

Tesis Doctoral

Estudio de los mecanismos de control de la maduración neuronal en el hipocampo adulto

Alvarez, Diego Damián

2017-07-07

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

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

Cita tipo APA:

Alvarez, Diego Damián. (2017-07-07). Estudio de los mecanismos de control de la maduración neuronal en el hipocampo adulto. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Alvarez, Diego Damián. "Estudio de los mecanismos de control de la maduración neuronal en el hipocampo adulto". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2017-07-07.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular

**Estudio de los mecanismos de control de la
maduración neuronal en el hipocampo adulto**

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

Diego Damian Alvarez

Director: **Alejandro F. Schinder**

Consejero de estudios: **Oswaldo D. Uchitel**

Lugar de trabajo: **Laboratorio de Plasticidad Neuronal
Fundación Instituto Leloir**

Buenos Aires, 2017

Estudio de los mecanismos de control de la maduración neuronal en el hipocampo adulto

Modificaciones dependientes de actividad en los circuitos neurales han sido ampliamente reportadas. En particular, la experiencia modifica la supervivencia, el desarrollo y la conectividad de las células granulares (CGs) nacidas en el hipocampo adulto; sin embargo, los mecanismos que median este fenómeno son poco conocidos. En esta tesis investigamos el remodelado de los microcircuitos del giro dentado (GD) en ratones expuestos a un ambiente enriquecido (AE). Una breve exposición a un AE en una ventana de tiempo restringida durante el desarrollo de las nuevas CGs aceleró su integración funcional, y este efecto correlacionó con un GD más activo. Esa integración funcional incrementada fue mimetizada por una activación quimiogénica *in vivo* de un pool de CGs maduras. Por técnicas de optogenética y electrofisiología *ex vivo* encontramos que las CGs maduras reclutan a las interneuronas parvalbumina (INs-PV), que a su vez contactan a las CGs en desarrollo. En concordancia, la estimulación quimiogénica de INs-PV o la despolarización directa de las CGs en desarrollo aceleró la integración funcional, mientras que la inactivación de las INs-PV previno los efectos del AE. Nuestros resultados revelan un mecanismo de remodelado dinámico por el cual la experiencia activa el circuito del GD, lo que determina una maduración acelerada de las CGs jóvenes a través un loop disináptico de feedback mediado por las INs-PV.

Palabras clave: Neurogénesis adulta – Hipocampo – Plasticidad neuronal – Microscopia confocal – Quimiogénica

Mechanisms controlling neuronal maturation in the adult hippocampus

Activity-dependent modifications in neural circuits have been widely reported. In particular, experience shapes the development and connectivity of adult-born granule cells (GCs) in the hippocampus; however, the mechanisms leading this process are still poorly understood. In this thesis we examined the remodeling of dentate gyrus microcircuits in mice in an enriched environment (EE). Short exposure to EE during early development of new GCs accelerated their functional integration, and this effect was correlated with increased activity in the dentate networks. Increased functional integration was mimicked by *in vivo* chemogenetic activation of a limited population of mature GCs. Slice recordings showed that mature GCs recruit parvalbumin interneurons (PV-INs) that feed back onto developing GCs. Accordingly, chemogenetic stimulation of PV-INs or direct depolarization of developing GCs accelerated GC integration, whereas inactivation of PV-INs prevented the effects of EE. Our results reveal a mechanism for dynamic remodeling in which experience activates dentate networks that “prime” young GCs through a disynaptic feedback loop mediated by PV-INs.

Key words: Adult neurogenesis – Hippocampus – Neuronal plasticity –Confocal microscopy – Chemogenetic

Índice

Introducción general	8
Estructura del hipocampo.....	10
El giro dentado, sustrato de la neurogénesis hipocampal.....	11
Funciones del hipocampo.....	14
Rol funcional de la neurogénesis en el hipocampo adulto.....	16
Capítulo I: Caracterización de la línea murina genéticamente modificada Ascl1^{CreERT2} para marcar neurogénesis adulta	
Introducción.....	18
Objetivo y estrategia experimental.....	19
Caracterización morfológica y análisis de determinantes fenotípicos tempranos en las células Tom ⁺ del ratón Ascl1 ^{CreERT2}	21
Caracterización electrofisiológica y expresión de marcadores de maduración en las células Tom ⁺ en el giro dentado.....	23
Discusión.....	26
Capítulo II: Mecanismos de control de la maduración neuronal	
Introducción.....	28
Parte 1: Rol del microambiente hipocampal en la modulación de la neurogénesis adulta	
Objetivos.....	30
El ejercicio voluntario como estímulo de la maduración neuronal.....	30
El ambiente enriquecido y la neurogénesis adulta: efectos sobre la maduración y supervivencia neuronal.....	35
Efecto del AE en las propiedades funcionales de las neuronas en desarrollo.....	41
Rol de la activación del GD en el proceso de desarrollo neuronal.....	43
Discusión.....	46
Parte 2: Integración funcional de las nuevas CGs: Mecanismos	
Objetivos e hipótesis.....	49
Activación optogenética de neuronas maduras en el giro dentado.....	49
Las interneuronas PV conectan las neuronas maduras con las CGs en desarrollo.....	51
Activación de las interneuronas parvalbumina por AE.....	55
Activación quimiogénica in vivo de las interneuronas parvalbumina.....	58
Bloqueo quimiogénico de la liberación de GABA en el GD: rol de las IN-PV en la integración funcional dependiente de AE.....	59
Efecto de la activación intrínseca en las neuronas en desarrollo.....	61
Discusión.....	65
Discusión general	69

Métodos

Producción de los vectores virales.....	71
Líneas murinas genéticamente modificadas.....	72
Marcado neuronal por BrdU.....	73
Cirugía estereotáxica.....	73
Perfusión y corte.....	74
Inmunofluorescencia.....	75
Microscopía confocal.....	76
Ensayos in vivo.....	77
Electrofisiología.....	79
Análisis estadístico.....	81

Bibliografía.....	82
--------------------------	-----------

Trabajos publicados en el marco de esta tesis.....	92
---	-----------

Introducción general

El sistema nervioso central de los mamíferos es una estructura biológica compleja en términos de su arquitectura celular, redes neurales e integración funcional, que se desarrolla anatómica y funcionalmente durante el período embrionario y perinatal. Durante gran parte del siglo pasado, se pensó que el cerebro adulto perdía la capacidad de generar nuevas neuronas luego de ese período. Utilizando timidina tritiada, Altman y colaboradores presentaron las primeras evidencias anatómicas de nuevas neuronas en el hipocampo de ratas adultas (Altman 1969, Altman & Das 1965). Kaplan y colaboradores demostraron luego que las nuevas neuronas en el hipocampo sobrevivían largos períodos de tiempo y parecían recibir contactos sinápticos (Kaplan & Bell 1983, Kaplan & Hinds 1977). Paralelamente, Nottebohm y colaboradores proveían evidencias del rol funcional de la neurogénesis postnatal para el aprendizaje en aves cantoras (Nottebohm 2004). El desarrollo de nuevas técnicas y herramientas moleculares tuvo como resultado una explosión de investigaciones que confirmaron que la neurogénesis, la generación e integración de nuevas neuronas, ocurre constitutivamente en dos regiones del cerebro adulto de los mamíferos: en las paredes laterales del ventrículo lateral y en el giro dentado del hipocampo. En estas regiones, la adición de nuevas neuronas representa otro medio, además de modificaciones morfológicas, sinápticas o moleculares en células individuales, por el cual se producen cambios en el circuito funcional. La neurogénesis adulta constituye así, un nivel adicional de plasticidad neural que debe agregarse a la lista de posibles cambios estructurales en el cerebro adulto (Alvarez-Buylla & Garcia-Verdugo 2002, Gross 2000, Lim & Alvarez-Buylla 2016, Ming & Song 2005, Mongiat & Schinder 2011, Zhao et al 2008).

La neurogénesis post-desarrollo está conservada a lo largo de la evolución desde crustáceos (Harzsch & Dawirs 1996) hasta vertebrados incluyendo aves (Goldman & Nottebohm 1983, Nottebohm 2002a, Nottebohm 2002b), roedores (Altman & Das 1965, van Praag et al 2002), primates (Kornack & Rakic 1999) y humanos (Bergmann et al 2015, Eriksson et al 1998, Ernst & Frisen 2015). La tasa de neurogénesis postnatal disminuye con el aumento de la complejidad cerebral: En vertebrados inferiores, tales como lagartijas, la neurogénesis provee un suministro de neuronas capaz de regenerar partes completas del cerebro, mientras que en

mamíferos la neurogénesis adulta se restringe a regiones acotadas, generando tipos celulares específicos (Kaslin et al 2008, Kempermann 2015b). Además, la neurogénesis adulta presenta varias desventajas: es un proceso energéticamente costoso y potencialmente peligroso; una desregulación tanto de la proliferación como de la conectividad fina de las nuevas neuronas podría derivar en diversas patologías. Se ha propuesto que el grado de neurogénesis post-desarrollo en una especie dada podría depender de una situación de compromiso entre los beneficios obtenidos por la incorporación de nuevas neuronas y los problemas que causarían en las estructuras neurales en las que se integran (Kempermann et al 2004). Al parecer, este último asunto ha influenciado fuertemente los cerebros mas complejos, al punto que en mamíferos la neurogénesis adulta bajo condiciones normales está confinada a solo dos regiones: la zona subgranular (ZSG) del giro dentado del hipocampo y la zona subventricular (ZSV) del ventrículo lateral, que genera interneuronas para el bulbo olfatorio (Alvarez-Buylla & Garcia-Verdugo 2002, Gross 2000, Lim & Alvarez-Buylla 2016, Toni & Schinder 2015).

La ZSV de las paredes del ventrículo lateral posee progenitores neurales con capacidad de auto renovación, generando células con potencial neurogénico que migran a través de la vía migratoria rostral para llegar al bulbo olfatorio y dar lugar a neuronas granulares inhibitorias, que se integran al circuito neural (Lim & Alvarez-Buylla 2016, Lledo et al 2006).

La ZSG del giro dentado (GD) es la región en donde ocurre la neurogénesis hipocampal, que da lugar a células granulares (CGs) (Bonaguidi et al 2012, Zhao et al 2008). En ratas adultas jóvenes se estima que se generan unas 9000 células diariamente, de las cuales solo el 50 % llegan a expresar marcadores neuronales, lo que representaría un 6 % de la población total de CGs en un mes (Cameron & McKay 2001). En humanos, las estimaciones indican que se agregan unas 700 neuronas en cada hipocampo diariamente, lo que correspondería a una renovación del 1,75 % de la población neuronal del GD anualmente (Spalding et al 2013). Este número significativo de nuevas neuronas, junto con la regulación dinámica por varios estímulos fisiológicos y patológicos (Ma et al 2009), sugieren que la neurogénesis adulta es una parte integral de ciertas funciones cerebrales. De hecho, análisis conductuales en modelos animales apoyan un rol crítico para las nuevas CGs en varias funciones dependientes del hipocampo (Aimone et al 2011). Análisis electrofisiológicos han identificado propiedades especiales en CGs inmaduras (Ge et al 2007b, Marin-Burgin et al 2012,

Mongiat et al 2009, Schmidt-Hieber et al 2004, Snyder et al 2012, Temprana et al 2015), proporcionando una base mecánica para su singular contribución al procesamiento de la información.

En esta tesis nos centramos en el estudio de la maduración de neuronas que se desarrollan en el hipocampo murino adulto, por lo que comenzaremos describiéndolo, focalizándonos en el GD, el nicho sobre el que ocurre la neurogénesis hipocámpal.

Estructura del hipocampo

La formación hipocámpal comprende 4 estructuras corticales: el GD, el hipocampo propiamente dicho (que se divide en las subregiones CA1, CA2 y CA3), el complejo subicular (que incluye subículo, parasubículo y presubículo) y por último la corteza entorrinal que en roedores se divide en lateral y medial. La forma tridimensional del hipocampo es relativamente compleja, ya que su eje longitudinal se dobla formando una “C” y se extiende desde el septum (dorso-rostral) a la región temporal (ventro-caudal) del cerebro, denominándose eje “septo-temporal” en roedores (Amaral & Witter 1989) (figura 1). En los primates dicho eje rotó 90° rostro-caudalmente por el mayor desarrollo de los lóbulos frontal y temporal. A lo largo de esta tesis nos referiremos a las regiones septal o temporal, y llamaremos hipocampo a la estructura que incluye además el GD.

En el centro del hipocampo se encuentran las neuronas piramidales de CA3 formando conexiones recurrentes, cuya función sería la de formar una red auto-asociativa esencial para almacenar las representaciones de la experiencia sensorial (Marr 1971, Rolls & Treves 1998). La mayor parte de las sinapsis en cada neurona piramidal de CA3 surge de las fibras colaterales de otras neuronas piramidales de CA3. La información aferente llega principalmente de la corteza entorrinal (CE) que proyecta directamente hacia CA3, e indirectamente a través del GD (Andersen et al 2007). Por último, las neuronas de CA1 integran la información proveniente de CA3 y de la CE (capa III) y proyectan sus axones a través del subículo nuevamente hacia la CE (Figura 2).

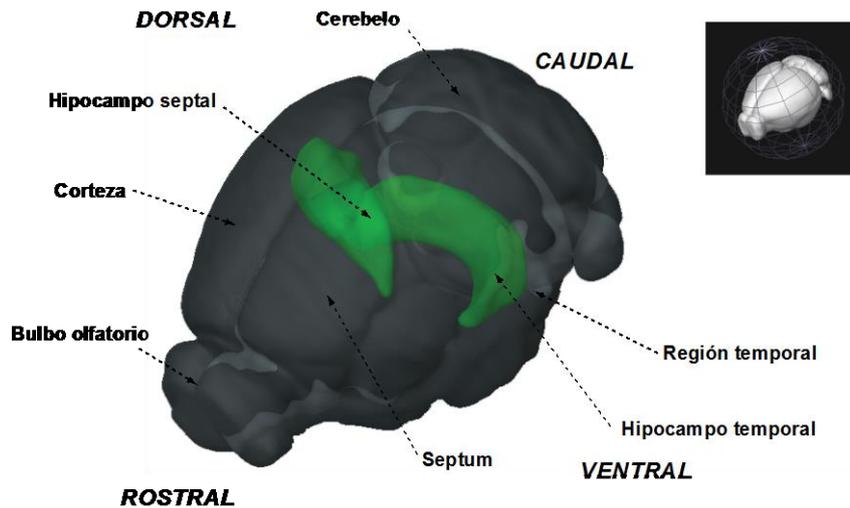


Figura 1. Esquema de la anatomía 3D del hipocampo en el cerebro murino. El eje longitudinal se extiende desde el septum (dorso-rostral) hacia la región temporal (ventro-caudal) del cerebro.

El giro dentado, sustrato de la neurogénesis hipocampal

El GD murino forma una estructura con forma de “V” que se encuentra envolviendo la región proximal de CA3 (figura 2). Puede ser subdividida en 3 capas: granular, molecular y hilus. La capa granular (GCL, por Granule Cell Layer) corresponde al estrato medio, que en roedores está formada por 6 a 8 capas de somas de CGs densamente empaquetadas. Cada porción de la “V” se llama capa suprapiramidal o infrapiramidal dependiendo de su posición respecto a CA3, y su punta se llama cresta o vértice. Las CGs muestran un árbol dendrítico con forma de cono invertido, cuyas dendritas proyectan hacia la capa molecular (ML, por Molecular Layer), la capa más superficial del GD. Esta capa contiene principalmente axones de la vía perforante que se originan en la CE y forman contactos sinápticos con las dendritas de las CGs. También contiene interneuronas GABAérgicas y fibras aferentes de los contactos externos al GD. La capa más interna es el hilus, que contiene los axones de las CGs y una variedad de interneuronas GABAérgicas y glutamatérgicas, de las cuales las más abundantes son las células “mossy”.

El borde entre la GCL y el hilus es la ZSG, la región en donde ocurre la neurogénesis adulta. Aquí se ubican las células madre neurales del tipo glía radial (células tipo 1), que poseen la capacidad de auto-replicarse y generar los progenitores de división rápida (células tipo 2) dando lugar finalmente a CGs (figura 3) (Amaral et al 2007, Bonaguidi et al 2012, Toni & Schinder 2015, Zhao et al 2008).

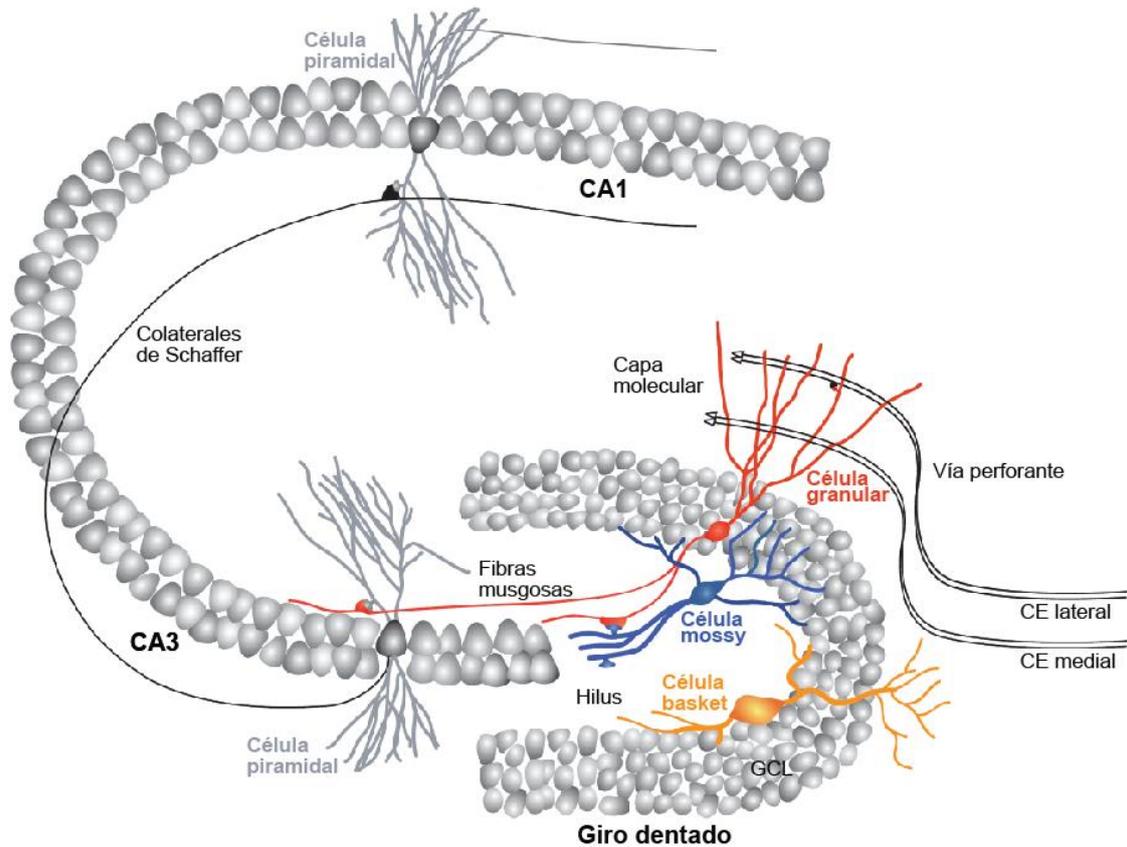


Figura 2. Circuito hipocampal. Vista esquemática de una sección transversal de hipocampo mostrando el giro dentado y las regiones CA3 y CA1. Las células principales localizadas en capas densamente empaquetadas están conectadas sinápticamente a través del clásico circuito trisináptico. La principal puerta de entrada al circuito es la vía perforante, compuesta por axones originados en la corteza entorrinal (CE) lateral y medial, que contactan los tercios externos y medios de la capa molecular respectivamente. Las CGs proyectan sus axones (fibras musgosas) hacia las neuronas piramidales de CA3, y estas se conectan con las neuronas piramidales de CA1 a través de las colaterales de Schaffer. Otros contactos hacia las CGs incluyen las interneuronas localizadas en la capa molecular y en el hilus, compuestas principalmente por células básquet y células mossy. Tomado y modificado de (Toni & Schinder 2015).

Los contactos que llegan al GD cargan información sensorial de la corteza. El principal input excitatorio/glutamatérgico hacia el GD llega a través de la vía perforante desde la CE. Distintas áreas de la CE proyectan e inervan diferentes porciones de las CGs. La CE medial (capa II, con alguna contribución de las capas III, V y VI) contactan el tercio medio del árbol dendrítico de las CGs, mientras que las proyecciones de la CE lateral contactan el tercio externo de esas dendritas (Toni & Schinder 2015, van Strien et al 2009). Las dendritas del tercio interno de la ML son inervadas principalmente por las fibras comisurales y de asociación provenientes de las células mossy glutamatérgicas del hilus ipsilateral y contralateral (Buckmaster et al 1992, Frotscher et al 1991). Las CGs maduras exhiben unas 2 espinas por μm^2 (evaluado

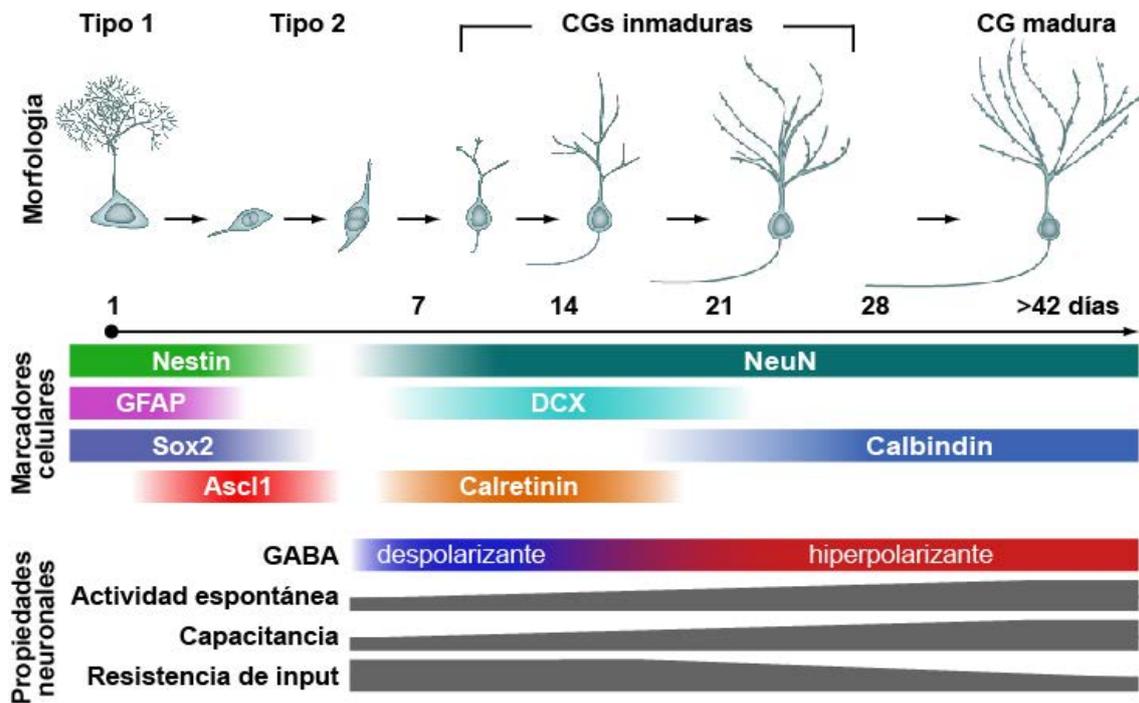


Figura 3. Propiedades básicas de las CGs durante el proceso de maduración. Se indica la morfología, expresión de marcadores típicos y propiedades neuronales funcionales de los diferentes estadios. Tomado y modificado de (Christian et al 2014).

por microscopía confocal), y cada una recibe unos 6000 a 7000 contactos glutamatérgicos (Claiborne et al 1990, Desmond & Levy 1985, Toni & Schinder 2015).

