



Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Integración Funcional De Neuronas Nacidas En El Hipocampo Adulto

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

Lic. Diego A. Laplagne

Director de Tesis: Dr. Alejandro F. Schinder

Consejero de Estudios: Dra. Lidia Szczupak

Lugar de Trabajo: Fundación Instituto Leloir

Buenos Aires, 2008

Integración Funcional de Neuronas Nacidas en el Hipocampo Adulto.

En el giro dentado del hipocampo, la neurogénesis persiste desde el desarrollo hasta la vejez. Para comparar la integración al circuito del hipocampo de las células granulares (GCs) nacidas en el adulto y en el desarrollo temprano se utilizaron retrovirus para marcar, en los mismos ratones, progenitores neurales en estos dos estadios. Se realizaron luego registros electrofisiológicos en rebanadas agudas de cerebro para estudiar cuantitativamente los principales aferentes de las GCs. Los experimentos muestran que las neuronas generadas durante el desarrollo y la adultez convergen hacia un patrón de conectividad aferente común.

Para determinar si las GCs generadas en la adultez son capaces de formar sinapsis funcionales con neuronas blanco se utilizó un retrovirus para expresar en ellas Channelrhodopsin-2 (ChR2), un canal catiónico activable por luz. Esto permite activarlas por pulsos lumínicos mientras se realizan registros en putativos blancos postsinápticos del hipocampo. Se demostró que estas neuronas forman conexiones eferentes funcionales y liberan glutamato como neurotransmisor.

El extenso conjunto de propiedades estudiadas muestra que las células granulares nacidas en todos los estadios del desarrollo maduran hasta alcanzar un fenotipo similar, sugiriendo que el rol fisiológico de la neurogénesis adulta reside en el agregado o recambio de unidades funcionalmente equivalentes. Las células granulares nacidas en el adulto son unidades totalmente funcionales del circuito del hipocampo, pues son capaces de integrar información de la corteza y el giro dentado y transmitirla a neuronas postsinápticas.

Palabras clave: neurogénesis adulta, hipocampo, patch clamp, sinapsis, retrovirus, channelrhodopsin-2.

Functional Integration of Adult-born Neurons to the Hippocampal Circuit

In the murine hippocampus neurogenesis spans from early development through adulthood. To compare the integration of development- and adult-born granule cells (GCs) to the hippocampal circuit, neural progenitors were retrovirally labeled at both stages in the same mice. Electrophysiological experiments were then carried out in acute brain slices in order to quantitatively study the main synaptic inputs to GCs. Results show that neurons generated during development and adulthood converge into a common pattern of afferent connectivity.

To determine whether adult-born GCs were able to establish functional output synapses, the retrovirus was modified to express the light-activated cationic channel Channelrhodopsin-2 (ChR2). This allowed for the spiking of these neurons to be controlled by light pulses while recordings of putative postsynaptic targets were carried out. It was shown that adult-born neurons establish functional output synapses and release glutamate as their neurotransmitter.

The vast array of properties studied proves that GCs born at all developmental stages mature into a similar phenotype, suggesting the physiological role of adult neurogenesis lies in the addition or replacement of equivalent functional units. Adult-born GCs are fully functional units of the hippocampal circuit as they are able to integrate information from the cortex and the dentate gyrus and transmit it to postsynaptic targets.

Keywords: adult neurogenesis, hippocampus, patch clamp, synapse, retrovirus, channelrhodopsin-2.

AGRADECIMIENTOS

A Alejandro Schinder por introducirme a la neurociencia.

A los compañeros del Laboratorio de Plasticidad Neuronal, que participaron activamente de esta tesis: Soledad Espósito, Verónica Piatti, Nicolas Morgenstern, Gabriela Lombardi, Juan Kamienkowski, Lucas Mongiat, Mariela Trinchero y Georgina Davies.

A Fred Gage y Chunmei Zhao por aportar los vectores retrovirales.

A Leopoldo Petreanu por su asistencia en el trabajo con Channelrhodopsin-2 y a Stefan Herlitze por proveer gentilmente la construcción.

A Daniel Calvo, Osvaldo Uchitel, Laura Morelli, Lidia Szczupak, Mariano Sigman, Gabriel Mindlin y Ron Calabrese por su ayuda desinteresada.

A los múltiples organizadores del Taller de Neurociencias por su contribución a mi formación.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, el CONICET, la Fundación Instituto Leloir y la International Brain Research Organization.

AGRADECIMIENTOS	4
INTRODUCCIÓN	8
EL HIPOCAMPO	8
ESTRUCTURA Y CIRCUITO	8
FUNCIÓN	14
DESARROLLO Y EVOLUCIÓN	21
NEUROGÉNESIS ADULTA	23
BREVE RESEÑA HISTÓRICA	23
NEUROGÉNESIS ADULTA EN EL GIRO DENTADO	25
INTEGRACIÓN FUNCIONAL DE LAS NEURONAS NUEVAS	27
OBJETIVOS	29
MATERIALES Y MÉTODOS	31
CONSTRUCCIÓN DE GENOMAS RETROVIRALES	31
ENSAMBLADO DE PARTÍCULAS RETROVIRALES	36
CIRUGÍA Y ANIMALES	37
PREPARACIÓN DE REBANADAS AGUDAS DE CEREBRO	39
ELECTROFISIOLOGÍA	40
COMPOSICIÓN DE LAS SOLUCIONES UTILIZADAS	40
ADQUISICIÓN Y ANÁLISIS DE DATOS ELECTROFISIOLÓGICOS	41
ENSAYOS EN CÉLULAS EN CULTIVO	45
RESULTADOS	46

PARTE PRIMERA - CONEXIONES AFERENTES SOBRE LAS GCs NACIDAS EN EL ADULTO	46
DISEÑO EXPERIMENTAL	46
PROPIEDADES DE MEMBRANA	50
CONEXIONES AFERENTES INHIBITORIAS	52
Corrientes GABAérgicas evocadas por estimulación extracelular	53
Caracterización de las corrientes evocadas	53
Estudios comparativos	57
Actividad GABAérgica espontánea	62
Corrientes espontáneas perisomáticas	63
Corrientes espontáneas dendríticas	67
CONEXIONES AFERENTES GLUTAMATÉRGICAS	71
Estimulación de las vías perforantes medial y lateral	71
Amplitud y plasticidad de corto plazo	74
Potenciales de acción evocados por aferencias excitatorias	77
PARTE SEGUNDA - CONEXIONES EFERENTES DE LAS GCs NACIDAS EN EL ADULTO	82
DISEÑO EXPERIMENTAL	82
CONSTRUCCIÓN DE RETROVIRUS PARA EL ESTUDIO DE LAS CONEXIONES EFERENTES	84
RESPUESTA A LA LUZ EN CÉLULAS GRANULARES QUE EXPRESAN CHANNELRHODOPSIN-2	87
CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE CONEXIONES EFERENTES DE GCs NACIDAS EN EL ADULTO	93
Clasificación de las neuronas registradas	93
Sinapsis funcionales sobre interneuronas	96
Análisis farmacológico de las corrientes evocadas por luz sobre interneuronas	103
Corrientes evocadas por luz sobre otros tipos neuronales	109
Carácter mono o polisináptico de las corrientes registradas	111
DISCUSIÓN	116

CONEXIONES AFERENTES Y EFERENTES DE LAS NEURONAS NUEVAS	118
AFERENCIAS GLUTAMATÉRGICAS	119
AFERENCIAS GABAÉRGICAS	122
CONEXIONES EFERENTES	123
MECANISMOS PARA LA CONVERGENCIA	126
ROL FISIOLÓGICO DE LA NEUROGÉNESIS ADULTA	128
PERSPECTIVAS	131
<u>ABREVIATURAS</u>	<u>137</u>
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	<u>138</u>
<u>PUBLICACIONES</u>	<u>150</u>

INTRODUCCIÓN

La neurogénesis del hipocampo adulto tiene lugar en el giro dentado, donde resulta en la producción de nuevas células granulares. Introduciremos entonces en primer lugar la estructura, circuito y función del hipocampo de manera de poner en contexto este fenómeno. Dado el gran dinamismo del campo de estudio en el que se enmarca la presente tesis, limitaremos la introducción principalmente al estado de tema en el momento de su inicio, incorporando en la discusión aportes realizados con posterioridad por otros grupos de investigación.

EL HIPOCAMPO

La formación hipocampal forma parte del sistema límbico e incluye a la corteza entorrinal, el giro dentado, el cornu ammonis (CA1 a CA3) y el subículo. En adelante utilizaremos el término hipocampo para referir en conjunto al giro dentado y el cornu ammonis. Factores anatómicos y funcionales confluyeron para hacer del hipocampo una de las estructuras más estudiadas del sistema nervioso central.

ESTRUCTURA Y CIRCUITO

Anatómicamente el hipocampo se distingue como una estructura de límites definidos y presenta una perfecta disposición laminar de sus cuerpos celulares y neuritas (**Figura 1**). De hecho, como en pocas otras estructuras, su histología sugiere instantáneamente una buena aproximación a su organización circuital. Esta organización aparentemente simple y el hecho de que su circuito se conserva en gran medida funcional en rodajas transversales lo convirtió en un excelente objeto para estudios electrofisiológicos.

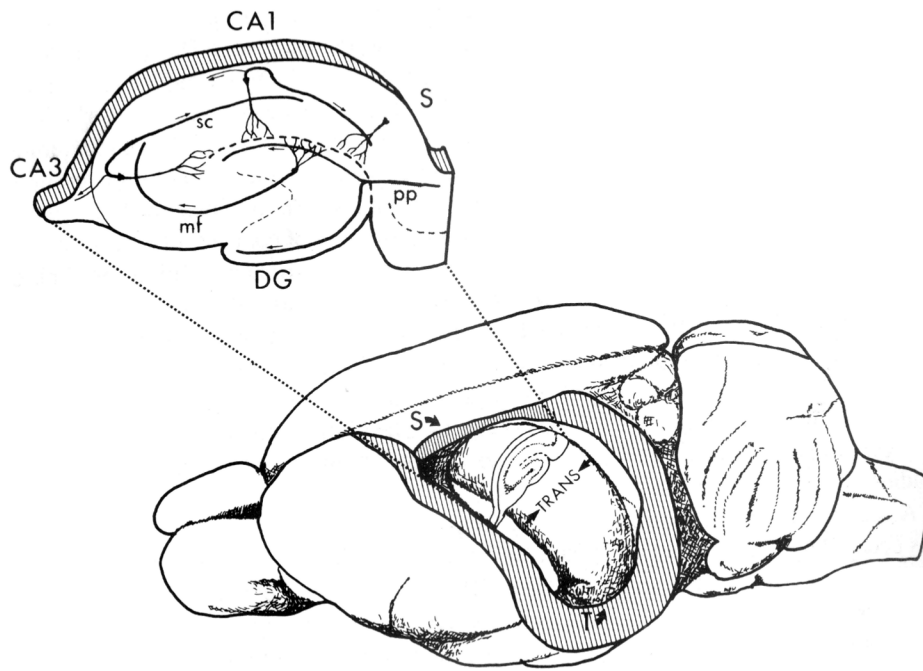


Figura 1. Esquema mostrando la ubicación del hipocampo izquierdo en un cerebro de rata al que se removió parte de la corteza. Se indican los extremos septal (S) y temporal (T). Arriba se expande la vista de una sección transversal del mismo en el que se señalan los componentes del circuito trisináptico. pp: vía perforante, mf: fibras mossy, sc: colaterales de Schaffer, DG: giro dentado, S: subículo (Reproducido de Johnston et al. 1998).

Se define como “circuito principal” o “circuito trisináptico” del hipocampo a un circuito excitatorio glutamatérgico idealizado que describe el flujo de actividad desde y hacia la corteza a través del giro dentado, CA3 y CA1 (Figura 1)(Andersen et al. 1969): 1) El circuito comienza en neuronas de la capa II de la corteza entorrinal, cuyos axones conforman la vía perforante (“*perforant path*”) y contactan las dendritas de las células granulares. La vía perforante se divide anatómica y funcionalmente en dos, la medial y la lateral, las cuales se originan en neuronas de la corteza entorrinal medial y lateral respectivamente (Hjorth-Simonsen 1972; Hjorth-Simonsen et al. 1972; Steward 1976; van Groen et al. 2003). La vía medial transmite información espacial (Ferbinteanu et al. 1999; Hafting et al. 2005; Hargreaves et al. 2005) y termina en el tercio medio de la capa molecular del giro dentado. Los axones de la vía lateral terminan en el tercio externo de la capa molecular y conllevarían información no espacial (como ser de objetos, olores, etc). 2) Las células granulares extienden sus axones, las fibras

mossy, a través del hilus hacia CA3 donde contactan las dendritas proximales de las neuronas piramidales. 3) Los axones estas células, los colaterales de Schaffer, contactan luego a las neuronas piramidales en CA1. La actividad eferente de CA1 regresa luego a la corteza entorrinal a través del subículo.

Este circuito sirve como hoja de ruta para orientarse en el hipocampo pero hoy es sabido que asumir un flujo unidireccional de la información es una sobresimplificación. El circuito excitatorio mismo presenta recurrencias que contradicen esta noción (**Figura 2**). En el giro dentado, las células granulares forman conexiones excitatorias con células mossy del hilus (Scharfman et al. 1990), las cuales excitan a su vez a las primeras (Scharfman 1995), formando un feedback excitatorio disináptico. Las células piramidales de CA3, por su parte, establecen contactos excitatorios entre sí, formando una red local altamente recurrente (Miles et al. 1986). Estas células contactan también a las células mossy del hilus, estableciendo así una compleja recurrencia excitatoria hacia el giro dentado (Scharfman 1994). Por otro lado, la vía perforante contacta también de manera directa a células mossy y células piramidales en CA3 y CA1, rompiendo el flujo secuencial propuesto en el circuito trisináptico (Witter et al. 1989).

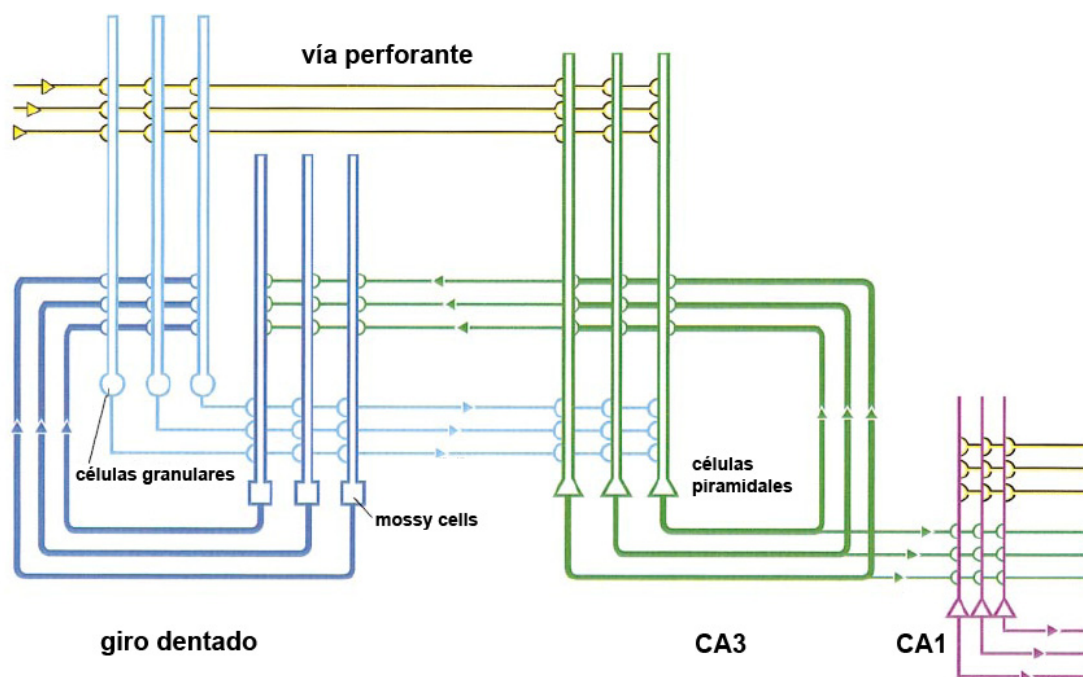


Figura 2. Circuito excitatorio ampliado del hipocampo. Dos circuitos recurrentes locales en el giro dentado y CA3 se vinculan por los contactos de las células granulares sobre las piramidales y los de éstas sobre las células mossy. La vía perforante contacta directamente a las tres poblaciones de neuronas principales. El esquema no incluye los contactos excitatorios sobre interneuronas, formados por todos los tipos celulares mostrados ni aquellos formados por la vía perforante sobre las células mossy (Adaptado de Lisman 1999).

Cualquier visión del circuito hipocampal es incompleta si no tiene en cuenta la participación de las interneuronas inhibitorias (Freund et al. 1996). Si bien se presentan en menor número, existe una amplia variedad de clases de estas neuronas, las cuales liberan GABA como principal neurotransmisor. A su vez, cada una puede contactar miles de neuronas principales, ejerciendo efectos globales sobre el circuito. Sólo en la región CA1 se ha propuesto la existencia de 16 clases de interneuronas (Somogyi et al. 2005). La variabilidad encontrada de hecho pone en duda la existencia misma de subtipos bien definidos (Parra et al. 1998; Markram et al. 2004). En los últimos años ganó fuerza la clasificación de las interneuronas a partir de la zona de terminación de sus axones sobre la región perisomática o las dendritas de las neuronas principales (Houser 2007). Si bien las dos grandes clases así definidas no resultan homogéneas, el criterio se basa en la observación de que esta división anatómica es a su vez una clara división funcional. La inhibición perisomática es capaz de controlar y sincronizar el disparo de grandes poblaciones de neuronas principales mientras que los contactos formados sobre dendritas modularían el efecto de las aferencias excitatorias (Cobb et al. 1995; Miles et al. 1996; Pouille et al. 2001). En el giro dentado, entre las interneuronas perisomáticas se distinguen a las células basket, que contactan el cuerpo celular y las dendritas proximales de las células granulares, y a las células axo-axónicas, que forman sinapsis sobre el segmento inicial de su axón. Los cuerpos celulares de estas interneuronas se encuentran por lo general en la capa granular, mayormente en su margen con el hilus, aunque las axo-axónicas pueden encontrarse en el hilus mismo (**Figura 3**). Las interneuronas que contactan las dendritas de las células granulares pueden localizar su soma en el hilus o la capa molecular y contactar específicamente los dos tercios externos de esta última (zona de terminación de la vía

perforante) o el tercio interno (zona de terminación de las aferencias desde células mossy ipsi- y contralaterales).

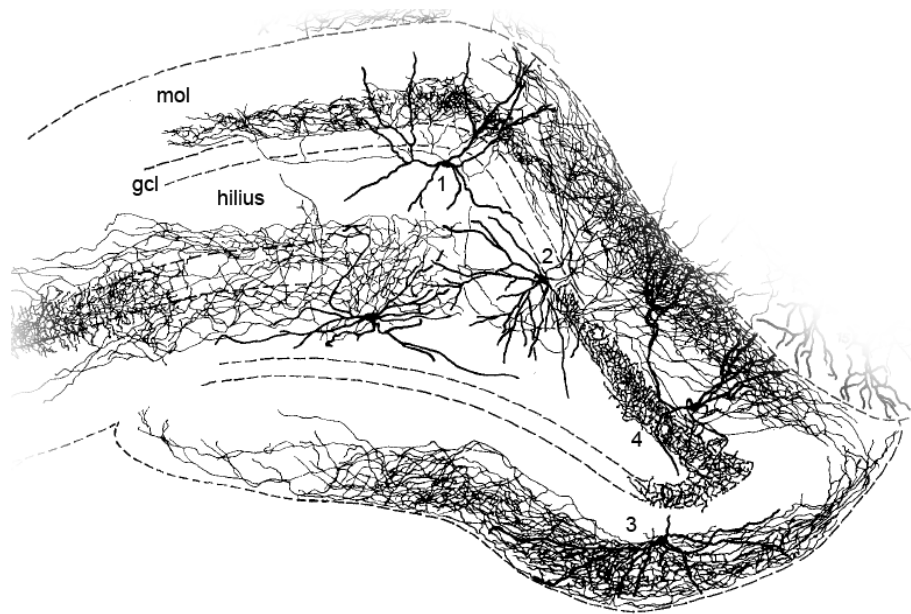


Figura 3. Reconstrucción morfológica de distintas clases de interneuronas en el giro dentado. Las dendritas y axones se evidencian como trazos gruesos y finos respectivamente. Se observan ejemplos con soma en el hilus y plexo axonal en el tercio interno (1) o los dos externos (2) de la capa molecular (mol), con soma y axón en la capa molecular misma (3) o células basket (4), con soma y axón en la capa granular (gcl) (Adaptado de Freund et al. 1996).

Las células granulares (GCs) tienen somas pequeños ($\sim 10 \mu\text{m}$ de diámetro) y aproximadamente esféricos que se disponen formando la capa granular, de 4 a 6 células de espesor. Esta capa presenta en cortes transversales una forma de “V” o “U” según su nivel septotemporal y se identifica a sus dos mitades como hoja superior e inferior, cuyas células pueden presentar diferencias morfológicas (Rahimi et al. 2007) y funcionales (Chawla et al. 2005) (**Figura 4**). Una a cinco dendritas principales emergen del extremo apical del soma y se ramifican en la capa molecular. Del extremo opuesto surge su axón, conocido como fibra mossy, el cual se ramifica en el hilus antes de enviar una proyección a través del stratum lucidum de CA3. Las fibras mossy forman sinapsis sobre células mossy y células piramidales a través de botones sinápticos de gran tamaño y sobre interneuronas inhibitorias de la capa

granular, el hilus y CA3 a través de extensiones más pequeñas en forma de filopodios (Acsady et al. 1998). La plasticidad en estos dos tipos de terminales es radicalmente distinta (Salin et al. 1996; Maccaferri et al. 1998; Toth et al. 2000; Nicoll et al. 2005). Las sinapsis formadas sobre células piramidales presentan una fuerte facilitación dependiente de frecuencia. Pasar a estimular esta vía de frecuencias bajas (<0.1 Hz) a intermedias (1-5 Hz) puede aumentar en más de un orden de magnitud la amplitud de las respuestas postsinápticas. En contactos formados sobre interneuronas este protocolo puede producir facilitaciones mucho menores o incluso depresiones de la respuesta. Esta plasticidad diferencial hace que el efecto sobre las células piramidales de la activación de las fibras mossy pase de una inhibición neta a bajas frecuencias (por el reclutamiento preferencial de inhibición feed-forward) a una fuerte excitación a frecuencias mayores (Mori et al. 2004). La fuerza de esta conexión es tal que la activación de una única célula granular puede controlar el disparo de neuronas blanco en CA3 (Henze et al. 2002).

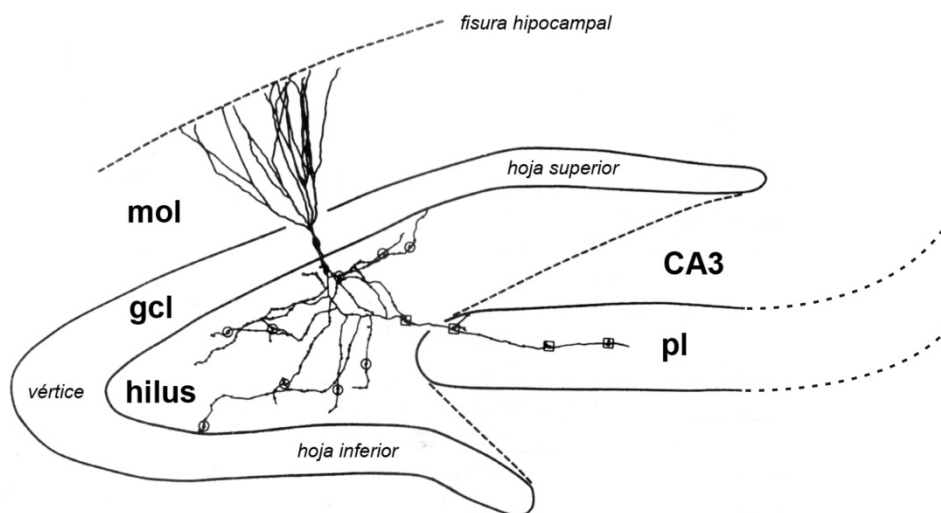


Figura 4. El giro dentado. Se presenta la reconstrucción de una célula granular sobre un esquema de un corte transversal del giro. Se observa su árbol dendrítico en la capa molecular (mol), su soma en la capa granular (gcl) y su axón ramificado en el hilus y hacia la capa piramidal (pl) de CA3. Los círculos y cuadrados señalan la ubicación de grandes botones sinápticos. La hoja superior queda ubicada entre CA3 y CA1 (Adaptado de Johnston et al. 1998).

El giro dentado recibe, además de los aferentes corticales descritos, aferencias subcorticales. Estas últimas provienen de números reducidos de células en núcleos específicos e involucran en general neurotransmisores de acción lenta y difusa. Se especula sobre una distinción funcional entre ambos tipos de aferencias, con las corticales proveyendo al hipocampo de información temporalmente detallada de eventos externos y las subcorticales modulando su impacto al favorecer distintos modos oscilatorios de actividad poblacional (Traub et al. 1991). Entre las entradas subcorticales se distinguen los aferentes GABAérgicos y colinérgicos desde el septum medial/banda diagonal de Broca. Estudios de microscopía electrónica muestran que los axones colinérgicos contactan principalmente dendritas de células granulares y en menor medida de interneuronas (Frotscher et al. 1985). Los axones GABAérgicos en cambio contactan exclusivamente a interneuronas inhibitorias, de igual forma que otros aferentes subcorticales como los serotoninérgicos del raphe, modulando indirectamente la inhibición sobre las células granulares (Leranth et al. 2007).

FUNCIÓN

El interés por el estudio del hipocampo obedece también a las evidencias obtenidas por estudio de lesiones espontáneas o inducidas que lo vinculan con la formación de memorias. El caso clínico más famoso es el del paciente de iniciales H.M., quien de joven sufrió la remoción quirúrgica bilateral de su hipocampo como tratamiento para un severo caso de epilepsia (Scoville et al. 1957). La lesión resultó en un síndrome de amnesia anterógrada total, por el cual era incapaz de formar nuevas memorias estables, sin deteriorarse en mayor medida sus memorias previas a la cirugía. Este y otros estudios sugieren fuertemente que el hipocampo es esencial para la formación de memorias declarativas en general y episódicas en particular (sucesos, tiempos, lugares) pero no así de memoria de procedimientos (habilidades adquiridas por la práctica). El rango temporal de las memorias guardadas en esta estructura es acotado y

se propone que luego de este período la actividad que sostiene a las mismas se traslada a centros corticales donde puede residir en el largo plazo (Zola-Morgan et al. 1990; Alvarez et al. 1994). La función del hipocampo se vincula también con la navegación espacial (O'Keefe et al. 1978). En humanos, como en aves y pequeños mamíferos, comportamientos que demandan intensivamente memoria espacial correlacionan con aumentos en el volumen hipocampal (Lee et al. 1998; Maguire et al. 2000).

Los primeros estudios en correlacionar actividad neuronal en el hipocampo con comportamiento se basaron en el registro de potenciales de campo locales. Cuando roedores exploran su entorno o durante el sueño REM, se detecta en el hipocampo actividad oscilatoria theta (~4-8 Hz) (Kahana et al. 2001). Esta actividad rítmica depende de las aferencias colinérgicas subcorticales mencionadas, aunque puede reproducirse en rodajas lo que sugiere la presencia de un generador intrínseco en el hipocampo (Konopacki et al. 1987). El ritmo theta modula la inducción de potenciación a largo plazo estando esta favorecida durante el pico del ciclo (Huerta et al. 1993; Orr et al. 2001). A su vez, la relación temporal del disparo de las células piramidales con la fase de la oscilación parece relevante a su codificación del espacio, un fenómeno conocido como phase coding (Jensen et al. 2000). Entre otros ritmos hipocampales destaca el gamma (~30-100 Hz), el cual se observa con mayor fuerza en el giro dentado y suele detectarse montado sobre los picos de oscilaciones theta (**Figura 5**). In vivo la expresión de gamma en el giro dentado necesita de las aferencias de la corteza entorrinal, pero el mismo puede generarse localmente en rodajas al ser excitadas (Towers et al. 2002; Poschel et al. 2003). Estas oscilaciones de alta frecuencia están vinculadas a la actividad de redes de interneuronas fast-spiking (Whittington et al. 2003), que inervan el soma de las neuronas principales.

gamma - theta

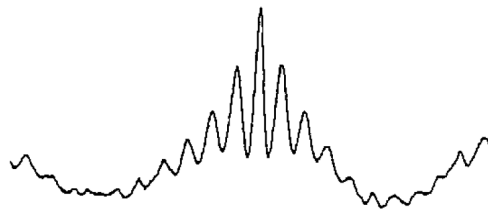


Figura 5. Potencial de campo promedio medido in vivo en el giro dentado de ratas. Los episodios están alineados al pico de ondas gamma. Se observa la modulación en amplitud de este ritmo por la fase del theta. Tiempo total: 200 ms (Adaptado de Bragin et al. 1995).

En 1971 se describe mediante el registro in vivo de *single units* (potenciales de acción de neuronas aisladas registrados extracelularmente) en la región CA1 la existencia de neuronas cuya actividad depende fuertemente de la localización espacial del animal. Estas células de lugar (*"place cells"*, muy probablemente células piramidales, Henze et al. 2000) presentan campos receptivos espaciales (*"place fields"*), zonas en las cuales su frecuencia de disparo aumenta sensiblemente (**Figura 6**). A partir de estos trabajos seminales, la actividad de células de lugar se constituye como el correlato electrofisiológico paradigmático de la función hipocampal.

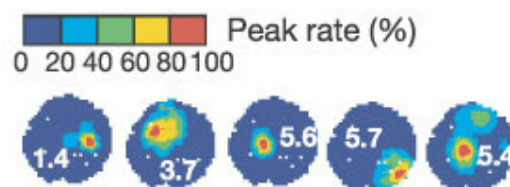


Figura 6. Actividad de células de lugar hipocampales. Tasa de disparo promedio de cinco células piramidales de CA1 de acuerdo a la localización del animal en una jaula circular. Cada punto del espacio se colorea de acuerdo a su tasa normalizada al valor máximo, indicado en Hz. Se observa la localización de campos receptivos espaciales. (Reproducido de Lever et al. 2002)

Trabajos posteriores demostraron que estas células modulan también su actividad por claves contextuales no espaciales (Eichenbaum et al. 1999). Esto es consistente con el rol del hipocampo en codificar memorias episódicas, en las que el espacio es sólo uno de los aspectos

relevantes. En el giro dentado, la existencia de células de lugar no fue confirmada hasta dos décadas después (Jung et al. 1993). Este retraso se debió en parte a la muy baja frecuencia basal de disparo de las células granulares, lo que dificultaba su detección al resultar enmascarada por el disparo a alta frecuencia de interneuronas. A su vez, sólo una baja proporción de GCs respondió al espacio en las condiciones estudiadas. Los autores encuentran en ratas que estas GCs presentan un mayor número de campos y de mayor precisión espacial en comparación a los propios de neuronas en CA3. La activación de GCs por experiencias espaciales fue también confirmada detectando la expresión del gen Arc (Chawla et al. 2005). En este estudio se observó que la exploración espacial activa células de la hoja superior y no así de la inferior de la capa granular. La proporción de GCs activadas fue menor al 3%, consistente con los resultados electrofisiológicos descritos y apoyando una codificación de tipo dispersa ("*sparse*") en el giro dentado, como se elaborará más adelante.

La relativa simpleza del circuito hipocampal y su clara vinculación con procesos mnésicos motivaron la elaboración de diversos modelos teóricos que intentan vincular actividad con función. Si bien no se cuenta con un modelo definitivo, algunos esfuerzos tempranos siguen proveyendo hoy día de un marco teórico útil para guiar e interpretar la experimentación. El corazón de estos modelos consiste en tratar a la región CA3 como una red de memoria autoasociativa (Marr 1971; McNaughton et al. 1987) lo cual explicaremos resumidamente.

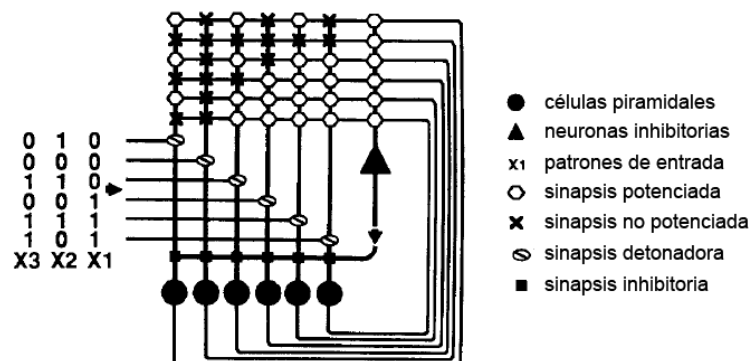


Figura 7. Esquema de la región CA3 como una red de memoria autoasociativa. Las entradas X provienen de fibras mossy desde células granulares. Las células piramidales forman sinapsis recurrentes con sus propias dendritas, las cuales se encuentran potenciadas o no según la historia previa de actividad (Adaptado de McNaughton et al. 1987).

En este modelo simple los patrones de actividad de las células granulares activan a las células piramidales a través de sinapsis “detonadoras” ocasionando su disparo (**Figura 7**). Los axones de estas últimas forman contactos recurrentes potenciándose sólo las sinapsis formadas sobre las dendritas de las mismas neuronas que fueron activadas por el patrón de entrada. Esto produce un aprendizaje de tipo hebbiano autoasociativo. La inhibición feed-forward tiene como rol normalizar la actividad de manera que patrones de entrada fuertes no saturen al circuito. Una vez entrenada la red con distintos patrones, si se presenta un patrón incompleto (ej: $X = 101000$) la misma es capaz de producir la misma salida que de haberse presentado el patrón completo ($X = 101010$). Este fenómeno es conocido como completado de patrones (“*pattern-completion*”) y se propone como correlato circuital de la recuperación de memorias completas a partir de presentaciones incompletas de estímulos. Si bien estos modelos centran la atención en la región CA3, permiten poner en contexto a la actividad de las células granulares y proponer un posible rol funcional para las mismas dentro de la formación hipocampal. En particular, constituyendo estas la principal entrada de información a la región CA3, los modelos predicen que propiedades debería cumplir su actividad poblacional para optimizar las posibilidades de codificación y almacenamiento de memorias (Marr 1971; McNaughton et al. 1987; Treves et al. 1992; Acsady et al. 2007):

- i. La actividad poblacional en el giro dentado debe ser de tipo dispersa (“*sparse*”). Esto es, en cada momento solo una baja proporción de las células granulares debe estar activada. Esto tiene el efecto de maximizar la capacidad de almacenamiento de información, por minimizar tanto el grado de superposición de dos patrones cualesquiera de actividad como el número de sinapsis utilizadas para el almacenamiento de cada evento.
- ii. Esta actividad dispersa debe transmitirse fidedignamente a un número acotado de blancos en CA3. La transmisión en esta conexión debe ser eficiente para que su influencia sobresalga sobre el bombardeo sináptico producido por el gran número de

recurrentes presentes mientras que mantener bajo el número de células piramidales contactado por cada fibra mossy permite un menor solapamiento en los patrones poblacionales de estas células. Este último efecto permite que distintas memorias no se confundan como consecuencia del proceso de compleción de patrones. Como se mencionó ya, la conexión de fibra mossy a célula piramidal está descrita como una de las conexiones excitatorias más fuertes de la corteza (Jaffe et al. 2007). A su vez, cada fibra mossy contactaría tan sólo unas 15 células piramidales (Amaral et al. 1990).

Como adelantamos ya, los experimentos confirman que la actividad poblacional de las células granulares es compatible con una codificación dispersa. En el dominio temporal, este tipo de codificación se evidencia en bajas tasas de disparo basales, con raros períodos de alta frecuencia acotados en el tiempo. En el dominio espacial, esta codificación resulta en campos receptivos compactos de manera que cada potencial de acción provee una gran cantidad de información espacial. Sin embargo la aferencia principal del giro dentado, la corteza entorrinal, realiza no una codificación dispersa sino una distribuida de los estímulos sensoriales. En este tipo de codificación una gran proporción de las unidades del circuito participan de cada representación. La actividad de la corteza entorrinal medial se caracteriza por la presencia de células de grilla (“grid cells”), neuronas que modulan su tasa de disparo a intervalos regulares en el espacio, tal vez uno de los campos receptivos más elegantes descritos en el sistema nervioso central (Hafting et al. 2005). Estos campos necesariamente resultan en la actividad conjunta de grandes poblaciones neuronales en cada lugar del espacio. Surge así una hipótesis funcional clara y distintiva para el giro dentado: actuar como traductor entre el código distribuido de la neocorteza y el disperso del hipocampo (Acsady et al. 2007). Esta tarea lo distinguiría funcionalmente de cualquier otra estructura cortical.

Mientras el tipo de codificación en corteza puede favorecer el establecimiento de generalizaciones, el hipocampo parece optimizado para amplificar pequeñas diferencias

discretizando así el ambiente en representaciones radicalmente distintas. Este último proceso es conocido como separación de patrones ("pattern separation") y puede evidenciarse comportamentalmente. Entre los numerosos estudios en los que lesiones del giro dentado comprometen la adquisición de memoria espacial destaca el realizado por Gilbert y colaboradores en el que la lesión dificulta la distinción entre contextos espaciales cuando estos son similares pero no cuando presentan grandes diferencias (Gilbert et al. 2001). Otra evidencia comportamental del rol del giro en la separación de patrones espaciales se obtuvo en ratones cuyas células granulares no expresan receptores funcionales tipo NMDA, no siendo posible entonces la inducción de potenciación de largo plazo (LTP) en las sinapsis de la vía perforante (McHugh et al. 2007). Estos animales fueron capaces de aprender por condicionamiento aversivo pero generalizaron erróneamente el contexto del entrenamiento a otro ambiente similar. Esta dificultad en formar representaciones distintas para ambientes parecidos se evidenció también como una menor diferencia en los patrones de actividad registrados en CA3 en los distintos ambientes.

El registro mediante multielectrodos de poblaciones neuronales in vivo permitió recientemente estudiar directamente el fenómeno de separación de patrones por las células granulares en ratas (Leutgeb et al. 2007). Se observó que, a diferencia de las células piramidales de CA3, éstas presentan múltiples campos receptivos espaciales. Frente a pequeños cambios en el entorno la localización de los campos se mantiene pero cada uno cambia su tasa de disparo de manera independiente, de manera que los vectores poblacionales de actividad distinguen claramente entre ambientes parecidos. Sin embargo, en respuesta a estos cambios sutiles del entorno, la actividad de las células de grilla de la corteza entorrinal no se modificó a niveles detectables, lo cual sugiere que el giro dentado mismo está realizando la operación de separación de patrones. Sorprendentemente, a pesar de que sólo se detecta una baja proporción de células granulares activas, estas mismas y no otras son las que se encuentran activas cuando el animal explora otros ambientes totalmente distintos. Esto

es radicalmente distinto a lo encontrado en CA3 (Leutgeb et al. 2005), en donde ambientes distintos reclutan poblaciones mayormente independientes de neuronas, y se desconoce por qué solo una subpoblación menor de las células granulares es activada por la exploración espacial.

DESARROLLO Y EVOLUCIÓN

El desarrollo de la capa granular del giro dentado sigue un patrón temporal atípico que comienza en el embrión, alcanza su máxima tasa neurogénica en las primeras semanas postnatales y se prolonga durante la vida adulta. El patrón espacio-temporal de neurogénesis de las GCs en ratones y ratas fue estudiado en detalle en diversos trabajos desde 1965 a 1990. Las GCs derivan de precursores generados en el neuroepitelio dentado primario, ubicado en la pared medial del ventrículo lateral (Altman et al. 1990). En ratas, las primeras células en diferenciarse a neuronas se hacen postmitóticas en E14 y migran hasta conformar el borde externo de la hoja superior de la capa granular (Schlessinger et al. 1975). Con posterioridad, hacia E18, se forma la matriz dentada secundaria. Las neuronas generadas a partir de estos progenitores migran hasta completar el borde externo de la capa. Hacia el momento del nacimiento se establece en la región del hilus la matriz dentada terciaria a partir de la cual se produce la mayor incorporación de neuronas, poblando el grueso de la capa granular (Schlessinger et al. 1975; Bayer 1980; Altman et al. 1990). Esta ola de neurogénesis postnatal genera aproximadamente el 80% del total de las células granulares. Luego de las dos primeras semanas de vida, la proliferación disminuye sensiblemente quedando acotada a la zona subgranular, desde donde se dará origen a las neuronas nacidas en el individuo adulto. En ratones el patrón espacio-temporal es similar al descrito para ratas aunque los tiempos son más reducidos, observándose ya células granulares postmitóticas desde E10 (Angevine 1965).

Se definen entonces tres patrones espacio-temporales en la neurogénesis de la capa granular:

1) Las neuronas nacidas durante el desarrollo embrionario se ubican formando el borde externo de la capa granular, limitando con la capa molecular, mientras las nacidas postnatalmente incrementan gradualmente el grosor de la capa incorporándose en el límite con el hilus, lo cual genera un gradiente de edades de afuera hacia adentro de la misma. 2) Las primeras neuronas conforman la punta de la hoja superior. Sucesivamente se incorporan neuronas extendiendo esta capa hasta el vértice de la GCL y luego formando la hoja inferior hasta su punta. 3) El desarrollo de la capa granular en el polo temporal del hipocampo adelanta a aquel en el polo septal.

Las neuronas que conectan con las células granulares, tanto pre- como postsinápticamente, son generadas mayormente con anterioridad a éstas, siguiendo un patrón temporal menos distintivo (Angevine 1965; Schlessinger et al. 1978). En el ratón, las neuronas de la corteza entorrinal y el hilus y la capa molecular del giro dentado se originan en la división de progenitores ocurrida mayormente entre E10 y E15 mientras que en la capa piramidal del cornu ammonis la proliferación continúa, aunque en menor número, hasta E18. El período de proliferación se estudió también específicamente para interneuronas GABAérgicas y se observó que en hipocampo y giro dentado el mismo culmina hacia E15, con anterioridad al de las neuronas principales (Soriano et al. 1986).

Evolutivamente, el giro dentado propiamente dicho se origina en el linaje de mamíferos, el cual diverge del de los actuales reptiles y aves cerca de trescientos millones de años atrás. En reptiles actuales, se considera a las corteza medial y dorsomedial como homólogas del giro dentado y el cornu ammonis de mamíferos respectivamente. Éstas se presentan como una estructura trilaminar en la cual, a diferencia de lo que ocurre en mamíferos, las capas celulares de ambas estructuras forman un continuo (Lopez-Garcia et al. 2002). Células de la corteza medial envían axones positivos para la tinción de Timm, característica de las fibras mossy, los

cuales conectan con células en lo que podría considerarse el hilus y en la corteza dorsomedial. A diferencia de sus homologas en mamíferos, estas fibras forman también proyecciones de largo alcance. Notablemente, la neurogénesis en la corteza medial de reptiles ocurre mayormente en el período posnatal y persiste durante la vida adulta, en clara similaridad con la propia del giro dentado en mamíferos. En aves se considera homólogo del hipocampo al telencéfalo dorsomedial, el cual se dispone también en forma trilaminar. No se observa en esta estructura sin embargo un homólogo claro del giro dentado. En particular la tinción de Timm no distingue claramente la existencia de un sistema de fibras mossy (Montagnese et al. 1993). Se observa sin embargo neurogénesis adulta en esta estructura (Patel et al. 1997). Tanto reptiles como aves evidencian comportamentalmente ser capaces de formar y recordar mapas espaciales, la cual depende de la actividad de sus ‘hipocampos’. Resulta interesante que estas capacidades existan en ausencia de un giro dentado propiamente dicho, lo cual ha contribuido a proponer que esta estructura no es indispensable para la función del hipocampo sino que su evolución habría aportado a la misma ventajas esencialmente cuantitativas (Treves et al. 2008).

NEUROGÉNESIS ADULTA

BREVE RESEÑA HISTÓRICA

“una vez terminado el desarrollo, las fuentes de crecimiento y regeneración de los axones y dendritas se secan irrevocablemente. En los cerebros adultos las vías nerviosas son algo fijo, terminado, inmutable. Todo puede morir, nada puede regenerarse. Corresponde a la ciencia del futuro cambiar, si es posible, este cruel decreto” (Ramón y Cajal 1913)

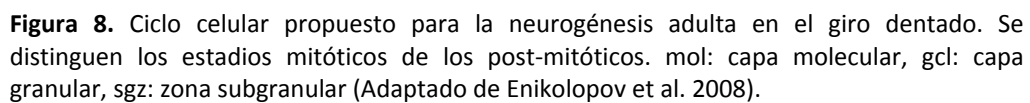
Por cerca de cien años éste constituyó el dogma imperante respecto a las capacidades de regeneración del cerebro adulto. Hoy es globalmente aceptado que este postulado es contradicho a dos niveles: 1) las neuritas y contactos sinápticos entre neuronas están en

constante rearreglo y 2) nuevas neuronas se generan a partir de la división de progenitores en el cerebro adulto. Las evidencias a favor de este segundo punto comenzaron a surgir ya desde finales del siglo XIX, aunque las técnicas utilizadas permitían dudar sobre la identidad neuronal de los cuerpos mitóticos encontrados (para una excelente revisión histórica y epistemológica ver Gross 2000). En la década del '60, el desarrollo de la técnica de marcado autorradioactivo por timidina tritiada permitió a Joseph Altman realizar una serie de estudios sobre la existencia de neurogénesis postnatal (curiosamente algunos de éstos reportan neuronas nuevas en neocorteza, donde más tarde sólo se confirmó este fenómeno en respuesta a trauma). En 1963 reporta la aparente producción de células granulares en el hipocampo adulto de ratas (Altman 1963), observación que confirma en trabajos posteriores (Altman et al. 1965). Los trabajos de Michael Kaplan comprobaron más adelante, mediante microscopía electrónica, que células granulares nacen aún en ratas de casi un año de vida, y que las mismas reciben contactos sinápticos (Kaplan et al. 1977; Kaplan et al. 1984). En simultáneo, Fernando Nottebohm y colaboradores mostraban por técnicas similares la generación de neuronas nuevas en núcleos vinculados al canto en cerebros de canarios (Burd et al. 1985). En un experimento histórico realizado en canarios vivos, Paton y Nottebohm demuestran que estas neuronas son funcionales y reciben señales sinápticas en respuesta a estímulos sonoros (Paton et al. 1984), aún hoy una de las demostraciones más elegantes de la incorporación de neuronas nacidas en el cerebro adulto a circuitos funcionales. El impacto de estos trabajos en la comunidad científica en general se habría visto sin embargo opacado por la presentación contemporánea de estudios por Pasko Rakic, en los que negaba la existencia de neurogénesis adulta en el cerebro de monos del viejo mundo (Rakic 1985). Con posterioridad, se reportó el aislamiento de cerebros adultos de células progenitoras capaces de generar neuronas en cultivo (Reynolds et al. 1992; Lois et al. 1993). El desarrollo del marcado por bromo-deoxiuridina y su revelado por inmunohistoquímica permitió al grupo de Fred Gage confirmar y cuantificar el fenómeno en ratas, utilizando marcadores específicos para distinguir entre distintos tipos celulares y

grados de maduración (Kuhn et al. 1996). El mismo Rakic refutó de igual manera sus observaciones tempranas en monos (Kornack et al. 1999) y la neurogénesis adulta se confirmó finalmente en humanos (Eriksson et al. 1998). La funcionalidad de las neuronas nuevas del hipocampo se demostró en 2002, como detallaremos más adelante (van Praag et al. 2002). Actualmente hay amplio consenso sobre la generación continua de neuronas en el giro dentado del hipocampo y el bulbo olfatorio de cerebros adultos (Gage et al. 2008) mientras que en otras áreas este fenómeno se observaría mayormente en respuesta a daño neuronal (Lindvall et al. 2008).

