentra reducida, sino que además la amplitud de los eventos espontáneos no se ve modificada. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que los cambios homeostáticos se expresen a través de una menor inhibición GABAérgica sobre las neuronas granulares con excitabilidad reducida.

En los últimos años se publicaron dos trabajos en los que se evaluó el rol de la actividad del circuito circundante sobre el desarrollo de neuronas granulares del giro dentado adulto (Ge S *et al.* 2006; Overstreet-Wadiche LS *et al.* 2006). El trabajo de Overstreet-Wadiche y colaboradores demuestra que un aumento en la actividad circuital producido por la inducción de convulsiones con pilocarpina, acelera la velocidad de desarrollo neuronal. Sin embargo, dado que el tratamiento utilizado genera múltiples cambios en el microambiente, dicho trabajo no permite esclarecer los factores específicos involucrados en la regulación de la velocidad de maduración neuronal. En cambio, el estudio realizado por Ge y colaboradores pone de manifiesto el rol de GABA ambiental en las primeras etapas del desarrollo neuronal. En dicho trabajo la conversión de la acción despolarizante de GABA en hiperpolarizante desde el inicio del desarrollo genera un retraso en la maduración neuronal. Estos resultados sugieren que la acción despolarizante del GABA ambiental podría estar actuando como mensajero de la actividad del circuito durante las primeras etapas del desarrollo neuronal, aún antes de la formación de las primeras sinapsis. De acuerdo con estos resultados, la reducción en la excitabilidad a través de la sobreexpresión de Kir2.1 también genera una reducción en la velocidad de maduración neuronal que se desencadena más tarde en el desarrollo. Por lo tanto, es posible que en ambos

trabajos se esté evidenciando el rol de la actividad del circuito en diferentes etapas de la maduración neuronal: al comienzo del desarrollo la acción despolarizante de GABA modularía la activación de las etapas subsiguientes, mientras que más avanzado el desarrollo, glutamato gatillaría las últimas etapas de maduración neuronal.

El estudio de los efectos de la sobreexpresión de Kir2.1 continúa en manos de María Georgina Davies. Actualmente, dos caracterizaciones histológicas están siendo llevadas a cabo. En primer lugar se están estudiando las propiedades de desarrollo del árbol dendrítico de las neuronas con excitabilidad reducida. Debido a la baja expresión de GFP fue necesario coinyectar el retrovirus que expresa Kir2.1 con uno que expresa RFP bajo el promotor CAG. La fuerte expresión de RFP en las neuronas coinfectadas con ambos retrovirus, identificadas por la coexpresión de GFP y RFP, permite el estudio de la morfología neuronal sin cometer errores de subestimación por la baja expresión de GFP. En segundo lugar se quiso estudiar si la reducción en la excitabilidad tiene efectos en la sobrevivencia neuronal. Para ello fue utilizada la misma estrategia de coinyección retroviral a partir de la cual se desea estimar la proporción de sobrevivencia relativa entre las neuronas que sobreexpresan Kir2.1 y las que no, en un mismo animal. Los resultados de estos experimentos junto con el análisis electrofisiológico de la conectividad aferente mencionado anteriormente, permitirán completar la comprensión de las consecuencias de la reducción en la excitabilidad sobre el desarrollo neuronal. En particular, nos permitirá saber si el efecto concreto radica en un retraso en la maduración neuronal, o si por el contrario la alteración es permanente. Además, a través del estudio de la conectividad GABAérgica será posible determinar si el efecto es específico sobre la aferencia glutamatérgica, y/o si depende del momento de desarrollo de la aferencia, avalando o no la hipótesis propuesta acerca del rol de la liberación sináptica de glutamato.

En conclusión, los resultados obtenidos hasta el momento demuestran la existencia de un mecanismo de modulación dependiente de la actividad del circuito en las etapas finales de la maduración neuronal que actuaría específicamente a través de la despolarización de la célula en desarrollo del giro dentado adulto.

4. Materiales y Métodos

Retrovirus

En el presente trabajo se utilizaron dos retrovirus diferentes, ambos desarrollados en el laboratorio de Fred H. Gage (Salk Institute, La Jolla, California) y cedidos gentilmente para su uso en nuestro laboratorio.

Para la realización de los experimentos del primer capítulo de esta tesis, se utilizó un retrovirus no replicativo derivado del “Moloney murine leukemia virus” desarrollado por Henriette van Praag. Dicho retrovirus expresa la proteína GFP bajo el promotor de citomegalovirus (CMV), que es un promotor constitutivo medianamente fuerte (van Praag H *et al.* 2002). Para la producción del virus contamos con células HEK (*human embryonic kidney*) 293T establemente transfectadas con el genoma viral y los genes de las enzimas virales (línea celular NIT-GFP, clon 293gp/NIT-GFPc11). Estas células fueron transfectadas con un plásmido conteniendo el gen que codifica para la proteína de la cápside usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen). Este 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).

En el segundo capítulo de esta tesis los clonados fueron realizados a partir de otro vector retroviral, desarrollado por Chunmei Zhao. Este nuevo vector también es un retrovirus no replicativo derivado del “Moloney murine leukemia virus” pero fue modificado para expresar GFP río arriba de una secuencia IRES bajo el control del promotor CAG (Zhao C *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. Este vector también contiene un elemento posttranscripcional del virus de la hepatitis (WPR) que estabiliza al transcripto y por lo tanto aumenta la producción de 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-vsrg), otro conteniendo los genes de las enzimas virales (CMV-gag/pol) y un tercer plásmido conteniendo el genoma viral con o sin transgen (vCAG-IRES-GFP). Dichos plásmidos también fueron producidos en condiciones libres de endotoxina, como se indicó anteriormente.

Las células HEK 293T son cultivadas en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCO, Invitrogen) suplementado por cada litro con: 10% de suero fetal bovino, 10 ml glutamina (200mM) y 1ml Gentamicina (50mg/ml). Luego de 48hs de la transfección el sobrenadante conteniendo el virus fue cosechado, filtrado y

concentrado mediante dos rondas de ultracentrifugación. Finalmente, el virus fue resuspendido en DPBS estéril y conservado a -80°C hasta el momento de su uso. En la primer parte de la tesis la producción del virus fue realizada por Alejandro Schinder y Diego Laplagne, mientras que en la segunda parte de la tesis el virus fue producido en conjunto con María Gabriela Lombardi.

Animales y cirugía estereotáxica

Para todos los experimentos realizados en esta tesis se utilizaron ratones C57BL/6 hembra de 6 a 7 semanas de edad que fueron colocados en grupos en jaulas conteniendo ruedas giratorias tres días antes de la cirugía, con el fin de aumentar la tasa de neurogénesis (Figura 4.1 A) (van Praag H *et al.* 1999). Los animales fueron anestesiados intramuscularmente con $100\ \mu\text{g}$ de ketamina y $10\ \mu\text{g}$ de xilacina en $10\ \mu\text{l}$ de PBS por gramo. 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: $-2\ \text{mm}$ anteroposterior, $1.5\ \text{mm}$ lateral y $1.9\ \text{mm}$ ventral. Posteriormente, en la zona 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 $1\ \mu\text{l}$ de virus en 7 minutos, utilizando un capilar calibrado (Drummond Scientific) estirado con un puller (Figura 4.1 B). La piel del animal se cerró utilizando cemento ultrarrápido en base a cianocrilato (“La gotita”).

A



B



Figura 4.1 A: Foto de un ratón C57BL/6 de 6-7 semanas de edad corriendo voluntariamente en una rueda giratoria. B: Foto de un ratón C57BL/6 colocado en el aparato estereotáxico mientras está siendo inyectado con un retrovirus en el giro dentado.

Electrofisiología

Se realizaron registros de las propiedades electrofisiológicas de las neuronas nacidas en el giro dentado de ratones adultos luego de diferentes días post-inyección.

- *Corte de rebanadas de cerebro*: los ratones fueron anestesiados intramuscularmente (100 μg ketamina y 10 μg xilacina in 10 μL de PBS / g) y decapitados. Luego, se removió el cerebro en solución de disección fría y burbujeada con carbógeno (95% O_2 , 5% CO_2) y se lo colocó sobre un papel de filtro. Una vez allí, se cortó y aisló el hemisferio derecho. Luego, se cortó y descartó el cerebelo y la parte anterior del cerebro, obteniendo un cubo del hemisferio derecho que incluye al hipocampo completamente. Finalmente, se cortó apenas la parte dorsal para volverla un poco más recta, ya que esta parte es luego pegada en la platina del vibrátomo con Suprabond Gel. Rápidamente se le agregó solución de disección fría previamente burbujeada y se realizaron cortes horizontales de 300 μm de espesor. Durante la tesis se utilizaron dos vibrátomos diferentes: un Vibratome 1000 de Warner Instruments en la primera mitad de la tesis; o un Leica VT1200 S, Leica-Microsystems, para los experimentos de la segunda mitad. Las cuchillas utilizadas fueron en su mayoría FA-10 (Feather), o SuperSilver (Gillette). La velocidad de corte fue mantenida alrededor de 0,06 mm/s y el ángulo de corte de 15°. Una vez cortada, cada rodaja fue trasladada a una cámara de incubación que contiene ACSF (*artificial cerebro spinal fluid*) burbujeada con carbógeno y mantenida a 30°C. La solución de disección contiene (mM): 2.5 KCl, 2 NaH_2PO_4 , 25 NaHCO_3 , 0.5 CaCl_2 , 7 MgCl_2 , 20 glucosa, 1.3 ascorbato de sodio, 3.1 piruvato de sodio, 110 cloruro de colina. La solución ACSF contiene (mM): 125 NaCl, 2.5 KCl, 2.3 NaH_2PO_4 , 25 NaHCO_3 , 2 CaCl_2 , 1.3 MgCl_2 , 10 glucosa, 1.3 ascorbato de sodio, 3.1 piruvato de sodio, 315 mOsm.