Las CGs también reciben contactos de varios tipos de interneuronas GABAérgicas (Freund & Buzsaki 1996, Han et al 1993, Hosp et al 2014, Houser 2007). Entre éstas se incluyen las células “basket” que se localizan en la ZSG y contactan principalmente el segmento inicial del axón de las CGs y sus dendritas proximales en la ML. Además de liberar GABA, éstas interneuronas expresan la proteína de unión a Ca^{++} parvalbumina (PV), y obtienen su nombre debido al patrón con forma de canasta (basket) que forman alrededor de los somas de las CGs. Dos tipos principales de interneuronas GABAérgicas residen en el hilus: Las células asociadas a la vía perforante (HIPP, por “hilar perforant-path associated”), algunas de las cuales expresan somatostatina, proyectan hacia los dos tercios externos de la ML; y las células anexas a la vía comisural-de asociación (HICAP, por “hilar commissural-associational pathway-related”), que proyectan hacia el tercio interno de la ML. En la ML, las células asociadas a la vía perforante (MOPP, por “molecular layer perforant path-associated”) proyectan hacia los dos tercios externos de la ML, mientras que las células axo-axonales inervan los segmentos iniciales de los axones de las CGs.

Las CGs proyectan sus axones (fibras musgosas, por “mossy fibers”) a través del hilus hasta la región CA3, contactando las células piramidales con su característico terminal grande e irregular. Las sinapsis de las fibras musgosas son escasas; cada célula piramidal de CA3 es contactada por menos de 50 CGs (Amaral et al 1990). Sin embargo, los terminales de las fibras musgosas son muy efectivos activando sus blancos piramidales (Henze et al 2002). Las fibras musgosas también tienen colaterales (~6-7 por fibra) que inervan a las células “mossy” y a las interneuronas GABAérgicas a través de terminales pequeños (Acsady et al 1998). Cada CG posee unas 160 a 200 varicosidades axonales a través de sus colaterales y ~20 terminales de fibras musgosas, formando un circuito disináptico consistente en fibra musgosa → Interneurona GABAérgica → célula piramidal, que subyace la potente inhibición de “feed-forward” que regula la excitabilidad del área CA3 (McBain 2008, Torborg et al 2010).

Funciones del hipocampo

Las funciones que se le atribuyen hoy en día al hipocampo son la de memoria y de la codificación espacial. La idea de que la formación hipocampal está relacionada con la memoria surgió de las observaciones de Brenda Milner sobre el paciente H.M. Éste fue un paciente epiléptico al que se le removió gran parte del hipocampo y regiones corticales que lo rodean (bilateralmente). La secuela de la operación fue una profunda amnesia anterógrada (incapacidad de recordar episodios ocurridos luego de la cirugía), pero no retrógrada. El paciente no tenía déficits en la percepción, en pensamiento abstracto ni en su habilidad para razonar (Scoville & Milner 1957). Durante el estudio de H.M. se definió lo que conocemos como memoria declarativa, el conocimiento consciente de hechos y eventos, que depende del lóbulo temporal medial (que fuera removido a H.M.). También se definió la memoria no declarativa o de procedimientos, debido a que el paciente podía aprender destrezas nuevas y las retenía por lo menos durante 3 meses. Las estructuras cerebrales importantes para este tipo de memorias adquiridas por prácticas son los ganglios basales, el cerebelo, la amígdala y la neocorteza (Cohen & Squire 1980, Squire 2009). Los estudios en el paciente H.M. demostraron que las estructuras dañadas son importantes para la formación y mantenimiento de la memoria a largo plazo. Se cree que las memorias son retenidas en la formación hipocampal por un período corto de tiempo luego de ser

aprendidas, y su almacenamiento a largo término involucra además otras regiones cerebrales para formar una memoria permanente (Squire 2009, Squire & Wixted 2011, Zola-Morgan & Squire 1990).

Un desarrollo importante que permitió avanzar hacia el conocimiento de la función hipocampal fue la implementación de microelectrodos para monitorear la actividad de neuronas individuales en el hipocampo de animales despiertos (O'Keefe 1976, O'Keefe & Dostrovsky 1971). Estos registros *in vivo* describieron la relación entre la actividad neuronal y una variedad de parámetros sensoriales. Por ejemplo, se encontró una fuerte correlación entre la actividad neuronal y la localización del animal en un ambiente acotado. De estos datos surgió la teoría del mapa cognitivo, que sugiere que el hipocampo procesa la memoria espacial, la cual permite al animal navegar por ambientes familiares, y elaborar señales espacio-temporales que son dependientes del contexto. En estos experimentos se encontró que existían células que disparaban potenciales de acción cuando un animal estaba en un ambiente familiar. Como sólo disparaban dependiendo de la ubicación del animal se las llamó "place cells" o células de lugar. Cada célula de lugar dispara en respuesta a una ubicación determinada del animal, o "place field" (O'Keefe & Nadel 1978). Diferentes conjuntos de células son activadas por diferentes lugares, por lo que se genera una fiel representación en la cual cada locación espacial es mapeada por una población particular o estado de actividad de células de lugar (Wilson & McNaughton 1993). Así, el hipocampo podría funcionar como un mapa cognitivo que es capaz de representar en la mente el espacio físico.

Un modelo alternativo postula que el hipocampo funcionaría como un organizador temporal de las memorias dependientes de hipocampo, denominado *codificación nodal*. La codificación nodal define al hipocampo como un mapa cognitivo generado a partir de la representación de eventos temporalmente próximos en un determinado contexto espacial pero incluyendo también información no espacial (Eichenbaum et al 1999). Las células de lugar previamente activadas, responderían a una localización actual y la asociación con episodios ocurridos en el mismo lugar. También se propone que estas células de lugar podrían reconocer episodios en común, independientemente de la ubicación. Este modelo espacial logra una visión general del hipocampo, y lo vincula con la generación de memorias espaciales y no espaciales. Luego estas memorias serían almacenadas a largo plazo en otras regiones corticales (Alvarez & Squire 1994).

La vía perforante impacta sobre las células piramidales de CA3 y presenta una elevada convergencia (Treves et al 2008). Estas sinapsis son capaces de experimentar potenciación a largo plazo (LTP, por “long term potentiation”). Como fue mencionado anteriormente, CA3 es una región auto-asociativa, es decir que presenta una elevada conectividad recurrente también capaz de llevar a cabo LTP dependiente del receptor de NMDA (Treves & Rolls 1992). Si bien aún no existe evidencia experimental concluyente acerca del rol funcional de CA3, la presencia de actividad recurrente y un número grande de conexiones sinápticas capaces de experimentar LTP convierten al área en un sustrato computacional apropiado para llevar a cabo la tarea de *completar patrones*. Completar patrones implica evocar una representación aprendida a partir de un estímulo cuando el sistema es re-expuesto al mismo en forma parcial o degradada, y se postula que puede constituir un mecanismo útil para la tarea de evocar memorias. A partir de este mecanismo se logra que estímulos parcialmente diferentes evoquen representaciones más correlacionadas (Andersen et al 2007).

Existe una elevada divergencia en la conectividad entre neuronas de la CE y las CGs. Esto llevó a hipotetizar que el GD estaría encargado de llevar a cabo una ortogonalización de la información proveniente desde la CE. De esta forma se generarían representaciones disímiles a partir de estímulos altamente correlacionados, en un proceso denominado *separación de patrones* (Treves et al 2008). En concordancia con esto, registros electrofisiológicos de actividad en neuronas únicas en la GCL de animales en comportamiento muestran que las CGs presentan una activación muy dispersa en condiciones fisiológicas (Piatti et al 2013). Se ha propuesto que el GD es capaz de imponer su código disperso en la red de CA3, lo cual le conferiría a esta estructura la capacidad de tener un comportamiento bimodal que fluctúa entre completar y separar patrones (Knierim & Neunuebel 2016).

Rol funcional de la neurogénesis en el hipocampo adulto

La evidencia más convincente del rol que cumple las nuevas CGs en la memoria, en particular en el proceso de separación de patrones, proviene de experimentos en los cuales la neurogénesis ha sido eliminada. Tres métodos han sido ampliamente utilizados con este fin: irradiación, agentes antimitóticos e inducción

genética de genes proapoptóticos (Aimone et al 2011, Hvoslef-Eide & Oomen 2016, Ming & Song 2011, Sahay et al 2011b).

Un trabajo con ratones en los que la neurogénesis había sido eliminada por agentes antimitóticos, reveló impedimentos en estrategias de aprendizaje. Estos defectos se vieron reflejados en la dificultad de reubicar una nueva posición de la plataforma escondida en el laberinto acuático de Morris, cuando una posición previa había sido aprendida (Garthe et al 2009). En experimentos donde se eliminó aproximadamente el 50 % de la neurogénesis por medio de infección de las nuevas CGs con un lentivirus que expresa un dominante negativo de Wnt (Lie et al 2005), se encontró que los ratones no podían distinguir entre dos ambientes parecidos (Clelland et al 2009). Esto resalta el rol de la neurogénesis adulta en la discriminación espacial o separación de patrones.

En otra serie de experimentos se aumentó la neurogénesis adulta a partir de la generación de ratones condicionales knock out para el gen proapoptótico Bax en los progenitores neurales. En estos ratones se generan más neuronas, mueren menos y sobreviven por más tiempo (Sahay et al 2011a). Estos animales mostraron una mejor performance en test comportamentales en los cuales se analizó su capacidad de discriminación de dos contextos similares. Se observó que el aumento en la neurogénesis adulta es suficiente para aumentar la separación de patrones.

Aunque los ensayos de comportamiento que miden explícitamente la separación de patrones no han sido eficaces para establecer una conexión directa con la neurogénesis adulta, existen test de memoria espacial en los cuales se necesita el reclutamiento del GD. Estudios recientes muestran que las neuronas nuevas son necesarias para resolver ese tipo de tareas (Deng et al 2013, Dupret et al 2007, Dupret et al 2008, Wojtowicz et al 2008).

Queda claro de todo lo expuesto, que la neurogénesis adulta cumple un rol fundamental en la formación y consolidación de memorias espaciales dependientes de hipocampo. Esto denota la importancia del entendimiento de los procesos involucrados en la neurogénesis adulta de los mamíferos.

Capítulo I

Caracterización de la línea murina genéticamente modificada **Asc11^{CreERT2}** para marcar neurogénesis adulta

Introducción

El GD del hipocampo genera nuevas CGs capaces de procesar información (Bonaguidi et al 2012, Toni & Schinder 2015, Zhao et al 2008). Las CGs nacidas en el cerebro adulto se incorporan a la red neural funcional del GD, produciendo un impacto significativo en la plasticidad del circuito (Chancey et al 2014, Gu et al 2012, Laplagne et al 2006, Marin-Burgin et al 2012, Temprana et al 2015, Toni et al 2008). En los últimos años se ha avanzado significativamente en comprender cómo la neurogénesis adulta contribuye a las funciones neurales mediadas por el hipocampo (Christian et al 2014, Drew et al 2013, Piatti et al 2013). Sin embargo, la contribución precisa de las nuevas CGs al procesamiento de información aún no está claro.

El campo de la neurogénesis adulta ha progresado debido a los avances técnicos que permitieron la identificación precisa y la manipulación de las nuevas neuronas entre los millones de neuronas preexistentes en el sistema nervioso central adulto. Los diferentes enfoques incluyen la clásica incorporación de análogos de timidina, marcado retroviral, y más recientemente, la utilización de ratones modificados genéticamente con promotores específicos expresados en los progenitores neurales (Dhaliwal & Lagace 2011, Dieni et al 2013, Ming & Song 2005, Overstreet-Wadiche et al 2006a, Taupin 2007, Zhao et al 2006). Sin embargo, la necesidad de realizar estudios *in vivo* para elucidar el rol de las nuevas CGs en la función hipocampal requiere herramientas altamente caracterizadas que permitan la identificación precisa y el control de las nuevas neuronas (Kropff et al 2015).

La forma inducible de la recombinasa Cre (CreERT2) expresada bajo el control de promotores de genes clave (tales como Nestin o GFAP, entre otros) han sido utilizados para el estudio de la neurogénesis adulta (Bonaguidi et al 2012, Dieni et al 2013, Encinas et al 2006). El gen mamífero *Ascl1* (homólogo al complejo Achaete-scute de drosophila), codifica para un factor de transcripción bHLH involucrado en la diferenciación neuronal y presente en las células tipo 1 y tipo 2 (Andersen et al 2014, Kim et al 2011, Kim et al 2007, Mich et al 2014). Una variedad de trabajos recientes ha utilizado el ratón genéticamente modificado *Ascl1*^{CreERT2} para el estudio de la neurogénesis adulta (Andersen et al 2014, Kim et al 2011, Kim et al 2007, Mich et al 2014), a pesar de la falta de una caracterización morfológica y funcional de las neuronas así marcadas. El grado en el cual las poblaciones neuronales identificadas usando estos métodos está en concordancia con los métodos de marcaje clásicos (análogos de timidina y retrovirus) se desconoce.

Objetivo y estrategia experimental

El objetivo de esta sección es el estudio del desarrollo y la integración funcional de las células identificadas usando la línea murina *Ascl1*^{CreERT2}, mediante una evaluación de la especificidad del marcado y precisión de la datación neuronal. En la línea murina *Ascl1*^{CreERT2}, la administración de tamoxifeno (TAM) permite la entrada al núcleo de la recombinasa Cre en células madre neurales tipo 1 y en los progenitores tipo 2 del hipocampo adulto (Kim et al 2011). Ratones *Ascl1*^{CreERT2} se cruzaron con ratones de la línea reportera condicional *CAG*^{floxStop-tdTomato} para obtener expresión permanente de tdTomato (Tom) en la progenie de las células que expresan *Ascl1* al momento de la administración de TAM, permitiendo así su identificación y caracterización a diferentes tiempos luego de la inducción con TAM (dpi, días post inducción). La administración de TAM en ratones *Ascl1*^{CreERT2};*CAG*^{floxStopTom} resultó en la expresión de Tom en una subpoblación de CGs en el GD (figura 4 A).

Para caracterizar las células generadas en el hipocampo adulto, ratones *Ascl1*^{CreERT2} expresando el alelo Tomato fueron inducidos mediante la administración de TAM a las 6-7 semanas de edad. El fenotipo neuronal fue evaluado por una descripción morfológica y por expresión de marcadores, mientras que la función neuronal se monitoreó por registros de whole-cell voltage-clamp (figura 4 B). Ambos

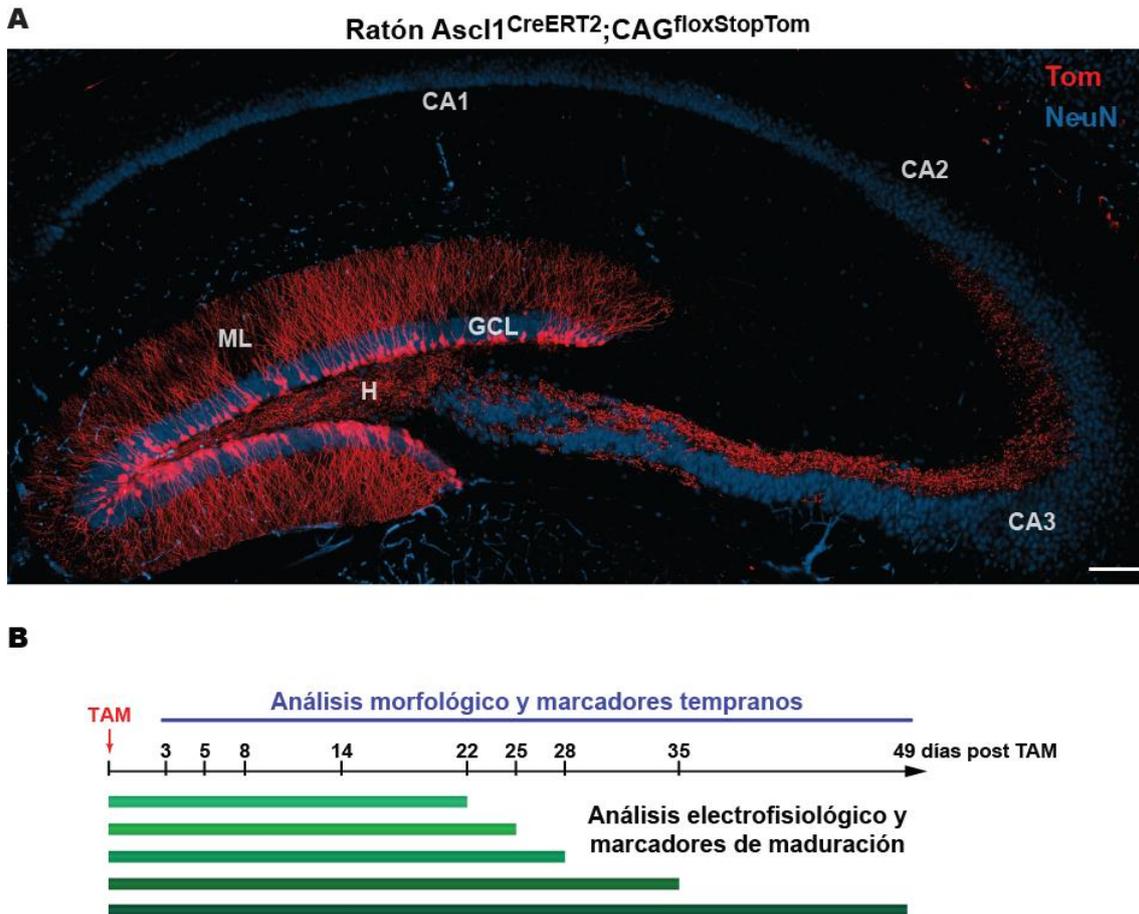


Figura 4. Diseño experimental para la caracterización de células marcadas en la línea *Ascl1^{CreERT2}*. (A) Reconstrucción obtenida a partir de 5 planos ópticos de una sección hipocámpal de 60 μm de espesor mostrando células *Tom⁺* (rojo) a los 49 días de la inducción con TAM. Se muestra la inmunofluorescencia de *NeuN* (azul) para visualizar la capa de células granulares (GCL) y las células piramidales de CA1, CA2 y CA3. Las dendritas de las células *Tom⁺* se extienden a través de la capa molecular (ML), y los axones (fibras musgosas) proyectan a través del hilus (H) hacia CA3. Escala: 100 μm . (B) La expresión de *Tom* fue inducida por la administración de TAM (120 $\mu\text{g/g}$, cuatro inyecciones en 2 días consecutivos) en ratones *Ascl1^{CreERT2};CAG^{floxStopTom}* adultos. El análisis morfológico, funcional y de marcadores se realizó a los tiempos post-inducción según se indica.

enfoques convergieron en la existencia de estadios distintivos de maduración neuronal con un perfil similar al observado previamente por el marcado retroviral.

Caracterización morfológica y análisis de determinantes fenotípicos tempranos en las células Tom⁺ del ratón Ascl1^{CreERT2}

El grado de maduración neuronal fue determinado por un análisis de la morfología celular a diferentes tiempos luego de la administración de TAM (figura 5 B). En los primeros días luego de la inducción (3 y 5 dpi) todas las células Tom⁺ observadas estaban localizadas en la ZSG del GD, y exhibieron una clara morfología del tipo glía radial (Bonaguidi et al 2011), lo que es esperable de acuerdo al patrón de expresión de Ascl1. Esta morfología se observó en algunas células incluso en ratones con mayor tiempo de inducción (8 y 14 dpi). La expresión del marcador neuronal NeuN fue nula en el estadio de 3 dpi, mientras que a los 5 dpi se observó un 32% de células Tom⁺ expresando NeuN (figura 5 D).

La morfología neuronal se hizo evidente a partir de los 8 dpi, estadio en el cual se empezaron a observar células Tom⁺ con un árbol dendrítico muy inmaduro: el soma ubicado en la ZSG y una dendrita apical que atraviesa toda la GCL y en algunos casos llega a extenderse unos pocos micrómetros hasta la ML. En este estadio aún se observó una gran cantidad de células Tom⁺ con la morfología tipo glía radial, aunque en menor cantidad que a los 5 dpi. A los 8 dpi se observó que un 50 % de las células marcadas expresa NeuN.

A los 14 dpi se observó que la mayoría de las células Tom⁺ ubican el soma en la GCL, lo que sugiere que ya dejaron la ZSG. En este estadio, la mayoría de las células Tom⁺ exhibieron características morfológicas típicas neuronales, con un leve incremento en la complejidad del árbol dendrítico y sin espinas. La proporción de células marcadas que mostraron una morfología del tipo glía radial a este tiempo post-inducción disminuyó considerablemente, mientras que la expresión de NeuN alcanzó el 70 % de las células Tom⁺.

La morfología neuronal madura se alcanzó a los 22-28 dpi, estadio en el cual el árbol dendrítico ocupó toda la ML, y las dendritas exhibieron una alta densidad de espinas. Notablemente, la expresión de NeuN a los 28 dpi asciende a un 95 %, un porcentaje elevado pero que no llega a la totalidad de las células Tom⁺. A los 49 dpi, la totalidad de las células Tom⁺ se ubica en la GCL, adquiriendo una morfología neuronal completamente madura.

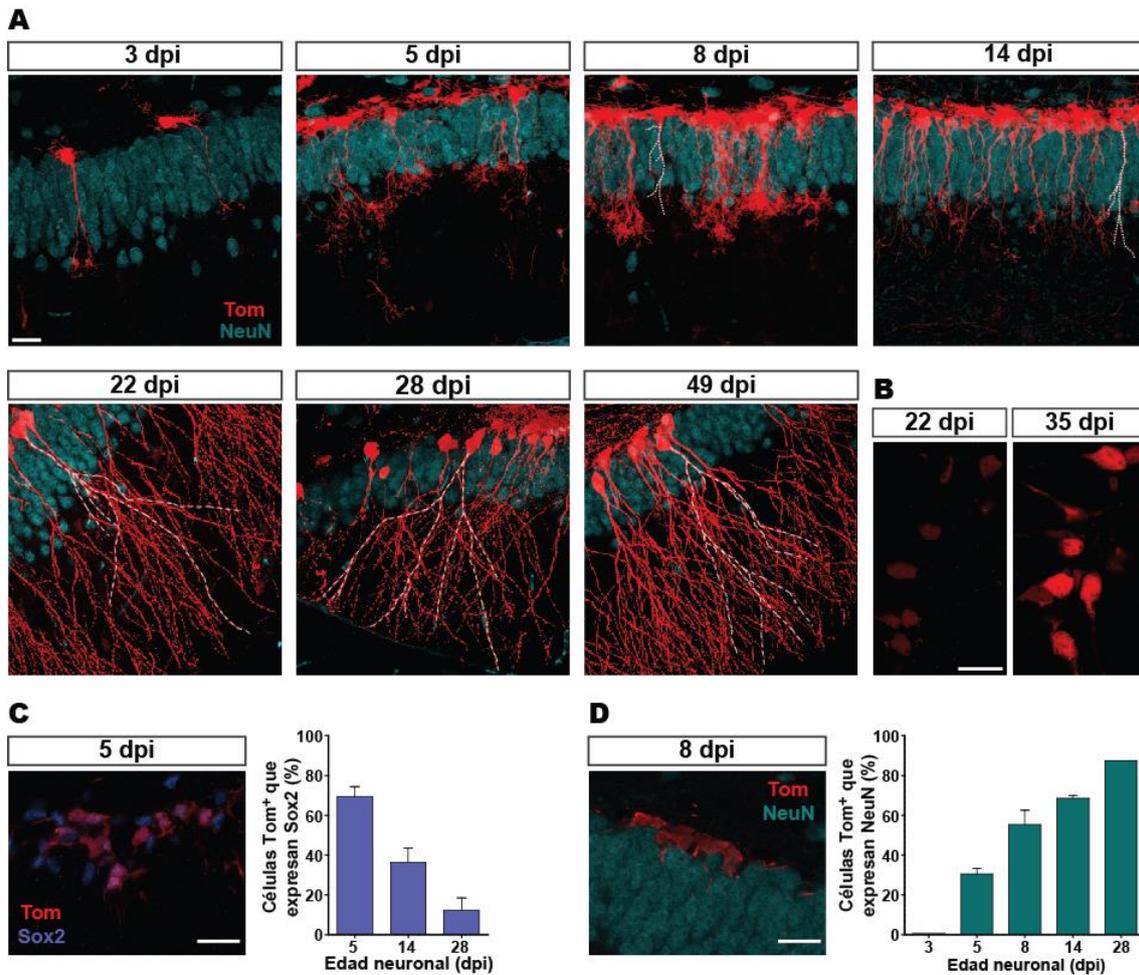


Figura 5. Caracterización morfológica y análisis de determinantes fenotípicos tempranos en las células Tom⁺ generadas en el ratón *Ascl1*^{CreERT2} adulto. (A) Reconstrucción obtenida a partir de imágenes confocales de células Tom⁺ en el GD de ratones *Ascl1*^{CreERT2};*CAG*^{loxStopTom} a diferentes tiempos post inducción con TAM. Se muestra la inmunofluorescencia de NeuN para identificar la GCL. Las líneas blancas punteadas fueron agregadas para permitir visualizar árboles dendríticos individuales entre varias células marcadas. Los parámetros utilizados para la obtención de cada imagen fueron ajustados para obtener intensidades de fluorescencia similares en todos los grupos. (B) Ejemplos de células Tom⁺ de 22 y 35 dpi obtenidos con parámetros idénticos, para visualizar el incremento de la intensidad de fluorescencia de forma tiempo-dependiente. Notar que a los 35 dpi se pueden observar poblaciones mixtas de células exhibiendo altas y bajas intensidades de Tom. (C – D) Imágenes confocales representativas y cuantificación de los niveles de expresión de Sox2 (C) y NeuN (D). Tamaño de muestras, > 50 células, con 2 ratones para cada punto (1 ratón para el punto de 28 dpi de NeuN). Escala: 20 μ m.