NEUROGÉNESIS ADULTA EN EL GIRO DENTADO

La neurogénesis adulta en el giro dentado se origina a partir de eventos de división celular en la zona subgranular, ubicada entre la capa granular propiamente dicha y el hilus (**Figura 8**). Se denomina células madre neurales a aquellas que pueden autorrenovarse y diferenciarse a todos los tipos neurales, incluyendo neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (Gage 2000). El verdadero carácter pluripotencial de las células mitóticas de la zona subgranular es aún debatido, por lo que suele referirse a ellas como “progenitores neurales”, células con alguna capacidad de dividirse y diferenciarse. La Figura 8 muestra un camino propuesto para la generación de nuevas células granulares (Zhao et al. 2008). Los progenitores de tipo 1 presentan un proceso radial que se ramifica en la capa molecular y expresan el marcador astrocítico GFAP, entre otros. Estos producirían por división asimétrica progenitores de tipo 2, identificados como amplificadores transientes, los cuales sufren varias rondas de división celular antes de comenzar su diferenciación a neurona, atravesando distintos estadios de maduración. Nuevos astrocitos y oligodendrocitos se generan también, aunque no es del todo claro si provienen de la misma población de progenitores.



Las tasas de proliferación y sobrevida son susceptibles de regulación independiente por diversos factores (Zhao et al. 2008). En ratones el ejercicio físico voluntario puede duplicar la proliferación celular, lo que resulta en un mayor número de neuronas nuevas (van Praag et al. 1999). Este protocolo resulta a su vez en un aumento en la amplitud de LTP inducido en la vía perforante y una mejora en el aprendizaje espacial (van Praag et al. 1999). La exposición de los animales a un ambiente enriquecido aumenta la sobrevida de las neuronas, duplicándola en neuronas de dos semanas de maduración (Kempermann et al. 1997; Tashiro et al. 2007). Estos ambientes incluyen actividad física y mayor complejidad espacial e interacción social,

resultando en un enriquecimiento cognitivo difícil de precisar. Paradigmas de aprendizaje dependientes de hipocampo (y no aquellos independientes) resultan en una mayor sobrevivencia de neuronas en estadios específicos de maduración (revisado en Leuner et al. 2006). Se observó en uno de estos estudios que el aprendizaje espacial en el laberinto acuático de Morris resulta en la muerte selectiva de neuronas muy inmaduras, mayor sobrevivencia de neuronas relativamente más maduras y un posterior aumento en la proliferación, siendo estos fenómenos interdependientes (Dupret et al. 2007). En conjunto las evidencias disponibles sugieren una compleja modulación de la neurogénesis por el aprendizaje. Distintas técnicas se han ensayado para disminuir o abolir la neurogénesis adulta, incluyendo irradiación, drogas antimitóticas y estrategias genéticas, de manera de evaluar su relación causal con el aprendizaje. Los resultados resultan al día de hoy conflictivos, posiblemente debido a diferencias entre especies y cepas, diferencias en los protocolos comportamentales o falta de especificidad de las técnicas de ablación (Zhao et al. 2008).

INTEGRACIÓN FUNCIONAL DE LAS NEURONAS NUEVAS

El uso de análogos de nucleótido obliga al uso de tejido post-mortem fijado para el revelado por inmunohistoquímica. A su vez, no es posible estudiar la morfología de las células marcadas dada la localización nuclear de estos compuestos. En 2002 se reporta el desarrollo de la técnica de marcado retroviral por el grupo de Fred Gage (van Praag et al. 2002). Los retrovirus del tipo oncoretrovirus requieren de la mitosis de la célula hospedadora para infectarla efectivamente integrando su genoma al de la misma (Lewis et al. 1994). Se desarrolló una variante del virus de la leucemia murina Moloney (MMLV), capaz de expresar la proteína fluorescente verde (GFP) el cual, al ser inyectado localmente en el giro dentado infecta sólo los progenitores en división. De esta manera, al observar con posterioridad rodajas de cerebro sólo se detecta fluorescencia en las neuronas y células de la glía generadas por éstos (**Figura 9**).

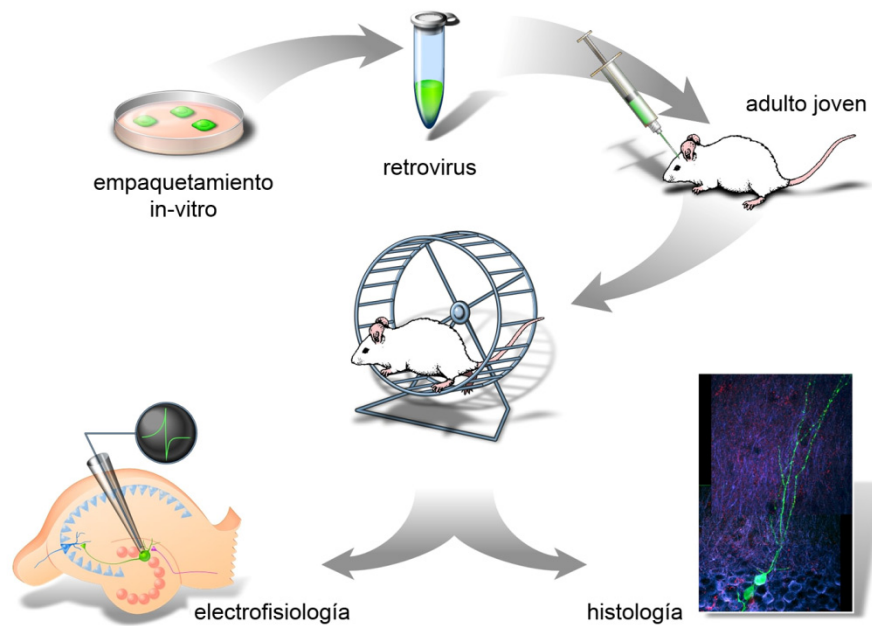


Figura 9. Estrategia de marcado retroviral de neuronas nuevas. Las partículas de retrovirus GFP se producen en células en cultivo y se inyectan estereotácticamente en el giro dentado de ratones adultos. Luego de un tiempo variable, el cual dependerá de la pregunta que se desea contestar, se obtienen rodajas vivas para electrofisiología o fijadas para histología (Adaptado de Fred Gage, The Salk Institute).

Se observó por microscopía confocal que las neuronas nacidas en el hipocampo adulto desarrollan morfología típica de células granulares. Sus dendritas presentan espinas y su complejidad aumenta entre el primer y cuarto mes de maduración. Esta técnica permite a su vez realizar registros electrofisiológicos intracelulares específicamente sobre las neuronas nuevas, identificadas bajo microscopio de fluorescencia en rodajas vivas de cerebro. Los estudios funcionales mostraron que sus propiedades de membrana son también características de las células granulares y disparan potenciales de acción en respuesta a corriente despolarizante. A su vez se detectaron corrientes sinápticas tanto de manera espontánea como por estimulación de la capa molecular demostrando la existencia de conexiones aferentes funcionales (van Praag et al. 2002). Este trabajo constituye el antecedente directo de la presente tesis.

OBJETIVOS

La capa granular del giro dentado es una estructura por demás particular. Su número de células en un cerebro adulto duplica aproximadamente a la suma de sus neuronas aferentes y eferentes en la corteza entorrinal y el hipocampo. Su desarrollo sigue un patrón temporal extraordinario, que se produce mayormente cuando las neuronas con las que conecta finalizaron el suyo y persiste durante toda la vida del animal. ¿Cuál es el rol fisiológico de la neurogénesis adulta? No es fácil pensar en contestar esta pregunta mientras se dude sobre el rol exacto del giro dentado en la función del hipocampo. Ciertas preguntas concretas pueden plantearse sin embargo desde un punto de vista circuital. ¿Qué tipo de aporte realizan las neuronas generadas durante la adultez al circuito en que se insertan? ¿Son éstas células unidades completamente funcionales del mismo?

El objetivo general de la presente tesis es comprender el grado de integración funcional de las neuronas nacidas en el adulto al circuito del hipocampo, de manera de aportar a la comprensión de su rol fisiológico. Al comienzo del presente trabajo de tesis se sabía que las neuronas nuevas reciben aferencias funcionales. Se desconocía sin embargo la extensión de su conectividad: ¿Reciben estas neuronas contactos desde las vías perforantes medial y lateral? ¿Son capaces estos inputs de reclutarlas ocasionando el disparo de potencial de acción? ¿Qué propiedades plásticas presentan estas conexiones? ¿Reciben también contactos de las distintas clases de interneuronas locales existentes? Más aún, su función en el circuito dependerá no solo de las propiedades cualitativas de sus aferencias sino también cuantitativas y será también relevante el detalle de sus propiedades intrínsecas, por mediar éstas la transformación input-output. Un objetivo puntual es entonces el de realizar una caracterización exhaustiva de sus propiedades de membrana y aferencias sinápticas, comparando cuantitativamente sus propiedades con las propias de células granulares nacidas durante el desarrollo perinatal.

Los resultados de este análisis permitirían distinguir entre dos escenarios posibles:

- Las células granulares generadas en la adultez maduran hacia una fisiología y conectividad indistinguible a la propia de aquellas nacidas durante el desarrollo. En este caso todas las neuronas, independientemente de su origen embrionario, postnatal temprano o adulto, contribuirían unidades a la misma población funcional. La neurogénesis adulta contribuiría un mecanismo de plasticidad lenta al circuito dado por el recambio o agregado de unidades equivalentes.
- Las neuronas nuevas presentan propiedades distintas a las preexistentes. Este resultado pondría en evidencia que la capa granular no es una estructura homogénea sino que sus componentes se dividen en subpoblaciones funcionales distintas de acuerdo a su origen temporal. La neurogénesis adulta aportaría al circuito de unidades con propiedades de procesamiento diferente expandiendo sus capacidades computacionales.

Si bien se conocía la existencia de aferencias funcionales, la capacidad de estas neuronas de formar conexiones eferentes era ignorada por completo. Las células granulares contactan normalmente una variedad de blancos en el giro dentado y la región CA3. ¿Son capaces aquellas generadas en la adulto de establecer contactos funcionales con neuronas postsinápticas a pesar de desarrollarse en un circuito establecido y maduro? Esta condición es un requisito ineludible para que una neurona impacte efectivamente sobre la actividad de la red. En caso de formar conexiones ¿Qué neurotransmisor liberan? ¿Son éstas excitatorias o inhibitorias? Un segundo objetivo particular del presente trabajo de tesis es entonces comprobar si estas células son capaces de influir en el circuito hipocampal estableciendo conexiones eferentes funcionales y estudiar si las mismas provocan la excitación o inhibición de sus neuronas blanco.

MATERIALES Y MÉTODOS

El diseño experimental seguido a lo largo de la presente tesis resulta de adaptar el protocolo de marcado retroviral descrito en la Figura 9. En la primer parte se utilizaron retrovirus expresando proteínas fluorescentes de manera de identificar en rodajas vivas de hipocampo a neuronas nacidas en distintos estadios del desarrollo. En la segunda, la transducción retroviral se aprovechó para modificar las propiedades de las neuronas nacidas en el adulto de manera de controlar su actividad por estímulos lumínicos.

CONSTRUCCIÓN DE GENOMAS RETROVIRALES

Se utilizaron en la primer parte de la presente tesis dos retrovirus desarrollados en el Laboratorio de Genética del Salk Institute, University of California, San Diego, dirigido por el Dr. Fred H. Gage. Se trata de vectores retrovirales no replicativos basados en el *Moloney murine leukemia virus*, modificados para expresar las proteínas fluorescentes EGFP o mRFP1 (Campbell 2002), bajo el control de un promotor CAG (Zhao et al. 2006). Todas las construcciones del genoma retroviral se encuentran flanqueadas por señales LTR ("long terminal repeat"). La secuencia comprendida entre estas señales contiene un promotor eucariota y uno o dos genes de interés. Esta secuencia se empaqueta en las partículas virales y se inserta luego al genoma de la célula hospedadora. Se construyeron en el presente trabajo de tesis once variantes nuevas, incluyendo nueve de ellas el gen de channelrhodopsin-2 (ChR2). En este proceso se utilizaron los vectores pSK-PS y vCAG-GFP-SP, generados también por C. Zhao. El primero constituye una variante del pBluescript SK (Stratagene) cuyo sitio de clonado múltiple se encuentra flanqueado por sitios de restricción Sfi I y Pme I. El segundo es una variante del vCAG-GFP, en el que el ORF de GFP es flanqueado por estos mismos dos sitios. Esta combinación, como se observará a continuación, permite el fácil clonado de insertos de

interés en pSK-SP, los cuales pueden subclonarse al genoma retroviral vCAG-GFP-SP en sus sitios Sfi I y Pme I.

El tamaño del genoma retroviral debe mantenerse pequeño para permitir su correcto empaquetamiento. Siendo el promotor CAG particularmente extenso (1,7 kb) se construyeron dos variantes genómicas nuevas en las que se reemplazo al mismo por un promotor PGK (phosphoglycerate kinase) o uno CMV (cytomegalovirus), ambos de 0,5 kb. Esto permitiría en principio albergar insertos de interés de mayor longitud.

Las **figuras 10 y 11** explican la obtención de estas dos construcciones. En estas y subsiguientes figuras, las tijeras simbolizan la construcción del plásmido a su derecha a partir de la digestión de los dos plásmidos a su izquierda con las enzimas de restricción detalladas debajo. De los plásmidos de la izquierda el superior aporta el inserto y el inferior el vector. Los fragmentos de interés se purificaron por gel de agarosa y se fusionaron por reacción de ligación. En algunos casos el inserto proviene de un producto de reacción de PCR, cuyos primers y condiciones se detallan en la **Tabla 1**. Los dibujos de los plásmidos no están realizados a escala y sólo se indican los sitios de restricción relevantes al clonado en cuestión. Cada nueva construcción se verificó por ensayos de restricción y secuenciación.

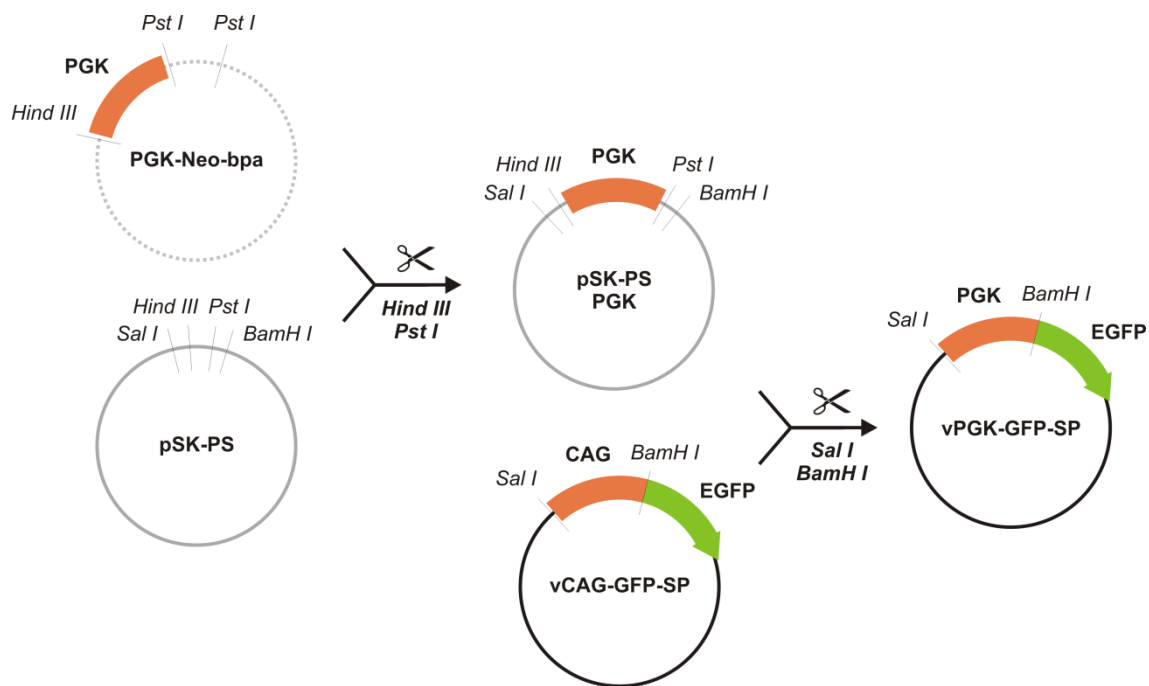


Figura 10. Construcción del genoma retroviral vPGK-GFP-SP. El promotor PGK se obtuvo del vector PGK-Neo-bpa y se subclonó entre los sitios Hind III y Pst I del pSK-PS. El fragmento Sal I – BamH I se subclonó al genoma viral reemplazando al promotor CAG.

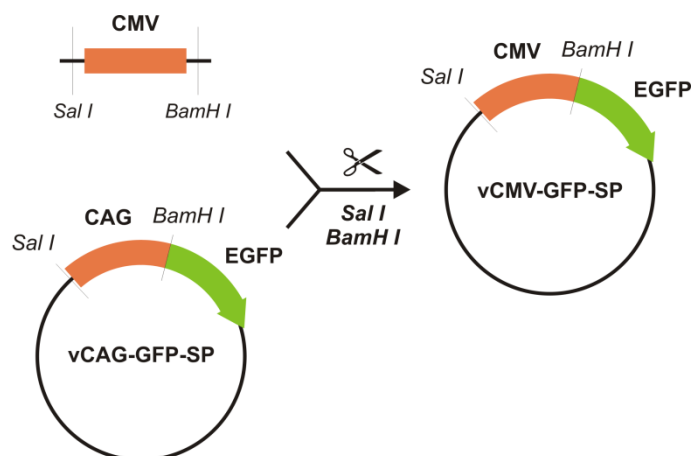


Figura 11. Construcción del genoma retroviral vCMV-GFP-SP. El promotor CMV se amplificó por reacción de PCR a partir del plásmido pcDNA 3.1 (Invitrogen), agregando en los primers sitios de restricción para Sal I y BamH I. Esto permitió el clonado directo en el genoma viral en reemplazo del promotor CAG.

Se dispone entonces de tres variantes del genoma viral, las cuales contienen al gen de EGFP flanqueado por los sitios Sfi I y Pme I y difieren sólo en el promotor que comanda la expresión

de este transgen. A continuación se describe como se reemplazó a EGFP por tres insertos distintos: Chr2-GFP, Chr2-IRES-RFP y Chr2(1-315). Cada inserto se subclonó bajo los tres promotores mencionados, generando una combinatoria de nueve genomas virales distintos.

En primer lugar se construyeron los virus Chr2-GFP (**Figura 12**). Este transgen se subclonó desde el vector cedido por el Dr. Stefan Herlitze, en el que la secuencia que codifica para los primeros 315 aminoácidos de Chr2 se encuentra fusionada en su extremo 3' al gen de EGFP.

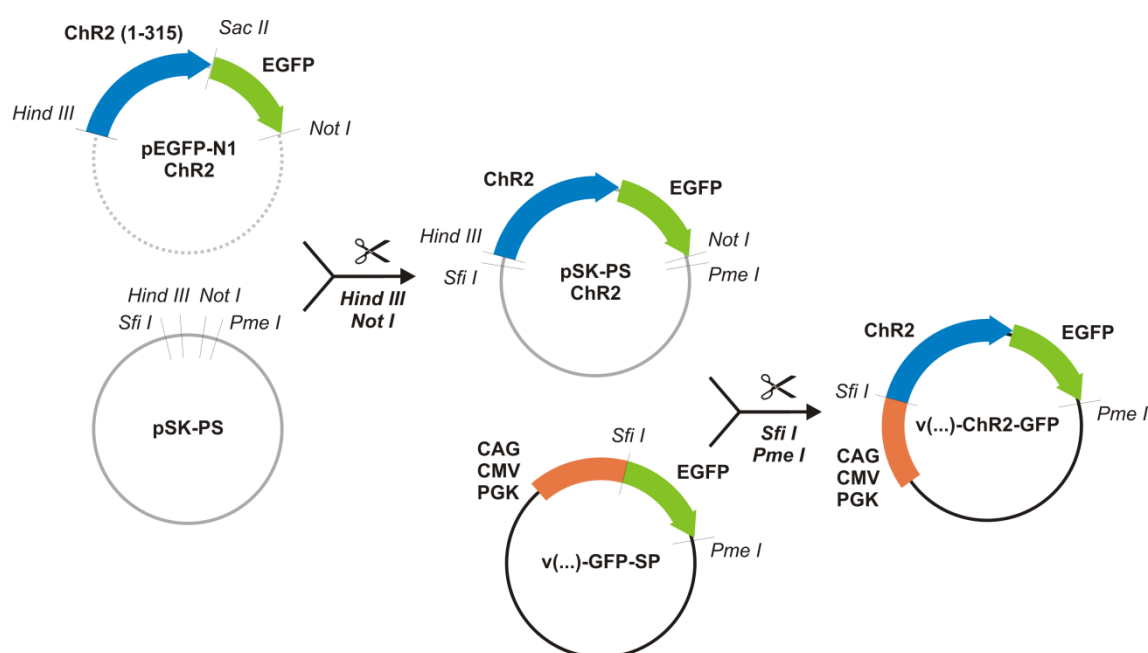


Figura 12. Construcción de los genomas virales vCAG-ChR2-GFP, vCMV-ChR2-GFP y vPGK-ChR2-GFP. El inserto que codifica para la proteína de fusión Chr2-GFP se subclonó a partir de un vector pEGFP-N1 (Clontech) en los sitios Hind III y Not I de pSK-PS. El fragmento Sfi I – Pme I de este nuevo plásmido se utilizó para reemplazar a EGFP en los vectores vCAG-GFP-SP, vCMV-GFP-SP y vPGK-GFP-SP.

Los espectros de excitación de Chr2 y GFP se solapan, siendo la misma máxima en luz azul (Nagel et al. 2003). En consecuencia al observar las rodajas en busca de células infectadas se las excita al mismo tiempo. Se construyó entonces una variante en la que el canal y una proteína fluorescente roja (mRFP1, Campbell et al. 2002) se expresan a partir de un mensajero bicistrónico, estando la traducción de la segunda comandada por un sitio de entrada ribosomal

interno (IRES, **Figura 13**). ChR2 no se expresa en esta construcción como proteína de fusión, lo cual podría adicionalmente favorecer su función.

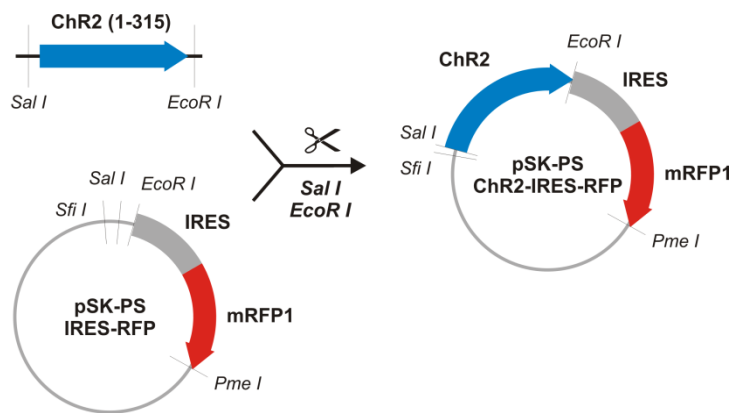


Figura 13. Construcción de los genomas virales vCAG-ChR2-IRES-RFP, vCMV-ChR2-IRES-RFP y vPGK-ChR2-IRES-RFP. La secuencia correspondiente a los primeros 315 aminoácidos de ChR2 se amplificó por PCR a partir del plásmido vCAG-ChR2-GFP. Se agregó a los primers sitios Sal I y EcoR I y un codón de terminación de la traducción. El producto digerido se insertó entre los sitios Sal I y EcoR I de un vector pSK-PS-IRES-RFP desarrollado por la Dra. Gabriela Lombardi. Los genomas virales se construyeron luego subclonando el inserto Sfi I – Pme I de igual forma que se ilustró para el inserto ChR2-GFP en la Figura 12 (no se muestra en este esquema).

Por último se construyó una familia de genomas virales en los que se removió la proteína fluorescente, de manera de achicar la longitud del transgen (**Figura 14**). De esta manera se buscaba reducir al mínimo indispensable el tamaño del genoma de manera de favorecer el empaquetamiento viral y mejorar así su título infectivo.

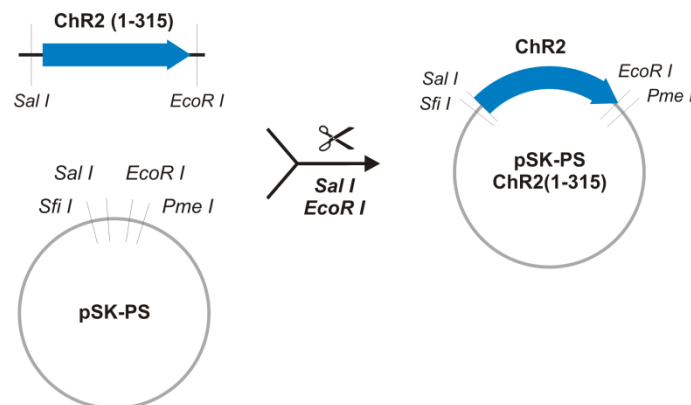


Figura 14. Construcción de los genomas virales vCAG-ChR2, vCMV-ChR2 y vPGK-ChR2. El mismo producto de PCR utilizado en la construcción de los virus ChR2-IRES-RFP se insertó entre los sitios Sal I y EcoR I del vector pSK-PS. El fragmento Sfi I – Pme I de este nuevo vector se subclonó en los genomas virales de igual forma que se ilustró para el inserto ChR2-GFP en la Figura 12 (no se muestra en este esquema).

PCR Promotor CMV		
Primer CMV-SalI (sentido)	5' CAGATGTCGAC <u>GTTGACATTGATTATTGACT</u> 3'	SalI
Primer CMV-BamHI (antisentido)	5' AGTTAGGATCC <u>GAGCTCTGCTTATATAGACCT</u> 3'	BamHI
PCR ChR2(1-315)		
Primer Chop2-SalI (sentido)	5' GATAAGTCGAC <u>ATGGATTATGGAGGCGCCCTGA</u> 3'	SalI
Primer Chop2-EcoRI (antisentido)	5' TCCCGGAATTC <u>TCACTTGCCGGTGCCCTTGTT</u> 3'	EcoRI STOP

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR. Se indica en negritas la región que aparece con la secuencia de interés en el molde y en subrayado la secuencia de sitios de restricción.

ENSAMBLADO DE PARTÍCULAS RETROVIRALES

Para el ensamblado de las partículas retrovirales se utilizaron tres plásmidos conteniendo la proteína de la cápside uno (CMV-vsug), las enzimas virales otro (CMV-gag/pol) y el genoma viral un tercero (vCAG-GFP o vCAG-RFP). Los plásmidos se obtuvieron a partir de cultivos transformados de *E.coli DH5α* mediante una modificación del método de la lisis alcalina con tratamiento contra endotoxinas (*Maxiprep endotoxin-free*, QIAGEN).

Los plásmidos se transfectaron en células HEK293T con lipofectamine 2000 (7,5, 15 y 22,5 µg de CMV-vsug, CMV-gag/pol y genoma viral respectivamente con 600 µl de lipofectamine por cada 12 placas P100 de células). 48 horas más tarde se cosechó y filtró el sobrenadante y se

concentró el virus por dos rondas de ultracentrifugación tras lo cual se resuspendió en DPBS estéril (90-120 µl por cada 12 placas de sobrenadante) y conservó a -80°C hasta su utilización. Las partículas virales pueden ser conservadas durante años en estas condiciones sin comprometer su capacidad infectiva.

CIRUGÍA Y ANIMALES

Se realizaron inyecciones retrovirales en tres estadios de desarrollo de ratones C57Bl/6J: embrionario (E14-15), postnatal temprano (P6-7) y adulto (P35-P49).

Para las inyecciones de embriones, ratones hembras C57Bl/6J preñadas a tiempo controlado se anestesiaron con 80 µg de ketamina y 8 µg de xilazina en 8 µl de PBS por gramo de peso corporal. El útero se expuso a través de una laparotomía ventral. Se insertó a través de la pared del útero un capilar graduado estirado (Drummond Scientific, Broomall, Pennsylvania, EEUU) en el ventrículo izquierdo o derecho de cada embrión y se inyectó por presión 1 µl de retrovirus. Se añadió el colorante Fast green (Sigma, St. Louis, Missouri, EEUU) a la suspensión viral de manera de evaluar la correcta localización del inóculo. La cavidad peritoneal se irrigó con NaCl 0,9% estéril durante la cirugía de manera de evitar la deshidratación de los tejidos. Tras las inyecciones, el peritoneo y la piel fueron sucesivamente suturados. No se intervino en el posterior parto de las crías. La tasa de supervivencia de las crías fue cercana al 30%. No se observó marcado de otros tipos neuronales aún cuando la proliferación de los progenitores de las células piramidales no ha concluido aún en E15 (Angevine 1965). Posiblemente éstos no sean alcanzados por la inyección de retrovirus en el ventrículo.

Para las inyecciones de ratones P6-7, los mismos fueron anestesiados ubicándolos en hielo durante 4 minutos, tras lo cual se ubicaron sobre una base de plastilina bajo un instrumento estereotáctico. Se inyectó mediante un capilar graduado estirado por calor 0,7 µl de

suspensión retroviral en la región dorsal del giro dentado derecho (coordenadas estereotáxicas desde el bregma: antero-posterior = 1,5 mm, lateral = 1,5 mm, ventral = 1,5 mm). Durante la operación los animales se mantuvieron en contacto con hielo para mantener el estado de anestesia. Los ratones se recuperaron luego entre 30 y 60 minutos sobre una manta térmica tras lo cual fueron devueltos a su madre. Tras el destete en P21 los ratones fueron segregados por sexo. Esta operación, así como la realizada a animales adultos, registró tasas de mortalidad cercanas a cero.

Las inyecciones de ratones adultos se realizaron en la sexta semana de vida para los resultados de la primera parte y en la quinta o la sexta para la segunda. Para la segunda mitad se utilizaron sólo ratones hembra. Tres días antes de la cirugía se proveyó a los animales de ruedas para correr (una rueda cada tres individuos) de manera de aumentar la tasa de proliferación y la cantidad de neuronas infectadas (van Praag et al. 1999). Los ratones se anestesiaron intramuscularmente con 100 µg de ketamina y 10 µg de xilazina en 10 µl de PBS por gramo de peso corporal y se inyectó en general 1 µl de virus en 7 minutos en la región dorsal del giro dentado derecho (coordenadas: 2 mm posterior y 1,5 mm a la derecha del bregma y 1,9 mm ventral) utilizando un capilar estirado por calor.

Los experimentos reportados en la primer parte de la sección *Resultados* se realizaron en 56 rodajas de 30 ratones inyectados en P7 y P42 (12 machos y 18 hembras) y en 29 rodajas de 14 ratones inyectados en E15 y P42 (8 machos y 6 hembras). La caracterización de aferencias GABAérgicas y propiedades de membrana se realizó $6,7 \pm 0,4$ semanas (media \pm desvío estándar; rango: 6,0 – 7,6) después de la segunda inyección. El estudio de las conexiones glutamatérgicas a $13,6 \pm 0,5$ semanas de la misma (rango: 12,9 – 14,6).

Los resultados de la segunda parte se obtuvieron de 43 rodajas de 34 ratones hembra, a $14,9 \pm 2,9$ semanas (rango: 8,6 – 20,6) de la inyección retroviral. Se detectaron corrientes evocadas

por luz en 14 neuronas provenientes de 11 rodajas de 9 ratones, a $16,0 \pm 1,9$ semanas (rango: 13,4 – 20,4) de la inyección.

PREPARACIÓN DE REBANADAS AGUDAS DE CEREBRO

Los ratones fueron anestesiados como se detalló para la cirugía adulta y decapitados. El cerebro se removió en solución de disección fría (de composición detallada en la siguiente sección) y se ubicó sobre un papel de filtro en donde se recortó según se buscara realizar cortes horizontales o coronales modificados (**Figura 15**).

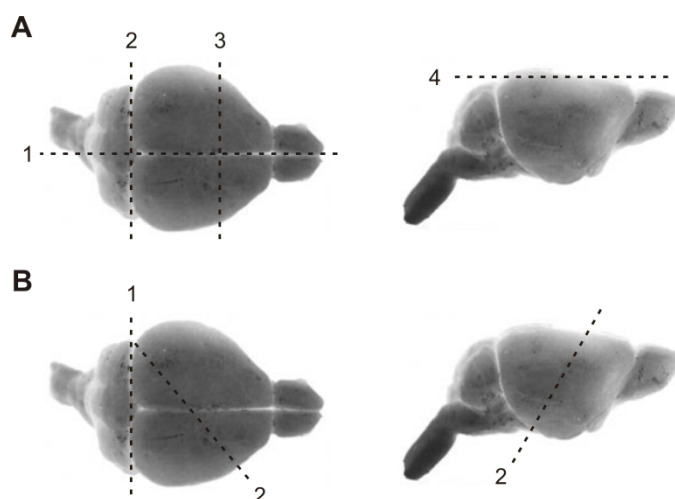


Figura 15. Cortes realizados al cerebro con bisturí previo a pegarlo en la platina del vibrátomo. Los cortes se señalan sobre una vista superior (izquierda) y/o lateral (derecha). **A.** Preparación para cortes horizontales. Se desecha el hemisferio izquierdo (1) y se remueve el cerebelo (2) y la región anterior (3) del derecho. Finalmente se nivela la región dorsal (4) y se pega esta cara hacia abajo en la platina. **B.** Preparación para cortes coronales modificados. Se remueve el cerebelo (1) y la región anterior se corta con un ángulo transversal al hipocampo derecho, mostrado en las dos vistas (2). Esta cara expuesta se pega en la platina.

Se pegó luego a la platina de un vibrátomo (Vibratome 1000, The Vibratome Company o Leica VT1200 S, Leica-Microsystems) con pegamento Suprabond Gel, tras lo cual se sumergió en solución de disección fría carbogenada (95% O₂, 5% CO₂) y se cortó con cuchillas FA-10 (Feather) o SuperSilver (Gillette). Se cortaron mayormente rodajas de 400 μ m a velocidad de

corte de 0,06 mm/s. Las rodajas se trasladaron inmediatamente con pipeta pasteur cortada a una cámara ubicada a 30°C con solución ACSF carbogenada (de composición detallada en la siguiente sección) donde se depositaron sobre una gasa sumergida y permanecieron hasta la realización de experimentos.

ELECTROFISIOLOGÍA

COMPOSICIÓN DE LAS SOLUCIONES UTILIZADAS

Se detalla a continuación la concentración (en mM) de los compuestos en cada solución.

Solución de disección: 2.5 KCl, 2 NaH₂PO₄, 25 NaHCO₃, 0.5 CaCl₂, 7 MgCl₂, 20 glucosa, 1.3 ascorbato de sodio, 3.1 piruvato de sodio, 110 cloruro de colina.

ACSF (Artificial Cerebro-Spinal Fluid): 125 NaCl, 2.5 KCl, 2.3 NaH₂PO₄, 25 NaHCO₃, 2 CaCl₂, 1.3 MgCl₂, 10 glucosa, 1.3 ascorbato de sodio, 3.1 piruvato de sodio. Osmolaridad: 315 mOsm.

Se utilizaron cuatro composiciones distintas de soluciones internas, según los requerimientos de cada experimento. Para el registro de corrientes sinápticas GABAérgicas evocadas (IPSCs), propiedades de membrana y la totalidad de los experimentos de la segunda parte de la tesis se utilizó la solución “Gluconato de Potasio”. Para el registro de corrientes sinápticas glutamatérgicas (EPSCs) se utilizó la solución “Gluconato de Cesio”, con alto cesio y bloqueantes de canales de sodio y potasio de manera de facilitar el registro de corrientes NMDA a potenciales positivos. Para el registro de corrientes GABAérgicas espontáneas a potencial de membrana fijado (V_{hold}) en -80 mV se utilizó la solución “Cloruro de Potasio”, de igual concentración de cloro que la solución externa y para aquellas adquiridas a $V_{\text{hold}} = 0$ mV, la solución “Cloruro de Cesio” en la que se reemplaza al potasio por cesio de manera de facilitar el registro a potencial despolarizado.

Gluconato de Potasio: 120 gluconato de K, 20 KCl, 5 NaCl, 4 MgCl₂, 0.1 EGTA, 10 Hepes, 4 Tris-ATP, 0.3 Tris-GTP, 10 fosfocreatina (pH 7.3, 290 mOsm). El potencial de juntura al usar esta solución interna resulta de 11 mV (calculado según Barry et al. 1991).

Gluconato de Cesio: 130 gluconato de Cs, 10 cloruro de tetraetilamonio (TEA-Cl), 2 NaCl, 2 MgCl₂, 0.2 EGTA, 2 QX-222, 10 Hepes, 4 Tris-ATP, 0.3 Tris-GTP, 10 fosfocreatina (pH 7.3, 290 mOsm).

Cloruro de Potasio: 19 gluconato de K, 121 KCl, 5 NaCl, 4 MgCl₂, 0.1 EGTA, 10 Hepes, 4 Tris-ATP, 0.3 Tris-GTP, 10 fosfocreatina (pH 7.3, 290 mOsm).

Cloruro de Cesio: 140 CsCl, 5 NaCl, 2 MgCl₂, 0.1 EGTA, 10 Hepes, 4 Tris-ATP, 0.3 Tris-GTP, 10 fosfocreatina (pH 7.3, 290 mOsm).

ADQUISICIÓN Y ANÁLISIS DE DATOS ELECTROFISIOLÓGICOS

Para la realización de experimentos las rodajas se ubicaron en cámara de registro con flujo de ACSF carbogenada a temperatura ambiente de 1-2 ml/min bajo microscopio Leica DMLFS y objetivo de inmersión en agua (63X, apertura numérica 0,9). Para los experimentos de whole-cell patch clamp (Cahalan et al. 1992) se utilizaron pipetas de patch de vidrio (Garner KG-33, diámetros interno y externo 1 y 1,5 mm) de 3 a 5 MΩ de resistencia estiradas con puller Narishige PP-830. Los registros en células granulares con pipetas más cercanas a 3 MΩ y los realizados sobre otros tipos neuronales con valores más cercanos a 5 MΩ.

Los registros se realizaron con amplificador Axopatch 200B (Molecular Devices) en sus configuraciones voltage clamp y current clamp. La salida se capturó con DigiData 1322A (Molecular Devices) y software jClamp (SciSoft) o pClamp 9 (Molecular Devices). Los registros en voltage clamp se realizaron, cuando no se indica lo contrario, a un potencial de membrana

fijado en -80 mV en células granulares y -60 o -70 mV en interneuronas, células mossy y células piramidales. La conversión analógica/digital de los registros se realizó por regla general con filtro analógico pasabajos con frecuencia de corte 2 kHz y frecuencia de muestreo de 20 kHz. Las señales utilizadas para el cálculo de resistencias de entrada, acceso y capacitancia se adquirieron utilizando frecuencias de corte y de muestreo de 10 y 50 kHz, respectivamente.

El análisis de los registros electrofisiológicos se realizó mayormente en MATLAB (The Mathworks). Para esto se programaron distintas rutinas que permitieron automatizar el proceso y tener total control sobre criterios y parámetros. Los trazos fueron importados a MATLAB directamente desde jClamp o mediante la rutina import_abf de Michele Giugliano (Universität Bern, Suiza).

Las resistencias de entrada y acceso y la capacitancia se calcularon en MATLAB a partir de la corriente en respuesta a pulsos hiperpolarizantes de 10 mV administrados en voltage clamp. Las resistencias de entrada y acceso se obtuvieron dividiendo 10 mV por el valor de corriente en estado estacionario y el valor pico respectivamente. La capacitancia se calculó realizando el cociente entre el área de la corriente capacitiva y la amplitud del estímulo (10 mV).

El estudio de potenciales de acción se realizó en configuración current clamp, aplicando corriente continua para mantener la línea de base del potencial a -80 mV (en células granulares) o -60 mV (en otros tipos neuronales) y pulsos de corriente despolarizante de intensidades crecientes y 400 ms de duración. El potencial de umbral de disparo se estimó en los experimentos de la primera parte como el punto de inflexión en el comienzo de la primera espiga observada en respuesta a pulsos de corriente despolarizante crecientes. En la segunda parte se consideró el valor para el cual la primer derivada temporal del voltaje difiere de la línea de base precedente por más de dos desvíos estándar (Atherton et al. 2005). Esto reporta el momento en que el voltaje empieza a crecer al comienzo de la espiga. Se consideró como corriente umbral para el disparo al mínimo escalón de corriente necesario para evocar

consistentemente al menos un potencial de acción durante el mismo. Usualmente se estimó a partir de escalones aplicados en pasos de a 5 pA.

Las propiedades de las corrientes sinápticas evocadas se calcularon en MATLAB para el trazo promedio. Se calculó su amplitud y tiempo de crecimiento y decaimiento. El tiempo de crecimiento corresponde al tiempo transcurrido entre que la corriente alcanza el 20 y el 80% de su amplitud máxima. El de decaimiento al que transcurre desde el pico hasta alcanzar el 40% del mismo. La cinética de IPSCs evocados por estimulación de las capas granular y molecular se analizó en trazos registrados a $V_{\text{hold}} = -80$ y -40 mV respectivamente. Para IPSCs evocados en la capa granular se construyeron curvas I-V en cinco puntos temporales: (1) la fase de crecimiento de la corriente, (2) su pico, y (3) 85 ms, (4) 145 ms y (5) 185 ms después del artefacto de estimulación. Para IPSCs evocados en la capa molecular, la conductancia y el potencial de reversión se calcularon a partir de curvas I-V construidas al tiempo del pico de la corriente saliente. En algunos experimentos el punto de $V_{\text{hold}} = -80$ mV se desvió de la linealidad y no fue considerado para la curva.

La actividad espontánea se adquirió a frecuencia de muestreo 10 KHz con Axoscope 9 (Molecular Devices), se filtró digitalmente con frecuencia de corte 1 KHz y se detectó posteriormente con Mini Analysis Program (Synaptosoft). Se utilizaron umbrales de amplitud y área de 10 pA y 50 pA.ms, siendo el desvío estándar del ruido de 2 pA en promedio. Todos los eventos fueron visualmente confirmados de manera de eliminar artefactos en la detección. Los eventos individuales de cada célula se exportaron a MATLAB donde se analizó en primer lugar la cinética de cada uno para la construcción de histogramas (Figura 31 y Figura 35). Se obtuvo luego un trazo promedio para cada célula normalizando previamente 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 (Figura 32 y Figura 36).

Para el cálculo de cocientes AMPA/NMDA (Figura 40), el componente AMPA se midió como la amplitud del EPSC registrado a $V_{\text{hold}} = -80$ mV y el NMDA como la amplitud del EPSC a $V_{\text{hold}} = +50$ mV medida 33 ms después del artefacto de estimulación (~25 ms después del pico AMPA). A este tiempo la corriente AMPA decae a menos de un 5% resultando su contribución a la medición de NMDA despreciable. Se ensayaron mediciones a otros puntos de tiempo sin que esto modificara las conclusiones del análisis. Para el estudio de plasticidad por pulso pareado (Figura 41) la amplitud de la segunda respuesta se midió respecto a la línea de base previa al segundo artefacto de estimulación. Para tiempos entre pulsos menores a 100 ms, la línea de base se calculó extrapolando un ajuste monoexponencial de la fase de caída de la primera respuesta al tiempo del pico de la segunda. Esto se hizo para evitar que el valor de amplitud de la segunda corriente sináptica esté contaminado por el aporte del decaimiento de la primera. No se corrigió la línea de base en las respuestas a 10 pulsos a 50 Hz (Figura 42).

Los estímulos lumínicos se administraron a través de la vía de epifluorescencia del microscopio, seleccionando la luz azul mediante el filtro para FITC. La luz se enfocó con objetivo 63X o 20X y se controló con un obturador electrónico UNIBLITZ VMM-D1 (Vincent Associates) comandado por el software de adquisición. Las rodajas fueron brevemente revisadas para detectar zonas de alta densidad de células granulares ChR2^+ (evidenciado por la expresión de GFP o RFP) tras lo cual se realizaron registros whole-cell patch clamp en potenciales neuronas blanco cercanas ubicadas en el borde GCL/hilus, hilus o capa piramidal, identificadas por microscopía infrarroja y sistema de contraste en gradiente (adaptado de Dodt et al. 2002) con objetivo 63X. Se estimuló el campo de la neurona siendo registrada con pulsos de luz de 10 ms a 0,2 – 4 Hz y se analizó la presencia de corrientes evocadas por luz en registros realizados en voltage clamp. En caso de no observarse se ensayó por regla general pasar a estimular a través del objetivo 20X de manera de agrandar la superficie iluminada y de desplazar el objetivo por la extensión de la capa granular. Sin embargo nunca se pasó a detectar de esta manera señales que no se evocaran por la estimulación local con 63X. Los

registros de neuronas postsinápticas se realizaron en su mayoría en presencia de BaCl_2 200 μM de manera de bloquear los canales de potasio inward-rectifier de las células granulares aumentando su excitabilidad en busca de reclutar más células ChR2^+ por estimulación con luz (ver Figura 51). La latencia de los potenciales de acción evocados por luz en células granulares ChR2^+ se midió desde el comienzo del pulso lumínico al pico de la espiga. La latencia de las corrientes postsinápticas se midió desde el comienzo del pulso lumínico al tiempo en que la corriente promedio alcanza el 10% de su amplitud pico.

Los gráficos de trazos, de barras y de puntos así como los ajustes, derivadas, histogramas acumulativos y estadísticas se realizaron en Prism 4 o 5 (GraphPad). Todas las pruebas estadísticas realizadas fueron a dos colas. En los análisis por ANOVA de una o dos vías se realizaron test post-hoc de Tukey sólo si el ANOVA detectó efectos significativos ($p < 0,05$).

ENSAYOS EN CÉLULAS EN CULTIVO

Para evaluar la funcionalidad de las construcciones ChR2 se transfectaron células HEK 293. Se colocaron cubreobjetos de 12 mm esterilizados por etanol y fuego en placas P35. Se sembraron $1,7 \times 10^5$ células por placa y al día siguiente se transfectó con 2 μg de plásmido del genoma retroviral con lipofectamine 2000. Entre las 24 y 48 hs de la transfección se realizaron registro de patch clamp con ACSF como solución externa y solución interna “gluconato de potasio”. La estimulación por luz se realizó con el mismo sistema utilizado en los experimentos en rodajas agudas de cerebro.