- *Registros*: las propiedades electrofisiológicas de las neuronas nuevas fueron medidas por la técnica de patch clamp en configuración whole-cell a temperatura ambiente. Las rodajas fueron colocadas en la cámara de registro y fueron perfundidas con ACSF burbujeada a velocidad constante (1-2 ml/min). Las células transfectadas con el retrovirus fueron identificadas con un microscopio de fluorescencia Leica DMLFS utilizando un objetivo de inmersión en agua (63X, apertura numérica 0,9). Las pipetas de patch fueron preparadas a partir de capilares de vidrio (Garner KG-33, diámetro interno y externo 1 y 1,5 mm respectivamente) estiradas con un puller Narishige PP-830 para lograr una punta de $\sim 3 \text{ M}\Omega$ de resistencia. Los registros fueron realizados con un amplificador Axopatch 200B (Molecular Devices) en sus configuraciones voltage-clamp y current-clamp. En todos los experimentos las

neuronas registradas fueron mantenidas a un potencial de -80 mV. La conversión analógica/digital fue realizada con una DigiData 1322A (Molecular Devices) y los datos fueron adquiridos con los siguientes softwares: jClamp (SciSoft) o pClamp 9 (Molecular Devices). La solución interna utilizada contiene (mM): 120 gluconato de K, 20 KCl, 5 NaCl, 4 MgCl₂, 0.1 EGTA, 10 HEPES, 4 ATP, 0.3 GTP, 10 fosfocreatina-Tris, Alexa Fluor 594 (en células GFP⁺) o Alexa Fluor 488 (en células RFP⁺) 5 µg/ml (Invitrogen), pH 7.3 y 290 mOsm. Solo fueron incluidas en el análisis las células que colocalizaron con el colorante utilizado en la solución interna, y cuya corriente de fuga fue menor a 100 pA a -80 mV, y la resistencia de acceso menor a 30 MΩ durante el curso del experimento.

- *Medición de las propiedades pasivas:* el cálculo de resistencia de membrana, acceso y capacitancia fue obtenido en voltage-clamp con un pulso de -10 mV y 40 ms de duración, utilizando un filtro analógico de 10 kHz y una frecuencia de muestreo de 50 kHz. La resistencia de la membrana se calculó dividiendo 10 mV por el valor de corriente en estado estacionario. La resistencia de acceso se calculó dividiendo 10 mV por el valor pico de la corriente. La capacitancia se calculó dividiendo el área de la corriente capacitiva por 10 mV.

- *Medición de corrientes de sodio y potasio activables por voltaje:* para el cálculo de la corriente de sodio y potasio se realizaron en voltage-clamp escalones sucesivos de a 10 mV y 200 ms de duración, desde -50 mV a 70 mV (primera parte) o 60 mV (segunda parte). La amplitud de la corriente de sodio fue calculada como el pico de la corriente entrante a -20 mV. Este punto fue elegido debido a que la corriente de potasio no se encuentra activada a dicho voltaje. La amplitud de la corriente de potasio fue calculada en el estado estacionario del mayor escalón de voltaje aplicado. En los experimentos del capítulo I se realizó una resta automática de las corrientes de fuga de los registros de corriente de sodio y potasio. En los experimentos del capítulo II no se realizó substracción de las corrientes de fuga.

- *Medición de las propiedades de los potenciales de acción:* el estudio de potenciales de acción se realizó en configuración current-clamp manteniendo la línea de base del potencial a -80 mV. El protocolo consistió en aplicar pulsos de corriente despolarizante de intensidad creciente y 400 ms de duración, hasta llegar a un máximo de potencial de membrana de 0 mV. La amplitud de los escalones fue variable dependiendo del tipo de medición que se quiso realizar. La amplitud del potencial de acción fue medida entre el comienzo de la fase de crecimiento rápida y el primer pico. La amplitud del AHP fue medida con respecto al valor del estado estacionario luego de la

recuperación. El valor de corriente umbral fue calculado realizando escalones sucesivos de 1 o 2 pA, y calculando el promedio de por lo menos 3 repeticiones. La frecuencia máxima de espigas fue calculada como el promedio del valor máximo de espigas en 400 ms de por lo menos 3 repeticiones, siempre que se haya logrado llegar a la acomodación.

- *Medición de las corrientes Kir y corrientes de fuga:* para la medición de las corrientes de rectificación entrante se aplicaron escalones sucesivos de a 5 mV y 100 ms de duración, desde -130 mV hasta -40 mV. Luego se realizó una curva I-V midiendo el valor de la corriente en el estado estacionario y se calculó el valor de conductancia para la componente de potasio entrante realizando una regresión lineal de dicha curva I-V considerando únicamente los potenciales desde -130 mV a -90 mV (Figura 4.2).

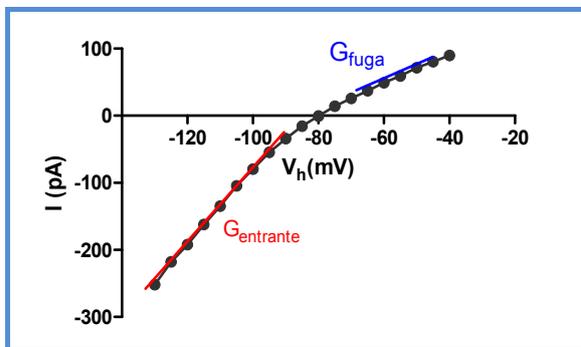


Figura 4.2 Ejemplo de mediciones de $G_{entrante}$ y G_{fuga} . Se muestra una curva I-V realizada en voltage-clamp.

Dado que los canales Kir son bloqueados por Mg^{++} y poliaminas cuando la corriente de potasio es saliente, el valor de conductancia de la componente saliente refleja la conductancia de los canales de fuga de la membrana. En la mayoría de los casos, dicho valor se calculó a partir de una curva I-V obtenida por la aplicación de escalones sucesivos de voltaje de 2

mV y 100 ms desde -80 mV a -44 mV, tomando para la regresión lineal mayormente valores entre -75 mV a -55 mV, antes de que se activen los canales activables por voltaje (Figura 4.2). En algunos experimentos la corriente de Kir fue bloqueada por la aplicación de 200 μM de $BaCl_2$ (bloqueante de canales de rectificación entrante) a la solución ACSF. En estos casos la conductancia máxima de Kir pudo ser calculada restando la corriente total menos la corriente luego del bloqueo con $BaCl_2$, y luego realizando una regresión lineal a valores de membrana hiperpolarizados. Cabe destacar que en la mayoría de los experimentos se observó una reducción progresiva del valor de la corriente entrante de potasio que probablemente se deba a la reducción en la concentración de alguna molécula regulatoria producto de la dilución del citoplasma por la técnica de whole-cell. Por lo tanto, en todos los casos se expresó el valor de $G_{entrante}$ al inicio del experimento.

- *Medición de respuestas postsinápticas evocadas:* la estimulación extracelular fue realizada utilizando un electrodo bipolar concéntrico (50 μm de diámetro; Frederick

Haer Company, Bowdoinham, ME) a 0.1 Hz con un estimulador Grass S88 y una unidad aisladora de estímulo (SIU5; Grass Instruments, Quincy, MA). El electrodo de estimulación fue ubicado sobre la capa granular a 250 μm de la célula registrada. La presencia de inputs funcionales fue estudiada utilizando estímulos de entre 15 y 20 V (50 μseg). Una célula fue considerada silente cuando no respondió a un estímulo de 30 V y una célula adyacente control madura sí lo hizo. La caracterización del tipo de input se realizó mediante farmacología: se utilizó 4 mM de ácido kinurénico (SIGMA, antagonista de los receptores ionotrópicos de glutamato) para aislar la corriente postsináptica GABAérgica, mientras que la corriente postsináptica glutamatérgica fue obtenida luego del bloqueo con bicuculina 20 μM (SIGMA, antagonista específico de los receptores GABA_A). Se midió la amplitud, el tiempo de crecimiento y de decaimiento de las corrientes evocadas. El tiempo de crecimiento se midió del 20 al 80% de la amplitud máxima. El tiempo de decaimiento se midió del pico al 40%. Para estudiar el potencial de reversión y la presencia de componentes cinéticos diferentes de las corrientes GABAérgica evocadas se construyeron curvas I-V. En los casos de PSCs con una única componente, la conductancia máxima fue calculada como la pendiente de la curva I-V y el potencial de reversión fue calculado de la regresión lineal. En el caso de PSCs evocados mixtos, el potencial de reversión de la componente rápida fue calculado de la curva I-V medida en el pico de las corrientes, mientras que el de la componente lenta fue calculado 85 ms después del artefacto de estimulación. Los valores de conductancia de la componente rápida y lenta fueron calculados como el cociente entre el pico de la corriente en el potencial de reversión de la componente opuesta y su correspondiente fuerza impulsora (*driving force*). En el cálculo de las propiedades cinéticas se utilizó el trazo de la corriente GABAérgica evocada en el potencial de membrana más cercano a la reversión de la componente opuesta. Todos los ejemplos de las respuestas evocadas corresponden a trazos promediados de más de 5 repeticiones.

- *Medición de receptores extrasinápticos:* la presencia de receptores extrasinápticos fue estudiada mediante la aplicación exógena de GABA (0.5 mM) o glutamato (0.5 mM) cerca del soma con un sistema de perfusión local, y las respuestas fueron registradas en voltage-clamp.

- *Medición de la actividad espontánea:* en el capítulo I se registró la actividad espontánea GABAérgica en presencia de 4 mM de ácido kinurénico. Los eventos se adquirieron a 10 KHz con Axoscope 9 (Molecular Devices) y se filtraron digitalmente a 2 KHz. En el capítulo II se registró la actividad espontánea miniatura glutamatérgica en presencia de picrotoxina 100 μM (antagonista específico de los receptores GABA_A),

CGP 100 nM (antagonista específico de los receptores GABA_B) y tetrodotoxina 0.5 μM (antagonista específico de los canales de sodio activables por voltaje). Estos registros se adquirieron a 2 KHz con pClamp 9. En todos los casos los eventos fueron detectados posteriormente con Mini Analysis (Synaptosoft) y fueron visualmente confirmados de manera de eliminar artefactos en la detección. Los eventos individuales de cada célula se exportaron a MATLAB (The Mathworks) donde se analizó la cinética de cada evento para la construcción de histogramas y luego se obtuvo un trazo promedio para cada célula normalizando la amplitud de los eventos y alineándolos al 10% de su fase de crecimiento. A partir de este trazo se obtuvo un valor de tiempo de crecimiento y decaimiento para cada experimento. Una célula fue considerada sinápticamente activa cuando se encontró más de 1 evento por minuto en un registro de 10 minutos como mínimo.

La mayor parte del análisis de los registros electrofisiológicos se realizó en MATLAB con rutinas automatizadas elaboradas por Diego Laplagne. Los trazos fueron importados a MATLAB directamente desde jClamp o mediante la rutina import_abf de Michele Giugliano.