El número de células Tom⁺ aumentó sustancialmente durante los primeros días luego de la administración de TAM (entre los 3 y los 8 dpi), lo cual es consistente con la amplificación esperada en la población de células tipo 2. Notablemente, la intensidad de fluorescencia de las células Tom⁺ también aumentó con la edad (figura 5 B). A tiempos posteriores se pudieron observar poblaciones mixtas de células

marcadas exhibiendo altas y bajas intensidades de fluorescencia, lo que podría resultar de la generación continua de CGs a partir de células madre neurales de división lenta (figura 5 C). Para determinar la proporción de células tipo 1/tipo 2 en comparación con neuronas, monitoreamos la expresión de Sox2 (presente en células madre neurales y progenitores de división rápida) (Bond et al 2015) y el marcador neuronal NeuN durante las etapas tempranas luego de la inducción. Los resultados de este análisis indican que la expresión de Sox2 disminuyó con la edad celular, al tiempo que la de NeuN aumentó, lo que sugiere una reducción de la población marcada de células madre/progenitores marcados y un rápido incremento de la producción neuronal (> 50% a los 8 dpi) (figura 5 B-D).

Caracterización electrofisiológica y expresión de marcadores de maduración en las células Tom⁺ en el giro dentado

La caracterización electrofisiológica de las células Tom⁺ en el ratón *Ascl1^{CreERT2}* fue realizada por Sung Min Yang, en lo que consistió una importante colaboración. Los datos electrofisiológicos mostrados aquí son un resumen del análisis realizado por Sung Min Yang. Para un análisis mas detallado, por favor remitirse a Yang, Alvarez y Schinder, 2011.

Para obtener información precisa acerca de las características funcionales de las células marcadas en el ratón *Ascl1^{CreERT2};CAG^{floxStop-Tom}*, se evaluaron propiedades intrínsecas y corrientes excitatorias de las células Tom⁺ y se compararon con las CGs del tercio externo de la GCL, generadas principalmente durante el desarrollo perinatal (Laplagne et al 2006). Las siguientes propiedades de membrana fueron evaluadas: Resistencia de input (R_{input}), que refleja el tamaño celular y la densidad de canales abiertos durante el reposo; y la capacitancia de membrana (C_m), proporcional al área del soma y las dendritas proximales. Las células Tom⁺ registradas a edades tempranas mostraron una alta R_{input} y una baja C_m , características típicas de neuronas inmaduras en el cerebro adulto y en desarrollo (figura 6 A). A tiempos mas avanzados la R_{input} disminuyó y la C_m se incrementó, alcanzando a los 49 dpi los niveles característicos de las CGs maduras. Además, los valores medios obtenidos para cada grupo son consistentes con los observados usando marcado retroviral en CGs de las mismas edades (Esposito et al 2005, Mongiat et al 2009).

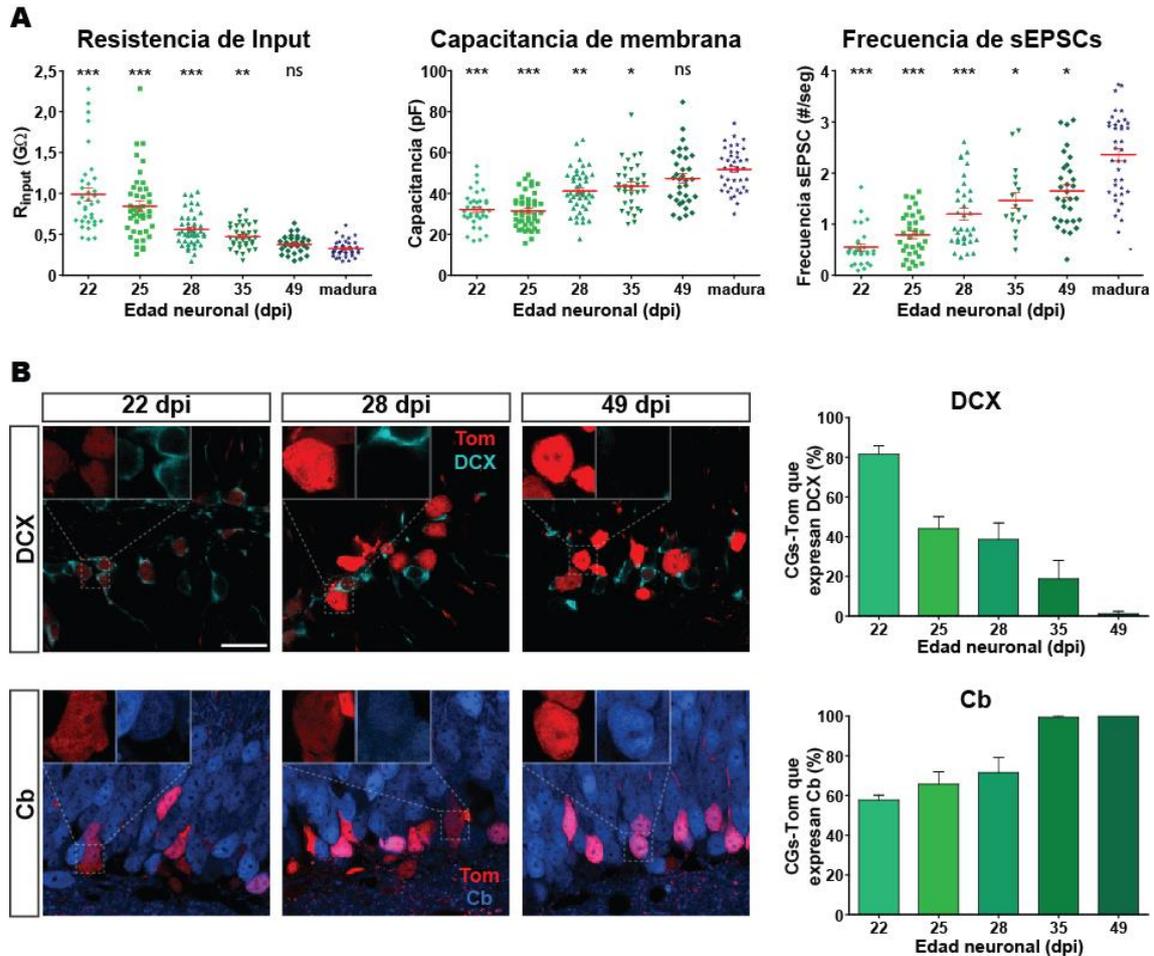


Figura 6. Propiedades funcionales y expresión de marcadores de maduración en las células Tom⁺ en el ratón Asc11^{CreERT2} adulto. (A) Propiedades pasivas de membrana (resistencia de input y capacitancia de membrana) y conectividad excitatoria (frecuencia de sEPSCs, 120 segundos) medida en células Tom⁺ y CGs maduras no marcadas. Tamaño de muestras (presentado como células/ratones), 35/6 (22 dpi), 44/5 (25 dpi), 44/6 (28 dpi), 35/5 (35 dpi), 33/5 (49 dpi), and 40/23 (madura). *** indica un P < 0.001; ** indica un P < 0.01; * indica un P < 0.05 luego de un test de Kruskal-Wallis seguido de un post hoc test de Dunn en el que cada grupo fue comparado con el grupo de CGs maduras. (B) Izquierda, Imágenes confocales representativas mostrando la expresión de DCX (arriba) y Cb (abajo) en células Tom⁺ a diferentes edades luego de la inducción. Recuadro interno, imagen aumentada de las células Tom⁺ para evaluar la colocalización con DCX o Cb. Derecha, Cuantificación de los niveles de DCX (arriba) y Cb (abajo). Tamaño de muestras: > de 90 células Tom⁺, con 2 o 3 ratones para cada tiempo. Escala: 20 μm.

Para evaluar la integración al circuito neural, se realizaron registros de voltage-clamp en células Tom⁺ para monitorear corrientes post-sinápticas excitatorias espontáneas (sEPSCs; figura 6 A). Se detectaron sEPSCs en todas las células Tom⁺ registradas, con un marcado aumento de la frecuencia de forma dependiente de la edad neuronal. Posiblemente, este aumento de la actividad espontánea con la edad surge de un incremento en el número de contactos sinápticos funcionales, que también ha sido

reportado a un nivel estructural evidenciado como un incremento en el número de espinas dendríticas (Toni et al 2008, Zhao et al 2006).

Además de la caracterización electrofisiológica, se evaluó la expresión de los marcadores neuronales doblecortina (DCX), una proteína asociada a microtúbulos presente durante la migración neuronal que es comúnmente usada para marcar neuronas inmaduras (Esposito et al 2005); y calbindin (Cb), una proteína de unión a calcio usada para identificar los últimos estadios del desarrollo neuronal (Zhao et al 2008). Los niveles de expresión de ambos marcadores dan una medida del grado madurativo de las células Tom⁺ a diferentes tiempos post inducción (Piatti et al 2011). La proporción de células Tom⁺ expresando DCX decreció con la edad neuronal (figura **6 D**). Por otro lado, la expresión de Cb incrementó en las células Tom⁺, indicando la maduración del fenotipo neuronal (figura **6 D**). En conjunto, los valores de expresión de ambos marcadores indican que las células Tom⁺ atraviesan el proceso de maduración neuronal de la forma esperada; por ejemplo, la expresión de Cb llegó al 100% a los 35 dpi, mientras que DCX estaba completamente ausente a los 49 dpi. Estos datos son consistentes con los hallazgos previos obtenidos principalmente con análogos de timidina y mediante marcado retroviral (Esposito et al 2005, Kempermann et al 2003, Overstreet Wadiche et al 2005, Piatti et al 2011, Piatti et al 2006, Zhao et al 2008).

En términos generales, el análisis morfológico, la expresión de marcadores y las propiedades funcionales de las células Tom⁺ en el ratón $Ascl1^{CreERT2};CAG^{floxStomTom}$ indican que el tiempo luego de la administración de TAM refleja la edad de las CGs marcadas con buena precisión. Además, los datos indican que la gran mayoría de las células identificadas en el ratón $Ascl1^{CreERT2}$ son células granulares (~ 95 % de expresión de NeuN a los 28 dpi). Comparado con la marcación retroviral, las células Tom⁺ marcadas en el ratón $Ascl1^{CreERT2};CAG^{floxStomTom}$ muestran una curva de maduración ligeramente retrasada (ver curvas de expresión de NeuN en figura **5 D**, y de Cb y DCX en figura **6 B**) (Esposito et al 2005, Piatti et al 2011, Piatti et al 2006), lo que sería consistente con una ventana temporal mas restringida por el marcaje retroviral. Esta diferencia es esperable ya que el retrovirus marca progenitores en división, mientras que en el ratón $Ascl1^{CreERT2}$ también se marcan células quiescentes de división lenta.

Concluimos que el ratón $Ascl1^{CreERT2};CAG^{floxStomTom}$ permite la identificación de cohortes de nuevas CGs con una buena precisión temporal. Nuestros resultados sugieren que las CGs-Tom derivan de linajes de células madre neurales de tipo 1 y progenitores de división rápida tipo 2. La totalidad de las células marcadas está compuesta mayoritariamente por la cohorte de CGs generadas al momento de la administración de TAM (derivadas posiblemente de los progenitores tipo 2), seguida por cohortes de CGs más jóvenes generadas posteriormente (derivadas de las células de división lenta tipo 1).

Discusión

Realizamos una caracterización fenotípica y funcional de las CGs nacidas en el hipocampo adulto del ratón $Ascl1^{CreERT2};CAG^{floxStomTom}$. Los resultados indican que la población de células que expresan Tom está altamente enriquecida en CGs generadas al momento de la inducción con TAM, por lo que este ratón genéticamente modificado es una herramienta muy adecuada para marcar nuevas CGs.

El campo de la neurogénesis adulta ha llegado al punto en el que el desafío es la validación *in vivo* de las evidencias obtenidas en los últimos 20 años acerca del rol de las nuevas CGs en el procesamiento de la información. Los análogos de timidina, tales como BrdU, CldU o EdU, han sido extensamente usados para marcar CGs nacidas en el adulto (Ming & Song 2005). A pesar de que esta técnica tiene la ventaja de marcar un alto número de neuronas, no permite la observación directa *ex vivo* o en experimentos *in vivo*. El marcado retroviral se ha usado ampliamente para el estudio de las propiedades electrofisiológicas de las nuevas CGs, y es la técnica preferida para marcar cohortes acotadas de neuronas nacidas en el hipocampo adulto. Sin embargo, el enfoque retroviral tiene la desventaja de marcar pocas neuronas por animal, y estas neuronas están restringidas al sitio de la inyección. Las líneas modificadas en las que el reportero fluorescente está bajo el control de promotores clave (por ejemplo, $Nestin^{GFP}$; DCX^{GFP}) han sido usadas satisfactoriamente, pero el marcado es transitorio y, usualmente, la señal fluorescente es débil (Hadjantonakis et al 2003, Ming & Song 2005). La forma inducible de la recombinasa Cre ($CreERT2$) permite el control del inicio del marcado a través de la administración de TAM con altos niveles de expresión del reportero (Madisen et al 2010).

Ascl1 se expresa en los progenitores en división y promueve su proliferación y diferenciación hacia neuronas en el hipocampo adulto (Andersen et al 2014, Bertrand et al 2002, Bonaguidi et al 2012, Castro et al 2011). En el ratón *Ascl1^{CreERT2}*, la administración de TAM induce recombinación en células madre neurales y en progenitores de división rápida. Demostramos que la inducción con TAM en el ratón *Ascl1^{CreERT2}* marca una cohorte de neuronas en el GD que muestra la progresión temporal típica de las propiedades morfológicas, fenotípicas y electrofisiológicas de las nuevas CGs. La presencia de células Tom⁺ del tipo glía radial durante los primeros días luego de la administración de TAM es consistente con la expresión de *Ascl1* en las células madre neurales (Andersen et al 2014, Kim et al 2011). Sin embargo, esta población de células disminuyó considerablemente hacia los 10 días luego del TAM, sugiriendo que las células del tipo glía radial marcadas ya estaban comprometidas a entrar al ciclo de divisiones rápidas seguido de la diferenciación neuronal.

La posibilidad de utilizar ratones genéticamente modificados en combinación con otras herramientas de marcaje, tales como el marcado retroviral, amplía considerablemente las posibilidades experimentales. Herramientas bien caracterizadas permiten el diseño de experimentos confiables y una interpretación precisa de los datos. Como se verá en los próximos capítulos, la combinación de optogenética y quimiogenética con el uso de animales genéticamente modificados contribuirá a la clarificación de aspectos clave de la neurogénesis adulta en la función hipocampal.

Capítulo II

Mecanismos de control de la maduración neuronal

Introducción

La neurogénesis adulta es un proceso complejo que involucra varias etapas comenzando con la proliferación de las células tipo 2, la posterior adquisición del fenotipo neuronal por parte de la progenie celular y finalmente la maduración e integración funcional durante varias semanas. Durante este período, las CGs jóvenes extienden sus axones y dendritas, estableciendo una conectividad adecuada con la red preexistente (Esposito et al 2005, Laplagne et al 2006, Overstreet-Wadiche et al 2006a, Overstreet Wadiche et al 2005, Piatti et al 2006, Toni et al 2008, Toni & Schinder 2015). El pasaje desde el progenitor neural a CG ofrece múltiples puntos de regulación que están controlados por condiciones fisiológicas y patológicas, que modulan en última instancia la eficiencia y la calidad del proceso neurogénico (Andersen et al 2014, Song et al 2013, Song et al 2012, Urban & Guillemot 2014, Waterhouse et al 2012). Experiencias simples tales como el ejercicio físico o la exploración de ambientes novedosos pueden modular la producción, maduración, sobrevivencia y la conectividad de las nuevas CGs (Bergami et al 2015, Chancey et al 2013, Kempermann et al 1997, Piatti et al 2011, van Praag et al 1999). Se conoce bastante acerca de los eventos regulatorios que rigen la transición temprana desde los progenitores hasta el estadio neuronal; sin embargo, poco se sabe acerca de los pasos subsiguientes que resultan en la integración funcional de las nuevas CGs a la red preexistente.

Los pasos regulatorios mejor caracterizados de la neurogénesis adulta son la tasa de proliferación de los progenitores neurales y la sobrevivencia de las CGs en desarrollo. Por ejemplo, el ejercicio, el aprendizaje y el enriquecimiento ambiental pueden incrementar la producción o sobrevivencia neuronal, mientras que el

envejecimiento, el estrés y la depresión entre otras condiciones disminuyen la tasa de neurogénesis (Abrous et al 2005, Gould et al 1999, Parent & Lowenstein 2002, van Praag et al 1999, Zhao et al 2008). La idea de que la maduración neuronal podía ser alterada fue observada inicialmente en modelos de epilepsia, en los que se observó que las nuevas CGs exhibían un fenotipo maduro pocos días después de su generación (Overstreet-Wadiche et al 2006b). Los tratamientos crónicos con antidepresivos también demostraron estimular la maduración neuronal (Wang et al 2008). Adicionalmente, manipulaciones experimentales para alterar la señalización de GABA en las CGs jóvenes indujeron importantes defectos en su desarrollo (Ge et al 2007b). Estos trabajos, que involucraban una condición patológica específica o una alteración en la señalización de GABA, demostraron que el desarrollo neuronal es sensible a alteraciones en la actividad eléctrica del circuito.

Recientemente se observó que estímulos fisiológicos también pueden modular la maduración y conectividad funcional de las neuronas que se desarrollan en el hipocampo adulto. Las CGs que se desarrollan en el polo temporal del hipocampo muestran una tasa de maduración menor que en el polo septal (Snyder et al 2012, Sun et al 2013). Además, se ha demostrado que el ejercicio voluntario promueve la maduración de las nuevas CGs que se desarrollan en el polo temporal del hipocampo (Piatti et al 2011). Notablemente, la tasa de maduración correlaciona con los niveles de actividad de las CGs maduras del GD (Piatti et al 2011), sugiriendo que la actividad de la red modula el desarrollo neuronal. El enriquecimiento ambiental también ha sido relacionado con modificaciones en las CGs jóvenes. La exposición a un ambiente enriquecido (AE) por 2 horas es suficiente para activar sinapsis silentes en CGs jóvenes, mediante un mecanismo dependiente de GABA (Chancey et al 2013). También se ha demostrado que 4 semanas de exposición a un AE incrementan la cantidad y diversidad de conexiones que reciben las CGs nacidas en el cerebro adulto (Bergami et al 2015). Estos trabajos sugieren que la maduración y conectividad de las nuevas CGs pueden ser moduladas de forma dependiente de experiencia. Sin embargo, los detalles de cómo se produce esta integración y los mecanismos que la median aún no están claros.

Parte 1: Rol del microambiente hipocampal en la modulación de la neurogénesis adulta

Objetivos

A partir de las observaciones y datos recogidos en la sección anterior proponemos la siguiente hipótesis: la experiencia induce una activación del GD, lo que determina un efecto importante sobre el desarrollo de las CGs nacidas en el hipocampo adulto. El objetivo de esta etapa es determinar cómo la experiencia modula el desarrollo neuronal, y cuál es el rol de los circuitos locales del microambiente hipocampal en este proceso modulador. Para lograr este objetivo, desarrollamos los experimentos que se detallan en las secciones subsiguientes.

Como se vio anteriormente, las nuevas CGs del polo temporal del hipocampo adulto se desarrollan a una tasa lenta (Piatti et al 2011, Snyder et al 2012, Sun et al 2013). Además, el ejercicio voluntario induce una aceleración de la maduración, cuyo mayor efecto se hace evidente a los 21 días de edad neuronal (Piatti et al 2011). Por este motivo, los resultados de CGs nuevas que se muestran a continuación fueron obtenidos en neuronas del polo temporal, 3 semanas después del marcado neuronal. Cabe mencionar que para cada experimento se eligió la técnica de marcado neuronal más adecuada de acuerdo a las herramientas disponibles.

El ejercicio voluntario como estímulo de la maduración neuronal

Trabajos previos mostraron que las nuevas CG del polo septal y temporal se desarrollan a una tasa similar durante los primeros días; sin embargo, a partir de la tercer semana, las CGs del polo septal aceleran su maduración, mientras que las del polo temporal se mantienen en un estado inmaduro al menos hasta los 21 dpi (Piatti et al 2011, Snyder et al 2012, Sun et al 2013). Además, se demostró que el ejercicio voluntario induce una aceleración de la maduración en las nuevas CGs del polo

temporal (Piatti et al 2011). Las diferencias en el grado de maduración neuronal descritas arriba podrían ser compatibles con los siguientes escenarios alternativos:

- 1) El ejercicio voluntario activa un subtipo de células progenitoras (tipo 1 o tipo 2) en el polo temporal del GD, cuya progenie tiene una tasa de maduración acelerada;
- 2) El ejercicio genera una señal en el GD que las nuevas CGs pueden percibir desde el momento en que comienza la diferenciación neuronal;
- 3) Las CGs perciben la señal del ejercicio en las etapas temprana de su maduración, cuando se está desarrollando la sinaptogénesis GABAérgica;
- 4) Las CGs perciben la señal del ejercicio en las etapas mas avanzadas de la maduración, cuando se está desarrollando la sinaptogénesis glutamatérgica.