RESULTADOS

PARTE PRIMERA

CONEXIONES AFERENTES SOBRE LAS GCS NACIDAS EN EL ADULTO

DISEÑO EXPERIMENTAL

Para comparar la fisiología de neuronas nacidas en distintos estadios del desarrollo es necesario poder distinguir a las mismas en rebanadas de cerebro vivas. Las células granulares (GCs) se disponen en un gradiente de edades, ubicándose preferencialmente las nacidas en el embrión en la franja externa de la capa granular (GCL), las nacidas en las primeras semanas postnatales en la franja media y las nacidas en la adultez en la franja interna. Existe sin embargo un alto grado de solapamiento en su disposición, lo cual impide deducir con precisión la edad de una GC a partir de su ubicación en la GCL.

El desarrollo de un retrovirus cuyo genoma codifica para la proteína fluorescente verde (GFP) permitió realizar por primera vez registros de patch clamp en neuronas identificadas inequívocamente como nacidas en el hipocampo de ratones adultos (van Praag et al. 2002). Para el presente estudio se procedió a extender esta técnica, utilizando dos retrovirus, codificando uno para GFP y el otro para proteína fluorescente roja (RFP), de manera de marcar diferencialmente a neuronas nacidas en dos estadios distintos del desarrollo. Se generaron dos grupos de animales (**Figura 16**). En uno se inyectó retrovirus CAG-GFP en el ventrículo de embriones en su día 15 de desarrollo (E15) y en el otro el mismo virus se inyectó en el giro dentado de ratones a 7 días de su nacimiento (P7). Ambos grupos recibieron luego una inyección de CAG-RFP en el giro dentado derecho a las 6 semanas de vida (~P42). De esta manera pudieron obtenerse rebanadas agudas de hipocampo en las que neuronas nacidas en

el desarrollo (embrionario o postnatal) podían identificarse por la emisión de fluorescencia verde y neuronas nacidas en la adultez por la emisión de fluorescencia roja (**Figura 17**).

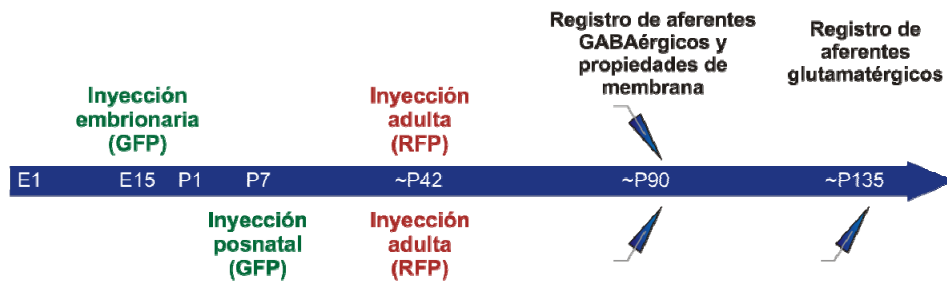


Figura 16. Se indican en la línea temporal las inyecciones retrovirales y los registros electrofisiológicos realizados en los dos grupos de animales. Las aferencias glutamatérgicas se estudiaron sólo en el grupo postnatal.

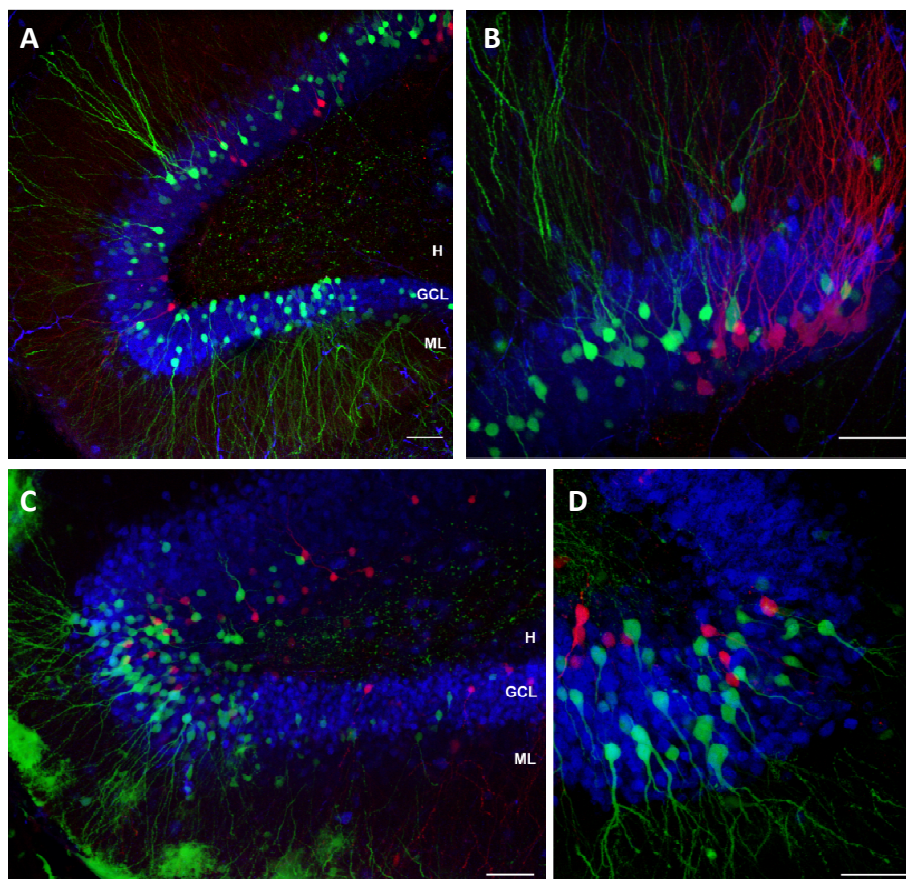


Figura 17. Marcado retroviral de GCs generadas en distintos estadios. **A,B.** GCs nacidas durante el desarrollo embrionario (GFP⁺, verde) y la adultez (RFP⁺, rojo). **C,D.** GCs nacidas durante el periodo postnatal temprano (GFP⁺) y la adultez (RFP⁺). Las imágenes corresponden (de A a D) a composiciones de 16, 30, 9 y 20 planos confocales tomadas de rodajas fijadas de 400 µm de ratones de 13 semanas de vida. La capa granular se marcó por inmunohistoquímica contra el marcador neuronal NeuN (azul). H, hilus; GCL, capa granular; ML, capa molecular. Escalas: 50 µm (M. S. Espósito participó en la inyección de retrovirus en animales E15, P7 y P42. A. F. Schinder participó en la producción de partículas retrovirales. La inmunohistoquímica y microscopía en esta figura fue realizada por N. Morgenstern y V. Piatti).

Considerando que el genoma retroviral se incorpora al propio de las células infectadas, cabe la posibilidad que progenitores infectados tempranamente continúen generando neuronas GFP⁺ durante la adultez. Para evaluar este efecto se administró bromodeoxiuridina (BrdU) desde P21 a P25 en 3 ratones infectados previamente con CAG-GFP en P7 y se cuantificó la colocalización de ambos marcadores a P53 mediante inmunohistoquímica (**Figura 18**). BrdU es un análogo de timidina capaz de ser incorporado al ADN durante su síntesis, por lo que marca efectivamente las células que atraviesan la fase S de la mitosis durante su aplicación. Se observó que un 2% de las neuronas GFP⁺ habían incorporado BrdU, indicando que se encontraban en división durante la tercera semana postnatal. Los resultados muestran que si bien la población de neuronas GFP⁺ incluye GCs nacidas en la adultez, estas se encontrarían en bajos números. Para minimizar las chances de incluir estas neuronas en el estudio se decidió elegir de entre las células GFP⁺ a aquellas alejadas de la franja interna de la GCL, zona donde se ubican preferencialmente las neuronas nacidas durante la adultez.

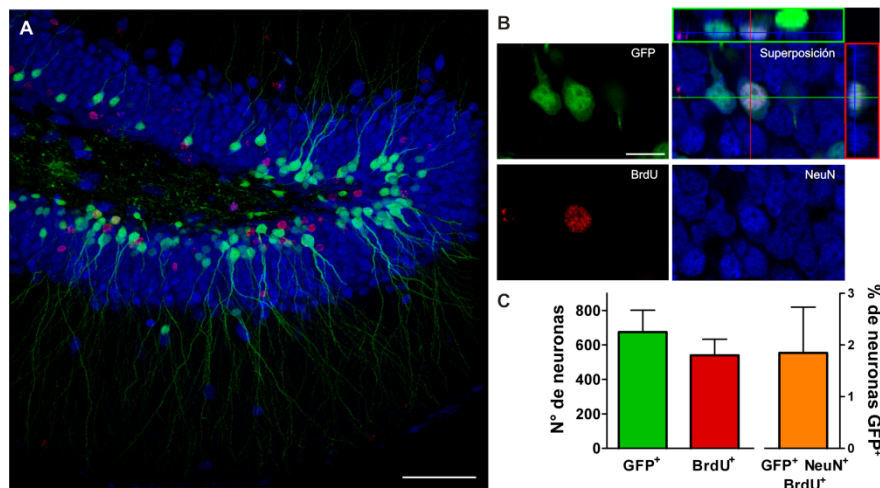


Figura 18. A. Giro dentado de un ratón infectado con retrovirus CAG-GFP y BrdU en los tiempos indicados en el texto. Inmunohistoquímica contra GFP (verde), BrdU (rojo) y NeuN (azul). Composición de 16 planos confocales. B. Ejemplo de un raro caso de colocalización de GFP con BrdU. Se muestran los distintos canales de fluorescencia por separado, su superposición y sus proyecciones ortogonales en los planos X-Z (arriba) e Y-Z (derecha, colores como en A). C. Número de células GFP⁺ y BrdU⁺ totales (izquierda) y porcentaje de colocalización (derecha, promedio de 3 ratones). Escalas: 50 μ m (A) y 10 μ m (B) (Experimentos realizados por N. Morgenstern).

Disponiendo de rodajas agudas de hipocampo con células nacidas en distintos estadios marcadas diferencialmente, se procedió a realizar en éstas registros de tipo patch clamp en configuración whole-cell. Se estudiaron de esta manera sus propiedades intrínsecas de membrana así como sus conexiones aferentes glutamatérgicas y GABAérgicas. El estudio cuantitativo de conexiones aferentes se realizó de manera pareada, como se describe en la **Figura 19**, de manera de minimizar el efecto de la variabilidad entre rodajas.

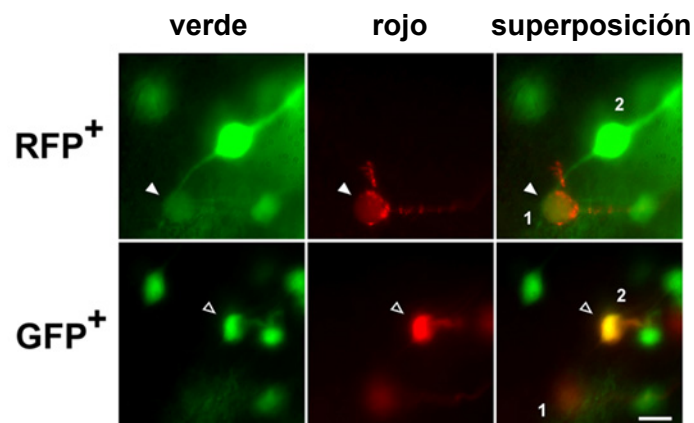


Figura 19. Para la realización de experimentos pareados, una neurona GFP⁺ y una vecina RFP⁺ se registraron sucesivamente, manteniendo la ubicación e intensidades de estímulo de los electrodos de estimulación extracelulares. Se observa en la fila superior una célula RFP⁺ (P42, “1”) luego de ser registrada y llenada con Alexa Fluor 488 (verde). En la fila inferior se observa la célula GFP⁺ (P7, “2”) luego de ser registrada y llenada con Alexa Fluor 594 (rojo). Las células se encuentran en el mismo campo aunque en distintos planos focales. Escala: 10 μ m.

En adelante nos referiremos a las neuronas marcadas en los estadios embrionario, postnatal temprano y adulto como **embrionarias**, **postnatales** y **adultas** respectivamente. Alternativamente utilizaremos en figuras los rótulos **E15**, **P7** y **P42** para referir a estos mismos grupos. No debe confundirse el nombre “adultas” con el calificativo “maduras”, el cual describe un grado de diferenciación avanzado en neuronas de cualquier grupo.

PROPIEDADES DE MEMBRANA

Reportaremos en primer lugar los resultados obtenidos de la medición de las propiedades electrofisiológicas intrínsecas de las células granulares embrionarias, postnatales y adultas. Estas propiedades no se estudiaron de manera pareada pues no es de esperar que las mismas presenten variabilidad entre rebanadas. La actividad de una neurona se ve fuertemente influida por sus propiedades de membrana, tanto pasivas como activas. La resistencia de entrada (" R_{entrada} ") determina la amplitud de los cambios de potencial ocasionados por corrientes iónicas. La capacitancia (" C_m ") fija, junto con la R_{entrada} , el valor de la constante temporal de la membrana (" τ_m "), afectando así la cinética de dichos cambios de potencial. Estas propiedades, en conjunto con los potenciales de reposo y umbral (" V_r " y " V_{umbral} ") finalmente determinan la intensidad de corriente despolarizante necesaria para el disparo de potencial de acción (" I_{umbral} "). Se midieron estas propiedades en GCs nacidas en los tres periodos estudiados.

La resistencia de entrada y la capacitancia se calcularon a partir de la corriente en respuesta a pulsos hiperpolarizantes de 10 mV administrados en voltage clamp (**Figura 20**). La resistencia de entrada mostró una tendencia creciente significativa de células embrionarias a adultas. Esto podría reflejar una menor densidad de canales de fuga (principalmente de potasio) en las células adultas y/o una menor superficie total de membrana. La capacitancia de estas células fue a su vez significativamente menor que la propia de neuronas embrionarias y adultas, apoyando la segunda opción. De hecho, tras relativizar la conductancia de entrada (la cual es lineal con el número de canales abiertos) a la capacitancia de cada célula no se observan diferencias entre las poblaciones. Esto sugiere fuertemente que la densidad de canales es equivalente y que las células se distinguen por propiedades geométricas. Dado que las células granulares son electrotónicamente compactas (Schmidt-Hieber et al. 2007), los valores medidos en el soma reflejan también contribuciones de todo el árbol dendrítico. Los

resultados apuntan a una menor superficie total de membrana en las células granulares nacidas en el adulto.

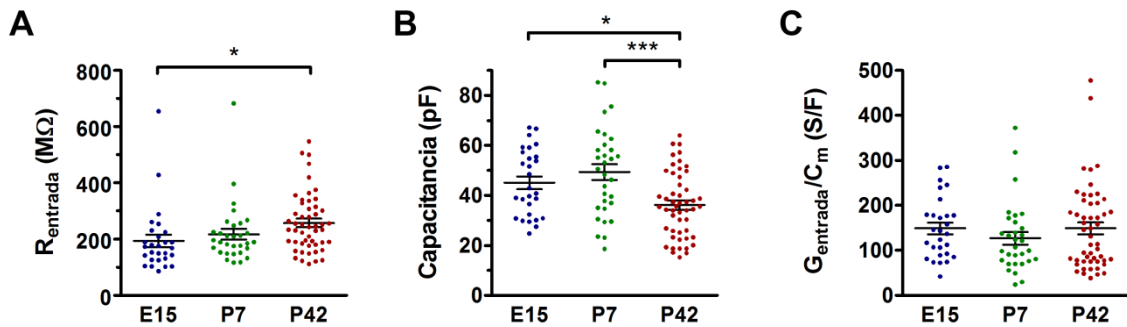


Figura 20. Propiedades pasivas de membrana. **A.** Resistencia de entrada ($p = 0,035$). **B.** Capacitancia ($p = 0,0003$). **C.** Conductancia de entrada ($1/R_{\text{entrada}}$) relativizada por la capacitancia de cada célula ($p = 0,47$). Pruebas post-hoc de Tukey: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Registrando en configuración current clamp se midió el potencial de reposo de las células y se estudió el disparo de potenciales de acción en respuesta a escalones de corriente despolarizante (**Figura 21**). Ni el potencial de reposo ni el de umbral de disparo resultaron significativamente distintos entre las poblaciones. Sin embargo, la corriente necesaria para evocar potencial de acción siguió una tendencia opuesta a la observada para la resistencia de entrada. Este resultado es esperable pues, a igual potencial de umbral, células con mayor R_{entrada} requieren de menos corriente despolarizante para evocar potenciales de acción. Los resultados muestran que tanto las neuronas adultas como las postnatales son más excitables que las nacidas durante el desarrollo embrionario.

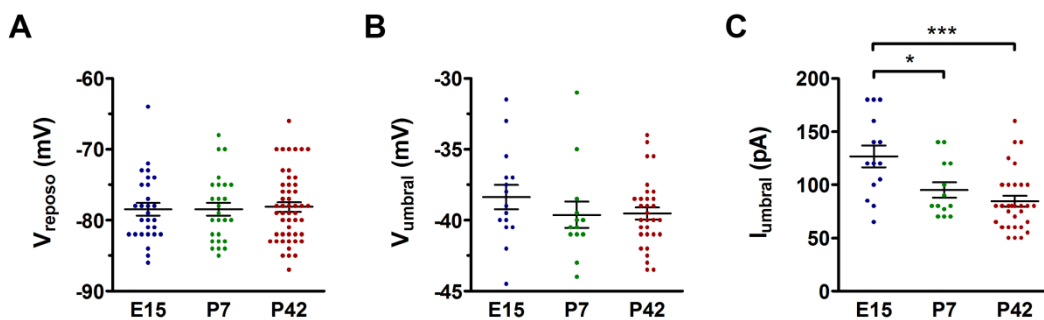


Figura 21. Potencial de reposo y potenciales de acción. **A.** Potencial de reposo ($p = 0,94$). **B.** Potencial de umbral de disparo ($p = 0,40$). **C.** Corriente de umbral para el disparo de potencial de acción ($p = 0,0003$). Pruebas post-hoc de Tukey: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

CONEXIONES AFERENTES INHIBITORIAS

Una amplia variedad de clases de interneuronas coexisten en el giro dentado. Los estudios anatómicos distinguen entre aquellas que contactan la región perisomática o las dendritas de las células granulares (ver **Figura 3**). Estudios electrofisiológicos previos en rodajas de hipocampo permitieron estudiar las propiedades de estas conexiones y destacaron la incidencia de corrientes sinápticas inhibitorias de distintos cursos temporales sobre las células piramidales (Pearce 1993; Miles et al. 1996; Banks et al. 1998; Banks et al. 2002) y granulares (Soltesz et al. 1995). La estimulación de las capas celulares evoca preferentemente corrientes de cinética rápida mientras que la de capas moleculares resulta en la detección de corrientes lentas, siendo todas bloqueables por antagonistas de receptores GABA_A. La actividad GABAérgica espontánea de las neuronas principales está ampliamente dominada por corrientes rápidas, aunque pueden detectarse eventos lentos con baja frecuencia. Diversas evidencias sostienen que las corrientes de cinética rápida provienen de sinapsis formadas sobre la región perisomática (soma, segmento inicial del axón o dendrita proximal) mientras que las lentas se originan en la región dendrítica, constituyendo así un correlato electrofisiológico de las distinciones morfológicas descritas entre interneuronas. Las diferencias cinéticas obedecerían al filtrado electrotónico de las corrientes de origen distal, aunque no pueden descartarse diferencias espaciales en las propiedades de los receptores.

Las propiedades de las corrientes GABAérgicas no son constantes durante la maduración temprana del hipocampo. En células granulares se observó que las mismas aumentan en frecuencia y aceleran su cinética durante las tres primeras semanas de vida en ratas (Hollrigel et al. 1997). En la primera semana se detectan a su vez ráfagas de actividad GABAérgica despolarizante (Hollrigel et al. 1998). En células piramidales, las corrientes lentas pasan de ser prácticamente indetectables en las dos primeras semanas a alcanzar frecuencias cercanas a los 0,2 Hz (Banks et al. 2002). No es claro cuáles de estos cambios obedecen a la maduración

individual de las neuronas principales y cuales a la evolución del circuito hipocampal, pero el carácter flexible de estas propiedades hace interesante su comparación entre neuronas adultas y perinatales.

En vista de lo antedicho resulta evidente que para estudiar la conectividad aferente GABAérgica de las células granulares es necesario distinguir entre contactos perisomáticos y dendríticos. De otra manera se corre el riesgo de enmascarar o confundir propiedades de estas dos vías, de función y maduración diferentes.

CORRIENTES GABAÉRGICAS EVOCADAS POR ESTIMULACIÓN EXTRACELULAR

CARACTERIZACIÓN DE LAS CORRIENTES EVOCADAS

Las dendritas, soma y axón de las interneuronas pueden abarcar desde la capa molecular externa hasta el hilus, por lo que la estimulación puntual de un área del giro dentado puede en principio estimular diversos tipos de interneuronas. Para estudiar en detalle las conexiones formadas sobre las GCs adultas, se debió extender la caracterización de las corrientes sinápticas GABAérgicas evocadas sobre las células granulares por estimulación extracelular en el giro dentado, tomando como punto de partida la literatura existente para el giro y las regiones CA3 y CA1. Esta caracterización comenzó previamente a la realización del experimento de triple marcado retroviral descrito en esta sección del trabajo de tesis. Todos los experimentos en esta sección se realizaron en presencia de ácido kinurénico (kyn, 4 mM), bloqueante de receptores de glutamato tipo AMPA y NMDA, de manera de aislar la transmisión GABAérgica.

Para evocar corrientes somáticas sobre las GCs se ensayó entonces estimular extracelularmente la capa granular misma, ubicando el electrodo a aproximadamente 200-300

μm de las células registradas (**Figura 22A**). La aplicación de breves pulsos de voltaje ($50\ \mu\text{s}$) evoca en las células granulares corrientes sinápticas cuya amplitud crece con la intensidad del estímulo aplicado (Figura 22B,C). Estas corrientes son abolidas reversiblemente por el bloqueante de receptores tipo GABA_A bicuculina (bmi, $20\ \mu\text{M}$) confirmando su naturaleza GABAérgica (Figura 22D).

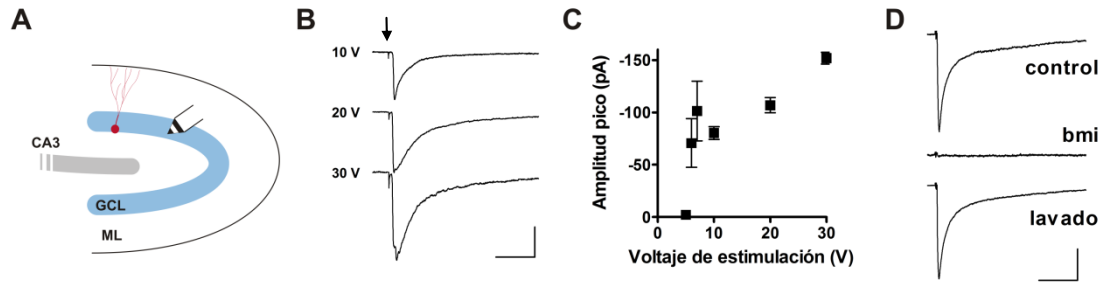


Figura 22. Corrientes GABAérgicas evocadas por estimulación de la capa granular. **A.** Esquema del giro dentado indicando la posición del electrodo de estimulación bipolar sobre la capa granular (GCL). ML: capa molecular. **B.** Corrientes GABAérgicas postsinápticas (IPSCs) evocadas sucesivamente por estímulos de voltaje creciente (indicado a la izquierda) sobre una neurona adulta marcada con retrovirus GFP. La flecha señala el artefacto de estimulación. Escala: 25 ms, 50 pA. **C.** Amplitud pico de los IPSCs evocados a cada intensidad de estímulo en el mismo experimento (se grafica la media y el error estándar). **D.** La aplicación de bmi ($20\ \mu\text{M}$) bloquea reversiblemente el IPSC evocado sobre otra neurona adulta. Escala: 50 ms, 20 pA. Experimentos realizados en presencia de kyn ($4\ \text{mM}$).

La conductancia de los canales GABA_A esta principalmente mediada por el flujo de iones Cl^- y en menor medida por iones HCO_3^- (Kaila 1994). En experimentos de whole-cell, el medio intracelular es mayormente reemplazado por la solución interna contenida en la pipeta, por lo que es de esperar que el potencial de reversión de estos canales (E_{GABA}) se aproxime al de equilibrio de Nernst correspondiente a las concentraciones de Cl^- en las soluciones intra- y extracelulares:

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

La realización de curvas I-V para las corrientes GABAérgicas evocadas reveló sin embargo la existencia de dos componentes con diferente cinética y potencial de reversión: una

conductancia con potencial de reversión despolarizado y crecimiento y decaimiento rápidos y otra con potencial de reversión más hiperpolarizado y cinética lenta (**Figura 23A,B**). Ambos componentes se bloquean completamente por bmi (20 μ M), confirmando que están mediados por receptores de tipo GABA_A y son entonces principalmente conductancias de Cl⁻ (Figura 23C). Siendo el medio extracelular homogéneo, se deduce que estas corrientes se originan en compartimentos con distinta concentración iónica intracelular, por lo que deben provenir de sinapsis segregadas espacialmente. En efecto, se ha descrito que si bien en el soma las concentraciones iónicas son mayormente impuestas por la pipeta, la actividad de transportadores de Cl⁻ puede mantener en las dendritas una concentración menor de este ión, haciendo su potencial de reversión local más hiperpolarizado (Jarolimek et al. 1999) (Figura 23D). Este criterio ha servido para distinguir entre sinapsis GABAérgicas cercanas al soma y aquellas más distales formadas sobre dendritas en células piramidales de CA1 (Pearce 1993; Khirug et al. 2005).

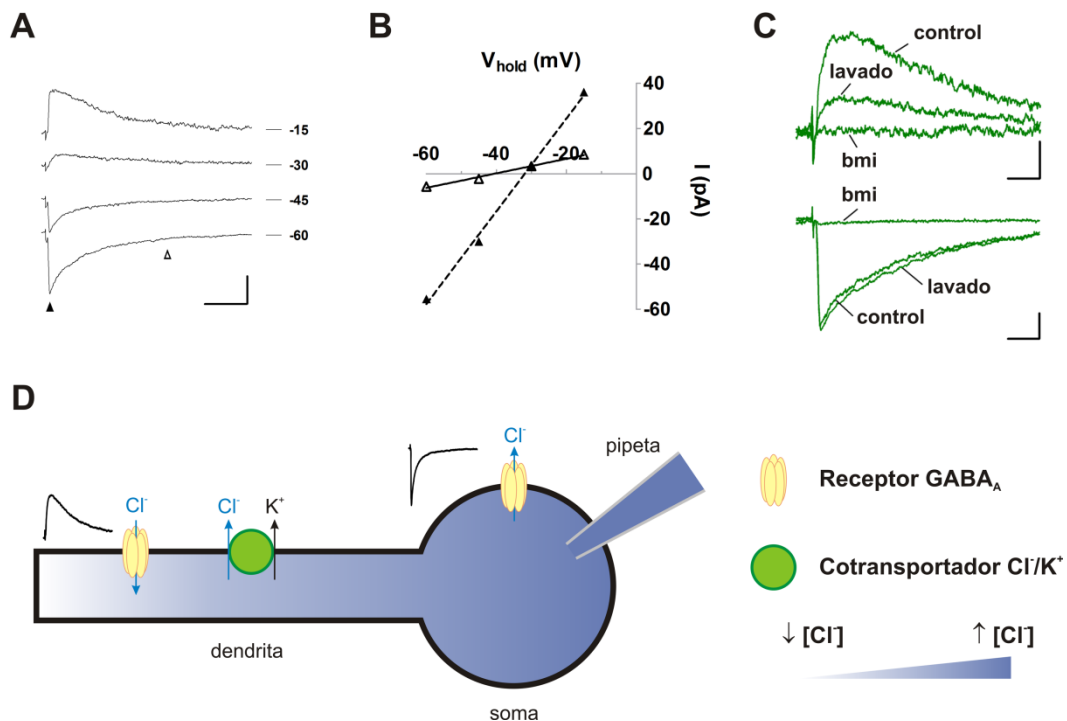


Figura 23. Componentes de distinto potencial de reversión y cinética en los IPSCs evocados por estimulación de la capa granular. **A.** IPSCs promedio evocados en una neurona adulta mantenida a los distintos V_{hold} indicados a la derecha. Escala: 50 ms, 25 pA. **B.** Curvas I-V del mismo experimento medidas en los tiempos indicados por los triángulos (temprano: triángulos negros, líneas continuas, $E = -31,9$ mV; tardío: triángulos blancos, líneas de puntos, $E = -40,6$ mV). **C.** Corrientes registradas a -20 y -80 mV en la misma GC adulta antes, durante y luego de la aplicación de bmi 20 μM en la solución externa. Bloqueo promedio por aplicación de bmi a -80 mV: $97,7 \pm 0,8$ %, $n = 4$. **D.** La solución interna de la pipeta impone una concentración elevada de Cl^- en el soma de la célula registrada. La actividad de cotransportadores de Cl^- / K^+ expulsa estos iones manteniendo una menor concentración de Cl^- en las dendritas. El potencial de reversión de las conductancias GABA_A es por lo tanto más hiperpolarizado en éstas que en el soma. La distinta cinética de las corrientes obedece a diferencias en las propiedades de los receptores y al filtrado electrotonico.

Para confirmar que las conductancias rápidas y lentas evocadas por estimulación de la capa granular corresponden a sinapsis formadas sobre el soma y dendritas de las GCs respectivamente se realizaron experimentos de aplicación local de bloqueantes. La perfusión local de bicuculina sobre el soma de una GC debería eliminar reversiblemente el componente rápido de los IPSCs sin afectar la corriente lenta. Se realizó este experimento en neuronas adultas marcadas con retrovirus GFP y GCs no marcadas, representando probabilísticamente a neuronas nacidas durante el desarrollo perinatal (**Figura 24**). Se añadió Alexa Fluor 594 a la solución de bmi de manera de controlar que la distribución de la droga no alcanzara las dendritas en la capa molecular (**Figura 24A**). La aplicación local de bmi bloqueó consistentemente el componente rápido de las corrientes evocadas en la capa granular y no su componente lento (**Figura 24B,C**), confirmando la localización perisomática y dendrítica propuesta.

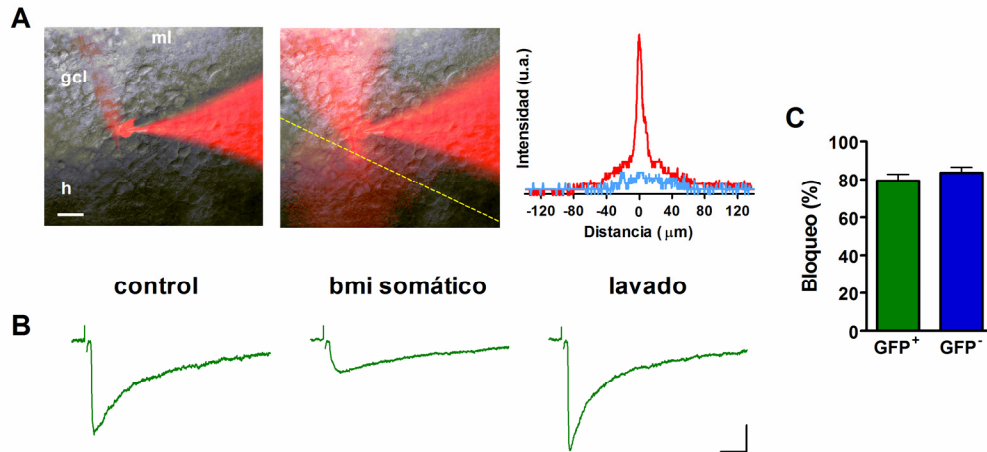


Figura 24. Bloqueo perisomático de las corrientes GABAérgicas rápidas. **A.** Composición de microscopías de campo claro y fluorescencia antes (izquierda) y durante (medio) la liberación local de bmi durante un experimento de whole-cell. La fluorescencia roja se debe a la inclusión de Alexa Fluor 594 en la solución con bmi y la solución interna. Derecha: La cuantificación de fluorescencia sobre la línea de puntos antes (azul) o durante (rojo) la liberación de bmi muestra que la misma queda restringida a un pequeño área dentro de la capa granular. ml, capa molecular; gcl, capa granular; h, hilus. **B.** Ejemplo de un experimento realizado sobre una GC adulta (GFP⁺). La aplicación de bmi en la región perisomática bloquea completa y reversiblemente el componente rápido del IPSC revelando la presencia de un componente lento dendrítico. **C.** Los IPSCs evocados por estimulación de la capa granular resultaron sensiblemente bloqueados por el bmi perisomático tanto en GCs adultas (GFP⁺; $p < 0,002$; $n = 3$; t test de muestra única) como en no marcadas (GFP⁻; $p < 0,002$; $n = 3$).

Las corrientes GABAérgicas evocadas por estimulación de la capa granular, registradas a potenciales hiperpolarizados ($V_{\text{hold}} = -80$ mV) están dominadas por el componente rápido, perisomático. Esto es particularmente cierto para sus propiedades de amplitud pico y tiempo de crecimiento. El tiempo de decaimiento es sin embargo influenciado por el componente lento dendrítico.

ESTUDIOS COMPARATIVOS

La estimulación extracelular con electrodos bipolares resulta en la activación de un alto número de axones, algunos de los cuales forman sinapsis con la célula registrada. El control del potencial (o la corriente) entre sus polos y la duración del estímulo permite variar la cantidad de axones efectivamente activados. La amplitud de corriente sináptica evocada es función entonces del número de sinapsis formado por los axones reclutados sobre la célula registrada

(n), su probabilidad de liberación (p) y la amplitud de corriente ocasionada por la liberación de cada vesícula de neurotransmisor (q). Los experimentos pareados permiten registrar las respuestas de distintas células a la estimulación del mismo conjunto de axones, permitiendo comparar así la “fuerza” relativa de la conexión estudiada. La cinética de las corrientes evocadas puede a su vez reflejar diferencias en la composición de subunidades de los receptores o en la localización subcelular de las sinapsis. En particular la cinética de los IPSCs evocados por estimulación de la capa granular puede obedecer también al aporte relativo de las componentes somáticas y dendríticas.

Se estudiaron los aferentes inhibitorios perisomáticos sobre las GCs realizando experimentos pareados entre neuronas embrionarias vs adultas y postnatales vs adultas (Figura 19, **Figura 25**).

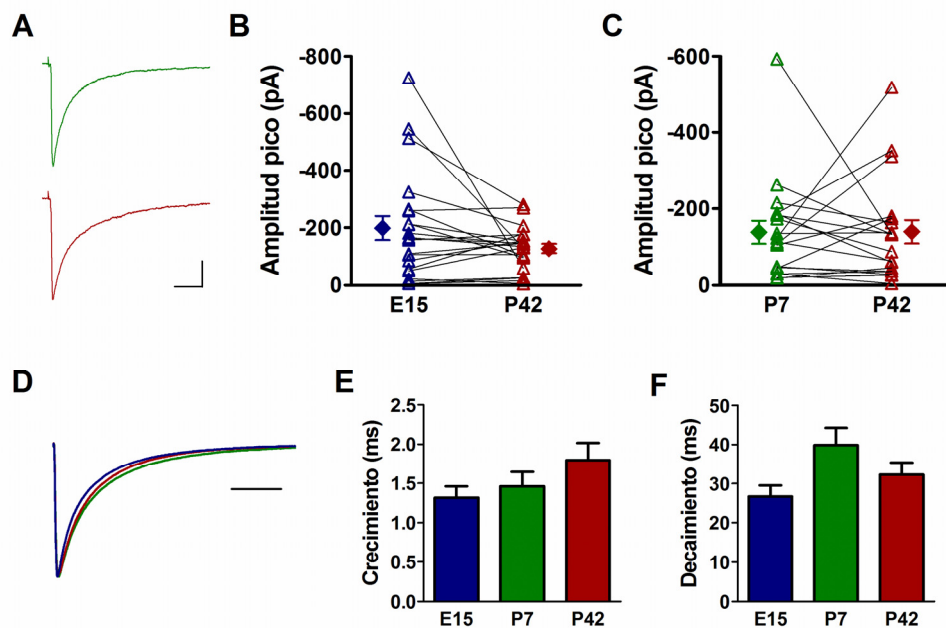


Figura 25. Amplitud y cinética de IPSCs evocados por estimulación de la capa granular. **A.** Ejemplo de IPSCs registrados durante un experimento pareado entre una célula postnatal (verde) y una adulta (rojo). Escala: 25 ms, 40 pA. **B, C.** Análisis de la amplitud pico de los IPSCs evocados en experimentos pareados entre neuronas embrionales y adultas (**B**, $n = 21$ pares, $p = 0.09$, t-test pareado) y postnatales y adultas (**C**, $n = 19$, $p = 0.97$). **D.** Promedios normalizados de todas los IPSCs evocados sobre células embrionales (azul), postnatales (verde) y adultas (rojo). Escala: 50 ms. **E, F.** Tiempo de crecimiento (**E**, 20 – 80%, $p = 0.26$, ANOVA de una vía) y decaimiento (**F**, 100 – 40%, $p = 0.07$) de los IPSCs.

No se observaron diferencias significativas en la amplitud pico de los IPSCs entre neuronas embrionarias y adultas ni entre postnatales y adultas (Figura 25B,C). La cinética de estas corrientes resultó a su vez similar entre las tres poblaciones (Figura 25D-F).

Para dilucidar el aporte de las sinapsis somáticas y dendríticas a las respuestas postsinápticas registradas se realizaron curvas I-V de las corrientes evocadas (**Figura 26**).

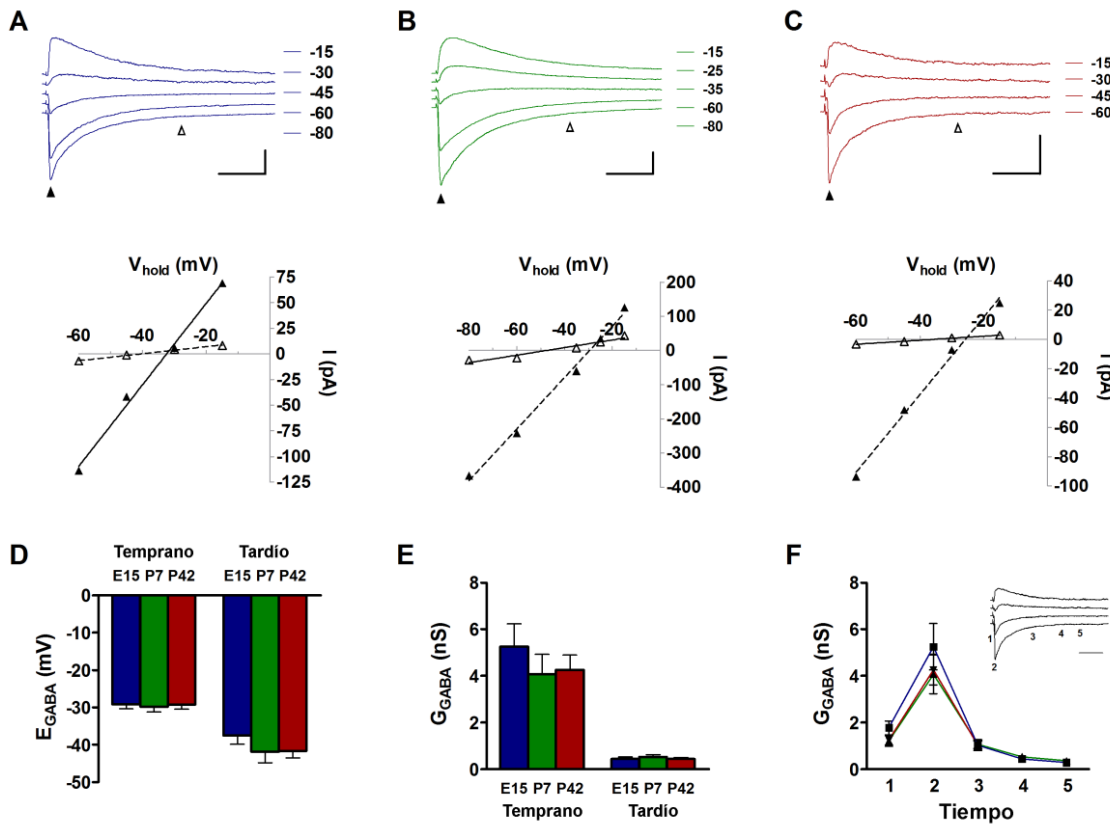


Figura 26. Conductancia y potencial de reversión de IPSCs evocados por estimulación de la capa granular. **A, B, C.** Ejemplos de experimentos realizados sobre células embrionarias (A), postnatales (B) y adultas (C). Arriba: trazos promedio de IPSCs a los V_{hold} indicados en mV a la derecha. Abajo: curvas I-V de los mismos experimentos medidas en los tiempos indicados por los triángulos (temprano: triángulos negros, líneas continuas; tardío: triángulos blancos, líneas de puntos). Escalas: 50 ms, 50 pA (A,C) o 100 pA (B). **D.** Potencial de reversión medido a tiempos tempranos y tardíos (E15, $n = 12$; P7, $n = 11$; P42, $n = 16$). Un ANOVA de dos vías reveló una diferencia significativa entre los dos puntos de tiempo ($p < 0.0001$) pero no entre los grupos de células ($p = 0.56$). **E.** Conductancia medida a tiempos tempranos y tardíos en los mismos experimentos. Un ANOVA de dos vías reveló una diferencia significativa entre los dos puntos de tiempo ($p < 0.0001$) pero no entre los grupos de células ($p = 0.63$). **F.** Perfil temporal de conductancia sináptica. Los valores corresponden a la conductancia medida en los puntos de tiempo indicados en el *inset*. Un ANOVA de dos vías de mediciones repetidas mostró un efecto significativo del tiempo de medición ($p < 0.0001$) pero no del grupo de células ($p = 0.62$).

En todas las GCs la estimulación de la capa granular evocó corrientes mixtas con componentes rápidos perisomáticos y lentos dendríticos (Figura 26A-C). Estos presentan potenciales de reversión distintos entre sí pero similares en los tres grupos neuronales (Figura 26D). La conductancia medida a tiempos tempranos y tardíos permite evaluar diferencialmente la contribución de los dos componentes a los IPSCs. Se observaron valores similares para los tres grupos de células (Figura 26E). Analizando en mayor profundidad, todo el perfil temporal de la conductancia sináptica resultó muy similar (Figura 26F).

Si bien la estimulación de la capa granular activa sinapsis formadas sobre las regiones perisomáticas y dendríticas de las GCs, las corrientes evocadas están dominadas, como se comentó anteriormente, por el componente perisomático. Para estudiar con mayor profundidad los aferentes inhibitorios dendríticos se ensayó estimular su zona de terminación: la franja externa de la capa molecular (**Figura 27**).

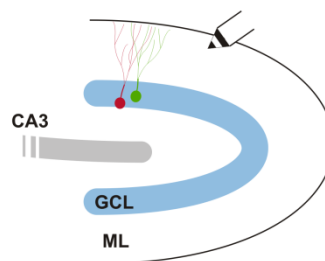


Figura 27. Esquema del giro dentado indicando la posición del electrodo de estimulación bipolar sobre la capa molecular.

La estimulación de la capa molecular en presencia de bloqueantes de glutamato evocó en todas las GCs corrientes de cinética lenta (**Figura 28A-C**). Las corrientes fueron completamente bloqueadas por aplicación de bmi 20 μ M ($98,5 \pm 1,5$ %, $n = 3$) confirmando estar mediadas por receptores tipo GABA_A. Se realizaron curvas I-V de manera de medir el potencial de reversión y el valor de conductancia de las respuestas. Las mismas mostraron un potencial de reversión de ~ -65 mV (Figura 28D), sensiblemente más hiperpolarizado que el propio de las corrientes lentas evocadas por estimulación de la capa granular (~ -40 mV, Figura 26D). Esto evidencia

una localización dendrítica más distal para estas sinapsis, indicando que la estimulación de la capa molecular permite estudiar aferentes no evocados en los experimentos descritos anteriormente. Los potenciales de reversión resultaron iguales en las tres poblaciones de células (Figura 28D), sugiriendo una localización subcelular común y una actividad similar de transportadores de Cl^- en todas las GCs. Siendo el potencial de reversión de estas corrientes tan cercano a -80 mV , no se midió la amplitud de las mismas a este V_{hold} , pues pequeñas variaciones en su reversión afectarían sensiblemente este valor. En su lugar se midió la conductancia sináptica pico ($G_{\text{máx}}$) para cuantificar estas aferencias. No se encontraron diferencias significativas para esta propiedad entre neuronas embrionarias, postnatales y adultas (Figura 28D). Para evaluar posibles diferencias en las propiedades de estas sinapsis y sus receptores se cuantificó la cinética de las corrientes salientes registradas a potenciales cercanos a -40 mV . Los trazos promedio obtenidos para las tres poblaciones de células resultan totalmente superponibles (Figura 28E) y la medición de tiempos de crecimiento y decaimiento refleja esta convergencia (Figura 28F).

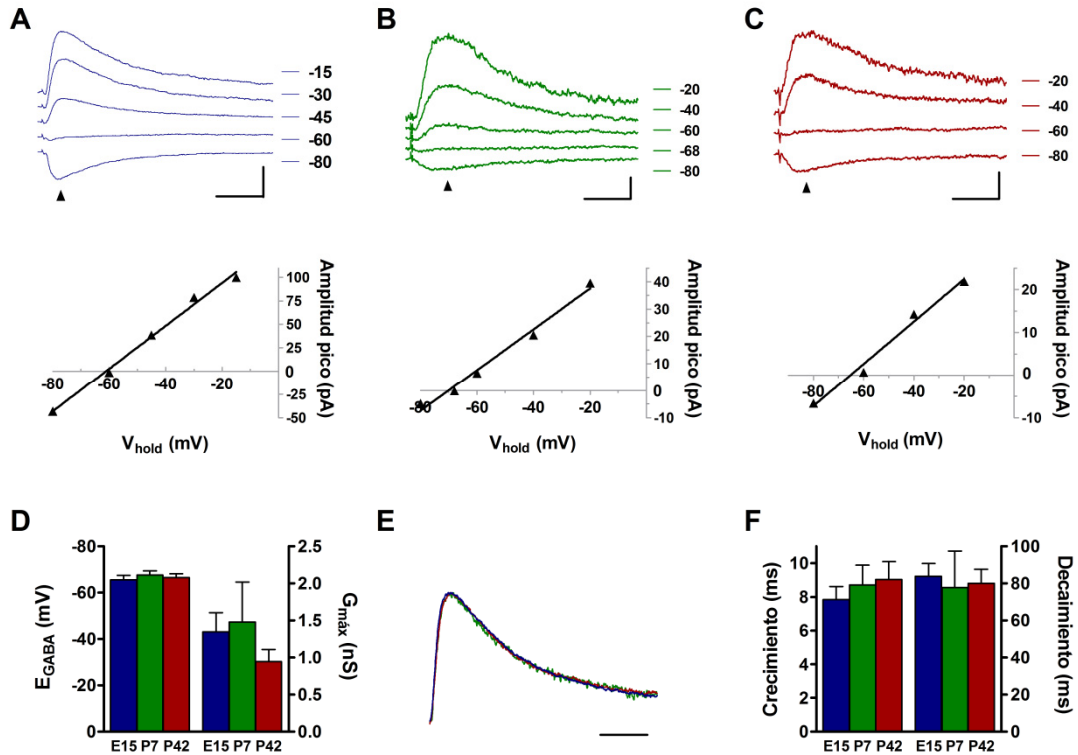


Figura 28. IPSCs evocados por estimulación de la capa molecular. **A, B, C.** Arriba: Ejemplos de IPSCs sobre neuronas embrionarias (A), postnatales (B) y adultas (C) registrados a los V_{hold} indicados en mV a la derecha. Escalas: 50 ms, 50 pA (A) o 10 pA (B,C). Abajo: Curvas I-V de los mismos experimentos, medidas a los tiempos indicados por los triángulos. **D.** Potencial de reversión y conductancia pico de los IPSCs. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos de células (E_{GABA} : $p = 0.75$, $G_{\text{máx}}$: $p = 0.36$; ANOVAS, $n = 7$ a 15). **E.** Promedios normalizados de todos los IPSCs evocados sobre células embrionarias (azul), postnatales (verde) y adultas (rojo), registrados a $V_{\text{hold}} \approx -40$ mV. Nótese la perfecta superposición de los trazos. Escala: 50 ms. **F.** Tiempos de crecimiento (20 – 80%) y decaimiento (100 – 40%) de los IPSCs. No se encontraron diferencias entre los grupos de células (crecimiento: $p = 0.64$, decaimiento: $p = 0.92$; ANOVAS, $n = 6$ a 14).