Biología molecular: modificación del genoma retroviral

En el capítulo II quisimos modificar el genoma viral de manera tal que exprese la proteína Kir2.1 y la proteína GFP. La estrategia diseñada se basó en expresar bajo el promotor CAG las proteínas Kir2.1 y GFP a partir de un mensajero bicistrónico, estando la traducción de GFP comandada por una secuencia IRES. Para ello partimos de un cDNA de Kir2.1 de ratón clonado en pcDNA3.1 (cedido gentilmente por Guillermo Lanuza) y de un plásmido del genoma viral con el promotor CAG seguido de algunos sitios de clonado y río abajo una secuencia IRES y la secuencia del gen de GFP (lo denominaré CAG-IRES-GFP). Dado que el plásmido del genoma viral no posee muchos sitios de restricción, la estrategia que seguimos fue agregar por PCR la secuencia de la enzima de restricción elegida (BamHI) a los extremos del cDNA de Kir2.1. El DNA amplificado fue purificado del gel y luego fue ligado a un plásmido comercial que permite clonar fácilmente fragmentos con extremos romos (Zero Blunt TOPO, Invitrogen). Una vez seleccionada y confirmada por secuenciación la colonia positiva, se digirió el DNA plasmídico con BamHI para obtener el fragmento conteniendo a Kir2.1 (~1360pb), que luego fue purificado en gel. En paralelo se linealizó el DNA plasmídico del genoma viral utilizando la misma enzima y luego se

realizó la ligación de este con el fragmento purificado conteniendo Kir2.1. Las colonias positivas fueron chequeadas por secuenciación.

- *Secuencia de Kir2.1 en pcDNA3.1:*

En azul se muestra la secuencia nucleotídica completa del cDNA de kir2.1 de ratón (1287 nucleótidos) con su respectivo codón de iniciación y terminación marcados en negrita. Sombreado en gris se muestra la región de apareamiento con los primers diseñados para el subclonado.

```
CTCAGACTGTTTTCTAAAGCAGAAACACTGGCGTCCCCAGCGGAAGCAatgggcagtg  
tgagaaccaaccgctacagcatcgtctctcggaggaagatggcatgaagctggccactatggcagttgccaatggcttt  
gggaatggcaagagtaaagtccatacccgacaacagtgaggagccgctttgtgaagaaagatggcattgcaatgttc  
agttatcaacgtgggtgagaagggacagaggtacctggcagacatcttactacctgtgtcgacatccgctggaggtgg  
atgctggtatctctgtcttgcctcgtgctctcctggctgttctttggctgtgttttggtgatagccctgctccatggggatcta  
gatacttctaaagtgagcaaagcatgctgtcggagggtcaacagcttcacggctgcctcctcttccatcgagaccag  
acaaccattggctatggttcaggtgtgacagacgagtgccaattgctgtcttcatggtggtattccagtcaattgtaggc  
tgcattgacgccttcatcattggtgcagtcattggcgaagatggcaaagccaagaagagaaatgagactcttgtcttc  
agtcacaatgctgtgattgccatgagggatggcaaactctgcttgatgtggagagtgggtaacctcgaaagagccacctt  
gtggaagctcatgtccgggcacagcttctcaaacttaggatcacttcagaaggggagtatatccctttggaccagataga  
catcaatggtggtttgatagtggaattgaccgcatatttctagtgccccatcactatcgttcacgaaatagatgaagacag  
ccctttatagacttgagtaagcaggacattgacaatgcagacttgaaattgtgtcactggaaggcatggtggaggcg  
actgcatgacaactcaatgccggagttcgtatctggccaatgaaattctctggggtcaccgctatgagccagtgctcttg  
aagagaaactactataaagtagactattcaagattccataagactatgaagtacctaacccccctttgtagtgcca  
gagacttagcagagaagaaatacatccttcaaattgcaaattcattttgctatgaaaatgaagttgccctaacaagcaaa  
gaggaagaggaggatagtgagaacggagtcacagagagcacaagcacagactcacctcctggcatagatcctcac  
aaccaggcaagcgtacctctagagcccaggcccttaaggcgagaatcggagatatgaCTGGCTGATTCCGT  
CTTTGGAATACTTACTTTGCTACACAGCCTGACGTTGGTCAGAGGTCCGAGA
```

Primer 5':

5' ATGGATCCGCA**atgggcagtg**gagaa 3'

Primer 3':

5' GGGATCC**GACCAACGTCAGGCTGTGTAG** 3'

Subrayada se muestra la región de reconocimiento y corte de la enzima de restricción BamHI.

A continuación se detalla el procedimiento seguido para la realización del clonado:

En primer lugar se transformaron bacterias *E. coli* XL1-blue con el vector pcDNA3.1-Kir2.1 y con el vector del genoma viral CAG-IRES-GFP.

Descripción de las bacterias utilizadas:

- *E. coli* XL1-Blue: endA1 hsdR17 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac F'(proAB lacI^q lacZΔM15 Tn10)

- *Protocolo de transformación por shock térmico:*

1. 50-100µl de cultivo saturado de bacterias competentes químicas
2. 1µl plásmido
3. 30 minutos en hielo
4. 45 segundos a 42°C
5. 2 minutos en hielo
6. Agregar 1ml de medio LB
7. Incubar 60 minutos en agitación a 200 rpm a 37°C
8. Plaquear en medio SOB-Ampicilina (antibiótico de selección)

Luego, se seleccionó una colonia aislada de cada transformación a partir de la cual se armó un cultivo líquido de 3 ml de medio SOB-ampicilina que se dejó crecer toda la noche a 37°C con agitación. Al día siguiente se obtuvo el DNA plasmídico del cultivo realizando una minipreparación de DNA plasmídico (Miniprep).

- *Protocolo de Miniprep:*

1. Centrifugar 5 min a 5000 xg 4°C
2. Agregar al pellet 300 µl de solución 1. Resuspender con vortex
3. Agregar 300 µl de solución 2. Mezclar por inversión 10 veces
4. Agregar 300 µl de solución 3. Mezclar por inversión 10 veces
5. Dejar 10 minutos en hielo
6. Centrifugar 10 minutos a 12000 xg 4°C
7. Pasar el sobrenadante a un tubo limpio y agregar RNAsa
8. Incubar 1 hora a 37°C
9. Agregar 600 µl de Cloroformo-Isoamilico (24-1). Vortex (paso optativo)
10. Centrifugar 5 minutos 12000 xg 4°C (paso optativo)
11. Pasar el sobrenadante a un tubo limpio y agregar 700 µl de Isopropanol
12. Incubar 30 minutos a temperatura ambiente
13. Centrifugar 15 minutos a 12000 xg 4°C
14. Descartar el sobrenadante y dejar secar el pellet
15. Resuspender en 50 µl de agua

Luego se cuantificaron las muestras obtenidas utilizando un espectrofotómetro. Se midió la absorbancia del DNA a 260nm, y de las proteínas a 280nm como medida del grado de pureza de la muestra. También se corrió la muestra en un gel para comprobar la ausencia de DNA genómico y RNA contaminante.

Utilizando el plásmido pcDNA3.1-Kir2.1 se realizó una PCR con los primers diseñados para amplificar el cDNA de Kir2.1 y agregarle los sitios de corte para BamHI.

- PCR:

Mezcla:		Ciclos:
MgSO ₄ (50mM)		94°C 5 min
2µl		35 ciclos: 94°C 45 seg
Buffer de PCR 10x		66°C 60 seg
5µl		68°C 60 seg
dNTP (100mM)		68°C 10 min
2µl		
ADNc		Recuperación de la banda de ~1360pb.
xµl		Purificación en gel de agarosa.
Primer 5' (100ng/µl)	2µl	
Primer 3' (100ng/µl)	2µl	
Taq polimerasa alta fidelidad	1µl	
H ₂ O, hasta completar	50µl	

- Purificación en gel de agarosa:

La purificación de fragmentos de DNA producto de una PCR y de digestiones enzimáticas se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa 1% + BrEt 0.01% en TAE 1X. Las bandas correspondientes al fragmento de DNA a purificar se cortaron del gel visualizándolas en un transiluminador de luz UV y se purificaron con el kit "Wizard DNA Cleanup® System" (PROMEGA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Luego, el fragmento purificado fue ligado al vector TOPO según recomendaciones del fabricante (Zero Blunt TOPO, Invitrogen). Con el resultado de la ligación se transformaron bacterias *E coli*. competentes químicas con el método de shock térmico y se las plaqueó en medio SOB sólido conteniendo kanamicina como antibiótico de selección. Luego de crecidas, se eligieron varias colonias para la extracción de su DNA plasmídico y se testeó si contienen el inserto analizando el patrón de corte de

varias enzimas de restricción. Finalmente la colonia positiva fue confirmada por secuenciación.

Luego se digirieron con BamHI (NewEnglandBiolabs) el plásmido TOPO-Kir2.1 y el vector CAGIRESGFP. Para lo cual se utilizó:

- 10 µg DNA
- 2 µl de buffer BamHI
- 2 µl de BSA
- 2 µl de BamHI
- H₂O hasta completar 20 µl

La mezcla se incubó a 37°C por 3 horas. Luego se trató con fosfatasas al vector cortado para sacarle los grupos fosfatos de los extremos y disminuir la probabilidad de religación. Para ello se utilizó la enzima SAP de Promega y siguiendo con las indicaciones del fabricante, se incubó 1 hora a 37°C. Luego, las muestras se corrieron en un gel a partir del cual se identificaron las bandas de interés y se las purificó como se detalló anteriormente. Una vez purificadas se procedió a la ligación del inserto con el vector.

- Ligación:

Las proporciones inserto/plásmido se establecieron por comparación de bandas en un gel de agarosa 1% + BrEt 0.01%. Las ligaciones se armaron a volumen final 10µl conteniendo distintas relaciones inserto/plásmido, 1µl de Buffer de Ligación, 0,5µl de T4Ligasa (5U/µl) y H₂O hasta completar el volumen. Las muestras se incubaron toda la noche a 16°C o 2-3 hs a temperatura ambiente. La reacción se detuvo mediante una incubación a 65°C por 10 minutos.

Luego, se transforman bacterias electrocompetentes con el producto de la ligación ya que este método da mayor eficiencia de transformación:

- Electroporación:

1. 50-100µl de cultivo saturado de bacterias electrocompetentes
2. 2µl de plásmido
3. 10 minutos en hielo
4. Transferir a cubeta de electroporación
5. Electroporar a 2,5 Kv, 25 µF y 200Ω 14,6-4,7
6. Lavar inmediatamente con 1ml de SOB y pasar a un tubo estéril.
7. Incubar por 1 hora en Agitación a 200 rpm a 37°C
8. Plaquear en medio SOB-Ampicilina sólido y dejar crecer a 37°C toda la noche

Luego de crecidas, se eligieron varias colonias, se les extrajo el DNA plasmídico y se testearon mediante patrones de restricción para confirmar si contienen el inserto. Finalmente la colonia positiva fue confirmada por secuenciación.