Para discriminar entre estas posibilidades, realizamos una serie de experimentos con un método rápido para obtener una primera aproximación de las ventanas de estimulación (figura 7). Ratones adultos recibieron una serie de inyecciones intraperitoneales de BrdU con el objetivo de marcar una cohorte de neuronas nacidas en el hipocampo adulto, y las CGs-BrdU se analizaron 21 días después del marcado (días post-inyección, dpi). A los diferentes grupos experimentales se les colocó una ruedita para correr (ejercicio voluntario) en diferentes momentos del desarrollo neuronal (figura 7 A):

- **Grupo control**, sin ruedita;
- **Grupo 1**, ejercicio pleno (-2 – 21): la ruedita se colocó desde 2 días antes de la inyección de BrdU para que, al momento de marcar los progenitores, estuviera completamente desencadenado el proceso disparado por el ejercicio (Vivar et al 2013);
- **Grupo 2**, ejercicio 3 – 21 dpi: para evaluar si la modulación por ejercicio ocurre durante el desarrollo neuronal;

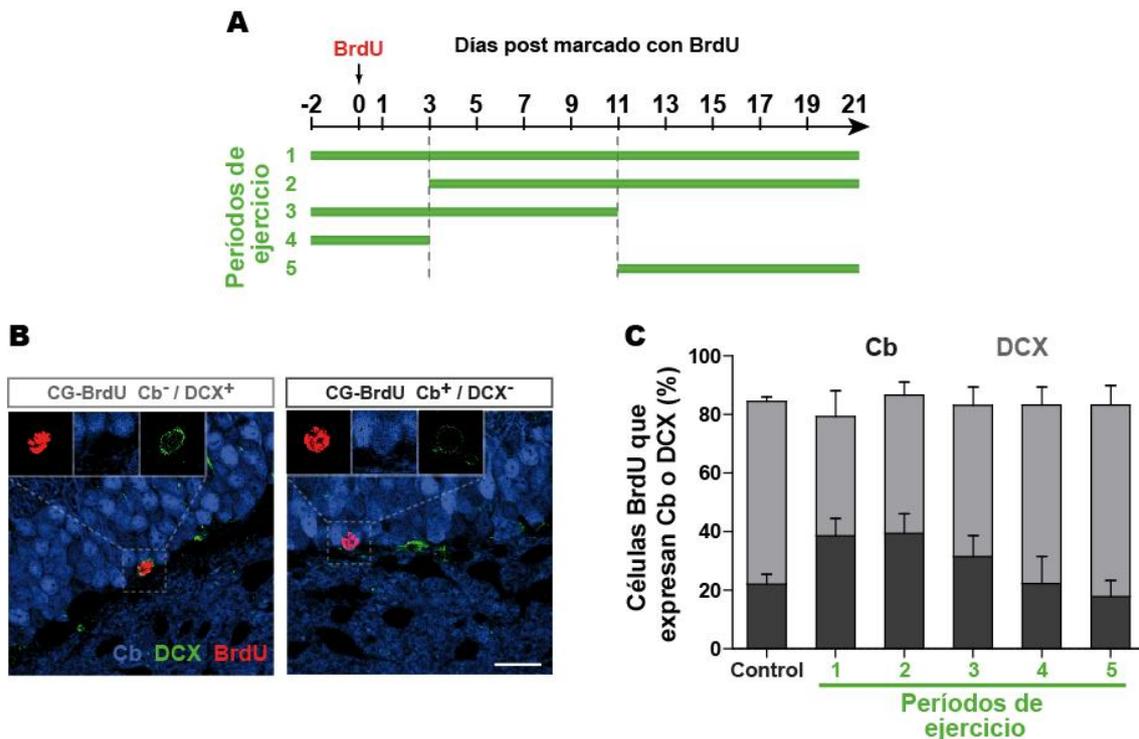


Figura 7. Períodos de alta sensibilidad al ejercicio voluntario. (A) Diseño experimental. Hembras “wild type” recibieron dos inyecciones intraperitoneales de BrdU (50 μ g/g) durante dos días consecutivos para marcar una cohorte de CGs nacidas en el giro dentado adulto. Se colocó una rueda para correr en la caja según se indica (líneas verdes). Se realizó un análisis de expresión de marcadores por inmunofluorescencia y microscopía confocal en células BrdU⁺ de 21 dpi. **(B)** Ejemplos de CG marcada con BrdU (CG-BrdU) que expresa doublecortin (DCX) pero no calbindin (Cb) en un ratón sedentario (izquierda) y CG-BrdU que expresa Cb pero no DCX en un ratón full running (derecha). Escala: 20 μ m. **(C)** Cuantificación de la expresión de DCX (gris claro) y Cb (gris oscuro) de los grupos experimentales indicados en **(A)**. Tamaño de muestra: 100 - 200 células, con 3-5 ratones para cada condición.

- **Grupo 3**, ejercicio -2 – 11 dpi: para evaluar si la modulación ocurre en el período de sinaptogénesis GABAérgica;
- **Grupo 4**, ejercicio -2 – 3 dpi: para evaluar si la modulación ocurre durante el período de división de los progenitores;
- **Grupo 5**, ejercicio 11 – 21 dpi , para evaluar si la modulación ocurre en el período de sinaptogénesis glutamatérgica;

Se analizó la expresión de los marcadores DCX (temprano) y Cb (tardío) en células de la GCL que expresaban BrdU; dado que DCX se expresa en neuronas inmaduras y Cb en CGs maduras, un mayor porcentaje de células expresando Cb y

menor porcentaje expresando DCX indica un estado de maduración poblacional mas avanzado. Este análisis nos permitió realizar una primera aproximación para evaluar las ventanas de estimulación. Los grupos en los que la exposición a la ruedita se realizó durante los primeros días del desarrollo neuronal (3 a 11 dpi) presentan los niveles de expresión de Cb y DCX mas cercanos al grupo de ejercicio pleno (figura **7 C**). Esto sugiere que las neuronas en desarrollo respondieron a la actividad del ambiente generada por el ejercicio cuando están atravesando los primeros días del desarrollo neuronal, posiblemente durante el periodo de sinaptogénesis GABAérgica.

Para estudiar en más detalle el período encontrado con los experimentos descritos arriba, realizamos un experimento que nos permitió obtener una medida mas cuantitativa del fenómeno observado. El marcado de progenitores neurales en división mediante retrovirus (RV) permite cuantificar, en la progenie celular, parámetros morfológicos que evidencian el estado de maduración neuronal tales como longitud total de árbol dendrítico y densidad de espinas, por lo que es la técnica más adecuada para realizar este experimento (figura **8**). Se administró un RV para marcar progenitores en división con la proteína fluorescente roja (RFP) para luego identificar esa cohorte de células granulares (CGs-RFP). Al grupo “ejercicio 3 – 11” se le colocó una ruedita para correr durante los días 3 a 11 del desarrollo neuronal, mientras que el grupo control permaneció en condiciones sedentarias. La morfología de las CGs-RFP se analizó 21 días después del marcado retroviral (días post-inyección, dpi). Las neuronas del grupo “ejercicio 3 – 11” muestran un incremento significativo de la longitud total de árbol dendrítico y una mayor densidad de espinas (figura **8 C-F**). Además, se realizó un análisis de Sholl (figura **8 D**; ver **Métodos**) para evaluar la complejidad del árbol dendrítico en ambas poblaciones de neuronas. Se encontró que las neuronas del grupo “ejercicio 3 – 11” muestran un mayor número de intersecciones, indicando un árbol dendrítico más complejo.

En conjunto, estos resultados indican que las CGs que se desarrollan en el polo temporal del hipocampo pueden percibir la señal que genera el ejercicio voluntario, en una etapa discreta y correspondiente a los días 3 a 11 de su desarrollo. Como consecuencia de esta activación, las neuronas aceleran su tasa de maduración.

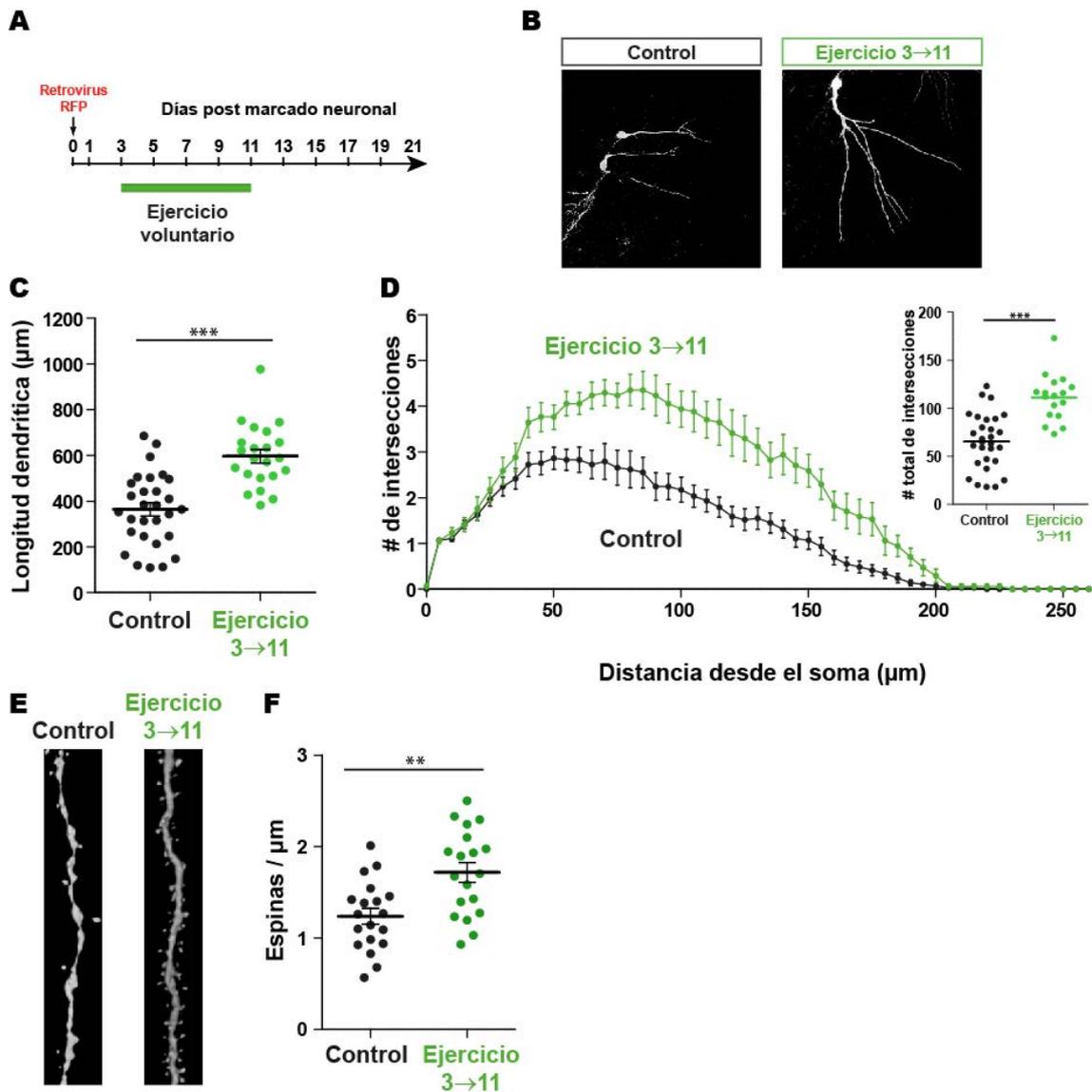


Figura 8. El ejercicio voluntario promueve la maduración neuronal. (A) Diseño experimental. Se inyectó un RV-RFP en el GD para marcar una cohorte de CGs. Se colocó una rueda para correr en la caja a partir del día 3 y hasta el día 11 del desarrollo neuronal. Las CGs-RFP de 21 dpi se analizaron morfológicamente por inmunofluorescencia y microscopía confocal. (B) Imágenes confocales representativas de CGs de 21 dpi obtenidas de ratones control (izquierda) y ejercicio 3-11 (derecha). Escala: 20 μm. (C – D) Medida de longitud dendrítica total y análisis de Sholl de las CGs correspondientes a cada grupo. *** indica un $P < 0.0001$ luego de un test t con corrección de Welch, con un $n = 29$ y 22 CGs (4 ratones) para los grupos control y ejercicio 3-11 respectivamente. (E) Imágenes confocales representativas de fragmentos dendríticos correspondientes a cada grupo experimental. Escala: 5 μm. (F) Análisis cuantitativo de la densidad de espinas de cada grupo. ** indica un $P = 0.0014$ luego de un test t con corrección de Welch, con $n = 19$ fragmentos dendríticos para cada grupo (de 4 ratones).

El ambiente enriquecido y la neurogénesis adulta: efectos sobre la maduración y supervivencia neuronal

A pesar de que muchas CGs mueren antes de madurar, las neuronas sobrevivientes están funcionalmente integradas en la red preexistente a las 4 semanas de edad (Jessberger & Kempermann 2003, Marin-Burgin et al 2012, van Praag et al 2002). La evidencia indica que estas nuevas CGs en el GD juegan un papel importante

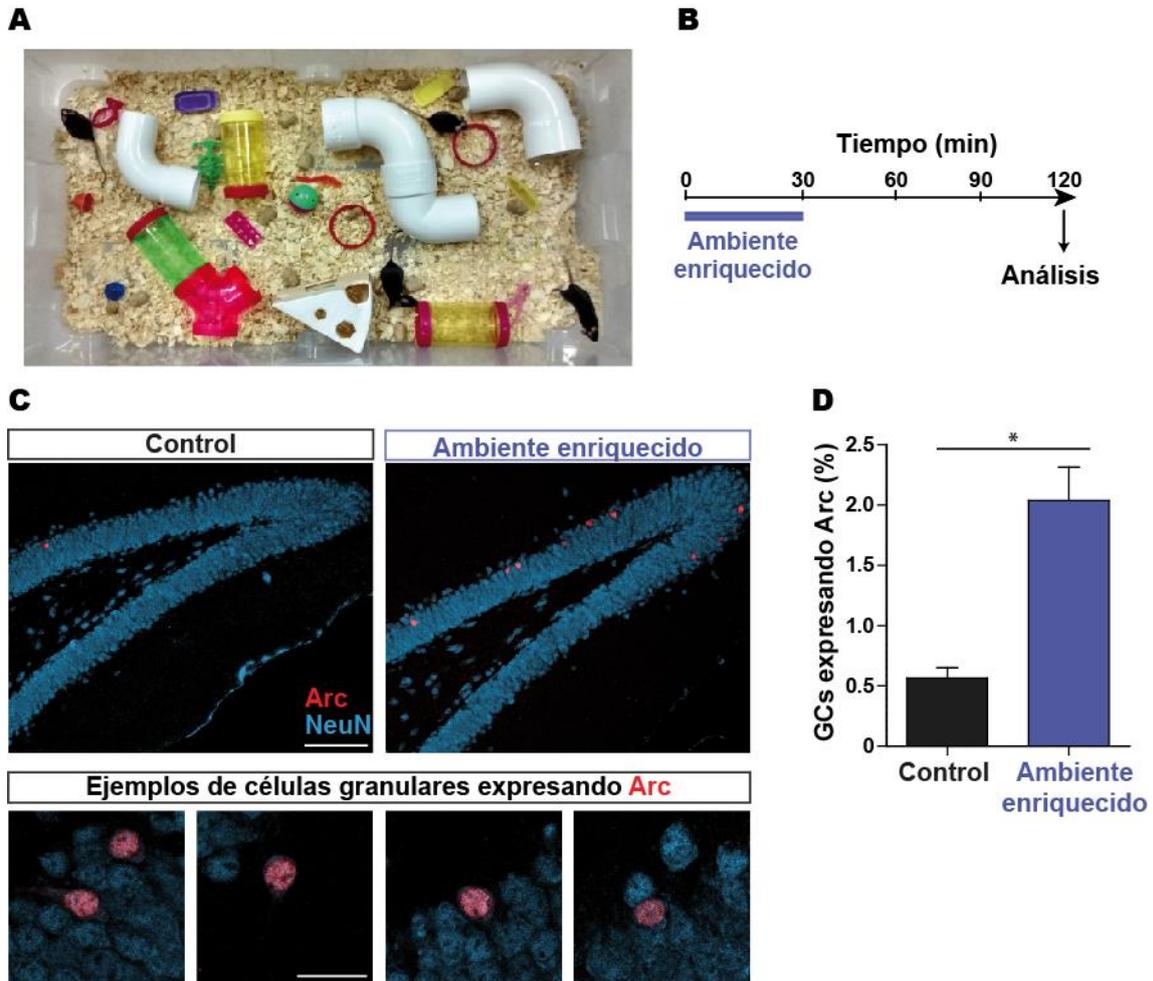


Figura 9. La experiencia exploratoria en un ambiente enriquecido (AE) activa la GCL.

(A) La caja del AE con los ratones explorando. (B) Diseño experimental. Ratones adultos fueron colocados en un AE para exploración libre durante 30 minutos (línea azul), o se dejaron en una caja común (control), y fueron perfundidos luego de 2 horas. La expresión de Arc en la GCL fue detectada por inmunofluorescencia y microscopía confocal. (C) Imágenes representativas de la expresión de Arc (rojo) en el GD de un ratón control y uno expuesto al AE. NeuN se muestra en azul. Escala: 100 μ m. Abajo: Ejemplos de CGs en las que se observa la colocalización de Arc con NeuN. Escala: 20 μ m. (D) Proporción de CGs que expresan Arc en el GD de ratones control y AE. * indica un $P = 0.0286$ luego de un test Mann-Whitney, con $n = 4$ ratones para cada grupo.

en los procesos de aprendizaje y memoria (Bruel-Jungerman et al 2005, Shors et al 2001, Shors et al 2002, Snyder et al 2005, Winocur et al 2006). En particular, la exposición a un AE promueve la exploración espacial y la actividad neural en el GD inducida por la novedad (Chancey et al 2013, Nitz & McNaughton 2004, Overstreet-Wadiche et al 2006a, Tashiro et al 2007). El objetivo de esta sección es evaluar el efecto de la exposición a un AE sobre la maduración neuronal. Además de promover la actividad neural en el GD, el AE representa una demanda cognitiva mayor que el ejercicio voluntario y es una actividad particularmente interesante para los ratones, en la cual son colocados en una caja de mayor tamaño en la que tienen acceso a túneles, juguetes, una escalera e incluso una casa con forma de queso (figura **9 A**).

En primer lugar nos preguntamos si la exposición a un AE modifica los niveles de activación de la GCL del GD. Un grupo de ratones se mantuvo en una caja normal (grupo control), mientras que otro grupo fue colocado por 30 minutos en un AE (grupo AE), y se analizaron 2 horas después (figura **9 B**). Para determinar el nivel de actividad se utilizó a modo de sensor la expresión del gen de respuesta inmediata Arc en CGs (Piatti et al 2011); la GCL y las CGs fueron identificadas por la expresión del marcador neuronal NeuN. Se observó un mayor porcentaje de CGs expresando Arc en el GD de los ratones que habían sido expuestos a un AE comparados con el grupo control (figura **9 D**). Estos resultados se corresponden con trabajos recientes (Chawla et al 2005, Huckleberry et al 2015, Meconi et al 2015, Ramirez-Amaya et al 2013, Tashiro et al 2007, Vazdarjanova et al 2006). Concluimos entonces que la exposición a un AE durante tiempos muy breves tiene un efecto activador del GD, evidenciado en este caso por un aumento en la cantidad de neuronas Arc positivas. Este experimento fue realizado en colaboración con Mariela Trinchero.

Posteriormente nos preguntamos si la exposición a un AE durante un período de tiempo restringido podría modular la maduración de las CGs y si dicha modulación es dependiente del estadio en el que se encuentran las CGs en desarrollo. Ratones adultos recibieron un RV-RFP en el GD temporal para marcar una cohorte de neuronas nuevas (CGs-RFP). Cada grupo experimental fue expuesto a un AE por períodos de 48 horas a diferentes tiempos post-inyección, de acuerdo al esquema de la figura **10 A**. Se evaluó la morfología de las CGs-RFP a los 21 dpi. Las CGs-RFP mostraron un mayor desarrollo dendrítico cuando la exposición a un AE se da en el período comprendido entre los días 9 a 11 de edad neuronal (AE 9-11), pero no antes o después de este período (figura **10 B-C**). Este resultado es consistente con los

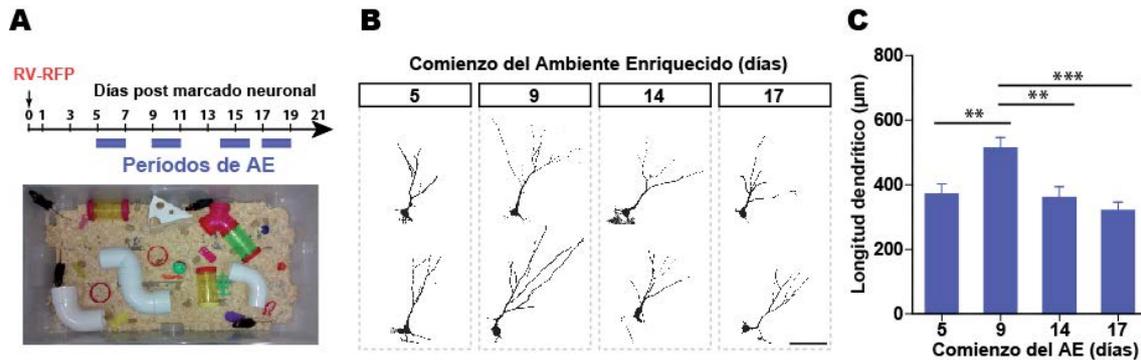


Figura 10. Una breve experiencia en un AE dentro de un período crítico acelera la maduración morfológica. (A) Diseño experimental. Un RV-RFP fue inyectado en el GD temporal para marcar CGs (GCs-RFP) nacidas durante la adultez. Los grupos de ratones se colocaron en un AE por 48 horas a diferentes tiempos post inyección (líneas azules) o se dejaron en una caja común (control). Se analizaron parámetros morfológicos de las CGs-RFP a los 21 días por inmunofluorescencia y microscopía confocal. (B) Imágenes confocales representativas de CGs-RFP de 21 dpi para cada grupo. Escala: 50 μm. (C) Medidas de longitud dendrítica total de CGs expuestas al AE a diferentes edades neuronales. ** indica un $P < 0.01$ *** indica un $P < 0.001$; luego de un análisis de varianza (ANOVA; $P < 0.0001$) seguido de un post test de Bonferroni, con $n = 31, 27, 24$ y 27 neuronas (de 3 o 4 animales por grupo) para los grupos cuyo AE comenzó a los 5, 9, 14 y 17 días, respectivamente.

mostrados en la sección anterior en los que se vio que el ejercicio voluntario acelera la maduración cuando es realizado durante los días 3 a 11 del desarrollo neuronal. Estos datos sugieren que la exposición a un AE por tan solo 48 horas en una etapa precisa del desarrollo neuronal es suficiente para promover la maduración de las nuevas CGs.

Para examinar este fenómeno en mayor detalle y proveer una comparación estandarizada, decidimos realizar una nueva serie de experimentos. Evaluamos el efecto de la exposición a AE 9-11 sobre la maduración neuronal, comparado con un grupo control que se mantuvo en una caja normal durante todo el período. Las CGs-RFP de 21 dpi que se desarrollaron en AE 9-11 presentaron características morfológicas más maduras: un mayor desarrollo y complejidad del árbol dendrítico y un incremento en la densidad de espinas, comparado con los controles (figura 11).