ACTIVIDAD GABAÉRGICA ESPONTÁNEA

Al estimular aferentes con un electrodo extracelular, la posición del mismo determina la identidad de las conexiones activadas. Dada la complejidad de la población de interneuronas que contactan a las células granulares, es posible que algunas de estas hayan escapado al análisis así realizado por no ser alcanzadas por la estimulación o verse su efecto apantallado por la mayor activación de otros aferentes. Se procedió entonces a extender la caracterización de las aferencias inhibitorias sobre las GCs nacidas en la adultez realizando registros de actividad espontánea GABAérgica. Las neuronas reciben en rebanadas agudas actividad sináptica espontánea ocasionada por dos tipos de procesos. Por un lado el disparo espontáneo de potencial de acción de neuronas presinápticas causa, naturalmente, la liberación de neurotransmisor en sus terminales. Por el otro, ocurren fenómenos estocásticos de fusión de vesículas sinápticas en los terminales las cuales liberan entonces su contenido. Los eventos postsinápticos causados por esta segunda clase de proceso corresponden a un cuanto de neurotransmisor y son conocidos como eventos postsinápticos miniatura. Estas corrientes miniatura pueden ocurrir a frecuencias considerables, por lo que podrían tener un rol funcional propio. Los experimentos se realizaron en ausencia de inhibidores del disparo de potencial de acción como el bloqueante de canales de Na^+ tetrodotoxina (TTX) por lo que los eventos registrados son consecuencia en principio de los dos tipos de procesos mencionados.

Este tipo de registros permitiría en principio revelar diferencias sutiles en la aferencia funcional inhibitoria formada sobre las distintas poblaciones de células granulares.

Resultados preliminares en rebanadas agudas mostraron que las células granulares reciben tanto corrientes espontáneas perisomáticas de cinética rápida, como dendríticas de cinética lenta. Estas últimas, sin embargo, ocurren a menor frecuencia y su detección es frecuentemente dificultada por la alta frecuencia y amplitud de las primeras. Los resultados descritos en las figuras 26 y 28 sugirieron una manera de estudiar por separado la actividad espontánea originada en los distintos compartimientos. Para aumentar la diferencia en la reversión de las corrientes se modificó la composición de la solución interna de registro de manera de trabajar con iguales concentraciones de Cl^- internas y externas (“ Cl^- simétrico”). De esta manera las corrientes GABAérgicas perisomáticas tendrían un potencial de reversión cercano a 0 mV, mientras que las dendríticas invertirían su dirección a potenciales de membrana más hiperpolarizados por la acción de los transportadores. En estas condiciones se predijo que en registros realizados a $V_{\text{hold}} = 0$ mV sólo se observarían corrientes salientes lentas mientras que registros realizados a -80 mV estarían ampliamente dominados por corrientes entrantes rápidas de gran amplitud en virtud de su mayor *driving force*. Comenzaremos describiendo los resultados obtenidos al registrar actividad espontánea a potenciales hiperpolarizados.

CORRIENTES ESPONTÁNEAS PERISOMÁTICAS

Como se esperaba, se detectaron en estas condiciones corrientes espontáneas de cinética rápida en GCs embrionarias, postnatales y adultas (**Figura 29A-C**). Estos eventos fueron completamente bloqueados por bmi, confirmando estar mediados por receptores de tipo GABA_A (Figura 29D).

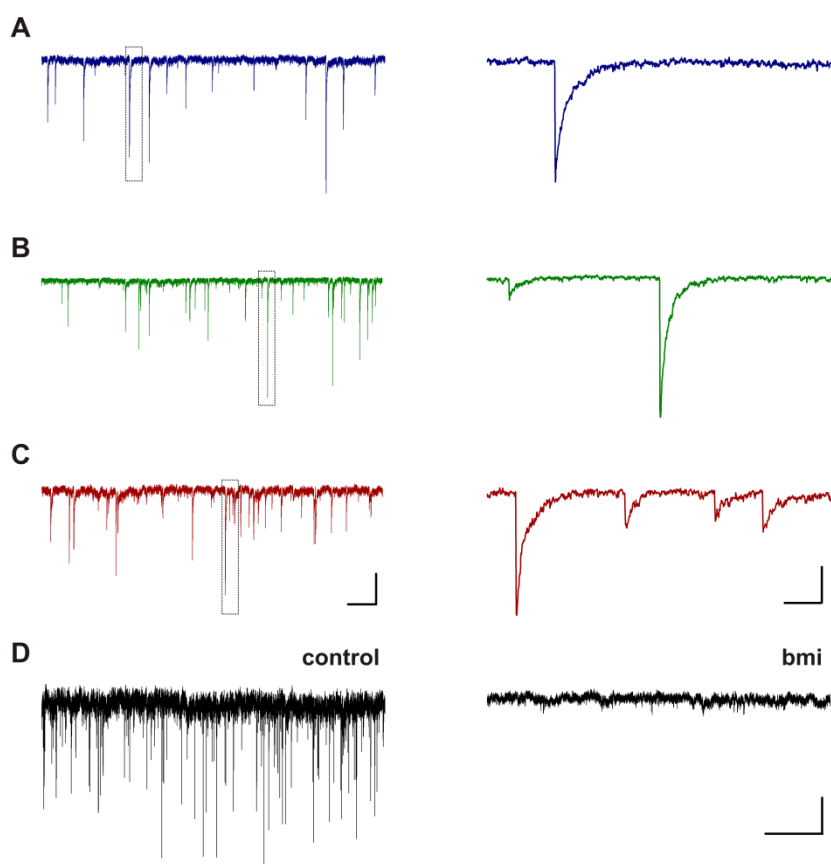


Figura 29. Actividad espontánea GABAérgica perisomática. **A-C.** Eventos espontáneos registrados a $V_{\text{hold}} = -80$ mV en neuronas embrionarias (A), postnatales (B) y adultas (C). Los trazos en la derecha corresponden a ampliaciones de las regiones recuadradas. Escalas: 1 s, 40 pA (izq); 50 ms, 40 pA (der). **D.** Actividad espontánea registrada como en A-C antes (izquierda) y durante (derecha) la aplicación de bicuculina (20 μ M). Resultado representativo de 3 experimentos. Escala: 10 s, 20 pA. Experimentos realizados en presencia de ácido kynurenico (4 mM).

Para analizar la actividad espontánea se detectaron digitalmente a posteriori los eventos siguiendo criterios de amplitud y área de los mismos. Cada evento fue confirmado visualmente para evitar incluir señales espurias. Se encontró que las GCs nacidas en la adultez reciben la misma frecuencia de eventos sinápticos inhibitorios que aquellas nacidas en el desarrollo embrionario y postnatal temprano (**Figura 30A**). A su vez, la amplitud de las corrientes registradas fue similar en las tres poblaciones (Figura 30B).

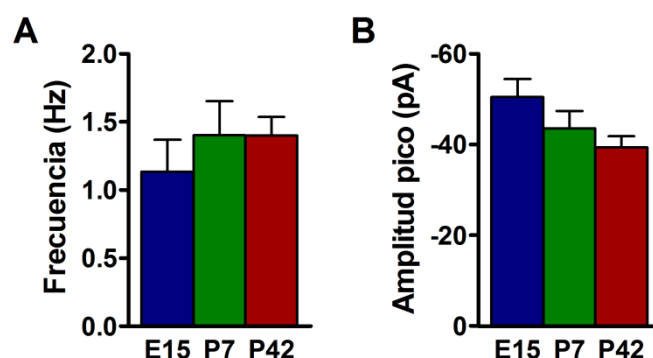


Figura 30. Frecuencia (A) y amplitud pico (B) de las corrientes espontáneas registradas a $V_{\text{hold}} = -80$ mV en neuronas embrionarias, postnatales y adultas (E15: $n = 10$, P7: $n = 12$, P42: $n = 15$). No se encontraron diferencias significativas entre los grupos de células (frecuencia: $p = 0.60$, ANOVA; amplitud: $p = 0.11$). La amplitud se comparó a partir de la amplitud promedio de los eventos de cada célula (Parte de estos registros fueron adquiridos por M. S. Espósito).

A continuación se estudió en detalle la cinética de las corrientes espontáneas inhibitorias (sIPSCs) registradas. En primer lugar se calculó el tiempo de crecimiento y decaimiento de cada evento individual registrado, utilizando para esto rutinas desarrolladas en MATLAB. A partir de estos datos se construyeron histogramas de manera de evaluar la distribución de estas propiedades y la posible existencia de subpoblaciones en los datos. Dado que cada evento queda caracterizado por un par de valores, se construyeron histogramas bidimensionales para visualizar su distribución en el plano (**Figura 31A**). Se observa que en estas condiciones la actividad espontánea detectada está ampliamente dominada por una población única de eventos. No se observan diferencias cualitativas entre estas distribuciones en los tres grupos de células. Los tiempos de crecimiento y decaimiento de estas corrientes están comprendidos mayoritariamente entre los 0,3-0,7 ms y 4-12 ms, respectivamente. Cabe destacar que este tipo de corrientes rápidas resultó completamente bloqueada durante los experimentos de aplicación de bmi en el soma (Figura 24), confirmando su origen perisomático. Para superponer las distribuciones de cinética de los distintos grupos, los mismos datos se representaron en forma de histogramas acumulativos para el tiempo de crecimiento y decaimiento por separado (Figura 31B). Nuevamente los tres grupos de células muestran

curvas prácticamente indistinguibles. Las neuronas adultas muestran tan solo una leve tendencia hacia eventos con tiempo de crecimiento mayor.

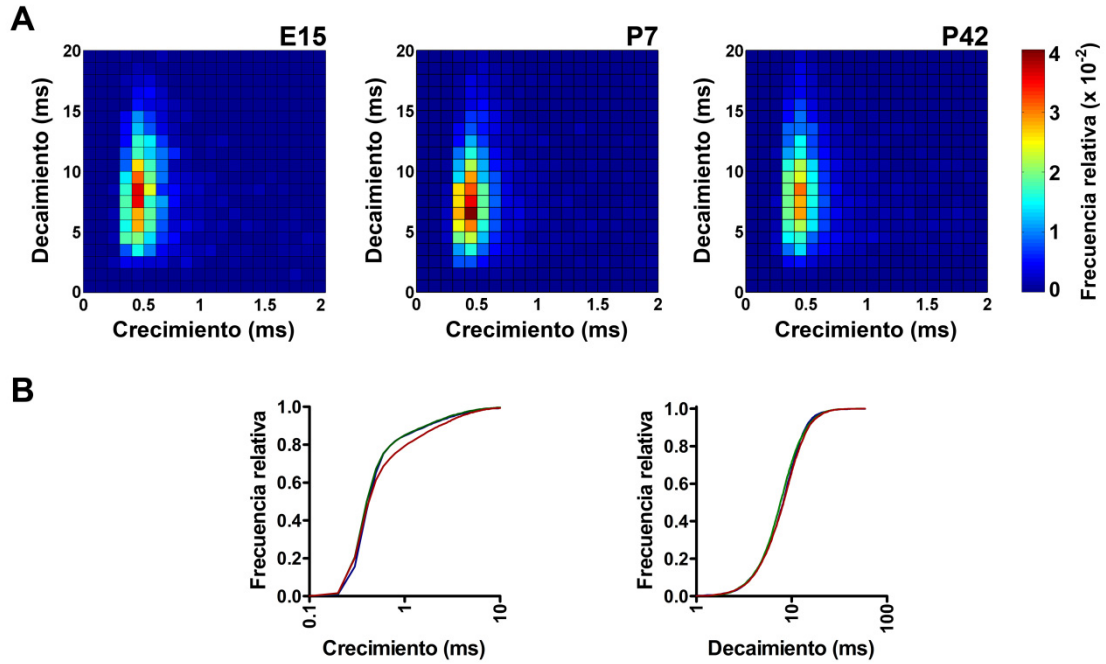


Figura 31. Cinética de los sIPSC individuales registrados a $V_{\text{hold}} = -80$ mV. **A.** Histogramas bidimensionales de tiempos de crecimiento (20-80%) y decaimiento (100-40%) para todos los eventos detectados en neuronas embrionarias, postnatales y adultas ($n = 3824$, 5871 y 8183 respectivamente). El color de cada sector indica la proporción de eventos comprendidos entre esos valores, de acuerdo a la escala mostrada a la derecha. **B.** Histogramas acumulativos para los mismos datos analizados en A. Las curvas para los tres grupos de células se superponen casi por completo (embrionario: azul, postnatal: verde, adulto: rojo).

Para realizar comparaciones estadísticas se obtuvo para cada célula registrada un trazo promedio de todos sus eventos. Los eventos fueron previamente alineados al 10% de su fase de crecimiento y sus amplitudes normalizadas de manera que cada evento contribuya en igual medida a la cinética del promedio. Este protocolo permite que cada célula tenga el mismo peso en la estadística, independientemente de su frecuencia de sIPSC. A su vez, el promediado de cientos de eventos minimiza el efecto del ruido sobre las mediciones. El análisis no arroja diferencias entre la cinética de los sIPSCs registrados sobre las GCs embrionarias, postnatales y adultas, siendo sus trazos promedio totalmente superponibles (**Figura 32A**) y sus propiedades homogéneas (**Figura 32B,C**).

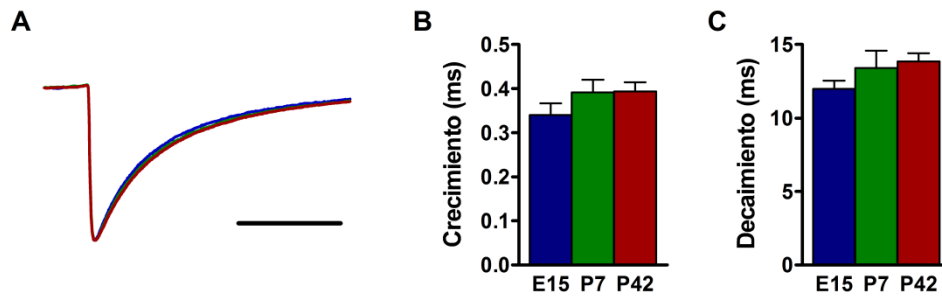


Figura 32. Cinética de los sIPSC promedio registrados a -80 mV. **A.** Trazos obtenidos a partir de promediar los eventos promedio de todas las neuronas embrionarias (azul), postnatales (verde) y adultas (rojo) registradas. Escala: 20 ms. **B,C.** Tiempos de crecimiento (20-80%) y decaimiento (100-40%) medidos sobre los eventos promedio. No se encontraron diferencias significativas en el crecimiento ($p = 0.28$, ANOVA, $n = 10$ E15, 12 P7 y 15 P42) o el decaimiento ($p = 0.27$).

CORRIENTES ESPONTÁNEAS DENDRÍTICAS

Como se adelantó ya, era de esperar que en estas condiciones de Cl^- simétrico y a un potencial de membrana de 0 mV las corrientes perisomáticas desaparecieran y se observen sólo corrientes salientes lentas, originadas en sinapsis sobre las dendritas. Se realizaron registros en estas condiciones, reemplazando el potasio intracelular por cesio de manera de bloquear conductancias de potasio y facilitar el trabajo a potenciales despolarizados (Hille 1992). Se detectaron así corrientes espontáneas dendríticas sobre las GCs nacidas en la adultez, así como en aquellas nacidas durante el desarrollo embrionario y postnatal temprano (**Figura 33A-C**). La naturaleza GABAérgica de estas corrientes se confirmó por el bloqueo con bicuculina (**Figura 33D**).

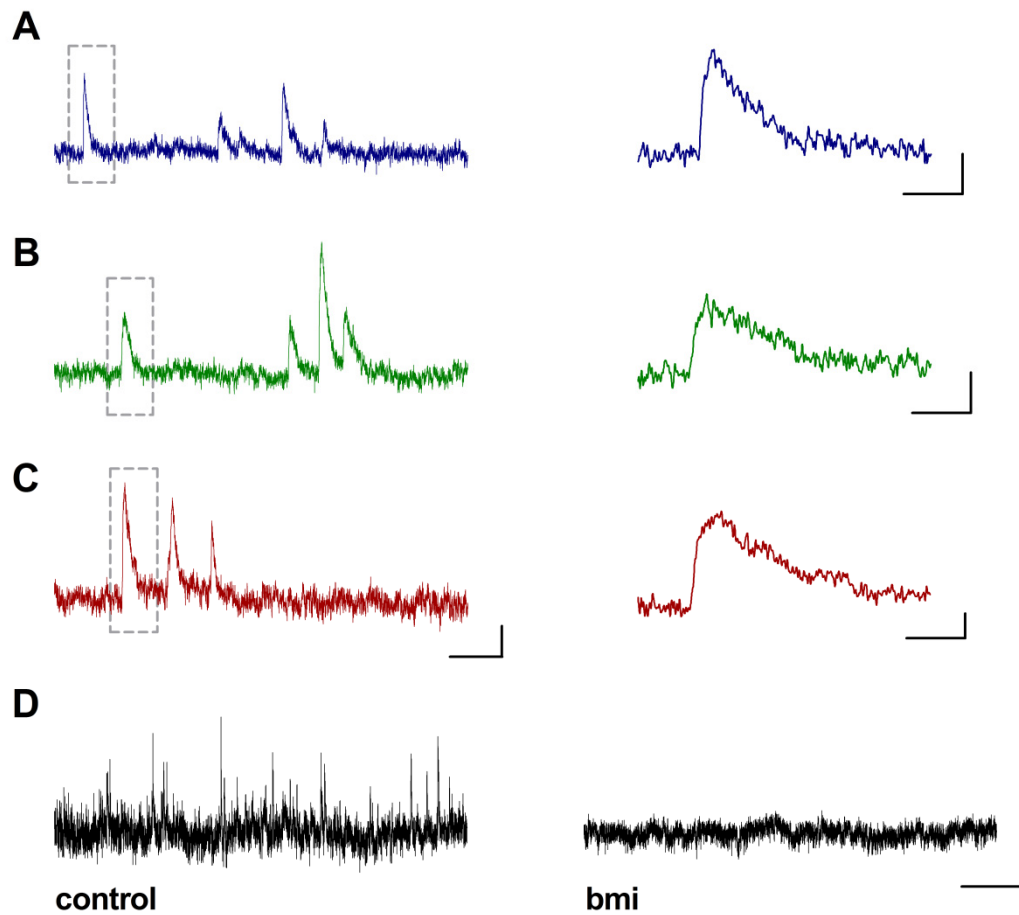


Figura 33. Actividad espontánea GABAérgica dendrítica. **A-C.** Eventos espontáneos registrados a $V_{\text{hold}} = 0$ mV en neuronas embrionarias (A), postnatales (B) y adultas (C). Los trazos en la derecha corresponden a ampliaciones de las regiones recuadradas. Escalas: 500 ms, 10 pA (izq); 50 ms, 10 pA (der). **D.** Actividad espontánea registrada como en A-C antes (izquierda) y durante (derecha) la aplicación de bmi (20 μ M, resultado representativo de 5 experimentos). Escala: 10 s, 20 pA. Experimentos realizados en presencia de ácido kynurenico (4 mM).

Se repitió para estos experimentos el mismo análisis realizado sobre los eventos registrados a $V_{\text{hold}} = -80$ mV. Ni la frecuencia ni la amplitud de estos sIPSC fue diferente entre los tres grupos de células (**Figura 34**).

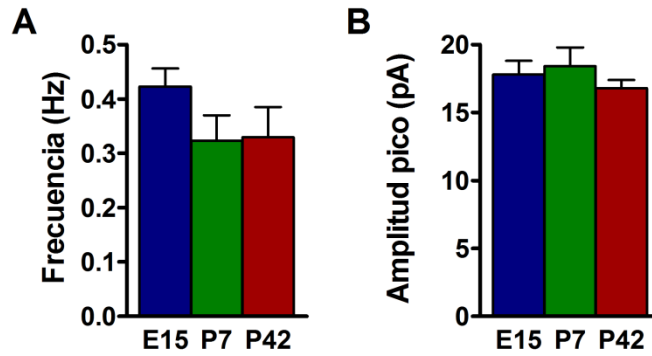


Figura 34. Frecuencia (A) y amplitud pico (B) de las corrientes espontáneas registradas a $V_{\text{hold}} = 0$ mV en neuronas embrionarias, postnatales y adultas (E15: $n = 11$, P7: $n = 10$, P42: $n = 14$). No se encontraron diferencias significativas entre los grupos de células (frecuencia: $p = 0.30$, ANOVA; amplitud: $p = 0.47$). La amplitud se comparó a partir de la amplitud promedio de los eventos de cada célula (Parte de estos registros fueron adquiridos y analizados por M. S. Espósito).

Nuevamente los eventos registrados constituyen una única población aunque de distribución más extendida (**Figura 35A**). La cinética de estas corrientes resultó por encima de un orden de magnitud más lenta que la observada en registros a -80 mV (Figura 31), con sus tiempos de crecimiento y decaimiento mayormente comprendidos entre los 4-20 ms y 10-80 ms respectivamente. La notable similitud de las cinéticas detectadas en las tres poblaciones de células se evidencia en los histogramas acumulativos de sus propiedades (Figura 35B).

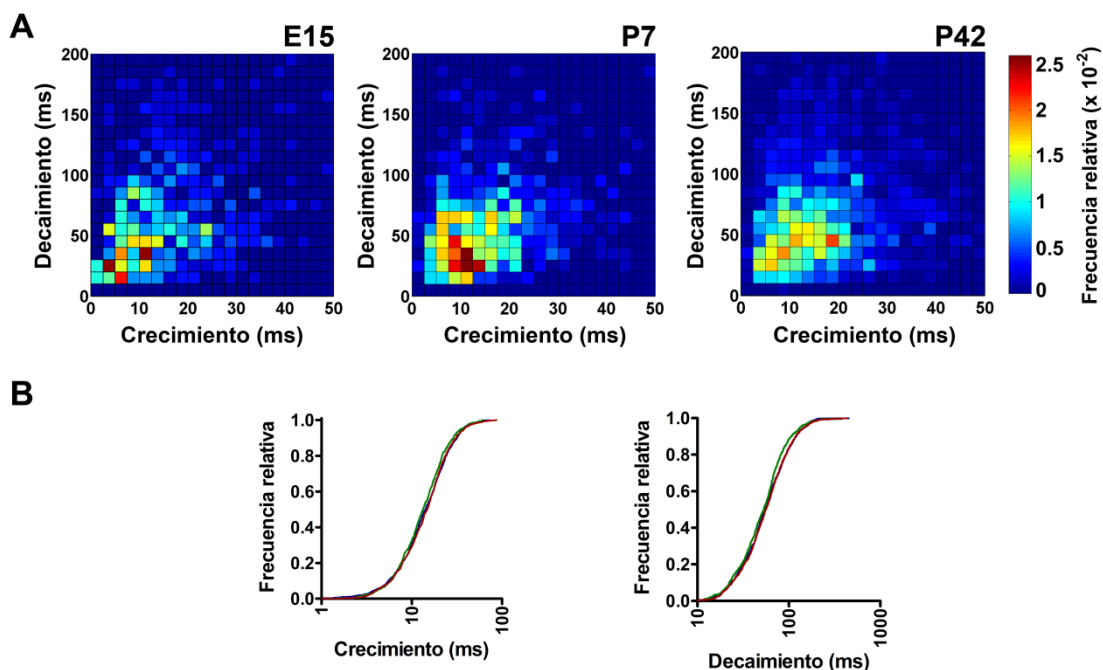


Figura 35. Cinética de los sIPSC individuales registrados a $V_{\text{hold}} = 0$ mV. **A.** Histogramas bidimensionales de tiempos de crecimiento y decaimiento para todos los eventos detectados en neuronas embrionarias, postnatales y adultas ($n = 508, 691$ y 1160 respectivamente). El tiempo de decaimiento en estos eventos corresponde a la constante temporal de un ajuste monoexponencial. **B.** Histogramas acumulativos para los mismos datos analizados en A. Las curvas para los tres grupos de células se superponen por completo (embrionario: azul, postnatal: verde, adulto: rojo).

Los trazos promedio de estas corrientes resultan a su vez totalmente superponibles (**Figura 36A**) y sus propiedades similares para los tres grupos de células granulares (**Figura 36B**).

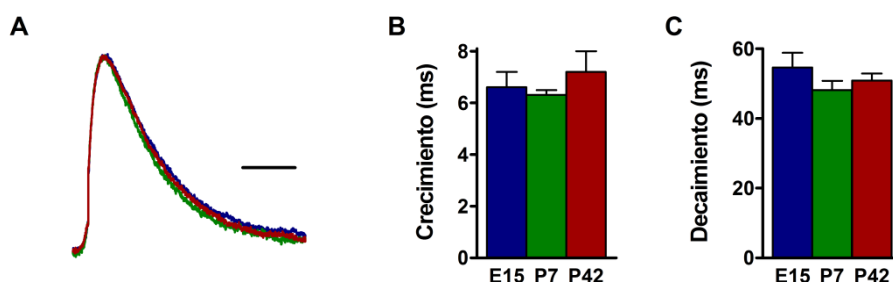


Figura 36. Cinética de los sIPSC promedio registrados a $V_{\text{hold}} = 0$ mV. **A.** Trazos obtenidos a partir de promediar los eventos promedio de todas las neuronas embrionarias (azul), postnatales (verde) y adultas (rojo) registradas. Escala: 50 ms. **B,C.** Tiempos de crecimiento (20-80%) y decaimiento (100-40%) medidos sobre los eventos promedio. No se encontraron diferencias significativas en el crecimiento ($p = 0.61$, ANOVA, $n = 11$ E15, 10 P7 y 14 P42) o el decaimiento ($p = 0.35$).

Estos resultados demuestran que las células granulares originadas por la neurogénesis adulta reciben una extensa red de aferencias inhibitorias. Se detectaron sinapsis funcionales formadas sobre al menos tres regiones: soma, dendritas proximales y dendritas distales. Se estudiaron sus propiedades mediante la estimulación de aferentes en las capas granular y molecular y el registro diferencial de actividad espontánea perisomática y dendrítica. Notablemente, para ninguna de las numerosas propiedades medidas sobre estos aferentes se observaron diferencias significativas entre las neuronas nacidas en los estadios embrionario, postnatal temprano y adulto (**Tabla 2¹**). Los resultados demuestran que una vez alcanzada su madurez las GCs nacidas en la adultez alcanzan una conectividad GABAérgica aferente indistinguible a la propia de sus pares nacidas durante el desarrollo perinatal.

¹ La **Tabla 2** está ubicada sobre el final de la primer parte de la sección Resultados.

ESTIMULACIÓN DE LAS VÍAS PERFORANTES MEDIAL Y LATERAL

Las GCs reciben tres grupos de aferentes glutamatérgicos: las vías perforantes lateral y medial (LPP y MPP), provenientes de la corteza entorrinal lateral y medial, y los axones de las células mossy del hilus ipsi- y contralateral (ver Introducción). Los mismos se disponen en forma laminar en la capa molecular del giro dentado, ubicándose la LPP y MPP en sus tercios externo y medio y las conexiones desde células mossy en su tercio interno. Este arreglo ordenado permite estimular diferencialmente las dos vías perforantes mediante el uso de electrodos extracelulares en rodajas agudas (McNaughton 1980; Abraham et al. 1984; Colino et al. 1993). La correcta localización de los electrodos puede evaluarse a posteriori por la fisiología de las respuestas evocadas.

Se estudiaron de manera cuantitativa las aferencias provenientes de las LPP y MPP sobre las neuronas nacidas durante el desarrollo postnatal temprano (P7) y la adultez (P42) realizando experimentos pareados (Figura 19) y posicionando electrodos extracelulares sobre los tercios externo y medio de la capa molecular (**Figura 37A**). Todos los estudios mostrados en esta sección se realizaron en presencia de bmi (20 μ M) de manera de aislar la transmisión glutamatérgica. En estas condiciones la aplicación de estímulos breves evoca en las GCs corrientes postsinápticas excitatorias (EPSCs) bloqueables por antagonistas de receptores AMPA (DNQX) y NMDA (AP-5), demostrando su naturaleza glutamatérgica (Figura 37B). En registros realizados a potenciales hiperpolarizados se evocan EPSCs rápidos, mediados por receptores AMPA (AMPA Rs). A potenciales despolarizados se observa también un componente lento mediado por receptores de tipo NMDA (NMDA Rs). Este componente no se observa a potenciales hiperpolarizados por el bloqueo dependiente de voltaje ejercido por iones Mg^{+} (Mayer et al. 1984; Nowak et al. 1984).

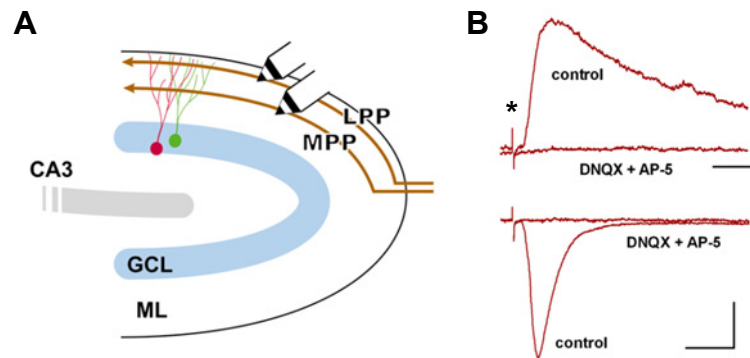


Figura 37. A. Esquema del giro dentado mostrando el recorrido de las LPP y MPP y el posicionamiento de los electrodos extracelulares para su estimulación. **B.** EPSCs evocados por la estimulación de la MPP sobre una GC nacida en el adulto registrada en *voltage clamp* a $V_{\text{hold}} = +50$ mV (arriba) y -80 mV (abajo). La aplicación de DNQX ($20 \mu\text{M}$) y AP-5 ($100 \mu\text{M}$) bloquea las corrientes. El asterisco señala el artefacto de estimulación.

Como se mencionó con anterioridad, las sinapsis formadas por axones provenientes de las LPP y MPP pueden distinguirse por su fisiología. La caracterización de estas propiedades que se encuentra en la literatura se realizó en experimentos *in vivo* (McNaughton et al. 1977; McNaughton et al. 1978) o en rodajas agudas (McNaughton 1980; Abraham et al. 1984; Colino et al. 1993) mediante registros extra- o intracelulares de las respuestas sobre células granulares. Al no distinguir entre las GCs nacidas en distintos estadios se deduce que los mismos reflejan principalmente las propiedades de sinapsis formadas sobre células nacidas durante el desarrollo perinatal, particularmente el postnatal temprano, el cual contribuye la amplia mayoría de las GCs existentes. Por lo tanto las respuestas de neuronas GFP⁺ (marcadas en P7) sirven para verificar el correcto posicionamiento de los electrodos de estimulación por comparación de las respuestas registradas con las reportadas en la literatura, mientras que los registros sobre células RFP⁺ estudian específicamente si las sinapsis formadas sobre GCs nacidas en el adulto comparten o no estas propiedades fisiológicas.

La plasticidad a corto plazo es quizás la diferencia más característica entre las sinapsis formadas por las dos vías perforantes (McNaughton 1980). Al estimular la LPP con pulsos pareados en el tiempo, el EPSC evocado por el segundo pulso presenta una amplitud promedio

superior a la del primer EPSC, un fenómeno conocido como facilitación. Por el contrario, el mismo protocolo aplicado a la MPP resulta en depresión del segundo EPSC. Se estudió esta propiedad aplicando dos estímulos separados por 100 ms (**Figura 38A**). Las neuronas nacidas en P7 respondieron con facilitación y depresión a la estimulación de la LPP y la MPP respectivamente, de acuerdo con la fisiología esperada para estas vías (Figura 38B). Las neuronas nacidas en el adulto respondieron de igual manera demostrando que esta propiedad es común a todas las GCs. Otra propiedad que distingue a la LPP de la MPP es la cinética de los EPSCs medidos desde el soma de las GCs, siendo la primera más lenta que la segunda (McNaughton et al. 1977). Esta diferencia obedecería sólo en parte al mayor filtrado dendrítico que experimentan las respuestas a la LPP en virtud de su posición distal (Abraham et al. 1984). Efectivamente, tanto en neuronas nacidas en P7 como en la adultez se observó un tiempo de crecimiento mayor en los EPSCs de la LPP y no se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos de células (Figura 38C).

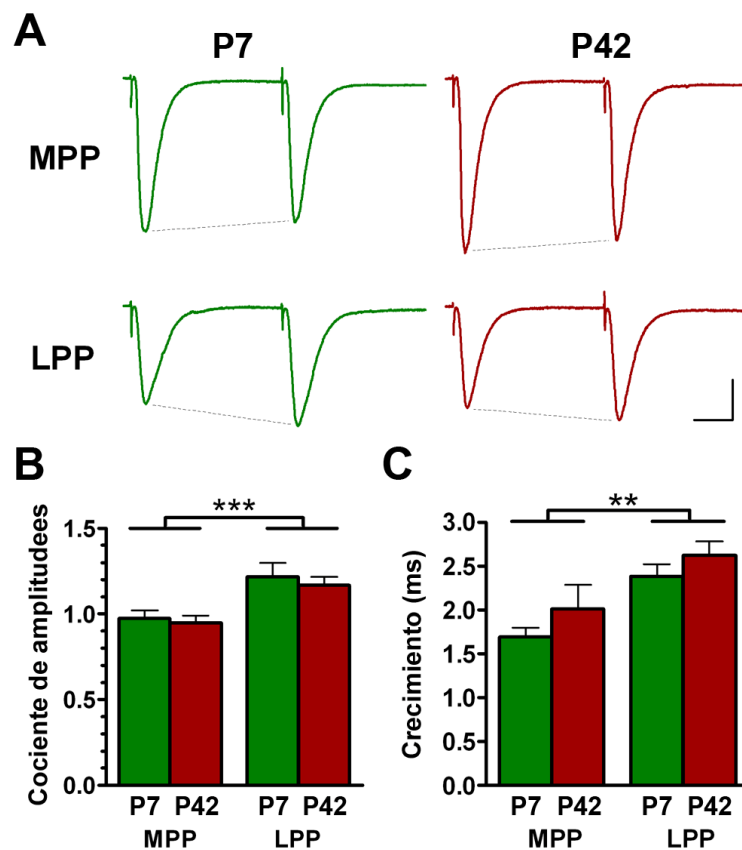


Figura 38. A. Ejemplo de un experimento pareado. Respuestas a la estimulación de las LPP y MPP con dos pulsos separados por 100 ms en una neurona postnatal y una adulta. Escalas: 25 ms, 50 pA. **B.** Cociente de la amplitud pico del segundo EPSC sobre la del primero. Un ANOVA de dos vías revela un efecto significativo de MPP vs. LPP ($p = 0.0002$, $n = 11$ a 15) pero no de postnatales vs. adultas. **C.** Tiempo de crecimiento del primer EPSC (del 20 al 80% de su amplitud). El mismo difiere significativamente entre MPP y LPP ($p = 0.0017$, ANOVA de dos vías, $n = 11$ a 15) pero no entre P7 y P42.

AMPLITUD Y PLASTICIDAD DE CORTO PLAZO

La realización de experimentos pareados permitió la comparación de la fuerza de la innervación cortical sobre los distintos grupos de células. Los resultados muestran que no existen diferencias significativas entre los dos grupos de células estudiados en la amplitud del EPSC promedio evocado por la activación de la MPP. Las neuronas nacidas en el adulto sin embargo mostraron una amplitud levemente menor a la propia de neuronas postnatales frente a la activación de la LPP (**Figura 39**).

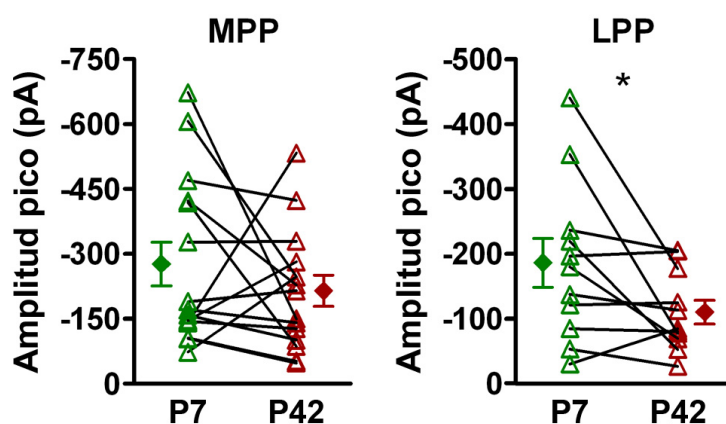


Figura 39. Amplitud del EPSC promedio medido a $V_{\text{hold}} = -80$ mV en respuesta a la estimulación de las vías perforantes medial (izquierda) y lateral (derecha). Las líneas conectan los valores del mismo experimento pareado. Se muestra a los costados la media y el error estándar de cada grupo. MPP: $p = 0.3$, $n = 15$ pares, t-test pareado; LPP: $p = 0.049$, $n = 11$ pares).

De acuerdo a lo ya mencionado y ejemplificado en la Figura 37, los EPSC medidos a potenciales hiperpolarizados reflejan principalmente la activación de AMPARs. Las sinapsis formadas por

las vías perforantes medial y lateral activan también conductancias NMDA (Colino et al. 1993). Para estudiar también la contribución de estos receptores a la fisiología de las neuronas nacidas en el adulto se realizaron mediciones de EPSCs a potenciales de membrana despolarizados. A estos potenciales las corrientes sinápticas representan una contribución mixta de ambos tipos de receptores. Sin embargo, dada la diferencia en cinética entre estos, la proporción de corriente que contribuye cada uno varía rápidamente con el tiempo posterior al estímulo (Wu et al. 1996). De hecho, midiendo a tiempos tardíos puede medirse casi exclusivamente la corriente mediada por NMDARs. Se muestra en la **Figura 40A** de qué manera se procedió a medir la contribución relativa de ambos tipos de receptores. El cociente AMPA / NMDA así medido resultó comparable entre las células nacidas en los dos estadios estudiados (Figura 40B). Cabe destacar que este resultado constituye la primera evidencia reportada de que las neuronas nacidas en el hipocampo adulto poseen receptores NMDA funcionales en sus sinapsis. Se encontró también una diferencia significativa en la relación AMPA / NMDA entre las sinapsis formadas por la MPP y la LPP, presentando las últimas una menor contribución relativa de conductancia de NMDARs (Figura 40B).

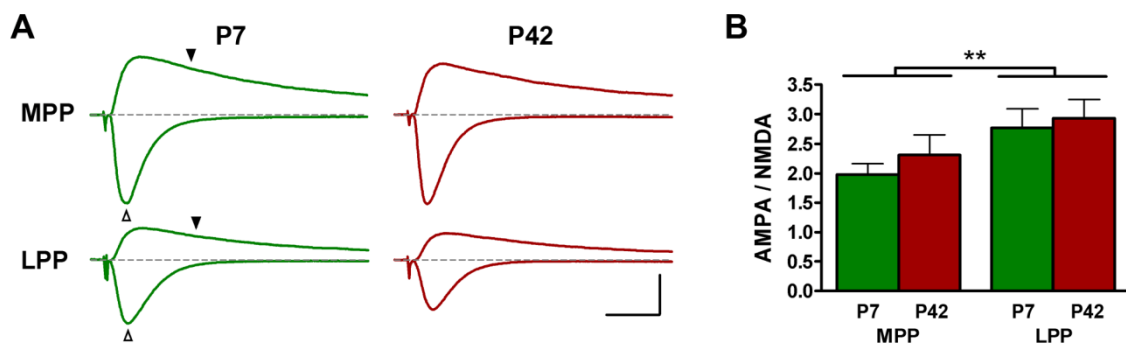


Figura 40. **A.** Ejemplo de un experimento pareado midiendo EPSCs evocados por estimulación de las MPP y LPP a potenciales hiperpolarizados ($V_{\text{hold}} = -80$ mV, trazos negativos) y despolarizados (+50 mV, trazos positivos). Los cocientes AMPA / NMDA se obtuvieron dividiendo la amplitud pico del trazo a -80 mV (flecha hueca) por la amplitud del trazo a +50 mV medida 33 ms después del artefacto de estimulación (flecha llena). A este último tiempo, la contribución de corriente AMPA a la amplitud es menor al 5%. Escalas: 20 ms, 100 pA. **B.** Cuantificación del cociente AMPA / NMDA. Un ANOVA de dos vías revela diferencias significativas entre MPP y LPP ($p = 0.006$, $n = 9$ a 13) pero no entre P7 y P42 ($p = 0.63$).

A continuación se extendió la caracterización de la plasticidad de corto plazo. El grado de facilitación o depresión por pulso pareado es función del intervalo de tiempo transcurrido entre los estímulos (Zucker et al. 2002). Se midió entonces esta propiedad para cuatro tiempos distintos: 20, 50, 100 y 500 ms (**Figura 41A**). Nuevamente, los resultados obtenidos para las dos vías axonales difieren drásticamente, con MPP mostrando depresión y LPP facilitación a tiempos cortos. A 500 ms ambas vías evidenciaron depresión del segundo EPSC (Figura 41B). Las curvas obtenidas para neuronas postnatales y adultas resultan prácticamente indistinguibles.

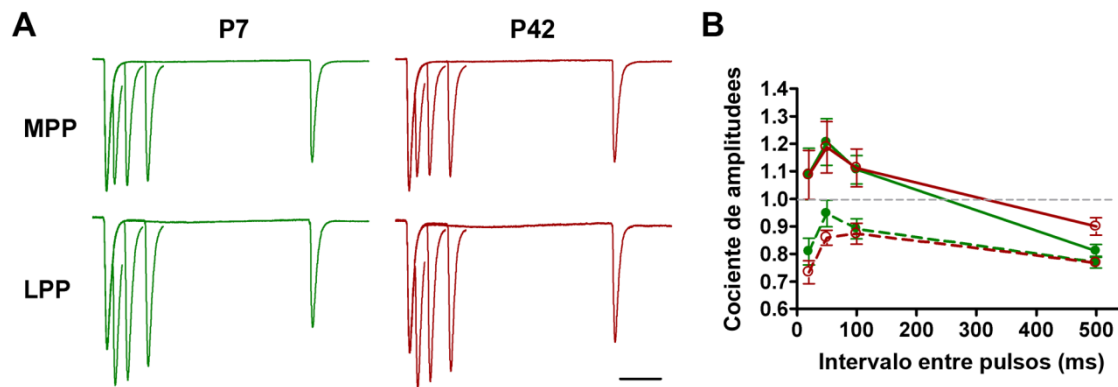


Figura 41. A. EPSCs en respuesta a la estimulación de las MPP y LPP con dos pulsos separados por 20, 50, 100 o 500 ms. Los trazos son el promedio de todos los experimentos realizados ($n = 7$ a 14 células por grupo) alineados y normalizados a la amplitud del primer EPSC. Los artefactos de estimulación y la fase de decaimiento de algunos EPSCs fueron recortados para mayor claridad. Escala: 100 ms. **B.** Cociente de la amplitud del segundo EPSC sobre la del primero en función del tiempo entre estímulos. ANOVAs de dos vías mostraron un efecto significativo de este tiempo tanto para MPP ($p < 0.0001$, líneas punteadas) como para LPP ($p < 0.0001$, líneas continuas) pero no detectaron diferencias entre P7 (verde) y P42 (rojo) en respuesta a estimulación de la MPP ($p = 0.073$) o la LPP ($p = 0.72$).

Diversos mecanismos aportan a las propiedades de la plasticidad sináptica a corto plazo. Uno de estos, la depleción de los reservorios vesiculares, puede estudiarse mediante la estimulación a alta frecuencia de las aferencias (Zucker et al. 2002). Se aplicaron trenes de 10 pulsos a 50 Hz sobre la MPP mientras se registraba en células GFP⁺ o RFP⁺ (**Figura 42A**). Este protocolo resultó en una rápida depresión de la transmisión sináptica hasta alcanzar la amplitud de los EPSCs un valor estacionario de aproximadamente el 30% de su amplitud

original (Figura 42B). Nuevamente, no se encontraron diferencias en el grado de depresión sufrido por las sinapsis sobre células nacidas en el desarrollo temprano y la adultez.

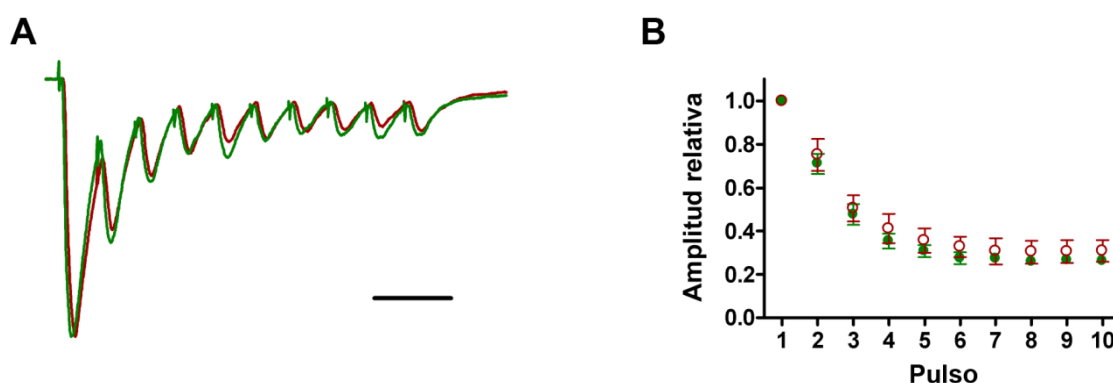


Figura 42. **A.** Ejemplo de respuestas a la aplicación de diez estímulos a la MPP a 50 Hz registradas sobre una neurona postnatal (verde) y una adulta (rojo). Los trazos están normalizados a la amplitud del primer EPSC. Escala: 40 ms. **B.** Amplitud promedio de cada EPSC relativa a la propia del primero para 10 neuronas postnatales y 4 adultas. Un ANOVA de dos vías para mediciones repetidas no reveló diferencias significativas entre ambos grupos ($p = 0.49$).