- *Soluciones y buffers:*

- Buffer de Siembra 6X (ADN): 60% Glicerina; 0,25% Azul de Bromofenol; 0,25% Xilencianol.
- TAE 50X: (1L) 242g Tris Base; 57,1ml Ácido Acético Glacial; 0,5M EDTA (pH 8,0) 100ml.
- Tris-HCl 1M pH 8: (1L) 121g Tris Base; 700ml H₂O; llevar a pH 8 con 5N HCl. Completar con H₂O.
- Medio SOB (1 litro): se disuelven 20 gr de triptona. 5 gr de extracto de levadura y 0.5 gr de NaCl en 950 ml de agua. Luego se agrega 10 ml de KCl 250 mM, se ajusta el pH a 7 y se lleva a 1 litro. Se autoclava el medio y luego se le agrega 5 ml de MgCl₂ 2 M estéril.
- Medio SOB sólido (1 litro): igual protocolo pero agregando además 15 gr de Bacto-Agar.

Soluciones para Miniprep:

- Solución 1: 25mM Tris-HCl pH 8; Glucosa 50mM; 10 mM EDTA. Autoclavar.
- Solución 2: 0,2N NaOH; SDS 1%.
- Solución 3: (100 ml) 60ml de Acetato de Potasio 5M; 11,5ml Ácido Acético Glacial; 28,5ml de H₂O.

Perfusión, inmunohistoquímica y microscopía confocal:

Los animales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina y xilacina intramuscular, como se indicó anteriormente. Luego fueron perfundidos a través del ventrículo izquierdo primero con 50 ml de solución fisiológica con heparina (2.5U/ml) y luego con 100 ml de paraformaldehído (PFA) 4% en PB 0.1M pH 7.2 frío. 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 perfundidos son pasados a sacarosa 30% en PB 0.1M y son mantenidos a 4°C hasta el momento del corte. Una vez que los cerebros dejan de flotar son cortados con un micrótopo de deslizamiento Leica SM 2000R en rodajas de 40 µm que son mantenidas a -20°C en solución criopreservadora (3 volúmenes de

glicerol, 3 volúmenes de etilenglicol y 4 volúmenes de PB 0.2M) hasta el momento de realizarse la inmunohistoquímica.

Las inmunohistoquímicas fueron realizadas con la técnica de “free-floating” utilizando secciones a través de todo el hipocampo. El protocolo consistió en:

- 1) 3 lavados de 5 minutos con TBS 1 X con agitación a temperatura ambiente.
- 2) 1 hora de bloqueo (Solución de bloqueo: TBS con suero de burro y 0.25% de Triton X-100) con agitación a temperatura ambiente.
- 3) 72 horas de incubación con el anticuerpo primario con agitación a 4°C
- 4) 2 lavados de 15 minutos con TBS 1 X con agitación a temperatura ambiente.
- 5) 15 minutos de bloqueo con agitación a temperatura ambiente.
- 6) 2 horas de incubación con el anticuerpo secundario con agitación a temperatura ambiente.
- 7) 3 lavados de 5 minutos con TBS 1 X con agitación a temperatura ambiente.
- 8) Montaje con PVA-DABCO

Todos los anticuerpos fueron aplicados en TBS con suero de burro y 0.25% de Triton X-100. Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: anti-NeuN 1:50 (F. H. Gage), es un anticuerpo monoclonal que reconoce un factor de transcripción nuclear específico de neurona; anti-DCX 1:750, es un anticuerpo policlonal de conejo contra doublecortin, proteína que se expresa en el citoplasma de neuronas inmaduras en migración (cedido gentilmente por C. Walsh, Harvard Medical School, Cambridge, MA); anti-GFP 1:500 (Invitrogen), anticuerpo policlonal de pollo que reconoce a GFP o anticuerpo policlonal de conejo. Se utilizaron los siguientes anticuerpos secundarios correspondientes en una dilución 1:250 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA): anti-ratón Cy5 (cyanine 5) hecho en burro, anti-conejo Cy3 hecho en burro, anti-pollo Cy2 hecho en burro. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio confocal Zeiss Pascal (Zeiss, Jena, Alemania). La colocalización de marcadores fue realizada a través de todo el eje Z de cada célula, utilizando un “pinhole” menor a 1.

Análisis estadístico

Todos los gráficos y análisis estadísticos se realizaron en Prism 4 o 5 (GraphPad) y en todos ellos se graficó el promedio \pm el error estándar. La comparación entre las edades neuronales de un mismo grupo experimental fue realizada utilizando el test de ANOVA de una vía o el test no paramétrico de Kruskal-Wallis (cuando los datos no siguieron una distribución Gaussiana) seguido del post-test de Bonferroni o Dunns,

respectivamente. La comparación entre las edades de diferentes grupos experimentales fue realizada mediante un ANOVA de dos vías seguido del post-test de Bonferroni. Solo se realizaron post-test si los test estadísticos dieron efectos significativos. La normalidad de las muestras fue analizada con el test de D'Agostino y Pearson, y la igualdad de las varianzas con el test de Bartlett. Todas las pruebas estadísticas realizadas fueron a dos colas.

5. Abreviaturas

Aminoácidos: G (glicina), Y (tirosina), A (alanina)
AHP: hiperpolarización posterior al disparo de un potencial de acción
BMI: bicuculina
BrdU: bromodeoxiuridina
CA: cornu ammonis
CAG: promotor de actina de pollo
CE: corteza entorrinal
C_m: capacitancia de membrana
DCX: doublecortin, marcador de neurona inmadura
dpi: días postinyección
E: estadio embrionario
E_{GABA}: potencial de reversión de GABA
ES: error estándar
GFP: proteína fluorescente verde
G_{entrante}: conductancia de potasio entrante
G_{fuga}: conductancia de potasio saliente
G_{Kir} : conductancia de Kir
G_m: conductancia de membrana
G_{max}: conductancia máxima
IEG: genes de respuesta inmediata
IRES: secuencia interna de unión para ribosomas
I-V: gráfico de corriente vs voltaje
KCC2: cotransportador de cloro y potasio
Kir: canal de K⁺ de rectificación entrante
Kirmut: versión mutada del canal Kir2.1
K_v: canal de K⁺ activable por voltaje
kyn: ácido kinurénico
LTP: potenciación de largo término
NeuN: factor de transcripción de neurona madura
NKCC1: cotransportador de cloro y potasio y sodio
PA: potencial de acción
PFA: paraformaldehído
PIP₂: fosfatidilinositolbifosfato
POMC: pro-opiomelanocortina
PSC: corriente postsináptica
RFP: proteína fluorescente roja

R_m : resistencia de membrana

s_{pi} : semanas postinyección

T. Crec: tiempo de crecimiento

T. Dec: tiempo de decaimiento

TTX: tetrodotoxina

V_h : potencial de membrana aplicado

V_m : voltaje de membrana aplicado

V_r : potencial de reposo

6. Referencias

- Abrous DN, Koehl M, Le Moal M. Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *Physiol Rev*. 2005 Apr;85(2):523-69. Review.
- Adelsberger H, Garaschuk O, Konnerth A. Cortical calcium waves in resting newborn mice. *Nat Neurosci*. 2005 Aug;8(8):988-90. Epub 2005 Jul 10.
- Aimone JB, Wiles J, Gage FH. Potential role for adult neurogenesis in the encoding of time in new memories. *Nat Neurosci*. 2006 Jun;9(6):723-7. Review.
- Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol*. 1965 Jun;124(3):319-35
- Altman J. 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*. 1969 Dec;137(4):433-57.
- Altman J, Bayer SA. Mosaic organization of the hippocampal neuroepithelium and the multiple germinal sources of dentate granule cells. *J Comp Neurol*. 1990 Nov 15;301(3):325-42.
- Altman J, Bayer SA. Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods. *J Comp Neurol*. 1990 Nov 15;301(3):365-81.
- Alvarez P, Squire LR. Memory consolidation and the medial temporal lobe: a simple network model. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Jul 19;91(15):7041-5. Review.
- Ambrogini P, Lattanzi D, Ciuffoli S, Agostini D, Bertini L, Stocchi V, Santi S, Cuppini R. Morpho-functional characterization of neuronal cells at different stages of maturation in granule cell layer of adult rat dentate gyrus. *Brain Res*. 2004 Aug 13;1017(1-2):21-31.
- Angevine JB Jr. Time of neuron origin in the hippocampal region. An autoradiographic study in the mouse. *Exp Neurol Suppl*. 1965 Oct;Suppl 2:1-70.
- Banks MI, Li TB, Pearce RA. The synaptic basis of GABA_A,slow. *J Neurosci*. 1998 Feb 15;18(4):1305-17.
- Ben-Ari Y. Developing networks play a similar melody. *Trends Neurosci*. 2001 Jun;24(6):353-60. Review.
- Ben-Ari Y. Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci*. 2002 Sep;3(9):728-39. Review.
- Ben-Ari Y, Gaiarsa JL, Tyzio R, Khazipov R. GABA: a pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations. *Physiol Rev*. 2007 Oct;87(4):1215-84. Review.
- Bichet D, Haass FA, Jan LY. Merging functional studies with structures of inward-rectifier K(+) channels. *Nat Rev Neurosci*. 2003 Dec;4(12):957-67. Review.
- Biebl M, Cooper CM, Winkler J, Kuhn HG. Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain. *Neurosci Lett*. 2000 Sep 8;291(1):17-20.
- Bolteus AJ, Bordey A. GABA release and uptake regulate neuronal precursor migration in the postnatal subventricular zone. *J Neurosci*. 2004 Sep 1;24(35):7623-31.
- Brown J, Cooper-Kuhn CM, Kempermann G, Van Praag H, Winkler J, Gage FH, Kuhn HG. Enriched environment and physical activity stimulate hippocampal but not olfactory bulb neurogenesis. *Eur J Neurosci*. 2003 May;17(10):2042-6.
- Bruel-Jungerman E, Laroche S, Rampon C. New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment. *Eur J Neurosci*. 2005 Jan;21(2):513-21.