Ha sido reportado que la exposición a un AE favorece la sobrevivencia y la activación de CGs 6 semanas después de su generación (Tashiro et al 2007). Notablemente, ese trabajo muestra que la mayor sobrevivencia se ve cuando el AE tiene lugar en la segunda semana de edad neuronal, lo que sería completamente consistente con el período crítico de maduración descrito aquí. Además, en trabajos previos de nuestro laboratorio se observó que la actividad eléctrica intrínseca a la que

están sometidas las GCs en desarrollo puede afectar la sobrevivida neuronal (tesis de María Georgina Davies Sala, 2012). Asimismo, se ha visto que el tratamiento de shocks electro-convulsivantes produce un incremento en la sobrevivida de las neuronas nacidas en el cerebro adulto (Parent & Lowenstein 2002, Parent & Murphy 2008, Parent et al 1997). Nos preguntamos entonces si la exposición a AE 9-11 tendría algún efecto en la sobrevivida de esas CGs. Analizamos la cantidad de CGs-RFP de 21 dpi en la capa granular del GD (figura 12). Encontramos que los ratones que fueron expuestos a AE 9-11 muestran una mayor cantidad de CGs-RFP que el grupo control. Este discreto incremento, aunque significativo, sugiere que las neuronas que se desarrollan en AE 9-11 sobreviven en mayor medida que las neuronas de los grupos

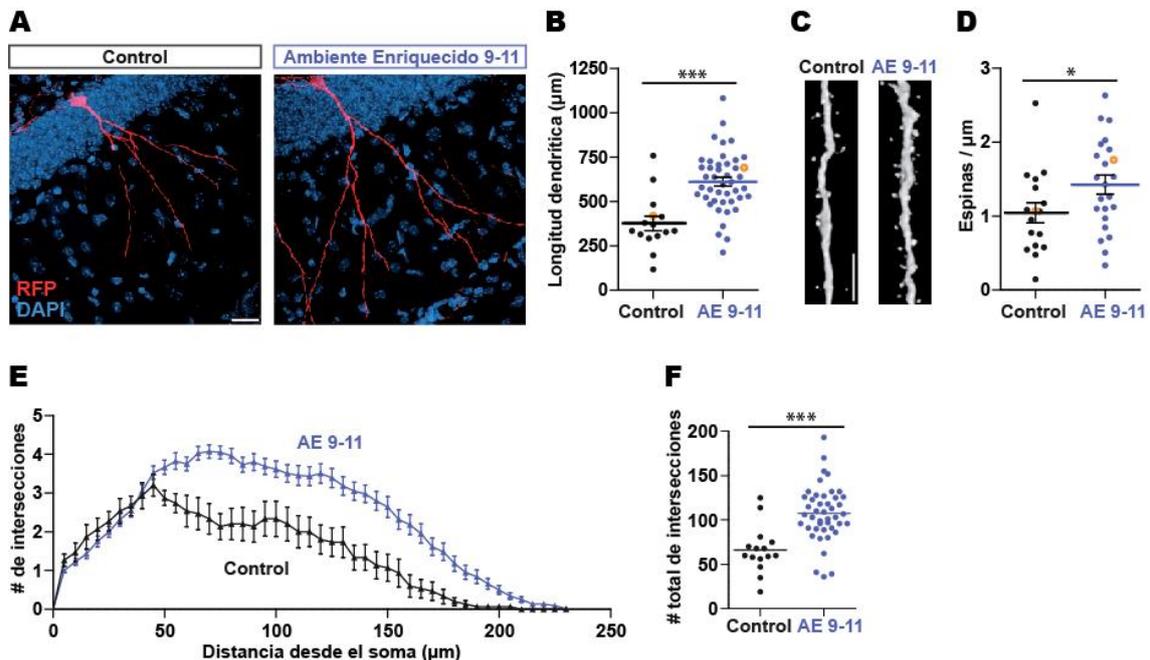
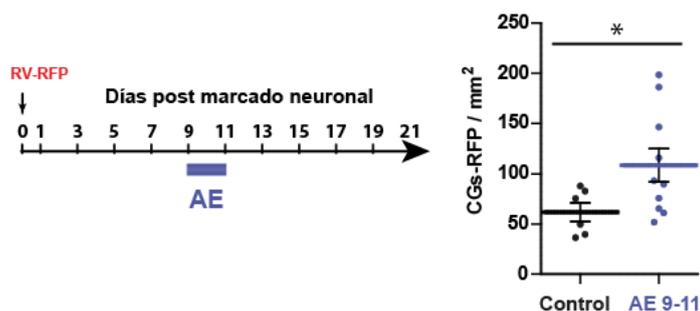


Figura 11. La experiencia exploratoria durante el período crítico promueve el desarrollo neuronal. (A) Imágenes confocales representativas de CGs de 21 dpi de ratones expuestos a un AE (AE 9-11) y controles no expuestos, con 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; azul) marcando la GCL. Escala: 20 μm . (B) Medidas de longitud dendrítica total de CGs de ambas condiciones. *** indica un $P < 0.0001$ luego de un test t con corrección de Welch, con un $n = 15$ y 44 neuronas (de 3 a 5 ratones) para las condiciones control y AE 9-11, respectivamente. Los círculos naranja corresponden a la CGs ejemplo mostradas en (A). (C) Imágenes de alta resolución para resaltar las espinas dendríticas a los 21 dpi. Escala: 5 μm . (D) Medidas de densidad de espinas para ratones control y AE 9-11. * indica un $P < 0.05$ luego de un test t con corrección de Welch, con un $n = 17$ y 23 segmentos (de 3 a 5 ratones) para las condiciones control y AE 9-11, respectivamente. (E) El análisis de Sholl muestra un crecimiento dendrítico sustancial inducido por AE. (F) Cuantificación del número total de intersecciones en el análisis de Sholl. *** indica un $P < 0.0001$ luego de un test t con corrección de Welch, con un $n = 15$ y 44 neuronas (de 3 a 5 ratones) para las condiciones control y AE 9-11, respectivamente.

Figura 12. Una breve experiencia en un AE incrementa la sobrevida de las nuevas CGs. Densidad de CGs-RFP de 21dpi. * indica un $P < 0.05$ luego de un test Mann-Whitney, con $n = 144$ y 473 células contadas en mas de 3 secciones por ratón de 6 y 10 ratones para las condiciones control y AE 9-11 respectivamente.



control. Estos experimentos fueron realizados en colaboración con Mariela Trincherro y Karina Buttner.

Los resultados hasta aquí mostrados indican que las CGs que se desarrollan en un AE durante el período comprendido entre los días 9 a 11 de edad neuronal presentan un árbol dendrítico más desarrollado y de mayor complejidad y un incremento en la densidad de espinas. Además, la exposición a un AE durante el período descrito incrementa ligeramente la sobrevida neuronal temprana.

En secciones previas observamos que el ejercicio voluntario promueve la maduración neuronal en una etapa correspondiente a los días 3 a 11 de su desarrollo (figuras 7 y 8). En base a los resultados obtenidos con AE, nos preguntamos si 48 horas de ejercicio voluntario en el período descrito tendrían algún efecto sobre la tasa de maduración neuronal. Realizamos un experimento en el que los ratones adultos recibieron una inyección de un RV-RFP y luego se les colocó por 48 horas una ruedita para correr desde el día 9 de edad neuronal (grupo “ejercicio 9-11”), y se comparó con los resultados de “ejercicio 3-11” obtenidos previamente (figura 13). Observamos que las CGs del grupo ejercicio 9-11 mostraron un mayor desarrollo dendrítico comparado con el control, aunque en menor medida que el ejercicio 3-11. Además, se observó un leve incremento en la densidad de espinas, que no llegó a ser estadísticamente significativo. Concluimos entonces que el ejercicio voluntario promueve la maduración neuronal incluso en períodos cortos de tiempo. Sin embargo, los resultados sugieren que este estímulo tiene características distintas al AE.

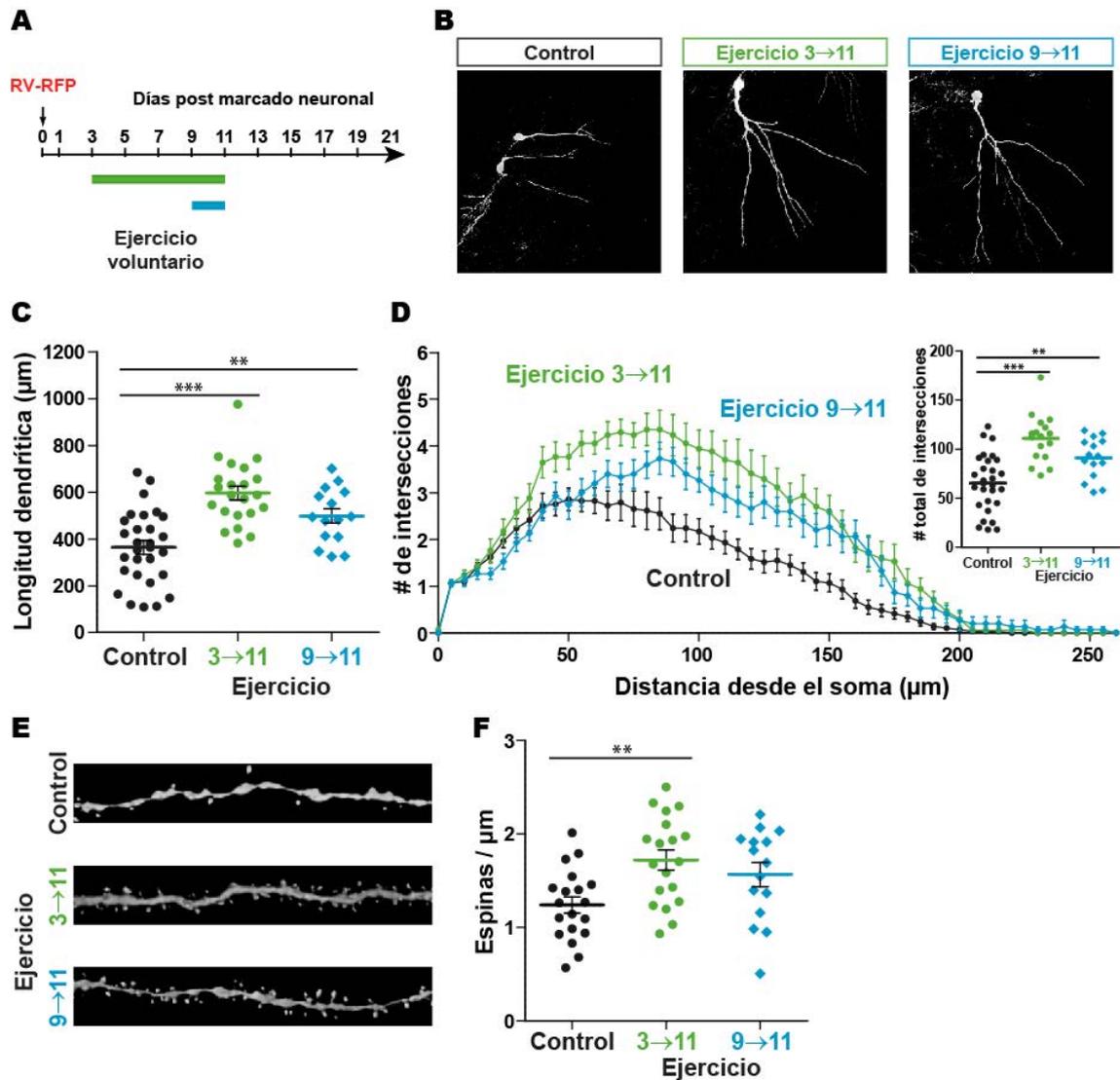


Figura 13. Dos días de ejercicio voluntario promueven la maduración neuronal. (A) Diseño experimental. Se inyectó un RV-RFP en el GD para marcar una cohorte de CGs. Se colocó una rueda para correr en la caja durante los períodos de tiempo que se indican y se realizó el análisis morfológico por inmunofluorescencia y microscopía confocal de las CGs-RFP a los 21 dpi. (B) Imágenes confocales representativas de CGs de 21 dpi obtenidas de ratones control (izquierda), ejercicio 3-11 (centro) y ejercicio 9-11 (derecha). Escala: 20 μm . (C – D) Longitud dendrítica total de las CGs correspondientes a cada grupo. ** indica un $P < 0.01$ y *** indica un $P < 0.001$ luego de un ANOVA ($P < 0.0001$) seguido de un post test de Bonferroni con $n = 29, 22$ y 15 CGs (4 o 5 ratones) para los grupos control, ejercicio 3-11 y ejercicio 9-11 respectivamente. (E) Imágenes confocales representativas de fragmentos dendríticos correspondientes cada grupo experimental. Escala: 5 μm . (F) Análisis cuantitativo de la densidad de espinas de cada grupo. ** indica un $P < 0.01$ luego de un ANOVA ($P = 0.0058$) seguido de un post test de Bonferroni con $n = 19, 19$ y 15 fragmentos (4 o 5 ratones) para los grupos control, ejercicio 3-11 y ejercicio 9-11 respectivamente.

Efecto del AE en las propiedades funcionales de las neuronas en desarrollo

Trabajos previos de nuestro laboratorio (Esposito et al 2005, Marin-Burgin et al 2012, Mongiat et al 2009, Piatti et al 2011, Yang et al 2015) han demostrado que a medida que avanza el proceso de maduración neuronal, se producen cambios a nivel morfológico que están acompañados por un desarrollo funcional progresivo, incluyendo un aumento en la conectividad y excitabilidad neuronal, y sinaptogénesis, entre otros. Nos preguntamos entonces si los cambios morfológicos observados en las CGs que fueron expuestas a un AE tienen un correlato en el perfil electrofisiológico de la neurona. Diseñamos un experimento en el que el marcado neuronal se realizó mediante una estrategia genética para obtener una mayor cantidad de neuronas marcadas por sección. La administración de TAM en ratones $Ascl1^{CreERT2};CAG^{floxStopTom}$ adultos indujo la expresión permanente de Tom en la población de CGs generadas al momento de la inducción (CGs-Tom) (ver **Introducción** y **Parte 1**). La adquisición y análisis de los registros electrofisiológicos mostrados en esta sección fue realizada por Sung Min Yang.

Ratones $Ascl1^{CreERT2};CAG^{floxStopTom}$ fueron inducidos con TAM, expuestos a un AE durante los días 9 a 11 del desarrollo neuronal, y 20 días después del marcado genético se obtuvieron rebanadas agudas de cerebro (ver **Métodos**) para proceder al análisis *ex vivo* (figura **14 A-B**). Con el objetivo de caracterizar las propiedades electrofisiológicas neuronales se llevaron a cabo registros en configuración whole-cell en CGs-Tom (figura **14 C**). En general, las CGs-Tom de 20 días de edad mostraron propiedades eléctricas típicas de neuronas inmaduras, tales como una resistencia de input elevada, baja capacitancia de membrana y una capacidad limitada para disparar potenciales de acción (figura **14 D-F**). Las CGs-Tom de los ratones expuestos a AE mostraron una resistencia de membrana y propiedades de disparo similares a las de los ratones control, indicando un grado de maduración funcional similar para las dos poblaciones de neuronas. La capacitancia de membrana se vio levemente incrementada, lo que sería consistente con un árbol dendrítico más desarrollado. Sin embargo, mostraron un importante incremento (3 veces) en la frecuencia de corrientes postsinápticas excitatorias espontáneas (sEPSCs), reflejando una mayor integración de la neurona a través de un número incrementado de contactos de la red excitatoria (figura **14 G**). La amplitud de los sEPSCs no se vio afectada por el estímulo, lo que indica que el aumento en la frecuencia de actividad espontánea de las CGs está dado por cambios en la propia célula más que por cambios en la red.

En síntesis, la exposición a un AE durante tan solo dos días en un período breve pero preciso del desarrollo neuronal (días 9 a 11), tuvo un fuerte impacto en la morfología e integración funcional de la CGs nacidas en el hipocampo adulto.

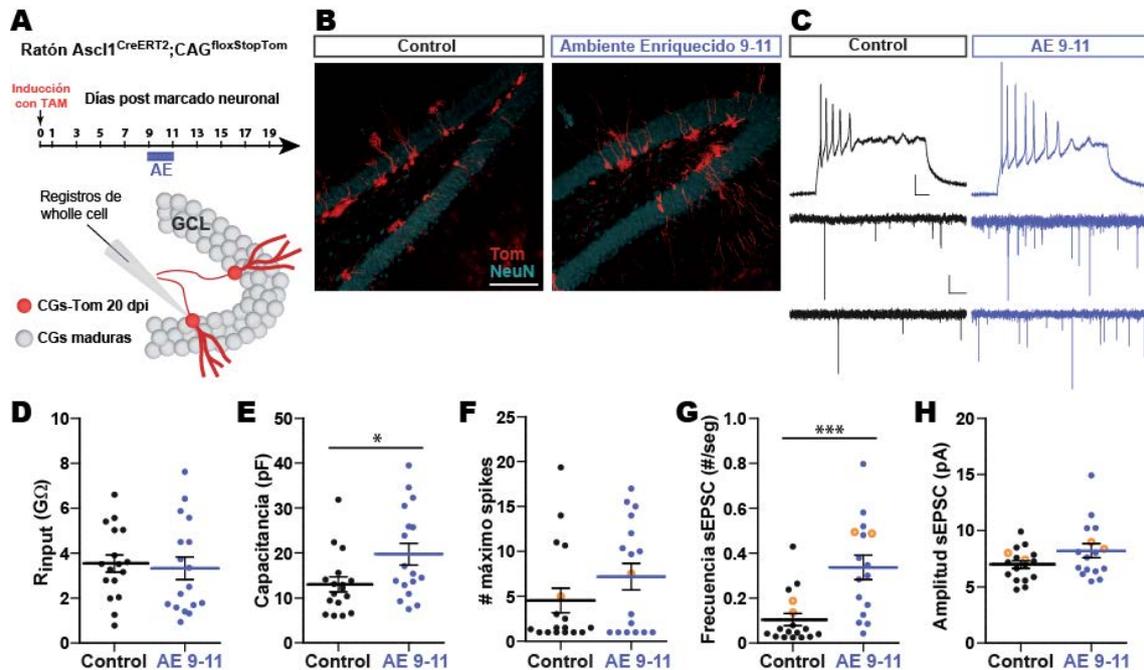


Figura 14. Propiedades funcionales de las nuevas CGs de ratones control y AE 9-11.

(A) Diseño experimental. Ratones $Ascl1^{CreERT2};CAG^{floxStopTom}$ recibieron TAM (150 μ g/g, dos inyecciones en un día) para marcar una cohorte de nuevas CGs (CGs-Tom) y fueron expuestos a un AE durante los días 9-11 del desarrollo neuronal. A los 20 dpi se obtuvieron registros de whole-cell de CGs-Tom. (B) Imágenes representativas de CGs-Tom obtenidas de ratones control o AE 9-11, con una inmunofluorescencia para el marcador neuronal NeuN (cian) marcando la GCL. Escala: 100 μ m. (C) Arriba: Trazos de voltaje representativos mostrando el disparo de CGs-Tom en respuesta a inyecciones de corriente despolarizante (60 pA, 500 ms) para ratones control y AE 9-11. Escala: 20 mV, 50 ms. Abajo: Trazos de corriente representativos (2 por célula) mostrando los EPSCs espontáneos obtenidos de CGs-Tom control y AE 9-11 mantenidas a -70 mV. Escala: 4 pA, 2 s. (D – E) Propiedades pasivas de membrana. * indica un $P < 0.05$ luego de un test Mann-Whitney con $n = 17$ CGs para cada condición. (F) Máximo número de disparos en respuesta a una inyección de corriente despolarizante. (G – H) Frecuencia y amplitud de los EPSCs espontáneos. *** indica un $P < 0.001$ luego de un test Mann-Whitney con $n = 17$ y 16 neuronas para los ratones control y AE 9-11, respectivamente. Los círculos naranja corresponden a los trazos mostrados en (C).

Rol de la activación del GD en el proceso de desarrollo neuronal

En las secciones anteriores vimos que el AE 9-11 promueve una aceleración en la maduración en las neuronas en desarrollo, y una mayor conectividad funcional. El objetivo de esta sección es identificar el mecanismo por el cual la experiencia exploratoria es transmitida a señales locales que actúan sobre las nuevas neuronas individuales. Como el AE activa fuertemente la GCL (figura 9), nos preguntamos si la activación de la red local tiene algún efecto en el desarrollo de las nuevas CGs. Para alcanzar este objetivo, utilizamos partículas retrovirales diseñadas para inducir la expresión del receptor asociado a proteína G activado por ligando sintético hM3D (Alexander et al 2009). El hM3D es un receptor obtenido por evolución dirigida a partir del receptor de acetilcolina, seleccionado para que sea activado específicamente por

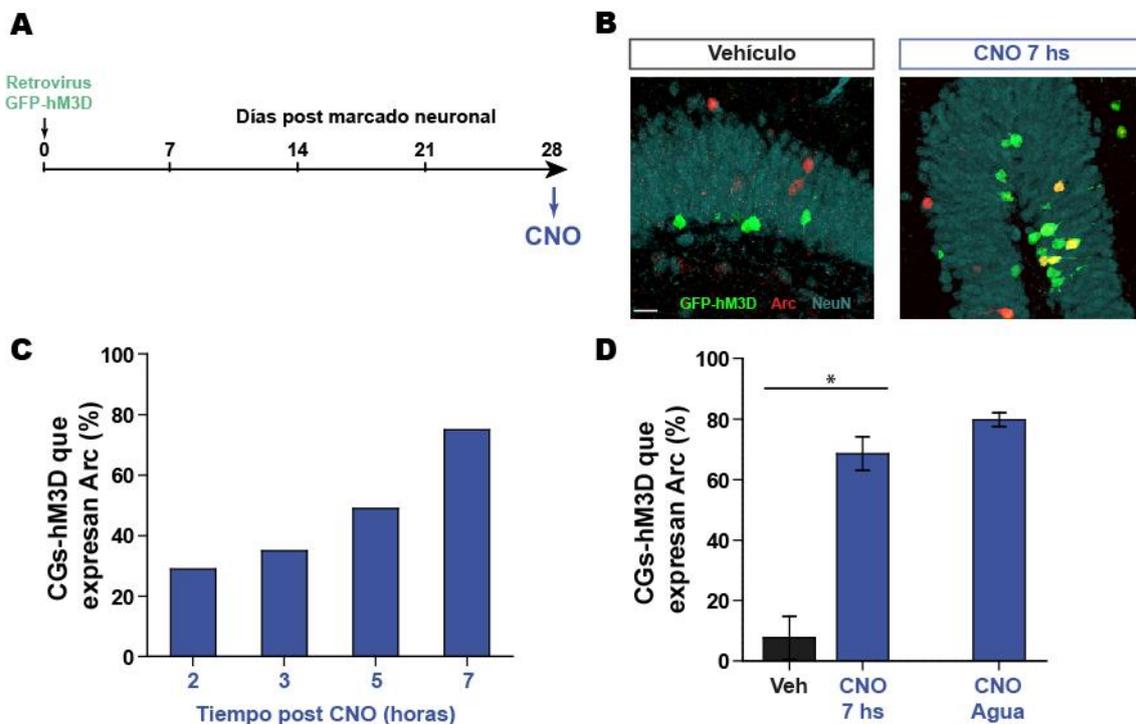


Figura 15. Caracterización de la activación de las CGs-hM3D mediada por CNO. (A) Diseño experimental. Se inyectó un RV-hM3D para marcar una cohorte de nuevas CGs en un ratón adulto. A los 28 días se administró CNO por vía intraperitoneal (5 μg/g) o se lo administró en el agua de beber (5 μg/g) la noche previa. Los niveles de activación de las CGs-hM3D se evaluaron por inmunofluorescencia y microscopía confocal del marcador de actividad Arc. (B) Imágenes confocales que muestran el GD con CGs-hM3D de ratones que recibieron vehículo (izquierda) o CNO (derecha; análisis realizado 7 horas después de la administración de CNO). La GCL se encuentra marcada con NeuN (azul). Escala: 20 μm. (C) Curso temporal de la activación de las CGs-hM3D luego de la inyección intraperitoneal de CNO. (D) El CNO causa la activación de las CGs-hM3D (pero no el vehículo) 7 horas después de la administración. * indica un $P = 0.0325$ luego de un test Mann-Whitney, con $n = 5$ ratones control y 3 ratones CNO. Se muestra también la activación de las CGs-hM3D producto de la administración de CNO por vía oral ($n = 2$ ratones).

el ligando sintético CNO (Clozapine-N-Oxide). Tras la activación, se recluta una vía mediada por proteína G que desemboca en el cierre de canales de K^+ , ocasionando la despolarización (Conklin et al 2008, Dong et al 2010, Pei et al 2008, Urban & Roth 2015).

En primer lugar, evaluamos el efecto de la activación *in vivo* de CGs maduras expresando el receptor hM3D (CGs-hM3D) (figura **15 A-B**). Tras la administración intraperitoneal de CNO, más del 60% de las CGs-hM3D expresaron Arc, reportero de actividad neuronal (figura **15 B-D**). Además, el CNO se administró por la vía oral (en el agua de beber); las CGs-hM3D de ratones que recibieron CNO en el agua durante toda la noche mostraron un alto porcentaje de expresión de Arc (figura **15 D**). Concluimos entonces que hM3D es una herramienta adecuada para activar CGs *in vivo*.