POTENCIALES DE ACCIÓN EVOCADOS POR AFERENCIAS EXCITATORIAS

Si bien era sabido que las neuronas nacidas en el hipocampo adulto recibían aferentes funcionales (van Praag et al. 2002), se desconocía si la actividad de estas sinapsis es capaz de excitarlas al punto de ocasionar el disparo de potenciales de acción. De acuerdo a los resultados ya mostrados, las GCs maduras nacidas en la primera semana postnatal y aquellas nacidas durante la adultez evidencian una gran similitud en sus propiedades fisiológicas, tanto intrínsecas como sinápticas (**Tabla 2**). En este contexto, es razonable esperar que las neuronas de ambos grupos sean reclutadas por igual por la activación de aferentes corticales. Para verificar esta posibilidad, se realizaron experimentos en los que estimuló la MPP con intensidades crecientes de corriente de manera de alcanzar amplitudes de respuestas postsinápticas suficientes para superar el umbral de disparo de potencial de acción. Estos experimentos se realizaron en configuración cell-attached, en la cual se forma un sello entre la

pipeta y la célula y se evita romper la membrana así encerrada. Esta técnica permite registrar corrientes de membrana sin afectar la composición del medio intracelular, manteniendo así inalterada la fisiología de la neurona registrada. En registros de voltage clamp así realizados los potenciales de acción se observan como corrientes capacitivas rápidas. Las GCs generadas por la neurogénesis adulta respondieron con potenciales de acción a la estimulación de la MPP, aumentando su probabilidad de disparo con la intensidad del estímulo (**Figura 43A**).

Para evaluar si estos aferentes reclutan de igual manera a todas las GCs, se realizaron registros simultáneos entre neuronas adultas y postnatales. En este experimento las neuronas adultas se marcaron con retrovirus CAG-GFP en lugar de CAG-RFP. Se consideró como neuronas postnatales a GCs no marcadas del tercio medio de la GCL. Esta población se encuentra altamente enriquecida en células nacidas durante las primeras semanas postnatales, aunque puede incorporar neuronas nacidas en otros estadios. A intensidades suficientemente bajas de estímulo, ninguna de las dos neuronas del par registrado sería activada. Por oposición, a estímulos suficientemente fuertes, ambas neuronas pueden disparar con probabilidad 1. Para poder realizar una comparación entre la probabilidad de disparo de ambos grupos, en cada experimento se buscó rápidamente una intensidad de estímulo intermedia que maximizara la diferencia entre las células. En algunos casos las neuronas postnatales se activaron con mayor probabilidad y en otros lo hicieron las adultas (Figura 43B,C). En conjunto, los experimentos muestran que ninguna población se activa preferencialmente en respuesta a la estimulación de la MPP (Figura 43D). Por lo tanto, la notable similitud en las propiedades intrínsecas y sinápticas de las neuronas nacidas en los estadios postnatal temprano y adulto dan como resultado un comportamiento equivalente frente a la actividad de sus aferentes corticales.

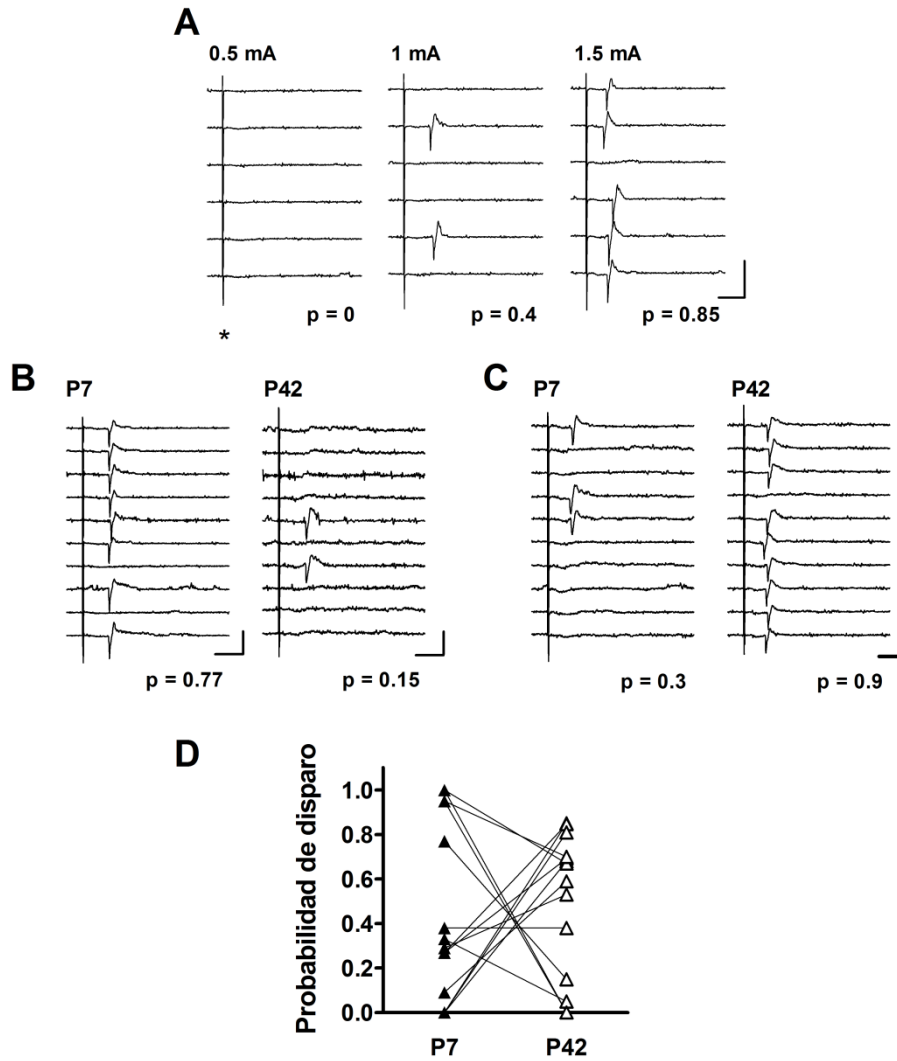


Figura 43. A. Potenciales de acción registrados en configuración cell-attached voltage clamp en una GC nacida en el adulto en respuesta a la estimulación de la MPP a intensidades crecientes (0.5 – 1.5 mA, 50 μ s). Se muestran 6 repeticiones de cada estímulo y la probabilidad de disparo correspondiente (obtenida a partir de un número mayor de repeticiones). El asterisco señala el artefacto de estimulación. Escalas: 10 ms, 50 pA. **B y C.** Ejemplos de dos registros simultáneos de una neurona postnatal y una adulta en respuesta a la estimulación de la MPP con 0.4 mA (B) o 1.5 mA (C) durante 50 μ s. En B la neurona postnatal es reclutada con mayor probabilidad mientras lo opuesto ocurre en C. Escalas: 10 ms, 50 pA (B, izq), 20 pA (B, der), 30 pA (C). **D.** Probabilidad de disparo en 14 pares ensayados como en B y C. Las líneas conectan las células de cada par. No se encontró diferencia significativa ($p = 0.8$, test no paramétrico de Wilcoxon).

	Embrionarias	Postnatales	Adultas	p-valor ⁱ	Fig ⁱⁱ	
Propiedades de Membrana						
V _{reposo} (mV)	-78.5 ± 0.9 (28)	-78.5 ± 0.9 (26)	-78.1 ± 0.7 (50)	0.94	21	
R _{entrada} (MΩ)	194 ± 22 (28)	218 ± 19 (31)	257 ± 15 (51)	0.035 ⁱⁱⁱ	20	
C _m (pF)	45.1 ± 2.5 (28)	49.4 ± 3.2 (31)	36.2 ± 1.8 (51)	0.0003 ^{iv}	20	
V _{umbral} (mV)	-38.4 ± 0.9 (15)	-39.6 ± 0.9 (13)	-39.5 ± 0.4 (31)	0.40	21	
I _{umbral} (pA)	127 ± 10 (14)	95.2 ± 7.3 (13)	84.5 ± 5.1 (31)	0.0003 ^v	21	
GCL-IPSCs						
Amplitud pico (pA)	-199 ± 42 (21)	-138 ± 30 (19)	-133 ± 17 (40)	0.20	25	
Tiempo de crecimiento (ms)	1.32 ± 0.15 (19)	1.46 ± 0.18 (22)	1.80 ± 0.22 (39)	0.26	25	
Tiempo de decaimiento (ms)	26.8 ± 2.8 (21)	39.9 ± 4.4 (22)	32.8 ± 3.2 (40)	0.07	25	
E _{GABA} temprano (mV)	-32.2 ± 3.2 (12)	-29.8 ± 1.4 (11)	-29.2 ± 1.2 (16)	Tiempo ^{vi} < .0001	Edad 0.56	26
E _{GABA} tardío (mV)	-40.3 ± 3.5 (12)	-41.8 ± 3.0 (11)	-41.6 ± 1.9 (16)			
G _{GABA} temprano (nS)	5.26 ± 0.99 (12)	4.08 ± 0.84 (11)	4.25 ± 0.63 (16)	Tiempo < .0001	Edad 0.63	26
G _{GABA} tardío (nS)	0.45 ± 0.10 (12)	0.53 ± 0.09 (11)	0.44 ± 0.08 (16)			
ML-IPSCs						
E _{GABA} (mV)	-65.4 ± 1.9 (10)	-67.5 ± 1.8 (7)	-66.4 ± 1.7 (11)	0.75	28	
G _{GABA} (nS)	1.35 ± 0.26 (11)	1.48 ± 0.54 (7)	0.94 ± 0.17 (15)	0.36	28	
Tiempo de crecimiento (ms)	7.8 ± 0.8 (12)	8.7 ± 1.2 (6)	9.0 ± 1.0 (14)	0.64	28	
Tiempo de decaimiento (ms)	83.7 ± 7.0 (12)	77.8 ± 19.5 (6)	80.0 ± 7.7 (14)	0.92	28	
sIPSCs -80 mV						
Frecuencia (Hz)	1.13 ± 0.23 (10)	1.40 ± 0.25 (12)	1.40 ± 0.14 (15)	0.60	30	
Amplitud pico (pA)	-50.4 ± 3.9 (10)	-43.5 ± 3.9 (12)	-40.0 ± 2.5 (15)	0.11	30	
Tiempo de crecimiento (ms)	0.34 ± 0.03 (10)	0.39 ± 0.03 (12)	0.39 ± 0.02 (15)	0.28	32	
Tiempo de decaimiento (ms)	12.0 ± 0.6 (10)	13.4 ± 1.2 (12)	13.8 ± 0.6 (15)	0.27	32	
sIPSCs 0 mV						
Frecuencia (Hz)	0.42 ± 0.03 (11)	0.32 ± 0.05 (10)	0.33 ± 0.05 (16)	0.30	34	
Amplitud pico (pA)	17.8 ± 1.0 (11)	18.4 ± 1.4 (10)	16.8 ± 0.6 (14)	0.47	34	
Tiempo de crecimiento (ms)	6.6 ± 0.6 (11)	6.3 ± 0.2 (10)	7.2 ± 0.8 (14)	0.61	36	
Tiempo de decaimiento (ms)	54.6 ± 4.2 (11)	48.1 ± 2.7 (10)	50.9 ± 2.0 (14)	0.35	36	

	Embrionarias	Postnatales	Adultas	p-valor ⁱ	Fig ⁱⁱ
EPSCs					
Amplitud pico MPP (pA)		-276 ± 50 (15)	-213 ± 35 (15)	0.30	39
Amplitud pico LPP (pA)		-186 ± 37 (11)	-110 ± 18 (11)	0.049	39
Relación pulso pareado MPP		0.98 ± 0.04 (13)	0.95 ± 0.04 (13)	Vía ^{vii}	38
Relación pulso pareado LPP		1.22 ± 0.08 (11)	1.17 ± 0.05 (11)	0.0002 Edad	
Tiempo de crecimiento MPP (ms)		1.7 ± 0.1 (15)	2.0 ± 0.3 (15)	Vía	38
Tiempo de crecimiento LPP (ms)		2.4 ± 0.1 (11)	2.6 ± 0.2 (11)	0.0017 Edad	
Tiempo de decaimiento MPP (ms)		8.9 ± 0.4 (15)	9.8 ± 0.5 (15)	Vía	38
Tiempo de decaimiento LPP (ms)		10.7 ± 0.7 (11)	10.3 ± 0.4 (11)	0.026 Edad	
AMPA / NMDA MPP		1.98 ± 0.18 (13)	2.31 ± 0.34 (7)	Vía	40
AMPA / NMDA LPP		2.77 ± 0.32 (10)	2.93 ± 0.32 (10)	0.0058 Edad	40

Tabla 2. Análisis estadístico de propiedades medidas en células granulares embrionarias, postnatales y adultas. Se indica la media y el error estándar con el número de células de cada grupo entre paréntesis. No se midieron propiedades de EPSCs en células embrionarias. No se incluyen en esta tabla los resultados obtenidos para los EPSCs por pulsos pareados de longitud variable y depleción por pulsos a 50 Hz. V_{reposo} , potencial de reposo; R_{entrada} , resistencia de entrada; C_m , capacitancia; V_{umbral} , potencial de umbral de potencial de acción; I_{umbral} , corriente de umbral para potencial de acción; E_{GABA} , potencial de reversión del IPSC; G_{GABA} , conductancia del IPSC.

ⁱ Cuando se reporta un único p-valor, este corresponde a un ANOVA de una vía de embrionarias vs. postnatales vs. adultas o a un t-test pareado cuando la propiedad no se midió en el grupo embrionario. Cuando se realizó ANOVA de dos vías se reportan los efectos de fila y columna. Si en ANOVAs de una vía se obtuvo $p < 0.05$, se realizaron pruebas post-hoc de Bonferroni para comparar todos los pares y se reportan aquellas pruebas post-hoc con $p < 0.05$.

ⁱⁱ Número de figura en que se ilustra cada propiedad.

ⁱⁱⁱ Pruebas post-hoc: embrionarias vs. adultas, $p < 0.05$.

^{iv} Pruebas post-hoc: embrionarias vs. adultas, $p < 0.05$; postnatales vs. adultas, $p < 0.001$.

^v Pruebas post-hoc: embrionarias vs. postnatales, $p < 0.05$; embrionarias vs. adultas, $p < 0.001$.

^{vi} 'Tiempo' y 'Edad' reportan el p-valor de los efectos fila (temprano vs. tardío) y columna (embrionarias vs. postnatales vs. adultas).

^{vii} 'Vía' y 'Edad' reportan el p-valor de los efectos fila (MPP vs. LPP) y columna (embrionarias vs. postnatales vs. adultas).

PARTE SEGUNDA

CONEXIONES EFERENTES DE LAS GCS NACIDAS EN EL ADULTO

DISEÑO EXPERIMENTAL

La pregunta acerca de si las neuronas generadas por la neurogénesis adulta son capaces de integrarse funcionalmente a circuitos comenzó a contestarse cuando el marcado retroviral permitió comprobar que las mismas recibían sinapsis funcionales (van Praag et al. 2002). El trabajo descrito hasta el momento en la presente tesis extiende esta caracterización demostrando que estas neuronas reciben de hecho una compleja red de conexiones excitatorias e inhibitorias, alcanzando una conectividad aferente prácticamente indistinguible a la de sus pares generadas por la neurogénesis embrionaria y postnatal temprana. Sin embargo no se puede concluir que una neurona participa activamente de un circuito si se desconoce su capacidad de formar conexiones eferentes con células blanco, pues sólo así su presencia puede influir eficazmente en la actividad de la red en la que se inserta. La respuesta a esta pregunta resultó más esquiva, por las dificultades técnicas que plantea su resolución. Se observó que las GCs nacidas en la adultez extienden axones a través del hilus hacia la región CA3 del hipocampo (Markakis et al. 1999; Zhao et al. 2006). Si bien esto es condición necesaria para el correcto establecimiento de conexiones eferentes, no permite conocer si estos axones forman sinapsis funcionales, ni caracterizar sus propiedades. Desde un enfoque electrofisiológico, el experimento canónico para demostrar esta propiedad consiste en el establecimiento de registros simultáneos entre una neurona adulta y un blanco postsináptico. Las probabilidades de encontrar pares conectados serían en teoría desalentadoramente bajas de acuerdo a los conocimientos previos sobre el circuito del giro dentado. Como se mencionó en la introducción, estudios anatómicos sugieren que cada GC contacta sólo una mínima fracción de sus posibles células blanco. Cada célula granular contactaría en el orden de 15 células piramidales en CA3, un 0,005% de las mismas, de manera que cada célula piramidal

recibiría contactos de 50 GCs (Amaral et al. 1990). Cada fibra mossy formaría también ~10 sinapsis con células mossy y más de 100 con interneuronas del giro dentado (Claiborne et al. 1986; Acsady et al. 1998). Dado que estos dos tipos celulares se encuentran en bajos números, más GCs convergirían sobre éstas que sobre células piramidales. La posibilidad de encontrar pares de neuronas conectadas se vería afectada también por el corte de axones durante la preparación de rebanadas agudas de cerebro. Frente a esta situación se razonó que de poder estimular simultáneamente altos números de neuronas nacidas en la adultez de manera específica, se podrían multiplicar las probabilidades de detectar respuestas postsinápticas en neuronas del hipocampo. Sin embargo las propiedades electrofisiológicas de esta población de neuronas, siendo tan similares a las propias del común de las GCs, no sugirieron una manera de lograr esta activación selectiva. Para lograr este objetivo era necesario entonces modificar de alguna manera específica sus propiedades, objetivo para el cual la técnica de marcado retroviral se ofrecía por demás versátil.

La idea primaria que se concibió proponía la modificación del genoma retroviral por técnicas de ingeniería genética, de manera de que la progenie de las células infectadas expresara un receptor excitatorio activable por ligando. Para permitir contestar la pregunta, este ligando no debía tener efecto sobre las células normales del hipocampo de ratón. En estas condiciones se proponía realizar registros en neuronas ya descritas como blanco posible de las fibras mossy y aplicar sobre la rebanada el ligando de manera de ocasionar el disparo de potenciales de acción en las GCs adultas infectadas y observar así señales postsinápticas en la célula registrada.

En el año 2005, dos grupos reportaron el uso exitoso de la proteína Channelrhodopsin-2 (ChR2) para controlar el disparo de potenciales de acción en neuronas (Boyden et al. 2005; Li et al. 2005). El gen de ChR2, clonado del alga verde unicelular *Chlamydomonas reinhardtii*, codifica para un canal catiónico cuya apertura es comandada por luz azul (**Figura 44**). Esta

propiedad es provista por la unión covalente del cofactor retinal, el cual se isomeriza y cambia su conformación al ser iluminado. En neuronas que expresan ChR2 entonces, la iluminación con luz azul induce una corriente despolarizante (Figura 44B) capaz de ocasionar el disparo de potenciales de acción (Figura 44C).

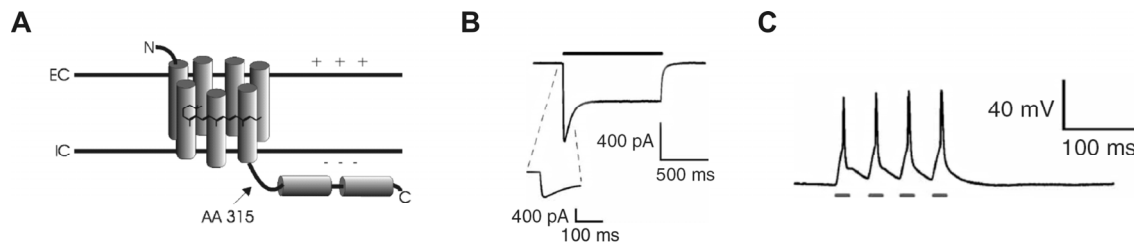


Figura 44. **A.** Visión esquemática de la estructura de ChR2. Se observa el extremo N-terminal en el lado extracelular (EC) de la membrana y el C-terminal en el intracelular (IC) y la presencia de una molécula de retinal. Se indica la posición del aminoácido 315, a partir del cual se reemplazó el extremo C-terminal de la proteína por un monómero de GFP (Reproducido de Nagel et al. 2003). **B.** Corriente de membrana en una neurona de un cultivo primario de hipocampo expresando ChR2. La barra negra indica la iluminación sostenida con luz azul. Nótese el componente rápido de alta amplitud que decae a un estado estacionario. **C.** Potenciales de acción en respuesta a la estimulación con 4 pulsos de 15 ms de luz azul en una neurona ChR2⁺ (B y C reproducidos de Boyden et al. 2005).

El uso de ChR2 conlleva una importante ventaja sobre la idea original de un canal activable por ligando de naturaleza química pues permite controlar el disparo de un potencial de acción con precisión de milisegundos. La aplicación global de moléculas de ligando sobre la rodaja hubiera resultado en una actividad desincronizada y difusa en el tiempo, dificultando el análisis de eventuales respuestas postsinápticas.

CONSTRUCCIÓN DE RETROVIRUS PARA EL ESTUDIO DE LAS CONEXIONES EFERENTES

Se consiguió una construcción conteniendo el gen de ChR2 fusionado en su extremo C-terminal con el de EGFP (Li et al. 2005), por gentileza del Dr. Stefan Herlitze, Case Western Reserve University, Cleveland, OH, EEUU. Se produjeron nueve variantes del genoma retroviral

incorporando el gen de ChR2 (**Figura 45** y ver Métodos). De las mismas, tres se usaron para producir partículas retrovirales, a dos de las cuales se demostró su funcionalidad en GCs infectadas.

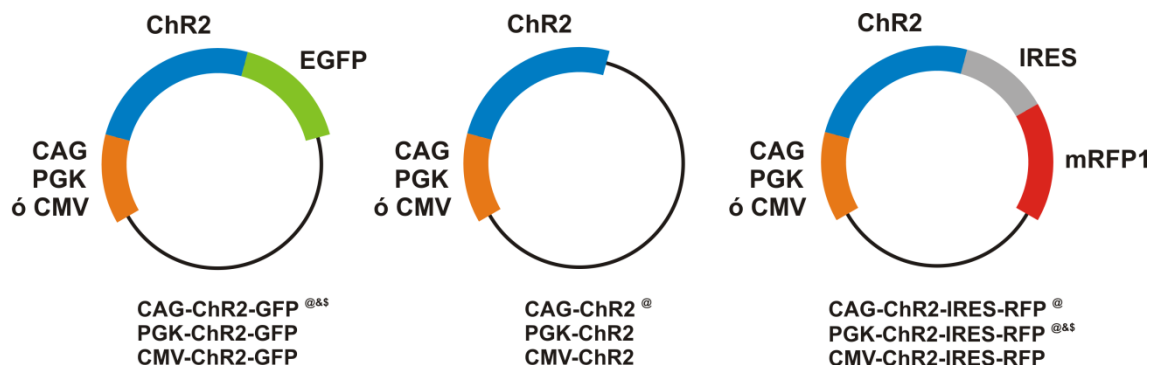


Figura 45. Genomas retrovirales contruidos para la expresión de ChR2. Se construyeron 9 versiones, con las combinaciones de 3 insertos (ChR2-GFP, ChR2 y ChR2-IRES-RFP) y 3 promotores (CAG, PGK y CMV). Los plásmidos para los cuales se comprobó expresión funcional de ChR2 por transfección de células en cultivo se indican con “@”. Aquellos para los cuales se produjo partículas virales y se comprobó la expresión funcional de ChR2 en células granulares en rebanadas se indican con “&”. Por último aquellos con los que se observaron respuestas postsinápticas se indican con “\$”.

El primer genoma en construirse fue el CAG-ChR2-GFP. Para ensayar si la remoción del dominio GFP aumentaba la expresión y/o función del canal se construyeron las variantes CAG-ChR2 y CAG-ChR2-IRES-RFP. A su vez, la variante con RFP permite observar la fluorescencia en células ChR2⁺ sin activar sustancialmente al canal, dado el menor solapamiento de sus curvas de excitación. Por último para reducir el tamaño del genoma viral en busca de mejorar su título se ensayó reemplazar el promotor CAG por los promotores PGK y CMV, de menos de un tercio de longitud.

Para verificar la expresión funcional de estas construcciones se transfectaron células HEK 293 en cultivo. Los plásmidos conteniendo el genoma retroviral transfectados en células de mamífero no solo transcriben el genoma mismo sino que también expresan su transgen bajo el control de su promotor CAG, PGK o CMV. 24 a 48 horas post-transfección se observó la presencia del canal en la membrana por microscopía de fluorescencia (**Figura 46A**) y se evaluó

su función con registros de whole-cell patch clamp en configuración voltage clamp. La aplicación de pulsos de luz azul produjo en las células transfectadas corrientes de gran amplitud (Figura 46B), de perfil temporal similar al descrito para ChR2 en este y otros sistemas (comparar con la Figura 44B).

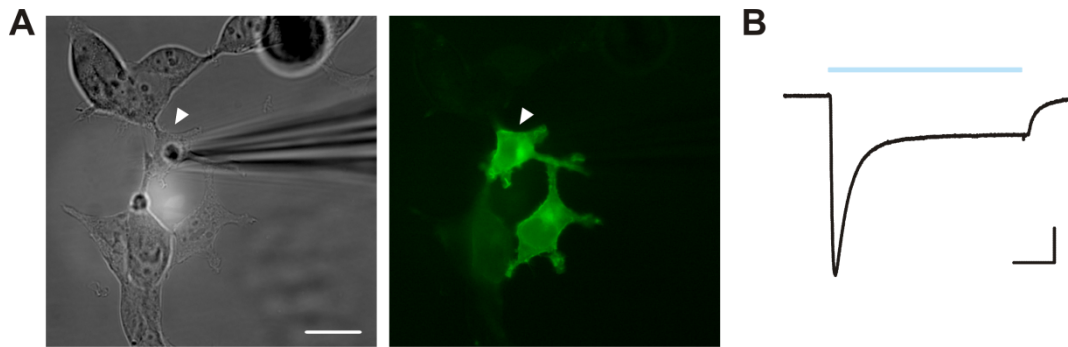


Figura 46. Actividad de ChR2 en células transfectadas. **A.** Microscopía de células HEK 293 transfectadas con CAG-ChR2-GFP. Se observa en el infrarrojo (izquierda) la pipeta de patch y en la fluorescencia (derecha) la expresión de ChR2-GFP en la membrana de la célula registrada y otras. Escala: 40 μm . **B.** Corriente de membrana en una célula ChR2⁺ durante la aplicación de un pulso de luz azul de 500 ms (barra azul). Escala: 100 ms, 200 pA.

De esta manera se verificó la correcta función del canal expresado en las cuatro construcciones indicadas en la Figura 45. El plásmido CAG-ChR2 se cotransfectó con una construcción CAG-RFP pues esta variante no incluye una proteína fluorescente que permita la identificación de las células ChR2⁺. La actividad del canal en células HEK 293 ya fue caracterizada de manera detallada (Nagel et al. 2003; Li et al. 2005) por lo que no se profundizó más en este sistema. Sí se caracterizó extensivamente la función de ChR2 en células granulares infectadas por la inyección de retrovirus en el giro dentado de ratones adultos, como se describe a continuación.

RESPUESTA A LA LUZ EN CÉLULAS GRANULARES QUE EXPRESAN CHANNELRHODOPSIN-2

Se ensayaron tres de las construcciones obtenidas inyectando retrovirus en ratones: CAG-ChR2-GFP, PGK-ChR2-IRES-RFP y CAG-ChR2. Esta última se inyectó junto con virus CAG-RFP para intentar salvar su carencia de proteína fluorescente. Sin embargo nunca se pudo detectar actividad del canal en las células RFP⁺, posiblemente por ser baja la probabilidad de coinfección con dos retrovirus, y se decidió abandonar su caracterización. Como se verá, las otras dos construcciones resultaron funcionales. La respuesta a la luz de células granulares ChR2⁺, descrita en esta sección, se caracterizó principalmente en células infectadas con virus CAG-ChR2-GFP.

Las células infectadas con virus ChR2 se diferencian correctamente a neuronas, presentando una morfología y fisiología típicas de células granulares (**Figura 47**). Las propiedades pasivas de estas células no resultaron diferentes a las obtenidas para GCs infectadas con virus CAG-RFP, confirmando su correcta maduración (potencial de reposo: $-80.6 \text{ mV} \pm 1.0 \text{ mV}$, $n = 38$; resistencia de membrana: $254 \pm 14 \text{ M}\Omega$, $n = 42$; capacitancia: $42 \pm 2 \text{ pF}$, $n = 42$; comparar con **Tabla 2**).

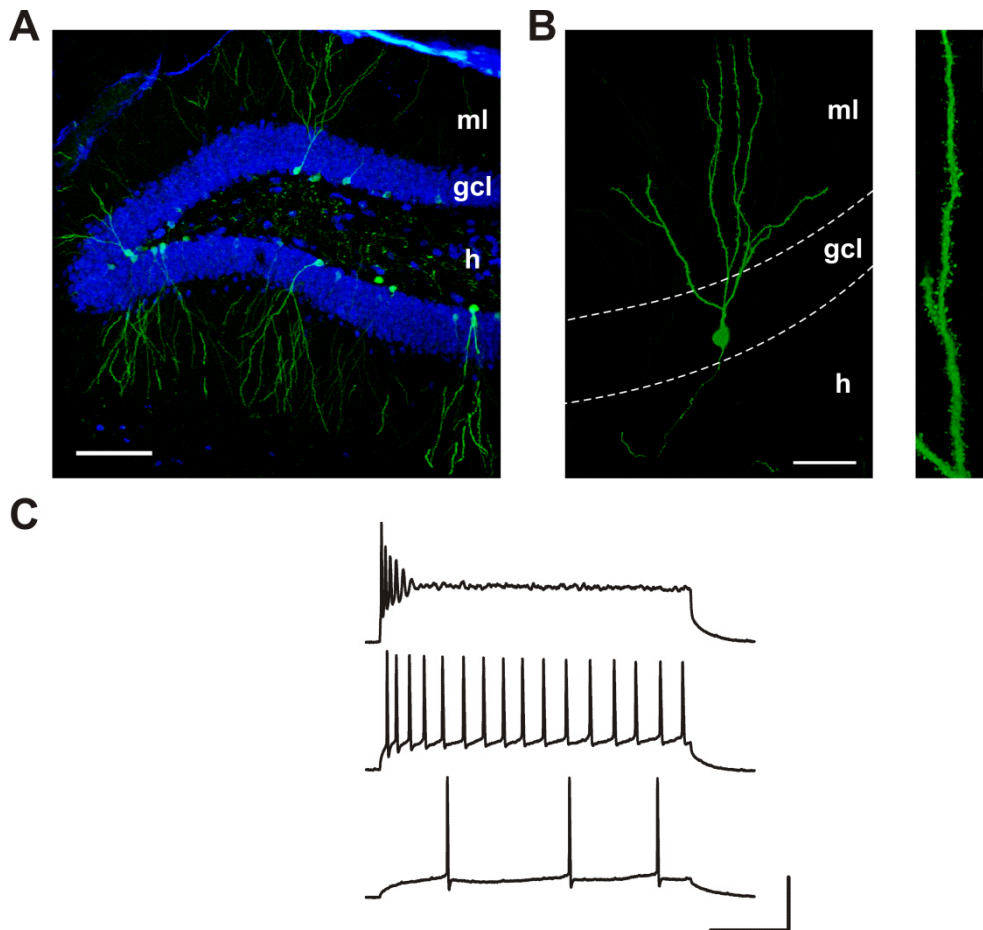


Figura 47. A. Giro dentado 30 días después de la inyección de retrovirus CAG-ChR2-GFP. Se observan neuronas ChR2⁺ (verde). B. Detalle de una GC ChR2⁺ de 16,3 semanas post inyección (izquierda) y espinas sobre una dendrita (15,7 semanas, derecha). Las imágenes corresponden a superposiciones de 25 (A), 37 (B, izq) y 101 (C, der) planos confocales tomados de rebanadas de 40 μ m. Las rebanadas fueron reveladas por inmunohistoquímica contra GFP (verde) y el marcador neuronal NeuN (azul). Cabe destacar que la señal propia de GFP, sin inmunohistoquímica, resulta poco más que imperceptible. Escalas: 100 μ m (A), 30 μ m (B, izq) y 10 μ m (B, der). C. Potenciales de acción en una célula granular de 12,7 semanas post inyección en respuesta a pulsos depolarizantes de 50, 150 y 400 pA de corriente. Se observaron patrones de potenciales de acción típicos de células granulares, como su fuerte adaptación en frecuencia y amplitud (n=14). Escala: 50 ms, 50 mV (G. Lombardi participó en la producción de partículas retrovirales y realizó la inmunohistoquímica y microscopía en esta figura).

Las células granulares ChR2⁺ respondieron a la aplicación de pulsos de luz azul con corrientes de curso temporal similar al observado en los experimentos en cultivo y en la literatura (**Figura 48A**). La cuantificación de la amplitud pico de esta corriente en GCs de distintas semanas post inyección evidenció un aumento gradual de la misma durante la maduración de las células (**Figura 48B**).

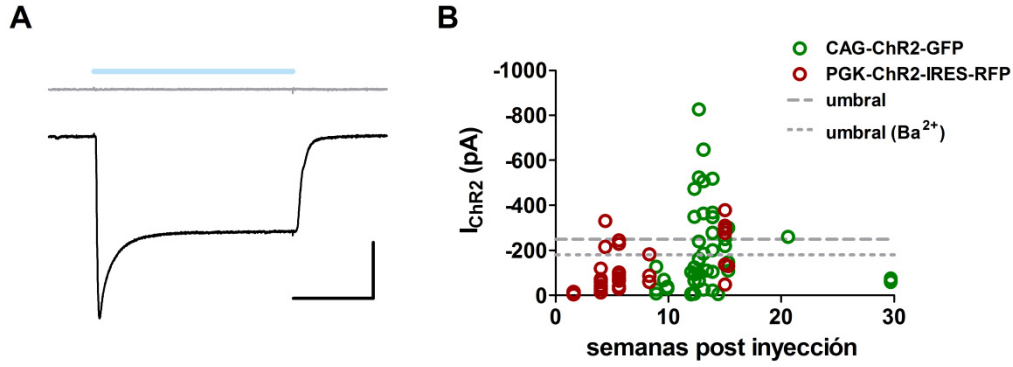


Figura 48. Corrientes mediadas por ChR2 en células granulares. **A.** Corriente de membrana en una GC ChR2⁺ de 13,1 semanas post inyección (trazo negro) y en una GC control no infectada (trazo gris) durante la aplicación de un pulso de luz azul (barra azul). Escala: 200 ms, 200 pA. **B.** Amplitud pico de la corriente inducida por luz en 81 GC de distintas semanas post inyección infectadas con CAG-ChR2-GFP o PGK-ChR2-IRES-RFP. En las células con amplitudes superiores a las líneas de puntos la aplicación de luz evocó el disparo de potenciales de acción. El efecto de la aplicación de Ba^{2+} se discute más adelante.

Para que el diseño experimental propuesto resultara exitoso era fundamental que la conductancia activada por luz fuera suficiente para evocar el disparo de potenciales de acción en las células ChR2⁺. Este fue el caso en una subpoblación de las GCs infectadas (**Figura 49**). Los potenciales de acción se pudieron detectar en registros en configuración cell attached, sin perturbar el medio intracelular (Figura 49A) y en whole-cell (Figura 49B). Se observó una relación directa entre el nivel de conductancia ChR2 de cada célula, evidenciada por la amplitud de corriente evocada por luz, y su capacidad de responder con potenciales de acción al estímulo. Como se observa en la Figura 48B, la proporción de GCs con conductancia suficiente para activarse por estímulos lumínicos crece con sus semanas de desarrollo y hacia las 12 semanas post inyección un número importante de células caen dentro de esta categoría.

Se caracterizó la respuesta de las células ChR2⁺ a pulsos de luz de distintas duraciones (2,5 a 25 ms) para evaluar cuál de estas sería conveniente utilizar para activar a las GCs en los experimentos de búsqueda de conexiones funcionales. En todas las células con respuestas supraumbral, el pulso de 10 ms resultó suficiente para evocar potenciales de acción (Figura 49C, arriba). Incrementar la duración del pulso de luz a 25 ms aumentó la proporción de

células que responden con más de un potencial de acción, una propiedad no deseada para la caracterización de las conexiones. La latencia media de los potenciales no mostró dependencia con la duración del estímulo (Figura 49C, medio). La variabilidad de esta latencia en cambio fue sensiblemente menor para pulsos de 10 ms que para aquellos de 5 ms (Figura 49C, abajo). Dado que la condición ideal para el estudio de corrientes postsinápticas es evocar de manera confiable un potencial de acción único de latencia precisa se escogió la duración de 10 ms para el estímulo lumínico.

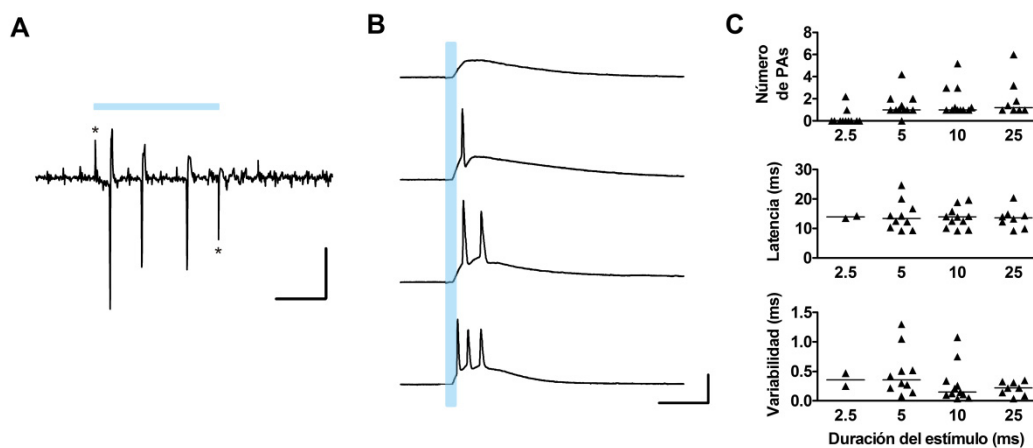


Figura 49. Disparo de potenciales de acción (PAs) en células granulares ChR2⁺. **A.** Registro en configuración cell-attached de una GC ChR2⁺ de 13,1 semanas post inyección durante la aplicación de un pulso de luz azul. Se observan tres PAs. Los asteriscos señalan artefactos eléctricos producidos por la apertura y cierre del obturador. Escala: 40 ms, 10 pA. **B.** Respuestas de voltaje evocadas en registros de whole-cell current clamp por pulsos de luz de 10 ms en GCs con distintos niveles de expresión de ChR2. Escala: 40 ms, 50 mV. **C.** Propiedades de los PAs en neuronas con respuestas supraumbrales. Arriba: número de PAs promedio evocados por pulsos de distinta duración. Medio: latencia promedio de los PAs medida como el tiempo transcurrido entre el comienzo del pulso de luz y el pico del PA. Abajo: desvío estándar de esta latencia. Cada punto representa un valor de una célula. Las líneas indican la mediana. Las barras gruesas indican el pulso de luz.

Las conexiones formadas por las fibras mossy presentan una rica variedad de propiedades plásticas dependientes de la frecuencia de disparo presináptica (Pelkey et al. 2008). Para conocer mejor los alcances y limitaciones del sistema desarrollado se evaluó la capacidad de las células ChR2⁺ de responder con potenciales de acción a trenes de estímulos lumínicos de distinta frecuencia (**Figura 50**). Se observó que la mayoría de las células con respuestas

de expresión de ChR2 intermedios dispararon potenciales de acción en respuesta a luz sólo después de la aplicación de BaCl₂. El Ba²⁺ actúa entonces disminuyendo el umbral de corriente ChR2 necesaria para el disparo de potencial de acción por luz (ver Figura 48B). La mayoría de los experimentos sobre las conexiones eferentes de las células granulares adultas se realizó entonces en presencia de BaCl₂ (200 µM) para aumentar las probabilidades de hallar neuronas postsinápticas conectadas con las células estimuladas.

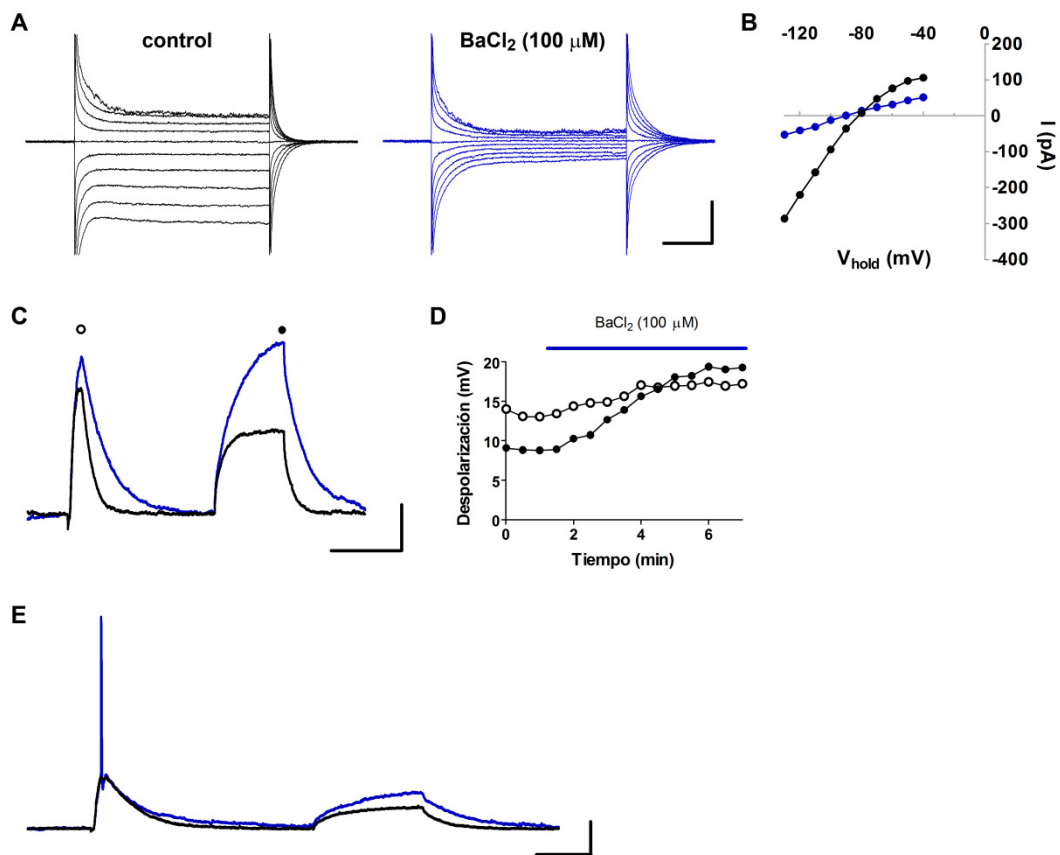


Figura 51. Efecto del Ba²⁺ en la excitabilidad de las células granulares. **A.** Corriente total de membrana al aplicar escalones de voltaje de -50 a 40 mV a partir de un $V_{\text{hold}} = -80$ mV en presencia de 0 (izq) o 100 µM (der) de BaCl₂. Las corrientes capacitivas se recortaron para mayor claridad. Experimento realizado en una GC ChR2⁺ de 12,7 semanas post inyección. Escala: 25 ms, 150 pA. **B.** Curvas I-V obtenidas a partir de los trazos mostrados en A (negro: control, azul: BaCl₂). Nótese la linealidad de la curva con Ba²⁺. Se observó un comportamiento similar en otros dos experimentos. **C.** Trazos promedio de registros en configuración current clamp en los que se aplicó un pulso de luz de 25 ms (círculo blanco), seguido por un escalón de corriente de 20 pA (círculo negro) en presencia (azul) o ausencia (negro) de BaCl₂ 100 µM. En presencia de Ba²⁺ aumenta la amplitud y constante temporal de las respuestas. Misma célula que en A y B. Escala: 200 ms, 5 mV. **D.** Curso temporal del efecto de Ba²⁺. Se midió la amplitud pico de las despolarizaciones evocadas por luz o corriente en los tiempos señalizados en C. La barra azul indica la aplicación de BaCl₂ en la solución externa. **E.** Ejemplo de otra GC ChR2⁺ de la misma edad en la que la aplicación de BaCl₂ (300 µM) transformó la respuesta a la luz de sub a supraumbral. Este efecto se observó en 3 de 8 células. Escala: 100 ms, 20 mV.

El retinal, cofactor necesario para la función de ChR2, es un derivado del retinol o vitamina A. Esta vitamina o sus precursores deben incorporarse necesariamente por dieta. Se decidió entonces suplementar la alimentación de los ratones con un complejo multivitamínico de manera de asegurar la suficiente disponibilidad de precursores y permitir así la correcta expresión de canales ChR2 funcionales. El suplemento se administró en las dosis diarias recomendadas. Si bien no se realizaron experimentos cuantitativos para determinar la eficacia de este tratamiento, la probabilidad de éxito de los experimentos aumentó notablemente en ratones suplementados, sugiriendo un efecto positivo en los niveles de expresión funcional de ChR2. Se incluyó a su vez trans-retinal (1 μ M) en la ACSF usada en las cámaras de incubación de rebanadas y registro. Si bien ensayos preliminares no demostraron un efecto de la aplicación de este compuesto en la amplitud de las corrientes por ChR2, se optó por mantener esta condición en la mayoría de los experimentos realizados para asegurar la saturación de cofactor en los canales expresados. Por último, los experimentos se realizaron en tiempos post inyección prolongados ($14,9 \pm 2,9$ semanas; rango: 8,6 a 20,6) en virtud de la mayor expresión de ChR2 observada en estas edades.

CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE CONEXIONES EFERENTES DE GCS NACIDAS EN EL ADULTO

CLASIFICACIÓN DE LAS NEURONAS REGISTRADAS

Para investigar las eferencias de las células granulares adultas se realizaron registros sobre posibles neuronas postsinápticas en el giro dentado y la región CA3. Como se describió en la introducción, las fibras mossy contactan neuronas que pueden clasificarse en tres grandes poblaciones: interneuronas, células mossy y células piramidales. Si bien existe cierta segregación espacial entre de estas poblaciones, esta no es completa por lo que fue necesario

establecer criterios para la correcta identificación del tipo celular de cada neurona registrada. Para ese fin se consideraron múltiples parámetros incluyendo localización de su cuerpo celular, morfología, propiedades de sus potenciales de acción y actividad sináptica espontánea. Se destacan a continuación las propiedades observadas en nuestras preparaciones para cada tipo neuronal.