- Bruel-Jungerman E, Davis S, Rampon C, Laroche S. Long-term potentiation enhances neurogenesis in the adult dentate gyrus. *J Neurosci*. 2006 May 31;26(22):5888-93.
- Bryans WA. Mitotic activity in the brain of the adult white rat. *Anat. Rec.* 1959, 133, 65–71.
- Buffelli M, Busetto G, Bidoia C, Favero M, Cangiano A. Activity-dependent synaptic competition at mammalian neuromuscular junctions. *News Physiol Sci*. 2004 Jun;19:85-91. Review.
- Burrone J, O'Byrne M, Murthy VN. Multiple forms of synaptic plasticity triggered by selective suppression of activity in individual neurons. *Nature*. 2002 Nov 28;420(6914):414-8.
- Cameron HA, McKay RD. Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J Comp Neurol*. 2001 Jul 9;435(4):406-17.
- Cancedda L, Fiumelli H, Chen K, Poo MM. Excitatory GABA action is essential for morphological maturation of cortical neurons in vivo. *J Neurosci*. 2007 May 9;27(19):5224-35.
- Cobas A, Fairén A, Alvarez-Bolado G, Sánchez MP. Prenatal development of the intrinsic neurons of the rat neocortex: a comparative study of the distribution of GABA-immunoreactive cells and the GABA_A receptor. *Neuroscience*. 1991;40(2):375-97.
- Cobb SR, Buhl EH, Halasy K, Paulsen O, Somogyi P. Synchronization of neuronal activity in hippocampus by individual GABAergic interneurons. *Nature*. 1995 Nov 2;378(6552):75-8.
- Cohen-Cory S. The developing synapse: construction and modulation of synaptic structures and circuits. *Science*. 2002 Oct 25;298(5594):770-6. Review.
- Dayer AG, Ford AA, Cleaver KM, Yassaee M, Cameron HA. Short-term and long-term survival of new neurons in the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol*. 2003 Jun 9;460(4):563-72.
- Demarque M, Represa A, Becq H, Khalilov I, Ben-Ari Y, Aniksztejn L. Paracrine intercellular communication by a Ca²⁺- and SNARE-independent release of GABA and glutamate prior to synapse formation. *Neuron*. 2002 Dec 19;36(6):1051-61.
- Demarque M, Villeneuve N, Manent JB, Becq H, Represa A, Ben-Ari Y, Aniksztejn L. Glutamate transporters prevent the generation of seizures in the developing rat neocortex. *J Neurosci*. 2004 Mar 31;24(13):3289-94.
- Döbrössy MD, Drapeau E, Aurousseau C, Le Moal M, Piazza PV, Abrous DN. Differential effects of learning on neurogenesis: learning increases or decreases the number of newly born cells depending on their birth date. *Mol Psychiatry*. 2003 Nov;8(12):974-82.
- Doupnik CA, Davidson N, Lester HA. The inward rectifier potassium channel family. *Curr Opin Neurobiol*. 1995 Jun;5(3):268-77. Review.
- Doyle DA, Morais Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science*. 1998 Apr 3;280(5360):69-77.
- Drapeau E, Mayo W, Aurousseau C, Le Moal M, Piazza PV, Abrous DN. Spatial memory performances of aged rats in the water maze predict levels of hippocampal neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Nov 25;100(24):14385-90. Epub 2003 Nov 12.
- Duman RS. Depression: a case of neuronal life and death? *Biol Psychiatry*. 2004 Aug 1;56(3):140-5. Review.
- Dupret D, Fabre A, Döbrössy MD, Panatier A, Rodríguez JJ, Lamarque S, Lemaire V, Olié SH, Piazza PV, Abrous DN. Spatial learning depends on both the addition and removal of new hippocampal neurons. *PLoS Biol*. 2007 Aug;5(8):e214.
- Dupret D, Revest JM, Koehl M, Ichas F, De Giorgi F, Costet P, Abrous DN, Piazza PV. Spatial relational memory requires hippocampal adult neurogenesis. *PLoS ONE*. 2008 Apr 9;3(4):e1959.

- Dupuy-Davies S, Houser CR. Evidence for changing positions of GABA neurons in the developing rat dentate gyrus. *Hippocampus*. 1999;9(2):186-99.
- Eichenbaum H, Dudchenko P, Wood E, Shapiro M, Tanila H. The hippocampus, memory, and place cells: is it spatial memory or a memory space? *Neuron*. 1999 Jun;23(2):209-26. Review.
- Ekstrom AD, Kahana MJ, Caplan JB, Fields TA, Isham EA, Newman EL, Fried I. Cellular networks underlying human spatial navigation. *Nature*. 2003 Sep 11;425(6954):184-8.
- Elliott RC, Miles MF, Lowenstein DH. Overlapping microarray profiles of dentate gyrus gene expression during development- and epilepsy-associated neurogenesis and axon outgrowth. *J Neurosci*. 2003 Mar 15;23(6):2218-27.
- Epp JR, Spritzer MD, Galea LA. Hippocampus-dependent learning promotes survival of new neurons in the dentate gyrus at a specific time during cell maturation. *Neuroscience*. 2007 Oct 26;149(2):273-85. Epub 2007 Aug 10.
- Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med*. 1998 Nov;4(11):1313-7.
- Ernfors P, Bengzon J, Kokaia Z, Persson H, Lindvall O. Increased levels of messenger RNAs for neurotrophic factors in the brain during kindling epileptogenesis. *Neuron*. 1991 Jul;7(1):165-76.
- Espósito MS, Piatti VC, 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.
- Ferbinteanu J, Holsinger RM, McDonald RJ. Lesions of the medial or lateral perforant path have different effects on hippocampal contributions to place learning and on fear conditioning to context. *Behav Brain Res*. 1999 May;101(1):65-84.
- Freund TF, Buzsáki G. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*. 1996;6(4):347-470. Review.
- Freund TF, Gulyás AI. Inhibitory control of GABAergic interneurons in the hippocampus. *Can J Physiol Pharmacol*. 1997 May;75(5):479-87. Review.
- Freund TF. Interneuron Diversity series: Rhythm and mood in perisomatic inhibition. *Trends Neurosci*. 2003 Sep;26(9):489-95. Review.
- Freund TF, Katona I. Perisomatic inhibition. *Neuron*. 2007 Oct 4;56(1):33-42. Review.
- Fricke R, Cowan WM. An autoradiographic study of the development of the entorhinal and commissural afferents to the dentate gyrus of the rat. *J Comp Neurol*. 1977 May 15;173(2):231-50.
- Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science*. 2000 Feb 25;287(5457):1433-8. Review.
- Ganguly K, Schinder AF, Wong ST, Poo M. GABA itself promotes the developmental switch of neuronal GABAergic responses from excitation to inhibition. *Cell*. 2001 May 18;105(4):521-32.
- Gao XB, van den Pol AN. GABA, not glutamate, a primary transmitter driving action potentials in developing hypothalamic neurons. *J Neurophysiol*. 2001 Jan;85(1):425-34.
- Garaschuk O, Hanse E, Konnerth A. Developmental profile and synaptic origin of early network oscillations in the CA1 region of rat neonatal hippocampus. *J Physiol*. 1998 Feb 15;507 (Pt 1):219-36.
- Ge S, Goh EL, Sailor KA, Kitabatake Y, Ming GL, Song H. GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature*. 2006 Feb 2;439(7076):589-93. Epub 2005 Dec 11.

Ge S, Yang CH, Hsu KS, Ming GL, Song H. A critical period for enhanced synaptic plasticity in newly generated neurons of the adult brain. *Neuron*. 2007 May 24;54(4):559-66.

Goldman SA, Nottebohm F. Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983 Apr;80(8):2390-4.

Goldstein SA, Bockenhauer D, O'Kelly I, Zilberberg N. Potassium leak channels and the KCNK family of two-P-domain subunits. *Nat Rev Neurosci*. 2001 Mar;2(3):175-84. Review.

Gould E, Tanapat P, McEwen BS, Flügge G, Fuchs E. Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Mar 17;95(6):3168-71.

Gould E, Beylin A, Tanapat P, Reeves A, Shors TJ. Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat Neurosci*. 1999 Mar;2(3):260-5.

Gozlan H, Ben-Ari Y. Interneurons are the source and the targets of the first synapses formed in the rat developing hippocampal circuit. *Cereb Cortex*. 2003 Jun;13(6):684-92.

Gratzner HG. Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science*. 1982 Oct 29;218(4571):474-5.

Haas K, Li J, Cline HT. AMPA receptors regulate experience-dependent dendritic arbor growth in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Aug 8;103(32):12127-31. Epub 2006 Aug 1.

Hafting T, Fyhn M, Molden S, Moser MB, Moser EI. Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. *Nature*. 2005 Aug 11;436(7052):801-6. Epub 2005 Jun 19.

Hamilton A. The division of differentiated cells in the central nervous system of the white rat. *J Comp Neurol*. 1901, 11, 297-320.

Hartman KN, Pal SK, Burrone J, Murthy VN. Activity-dependent regulation of inhibitory synaptic transmission in hippocampal neurons. *Nat Neurosci*. 2006 May;9(5):642-9. Epub 2006 Apr 2.

Harzsch S, Dawirs RR. Neurogenesis in the developing crab brain: postembryonic generation of neurons persists beyond metamorphosis. *J Neurobiol*. 1996 Mar;29(3):384-98.

Hastings NB, Gould E. Rapid extension of axons into the CA3 region by adult-generated granule cells. *J Comp Neurol*. 1999 Oct 11;413(1):146-54. Erratum in: *J Comp Neurol* 1999 Dec 6;415(1):144.

Hennou S, Khalilov I, Diabira D, Ben-Ari Y, Gozlan H. Early sequential formation of functional GABA(A) and glutamatergic synapses on CA1 interneurons of the rat foetal hippocampus. *Eur J Neurosci*. 2002 Jul;16(2):197-208.

Hollrigel GS, Soltesz I. Slow kinetics of miniature IPSCs during early postnatal development in granule cells of the dentate gyrus. *J Neurosci*. 1997 Jul 1;17(13):5119-28.

Hollrigel GS, Ross ST, Soltesz I. Temporal patterns and depolarizing actions of spontaneous GABAA receptor activation in granule cells of the early postnatal dentate gyrus. *J Neurophysiol*. 1998 Nov;80(5):2340-51.

Holt JR, Johns DC, Wang S, Chen ZY, Dunn RJ, Marban E, Corey DP. Functional expression of exogenous proteins in mammalian sensory hair cells infected with adenoviral vectors. *J Neurophysiol*. 1999 Apr;81(4):1881-8.