Con el objetivo de evaluar si la activación quimiogénica del GD tiene algún efecto sobre la maduración neuronal diseñamos el siguiente experimento (figura **16 A**). Ratones adultos jóvenes recibieron una inyección de RV-hM3D para expresar en una cohorte de CGs el receptor sintético hM3D (CGs-hM3D). Luego de 7 semanas, cuando esas neuronas habían completado su maduración, se inyectó un RV-RFP para marcar otra cohorte de CGs (CGs-RFP). Cuando el segundo grupo de neuronas estaba atravesando el período crítico de maduración descrito anteriormente (días 9 a 11 de edad neuronal), se administró CNO de forma tal de activar la cohorte de neuronas maduras CGs-hM3D. Paralelamente, otro grupo de ratones recibió el mismo tratamiento retroviral, pero se les administró CNO durante 96 horas desde el día 8 hasta el 12 del desarrollo neuronal; este grupo tuvo como objetivo evaluar la posibilidad de que solo dos días de activación del GD no tuvieran ningún efecto sobre la maduración neuronal. Se analizó la morfología de las CGs-RFP a los 21 días. En ambos grupos activados se observó un incremento importante en el tamaño y la complejidad del árbol dendrítico en comparación al control (figura **16 B-E**). En el grupo que recibió CNO de 9 a 11 dpi se analizó también la densidad de espinas y se observó un incremento importante en comparación con el control. Estos resultados confirman que la activación una subpoblación de CGs maduras del GD *in vivo* causa una aceleración de la maduración e integración funcional de las neuronas que se desarrollan en el hipocampo adulto (figura **16 F-G**).

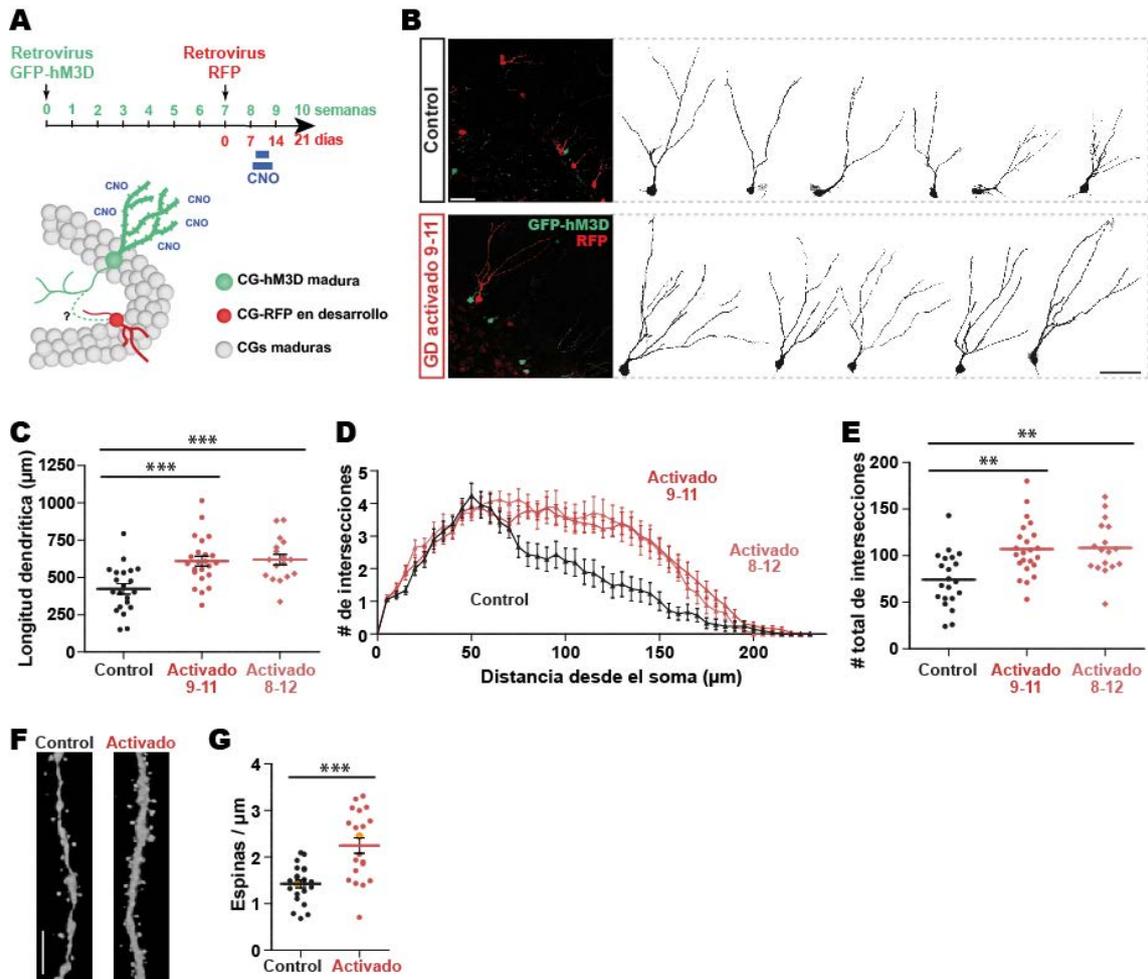


Figura 16. La activación quimiogénica de una cohorte de CGs maduras promueve la integración de nuevas CGs que están atravesando el período crítico. (A) Diseño experimental. Un RV-hM3D fue inyectado en el GD para marcar nuevas CGs (CGs-hM3D). Luego de 7 semanas se inyectó un RV-RFP para marcar otra cohorte de CGs (CGs-RFP). Ocho o nueve días después, los ratones recibieron CNO por 96 o 48 horas para estimular las CGs-hM3D maduras que estaban en contacto con las CGs-RFP jóvenes. El análisis morfológico se realizó en las CGs-RFP a los 21 dpi. **(B)** Izquierda: Imágenes representativas del GD mostrando CGs-RFP de 21 dpi (rojo) y CGs-hM3D de 70 dpi (verde) de ratones que recibieron vehículo o CNO. Derecha: Ejemplos representativos de CGs-RFP. Escala: 50 μm . **(C – E)** Medidas de longitud dendrítica **(C)** y análisis de Sholl **(D y E)** que demuestran el sustancial crecimiento de las CGs-RFP de ratones que recibieron CNO. ** indica un $P < 0.01$; *** indica un $P < 0.001$ luego de un análisis de varianza (ANOVA; $P < 0.0001$) seguido de un post test de Bonferroni, con $n = 21, 23$ y 17 neuronas (con 5 ratones para cada grupo) para los grupos control, activado 9-11 y activado 8-12, respectivamente. **(F – G)** Se muestran segmentos neuronales para destacar las espinas dendríticas. Escala: $5 \mu\text{m}$. La densidad de espinas es mayor luego de la activación de las CGs-hM3D. *** indicia un $P < 0.001$ luego de un test de t con corrección de Welch, con $n = 22$ y 20 segmentos (de 5 ratones) para las condiciones control y activado 9-11, respectivamente. Los círculos naranja corresponden a los ejemplos mostrados en **(F)**.

Discusión

En esta sección evaluamos el rol la actividad del microambiente hipocampal en el desarrollo de las nuevas CGs del GD adulto. En primer lugar, confirmamos que el ejercicio voluntario promueve el desarrollo neuronal, como había sido reportado previamente (Piatti et al 2011). Además, encontramos un período en el que las neuronas son sensibles a la activación del ambiente inducida por el ejercicio (figuras 7 y 8). Notablemente, este período corresponde a los días 3 a 11 del desarrollo neuronal, coincidente con el comienzo de la sinaptogénesis GABAérgica (Esposito et al 2005).

Los efectos del AE en el proceso de neurogénesis en el hipocampo adulto han sido ampliamente estudiados (Brown et al 2003, Kempermann 2015a, Kempermann & Gage 1999, Kempermann et al 1997, Kempermann et al 1998, Tashiro et al 2007, van Praag et al 1999). En este capítulo, demostramos que 30 minutos de AE inducen la expresión de Arc en CGs maduras, indicando una importante activación del GD (figura 9) (Huckleberry et al 2015, Tashiro et al 2007). Mas aún, la exposición a un AE fue suficiente para promover la maduración de nuevas CGs. Notablemente, esa exposición fue efectiva solo en el periodo correspondiente a los días 9 a 11 del desarrollo neuronal, siendo este periodo consistente con los resultados de ejercicio voluntario (figuras 10 y 11). Sin embargo, los resultados sugieren que el AE sería un estímulo mas fuerte que el ejercicio voluntario, ya que 48 horas de ejercicio tuvieron un efecto marginal en el desarrollo de las CGs (figura 13). En contraste con estos datos, el AE tuvo un efecto moderado sobre las nuevas CGs en ratones envejecidos, mientras que el ejercicio voluntario promovió fuertemente la maduración (tesis de Mariela Trincheró, 2015). Esta observación podría explicarse suponiendo que los ratones jóvenes tienen niveles de actividad eléctrica en los circuitos neuronales basalmente mayores que los ratones envejecidos (Segovia et al 2008, Zambrana et al 2007). Es interesante mencionar que la tasa de maduración se ve afectada por los niveles de BDNF (tesis de Mariela Trincheró, 2015) (Wang et al 2015, Waterhouse et al 2012), lo que sumaría una variable a considerar al comparar los resultados en ratones adultos y envejecidos. Por otro lado, la experiencia exploratoria en un ratón envejecido podría ser un estímulo menor debido a una falta de motivación inducida por la edad (Segovia et al 2008, Zambrana et al 2007).

Ha sido reportado que el AE sostenido incrementa la sobrevida neuronal (van Praag et al 1999). Nuestros resultados muestran que los ratones que se expusieron por 48 horas a AE poseen una mayor cantidad de CGs marcadas que los controles 21 días después del marcado neuronal (figura **12**). Restaría saber si esa sobrevida incrementada se mantiene en las etapas finales del desarrollo neuronal. Si bien este dato es preliminar, sugiere que la exposición a un AE por un breve periodo favorece la sobrevida neuronal. En concordancia con nuestro resultado, un trabajo previo mostró que 7 días de AE durante la segunda semana del desarrollo neuronal es suficiente para incrementar la sobrevida de las nuevas CGs (Tashiro et al 2007). Notablemente, este trabajo muestra que las CGs que recibieron AE son fuertemente activadas ante la re exposición al mismo ambiente. Una posible explicación para estos resultados es que el AE contenga una mayor cantidad de información (tamaño de la caja, túneles, ubicación de los juguetes) que debe ser codificada por el hipocampo y particularmente por las nuevas CGs; una sobrevida incrementada implicaría una mayor cantidad “recursos” disponibles para codificar esa información (Danielson et al 2016, Jessberger & Kempermann 2003, Shors et al 2001, Tashiro et al 2007, Tashiro et al 2006).

Las CGs que se desarrollaron en un AE también mostraron propiedades electrofisiológicas diferenciales. Consistente con un mayor desarrollo dendrítico, las CGs de ratones expuestos a un AE mostraron un leve incremento en la capacitancia de membrana. Mas aún, 48 horas de AE indujeron un incremento de 3 veces en la actividad espontánea excitatoria (figura **14**). Estos datos sugieren que el AE favorece la integración de las nuevas CGs, logrando que alcancen un estadio relevante para el procesamiento de la información más rápidamente (Marin-Burgin & Schinder 2012, Mongiat et al 2009, Temprana et al 2015, Toni & Schinder 2015). Se ha propuesto a las nuevas CGs como formadores de asociaciones temporales de la memoria (Aimone et al 2006, Rangel et al 2014). En este contexto es interesante el hecho de que el AE no afectó ni la resistencia de membrana ni la capacidad de disparo de las nuevas CGs, lo que indica que las neuronas alcanzan un alto nivel de conectividad, pero mantienen propiedades funcionales inmaduras (figura **14**) (Mongiat et al 2009, Yang et al 2015). Estas características posibilitarían que esas neuronas formen asociaciones a escalas temporales más largas (Aimone et al 2006, Piatti et al 2011, Rangel et al 2014).

Vimos que 30 minutos de exposición a un ambiente enriquecido producen una importante activación del GD (figura **9**). Además, demostramos que el AE promueve la maduración e integración neuronal (figuras **10**, **11** y **14**). Estos resultados demostraron

una correlación entre los niveles de actividad del GD y la tasa de maduración e integración de las nuevas CGs. Además, son consistentes con datos previos obtenidos en condiciones sedentarias o de ejercicio voluntario (Piatti et al 2011, Snyder et al 2012, Sun et al 2013). Pudimos mimetizar la activación del GD mediante la expresión del receptor hM3D en las nuevas CGs (figura **15**). Notablemente, la activación quimiogénica de una cohorte de neuronas maduras fue suficiente para promover la maduración de las CGs en desarrollo que estaban atravesando el periodo crítico de maduración (figura **16**). Estos datos nos permiten aseverar que la activación de las neuronas maduras en el GD induce la maduración e integración acelerada de las CGs en desarrollo, similar al efecto del AE. Los mecanismos que conectan la activación de las neuronas maduras con la maduración funcional observada en las nuevas CGs son el objetivo del siguiente capítulo.

Parte 2: Integración funcional de las nuevas CGs: Mecanismos

Objetivos e hipótesis

En la sección anterior concluimos que la exposición a un AE promueve la maduración e integración funcional de las neuronas en desarrollo en el hipocampo adulto. Además, vimos que el efecto promotor del AE estaría mediado por la activación de CGs maduras. El objetivo de esta sección es identificar el mecanismo por el cual la activación de neuronas maduras en el GD es transmitida a las CGs en desarrollo. Para lograr este objetivo partiremos de la siguiente hipótesis: Las CGs en desarrollo pueden “percibir” la activación del GD por medio del microcircuito hipocampal. Es importante destacar que por CGs en desarrollo nos referimos a células de alrededor de 10 días de edad, puesto que esta es la edad a la que vimos que el AE o la activación de CGs maduras tienen un marcado efecto sobre su maduración e integración funcional.

Para testear la hipótesis planteada, realizamos experimentos de optogenética y electrofisiología en rodajas agudas de cerebro, combinando la inyección de retrovirus para marcar poblaciones de CGs con ratones genéticamente modificados para identificar poblaciones neuronales específicas dentro del hipocampo. La adquisición y el análisis de los datos electrofisiológicos mostrados en esta sección fue realizado por Sung Min Yang y Silvio Temprana.

Para evaluar *in vivo* el rol del circuito hipocampal encontrado mediante electrofisiología y optogenética, llevamos a cabo experimentos de activación quimiogénica en poblaciones neuronales específicas, como se verá en la segunda etapa de esta sección.

Activación optogenética de neuronas maduras en el giro dentado

En primer lugar evaluamos una vía de comunicación directa entre CGs maduras y CGs que están atravesando el período crítico de desarrollo neuronal. Para

caracterizar esta conexión se recurrió a la optogenética mediante la expresión del canal catiónico activable por luz azul Channelrhodopsin-2 (ChR2) (figura 17 A). Ratones $Ascl1^{CreERT2};CAG^{floxStopChR2}$ jóvenes fueron inducidos con TAM para expresar ChR2 en una cohorte de neuronas (CGs-ChR2). Cuando las CGs-ChR2 completaron su maduración (7 semanas después) se inyectó un RV-RFP para marcar otra cohorte de CGs (CGs-RFP). Diez días después se obtuvieron rebanadas agudas de hipocampo para la adquisición de registros en configuración whole-cell de CGs-RFP

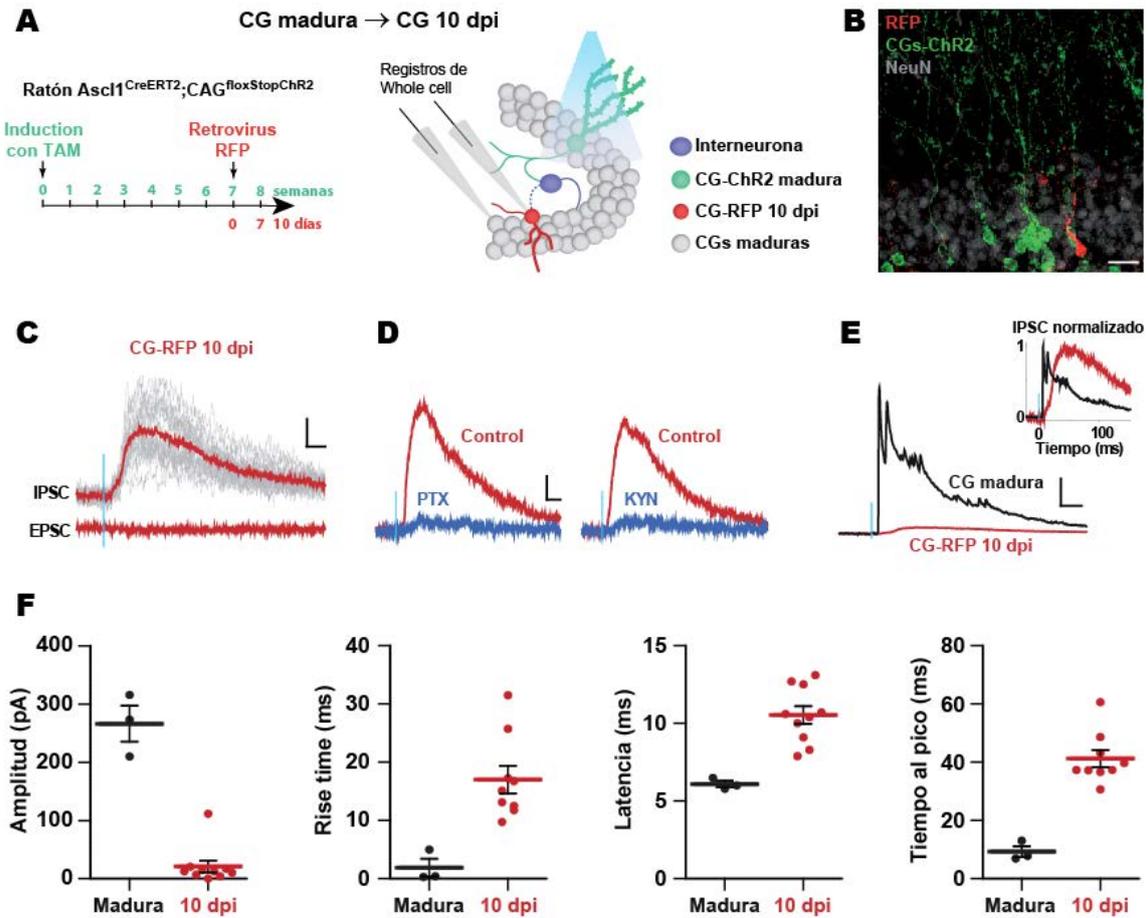


Figura 17. Las CGs maduras se conectan a las CGs en desarrollo. (A) Diseño experimental. Ratones $Ascl1^{CreERT2};CAG^{floxStopChR2}EYFP$ recibieron TAM para marcar una cohorte de CGs (CGs-ChR2 maduras). Luego de 7 semanas se inyectó un RV-RFP para marcar otra cohorte de CGs nuevas (CGs-RFP). Se realizaron registros de whole-cell en CGs-RFP de 10 dpi bajo estimulación lumínica. (B) Imagen confocal que muestra las CGs-ChR2 maduras inducidas por el TAM y las CGs-RFP de 10 dpi. Escala: 20 μ m. (C) Trazos representativos de corrientes mostrando IPSCs y EPSCs obtenidos de CGs-RFP de 10 dpi en respuesta a la activación por láser de CGs-ChR2 maduras (1 ms; línea azul). Se muestra el trazo promedio (rojo) y los trazos individuales (gris). Escala: 5 pA, 20 ms. (D) Las corrientes inhibitorias fueron bloqueadas (>90 %) por 100 mM de pocrotoxina (PTX; n = 3) y 4 mM de ácido kinurénico (KYN; n = 2). Escala: 5 ms, 20 ms. (E) Comparación de los IPSCs evocados por láser de CGs maduras y CGs de 10 dpi. Escala: 50 pA, 20 ms. El recuadro interno muestra los trazos normalizados. (F) Caracterización de los IPSCs disinápticos de CGs-RFP de 10 dpi (n = 9 células, 4 ratones) y CGs maduras (n = 3 células, 2 ratones).

de 10 dpi en respuesta a la estimulación optogenética de CGs-ChR2 maduras. La utilización de registros en esta configuración permite la detección y discriminación de corrientes excitatorias e inhibitorias postsinápticas (EPSCs y IPSCs) a partir de mantener la membrana a distintos potenciales (voltage-clamp). Los resultados de este análisis se resumen en la figura 17 C-F; no se observaron corrientes excitatorias en las CGs-RFP evocadas por la estimulación de CGs-ChR2 (0 de 9 células registradas). Sin embargo, la estimulación optogenética de CGs-ChR2 reclutó corrientes inhibitorias (IPSCs) en las CGs-RFP (9 de 10 células registradas; figura 17 C), que fueron bloqueadas por picrotoxina (antagonista del receptor GABA_A) o ácido kinurénico (bloqueante de los receptores ionotrópicos glutamatérgicos; figura 17 D), lo que indica una conexión polisináptica mediada por GABA y glutamato. Además, la latencia de estas corrientes es consistente con una conexión disináptica. Estos IPSCs mostraron amplitud pequeña y cinética lenta (figura 17 E-F), en contraste con los IPSCs registrados en CGs maduras, lo que sugiere una etapa de sinaptogénesis GABAérgica incipiente. Las CGs de 10 dpi registradas mostraron características morfológicas y eléctricas típicas de neuronas inmaduras (figura 18).

Las interneuronas PV conectan las neuronas maduras con las CGs en desarrollo

A partir del experimento anterior concluimos que la activación de una cohorte de neuronas maduras en el giro dentado genera una corriente GABAérgica en las CGs

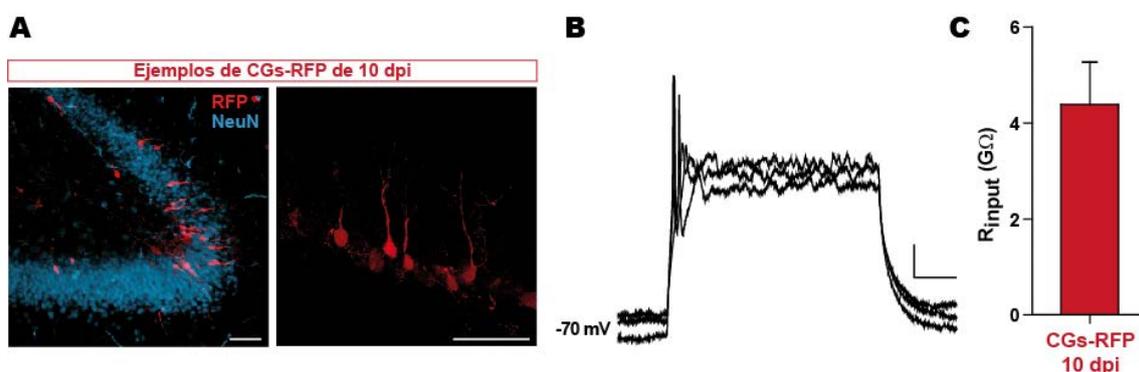


Figura 18. Propiedades eléctricas inmaduras de las CGs-RFP de 10 dpi marcadas por el retrovirus. (A) Imágenes confocales representativas de CGs-RFP, con una inmunofluorescencia para NeuN (azul) marcando la GCL. Escala: 50 μ m. (B) Trazos de voltaje representativos mostrando el disparo incipiente en respuesta a inyecciones de corriente despolarizante (20, 30 y 40 pA) en CGs-RFP de 10 dpi. Escala: 10 mV, 100 ms. (C) Resistencia de input de las CGs-RFP de 10 dpi (n = 4 células).

de 10 dpi. El siguiente objetivo fue determinar la población de células inhibitorias que media esa conexión. Las interneuronas parvalbumina (INs-PV) intervienen en la inhibición GABAérgica perisomática de células principales del hipocampo (Freund & Buzsaki 1996, Hosp et al 2014, Kepecs & Fishell 2014, Kraushaar & Jonas 2000) (ver **Introducción**), por lo que son un candidato adecuado para mediar la conexión en el GD entre las neuronas maduras y las CGs en desarrollo.