Interneuronas. Este grupo comprende una amplia variedad de neuronas, las cuales liberan GABA en sus terminales (Freund et al. 1996). Las interneuronas pueden distinguirse claramente de las neuronas excitatorias por las propiedades de sus potenciales de acción: hiperpolarizaciones (*afterhyperpolarizations*, AHP) de gran amplitud, cinética rápida y alta frecuencia de disparo (**Figura 52 y Tabla 3**) (Scharfman 1992; Mott et al. 1997). El soma de estas neuronas puede encontrarse en la capa granular, generalmente sobre su límite con el hilus, en el hilus mismo o en distintos estratos de CA3. No se registraron interneuronas en CA3. La morfología de estas células presenta una alta variabilidad, correspondiente a los distintos subtipos celulares. Se observan tanto formas bipolares (ejemplo en la Figura 53A) como multipolares (ejemplo en la Figura 54A) en referencia a la disposición de sus dendritas principales. La única distinción interna en este grupo se hizo de acuerdo a la ubicación de su soma en la capa granular (ejemplo en Figura 54E) o el hilus (ejemplo en Figura 55D). Las dendritas a su vez se presentan generalmente desprovistas de espinas (Scharfman 1992).

Células mossy. Estas neuronas excitatorias ubican su cuerpo celular en el hilus y no es posible distinguirlas de las interneuronas vecinas por observación al microscopio infrarrojo (Ratzliff et al. 2004). La observación de su morfología tras el llenado intracelular con colorantes evidencia sin embargo la presencia de gran cantidad de espinas en sus dendritas y en particular de las llamadas “thorny excrescences”, especializaciones dendríticas de gran tamaño donde forman sinapsis las fibras mossy. Las dendritas de estas células están mayormente confinadas al hilus, donde recorren largas distancias (Amaral 1978; Scharfman 1992). Los potenciales de acción en

estas células se presentan en baja frecuencia, con AHPs ausentes o de muy baja amplitud y con cinética lenta (**Figura 52 y Tabla 3**) (Scharfman et al. 1988; Scharfman 1995). La baja amplitud de su AHP es el único parámetro que distingue sus potenciales de acción de los propios de células piramidales en nuestros experimentos. La característica fisiológica que mejor distingue a las células mossy de las piramidales es la presencia de actividad espontánea de muy alta frecuencia y amplitud, proveniente de sinapsis formadas por fibras mossy (como se observa en la Figura 61B) (Scharfman 1993; Ishizuka et al. 1998).

Células piramidales. Estas neuronas constituyen el blanco canónico de las fibras mossy y definen con la posición de sus somas la capa piramidal del hipocampo. Presentan una morfología bipolar, con un árbol dendrítico apical y uno basal. Las dendritas presentan espinas y “thorny excrescences”. Para sus potenciales de acción se observaron propiedades similares a las propias de las células mossy aunque, como se mencionó, se observó una mayor amplitud de AHP (**Figura 52 y Tabla 3**).

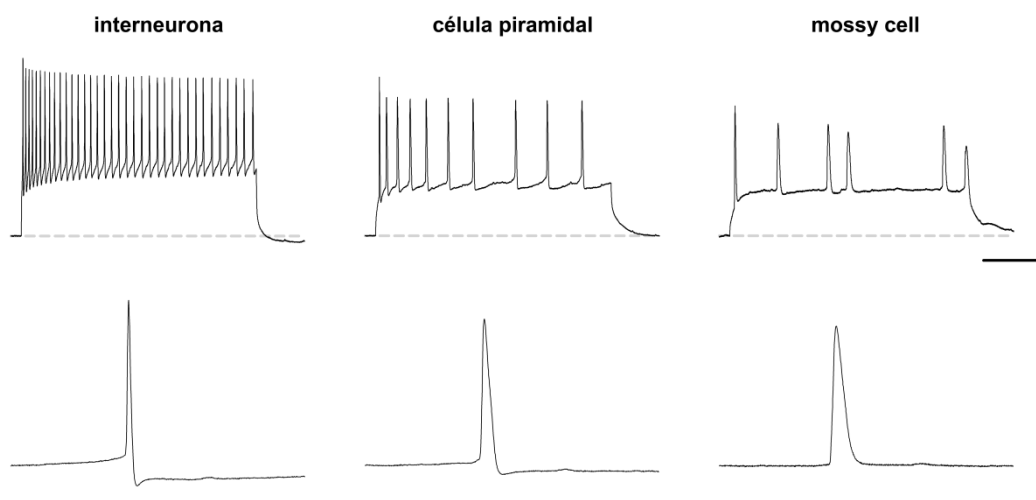


Figura 52. Potenciales de acción típicos en una interneurona de la capa granular, una célula piramidal de CA3 y una célula mossy. Los trazos superiores se obtuvieron en respuesta a escalones de corriente de 750, 400 y 350 pA (de izquierda a derecha) y representan la máxima frecuencia alcanzada por cada célula (90, 25 y 15 Hz). Los trazos inferiores muestran en detalle potenciales de acción evocados por escalones de corriente de 50, 100 y 100 pA. Escalas: 100 ms, 40 mV (arriba) y 10 ms, 40 mV (abajo).

	Interneuronas	Piramidales	Mossy	p-valor ^a	int - pir ^b	int - mos ^b	pir - mos ^b
amplitud (mV) ^c	80.8 ± 1.9	82.4 ± 5.5	70.9 ± 2.6	0.024	ns	< 0.05	ns
amplitud de AHP (mV) ^d	17.5 ± 1.0	8.7 ± 1.4	3.7 ± 0.6	< 0.0001	< 0.001	< 0.001	< 0.05
pendiente máx. (mV/ms) ^e	228.9 ± 11.2	163.9 ± 25.4	119.8 ± 12.7	< 0.0001	< 0.05	< 0.001	ns
ancho medio (ms) ^f	0.81 ± 0.06	1.50 ± 0.07	1.97 ± 0.20	< 0.0001	< 0.001	< 0.001	ns
frecuencia máx. (Hz) ^g	74.0 ± 6.8	24.3 ± 5.2	25.9 ± 4.4	< 0.0001	< 0.001	< 0.001	ns

Tabla 3. Propiedades de los potenciales de acción de interneuronas (n=20), células piramidales (n=7) y células mossy (n=10).

^a p-valor de ANOVA de una vía.

^b p-valor de pruebas post-hoc de Tukey entre pares de columnas.

^c Amplitud pico de potenciales de acción medida desde el voltaje de umbral. Se consideró como umbral al valor en el cual la primer derivada temporal del voltaje difiere de la línea de base precedente por más de dos desvíos estándar (Atherton et al. 2005).

^d Amplitud pico del AHP medida desde el voltaje de umbral.

^e Máxima derivada temporal del voltaje en la fase de crecimiento del potencial de acción.

^f Ancho del potencial de acción a la mitad de la amplitud medida en c.

^g Frecuencia máxima de potenciales de acción en respuesta a escalones de corriente despolarizante de 400 ms y 0 a 800 pA.

SINAPSIS FUNCIONALES SOBRE INTERNEURONAS

Estudiaremos en primer lugar los resultados obtenidos sobre interneuronas. Dos características de estas células las hacen particularmente atractivas para encontrar conexiones funcionales desde células granulares: 1) numéricamente constituyen el principal blanco de las fibras mossy (Acsady et al. 1998) y 2) dada la proximidad física entre los cuerpos de las GC y las interneuronas, es de esperar que estas conexiones cortas se mantengan intactas luego de la preparación de rebanadas agudas.

De un total de 76 experimentos realizados sobre interneuronas, se observaron corrientes postsinápticas evocadas por luz en 11 de ellas. La **Figura 53** muestra resultados sobre una interneurona en la que se detectaron claramente corrientes postsinápticas (PSCs) evocadas por luz. Esta neurona presenta una morfología bipolar, con su soma ubicado en el borde la capa granular con el hilus y en la cercanía de numerosas células granulares ChR2⁺, las cuales envían sus axones hacia la zona ocupada por ésta (Figura 53A). Su fisiología es propia de

interneuronas, con potenciales de acción rápidos y de gran AHP (Figura 53B). La estimulación de la rebanada con un pulso prolongado de luz azul ocasiona una ráfaga de respuestas postsinápticas, sugiriendo que células granulares ChR2^+ forman sinapsis funcionales con la célula registrada (Figura 53C). Para caracterizar mejor estas conexiones se estimuló con pulsos cortos de luz (10 ms) administrados a baja frecuencia (0,2 Hz). De acuerdo a la caracterización previa de las células granulares ChR2^+ se espera que este protocolo evoque un potencial de acción en éstas en respuesta a cada pulso de luz, ocasionando la liberación de neurotransmisor en sus terminales y la observación en consecuencia de PSCs sincronizados con el estímulo. En efecto, los pulsos de luz evocaron consistentemente PSCs en una ventana de tiempo acotada (Figura 53D). El promediado de decenas de repeticiones evidenció una corriente postsináptica de dos componentes: uno temprano de cinética rápida y uno más tardío y lento (Figura 53E). El bloqueo del paso de luz de excitación anuló el PSC, confirmando que esta señal correspondía a una respuesta a la activación por luz de células ChR2^+ (Figura 53E, trazo gris). Los trazos individuales muestran que los pulsos de luz evocan PSCs de dos latencias distintas. Estos PSCs pueden presentarse simultáneamente en algunos trazos mientras que en otros se observan fallas de alguno de los dos de manera independiente. Esto sugiere que los pulsos de luz evocaban potenciales de acción a dos tiempos distintos. Estos podían provenir de células distintas con distintos niveles de expresión de ChR2 , o en cambio de células individuales en las que el pulso de luz evocaba más de un potencial de acción (Figura 49). Como se discutirá más adelante, los resultados apoyan la segunda posibilidad. La probabilidad de falla del primer PSC fue de 0,36, sugiriendo que las corrientes observadas provenían de sinapsis formadas desde una o muy pocas células ChR2 .

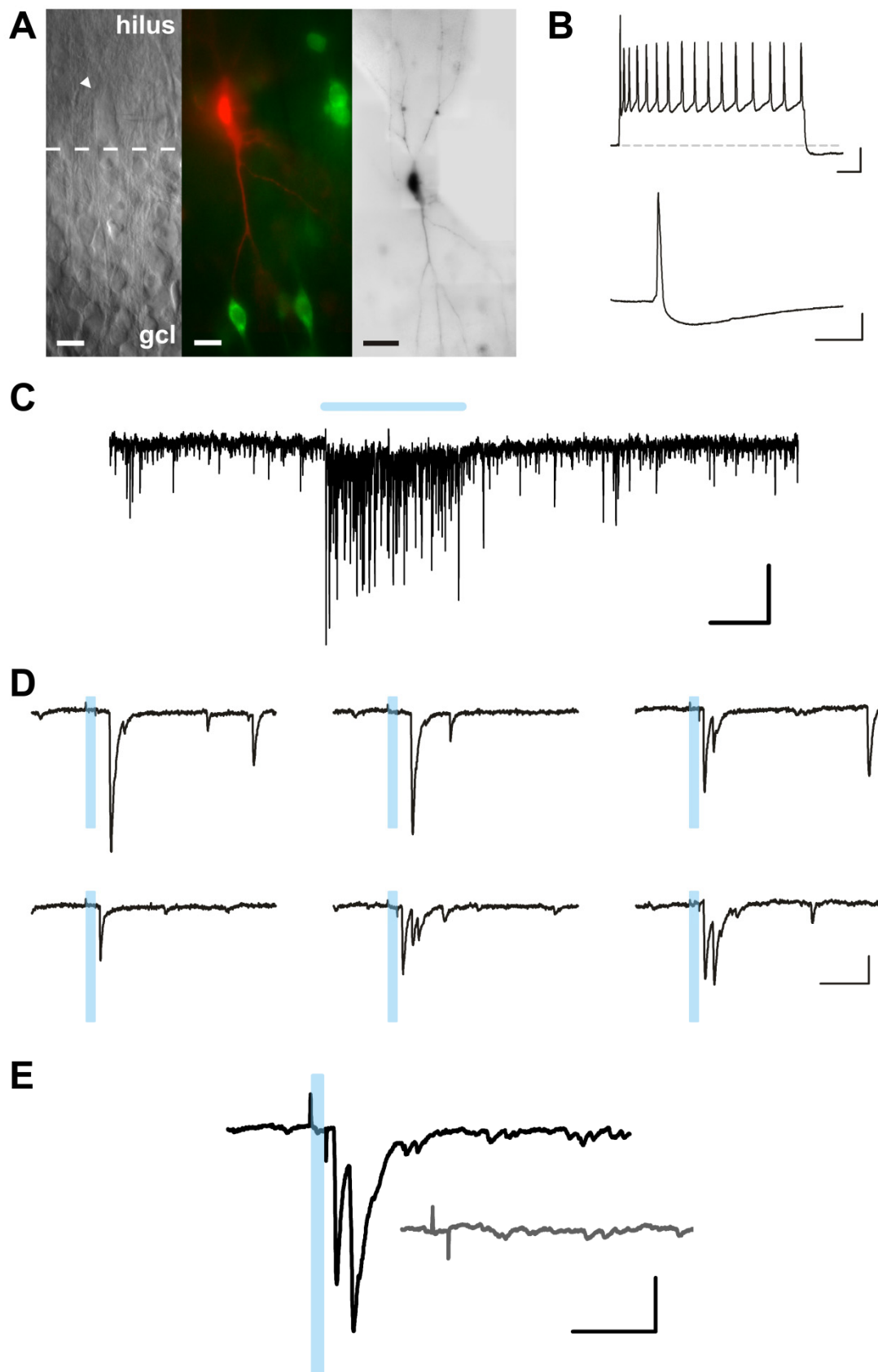


Figura 53. Corrientes postsinápticas evocadas por luz en una interneurona del borde entre la capa granular y el hilus. **A.** Izquierda: Microscopía infrarroja de la neurona registrada (flecha). La línea de puntos separa la GCL del hilus. Escala: 20 μm . Medio: Composición mostrando la neurona registrada llenada con Alexa Fluor 543 (rojo) y GCs ChR2-GFP⁺ (verde) en la vecindad. Escala: 20 μm . Derecha: Reconstrucción de la morfología de la neurona llenada con colorante. Se observa una morfología bipolar, con neuritas que se extienden hacia la GCL y el hilus. Escala: 50 μm . **B.** Arriba: Tren de potenciales de acción (40 Hz) evocado por un escalón de corriente despolarizante de 750 pA. Escala: 50 ms, 20 mV. Abajo: Potencial de acción evocado por un pulso de corriente de 50 pA. Nótese el pronunciado AHP. Escala: 20 ms, 20 mV. **C.** Registro de voltage clamp de actividad sináptica durante la aplicación de un pulso sostenido de luz de 5 segundos indicado por la barra azul. Se observa un aumento sustancial en la frecuencia y amplitud de eventos. Escala: 2 seg, 30 pA. **D.** Ejemplos de corrientes postsinápticas (PSCs) evocadas por pulsos de luz de 10 ms (barras azules) aplicados a baja frecuencia (0,2 Hz). Escala: 50 ms, 50 pA. **E.** Promedio de 45 presentaciones del estímulo lumínico. Latencia al comienzo del PSC: 15,2 ms. Probabilidad de falla del primer pico: 0,36. El trazo gris corresponde al promedio de 38 repeticiones realizadas mientras se bloqueaba el camino de la luz de excitación. Nótese la ausencia de PSC. Escala: 50 ms, 20 pA. Este experimento se realizó 15,6 semanas después de la inyección retroviral.

La **Figura 54** muestra los resultados obtenidos sobre otras 4 interneuronas, una ubicada en el hilus y tres en la capa granular. Como se discutirá más adelante las propiedades de estas corrientes (latencia corta y de poca variabilidad), al igual que las mostradas en la Figura 53, sugieren que corresponden a conexiones monosinápticas desde células granulares ChR2⁺.

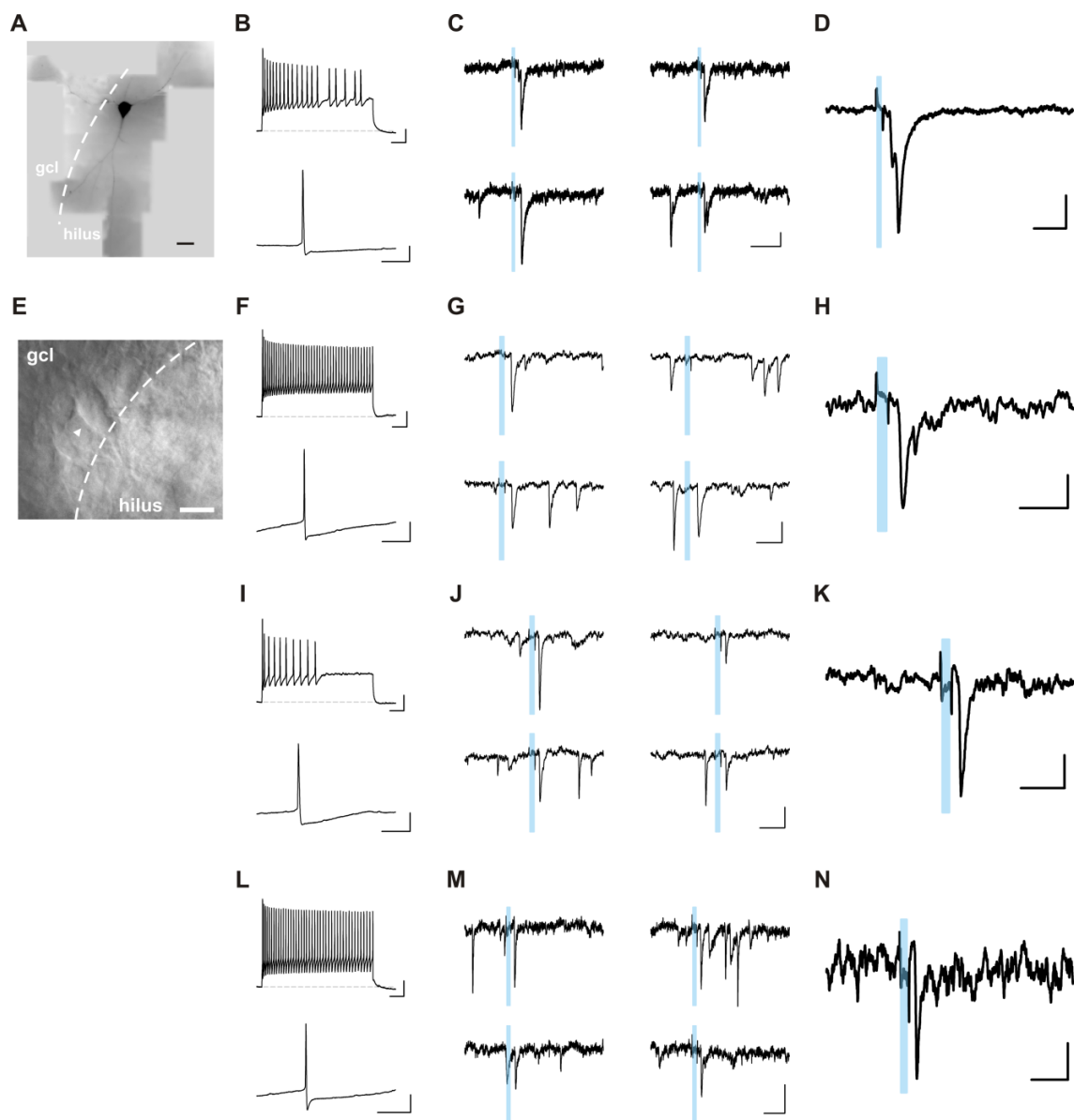


Figura 54. Corrientes postsinápticas evocadas por luz en cuatro interneuronas. Los resultados corresponden a una interneurona del hilus (A-D) y tres de la capa granular (E-H, I-K y L-N). **A.** Reconstrucción de la morfología de la célula registrada tras el llenado con fluoróforo. Se observa una morfología multipolar, con tres dendritas principales extendiéndose por el hilus y una hacia la capa granular (gcl). Escala: 50 μ m. **E.** Microscopía infrarroja de la interneurona de la capa granular (flecha) cuyos resultados se muestran en F-H. La línea de puntos divide la capa granular del hilus. Escala: 20 μ m. **B, F, I, L.** Potenciales de acción de las células estudiadas en respuesta a inyección de corriente despolarizante. Los trazos superiores representan la máxima frecuencia de disparo observada (B: frecuencia 50 Hz, corriente inyectada 700 pA; F: 110 Hz, 800 pA; I: 25 Hz, 500 pA; L: 107,5 Hz, 800 pA. Escalas: 50 ms, 20 mV). Los trazos inferiores muestran el detalle de un potencial de acción inducido por baja intensidad de corriente (50 pA, 100 pA, 100 pA y 150 pA respectivamente. Escalas: 20 ms, 20 mV). **C, G, J, M.** Trazos ejemplo de corrientes postsinápticas individuales en respuesta a pulsos de luz de 10 ms (barras azules). Se observan también eventos espontáneos no relacionados con la estimulación. Se incluyó en G un ejemplo de falla en la transmisión sináptica. Escalas: 100 ms, 10 pA (C); 40 ms, 40 pA (G); 40 ms, 20 pA (J); 40 ms, 20 pA (M). **D, H, K, N.** Trazos promedio de las corrientes evocadas por luz. D: promedio de 179 repeticiones a 1 Hz, probabilidad de falla del primer pico 0,56, latencia al comienzo del pulso 21,9 ms. H: 200 repeticiones a 1 Hz, probabilidad de falla 0,63, latencia 19,2 ms. K: 500 repeticiones a 4 Hz, probabilidad de falla 0,58, latencia 17,4 ms. N: 178 repeticiones a 1 Hz, latencia 17,5 ms, no se calculó probabilidad de falla (La reconstrucción de la morfología en A se realizó en colaboración con M. Trinchero).

En los cinco experimentos mostrados hasta el momento las corrientes postsinápticas pueden identificarse claramente en los trazos individuales como eventos de considerable amplitud y buena sincronización con el estímulo. En otras células registradas, sin embargo, la presencia de actividad sináptica evocada por luz sólo se hizo evidente al promediar cientos de repeticiones del estímulo. De esta manera la actividad sináptica espontánea se cancela por estar distribuida de manera aleatoria en el tiempo y sólo se observan en el trazo promedio aquellas señales que guardan correlación temporal con el estímulo. En la **Figura 55** se muestran dos de estos casos, obtenidos en una interneurona de la capa granular y una del hilus. No es posible en estos casos identificar inequívocamente aquellas corrientes evocadas por los pulsos de luz en los trazos individuales. El promediado de decenas de estos sin embargo resulta en una corriente tardía de cinética lenta posterior al estímulo (Figura 55C,F). El curso temporal de estas corrientes promedio podría reflejar una cinética lenta de las corrientes sinápticas individuales. Alternativamente, las corrientes individuales podrían ser de cinética rápida pero de latencia variable. Los resultados no permiten distinguir entre estas posibilidades.

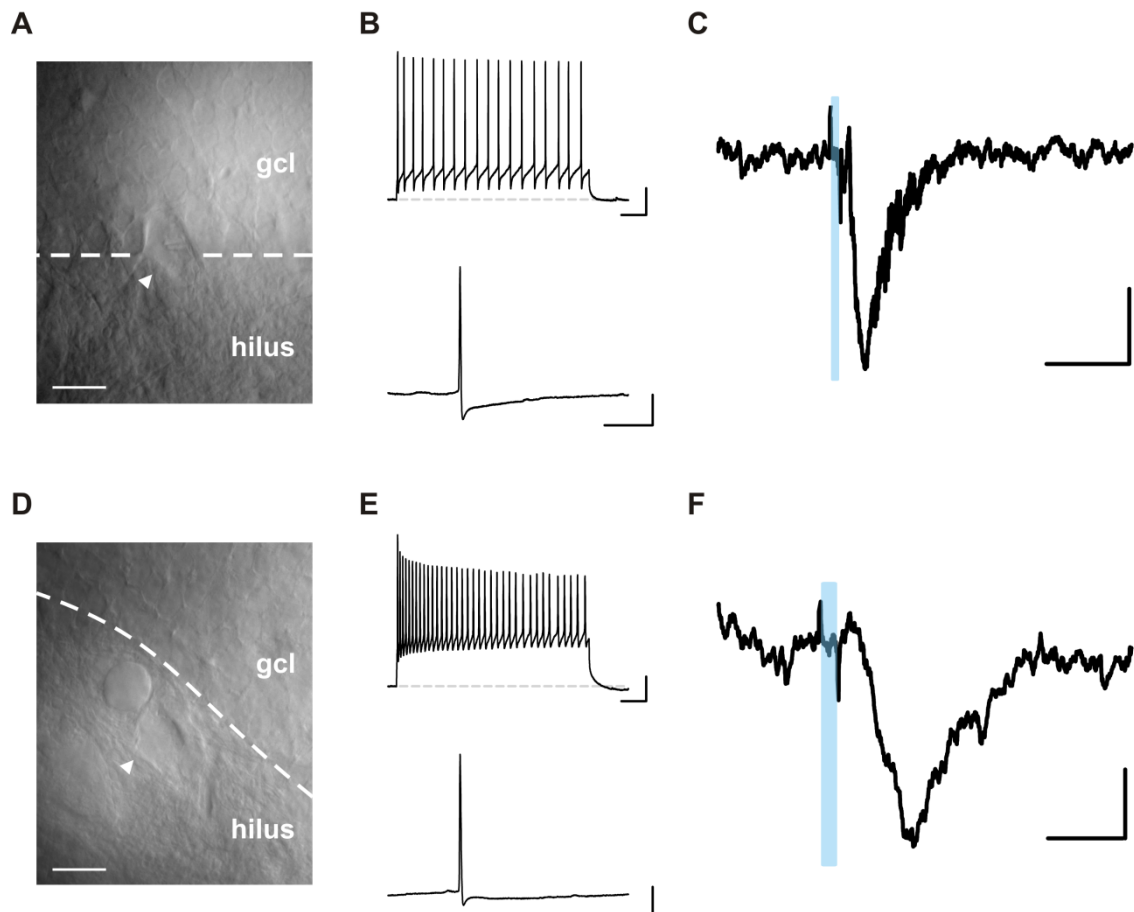


Figura 55. Corrientes postinápticas sobre una interneurona de la capa granular (A-C) y una del hilus (D-F). **A.** Microscopía infrarroja de la célula registrada mostrando la ubicación de su soma en el borde de la capa granular y el hilus. La línea punteada se interrumpió por claridad. Escala: 30 μm . **B.** Potenciales de acción inducidos por inyección de corriente despolarizante. Arriba: 45 Hz en respuesta a 400 pA, el máximo de corriente aplicada a esta célula. Escala: 50 ms 20 mV. Abajo: detalle de potencial de acción en respuesta a 200 pA. Escala: 20 ms, 20 mV. **C.** Promedio de 100 respuestas a pulsos de luz de 10 ms aplicados a 1 Hz. Latencia: 20,0 ms. Escala: 80 ms, 3 pA. **D.** Microscopía infrarroja de la célula registrada mostrando la ubicación de su soma en el hilus. Escala: 30 μm . **E.** Potenciales de acción en respuesta a 800 pA (arriba, 90 Hz, escala 50 ms, 20 mV) y 50 pA (abajo, escala 20 ms, 20 mV). **F.** Promedio de 80 respuestas a pulsos de luz de 10 ms aplicados a 1 Hz. Latencia: 25,6 ms. Escala: 40 ms, 3 pA. Nótese que los trazos en C y F se muestran a distinta escala temporal.

ANÁLISIS FARMACOLÓGICO DE LAS CORRIENTES EVOCADAS POR LUZ SOBRE INTERNEURONAS

Los resultados mostrados hasta el momento demuestran que las células granulares nacidas durante la adultez forman sinapsis funcionales con neuronas blanco, pues la activación de las primeras resulta en la apertura de conductancias sinápticas en las segundas. Como se señaló ya en la introducción, las fibras mossy liberan normalmente glutamato como neurotransmisor rápido pero algunas evidencias sugieren la posibilidad que las mismas puedan liberar también GABA, estando este fenotipo regulado por la edad del animal y la actividad del circuito (Gutierrez 2000; Walker et al. 2001; Gutierrez et al. 2003). Conocer la identidad del o de los neurotransmisores liberados por las GCs adultas resulta fundamental para comprender el aporte funcional de las mismas al circuito hipocampal pues la liberación de glutamato o GABA sobre neuronas maduras tiene efectos opuestos sobre su actividad.

Para contestar esta pregunta se realizaron experimentos de bloqueo farmacológico de las corrientes sinápticas evocadas por luz. La interpretación del efecto de bloqueantes de glutamato o GABA sobre las mismas no es sin embargo trivial. La **Figura 56** esquematiza algunos escenarios posibles del efecto de bloqueantes sobre corrientes de origen mono o polisináptico. El caso más simple ocurre si la neurona registrada recibe una conexión directa desde una GC ChR2⁺. En este caso se observan corrientes monosinápticas, las cuales serán bloqueadas por kyn (y no por bmi) o por bmi (y no por kyn) según sean glutamatérgicas o GABAérgicas (Figura 56A,B). Alternativamente, las corrientes registradas pueden ser de origen polisináptico. Esto ocurre cuando la estimulación de las GC ChR2⁺ ocasiona el disparo de potencial de acción en neuronas intermedias, las cuales forman sinapsis con la neurona registrada. Este escenario es particularmente factible pues la fuerza de las conexiones formadas por las GCs es tal que en ciertas condiciones la activación de una única GC es capaz de causar el disparo de potencial de acción en neuronas postsinápticas (Scharfman et al. 1990;

Henze et al. 2002). Este escenario sólo sería plausible en el caso de que las GCs adultas liberen glutamato, pues GABA no podría activar neuronas maduras, sobre las cuales ejerce una acción inhibitoria. Si las neuronas intermedias activadas son excitatorias (células mossy o células piramidales), las corrientes registradas serán glutamatérgicas y bloqueables por kyn pero no por bmi (Figura 56C). Se ha demostrado electrofisiológicamente la presencia de conexiones funcionales que podrían contribuir corrientes polisinápticas de este tipo: desde células mossy a interneuronas (Scharfman 1995) y desde células piramidales a células mossy o interneuronas (Scharfman 1993; Scharfman 1994). Otro circuito polisináptico activable es el conocido como feedforward inhibition, como consecuencia de la activación primera de interneuronas, las cuales pueden luego inhibir a otras interneuronas (Scharfman et al. 1990) o a células piramidales (Freund et al. 1996). Este caso presenta una respuesta farmacológica distintiva pues las corrientes resultarían bloqueadas tanto por kyn como por bmi (Figura 56D). Finalmente debe considerarse la posibilidad de que en una neurona confluyan conexiones de distintos tipos y las drogas causen bloqueos parciales de las corrientes postsinápticas.

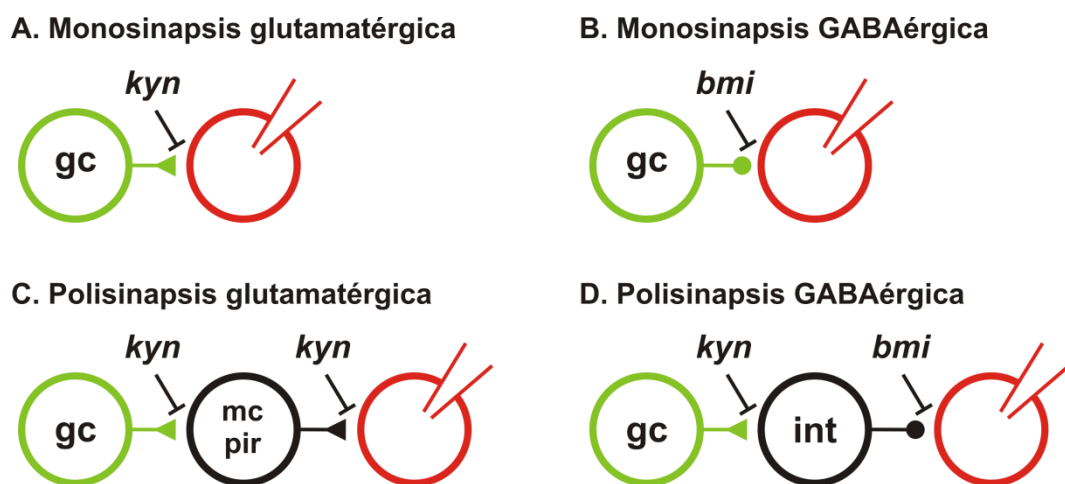


Figura 56. Efecto de bloqueantes de glutamato o GABA sobre corrientes de origen mono o polisináptico. Se señalan en verde las células granulares ChR2^+ y en rojo las neuronas registradas. Los triángulos indican conexiones excitatorias y los círculos inhibitorias. **A.** Conexión monosináptica glutamatérgica. Es bloqueada por kyn pero no por bmi. **B.** Conexión monosináptica GABAérgica. Es bloqueada por bmi pero no por kyn. **C.** Conexión polisináptica glutamatérgica. Es bloqueada por kyn pero no por bmi. **D.** Conexión polisináptica GABAérgica. Es bloqueada tanto por kyn, actuando en la sinapsis entre la GC y la interneurona, como por bmi, actuando en la sinapsis entre la interneurona y la neurona registrada.

De los posibles escenarios discutidos se desprende que si el ácido kinurénico bloquea completamente las respuestas postsinápticas evocadas por luz, las células granulares nacidas en el hipocampo adulto son de neuronas glutamatérgicas (casos A, C y D de la Figura 56). Se realizaron entonces experimentos de aplicación de kyn 4 - 10 mM durante el registro de corrientes evocadas por luz (**Figura 57**). En los tres experimentos en que se siguió este protocolo kyn bloqueó por completo las corrientes evocadas.

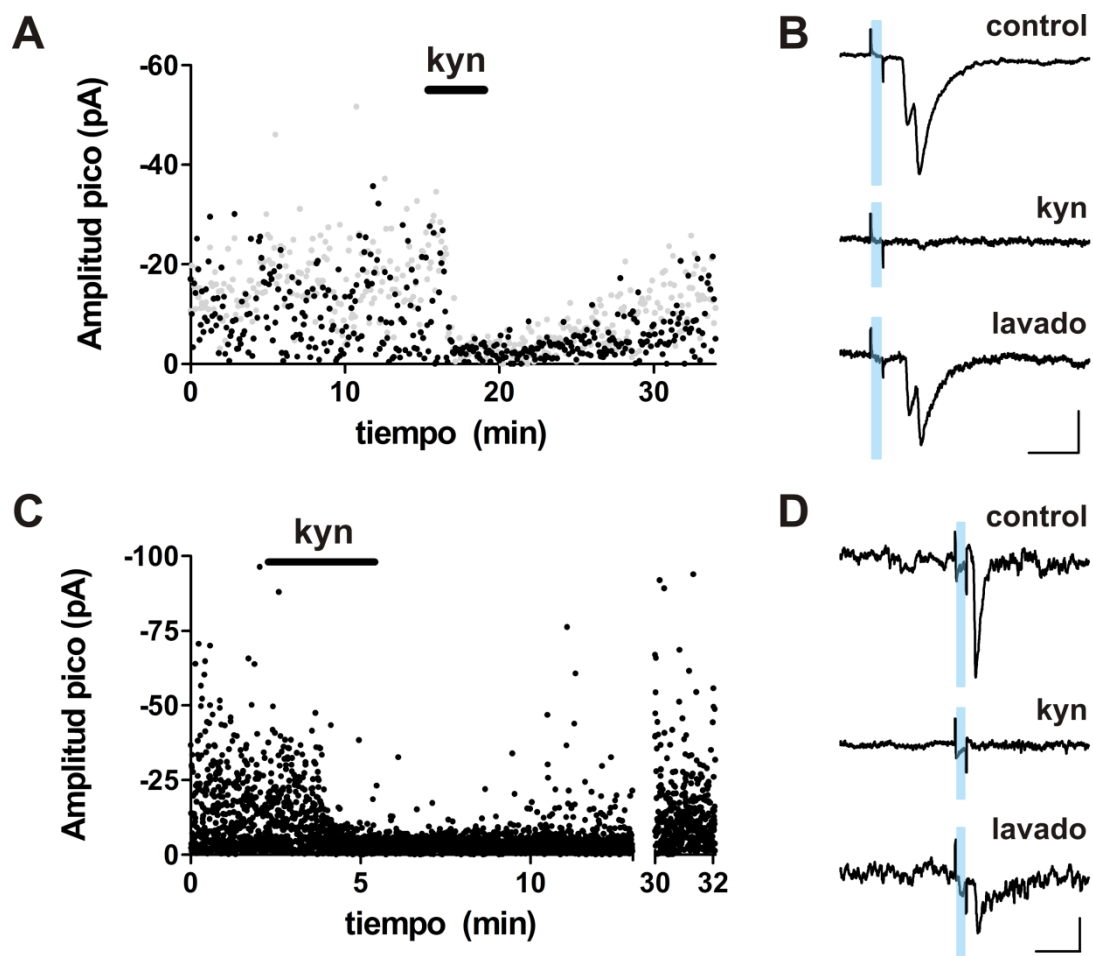


Figura 57. Bloqueo de corrientes evocadas por luz por ácido kinurénico. **A.** Amplitud pico del primer y segundo componente (puntos negros y grises) de corrientes evocadas por luz a 0,2 Hz en la interneurona de la Figura 54A-D. La barra negra señala la aplicación de kyn 10 mM en la solución externa. **B.** Trazos promedio antes, durante y después de la aplicación de kyn en el experimento mostrado en A. Escala: 40 ms, 5 pA. **C.** Amplitud pico de las corrientes evocadas por luz a 4 Hz en la interneurona de la Figura 54I-K. **D.** Trazos promedio del experimento mostrado en C. Escala: 40 ms, 2 pA. Resultados similares se obtuvieron también para la interneurona de la Figura 54L-N.

Estos resultados sugieren fuertemente que las GCs adultas liberan glutamato como único neurotransmisor rápido. Para evaluar si la activación de estas neuronas era capaz de reclutar interneuronas postsinápticas, dando lugar a inhibición feedforward de otras células, se siguió otro protocolo de farmacología en el cual se aplicó en primer medida bmi (**Figura 58**). En caso de que las corrientes evocadas por luz tuviesen un componente polisináptico GABAérgico, este debería bloquearse por bmi. La aplicación posterior de kyn debería bloquear por completo el PSC (**Figura 56D**). En tres de los cuatro experimentos de este tipo realizados sobre interneuronas, la aplicación de bmi no bloqueó sustancialmente las corrientes evocadas por luz (**Figura 59**). Resulta particularmente interesante el caso mostrado en la **Figura 58A,B** en el que ninguno de los dos componentes del PSC resultó afectado, descartando así la posibilidad de que el segundo pico correspondiese a una señal polisináptica inhibitoria. Se muestra en la **Figura 58C** el caso en que bmi bloqueó un componente tardío del PSC, sugiriendo que el mismo correspondía a sinapsis inhibitorias polisinápticas. Se detectó inhibición polisináptica también sobre una célula piramidal, como se describirá más adelante.

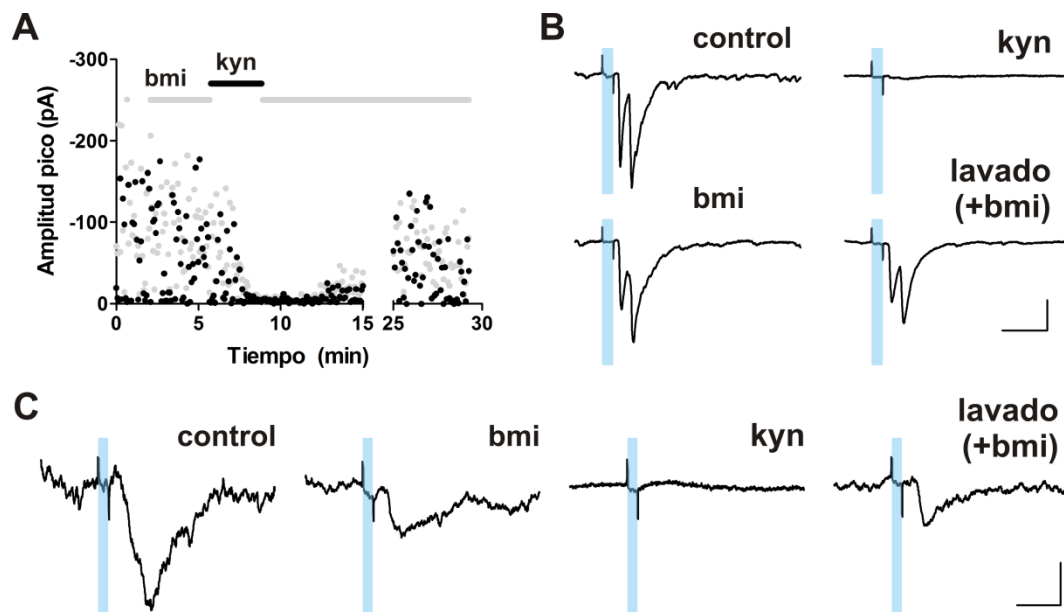


Figura 58. Efecto de la bicuculina en las corrientes evocadas por luz sobre interneuronas. **A.** Amplitud pico del primer y segundo componente (puntos negros y grises) de corrientes evocadas por luz a 0,2 Hz en la interneurona de la Figura 53. Las barras gris y negra señalan la aplicación de bmi 20 μ M y kyn 10 mM respectivamente. **B.** Trazos promedio correspondientes al experimento mostrado en A. Escala: 40 ms, 20 pA. **C.** Trazos promedio

obtenidos en ausencia de drogas y durante la aplicación de bmi 20 μ M, la aplicación posterior de kyn (4 mM) y el lavado de kyn. Nótese que bmi bloquea un componente tardío del PSC. Los datos corresponden a la interneurona de la figura 38D-F. Escala: 40 ms, 3 pA.

Los resultados obtenidos, resumidos en la **Figura 59**, demuestran que las células granulares nacidas en la adultez liberan glutamato como principal neurotransmisor pues la aplicación de kyn bloqueó por completo las corrientes evocadas por luz. A su vez, sobre dos neuronas se comprobó la incidencia de corrientes GABAérgicas de origen polisináptico.

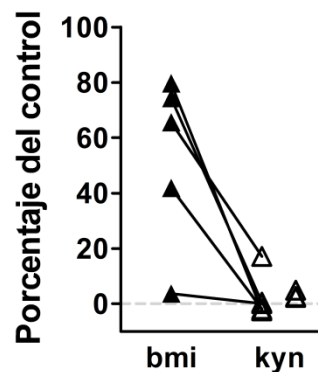


Figura 59. Resumen de los resultados obtenidos por aplicación de bmi o kyn. Se grafica la amplitud de la corriente postsináptica en presencia de droga relativa a la propia del trazo control. En los cinco casos en que se aplicó de manera sucesiva bmi y kyn se conectan con una línea los valores obtenidos con cada droga. Los tres casos en que se aplicó directamente kyn se grafican solos a la derecha. La corriente que se bloqueó en forma completa por bmi fue registrada en una célula piramidal.

Las fibras mossy presentan un mecanismo de regulación de la transmisión sináptica según el cual ésta es inhibida por la activación de receptores metabotrópicos de glutamato presentes en la presinapsis. Este efecto puede reproducirse aplicando agonistas específicos de receptores mGluR de tipo II como el (2S,1'R,2'R,3'R)-2-(2,3-dicarboxycyclo-propyl)glycine, conocido como DCG-IV (Kamiya et al. 1996). Esta farmacología distingue a las sinapsis formadas por las fibras mossy de otras sinapsis excitatorias del hipocampo las cuales no son afectadas por estos agonistas. De hecho, la inhibición por DCG-IV se utiliza rutinariamente cuando se quiere demostrar que las fibras reclutadas en un experimento de estimulación extracelular corresponden efectivamente a fibras mossy (Nicoll et al. 2005). En el paradigma

experimental utilizado en la presente tesis tal comprobación no es necesaria pues la selectividad propia del retrovirus garantiza que los pulsos lumínicos estimulan solo células granulares. Sin embargo resulta interesante determinar si las GCs nacidas en la adultez presentan también este mecanismo plástico por regulación de la transmisión dependiente de actividad. Se realizaron entonces dos experimentos en los que se evaluó el efecto de DCG-IV (1 μ M) sobre las corrientes evocadas por luz (**Figura 60**). Se observó un fuerte efecto inhibitorio de este agonista sobre las corrientes registradas. Este bloqueo se evidenció como un aumento en la probabilidad de fallas de la transmisión sináptica y una disminución de la amplitud del PSC promedio.

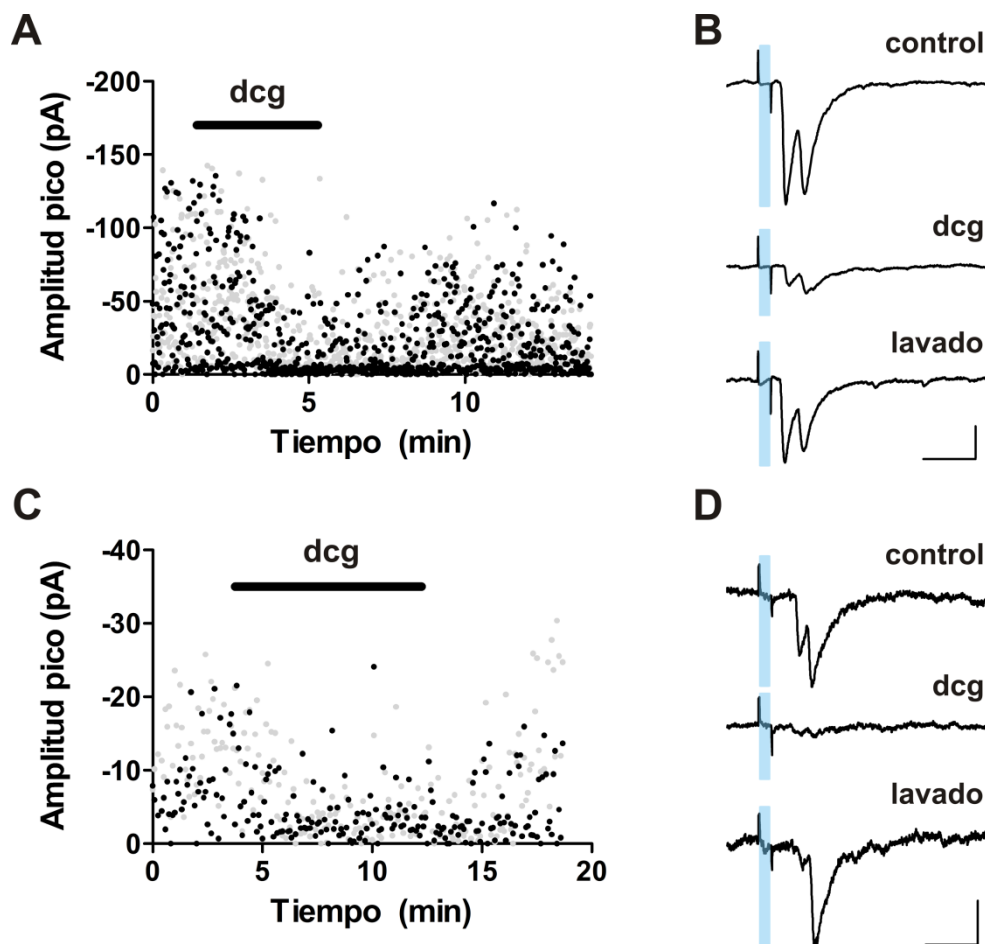


Figura 60. Efecto del DCG-IV sobre las corrientes evocadas por luz. **A.** Amplitud pico del primer y segundo componente (puntos negros y grises) de corrientes evocadas por luz a 1 Hz en la interneurona de la Figura 53 y Figura 58A,B. La barra negra señala la aplicación de dcg 1 μ M. La probabilidad de falla de las corrientes aumentó de 0,27 a 0,73 durante la aplicación de dcg. **B.** Trazos promedio correspondientes al experimento mostrado en A. Este experimento se realizó en presencia de bmi. Escala: 40 ms, 10 pA. **C.** Experimento realizado sobre la interneurona de la Figura 54A-D. El dcg aumentó la probabilidad de falla de 0,27 a 0,85. Estímulos aplicados a 0,2 Hz. **D.** Trazos promedio correspondientes al experimento mostrado en C. Escala: 40 ms, 5 pA.