Horio Y, Morishige K, Takahashi N, Kurachi Y. Differential distribution of classical inwardly rectifying potassium channel mRNAs in the brain: comparison of IRK2 with IRK1 and IRK3. *FEBS Lett*. 1996 Feb 5;379(3):239-43.

Hua JY, Smear MC, Baier H, Smith SJ. Regulation of axon growth in vivo by activity-based competition. *Nature*. 2005 Apr 21;434(7036):1022-6.

- Isaac JT, Crair MC, Nicoll RA, Malenka RC. Silent synapses during development of thalamocortical inputs. *Neuron*. 1997 Feb;18(2):269-80.
- Isackson PJ, Huntsman MM, Murray KD, Gall CM. BDNF mRNA expression is increased in adult rat forebrain after limbic seizures: temporal patterns of induction distinct from NGF. *Neuron*. 1991 Jun;6(6):937-48.
- Isomoto S, Kondo C, Kurachi Y. Inwardly rectifying potassium channels: their molecular heterogeneity and function. *Jpn J Physiol*. 1997 Feb;47(1):11-39. Review.
- Jarolimek W, Lewen A, Misgeld U. A furosemide-sensitive K⁺-Cl⁻ cotransporter counteracts intracellular Cl⁻ accumulation and depletion in cultured rat midbrain neurons. *J Neurosci*. 1999 Jun 15;19(12):4695-704.
- Jessberger S, Kempermann G. Adult-born hippocampal neurons mature into activity-dependent responsiveness. *Eur J Neurosci*. 2003 Nov;18(10):2707-12.
- Jessberger S, Zhao C, Toni N, Clemenson GD Jr, Li Y, Gage FH. Seizure-associated, aberrant neurogenesis in adult rats characterized with retrovirus-mediated cell labeling. *J Neurosci*. 2007 Aug 29;27(35):9400-7.
- Johns DC, Marx R, Mains RE, O'Rourke B, Marbán E. Inducible genetic suppression of neuronal excitability. *J Neurosci*. 1999 Mar 1;19(5):1691-7.
- Kaila K. Ionic basis of GABAA receptor channel function in the nervous system. *Prog Neurobiol*. 1994 Mar;42(4):489-537. Review.
- Kaplan MS, Hinds JW. Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science*. 1977 Sep 9;197(4308):1092-4.
- Kaplan MS, Bell DH. Neuronal proliferation in the 9-month-old rodent-radioautographic study of granule cells in the hippocampus. *Exp Brain Res*. 1983;52(1):1-5.
- Kaplan MS. Proliferation of subependymal cells in the adult primate CNS: differential uptake of DNA labelled precursors. *J Hirnforsch*. 1983;24(1):23-33.
- Karschin C, Dissmann E, Stühmer W, Karschin A. IRK(1-3) and GIRK(1-4) inwardly rectifying K⁺ channel mRNAs are differentially expressed in the adult rat brain. *J Neurosci*. 1996 Jun 1;16(11):3559-70.
- Karten YJ, Jones MA, Jeurling SI, Cameron HA. GABAergic signaling in young granule cells in the adult rat and mouse dentate gyrus. *Hippocampus*. 2006;16(3):312-20.
- Katz LC, Shatz CJ. Synaptic activity and the construction of cortical circuits. *Science*. 1996 Nov 15;274(5290):1133-8. Review.
- Kee N, Teixeira CM, Wang AH, Frankland PW. Preferential incorporation of adult-generated granule cells into spatial memory networks in the dentate gyrus. *Nat Neurosci*. 2007 Mar;10(3):355-62. Epub 2007 Feb 4.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*. 1997 Apr 3;386(6624):493-5.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *J Neurosci*. 1998 May 1;18(9):3206-12.
- Kempermann G, Brandon EP, Gage FH. Environmental stimulation of 129/SvJ mice causes increased cell proliferation and neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Curr Biol*. 1998 Jul 30-Aug 13;8(16):939-42.
- Kempermann G, Gage FH. Genetic determinants of adult hippocampal neurogenesis correlate with acquisition, but not probe trial performance, in the water maze task. *Eur J Neurosci*. 2002 Jul;16(1):129-36.

- Kempermann G, Gast D, Kronenberg G, Yamaguchi M, Gage FH. Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development*. 2003 Jan;130(2):391-9.
- Khazipov R, Esclapez M, Caillard O, Bernard C, Khalilov I, Tyzio R, Hirsch J, Dzhala V, Berger B, Ben-Ari Y. Early development of neuronal activity in the primate hippocampus in utero. *J Neurosci*. 2001 Dec 15;21(24):9770-81.
- Khazipov R, Sirota A, Leinekugel X, Holmes GL, Ben-Ari Y, Buzsáki G. Early motor activity drives spindle bursts in the developing somatosensory cortex. *Nature*. 2004 Dec 9;432(7018):758-61.
- Khirug S, Huttu K, Ludwig A, Smirnov S, Voipio J, Rivera C, Kaila K, Khiroug L. Distinct properties of functional KCC2 expression in immature mouse hippocampal neurons in culture and in acute slices. *Eur J Neurosci*. 2005 Feb;21(4):899-904.
- Kokaia Z, Lindvall O. Neurogenesis after ischaemic brain insults. *Curr Opin Neurobiol*. 2003 Feb;13(1):127-32. Review.
- Komuro H, Rakic P. Intracellular Ca²⁺ fluctuations modulate the rate of neuronal migration. *Neuron*. 1996 Aug;17(2):275-85.
- Kornack DR, Rakic P. Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 May 11;96(10):5768-73.
- Kronenberg G, Reuter K, Steiner B, Brandt MD, Jessberger S, Yamaguchi M, Kempermann G. Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli. *J Comp Neurol*. 2003 Dec 22;467(4):455-63.
- Kruger GM, Morrison SJ. Brain repair by endogenous progenitors. *Cell*. 2002 Aug 23;110(4):399-402. Review.
- Kubo Y, Baldwin TJ, Jan YN, Jan LY. Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature*. 1993 Mar 11;362(6416):127-33.
- Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci*. 1996 Mar 15;16(6):2027-33.
- Laplagne DA, Espósito MS, Piatti VC, Morgenstern NA, Zhao C, van Praag H, Gage FH, Schinder AF. Functional convergence of neurons generated in the developing and adult hippocampus. *PLoS Biol*. 2006 Nov;4(12):e409.
- Laplagne DA, Kamienkowski JE, Espósito MS, Piatti VC, Zhao C, Gage FH, Schinder AF. Similar GABAergic inputs in dentate granule cells born during embryonic and adult neurogenesis. *Eur J Neurosci*. 2007 May;25(10):2973-81. Epub 2007 May 17.
- Leinekugel X, Tseeb V, Ben-Ari Y, Bregestovski P. Synaptic GABAA activation induces Ca²⁺ rise in pyramidal cells and interneurons from rat neonatal hippocampal slices. *J Physiol*. 1995 Sep 1;487 (Pt 2):319-29.
- Leinekugel X, Medina I, Khalilov I, Ben-Ari Y, Khazipov R. Ca²⁺ oscillations mediated by the synergistic excitatory actions of GABA(A) and NMDA receptors in the neonatal hippocampus. *Neuron*. 1997 Feb;18(2):243-55.
- Leinekugel X, Khalilov I, Ben-Ari Y, Khazipov R. Giant depolarizing potentials: the septal pole of the hippocampus paces the activity of the developing intact septohippocampal complex in vitro. *J Neurosci*. 1998 Aug 15;18(16):6349-57.
- Leinekugel X, Khazipov R, Cannon R, Hirase H, Ben-Ari Y, Buzsáki G. Correlated bursts of activity in the neonatal hippocampus in vivo. *Science*. 2002 Jun 14;296(5575):2049-52.

- Leuner B, Mendolia-Loffredo S, Kozorovitskiy Y, Samburg D, Gould E, Shors TJ. Learning enhances the survival of new neurons beyond the time when the hippocampus is required for memory. *J Neurosci*. 2004 Aug 25;24(34):7477-81.
- Li H, Khirug S, Cai C, Ludwig A, Blaesse P, Kolikova J, Afzalov R, Coleman SK, Lauri S, Airaksinen MS, Keinänen K, Khiroug L, Saarma M, Kaila K, Rivera C. KCC2 interacts with the dendritic cytoskeleton to promote spine development. *Neuron*. 2007 Dec 20;56(6):1019-33.
- Liao D, Hessler NA, Malinow R. Activation of postsynaptically silent synapses during pairing-induced LTP in CA1 region of hippocampal slice. *Nature*. 1995 Jun 1;375(6530):400-4.
- Liu M, Pleasure SJ, Collins AE, Noebels JL, Naya FJ, Tsai MJ, Lowenstein DH. Loss of BETA2/NeuroD leads to malformation of the dentate gyrus and epilepsy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Jan 18;97(2):865-70. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 May 9;97(10):5679.
- Liu X, Tilwalli S, Ye G, Lio PA, Pasternak JF, Trommer BL. Morphologic and electrophysiologic maturation in developing dentate gyrus granule cells. *Brain Res*. 2000 Feb 21;856(1-2):202-12.
- Liu X, Wang Q, Haydar TF, Bordey A. Nonsynaptic GABA signaling in postnatal subventricular zone controls proliferation of GFAP-expressing progenitors. *Nat Neurosci*. 2005 Sep;8(9):1179-87. Epub 2005 Aug 14.
- Liu YB, Lio PA, Pasternak JF, Trommer BL. Developmental changes in membrane properties and postsynaptic currents of granule cells in rat dentate gyrus. *J Neurophysiol*. 1996 Aug;76(2):1074-88.
- Liu YB, Ye GL, Liu XS, Pasternak JF, Trommer BL. GABAA currents in immature dentate gyrus granule cells. *J Neurophysiol*. 1998 Nov;80(5):2255-67.
- Lledo PM, Alonso M, Grubb MS. Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat Rev Neurosci*. 2006 Mar;7(3):179-93. Review.
- Lohof AM, Delhaye-Bouchaud N, Mariani J. Synapse elimination in the central nervous system: functional significance and cellular mechanisms. *Rev Neurosci*. 1996 Apr-Jun;7(2):85-101. Review.
- Lois C, Alvarez-Buylla A. Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Mar 1;90(5):2074-7.
- LoTurco JJ, Owens DF, Heath MJ, Davis MB, Kriegstein AR. GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis. *Neuron*. 1995 Dec;15(6):1287-98.
- Lu L, Bao G, Chen H, Xia P, Fan X, Zhang J, Pei G, Ma L. Modification of hippocampal neurogenesis and neuroplasticity by social environments. *Exp Neurol*. 2003 Oct;183(2):600-9.
- Lübbbers K, Frotscher M. Differentiation of granule cells in relation to GABAergic neurons in the rat fascia dentata. Combined Golgi/EM and immunocytochemical studies. *Anat Embryol (Berl)*. 1988;178(2):119-27.
- Lübbbers K, Wolff JR, Frotscher M. Neurogenesis of GABAergic neurons in the rat dentate gyrus: a combined autoradiographic and immunocytochemical study. *Neurosci Lett*. 1985 Dec 18;62(3):317-22.
- Mackinnon R. Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature*. 1991 Mar 21;350(6315):232-5.
- Madsen TM, Kristjansen PE, Bolwig TG, Wörtwein G. Arrested neuronal proliferation and impaired hippocampal function following fractionated brain irradiation in the adult rat. *Neuroscience*. 2003;119(3):635-42.
- Magavi SS, Leavitt BR, Macklis JD. Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. *Nature*. 2000 Jun 22;405(6789):951-5.