El ratón genéticamente modificado PV^{Cre};CAG^{floxStopTom} permite identificar las INs-PV por la expresión específica de Tom. En la figura 19, se muestra una imagen del hipocampo de un ratón PV^{Cre};CAG^{floxStopTom}, en el que se observa la típica inervación perisomática de las INs-PV, así como también los somas y árboles dendríticos correspondientes. En trabajos previos de nuestro laboratorio (Temprana et al 2015), utilizando el ratón PV^{Cre};CAG^{floxStopTom}, se demostró que las CGs maduras del

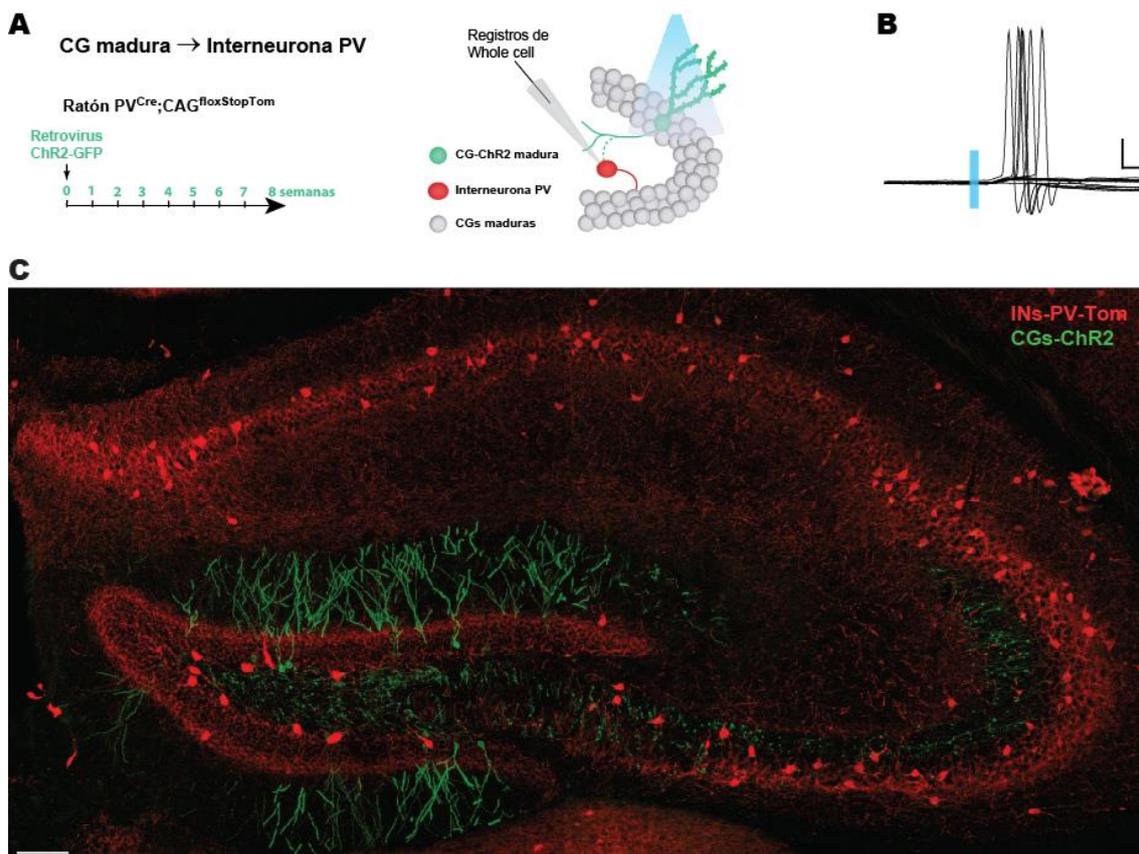


Figura 19. Las CGs maduras activan a las interneuronas parvalbumina. (A) Ratones PV^{Cre};CAG^{floxStopTom} recibieron un RV-ChR2 para marcar una cohorte de CGs (CGs-ChR2 maduras), y 8 semanas después se obtuvieron registros de whole-cell en las interneuronas parvalbumina (INs-PV-Tom). (B) Trazos de voltaje que muestran el disparo de las INs-PV en respuesta a la activación lumínica de las CGs-ChR2 maduras (1 ms; línea azul). Escala: 20 mV, 2 ms. (C) Imagen confocal que muestra las CGs-ChR2 maduras y las INs-PV-Tom cuyo axón cubre la totalidad de la GCL. Escala: 100 μ m.

hipocampo contactan a las INs-PV-Tom (figura 19). Estos resultados, que demostraron que las INs-PV son blancos directos de las CGs maduras nacidas durante la adultez, constituyeron parte del trabajo de tesis de Silvio Temprana.

Para determinar si las INs-PV contactan a las CGs en un estadio temprano del desarrollo neuronal, diseñamos el siguiente experimento (figura 20). Ratones $PV^{Cre};CAG^{floxStopChR2}$ recibieron un RV-RFP para marcar una cohorte de CGs. Diez días después se obtuvieron rebanadas agudas de hipocampo para la adquisición de registros en configuración whole-cell de CGs-RFP de 10 dpi en respuesta a la estimulación optogenética de INs-PV-ChR2. La estimulación lumínica de INs-PV

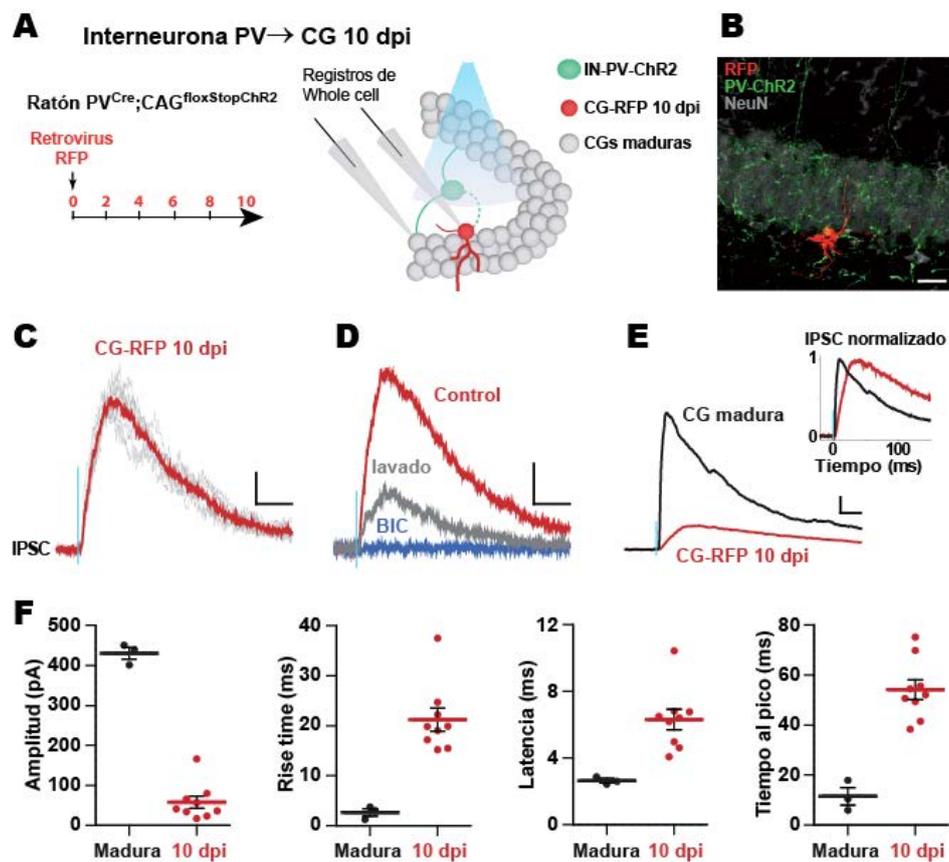


Figura 20. Las IN-PV contactan directamente a las CGs inmaduras. (A) Ratones $PV^{Cre};CAG^{floxStopChR2}$ recibieron un RV-RFP para marcar una cohorte de nuevas CGs (CGs-RFP). Luego de 10 días se obtuvieron registros de whole-cell en CGs-RFP. (B) Imagen confocal de CGs-RFP de 10 dpi y CGs maduras rodeadas por los axones de las INs-PV-ChR2. Escala: 20 μ m. (C) Trazo representativo de un IPSC evocado por laser (200 ms, línea azul) obtenido de CGs-RFP de 10 dpi. Escala: 10 pA, 50 ms. (D) Los IPSCs fueron bloqueados en mas de un 99 % por 20 mM de bicuculina (BIC; n = 5). Escala: 10 pA, 50 ms. (E) Comparación de los IPSCs evocados por laser de CGs maduras y CGs de 10 dpi. Escala: 50 pA, 20 ms. El recuadro interno muestra los trazos normalizados. (F) Caracterización de los IPSCs monosinápticos de CGs-RFP de 10 dpi (n = 9 células, 3 ratones) y CGs maduras (n = 3 células, 2 ratones).

reclutó IPSCs en las CGs-RFP (9 de 9 células; figura 17) que fueron bloqueadas por bicuculina (BIC, antagonista de los receptores de GABA_A). En contraste con los registros de IPSCs de CGs maduras, las CGs-RFP mostraron IPSCs de amplitud pequeña, cinética lenta y latencia consistente con un contacto monosináptico inmaduro.

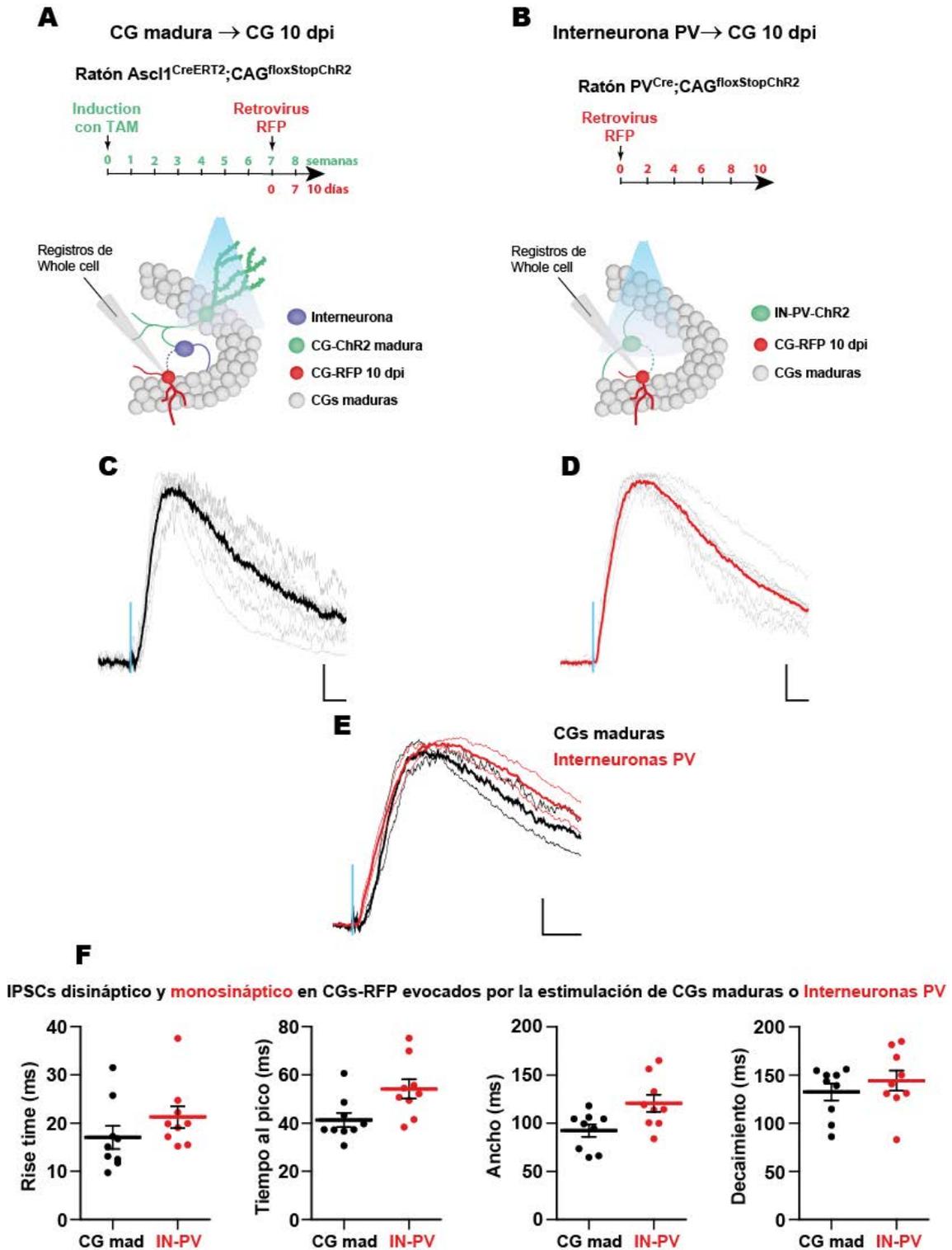


Figura 21. IPSCs de propiedades similares en CGs de 10 dpi evocados por la estimulación optogenética de CGs maduras (disinápsitico) y por INs-PV (monosináptico). Los datos corresponden a los experimentos mostrados en las figuras 17 y 20. (A – B) Diseño experimental de los dos experimentos. (C – D) IPSCs normalizados obtenidos de CGs-RFP de 10 dpi en respuesta a la activación mediada por laser (1 ms; línea azul) de CGs-ChR2 maduras (C) o INs-PV-ChR2 (D). Los trazos promedio por célula se muestran en gris. Los trazos promedio totales se muestran en negro (C) y en rojo (D). (E) Trazos superpuestos de IPSCs normalizados en respuesta a la estimulación de CGs y INs-PV (promedio de todos los experimentos; n = 9 CGs-RFP para cada grupo). El trazo gris fino indica la dispersión de los datos. Escala: 0.2 unidades arbitrarias, 20 ms. (F) Tiempo de subida (20 % al 80 % de la amplitud del pico), tiempo al pico, ancho (al 50 % del pico) y decaimiento (80 % al 20 %) de los IPSCs disinápticos y monosinápticos en CGs-RFP de 10 dpi evocados por la estimulación de CGs maduras o INs-PV.

En la figura 21 se muestra, a modo comparativo, la respuesta normalizada de CGs-RFP a la estimulación optogenética de INs-PV (monosináptica) o CGs maduras (disináptica). Se observó una respuesta sináptica GABAérgica de propiedades similares, lo que sugiere fuertemente que la conexión de neuronas maduras con CGs en desarrollo está transmitida principalmente por las INs-PV.

Como las CGs inmaduras tienen una alta concentración intracelular de Cl⁻, la transmisión GABAérgica en estas células es despolarizante, volviéndose inhibitoria recién a las >3 semanas de edad (Overstreet Wadiche et al 2005, Tozuka et al 2005). Además, la elevada resistencia de membrana de las CGs de 10 dpi (>4 GΩ, figura 18), sugiere que la corriente GABAérgica podría causar un efecto importante en el potencial de esas células. Para determinar si las CGs de 10 dpi experimentan una despolarización perceptible a pesar de sus débiles corrientes postsinápticas (figura 22), realizamos registros en configuración whole-cell current-clamp utilizando una solución interna de alto Cl⁻, similar a la concentración fisiológica reportada (Chancey et al 2013, Ge et al 2006, Heigele et al 2016, Karten et al 2006). Las CGs-RFP se despolarizaron (aproximadamente 20 mV) en respuesta a la estimulación lumínica de las INs-PV-ChR2 por trenes, un patrón similar a la actividad *in vivo* de las INs-PV. Estos datos indican que las CGs maduras reclutan un circuito de feedback disináptico GABAérgico mediado por INs-PV que despolariza en las CGs en desarrollo.

Activación de las interneuronas parvalbumina por AE

En trabajos anteriores se demostró que la activación quimiogénica *in vivo* de CGs maduras del giro dentado induce la expresión del gen de respuesta inmediata c-

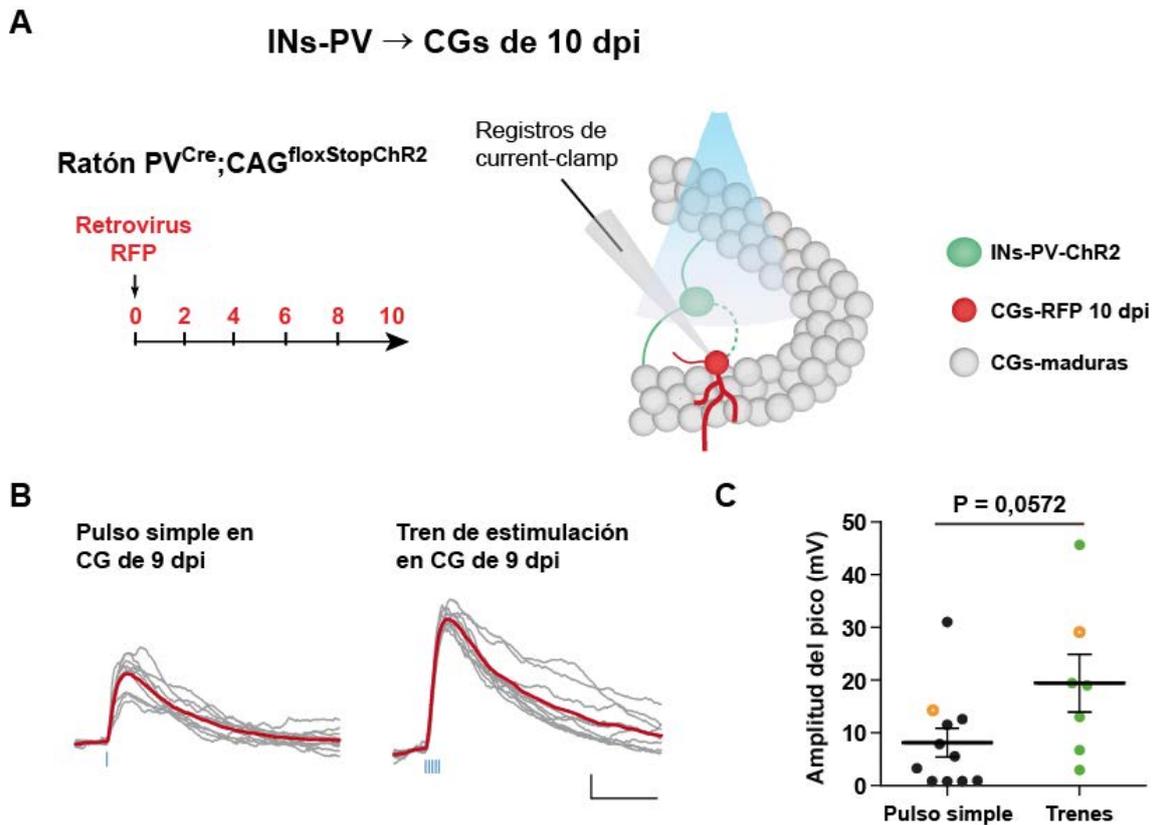


Figura 22. Despolarización de las nuevas CGs evocada por trenes de alta frecuencia de activación de las INs-PV. (A) Diseño experimental. Ratones $PV^{Cre};CAG^{floxStopChR2}$ recibieron un retrovirus RFP bilateralmente para marcar una cohorte de CGs nuevas (CGs-RFP). Se obtuvieron registros de whole-cell current-clamp de CGs-RFP de 9 a 11 dpi, bajo estimulación lumínica de INs-PV-ChR2. (B) Trazos ejemplo de potencial de membrana que muestra las despolarizaciones en CGs-RFP de ~ 10 dpi evocadas por la estimulación lumínica por un pulso simple (1 ms) o trenes (5 pulsos, 1 ms, 40 Hz) de INs-PV-ChR2, tal como se indica. Notar la cinética de decaimiento particularmente lenta. Las respuestas de todos los ensayos se muestran en gris; el trazo promedio se muestra en rojo. Escala: 5 mV, 500 ms. El potencial de membrana se mantuvo a -70 mV. (C) Cuantificación de la despolarización. $P = 0.0572$ luego de un test Mann-Whitney, con $n = 11$ y 7 CGs-RFP (de 5 y 3 ratones) para el pulso simple y trenes de estimulación respectivamente. Los símbolos naranja corresponden a los trazos ejemplo mostrados en (B).

Fos en INs-PV (Temprana et al 2015). Vimos que la exposición a un AE activa el GD (figura 9) y los resultados mostrados previamente en esta sección indican que las INs-PV se activan en respuesta a la estimulación optogenética de CGs maduras (figura 19) (Temprana et al 2015). En base a estas observaciones decidimos evaluar la actividad de las INs-PV en respuesta a la exposición a un AE. En los mismos animales utilizados en el experimento mostrado en la figura 9, analizamos la expresión del gen de respuesta inmediata c-Fos colocalizando con las INs-PV identificadas por inmunofluorescencia. Los resultados de este análisis se muestran en la figura 23 e indican que los ratones que fueron expuestos a un AE tienen un mayor porcentaje de INs-PV que expresan c-Fos. Este resultado es consistente con datos anteriormente

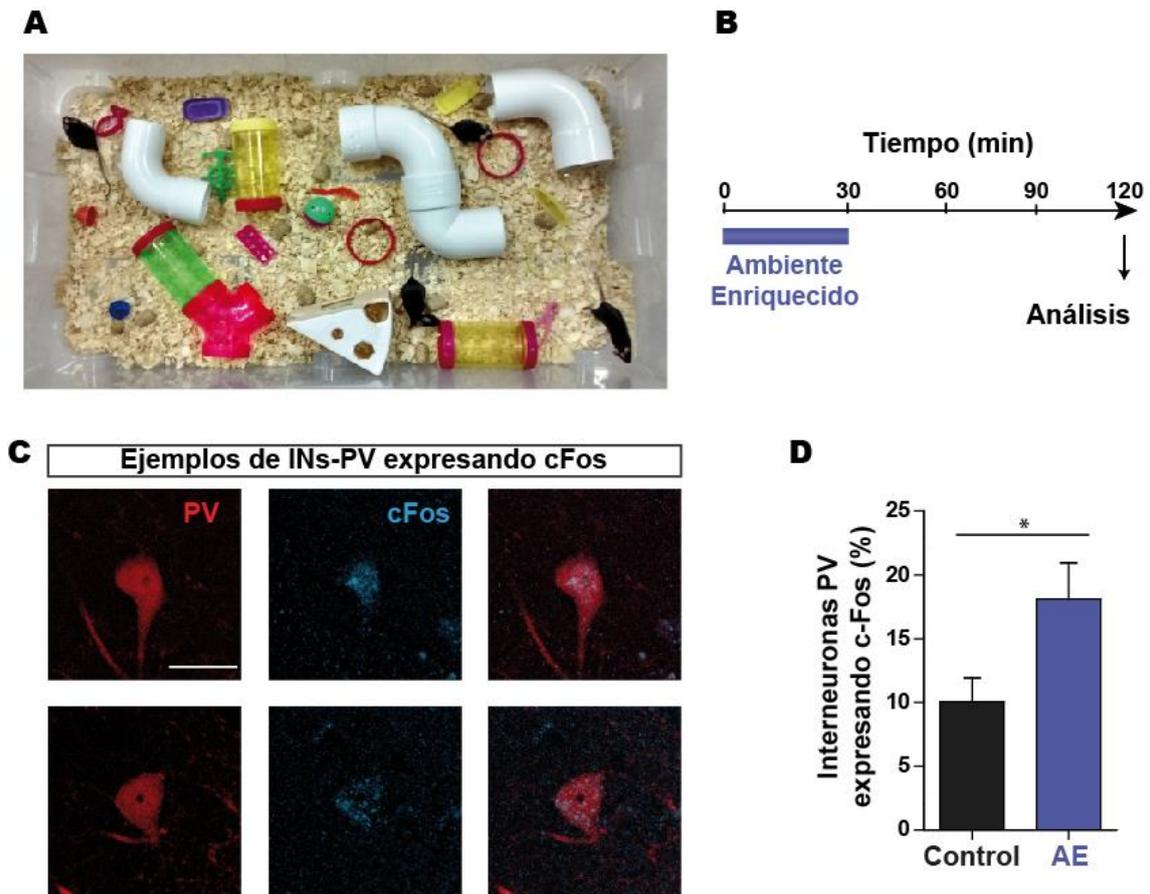


Figura 23. La experiencia exploratoria en un AE activa las INs-PV del GD. (A – B) El mismo diseño experimental que el mostrado en la figura 9. Ratones adultos fueron colocados en un AE para exploración libre durante 30 minutos (línea azul), o se dejaron en una caja común (control), y fueron perfundidos luego de 2 horas. La expresión de cFos en las INs-PV fue detectada por inmunofluorescencia y microscopía confocal. **(C)** Ejemplos de INs-PV (rojo) expresando el marcador de actividad cFos (azul). Escala: 20 μ m. **(D)** Proporción de INs-PV que expresan cFos en el GD de ratones control y AE. * indica un $P = 0.032$ luego de un test t con corrección de Welch, con $n = 10$ GD para cada condición (de 5 ratones).

reportados (Restivo et al 2015, Temprana et al 2015), e indica que la exposición a un AE induce la activación de las CGs y la expresión de c-Fos en las INs-PV del GD del hipocampo.