CORRIENTES EVOCADAS POR LUZ SOBRE OTROS TIPOS NEURONALES

Se realizaron experimentos para determinar si las células granulares nacidas en la adultez forman también sinapsis funcionales con neuronas excitatorias del hipocampo. Se buscaron a este fin corrientes evocadas por luz en 16 células mossy y 11 células piramidales, encontrándose un resultado positivo para cada uno de estos dos tipos neuronales.

La **Figura 61** documenta las corrientes evocadas sobre la célula mossy. Esta célula constituyó el primer resultado positivo obtenido. Presentó potenciales de acción acordes con la caracterización realizada para células mossy (Figura 61A). Su actividad espontánea de alta frecuencia y amplitud, también característica de su tipo neuronal, hace imposible distinguir inequívocamente las corrientes evocadas por luz de aquellas no correlacionadas con el estímulo (Figura 61B). Sin embargo es posible observar la aparición consistente de corrientes de alta amplitud a tiempos inmediatamente posteriores al estímulo. El promediado de cientos de repeticiones cancela la contribución de la actividad espontánea revelando la existencia de corrientes sinápticas evocadas por la luz, de gran amplitud y baja latencia al estímulo (Figura 61C). Como se observó en algunos experimentos sobre interneuronas, estas PSCs también presentaron un componente temprano y otro tardío.

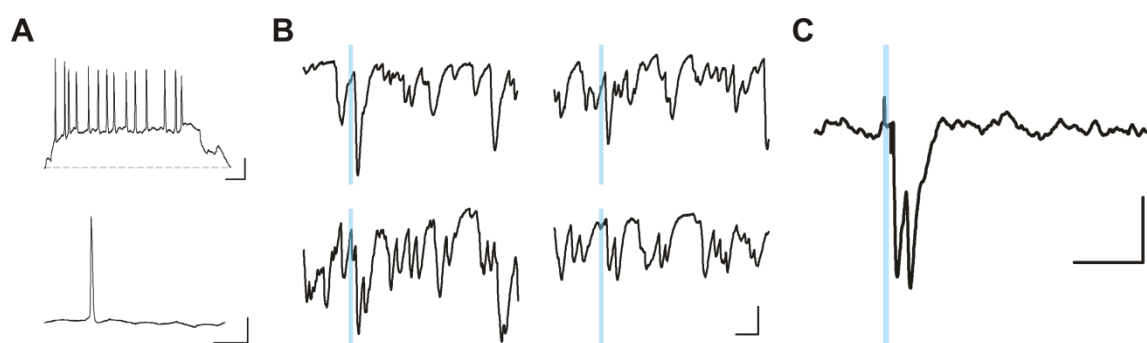


Figura 61. Corrientes evocadas por luz sobre una célula mossy. **A.** Arriba: tren de potenciales de acción de 25 Hz en respuesta a 250 pA de corriente despolarizante. Escala: 50 ms, 20 mV. Abajo: detalle de un potencial de acción en respuesta a 100 pA. Escala: 20 ms, 20 mV. **B.** Ejemplos de cuatro presentaciones individuales de estímulos lumínicos de 10 ms. Nótese la alta frecuencia de corrientes espontáneas. Escala: 50 ms, 60 pA. **C.** Promedio de 445 respuestas a estímulos presentados a 1 Hz. Latencia del PSC: 14,2 ms. Escala: 100 ms, 20 pA.

En la **Figura 62** se muestran los resultados obtenidos para una célula identificada como piramidal por la ubicación de su soma en la capa piramidal de CA3, su morfología (Figura 62A) y las propiedades de sus potenciales de acción (Figura 62B). Como en los casos mostrados en la Figura 55, las respuestas individuales no pueden distinguirse de la actividad espontánea y sólo el promediado de cientos de eventos permite confirmar la presencia de corrientes evocadas por luz (Figura 62C). Se observa una corriente promedio con prolongada latencia y cinética lenta. Se ensayó farmacológicamente la identidad de la misma (Figura 62D). La aplicación de bmi bloqueó por completo el PSC, el cual se recuperó parcialmente durante el lavado de la droga. La aplicación sucesiva de kyn tuvo el mismo efecto, confirmando que la señal registrada corresponde a una conexión polisináptica mediada por interneuronas GABAérgicas (Figura 56D).

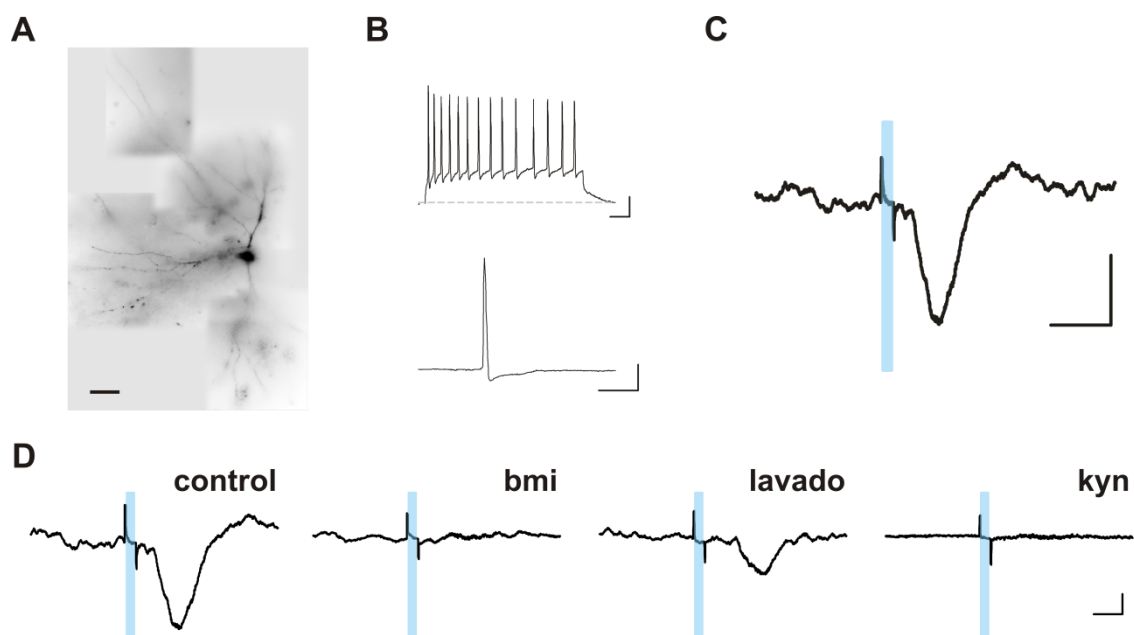


Figura 62. Corrientes evocadas por luz sobre una célula piramidal de CA3. **A.** Reconstrucción morfológica de la célula tras el llenado con fluoróforo. El soma se ubica en la capa piramidal de la región CA3c y extiende dendritas hacia el upper (arriba) y lower (abajo) blade del giro dentado. Escala: 50 μ m. **B.** Arriba: tren de potenciales de acción de 35 Hz en respuesta a 350 pA de corriente despolarizante. Escala: 50 ms, 20 mV. Abajo: detalle de un potencial de acción en respuesta a 50 pA. Escala: 20 ms, 20 mV. **C.** Promedio de 400 respuestas a pulsos de luz de 10 ms presentados a 1 Hz. Latencia del PSC: 25,1 ms. Escala: 50 ms, 5 pA. **D.** Trazos promedio obtenidos antes o durante la aplicación sucesiva de bmi y kyn. La aplicación de bmi 20 μ M bloquea reversiblemente el PSC. Tras el lavado, toda la corriente es bloqueada por kyn 4 mM. Escala: 25 ms, 2 pA.

En resumen, se detectaron corrientes sinápticas evocadas por luz en 14 neuronas: 11 interneuronas, 1 célula mossy, 1 célula piramidal y 1 neurona no identificada. La amplitud de sus corrientes promedio se grafica en la **Figura 63**.

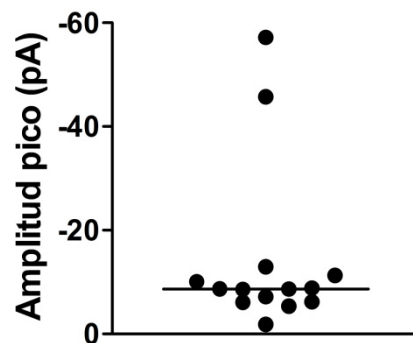


Figura 63. Amplitud pico de los trazos promedio de las 14 corrientes postsinápticas registradas.

CARÁCTER MONO O POLISINÁPTICO DE LAS CORRIENTES REGISTRADAS

Los experimentos mostrados demuestran que las células granulares nacidas en el hipocampo adulto forman conexiones eferentes funcionales pues su activación resulta en la incidencia de corrientes sinápticas sobre otras neuronas. Para poder asegurar sin embargo que las interneuronas, células mossy y células piramidales son contactadas directamente por los axones de estas células es necesario determinar si las respuestas registradas corresponden a conexiones monosinápticas desde las neuronas Chr2^+ o si por el contrario son el resultado de la activación de circuitos polisinápticos. El criterio más utilizado para distinguir entre estos dos tipos de señales es la medición de la demora entre el disparo de potencial de acción presináptico y el comienzo de la señal postsináptica (**Figura 64A**). Otros criterios incluyen la baja variabilidad de esta demora y la detección de corrientes NMDA en presencia de bloqueantes AMPA. La demora es función de la velocidad de conducción del potencial de acción, la distancia recorrida hasta las terminales y el tiempo requerido para que la liberación de neurotransmisor afecte las conductancias postsinápticas. Demoras largas sugieren que la

señal registrada se origina en sinapsis formadas por neuronas activadas secundariamente por el disparo de las primeras.

Una limitación del protocolo experimental seguido durante el estudio de estas conexiones es que se desconoce el momento en que las neuronas presinápticas disparan potencial de acción evocado por luz, lo que hace imposible determinar la demora de la transmisión sináptica. Teniendo en cuenta esta limitación, se procederá a continuación a identificar aquellos experimentos para los que se pueda especular fuertemente sobre su naturaleza mono o polisináptica y dejando a los más dudosos sin clasificar.

En experimentos realizados en rebanadas de hipocampo mantenidas a temperatura ambiente la demora desde el disparo de potencial de acción en fibras mossy y el comienzo de corrientes o potenciales postsinápticos resulta de aproximadamente 3 a 6 ms (Jonas et al. 1993; Kneisler et al. 1995).

Las GCs ChR2⁺ disparan a tiempos variables desde el comienzo del estímulo lumínico como consecuencia de sus distintos niveles de expresión funcional del transgen (Figura 49C). Aplicando pulsos de luz de 10 ms cada 30 segundos (0,03 Hz) dispararon con una latencia de entre 9,3 y 19,7 ms (mediana 14,0 ms, n = 11, Figura 64B). Al aumentar la frecuencia de estímulos a 1 Hz esta latencia fue de entre 10,3 y 23,5 ms (mediana 19,3 ms, n = 9). El aumento en la latencia se debe a que ChR2 no alcanza a desinactivar su conductancia en ese breve intervalo de recuperación. Este retraso debe tenerse en cuenta pues varios experimentos se realizaron a frecuencias de estimulación de 1 Hz o incluso mayores. La latencia medida para las corrientes postsinápticas evocadas por luz fue muy variable, entre 14,2 y 39,8 ms (mediana 21,0 ms, n = 14, Figura 64C). Considerando todos estos valores, las latencias de varias de las PSCs medidas son compatibles con una conexión monosináptica mientras que otras tendrían latencias demasiado largas, sugiriendo un origen polisináptico.

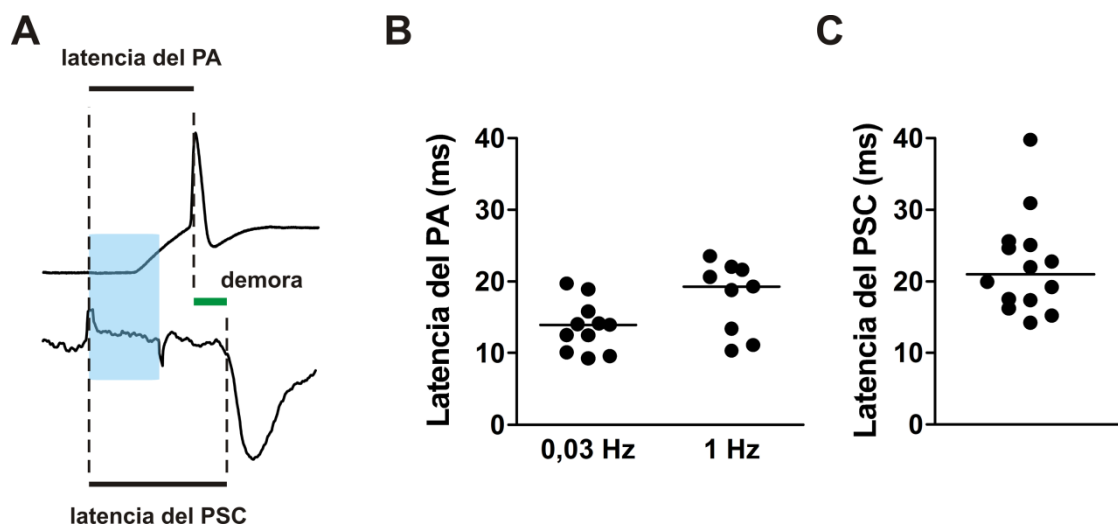


Figura 64. Comparación entre la latencia de los potenciales de acción en GCs y las corrientes postsinápticas evocadas por luz. **A.** Esquema ilustrando la medición de latencias. Se muestra en la misma escala temporal un potencial de acción evocado en una GC ChR2⁺ (arriba) y un trazo promedio de corrientes evocadas por luz (abajo). Los trazos provienen de experimentos no relacionados y se alinearon respecto al pulso de luz de 10 ms aplicado (barra gruesa). La latencia del potencial de acción se midió desde el comienzo del pulso de luz al pico del PA. La latencia de la corriente postsináptica se midió desde el comienzo del pulso de luz hasta el punto en que la corriente alcanza el 10% de su amplitud máxima. La demora de la transmisión sináptica correspondería a la resta entre estos valores, aunque no puede calcularse en los experimentos. **B.** Latencia de los potenciales de acción evocados en GCs ChR2⁺ por pulsos de luz aplicados a 0,03 Hz y 1 Hz. **C.** Latencia de las corrientes postsinápticas promedio obtenidas para los 14 casos positivos. Las líneas indican la mediana.

Para precisar más este análisis se consideró también la variabilidad de la latencia de los PSC individuales evocados por luz. Se considera que las conexiones monosinápticas se caracterizan por una baja varianza mientras que las conexiones polisinápticas son menos precisas por involucrar la activación de neuronas intermedias. Este parámetro se estimó a partir de mediciones del tiempo de crecimiento de los trazos promedio. Si los PSCs ocurren con latencia variable, su trazo promedio presenta una fase de crecimiento más lenta que la de los trazos individuales. El tiempo de crecimiento depende también, por supuesto, de la cinética propia de las conductancias activadas. Pero sólo se podrán detectar tiempos de crecimiento rápido si la latencia de las corrientes individuales presenta poca variabilidad. Por lo tanto una cinética rápida aporta evidencia a favor del carácter monosináptico de esa corriente.

La **Figura 65** identifica a cada uno de los 14 resultados positivos por el tiempo de crecimiento y la latencia al estímulo de sus corrientes postsinápticas promedio. Se observa una concentración de puntos de baja latencia y crecimiento rápido. Estos 7 casos se propone que constituyen evidencia de conexiones monosinápticas entre GCs adultas e interneuronas (6 casos, 5 de los cuales se muestran en las figuras 53 y 54) y células mossy (1 caso, mostrado en la Figura 61).

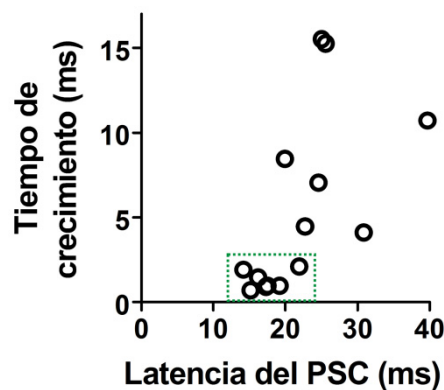


Figura 65. Tiempo de crecimiento (20 – 80%) del trazo promedio de cada uno de los 14 resultados positivos en función de su latencia. La región recuadrada destaca los 7 casos cuyas propiedades sugieren un origen monosináptico (dos puntos se superponen en el plano).

Como evidencia adicional a favor del origen monosináptico de estas 7 respuestas, en las 2 células de este grupo en que se ensayó la aplicación de bmi (uno de ellos mostrado en la Figura 58A,B) el experimento descartó la posibilidad de que representaran conexiones polisinápticas GABAérgicas pues no fueron bloqueadas sustancialmente.

El resultado obtenido sobre una célula piramidal mostrado en la Figura 62 representa claramente una conexión polisináptica GABAérgica por ser sensible tanto a bloqueantes de receptores de glutamato como de GABA. En una interneurona en que la luz evocó corrientes lentas de alta latencia, la aplicación de bmi bloqueó en aproximadamente un 60% la corriente evocada y se obtuvo un bloqueo total por kyn, sugiriendo que parte de la corriente correspondía a una conexión polisináptica GABAérgica.

Entre los 7 resultados restantes se encuentran las dos conexiones polisinápticas descritas previamente. En los 5 resultados restantes, sus propiedades intermedias y la falta de datos farmacológicos no permiten determinar fehacientemente su carácter mono o polisináptico.

En tres casos, los trazos promedio de las corrientes evocadas por luz presentaron claramente dos picos (Figura 53E, Figura 54D y Figura 61C), representando PSCs individuales con latencias distintas. Proponemos que este fenómeno es consecuencia del disparo de más de un potencial de acción por neuronas ChR2^+ como se muestra en la Figura 49B,C. En favor de esta hipótesis, los dos picos ocurrieron en promedio con 12 ms de separación, el mismo valor que separa en promedio a los dos primeros potenciales de acción de neuronas ChR2^+ en que pulsos lumínicos de 10 ms evocan más de un PA. En estas células, el segundo PA tiene latencia variable, siendo su desvío estándar 10 veces superior al propio del primer PA. Esto explicaría el curso temporal más lento del segundo componente de las corrientes postsinápticas. Alternativamente, los dos picos podrían ser respuestas individuales a potenciales de acción únicos provenientes de distintas neuronas transducidas, aunque esto es poco probable dada la prolongada latencia del segundo componente. Otra posibilidad sería que el segundo pico resulte de una conexión polisináptica. En un caso sin embargo se descartó que reflejara una polisinapsis GABAérgica pues no fue bloqueado por bmi (Figura 58A).

DISCUSIÓN

El fenómeno de la neurogénesis adulta despertó gran interés de la comunidad neurocientífica en la última década, resultando en miles de trabajos de investigación. Las motivaciones detrás de estos estudios se pueden dividir en tres grandes áreas:

- **Potencial terapéutico.** El descubrimiento de que nuevas neuronas pueden generarse y diferenciarse en cerebros adultos e integrarse funcionalmente a los circuitos preexistentes alimenta la esperanza de desarrollar terapias de repoblación neuronal para enfermedades neurodegenerativas o trauma del sistema nervioso central. Estas terapias podrían involucrar estrategias de trasplante o manipulación del destino celular de progenitores endógenos.
- **Diferenciación neuronal.** Las neuronas nacidas en la adultez presentan la singularidad de desarrollarse en un entorno estable. Estudiar los factores intrínsecos y extrínsecos que modulan el proceso de diferenciación neuronal durante el desarrollo embrionario presenta la dificultad adicional de que mientras la neurona madura, también lo hace el tejido en que se inserta, complicando el establecimiento de causalidades y la distinción de mecanismos celulares autónomos. La neurogénesis adulta permite estudiar un proceso de maduración sabiendo que es la propia neurona la que marca sus tiempos. En particular el uso de retrovirus modificados permite realizar manipulaciones en células únicas que permiten desentrañar su programa genético y reglas de integración al circuito. Es de esperar que el estudio de la neurogénesis adulta permita desentrañar mecanismos generales a distintos procesos de diferenciación neuronal.
- **Rol fisiológico.** La neurogénesis adulta constituye un fenómeno interesante en sí mismo. ¿Por qué está mayormente restringida a bulbo olfatorio e hipocampo? ¿Qué distingue funcionalmente a estas estructuras? ¿Cómo es regulada la misma por el comportamiento del individuo? ¿Qué tipo de plasticidad aportan las neuronas nuevas

al circuito al que se insertan? Todas estas preguntas apuntan a determinar cuál es el rol fisiológico que cumple este proceso en la actividad cerebral.

La presente tesis se inserta en esta última área, estudiando cualitativa y cuantitativamente la integración al circuito hipocampal de las neuronas nacidas en la adultez. En particular el trabajo se concentra en estadios tardíos de diferenciación de las mismas, cuando han alcanzado la madurez.

Se demostró que las neuronas adultas se conectan exhaustivamente con el circuito del hipocampo. Reciben contactos funcionales excitatorios desde la corteza entorrinal medial y lateral, los cuales pueden reclutarlas causando el disparo de potenciales de acción. Son contactadas a su vez por sinapsis inhibitorias perisomáticas y dendríticas desde interneuronas locales y forman sinapsis excitatorias con neuronas blanco en el giro dentado. En conjunto los resultados muestran que las células granulares nacidas durante la adultez son unidades totalmente funcionales del circuito del hipocampo, pues son capaces de integrar información proveniente de la corteza y el giro dentado y transmitirla eficientemente a neuronas postsinápticas. Más aún, el estudio cuantitativo de sus aferencias y eferencias demostró que las mismas alcanzan un grado de conectividad prácticamente indistinguible al propio de aquellas nacidas durante el desarrollo embrionario o postnatal temprano, sugiriendo que todas las células granulares convergen a una función similar de manera independiente a su origen temporal.

A continuación discutiremos los resultados y sus implicancias en el contexto de la fisiología del hipocampo.

Los resultados sobre la conectividad sináptica de las células granulares se resumen en la **Figura 66**.

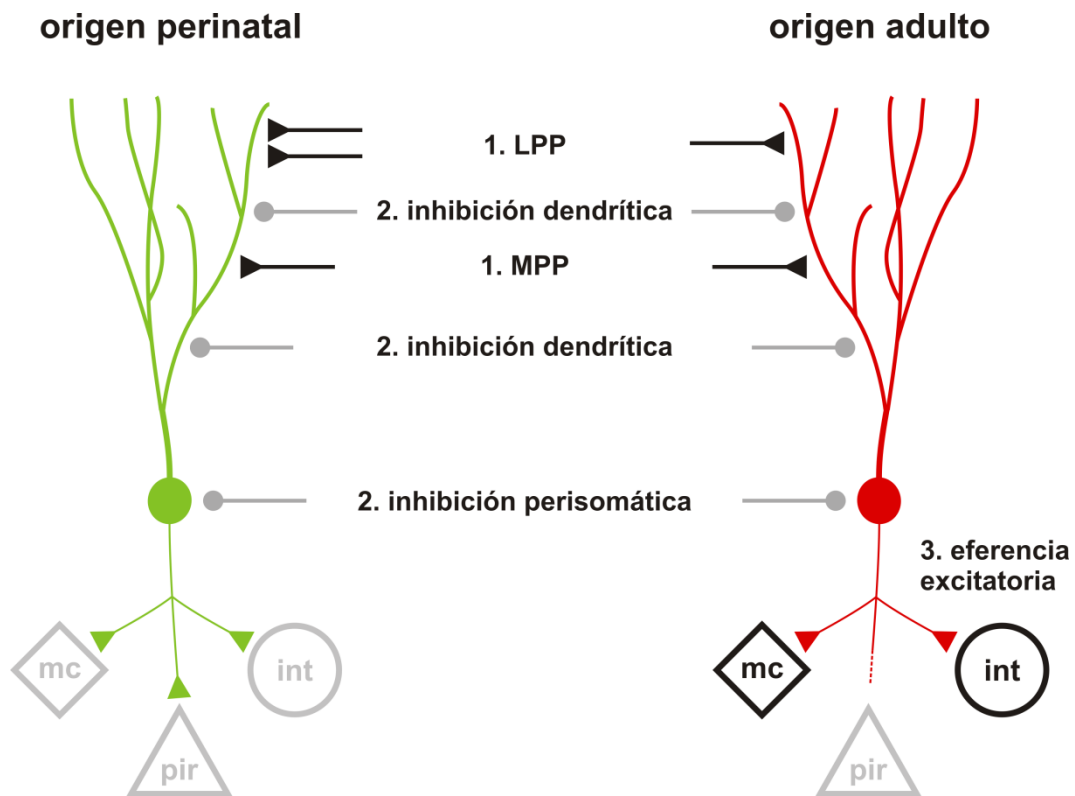


Figura 66. Esquema resumiendo la conectividad de las células granulares nacidas en la adultez en comparación con la propia de aquellas nacidas durante el desarrollo perinatal (ver texto). Se indican con triángulo las terminaciones excitatorias y con círculo las inhibitorias. En las neuronas postnatales se detectó mayor aferencia de la vía perforante lateral, indicado con dos terminales. Se detectó inhibición dendrítica distal y proximal, como lo evidencia su distinto potencial de reversión. Las neuronas blanco de las neuronas de origen perinatal se indican en gris por no haberse estudiado directamente estas conexiones en esta tesis. La conexión monosináptica desde neuronas adultas a células piramidales no se confirmó funcionalmente por lo que se deja como incógnita. LPP y MPP: vías perforante lateral y medial; mc: célula mossy; pir: célula piramidal; int: interneurona.

Se estudiaron las aferencias excitatorias provenientes de la corteza entorrinal, distinguiendo entre los axones de las vías perforantes lateral y medial (Figura 66, “1”). Las propiedades de estas conexiones se compararon entre células granulares marcadas al séptimo día postnatal y a las seis semanas de vida de los animales. Las corrientes sinápticas evocadas por estimulación de la LPP resultaron significativamente mayores en las neuronas postnatales que en las adultas (Figura 39). Esta constituye de hecho la única diferencia significativa encontrada en todas las propiedades medidas de los aferentes, tanto excitatorios como inhibitorios (**Tabla 2**). Este resultado podría reflejar tanto un mayor número de contactos como un mayor tamaño cuantal o una mayor probabilidad de liberación en esta vía, o una combinación de estos efectos. En contra de la posibilidad de que las sinapsis difieran en su probabilidad de liberación está el hecho de que la facilitación por pulso pareado resultó indistinguible (Figura 41), siendo ésta sensible a este parámetro. El registro de actividad espontánea miniatura permitiría distinguir entre estas posibilidades. Otra posibilidad difícil de descartar es que esta diferencia refleje un artefacto por el trabajo en rodajas. Las neuronas que sobreviven al corte son aquellas que mejor “esconden” sus dendritas hacia el interior de la rodaja. Las neuronas adultas ubican su soma a mayor distancia de la capa molecular, lo que podría hacer que sus dendritas distales lleguen con mayor profundidad al tercio externo de la misma. Dado que la estimulación extracelular se realiza en la superficie cabe la posibilidad que los axones evocados contacten preferencialmente a las dendritas de las neuronas postnatales por motivos geométricos. La vía perforante medial no evidenció diferencias en amplitud entre grupos de células. De confirmarse esta menor innervación de las neuronas adultas por la LPP, sugeriría una diferencia funcional según la cual éstas se verían menos influenciadas por la información no espacial transmitida desde la corteza entorrinal. El rol preciso de esta vía, sin embargo, no es aún comprendido con claridad.

Se estudiaron otras propiedades de estas sinapsis relevantes a su función. El cociente de corrientes AMPA y NMDA medido permite estimar la contribución relativa de ambos tipos de receptores a las estructuras postsinápticas. Esta proporción es modulada durante el proceso de sinaptogénesis: en distintos tipos neuronales, incluyendo a las células granulares del giro dentado, la contribución relativa de los AMPARs sobre los NMDARs aumenta durante su maduración (Ye et al. 2005; Hall et al. 2008). Tanto en las vías lateral como medial la activación de receptores NMDA es necesaria para la inducción de LTP (Colino et al. 1993) y LTD (Desmond et al. 1991). De existir diferencias en la densidad de estos receptores entre células esto podría indicar distinto estado de maduración de sus sinapsis y afectar sus propiedades plásticas. Se encontró diferencia en el cociente AMPA/NMDA pero no entre los dos grupos de células sino entre las sinapsis de la LPP y la MPP (Figura 40). La LPP evidenció una menor contribución de conductancia mediada por NMDARs. Esta diferencia no fue previamente reportada a nuestro conocimiento. Resulta por demás interesante que en la vía lateral la magnitud del LTP inducido por tétanos es sensiblemente menor que la propia de la MPP, efecto que se propuso podía deberse a diferencias en la densidad de receptores NMDA activados por ambas vías (Colino et al. 1993). Alternativamente la diferencia observada puede reflejar un artefacto por “space clamp” incompleto. Esto haría que al intentar mantener el potencial de membrana a +50 mV, se alcance un valor menor resultando en un driving force disminuido. Este efecto sería mayor en la LPP por la localización distal de sus sinapsis. Sin embargo las células granulares son particularmente compactas electrotónicamente (Schmidt-Hieber et al. 2007), lo que minimizaría este efecto.

La plasticidad a corto plazo de estas sinapsis fue también equivalente en los dos grupos de células granulares. Se ensayaron dos tipos de plasticidad, facilitación por pulso pareado y depresión por alta frecuencia. Estos fenómenos presentan cursos temporales y mecanismos distintos y modulan la dependencia de frecuencia de la transmisión de información cortical. Ambos presentan mecanismos predominantemente presinápticos, estando la facilitación por

pulso pareado frecuentemente ligada a la acumulación de iones calcio en la terminal y la depresión por frecuencia a la depleción de vesículas disponibles para la liberación (Zucker et al. 2002). Como ya se mencionó, las vías perforantes lateral y medial responden de manera opuesta a la presentación de estímulos pareados. Estos resultados se reprodujeron, presentando la LPP facilitación y la MPP depresión (Figura 38). Más aún, se ensayaron distintos intervalos entre pulsos y, si bien las dos vías difieren claramente en su plasticidad, las neuronas postnatales y adultas respondieron de igual modo (Figura 41).

Los resultados descriptos, sumados a la similitud en la excitabilidad presentada por las neuronas postnatales y adultas (pero no las embrionarias), hacían suponer que los dos grupos de células serían reclutados de igual manera por la activación de la MPP. No se tenían evidencias sin embargo de que las aferencias sinápticas sobre las neuronas nuevas fueran siquiera capaces de evocar potenciales de acción, condición necesaria para su participación efectiva en el circuito. Se ensayó entonces esta posibilidad en condiciones de registro no invasivas y se observó que éste era el caso. Más aún, la realización de experimentos pareados demostró que ninguna de las dos poblaciones era más propensa a excitarse por la activación de la MPP (Figura 43), aportando a su aparente convergencia funcional. Los resultados no permiten afirmar con seguridad sin embargo que las neuronas adultas sean reclutadas efectivamente por la actividad circuital in vivo. Este experimento se realizó en presencia de bloqueantes de la transmisión inhibitoria y se estimuló simultáneamente un conjunto potencialmente grande de axones. Sin embargo el hecho de que las neuronas adultas respondieran con umbral similar a las postnatales sugiere que este es el caso pues no puede dudarse que estas últimas, que contribuyen la amplia mayoría de la población de células granulares, participen activamente de la función hipocampal.

Se extendió la caracterización electrofisiológica existente de los contactos inhibitorios formados sobre las células granulares. Se establecieron así protocolos para el estudio diferencial de la inhibición perisomática y dendrítica. La aplicación de estímulos extracelulares en la capa granular evocó corrientes originadas en el soma y en dendritas proximales, distinguibles por su cinética y potencial de reversión. La estimulación de la capa molecular externa activó sinapsis sobre dendritas distales, de cinética más lenta y reversión más hiperpolarizada que las anteriores. La localización subcelular de las corrientes se confirmó por aplicación local de bloqueantes. A su vez, las diferencias en potencial de equilibrio en ambos compartimientos permitieron estudiar de manera aislada la actividad espontánea generada en cada uno, mejorando la descripción preexistente. Este estudio preliminar permitió analizar en profundidad las propiedades de la conectividad inhibitoria aferente de las neuronas adultas y compararlas con las propias de neuronas embrionarias y postnatales. No se observó diferencia significativa alguna entre las tres poblaciones tras estudiar la actividad evocada y espontánea de sinapsis perisomáticas y dendríticas (Figura 66, "2"). Las células granulares nacidas en el adulto por lo tanto son extensamente contactadas por la red inhibitoria local. No puede asegurarse sin embargo que la convergencia incluya a todos los tipos de interneuronas presentes, pues algunos podrían no influir lo suficiente en las propiedades medidas como para evidenciar potenciales diferencias. Los resultados muestran también que las interneuronas son capaces de una gran plasticidad estructural, formando nuevas conexiones con dendritas formadas meses después de su propia maduración y sugieren que las reglas que guían estas conexiones no distinguirían entre neuronas maduras de distintos orígenes temporales.

Como se introdujo anteriormente, la actividad de las neuronas hipocampales evidencia períodos de sincronía observables como oscilaciones de distintos rangos de frecuencias (Figura 5). El giro dentado se caracteriza por oscilaciones gamma de gran amplitud, frecuentemente

moduladas por ritmos theta, de menor frecuencia. Se observó que el giro dentado y la región CA3-CA1 actúan in vivo como generadores independientes de ritmos gamma, los cuales pueden temporariamente sincronizarse (Csicsvari et al. 2003). Estudios in vitro e in silico sugieren que las interneuronas que originan la inhibición somática juegan un rol central en la expresión de gamma. Durante oscilaciones inducidas en rodajas las células granulares son bombardeadas por potenciales inhibitorios rápidos en frecuencias gamma (Towers et al. 2002) y la aplicación de bloqueantes GABA_A anula o reduce abruptamente el poder de estas frecuencias (Poschel et al. 2002; Poschel et al. 2003). Simulaciones computacionales demuestran que redes de interneuronas de tipo fast-spiking son capaces de generar de manera autónoma oscilaciones gamma en respuesta a excitación tónica (Wang et al. 1996; Vida et al. 2006). Complementariamente se ha propuesto que la inhibición dendrítica, de cinética lenta, está involucrada en la expresión de ritmos theta (White et al. 2000; Whittington et al. 2003). El hecho de que las neuronas nacidas en el adulto reciban inhibición somática y dendrítica de igual manera que el común de las células granulares sugiere fuertemente que las mismas serán efectivamente reclutadas por la actividad sincrónica oscilatoria, las cual se proponen relevante a la función mnésica del hipocampo (Lisman et al. 1995; Lisman 1999).

CONEXIONES EFERENTES

Se demostró que las células granulares que se diferencian en el cerebro adulto son capaces de establecer contactos sinápticos eferentes con neuronas blanco en el hipocampo. En particular se confirmó su conexión con interneuronas de la capa granular y el hilus y con células mossy (Figura 66, "3"). Estudios farmacológicos revelaron que las mismas liberan glutamato como neurotransmisor, aspecto en el que no se diferencian de aquellas nacidas durante el desarrollo perinatal (Figura 59). A su vez, la detección de corrientes GABAérgicas polisinápticas refleja que estas conexiones son capaces de reclutar efectivamente a interneuronas inhibitorias.

El fenotipo glutamatérgico de las fibras mossy de las neuronas nuevas plantea ciertos desafíos al hipocampo. El constante agregado de sinapsis excitatorias puede aumentar globalmente la probabilidad de que células piramidales de CA3 disparen en forma indiscriminada. Si la codificación en CA3 depende de la activación de grupos definidos de neuronas, este efecto podría comprometer su correcta función. De hecho, de no existir mecanismos compensatorios, un aumento sostenido en la aferencia excitatoria llevaría a la activación permanente de toda la población de células piramidales, impidiendo cualquier tipo de codificación. En un modelo simple de red (Meltzer et al. 2005), el aumento en la población de “células granulares” ocasiona un deterioro de las memorias almacenadas por sobreexcitación de la capa de “células piramidales”. En el modelo, la compensación de la neurogénesis por muerte celular previene este efecto y causa el deterioro preferencial de memorias viejas, un efecto no necesariamente indeseado para la función hipocampal. Si la neurogénesis se compensa en cambio por regulación negativa de la actividad o excitabilidad de la red, la capacidad de almacenamiento en esta red artificial se maximiza. El agregado de neuronas glutamatérgicas, sin embargo, no se traduce necesariamente en un aumento en la excitabilidad de la red. Como se mencionó en la introducción, el blanco más importante numéricamente de las fibras mossy son interneuronas del giro dentado y CA3 y los experimentos confirman que las neuronas nuevas contactan efectivamente a esta población. En consecuencia la activación de las células granulares adultas puede resultar en un efecto inhibitorio neto sobre las neuronas principales. Dado que no se realizó una comparación cuantitativa entre las eferencias de las neuronas nuevas y viejas, no puede excluirse la posibilidad de que contacten en distintas proporciones a sus neuronas blanco. El estudio de la plasticidad a corto plazo de estas conexiones determinará de qué manera el efecto excitatorio o inhibitorio de su actividad depende de su frecuencia de disparo. El descubrimiento de que las neuronas nuevas presentan un fenotipo excitatorio confirma el desafío homeostático pero no sugiere su solución. El hipocampo podría compensar este efecto asociando cuantitativamente el nacimiento de neuronas con la muerte de unidades

preexistentes o bien mediante algunos de los mecanismos de plasticidad homeostática descritos en la siguiente sección. Como se introdujo anteriormente, algunos estudios reportan que el número de células granulares aumentaría sostenidamente durante la adultez mientras que otros contradicen esta noción. De confirmarse el primer escenario, la neurogénesis adulta estaría causando un incremento neto en el número de neuronas excitatorias del circuito.

El fenotipo excitatorio de las neuronas nuevas es también relevante al campo de la epilepsia. El hipocampo es considerado una estructura crítica para la patología de epilepsia del lóbulo temporal por su predominancia como foco epileptogénico, lo que lo convierte en uno de los blancos quirúrgicos más frecuentes en casos de epilepsia intratable. Numerosos estudios se centran en el rol del giro dentado en este fenómeno, motivados por la concepción del mismo como “puerta de entrada” del hipocampo y la observación de grandes cambios en su citoarquitectura y conectividad relacionados con epilepsia (Dudek et al. 2007). Estos cambios incluyen la muerte de células mossy e interneuronas del hilus y se propone que ambas resultarían en desinhibición de las células granulares, la primera por resultar en una menor excitación de interneuronas GABAérgicas (Scharfman 1999). A su vez, las fibras mossy sufren una reestructuración masiva tras la cual se observa densa innervación de la capa molecular interna (Sutula et al. 2007) y se establecen así recurrentes monosinápticos excitatorios entre células granulares (Scharfman et al. 2003). Estos efectos contribuyen a la actividad reverberante excitatoria que subyace a los episodios convulsivos. En los últimos años se demostró que las convulsiones en el giro dentado aumentan sustancialmente su tasa de neurogénesis (Scharfman et al. 2007). Curiosamente no sólo se forman neuronas nuevas en la capa granular sino que células granulares ectópicas se observan en el hilus. En vista de la evidencia presentada de que las neuronas nacidas en la adultez presentan un fenotipo glutamatérgico, la neurogénesis inducida por estados epilépticos constituiría un feedback positivo a la excitación en el hipocampo, el cual agravaría el cuadro en lugar de ayudar a su

recuperación. De hecho la cantidad de células granulares ectópicas correlaciona positivamente con la frecuencia de convulsiones luego de la inducción de status epilepticus en ratas (McCloskey et al. 2006) y el bloqueo de la neurogénesis con agentes antimitóticos redujo la probabilidad de desarrollarlas (Jung et al. 2004). Nuevamente, no es posible asegurar que las neuronas nuevas aportan excitación al sistema pues podrían contactar preferentemente interneuronas. Más aún, en el corto plazo tras la inducción de convulsiones las fibras mossy podrían liberar GABA en sus terminales (Gutierrez 2000), fenotipo que ha sido observado también durante el desarrollo postnatal temprano del giro dentado (Walker et al. 2001; Gutierrez et al. 2003). Este fenómeno se observa ya a las 24 hs de inducidas las convulsiones, por lo que no puede involucrar a las neuronas generadas recién en respuesta al tratamiento. Sin embargo, la capacidad de las fibras mossy de liberar GABA no ha sido confirmada aún mediante la realización de registros simultáneos entre células granulares y blancos postsinápticos y ha sido cuestionada recientemente (Uchigashima et al. 2007). Los resultados obtenidos en nuestras condiciones, con el ejercicio físico voluntario como único tratamiento, no pueden de todas formas extrapolarse libremente a una situación de epilepsia. Se observó que células granulares nacidas una semana después de la inducción de status epilepticus en ratas exhiben una conectividad aferente distinta a aquellas nacidas en ratas con ejercicio físico (Jakubs et al. 2006). En particular se observó una reducción en la aferencia excitatoria y un aumento en la inhibitoria, sugiriendo una compensación homeostática al aumento en la excitabilidad del circuito. Por lo tanto no puede excluirse que el fenotipo neurotransmisor de las mismas sea también modificable por esta patología.

MECANISMOS PARA LA CONVERGENCIA

El grado de convergencia alcanzada por todas las células granulares respecto a su conectividad aferente resulta fascinante si se consideran las enormes diferencias en los ambientes y el

estado de los circuitos durante la diferenciación a neurona de unas y otras. Durante el desarrollo temprano ocurre extensiva división celular y migración, en estratos todavía incompletamente definidos. Los circuitos no están aún establecidos, pues sus unidades se están formando y conectando. Cuando se inicia la actividad circuital, la misma está dominada por la acción despolarizante de GABA (Ben-Ari et al. 2004) y no se evidencian los ritmos fisiológicos observados en el adulto. En la adultez las relativamente pocas neuronas que se forman deben competir para el establecimiento de sinapsis aferentes y eferentes con aquellas formadas por neuronas preexistentes y lo hacen en un contexto de actividad radicalmente distinto. A su vez, las neuronas embrionarias y postnatales duplican en edad a las adultas estudiadas. En consecuencia las mismas tienen una larga historia de actividad, la cual moldea plásticamente las propiedades de sus conexiones. Resulta sorprendente entonces que las neuronas adultas, aún desarrollándose más lentamente (Zhao et al. 2006), alcancen en ese tiempo la misma estadística de aferencias.

¿Cuáles son los mecanismos que podrían contribuir a esta convergencia? Una hipótesis posible es que el fenómeno comparta mecanismos con los procesos de plasticidad homeostática (Turrigiano et al. 2004; Turrigiano 2007). Estos modelos proponen que existen a nivel de neurona o circuito niveles de actividad definidos los cuales el sistema busca alcanzar corrigiendo para esto sus parámetros de manera de compensar desviaciones de los mismos. Las neuronas pueden por ejemplo controlar su excitabilidad intrínseca en respuesta a cambios en su aferencia (Zhang et al. 2003). El número de receptores AMPA postsinápticos aumenta o disminuye luego de períodos de inactividad o hiperactividad respectivamente, un fenómeno conocido como “synaptic scaling” (Turrigiano et al. 1998), y hasta la relación AMPA/NMDA se mantiene durante eventos de plasticidad homeostática o hebbiana (Watt et al. 2000; Watt et al. 2004). Estos tratamientos pueden también resultar en compensaciones presinápticas (Burrone et al. 2002). Las sinapsis inhibitorias evidenciarían efectos homeostáticos inversos, y los balances excitación/inhibición se mantendrían a nivel de circuito por la acción de estos

mecanismos (Turrigiano et al. 2004). Las neuronas se encuentran constantemente rearreglando la identidad y fuerza de sus conexiones de una manera dependiente de actividad (Holtmaat et al. 2006). De acuerdo a los resultados obtenidos, es tentador hipotetizar que todas las células granulares, independientemente de su origen temporal, compartirían los mismos mecanismos de plasticidad homeostática por lo que alcanzarían un mismo nivel de actividad posiblemente determinado por su programa genético. La combinación de este principio con la plasticidad de las conexiones permitiría que las propiedades cualitativas y cuantitativas de las mismas se independicen en el mediano plazo de su historia previa, permitiendo alcanzar la convergencia observada. Tal vez sea el hipocampo una estructura particularmente propicia a este modelo dada su participación preferencial en el establecimiento de memorias de corto plazo.

El proceso de sinaptogénesis en las neuronas nuevas se estudió recientemente por microscopía electrónica (Toni et al. 2007). Se observó que los filopodios dendríticos (posibles espinas en formación) de las mismas tienden a aproximarse a botones presinápticos, con la particularidad de que los mismos ya contactaban espinas en otras dendritas (“multiple spine boutons”). Con la maduración de las neuronas aumenta la proporción de espinas con botones dedicados exclusivamente (“single spine boutons”). Estas observaciones sugieren que las dendritas de las neuronas nuevas compiten con dendritas preexistentes por los terminales presinápticos.

ROL FISIOLÓGICO DE LA NEUROGÉNESIS ADULTA

Los resultados de la presente tesis sugieren que la neurogénesis adulta aporta al hipocampo un nuevo mecanismo de plasticidad mediado por el recambio o agregado de unidades funcionalmente equivalentes a la red. Éste sigue una cinética notablemente más lenta que los

descriptos de plasticidad sináptica, expandiendo el rango temporal en que ocurren estos fenómenos (desde decenas de milisegundos a meses). Que este sea un mecanismo plástico dependiente de actividad lo sugiere el hecho de que es regulado por un sinnúmero de condiciones fisiológicas y patológicas, tanto el número de neuronas producidas como su maduración e integración al circuito (Piatti et al. 2006; Zhao et al. 2008). Este fenómeno ocurre en el giro dentado, donde se describió por primera vez el fenómeno de LTP (Bliss et al. 1973) y se suma al impresionante cuerpo de mecanismos plásticos descritos desde entonces. En este contexto, los experimentos futuros deberían apuntar a comprender las reglas computacionales que determinan la integración al circuito de cada neurona nueva y como el establecimiento de estas conexiones contribuye a los procesos de aprendizaje, memoria, navegación espacial u otras funciones del hipocampo.