- Manent JB, Demarque M, Jorquera I, Pellegrino C, Ben-Ari Y, Aniksztejn L, Represa A. A noncanonical release of GABA and glutamate modulates neuronal migration. *J Neurosci*. 2005 May 11;25(19):4755-65.
- Markakis EA, Gage FH. Adult-generated neurons in the dentate gyrus send axonal projections to field CA3 and are surrounded by synaptic vesicles. *J Comp Neurol*. 1999 Apr 19;406(4):449-60.
- Martin LA, Tan SS, Goldowitz D. Clonal architecture of the mouse hippocampus. *J Neurosci*. 2002 May 1;22(9):3520-30.
- Marty S, Berninger B, Carroll P, Thoenen H. GABAergic stimulation regulates the phenotype of hippocampal interneurons through the regulation of brain-derived neurotrophic factor. *Neuron*. 1996 Mar;16(3):565-70.
- Miles R, Tóth K, Gulyás AI, Hájos N, Freund TF. Differences between somatic and dendritic inhibition in the hippocampus. *Neuron*. 1996 Apr;16(4):815-23.
- Ming GL, Song H. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci*. 2005;28:223-50. Review.
- Mirescu C, Gould E. Stress and adult neurogenesis. *Hippocampus*. 2006;16(3):233-8. Review.
- Miyashita T, Kubo Y. Localization and developmental changes of the expression of two inward rectifying K(+)-channel proteins in the rat brain. *Brain Res*. 1997 Mar 7;750(1-2):251-63.
- Mizuno H, Hirano T, Tagawa Y. Evidence for activity-dependent cortical wiring: formation of interhemispheric connections in neonatal mouse visual cortex requires projection neuron activity. *J Neurosci*. 2007 Jun 20;27(25):6760-70.
- Morgenstern NA, Lombardi G, Schinder AF. Newborn granule cells in the aging dentate gyrus. *J Physiol.*, en prensa.
- Morozov YM, Freund TF. Postnatal development and migration of cholecystokinin-immunoreactive interneurons in rat hippocampus. *Neuroscience*. 2003;120(4):923-39.
- Nilsson M, Perfilieva E, Johansson U, Orwar O, Eriksson PS. Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory. *J Neurobiol*. 1999 Jun 15;39(4):569-78.
- Obrietan K, van den Pol AN. GABA neurotransmission in the hypothalamus: developmental reversal from Ca²⁺ elevating to depressing. *J Neurosci*. 1995 Jul;15(7 Pt 1):5065-77.
- O'Keefe J, Dostrovsky J. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res*. 1971 Nov;34(1):171-5.
- O'Keefe, J; Nadel L (1978). *The Hippocampus as a Cognitive Map*. Oxford University Press.
- Olariu A, Cleaver KM, Shore LE, Brewer MD, Cameron HA. A natural form of learning can increase and decrease the survival of new neurons in the dentate gyrus. *Hippocampus*. 2005;15(6):750-62.
- Overstreet LS, Hentges ST, Bumashny VF, de Souza FS, Smart JL, Santangelo AM, Low MJ, Westbrook GL, Rubinstein M. A transgenic marker for newly born granule cells in dentate gyrus. *J Neurosci*. 2004 Mar 31;24(13):3251-9.
- Overstreet-Wadiche L, Bromberg DA, Bensen AL, Westbrook GL. GABAergic signaling to newborn neurons in dentate gyrus. *J Neurophysiol*. 2005 Dec;94(6):4528-32. Epub 2005 Jul 20.
- Overstreet-Wadiche LS, Bensen AL, Westbrook GL. Delayed development of adult-generated granule cells in dentate gyrus. *J Neurosci*. 2006 Feb 22;26(8):2326-34.

- Overstreet-Wadiche LS, Bromberg DA, Bensen AL, Westbrook GL. Seizures accelerate functional integration of adult-generated granule cells. *J Neurosci*. 2006 Apr 12;26(15):4095-103.
- Overstreet-Wadiche LS, Westbrook GL. Functional maturation of adult-generated granule cells. *Hippocampus*. 2006;16(3):208-15. Review.
- Owens DF, Boyce LH, Davis MB, Kriegstein AR. Excitatory GABA responses in embryonic and neonatal cortical slices demonstrated by gramicidin perforated-patch recordings and calcium imaging. *J Neurosci*. 1996 Oct 15;16(20):6414-23.
- Owens DF, Kriegstein AR. Maturation of channels and receptors: consequences for excitability. *Int Rev Neurobiol*. 2001;45:43-87. Review.
- Carleton A, Petreanu LT, Lansford R, Alvarez-Buylla A, Lledo PM. Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb. *Nat Neurosci*. 2003 May;6(5):507-18.
- Paradis S, Sweeney ST, Davis GW. Homeostatic control of presynaptic release is triggered by postsynaptic membrane depolarization. *Neuron*. 2001 Jun;30(3):737-49. Erratum in: *Neuron* 2001 Jul 19;31(1):167.
- Parent JM, Lowenstein DH. Seizure-induced neurogenesis: are more new neurons good for an adult brain? *Prog Brain Res*. 2002;135:121-31. Review.
- Paton JA, Nottebohm FN. Neurons generated in the adult brain are recruited into functional circuits. *Science*. 1984 Sep 7;225(4666):1046-8.
- Pearce RA. Physiological evidence for two distinct GABAA responses in rat hippocampus. *Neuron*. 1993 Feb;10(2):189-200.
- Penn AA, Shatz CJ. Brain waves and brain wiring: the role of endogenous and sensory-driven neural activity in development. *Pediatr Res*. 1999 Apr;45(4 Pt 1):447-58. Review.
- Petreanu L, Alvarez-Buylla A. Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction. *J Neurosci*. 2002 Jul 15;22(14):6106-13.
- Piatti VC, Espósito MS, Schinder AF. The timing of neuronal development in adult hippocampal neurogenesis. *Neuroscientist*. 2006 Dec;12(6):463-8. Review.
- Pratt KG, Aizenman CD. Homeostatic regulation of intrinsic excitability and synaptic transmission in a developing visual circuit. *J Neurosci*. 2007 Aug 1;27(31):8268-77.
- Price J, Turner D, Cepko C. Lineage analysis in the vertebrate nervous system by retrovirus-mediated gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Jan;84(1):156-60.
- Rajan I, Cline HT. Glutamate receptor activity is required for normal development of tectal cell dendrites in vivo. *J Neurosci*. 1998 Oct 1;18(19):7836-46.
- Rakic P. Limits of neurogenesis in primates. *Science*. 1985 Mar 1;227(4690):1054-6.
- Rao MS, Hattiangady B, Abdel-Rahman A, Stanley DP, Shetty AK. Newly born cells in the ageing dentate gyrus display normal migration, survival and neuronal fate choice but endure retarded early maturation. *Eur J Neurosci*. 2005 Jan;21(2):464-76.
- Rapedius M, Fowler PW, Shang L, Sansom MS, Tucker SJ, Baukrowitz T. H bonding at the helix-bundle crossing controls gating in Kir potassium channels. *Neuron*. 2007 Aug 16;55(4):602-14.
- Represa A, Ben-Ari Y. Trophic actions of GABA on neuronal development. *Trends Neurosci*. 2005 Jun;28(6):278-83. Review.
- Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*. 1992 Mar 27;255(5052):1707-10.

- Richards LJ, Kilpatrick TJ, Bartlett PF. De novo generation of neuronal cells from the adult mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Sep 15;89(18):8591-5.
- Rivera C, Voipio J, Payne JA, Ruusuvuori E, Lahtinen H, Lamsa K, Pirvola U, Saarma M, Kaila K. The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature*. 1999 Jan 21;397(6716):251-5.
- Ruthazer ES, Akerman CJ, Cline HT. Control of axon branch dynamics by correlated activity in vivo. *Science*. 2003 Jul 4;301(5629):66-70.
- Sanes JR, Rubenstein JL, Nicolas JF. Use of a recombinant retrovirus to study post-implantation cell lineage in mouse embryos. *EMBO J*. 1986 Dec 1;5(12):3133-42.
- Saxe MD, Battaglia F, Wang JW, Malleret G, David DJ, Monckton JE, Garcia AD, Sofroniew MV, Kandel ER, Santarelli L, Hen R, Drew MR. Ablation of hippocampal neurogenesis impairs contextual fear conditioning and synaptic plasticity in the dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Nov 14;103(46):17501-6. Epub 2006 Nov 6.
- Saxe MD, Malleret G, Vronskaya S, Mendez I, Garcia AD, Sofroniew MV, Kandel ER, Hen R. Paradoxical influence of hippocampal neurogenesis on working memory. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Mar 13;104(11):4642-6. Epub 2007 Mar 5.
- Scharfman HE, Goodman JH, Sollas AL. Granule-like neurons at the hilar/CA3 border after status epilepticus and their synchrony with area CA3 pyramidal cells: functional implications of seizure-induced neurogenesis. *J Neurosci*. 2000 Aug 15;20(16):6144-58.
- Scharfman HE, Sollas AL, Berger RE, Goodman JH. Electrophysiological evidence of monosynaptic excitatory transmission between granule cells after seizure-induced mossy fiber sprouting. *J Neurophysiol*. 2003 Oct;90(4):2536-47.
- Schinder AF, Gage FH. A hypothesis about the role of adult neurogenesis in hippocampal function. *Physiology (Bethesda)*. 2004 Oct;19:253-61. Review.
- Schlessinger AR, Cowan WM, Gottlieb DI. An autoradiographic study of the time of origin and the pattern of granule cell migration in the dentate gyrus of the rat. *J Comp Neurol*. 1975 Jan 15;159(2):149-75.
- Schmidt-Hieber C, Jonas P, Bischofberger J. Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature*. 2004 May 13;429(6988):184-7. Epub 2004 Apr 25.
- Schulte U, Fakler B. Gating of inward-rectifier K⁺ channels by intracellular pH. *Eur J Biochem*. 2000 Oct;267(19):5837-41. Review.
- Scoville WB, Milner B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1957 Feb;20(1):11-21.
- Shapiro LA, Ribak CE. Newly born dentate granule neurons after pilocarpine-induced epilepsy have hilar basal dendrites with immature synapses. *Epilepsy Res*. 2006 Apr;69(1):53-66. Epub 2006 Feb 15.
- Sheng M, Hoogenraad CC. The postsynaptic architecture of excitatory synapses: a more quantitative view. *Annu Rev Biochem*. 2007;76:823-47. Review.
- Shors TJ, Miesegaes G, Beylin A, Zhao M, Rydel T, Gould E. Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature*. 2001 Mar 15;410(6826):372-6. Erratum in: *Nature* 2001 Dec 20-27;414(6866):938.
- Shors TJ, Townsend DA, Zhao M, Kozorovitskiy Y, Gould E. Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning. *Hippocampus*. 2002;12(5):578-84.