La convergencia funcional fue observada sin embargo en neuronas de cerca de dos meses de desarrollo en adelante, cuando las mismas habrían alcanzado ya su madurez (Zhao et al. 2006; Ge et al. 2007; Toni et al. 2007). Las neuronas inmaduras presentan necesariamente propiedades distintas, entre las que se describieron mayor excitabilidad (Schmidt-Hieber et al. 2007), acción despolarizante de GABA (Ge et al. 2006), distinta contribución de aferentes excitatorios e inhibitorios (Esposito et al. 2005) y mayor amplitud de LTP (Ge et al. 2007). Dado el alto número de neuronas inmaduras presentes en el giro dentado de ratones adultos, no puede descartarse que las mismas jueguen un rol en el procesamiento de información. Para que esto ocurra es fundamental que las mismas formen ya en esos estadios sinapsis eferentes funcionales. La baja expresión de ChR2 no permitió evaluar el establecimiento temprano de contactos eferentes. Sin embargo evidencias estructurales sugieren que las neuronas nuevas formarían ya sinapsis poco después de las dos semanas de diferenciación, cuando aún presentan propiedades claramente inmaduras (Toni et al. 2008).

Modelos computacionales del hipocampo como red de memoria asociativa permiten especular sobre posibles consecuencias del agregado o recambio de unidades en el giro dentado. En 1987, McNaughton y Morris destacan el problema de saturación que surge al aumentar el número de memorias a ser almacenadas y sugieren formas en que el circuito puede contrarrestarlo: "... codificación eficiente de la información de entrada (minimizando el número de neuronas utilizadas para codificar cada representación), expansión de la vía de entrada a una red con gran número de unidades de manera de reducir el solapamiento relativo de patrones de entrada ... y haciendo la memoria lábil (ya sea por decaimiento espontáneo o por interacciones competitivas)" (McNaughton et al. 1987). Los autores no refieren al fenómeno de neurogénesis adulta al escribir estas líneas (de hecho el mismo no es siquiera mencionado en dicho trabajo) pero es interesante considerar cómo la misma puede contribuir a estos mecanismos. El primero de ellos se refiere a la ya mencionada codificación dispersa característica del hipocampo y particularmente el giro dentado. El segundo destaca la relevancia del gran número de neuronas en la capa granular, cuya población expande la información proveniente de la corteza entorrinal permitiendo representaciones más ortogonales de su actividad, esto es que comparten un menor número de unidades activas. Se propone que esta ortogonalización permite al giro dentado contribuir a la creación de patrones de actividad claramente distintos para entradas similares ("pattern separation"). De hecho, en una simulación del complejo hipocampal, el tamaño del giro dentado influye fuertemente sus propiedades mnésicas (Becker 2005). En este contexto, el continuo agregado de unidades a esta capa del circuito aumenta su capacidad de memoria al minimizar el solapamiento entre distintos patrones (Wiskott et al. 2006; Treves et al. 2008). Resulta interesante que la tasa neta de neurogénesis en el adulto se vea aumentada en situaciones que se puede esperar aumenten la demanda computacional sobre el hipocampo como ser ambientes cognitivamente enriquecidos y paradigmas de aprendizaje. El último punto sugiere un rol beneficioso para el decaimiento de memorias: si las memorias viejas se independizan

efectivamente del hipocampo, resulta positivo eliminarlas de esta estructura de manera de evitar su colisión con memorias nuevas. Un mecanismo posible para esta limpieza sería un recambio de células granulares viejas por nuevas, el cual causaría un deterioro preferencial de memorias lejanas en el tiempo y un consecuente beneficio en el establecimiento de memorias nuevas (Becker 2005; Meltzer et al. 2005). La posibilidad de que células granulares maduras mueran sostenidamente no ha sido sin embargo confirmada experimentalmente. Cabe destacar que estos posibles efectos de la neurogénesis adulta no requieren que las neuronas producidas presenten propiedades distintivas, sino que destacan las ventajas del agregado de unidades funcionalmente equivalentes a esta capa de la red como un mecanismo plástico de curso temporal lento. Las propiedades de neuronas inmaduras podrían ser relevantes a las reglas computacionales que guían el proceso de integración a circuito de estas unidades, influyendo en su rol posterior.

PERSPECTIVAS

La extrapolación de los resultados obtenidos en rodajas agudas sugiere que todas las células granulares presentarían patrones de actividad similares in vivo una vez alcanzada su madurez. Esta aseveración aguarda sin embargo una confirmación experimental. En primer lugar, las aferencias estudiadas no incluyen a las colinérgicas originadas en el septum medial y la banda diagonal de Broca, las cuales contactan directamente las dendritas de las células granulares (Frotscher et al. 1985) y estarían relacionados con la generación de ritmos theta en el hipocampo, aprendizaje y memoria (Leranth et al. 2007). No se estudió tampoco la contribución de receptores sinápticos tipo GABA_B (Piguet 1993) o extrasinápticos, mediadores de inhibición tónica sobre las células granulares (Nusser et al. 2002). La plasticidad a corto plazo de las sinapsis GABAérgicas formadas sobre las neuronas nuevas sería modificable al menos en condiciones patológicas (Jakubs et al. 2006) y no se analizó en la presente tesis. La

plasticidad a largo plazo de las conexiones desde la corteza entorrinal no se ensayaron pero otro estudio observó que si bien las neuronas nuevas presentan mayor amplitud y menor umbral de LTP entre las 4 y 6 semanas de desarrollo, el mismo resulta indistinguible al propio de neuronas viejas tras ese período (Ge et al. 2007).

El hecho de que estadísticamente las aferencias medidas no distingan entre células granulares de distintos orígenes temporales (con excepción de las conexiones de la vía perforante lateral) no implica necesariamente que participan todas del mismo circuito. Distintas poblaciones podrían ser contactadas por grupos específicos de axones de similares propiedades. Esto implicaría sin embargo la existencia de distintas subpoblaciones funcionales dentro de los grupos de neuronas presinápticas, hecho para el que no existe evidencia experimental. La expresión retroviral de distintos trazadores retrógrados en GCs de origen perinatal y adulto permitiría evaluar si estas comparten neuronas presinápticas. Complementariamente, el registro simultáneo de neuronas de distinto origen temporal permitiría evaluar el grado de correlación temporal de sus aferencias de manera de especular en qué grado las mismas son compartidas.

Las propiedades intrínsecas resultaron distintivas para neuronas de origen embrionario, postnatal temprano y adulto. En particular las neuronas adultas presentaron menor capacitancia y mayor resistencia de membrana (Figura 20). Esta diferencia obedecería a la geometría de las células. De hecho las diferencias morfológicas son evidentes dada la distinta localización de las mismas en la capa granular. Células granulares con soma en las cercanías de la capa molecular presentan más dendritas primarias y árbol dendrítico más disperso y posiblemente más extenso que aquellas con soma más cercano al hilus (Rahimi et al. 2007). Las diferentes propiedades encontradas se tradujeron en una menor excitabilidad de las neuronas de origen embrionario, lo que podría resultar en un reclutamiento diferencial de las mismas durante la actividad del circuito.

El experimento ideal para resolver estas preguntas es sin duda registrar directamente la actividad electrofisiológica de las neuronas nuevas in vivo y compararla cuantitativamente con la de neuronas preexistentes durante distintos comportamientos del animal. Esto presenta un gran desafío técnico de identificar inequívocamente el origen temporal de las neuronas registradas. En pájaros, donde la neurogénesis estacional es masiva, este experimento se realizó mediante la administración de BrdU, el registro a ciegas de grandes cantidades de neuronas y el posterior revelado histoquímico del marcador (Paton et al. 1984). La actividad in vivo de las células granulares nacidas en el hipocampo adulto fue estudiada indirectamente en dos trabajos recientes utilizando la expresión de immediate-early genes (IEGs) como indicador del reclutamiento de las mismas por conductas de exploración espacial. En el primero se observó que el porcentaje de neuronas de 5 meses de edad que expresan Arc aumentan aumenta en respuesta a la exploración de un entorno novedoso, y lo hace en mayor proporción que las neuronas “preexistentes” (Ramirez-Amaya et al. 2006). El segundo experimento sugiere que las neuronas nuevas de 6 (y en menor medida 8) semanas de edad participan de la codificación de memorias en mayor proporción que el común de las células granulares (Kee et al. 2007). No se determinó si esta propiedad se mantenía en neuronas de mayor edad o decaía por el contrario al nivel de toda la población. Estos trabajos demuestran claramente que la neurogénesis adulta provee de unidades funcionales al circuito del hipocampo. En ambos trabajos sin embargo las evidencias a favor de una activación preferencial de las neuronas adultas no son concluyentes. En primer lugar, los porcentajes de células activadas en cada población se estimaron con distintos métodos, lo cual podría introducir desviaciones sistemáticas en los cálculos. En segundo lugar la activación de las neuronas adultas (marcadas por la aplicación aguda de BrdU) se comparó con la del total de neuronas en la capa granular (células NeuN⁺), una población altamente heterogénea, lo cual dificulta la interpretación del resultado.

Considerando la dificultad de realizar registros in vivo de neuronas nuevas, la posibilidad de estudiar su actividad durante episodios de oscilaciones inducidas en rodajas agudas constituye una alternativa realizable y potencialmente informativa. En el giro dentado distintos ritmos pueden generarse en respuesta a la aplicación de glutamato (Poschel et al. 2002), tétanos (Poschel et al. 2003) o bloqueantes GABA_A (D'Antuono et al. 2005). El agonista colinérgico carbacol induce robustas oscilaciones theta y gamma en las regiones CA3 y CA1 (Huerta et al. 1993; Fisahn et al. 1998) aunque no fue reportado su efecto en el giro dentado. Estos protocolos reproducen propiedades de los ritmos observados in vivo y permitirían estudiar de que manera son reclutadas las neuronas nuevas a los mismos y evidenciar sutiles diferencias funcionales entre las distintas células granulares.

Se demostró en esta tesis que las neuronas generadas en la adultez son capaces de formar sinapsis funcionales excitatorias con interneuronas GABAérgicas de la capa granular y el hilus así como con células mossy. La actividad de estas sinapsis fue suprimida por la aplicación de agonistas metabotrópicos de glutamato. Estas propiedades no las distinguen de las fibras mossy de células granulares preexistentes, por lo que contribuyen a la convergencia de conectividad descrita en esta tesis. La caracterización de estas conexiones no se realizó sin embargo de manera comparativa entre las distintas poblaciones de células granulares, por lo que no puede excluirse la existencia de diferencias funcionales en este aspecto. Estas podrían residir en la amplitud, cinética o plasticidad de las sinapsis individuales o en la innervación de neuronas postsinápticas en distintas proporciones. No se pudo determinar el establecimiento de contactos monosinápticos sobre células piramidales por las dificultades técnicas asociadas. Estos contactos fueron observados por microscopía electrónica y quedan a la espera de su confirmación electrofisiológica (Toni et al. 2008). El sistema de estimulación por luz desarrollado presenta dificultades adicionales al estudio de plasticidad sináptica pues las células ChR2⁺ no fueron pasibles de ser activadas fidedignamente en respuesta a trenes de estímulos de más de 10 Hz. Este rango de frecuencias sería suficiente para la caracterización de

la plasticidad dependiente de frecuencia, propiedad distintiva de las fibras mossy, pero no de la plasticidad por pulso pareado o del LTP inducido por actividad de alta frecuencia. A su vez, la acumulación lenta de expresión funcional de ChR2 en las células infectadas no permitió estudiar las eferencias de neuronas de pocas semanas de vida, las cuales se sabe extienden ya axones hacia el hilus y CA3. El desarrollo de un sistema de expresión más fuerte para ChR2 sería necesario para encarar estas preguntas. Se construyó ya en el laboratorio una nueva variante retroviral en la que se reemplaza el gen original del canal por una versión “humanizada”, cuya secuencia está optimizada de acuerdo con el uso de codones preferencial en mamíferos, que está siendo actualmente analizada.

La estrategia desarrollada permitiría en principio controlar la actividad de las neuronas nuevas in vivo mediante el implante de fibras ópticas en el giro dentado de ratones infectados. Esto permitiría evaluar las consecuencias comportamentales de la activación específica de esta población de células (Adamantidis et al. 2007; Bernstein et al. 2008; Huber et al. 2008). Alternativamente, la construcción de retrovirus que expresen el canal de Cl^- activable por luz NpHR (Zhang et al. 2007) permitiría silenciar rápida y reversiblemente la actividad de estas neuronas y estudiar así su relevancia en la codificación y expresión de memorias u otros comportamientos dependientes del giro dentado. El retrovirus permite transducir sin embargo sólo una fracción de las neuronas adultas, lo cual debe ser considerado al interpretar este tipo de experimentos. Por último, la expresión retroviral de ChR2 podría asistir al registro de actividad in vivo de las neuronas nuevas. Como se mencionó, el principal desafío de este tipo de experimentos es la identificación de estas neuronas en el animal intacto. La combinación de registros intracelulares o por multielectrodos extracelulares con el implante de fibras ópticas podría identificar a las neuronas nuevas como aquellas que responden inmediatamente a la aplicación de pulsos de luz con despolarización o potencial de acción, dependiendo del sistema de registro electrofisiológico. El uso de multielectrodos tiene la ventaja de acelerar el

muestreo de la población de células granulares mientras que el uso de microelectrodos intracelulares facilita la identificación inequívoca de neuronas ChR2⁺.

ABREVIATURAS

bmi, bicuculline methiodide; ChR2, Channelrhodopsin-2; GABA, ácido gamma aminobutírico; E_{GABA} , potencial de reversión de IPSCs; EPSC, corriente excitatoria postsináptica; GC, célula granular; GCL, capa granular; G_{GABA} , conductancia de IPSCs; IPSC, corriente inhibitoria postsináptica; kyn, ácido kinurénico; LTD, depresión de largo plazo; LTP, potenciación de largo plazo; MC, célula mossy; ML, capa molecular; PA, potencial de acción; PC, célula piramidal; V_{hold} , potencial de *holding*.

BIBLIOGRAFÍA

- Abraham, W. C. and McNaughton, N. (1984). "Differences in synaptic transmission between medial and lateral components of the perforant path." Brain Res. **303**(2): 251-260.
- Acsady, L. and Kali, S. (2007). "Models, structure, function: the transformation of cortical signals in the dentate gyrus." Prog Brain Res **163**: 577-99.
- Acsady, L., Kamondi, A., et al. (1998). "GABAergic cells are the major postsynaptic targets of mossy fibers in the rat hippocampus." J. Neurosci. **18**(9): 3386-3403.
- Adamantidis, A. R., Zhang, F., et al. (2007). "Neural substrates of awakening probed with optogenetic control of hypocretin neurons." Nature **450**(7168): 420-4.
- Altman, J. (1963). "Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats." Anat Rec **145**: 573-91.
- Altman, J. and Bayer, S. A. (1990). "Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods." J Comp Neurol **301**(3): 365-81.
- Altman, J. and Bayer, S. A. (1990). "Mosaic organization of the hippocampal neuroepithelium and the multiple germinal sources of dentate granule cells." J Comp Neurol **301**(3): 325-42.
- Altman, J. and Das, G. D. (1965). "Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats." J Comp Neurol **124**(3): 319-35.
- Alvarez, P. and Squire, L. R. (1994). "Memory consolidation and the medial temporal lobe: a simple network model." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(15): 7041-5.
- Amaral, D. G. (1978). "A Golgi study of cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat." J Comp Neurol **182**(4 Pt 2): 851-914.
- Amaral, D. G., Ishizuka, N., et al. (1990). "Neurons, numbers and the hippocampal network." Prog Brain Res **83**: 1-11.
- Andersen, P., Bliss, T. V., et al. (1969). "Lamellar organization of hippocampal excitatory pathways." Acta Physiol Scand **76**(1): 4A-5A.
- Angevine, J. B., Jr. (1965). "Time of neuron origin in the hippocampal region. An autoradiographic study in the mouse." Exp Neurol Suppl: Suppl 2:1-70.
- Atherton, J. F. and Bevan, M. D. (2005). "Ionic mechanisms underlying autonomous action potential generation in the somata and dendrites of GABAergic substantia nigra pars reticulata neurons in vitro." J Neurosci **25**(36): 8272-81.
- Banks, M. I., Hardie, J. B., et al. (2002). "Development of GABA(A) receptor-mediated inhibitory postsynaptic currents in hippocampus." J. Neurophysiol. **88**(6): 3097-3107.
- Banks, M. I., Li, T. B., et al. (1998). "The synaptic basis of GABA_A,slow." J. Neurosci. **18**(4): 1305-1317.

- Barry, P. H. and Lynch, J. W. (1991). "Liquid junction potentials and small cell effects in patch-clamp analysis." J Membr Biol **121**(2): 101-17.
- Bayer, S. A. (1980). "Development of the hippocampal region in the rat. I. Neurogenesis examined with 3H-thymidine autoradiography." J Comp Neurol **190**(1): 87-114.
- Bayer, S. A., Yackel, J. W., et al. (1982). "Neurons in the rat dentate gyrus granular layer substantially increase during juvenile and adult life." Science **216**(4548): 890-2.
- Becker, S. (2005). "A computational principle for hippocampal learning and neurogenesis." Hippocampus **15**(6): 722-38.
- Ben-Ari, Y., Khalilov, I., et al. (2004). "Interneurons set the tune of developing networks." Trends Neurosci **27**(7): 422-7.
- Bernstein, J. G., Han, X., et al. (2008). "Prosthetic systems for therapeutic optical activation and silencing of genetically-targeted neurons." Proc Soc Photo Opt Instrum Eng **6854**: 68540H.
- Bliss, T. V. and Lomo, T. (1973). "Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path." J Physiol **232**(2): 331-56.
- Boss, B. D., Peterson, G. M., et al. (1985). "On the number of neurons in the dentate gyrus of the rat." Brain Res **338**(1): 144-50.
- Boyden, E. S., Zhang, F., et al. (2005). "Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity." Nat Neurosci **8**(9): 1263-8.
- Bragin, A., Jando, G., et al. (1995). "Gamma (40-100 Hz) oscillation in the hippocampus of the behaving rat." J Neurosci **15**(1 Pt 1): 47-60.
- Burd, G. D. and Nottebohm, F. (1985). "Ultrastructural characterization of synaptic terminals formed on newly generated neurons in a song control nucleus of the adult canary forebrain." J Comp Neurol **240**(2): 143-52.
- Burrone, J., O'Byrne, M., et al. (2002). "Multiple forms of synaptic plasticity triggered by selective suppression of activity in individual neurons." Nature **420**(6914): 414-8.
- Cahalan, M. and Neher, E. (1992). "Patch clamp techniques: an overview." Methods Enzymol **207**: 3-14.
- Cameron, H. A. and McKay, R. D. (2001). "Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus." J Comp Neurol **435**(4): 406-417.
- Campbell, R. E., Tour, O., et al. (2002). "A monomeric red fluorescent protein." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(12): 7877-82.
- Claiborne, B. J., Amaral, D. G., et al. (1986). "A light and electron microscopic analysis of the mossy fibers of the rat dentate gyrus." J Comp Neurol **246**(4): 435-58.
- Cobb, S. R., Buhl, E. H., et al. (1995). "Synchronization of neuronal activity in hippocampus by individual GABAergic interneurons." Nature **378**(6552): 75-8.

- Colino, A. and Malenka, R. C. (1993). "Mechanisms underlying induction of long-term potentiation in rat medial and lateral perforant paths in vitro." J. Neurophysiol. **69**(4): 1150-1159.
- Crespo, D., Stanfield, B. B., et al. (1986). "Evidence that late-generated granule cells do not simply replace earlier formed neurons in the rat dentate gyrus." Exp Brain Res **62**(3): 541-8.
- Csicsvari, J., Jamieson, B., et al. (2003). "Mechanisms of gamma oscillations in the hippocampus of the behaving rat." Neuron **37**(2): 311-22.
- Chawla, M. K., Guzowski, J. F., et al. (2005). "Sparse, environmentally selective expression of Arc RNA in the upper blade of the rodent fascia dentata by brief spatial experience." Hippocampus **15**(5): 579-86.
- D'Antuono, M., de Guzman, P., et al. (2005). "Ripple activity in the dentate gyrus of disinhibited hippocampus-entorhinal cortex slices." J Neurosci Res **80**(1): 92-103.
- Desmond, N. L., Colbert, C. M., et al. (1991). "NMDA receptor antagonists block the induction of long-term depression in the hippocampal dentate gyrus of the anesthetized rat." Brain Res **552**(1): 93-8.
- Dodt, H. U., Eder, M., et al. (2002). "Infrared-guided laser stimulation of neurons in brain slices." Sci STKE **2002**(120): PL2.
- Dudek, F. E. and Sutula, T. P. (2007). "Epileptogenesis in the dentate gyrus: a critical perspective." Prog Brain Res **163**: 755-73.
- Dupret, D., Fabre, A., et al. (2007). "Spatial learning depends on both the addition and removal of new hippocampal neurons." PLoS Biol **5**(8): e214.
- Eichenbaum, H., Dudchenko, P., et al. (1999). "The hippocampus, memory, and place cells: is it spatial memory or a memory space?" Neuron **23**(2): 209-26.
- Enikolopov, G. and Overstreet-Wadiche, L. (2008). "The Use of Reporter Mouse Lines to Study Adult Neurogenesis." Cold Spring Harbor monograph series.(52): 81-100.
- Eriksson, P. S., Perfilieva, E., et al. (1998). "Neurogenesis in the adult human hippocampus." Nat Med **4**(11): 1313-7.
- Esposito, M. S., Piatti, V. C., et al. (2005). "Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development." J Neurosci **25**(44): 10074-86.
- Fisahn, A., Pike, F. G., et al. (1998). "Cholinergic induction of network oscillations at 40 Hz in the hippocampus in vitro." Nature **394**(6689): 186-9.
- Freund, T. F. and Buzsaki, G. (1996). "Interneurons of the hippocampus." Hippocampus **6**(4): 347-470.
- Frotscher, M. and Leranth, C. (1985). "Cholinergic innervation of the rat hippocampus as revealed by choline acetyltransferase immunocytochemistry: a combined light and electron microscopic study." J Comp Neurol **239**(2): 237-46.
- Gage, F., Kempermann, G., et al. (2008). Adult neurogenesis. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Gage, F. H. (2000). "Mammalian neural stem cells." Science **287**(5457): 1433-8.
- Ge, S., Goh, E. L., et al. (2006). "GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain." Nature **439**(7076): 589-93.
- Ge, S., Yang, C. H., et al. (2007). "A critical period for enhanced synaptic plasticity in newly generated neurons of the adult brain." Neuron **54**(4): 559-66.
- Gilbert, P. E., Kesner, R. P., et al. (2001). "Dissociating hippocampal subregions: double dissociation between dentate gyrus and CA1." Hippocampus **11**(6): 626-36.
- Gross, C. G. (2000). "Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma." Nat Rev Neurosci **1**(1): 67-73.
- Gutierrez, R. (2000). "Seizures induce simultaneous GABAergic and glutamatergic transmission in the dentate gyrus-CA3 system." J Neurophysiol **84**(6): 3088-90.
- Gutierrez, R., Romo-Parra, H., et al. (2003). "Plasticity of the GABAergic phenotype of the "glutamatergic" granule cells of the rat dentate gyrus." J. Neurosci. **23**(13): 5594-5598.
- Hafting, T., Fyhn, M., et al. (2005). "Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex." Nature **436**(7052): 801-6.
- Hall, B. J. and Ghosh, A. (2008). "Regulation of AMPA receptor recruitment at developing synapses." Trends Neurosci **31**(2): 82-9.
- Henze, D. A., Borhegyi, Z., et al. (2000). "Intracellular features predicted by extracellular recordings in the hippocampus in vivo." J Neurophysiol **84**(1): 390-400.
- Henze, D. A., Wittner, L., et al. (2002). "Single granule cells reliably discharge targets in the hippocampal CA3 network in vivo." Nat. Neurosci. **5**(8): 790-795.
- Hille, B. (1992). Ionic channels of excitable membranes. Sunderland, Mass., Sinauer Associates.
- Holtmaat, A., Wilbrecht, L., et al. (2006). "Experience-dependent and cell-type-specific spine growth in the neocortex." Nature **441**(7096): 979-83.
- Hollrigel, G. S., Ross, S. T., et al. (1998). "Temporal patterns and depolarizing actions of spontaneous GABAA receptor activation in granule cells of the early postnatal dentate gyrus." J. Neurophysiol. **80**(5): 2340-2351.
- Hollrigel, G. S. and Soltesz, I. (1997). "Slow kinetics of miniature IPSCs during early postnatal development in granule cells of the dentate gyrus." J. Neurosci. **17**(13): 5119-5128.
- Houser, C. R. (2007). "Interneurons of the dentate gyrus: an overview of cell types, terminal fields and neurochemical identity." Prog Brain Res **163**: 217-32.
- Huber, D., Petreanu, L., et al. (2008). "Sparse optical microstimulation in barrel cortex drives learned behaviour in freely moving mice." Nature **451**(7174): 61-4.
- Huerta, P. T. and Lisman, J. E. (1993). "Heightened synaptic plasticity of hippocampal CA1 neurons during a cholinergically induced rhythmic state." Nature **364**(6439): 723-5.
- Ishizuka, S. and Kosaka, T. (1998). "Physiological properties of mouse hippocampal mossy cells." Neuroreport **9**(2): 193-9.

- Jaffe, D. B. and Gutierrez, R. (2007). "Mossy fiber synaptic transmission: communication from the dentate gyrus to area CA3." Prog Brain Res **163**: 109-32.
- Jakubs, K., Nanobashvili, A., et al. (2006). "Environment matters: synaptic properties of neurons born in the epileptic adult brain develop to reduce excitability." Neuron **52**(6): 1047-59.
- Jarolimek, W., Lewen, A., et al. (1999). "A furosemide-sensitive K⁺-Cl⁻ cotransporter counteracts intracellular Cl⁻ accumulation and depletion in cultured rat midbrain neurons." J Neurosci **19**(12): 4695-704.
- Jensen, O. and Lisman, J. E. (2000). "Position reconstruction from an ensemble of hippocampal place cells: contribution of theta phase coding." J Neurophysiol **83**(5): 2602-9.
- Johnston, D. and Amaral, D. G. (1998). Hippocampus. The Synaptic Organization of the Brain. G. M. Shepherd. New York, Oxford University Press: 417-458.
- Jonas, P., Major, G., et al. (1993). "Quantal components of unitary EPSCs at the mossy fibre synapse on CA3 pyramidal cells of rat hippocampus." J Physiol **472**: 615-63.
- Jung, K. H., Chu, K., et al. (2004). "Continuous cytosine-b-D-arabinofuranoside infusion reduces ectopic granule cells in adult rat hippocampus with attenuation of spontaneous recurrent seizures following pilocarpine-induced status epilepticus." Eur J Neurosci **19**(12): 3219-26.
- Jung, M. W. and McNaughton, B. L. (1993). "Spatial selectivity of unit activity in the hippocampal granular layer." Hippocampus **3**(2): 165-82.
- Kahana, M. J., Seelig, D., et al. (2001). "Theta returns." Curr Opin Neurobiol **11**(6): 739-44.
- Kaila, K. (1994). "Ionic basis of GABAA receptor channel function in the nervous system." Prog Neurobiol **42**(4): 489-537.
- Kamiya, H., Shinozaki, H., et al. (1996). "Activation of metabotropic glutamate receptor type 2/3 suppresses transmission at rat hippocampal mossy fibre synapses." J Physiol **493** (Pt 2): 447-55.
- Kaplan, M. S. and Bell, D. H. (1984). "Mitotic neuroblasts in the 9-day-old and 11-month-old rodent hippocampus." J Neurosci **4**(6): 1429-41.
- Kaplan, M. S. and Hinds, J. W. (1977). "Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs." Science **197**(4308): 1092-4.
- Kee, N., Teixeira, C. M., et al. (2007). "Preferential incorporation of adult-generated granule cells into spatial memory networks in the dentate gyrus." Nat Neurosci **10**(3): 355-62.
- Kempermann, G., Gast, D., et al. (2003). "Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice." Development **130**(2): 391-399.
- Kempermann, G., Kuhn, H. G., et al. (1997). "More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment." Nature **386**(6624): 493-5.
- Kempermann, G., Kuhn, H. G., et al. (1998). "Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus." J Neurosci **18**(9): 3206-3212.

- Khirug, S., Huttu, K., et al. (2005). "Distinct properties of functional KCC2 expression in immature mouse hippocampal neurons in culture and in acute slices." Eur J Neurosci **21**(4): 899-904.
- Kneisler, T. B. and Dingledine, R. (1995). "Spontaneous and synaptic input from granule cells and the perforant path to dentate basket cells in the rat hippocampus." Hippocampus **5**(3): 151-64.
- Konopacki, J., MacIver, M. B., et al. (1987). "Carbachol-induced EEG 'theta' activity in hippocampal brain slices." Brain Res **405**(1): 196-8.
- Kornack, D. R. and Rakic, P. (1999). "Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(10): 5768-73.
- Kuhn, H. G., Dickinson-Anson, H., et al. (1996). "Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation." J Neurosci **16**(6): 2027-33.
- Lee, D. W., Miyasato, L. E., et al. (1998). "Neurobiological bases of spatial learning in the natural environment: neurogenesis and growth in the avian and mammalian hippocampus." Neuroreport **9**(7): R15-27.
- Leranth, C. and Hajszan, T. (2007). "Extrinsic afferent systems to the dentate gyrus." Prog Brain Res **163**: 63-84.
- Leuner, B., Gould, E., et al. (2006). "Is there a link between adult neurogenesis and learning?" Hippocampus **16**(3): 216-24.
- Leutgeb, J. K., Leutgeb, S., et al. (2007). "Pattern separation in the dentate gyrus and CA3 of the hippocampus." Science **315**(5814): 961-6.
- Leutgeb, S., Leutgeb, J. K., et al. (2005). "Independent codes for spatial and episodic memory in hippocampal neuronal ensembles." Science **309**(5734): 619-23.
- Lever, C., Wills, T., et al. (2002). "Long-term plasticity in hippocampal place-cell representation of environmental geometry." Nature **416**(6876): 90-4.
- Lewis, P. F. and Emerman, M. (1994). "Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus." J Virol **68**(1): 510-6.
- Li, X., Gutierrez, D. V., et al. (2005). "Fast noninvasive activation and inhibition of neural and network activity by vertebrate rhodopsin and green algae channelrhodopsin." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(49): 17816-21.
- Lindvall, O. and Kokaia, Z. (2008). "Neurogenesis following Stroke Affecting the Adult Brain." Cold Spring Harbor monograph series.(52): 549-570.
- Lisman, J. E. (1999). "Relating hippocampal circuitry to function: recall of memory sequences by reciprocal dentate-CA3 interactions." Neuron **22**(2): 233-42.
- Lisman, J. E. and Idiart, M. A. (1995). "Storage of 7 +/- 2 short-term memories in oscillatory subcycles." Science **267**(5203): 1512-5.
- Lois, C. and Alvarez-Buylla, A. (1993). "Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(5): 2074-7.

- Lopez-Garcia, C., Molowny, A., et al. (2002). "The lizard cerebral cortex as a model to study neuronal regeneration." An Acad Bras Cienc **74**(1): 85-104.
- Maccaferri, G., Toth, K., et al. (1998). "Target-specific expression of presynaptic mossy fiber plasticity." Science **279**(5355): 1368-1370.
- Maguire, E. A., Gadian, D. G., et al. (2000). "Navigation-related structural change in the hippocampi of taxi drivers." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(8): 4398-403.
- Markakis, E. A. and Gage, F. H. (1999). "Adult-generated neurons in the dentate gyrus send axonal projections to field CA3 and are surrounded by synaptic vesicles." J Comp Neurol **406**(4): 449-60.
- Markram, H., Toledo-Rodriguez, M., et al. (2004). "Interneurons of the neocortical inhibitory system." Nat Rev Neurosci **5**(10): 793-807.
- Marr, D. (1971). "Simple memory: a theory for archicortex." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **262**(841): 23-81.
- Mayer, M. L., Westbrook, G. L., et al. (1984). "Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones." Nature **309**(5965): 261-3.
- McCloskey, D. P., Hintz, T. M., et al. (2006). "Stereological methods reveal the robust size and stability of ectopic hilar granule cells after pilocarpine-induced status epilepticus in the adult rat." Eur J Neurosci **24**(8): 2203-10.
- McNaughton, B. L. (1980). "Evidence for two physiologically distinct perforant pathways to the fascia dentata." Brain Res. **199**(1): 1-19.
- McNaughton, B. L. and Barnes, C. A. (1977). "Physiological identification and analysis of dentate granule cell responses to stimulation of the medial and lateral perforant pathways in the rat." J.Comp Neurol. **175**(4): 439-454.
- McNaughton, B. L., Douglas, R. M., et al. (1978). "Synaptic enhancement in fascia dentata: cooperativity among coactive afferents." Brain Res. **157**(2): 277-293.
- McNaughton, B. L. and Morris, R. G. M. (1987). "Hippocampal synaptic enhancement and information storage within a distributed memory system." Trends Neurosci **10**(10).
- McHugh, T. J., Jones, M. W., et al. (2007). "Dentate gyrus NMDA receptors mediate rapid pattern separation in the hippocampal network." Science **317**(5834): 94-9.
- Meltzer, L. A., Yabaluri, R., et al. (2005). "A role for circuit homeostasis in adult neurogenesis." Trends Neurosci **28**(12): 653-60.
- Miles, R., Toth, K., et al. (1996). "Differences between somatic and dendritic inhibition in the hippocampus." Neuron **16**(4): 815-823.
- Miles, R. and Wong, R. K. (1986). "Excitatory synaptic interactions between CA3 neurones in the guinea-pig hippocampus." J Physiol **373**: 397-418.
- Montagnese, C. M., Geneser, F. A., et al. (1993). "Histochemical distribution of zinc in the brain of the zebra finch (*Taenopygia guttata*)." Anat Embryol (Berl) **188**(2): 173-87.
- Mori, M., Abegg, M. H., et al. (2004). "A frequency-dependent switch from inhibition to excitation in a hippocampal unitary circuit." Nature **431**(7007): 453-6.

- Mott, D. D., Turner, D. A., et al. (1997). "Interneurons of the dentate-hilus border of the rat dentate gyrus: morphological and electrophysiological heterogeneity." J.Neurosci. **17**(11): 3990-4005.
- Nagel, G., Szellas, T., et al. (2003). "Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(24): 13940-5.
- Nicoll, R. A. and Schmitz, D. (2005). "Synaptic plasticity at hippocampal mossy fibre synapses." Nat Rev Neurosci **6**(11): 863-76.
- Nowak, L., Bregestovski, P., et al. (1984). "Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones." Nature **307**(5950): 462-5.
- Nusser, Z. and Mody, I. (2002). "Selective modulation of tonic and phasic inhibitions in dentate gyrus granule cells." J Neurophysiol **87**(5): 2624-8.
- O'Keefe, J. and Nadel, L. (1978). The Hippocampus as a Cognitive Map, Oxford University Press.
- Orr, G., Rao, G., et al. (2001). "Hippocampal synaptic plasticity is modulated by theta rhythm in the fascia dentata of adult and aged freely behaving rats." Hippocampus **11**(6): 647-54.
- Parra, P., Gulyas, A. I., et al. (1998). "How many subtypes of inhibitory cells in the hippocampus?" Neuron **20**(5): 983-93.
- Patel, S. N., Clayton, N. S., et al. (1997). "Spatial learning induces neurogenesis in the avian brain." Behav Brain Res **89**(1-2): 115-28.
- Paton, J. A. and Nottebohm, F. N. (1984). "Neurons generated in the adult brain are recruited into functional circuits." Science **225**(4666): 1046-1048.
- Pearce, R. A. (1993). "Physiological evidence for two distinct GABAA responses in rat hippocampus." Neuron **10**(2): 189-200.
- Pelkey, K. A. and McBain, C. J. (2008). "Target-cell-dependent plasticity within the mossy fibre-CA3 circuit reveals compartmentalized regulation of presynaptic function at divergent release sites." J Physiol **586**(6): 1495-1502.
- Piatti, V. C., Esposito, M. S., et al. (2006). "The timing of neuronal development in adult hippocampal neurogenesis." Neuroscientist **12**(6): 463-8.
- Piguet, P. (1993). "GABAA- and GABAB-mediated inhibition in the rat dentate gyrus in vitro." Epilepsy Res **16**(2): 111-22.
- Poschel, B., Draguhn, A., et al. (2002). "Glutamate-induced gamma oscillations in the dentate gyrus of rat hippocampal slices." Brain Res **938**(1-2): 22-8.
- Poschel, B., Heinemann, U., et al. (2003). "High frequency oscillations in the dentate gyrus of rat hippocampal slices induced by tetanic stimulation." Brain Res **959**(2): 320-7.
- Pouille, F. and Scanziani, M. (2001). "Enforcement of temporal fidelity in pyramidal cells by somatic feed-forward inhibition." Science **293**(5532): 1159-63.
- Pruss, H., Derst, C., et al. (2005). "Differential distribution of individual subunits of strongly inwardly rectifying potassium channels (Kir2 family) in rat brain." Brain Res Mol Brain Res **139**(1): 63-79.

- Rahimi, O. and Claiborne, B. J. (2007). "Morphological development and maturation of granule neuron dendrites in the rat dentate gyrus." Prog Brain Res **163**: 167-81.
- Rakic, P. (1985). "Limits of neurogenesis in primates." Science **227**(4690): 1054-6.
- Ramirez-Amaya, V., Marrone, D. F., et al. (2006). "Integration of new neurons into functional neural networks." J Neurosci **26**(47): 12237-41.
- Ramón y Cajal, S. (1913). Estudios sobre la degeneración y regeneración del sistema nervioso. Madrid, Imprenta de Hijos de Nicolás Moya.
- Rapp, P. R. and Gallagher, M. (1996). "Preserved neuron number in the hippocampus of aged rats with spatial learning deficits." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(18): 9926-30.
- Ratzliff, A. H., Howard, A. L., et al. (2004). "Rapid deletion of mossy cells does not result in a hyperexcitable dentate gyrus: implications for epileptogenesis." J Neurosci **24**(9): 2259-69.
- Reynolds, B. A. and Weiss, S. (1992). "Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system." Science **255**(5052): 1707-10.
- Salin, P. A., Scanziani, M., et al. (1996). "Distinct short-term plasticity at two excitatory synapses in the hippocampus." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(23): 13304-9.
- Scoville, W. B. and Milner, B. (1957). "Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions." J Neurol Neurosurg Psychiatry **20**(1): 11-21.
- Scharfman, H. E. (1992). "Differentiation of rat dentate neurons by morphology and electrophysiology in hippocampal slices: granule cells, spiny hilar cells and aspiny 'fast-spiking' cells." Epilepsy Res Suppl **7**: 93-109.
- Scharfman, H. E. (1993). "Activation of dentate hilar neurons by stimulation of the fimbria in rat hippocampal slices." Neurosci Lett **156**(1-2): 61-6.
- Scharfman, H. E. (1993). "Characteristics of spontaneous and evoked EPSPs recorded from dentate spiny hilar cells in rat hippocampal slices." J Neurophysiol **70**(2): 742-57.
- Scharfman, H. E. (1994). "Evidence from simultaneous intracellular recordings in rat hippocampal slices that area CA3 pyramidal cells innervate dentate hilar mossy cells." J Neurophysiol **72**(5): 2167-80.
- Scharfman, H. E. (1995). "Electrophysiological evidence that dentate hilar mossy cells are excitatory and innervate both granule cells and interneurons." J Neurophysiol **74**(1): 179-94.
- Scharfman, H. E. (1999). "The role of nonprincipal cells in dentate gyrus excitability and its relevance to animal models of epilepsy and temporal lobe epilepsy." Adv Neurol **79**: 805-20.
- Scharfman, H. E. and Gray, W. P. (2007). "Relevance of seizure-induced neurogenesis in animal models of epilepsy to the etiology of temporal lobe epilepsy." Epilepsia **48 Suppl 2**: 33-41.
- Scharfman, H. E., Kunkel, D. D., et al. (1990). "Synaptic connections of dentate granule cells and hilar neurons: results of paired intracellular recordings and intracellular horseradish peroxidase injections." Neuroscience **37**(3): 693-707.

- Scharfman, H. E. and Schwartzkroin, P. A. (1988). "Electrophysiology of morphologically identified mossy cells of the dentate hilus recorded in guinea pig hippocampal slices." J Neurosci **8**(10): 3812-21.
- Scharfman, H. E., Sollas, A. L., et al. (2003). "Electrophysiological evidence of monosynaptic excitatory transmission between granule cells after seizure-induced mossy fiber sprouting." J Neurophysiol **90**(4): 2536-47.
- Schlessinger, A. R., Cowan, W. M., et al. (1975). "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 **159**(2): 149-75.
- Schlessinger, A. R., Cowan, W. M., et al. (1978). "The time of origin of neurons in Ammon's horn and the associated retrohippocampal fields." Anat Embryol (Berl) **154**(2): 153-73.
- Schmidt-Hieber, C., Jonas, P., et al. (2007). "Subthreshold dendritic signal processing and coincidence detection in dentate gyrus granule cells." J Neurosci **27**(31): 8430-41.
- Soltesz, I., Smetters, D. K., et al. (1995). "Tonic inhibition originates from synapses close to the soma." Neuron **14**(6): 1273-83.
- Somogyi, P. and Klausberger, T. (2005). "Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus." J Physiol **562**(Pt 1): 9-26.
- Soriano, E., Cobas, A., et al. (1986). "Asynchronism in the neurogenesis of GABAergic and non-GABAergic neurons in the mouse hippocampus." Brain Res **395**(1): 88-92.
- Standen, N. B. and Stanfield, P. R. (1978). "A potential- and time-dependent blockade of inward rectification in frog skeletal muscle fibres by barium and strontium ions." J Physiol **280**: 169-91.
- Sutula, T. P. and Dudek, F. E. (2007). "Unmasking recurrent excitation generated by mossy fiber sprouting in the epileptic dentate gyrus: an emergent property of a complex system." Prog Brain Res **163**: 541-63.
- Tashiro, A., Makino, H., et al. (2007). "Experience-specific functional modification of the dentate gyrus through adult neurogenesis: a critical period during an immature stage." J Neurosci **27**(12): 3252-9.
- Toni, N., Laplagne, D. A., et al. (2008). "Neurons born in the adult dentate gyrus form functional synapses with target cells." Nat Neurosci (en prensa).
- Toni, N., Teng, E. M., et al. (2007). "Synapse formation on neurons born in the adult hippocampus." Nat Neurosci **10**(6): 727-34.
- Toth, K., Soares, G., et al. (2000). "Differential mechanisms of transmission at three types of mossy fiber synapse." J Neurosci **20**(22): 8279-89.
- Towers, S. K., LeBeau, F. E., et al. (2002). "Fast network oscillations in the rat dentate gyrus in vitro." J Neurophysiol **87**(2): 1165-8.
- Traub, R. D. and Miles, R. (1991). Neuronal networks of the hippocampus. Cambridge; New York, Cambridge University Press.
- Treves, A. and Rolls, E. T. (1992). "Computational constraints suggest the need for two distinct input systems to the hippocampal CA3 network." Hippocampus **2**(2): 189-99.

- Treves, A., Tashiro, A., et al. (2008). "What is the mammalian dentate gyrus good for?" (en prensa).
- Turrigiano, G. (2007). "Homeostatic signaling: the positive side of negative feedback." Curr Opin Neurobiol **17**(3): 318-24.
- Turrigiano, G. G., Leslie, K. R., et al. (1998). "Activity-dependent scaling of quantal amplitude in neocortical neurons." Nature **391**(6670): 892-6.
- Turrigiano, G. G. and Nelson, S. B. (2004). "Homeostatic plasticity in the developing nervous system." Nat Rev Neurosci **5**(2): 97-107.
- Uchigashima, M., Fukaya, M., et al. (2007). "Evidence against GABA release from glutamatergic mossy fiber terminals in the developing hippocampus." J Neurosci **27**(30): 8088-100.
- van Praag, H., Christie, B. R., et al. (1999). "Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **96**(23): 13427-13431.
- van Praag, H., Kempermann, G., et al. (1999). "Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus." Nat Neurosci **2**(3): 266-70.
- van Praag, H., Schinder, A. F., et al. (2002). "Functional neurogenesis in the adult hippocampus." Nature **415**(6875): 1030-1034.
- Vida, I., Bartos, M., et al. (2006). "Shunting inhibition improves robustness of gamma oscillations in hippocampal interneuron networks by homogenizing firing rates." Neuron **49**(1): 107-17.
- Walker, M. C., Ruiz, A., et al. (2001). "Monosynaptic GABAergic signaling from dentate to CA3 with a pharmacological and physiological profile typical of mossy fiber synapses." Neuron **29**(3): 703-715.
- Wang, X. J. and Buzsaki, G. (1996). "Gamma oscillation by synaptic inhibition in a hippocampal interneuronal network model." J Neurosci **16**(20): 6402-13.
- Watt, A. J., Sjostrom, P. J., et al. (2004). "A proportional but slower NMDA potentiation follows AMPA potentiation in LTP." Nat Neurosci **7**(5): 518-24.
- Watt, A. J., van Rossum, M. C., et al. (2000). "Activity coregulates quantal AMPA and NMDA currents at neocortical synapses." Neuron **26**(3): 659-70.
- White, J. A., Banks, M. I., et al. (2000). "Networks of interneurons with fast and slow gamma-aminobutyric acid type A (GABAA) kinetics provide substrate for mixed gamma-theta rhythm." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(14): 8128-33.
- Whittington, M. A. and Traub, R. D. (2003). "Interneuron diversity series: inhibitory interneurons and network oscillations in vitro." Trends Neurosci **26**(12): 676-82.
- Wiskott, L., Rasch, M. J., et al. (2006). "A functional hypothesis for adult hippocampal neurogenesis: avoidance of catastrophic interference in the dentate gyrus." Hippocampus **16**(3): 329-43.
- Witter, M. P., Groenewegen, H. J., et al. (1989). "Functional organization of the extrinsic and intrinsic circuitry of the parahippocampal region." Prog Neurobiol **33**(3): 161-253.

- Wu, G., Malinow, R., et al. (1996). "Maturation of a central glutamatergic synapse." Science **274**(5289): 972-6.
- Ye, G. L., Yi, S., et al. (2005). "AMPA and NMDA receptor-mediated currents in developing dentate gyrus granule cells." Brain Res Dev Brain Res **155**(1): 26-32.
- Zhang, F., Wang, L. P., et al. (2007). "Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry." Nature **446**(7136): 633-9.
- Zhang, W. and Linden, D. J. (2003). "The other side of the engram: experience-driven changes in neuronal intrinsic excitability." Nat Rev Neurosci **4**(11): 885-900.
- Zhao, C., Deng, W., et al. (2008). "Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis." Cell **132**(4): 645-60.
- Zhao, C., Teng, E. M., et al. (2006). "Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus." J Neurosci **26**(1): 3-11.
- Zola-Morgan, S. M. and Squire, L. R. (1990). "The primate hippocampal formation: evidence for a time-limited role in memory storage." Science **250**(4978): 288-90.
- Zucker, R. S. and Regehr, W. G. (2002). "Short-term synaptic plasticity." Annu.Rev.Physiol **64**: 355-405.

PUBLICACIONES

Se destacan a continuación las publicaciones en revistas científicas internacionales con arbitraje que incluyen resultados reportados en la presente tesis.

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, 2008).

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

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

Esposito 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.

(* Estos autores contribuyeron en igual medida al trabajo)