- Sidman RL, Miale IL, Feder N. Cell proliferation and migration in the primitive ependymal zone: an autoradiographic study of histogenesis in the nervous system. *Exp Neurol.* 1959 Oct;1:322-33.
- Sin WC, Haas K, Ruthazer ES, Cline HT. Dendrite growth increased by visual activity requires NMDA receptor and Rho GTPases. *Nature.* 2002 Oct 3;419(6906):475-80.
- Smith DM, Mizumori SJ. Hippocampal place cells, context, and episodic memory. *Hippocampus.* 2006;16(9):716-29. Review.
- Snyder JS, Kee N, Wojtowicz JM. Effects of adult neurogenesis on synaptic plasticity in the rat dentate gyrus. *J Neurophysiol.* 2001 Jun;85(6):2423-31.
- Snyder JS, Hong NS, McDonald RJ, Wojtowicz JM. A role for adult neurogenesis in spatial long-term memory. *Neuroscience.* 2005;130(4):843-52.
- Soltész I, Smetters DK, Mody I. Tonic inhibition originates from synapses close to the soma. *Neuron.* 1995 Jun;14(6):1273-83.
- Spigelman I, Zhang L, Carlen PL. Patch-clamp study of postnatal development of CA1 neurons in rat hippocampal slices: membrane excitability and K⁺ currents. *J Neurophysiol.* 1992 Jul;68(1):55-69.
- Squire LR, Zola SM. Episodic memory, semantic memory, and amnesia. *Hippocampus.* 1998;8(3):205-11. Review.
- Stanfield BB, Trice JE. Evidence that granule cells generated in the dentate gyrus of adult rats extend axonal projections. *Exp Brain Res.* 1988;72(2):399-406.
- Sugita N. Comparative studies on the growth of the cerebral cortex. *J. Comp. Neurol.* 1918, 29, 61-117.
- Takigawa T, Alzheimer C. Phasic and tonic attenuation of EPSPs by inward rectifier K⁺ channels in rat hippocampal pyramidal cells. *J Physiol.* 2002 Feb 15;539(Pt 1):67-75.
- Tashiro A, Sandler VM, Toni N, Zhao C, Gage FH. NMDA-receptor-mediated, cell-specific integration of new neurons in adult dentate gyrus. *Nature.* 2006 Aug 24;442(7105):929-33. Epub 2006 Aug 13.
- Tashiro A, Makino H, Gage FH. Experience-specific functional modification of the dentate gyrus through adult neurogenesis: a critical period during an immature stage. *J Neurosci.* 2007 Mar 21;27(12):3252-9.
- Tongiorgi E, Armellini M, Giulianini PG, Bregola G, Zucchini S, Paradiso B, Steward O, Cattaneo A, Simonato M. Brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein are targeted to discrete dendritic laminae by events that trigger epileptogenesis. *J Neurosci.* 2004 Jul 28;24(30):6842-52.
- Toni N, Teng EM, Bushong EA, Aimone JB, Zhao C, Consiglio A, van Praag H, Martone ME, Ellisman MH, Gage FH. Synapse formation on neurons born in the adult hippocampus. *Nat Neurosci.* 2007 Jun;10(6):727-34. Epub 2007 May 7.
- Toni N, Laplagne DA, Zhao C, Lombardi G, Ribak CE, Gage FH, Schinder AF. Neurons born in the adult dentate gyrus form functional synapses with target cells. *Nat Neurosci.*, en prensa.
- Tozuka Y, Fukuda S, Namba T, Seki T, Hisatsune T. GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells. *Neuron.* 2005 Sep 15;47(6):803-15.
- Tyzio R, Represa A, Jorquera I, Ben-Ari Y, Gozlan H, Aniksztejn L. The establishment of GABAergic and glutamatergic synapses on CA1 pyramidal neurons is sequential and correlates with the development of the apical dendrite. *J Neurosci.* 1999 Dec 1;19(23):10372-82.

- Tyzio R, Ivanov A, Bernard C, Holmes GL, Ben-Ari Y, Khazipov R. Membrane potential of CA3 hippocampal pyramidal cells during postnatal development. *J Neurophysiol*. 2003 Nov;90(5):2964-72. Epub 2003 Jul 16.
- Tyzio R, Holmes GL, Ben-Ari Y, Khazipov R. Timing of the developmental switch in GABA(A) mediated signaling from excitation to inhibition in CA3 rat hippocampus using gramicidin perforated patch and extracellular recordings. *Epilepsia*. 2007;48 Suppl 5:96-105. Erratum in: *Epilepsia*. 2007 Dec;48(12):2380.
- Van Eden CG, Mrzljak L, Voorn P, Uylings HB. Prenatal development of GABA-ergic neurons in the neocortex of the rat. *J Comp Neurol*. 1989 Nov 8;289(2):213-27.
- van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci*. 1999 Mar;2(3):266-70.
- van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Neural consequences of environmental enrichment. *Nat Rev Neurosci*. 2000 Dec;1(3):191-8. Review.
- van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature*. 2002 Feb 28;415(6875):1030-4.
- Wang CL, Zhang L, Zhou Y, Zhou J, Yang XJ, Duan SM, Xiong ZQ, Ding YQ. Activity-dependent development of callosal projections in the somatosensory cortex. *J Neurosci*. 2007 Oct 17;27(42):11334-42.
- Wang LP, Kempermann G, Kettenmann H. A subpopulation of precursor cells in the mouse dentate gyrus receives synaptic GABAergic input. *Mol Cell Neurosci*. 2005 Jun;29(2):181-9.
- Wang S, Scott BW, Wojtowicz JM. Heterogenous properties of dentate granule neurons in the adult rat. *J Neurobiol*. 2000 Feb 5;42(2):248-57.
- Weissman TA, Riquelme PA, Ivic L, Flint AC, Kriegstein AR. Calcium waves propagate through radial glial cells and modulate proliferation in the developing neocortex. *Neuron*. 2004 Sep 2;43(5):647-61.
- Wiesel TN. Postnatal development of the visual cortex and the influence of environment. *Nature*. 1982 Oct 14;299(5884):583-91. Review.
- Wong RO, Ghosh A. Activity-dependent regulation of dendritic growth and patterning. *Nat Rev Neurosci*. 2002 Oct;3(10):803-12. Review.
- Wu G, Malinow R, Cline HT. Maturation of a central glutamatergic synapse. *Science*. 1996 Nov 8;274(5289):972-6.
- Xie LH, John SA, Ribalet B, Weiss JN. Activation of inwardly rectifying potassium (Kir) channels by phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2): interaction with other regulatory ligands. *Prog Biophys Mol Biol*. 2007 Jul;94(3):320-35. Epub 2006 Jun 19. Review.
- Yamaguchi M, Saito H, Suzuki M, Mori K. Visualization of neurogenesis in the central nervous system using nestin promoter-GFP transgenic mice. *Neuroreport*. 2000 Jun 26;11(9):1991-6.
- Yamamoto M, Wada N, Kitabatake Y, Watanabe D, Anzai M, Yokoyama M, Teranishi Y, Nakanishi S. Reversible suppression of glutamatergic neurotransmission of cerebellar granule cells in vivo by genetically manipulated expression of tetanus neurotoxin light chain. *J Neurosci*. 2003 Jul 30;23(17):6759-67.
- Yang J, Jan YN, Jan LY. Determination of the subunit stoichiometry of an inwardly rectifying potassium channel. *Neuron*. 1995 Dec;15(6):1441-7.
- Ye GL, Song Liu X, Pasternak JF, Trommer BL. Maturation of glutamatergic neurotransmission in dentate gyrus granule cells. *Brain Res Dev Brain Res*. 2000 Nov 30;124(1-2):33-42.

Ye GL, Yi S, Gamkrelidze G, Pasternak JF, Trommer BL. AMPA and NMDA receptor-mediated currents in developing dentate gyrus granule cells. *Brain Res Dev Brain Res*. 2005 Mar 22;155(1):26-32.

Yu CR, Power J, Barnea G, O'Donnell S, Brown HE, Osborne J, Axel R, Gogos JA. Spontaneous neural activity is required for the establishment and maintenance of the olfactory sensory map. *Neuron*. 2004 May 27;42(4):553-66.

Zhang L, Spigelman I, Carlen PL. Development of GABA-mediated, chloride-dependent inhibition in CA1 pyramidal neurones of immature rat hippocampal slices. *J Physiol*. 1991 Dec;444:25-49.

Zhang ZW. Maturation of layer V pyramidal neurons in the rat prefrontal cortex: intrinsic properties and synaptic function. *J Neurophysiol*. 2004 Mar;91(3):1171-82. Epub 2003 Nov 5.

Zhao C, Teng EM, Summers RG Jr, Ming GL, Gage FH. Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *J Neurosci*. 2006 Jan 4;26(1):3-11.

Zhao C, Deng W, Gage FH. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell*. 2008 Feb 22;132(4):645-60. Review.

Zola-Morgan S, Squire LR, Amaral DG. Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. *J Neurosci*. 1986 Oct;6(10):2950-67.

Zola-Morgan S, Squire LR. Memory impairment in monkeys following lesions limited to the hippocampus. *Behav Neurosci*. 1986 Apr;100(2):155-60.