Los experimentos de optogenética en rodajas mostrados hasta aquí indican la existencia de un circuito hipocampal consistente en CG madura \rightarrow IN-PV \rightarrow CG inmadura, que postulamos como la conexión entre la activación inducida por el AE con los efectos observados en las nuevas CGs. El siguiente objetivo es determinar si este circuito de “feedback” es el encargado de promover la maduración e integración neuronal *in vivo*. Para alcanzar este objetivo diseñamos dos estrategias experimentales complementarias que se detallan a continuación.

Activación quimiogénica *in vivo* de las interneuronas parvalbumina

En primer lugar investigamos la posibilidad de que la activación de las INs-PV module la integración de las nuevas CGs. Para testear esta hipótesis, utilizamos un virus adeno-asociado (AAV) para expresar en INs-PV el canal catiónico activable por ligando sintético PSAM-5HT3-GFP. Este canal, similar en concepto al receptor hM3D (ver figuras 15 y 16), fue generado a partir de la combinación modular de un dominio de unión a ligando modificado y farmacológicamente selectivo al agonista sintético PSEM₃₀₈, con el dominio correspondiente al poro catiónico del receptor de serotonina 5HT3a (Magnus et al 2011, Sternson & Roth 2014). El AAV utilizado codifica para el

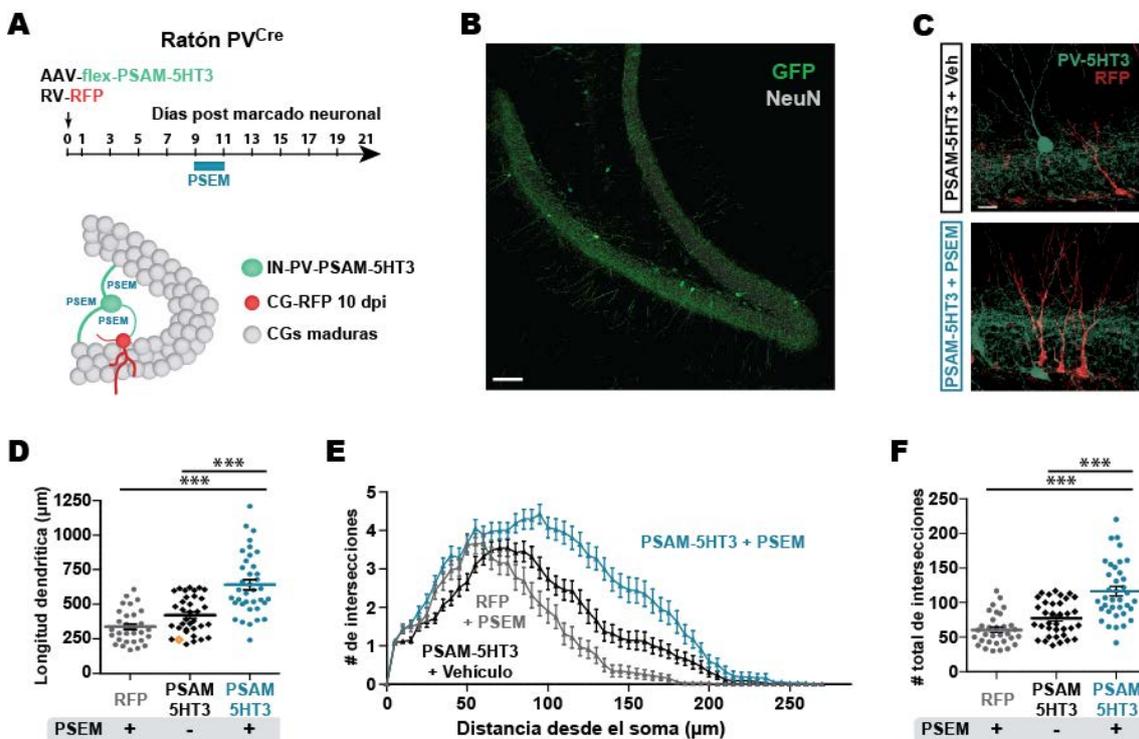


Figura 24. La activación quimiogénica de las INs-PV acelera la maduración neuronal. (A) Diseño experimental. Ratones PV^{Cre} recibieron un virus adeno-asociado que codifica para el receptor sintético PSAM-5HT3 (AAV-flex-PSAM-5HT3) para marcar INs-PV y un RV-RFP para marcar nuevas CGs. A los 9 días se inyectó PSEM³⁰⁸ (10 µg/g) o vehículo (8 inyecciones intraperitoneales en 48 horas) para estimular las INs-PV-PSEM-5HT3. El análisis morfológico se realizó en las CGs-RFP de 21 dpi. (B) Imagen confocal panorámica mostrando el giro dentado con las INs-PV-ChR2 invirtiendo toda la capa granular (marcada con NeuN). Escala: 100 µm. (C) Imágenes confocales representativas de CGs-RFP rodeadas por las INs-PV marcadas y sus axones, obtenidas de ratones tratados con vehículo (izquierda) o PSEM³⁰⁸ (derecha). Escala: 20 µm. (D) Longitud dendrítica para los diferentes tratamientos. El símbolo naranja corresponde a los ejemplos mostrados en (C). (E – F) Análisis de Sholl de los arboles dendríticos de las nuevas CGs bajo los diferentes tratamientos. *** indica un P < 0.001 luego de un test de Kruskal-Wallis (P < 0.0001) seguido de un post hoc test de Dunn, con n = 35, 37 y 32 CGs (de 3 o 4 ratones) para las condiciones RFP + PSEM, PSAM-5HT3 + vehículo y PSAM-5HT3 + PSEM, respectivamente.

canal PSAM-5HT3-GFP precedido por un sitio stop flanqueado por sitios loxP (AAV-flex-PSAM-5HT3), de forma tal que solo se expresa en las células que poseen la recombinasa Cre, las INs-PV en este caso (figura **24 A-B**).

Para evaluar si la activación *in vivo* de las INs-PV modula la maduración de las nuevas CGs, diseñamos el siguiente experimento (figura **24 A-B**): Ratones PV^{Cre} adultos recibieron una combinación de AAV-flex-PSAM-5HT3 y RV-RFP; se administró PSEM₃₀₈ o vehículo de 9 a 11 dpi, y se analizó la morfología de las CGs-RFP a los 21 dpi. La estimulación *in vivo* de las INs-PV indujo un incremento importante en el tamaño y complejidad dendrítica de las CGs-RFP, similar al efecto producido por el AE (figura **24 C-F**).

Este resultado indica que la estimulación de las INs-PV es suficiente para promover la maduración de las nuevas CGs, aun en condiciones en las que el GD se mantiene poco activo, es decir en condiciones sedentarias. Restaría determinar si es este circuito el que conecta la exploración espacial en el AE con la señalización local en el GD, como veremos a continuación.

Bloqueo quimiogénico de la liberación de GABA en el GD: rol de las interneuronas parvalbumina en la integración funcional dependiente de AE

El siguiente objetivo fue evaluar si las INs-PV median la señalización que conecta el AE con la integración funcional de las nuevas CGs. Para alcanzar este objetivo, usamos un AAV para expresar selectivamente el receptor sintético hM4Di en las INs-PV. El hM4Di es un receptor obtenido por evolución dirigida que se activa por el agonista sintético CNO (Conklin et al 2008, Dong et al 2010, Pei et al 2008, Urban & Roth 2015). El receptor activado recluta una vía mediada por proteína G, que induce la apertura de canales de K⁺, ocasionando la hiperpolarización de la célula, evitando que se libere el neurotransmisor (Stachniak et al 2014). La inyección de un AAV-flex-HA-hM4Di en ratones PV^{Cre} resultó en la expresión del receptor hM4Di en las INs-PV (figura **25 A-B**).

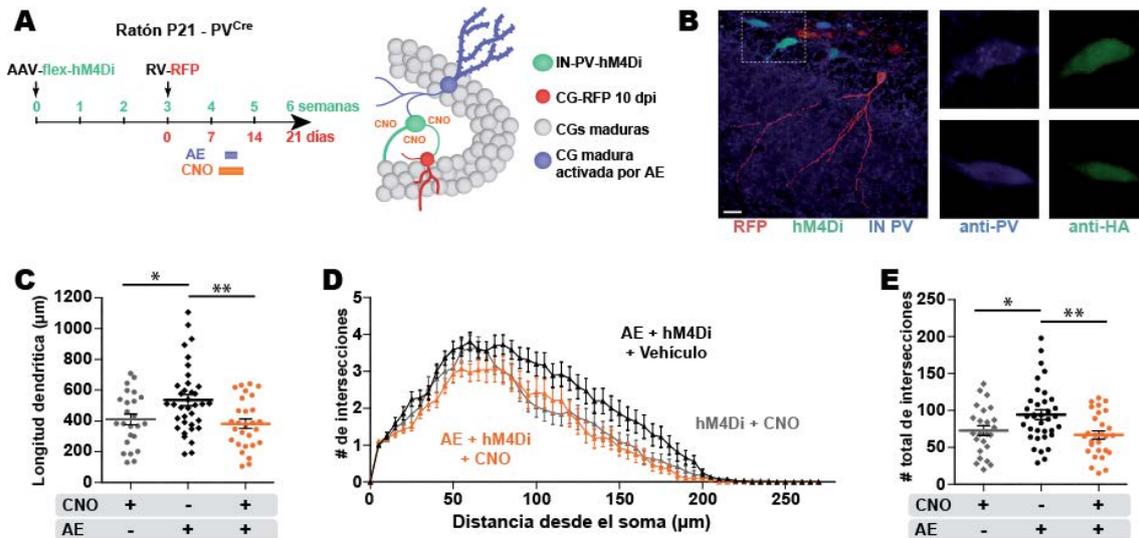


Figura 25. Las INs-PV median los efectos del AE. (A) Diseño experimental. Ratones PV^{Cre} recibieron un AAV-flex-hM4Di para marcar INs-PV y un RV-RFP para marcar nuevas CGs a los tiempos indicados. Los ratones fueron expuestos a un AE por 48 horas del día 9 al 11 del desarrollo neuronal. El CNO fue administrado entre los días 8 a 12 para bloquear la liberación de GABA de las INs-PV-hM4Di. El análisis morfológico se realizó en las CGs-RFP de 21 dpi. (B) Imagen confocal representativa que muestra una CGs-RFP rodeada de INs-PV marcadas que expresan el HA-hM4Di. Escala: 20 μm . Los paneles de la derecha muestran la colocalización de la inmunofluorescencia del anti-PV con el anti-HA-hM4Di de las neuronas del área recuadrada. (C – E) Medidas de longitud dendrítica y análisis de Sholl para las CGs-RFP de los diferentes tratamientos. * indica un $P < 0.05$ y ** indica un $P < 0.01$ luego de un ANOVA ($P = 0.0039$ y $P = 0.0056$, respectivamente) seguido de un post test de Bonferroni, con $n = 24, 36$ y 28 CGs (de 4 o 5 ratones) para las condiciones CNO, AE y CNO + AE respectivamente.

Para determinar si las INs-PV median la señalización local inducida por el AE, diseñamos el siguiente experimento (figura 25 A-B). Ratones PV^{Cre} recibieron un AAV-flex-HA-hM4Di a los 21 días de edad, y un RV-RFP 3 semanas después. Los ratones se expusieron a un AE por 48 horas a los 9 días de edad de las CGs-RFP en presencia de CNO o vehículo; la morfología de las CGs-RFP se analizó a los 21 dpi. El silenciamiento quimiogénico de las INs-PV en el GD bloqueó la integración acelerada dependiente de la experiencia exploratoria en las nuevas CGs (figura 25 C-E).

Estos resultados demuestran que las INs-PV son las encargadas de mediar localmente la señalización inducida por el AE, modulando así la maduración de las nuevas CGs.

Efecto de la activación intrínseca en las neuronas en desarrollo

En trabajos previos se estudió el rol de la actividad neuronal intrínseca en la maduración neuronal. Se observó que una reducción de la actividad eléctrica mediante la expresión de un canal de K^+ (hiperpolarizante) en las nuevas CGs indujo un retraso en la maduración neuronal (Lin et al 2010, Piatti et al 2011). En las secciones previas vimos que, debido a la alta concentración intracelular de Cl^- y a la baja resistencia de membrana, las CGs inmaduras experimentan una importante despolarización en respuesta a la activación optogenética de las INs-PV (figura **22**), y demostramos que las INs-PV median la señalización que promueve la maduración neuronal dependiente de la experiencia exploratoria (figura **25**). Además, se ha demostrado que GABA está fuertemente involucrado en el proceso de maduración neuronal (Dieni et al 2012, Ge et al 2006, Ge et al 2007a, Tozuka et al 2005).

Estos datos sugieren que la despolarización generada en las CGs inmaduras por GABA (liberado por las INs-PV) promueve el desarrollo neuronal. El objetivo de esta sección es determinar el efecto de la despolarización intrínseca en la maduración de las nuevas CGs. Para alcanzar este objetivo, utilizamos nuevamente el RV-hM3D de forma tal de manipular *in vivo* la actividad intrínseca de las nuevas CGs durante su desarrollo.

En primer lugar, nos preguntamos si las nuevas CGs experimentan algún cambio morfológico al desarrollarse en condiciones de activación intrínseca sostenida desde el momento de su diferenciación a neuronas. Diseñamos un experimento siguiendo una estrategia usada en trabajos anteriores de nuestro laboratorio (Piatti et al 2011). Una combinación de RV-hM3D y RV-RFP fue inyectado en el GD para transducir una cohorte de nuevas CGs (figura **26 A**); la inyección conjunta de los dos retrovirus permitió visibilizar el árbol dendrítico de las CGs con buena intensidad de fluorescencia (por el RV-RFP), y manipular la excitabilidad mediante la expresión del receptor hM3D. Se administró CNO en el agua de beber desde el día 3, y se realizó un análisis morfológico de las CGs-RFP de 21 dpi que expresaban GFP en el soma (CGs-hM3D). Las CGs-hM3D mostraron una longitud dendrítica mayor que el grupo control (figura **26 B-C**), indicando que la estimulación crónica indujo una aceleración de la maduración.

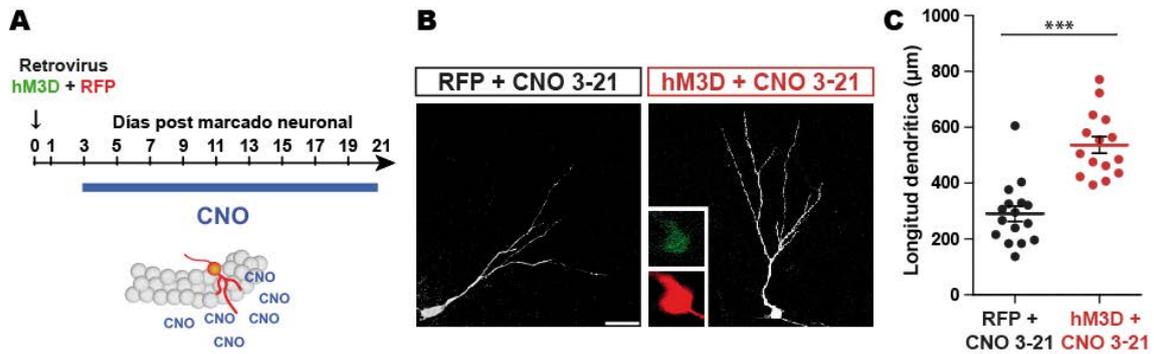


Figura 26. La despolarización intrínseca promueve la maduración de las CGs en desarrollo. (A) Diseño experimental. Una combinación de retrovirus (RV-hM3D + RV-RFP o solo RV-RFP) fue inyectado en el GD para marcar nuevas CGs. Se administró CNO desde el día 3 y hasta el final del experimento. A los 21 dpi se realizó el análisis morfológico. (B) Imágenes confocales representativas de CGs de 21 dpi en el GD temporal obtenidas de ratones que recibieron RV-RFP + CNO 3-21 (izquierda) o RV-hM3D + CNO 3-21 (derecha). El recuadro interno muestra la colocalización de RFP con eGFP en el soma de la neurona coinfectada. Escala: 20 µm. (C) Medidas de longitud dendrítica para las diferentes condiciones. *** indica un $P < 0.001$ luego de un test t corrección de Welch, con $n = 16$ y 15 CGs (de 4 ratones) para RV-RFP + CNO 3-21 y RV-hM3D + CNO 3-21 respectivamente.

Posteriormente evaluamos si un pulso de actividad eléctrica intrínseca en las nuevas CGs, durante el período crítico de maduración, tiene algún efecto sobre el desarrollo neuronal. Una combinación de RV-hM3D y RV-RFP fue inyectado en el GD de ratones adultos para marcar una cohorte de nuevas CGs (figura 27 A). Se analizó el árbol dendrítico de CGs-RFP de 21 dpi que expresaron GFP en el soma (CGs-hM3D), de ratones que recibieron vehículo o CNO los días 9 a 11 del desarrollo neuronal (figura 27 B). Las CGs-hM3D estimuladas durante el período crítico mostraron una mayor longitud y complejidad dendrítica y una mayor densidad de espinas que los controles (figura 27 C-G). Sin embargo, no se observó maduración neuronal incrementada cuando el CNO fue administrado en una etapa posterior (14 a 16 dpi). Estos resultados indican que la señal transmitida por la despolarización intrínseca es suficiente para promover la integración, solo si se produce durante el período crítico de maduración, pero no después.

Además, nos preguntamos si las CGs-RFP que se desarrollaron junto a las CGs-hM3D podrían tener algún efecto por encontrarse en las cercanías de las CGs que aceleraron su maduración, tal vez por algún factor parácrino liberado por estas (Cotman et al 2007, Chan et al 2008, Park & Poo 2013, Waterhouse et al 2012). Realizamos un análisis morfológico de las CGs-RFP que no expresaban el receptor hM3D en el soma (CGs-RFP⁺/hM3D⁻) (figura 27 C). Las CGs-RFP⁺/hM3D⁻

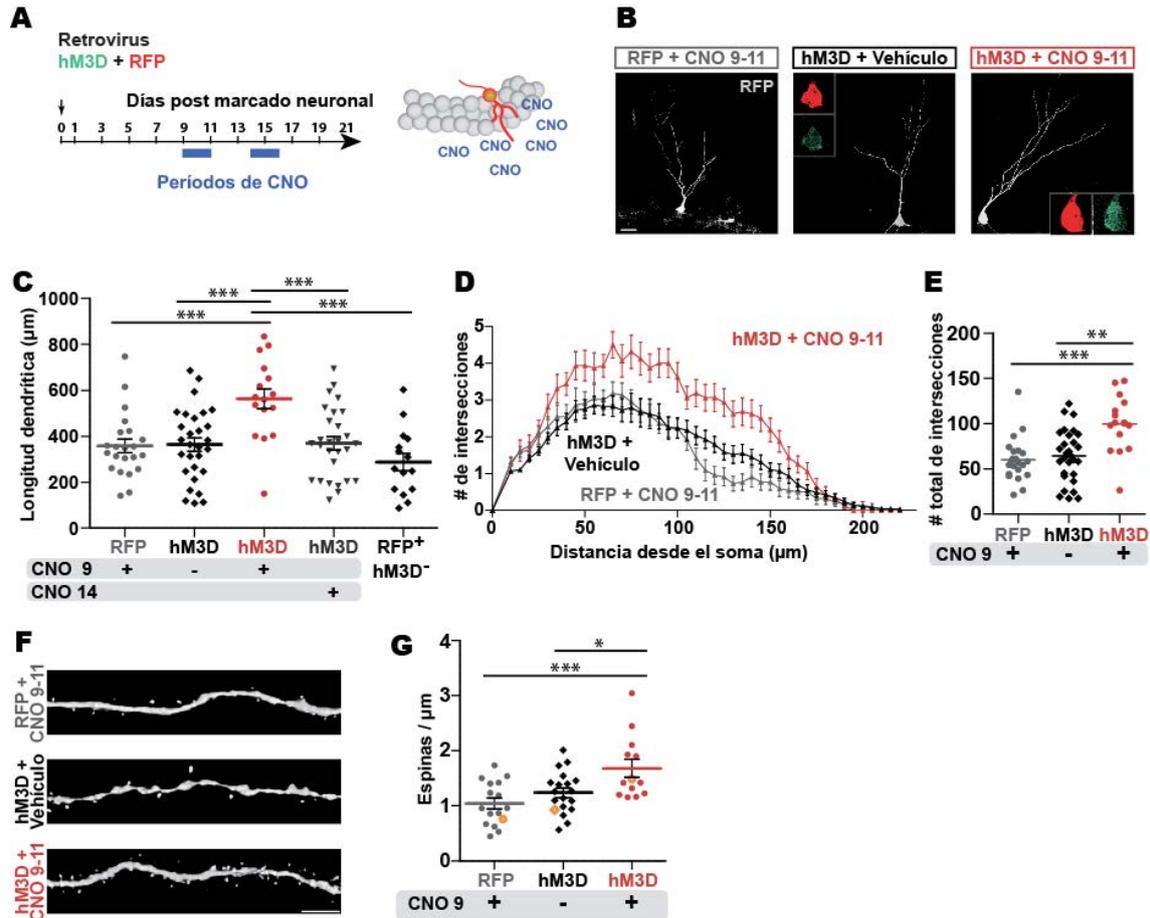


Figura 27. Una breve activación intrínseca en las CGs en desarrollo acelera la integración funcional. (A) Diseño experimental. Una combinación de retrovirus (RV-hM3D + RV-RFP o solo RV-RFP) fue inyectado en el GD para marcar nuevas CGs. Los ratones recibieron CNO por 48 horas para estimular a las CGs-hM3D a los 9 o 14 dpi. A los 21 dpi se realizó el análisis morfológico en las CGs-hM3D o CGs-RFP. (B) Imágenes confocales representativas de CGs de 21 dpi en el GD temporal obtenidas de ratones que recibieron RV-RFP + CNO (izquierda), RV-hM3D + vehículo (centro) o RV-hM3D + CNO (derecha). Los recuadros internos muestran la colocalización de RFP con eGFP en el soma de las neuronas coinfectadas. Escala: 20 µm. (C) Medidas de longitud dendrítica para las diferentes condiciones. *** indica un $P < 0.001$ luego de un ANOVA ($P = 0.0002$) seguido de un post test de Bonferroni, con $n = 22, 29, 16, 28$ y 15 CGs (de 4 o 5 ratones) para los grupos RFP, hM3D + vehículo, hM3D + CNO 9-11, hM3D + CNO 14-16 y RFP+/hM3D- respectivamente. (D) El análisis de Sholl muestra el crecimiento dendrítico sustancial de las CGs-hM3D que recibieron CNO 9-11. ** indica un $P < 0.01$ y *** indica un $P < 0.001$ luego de un test de Kruskal-Wallis seguido de un post test de Dunn. (E) Segmentos neuronales que destacan las espinas dendríticas. Escala: 5 µm. (F) La densidad de espinas es mayor en las CGs-hM3D activadas. * indica un $P < 0.05$ y *** indica un $P < 0.001$ luego de un ANOVA seguido de un post test de Bonferroni, con $n = 16, 19$ y 13 segmentos (de 4 o 5 ratones) para RFP, hM3D + vehículo y hM3D + CNO 9-11 respectivamente. Los símbolos naranja corresponden a los ejemplos mostrados.

mostraron una longitud de árbol dendrítico menor que la media de los controles (aunque sin significancia estadística), lo que indica que la maduración acelerada de las

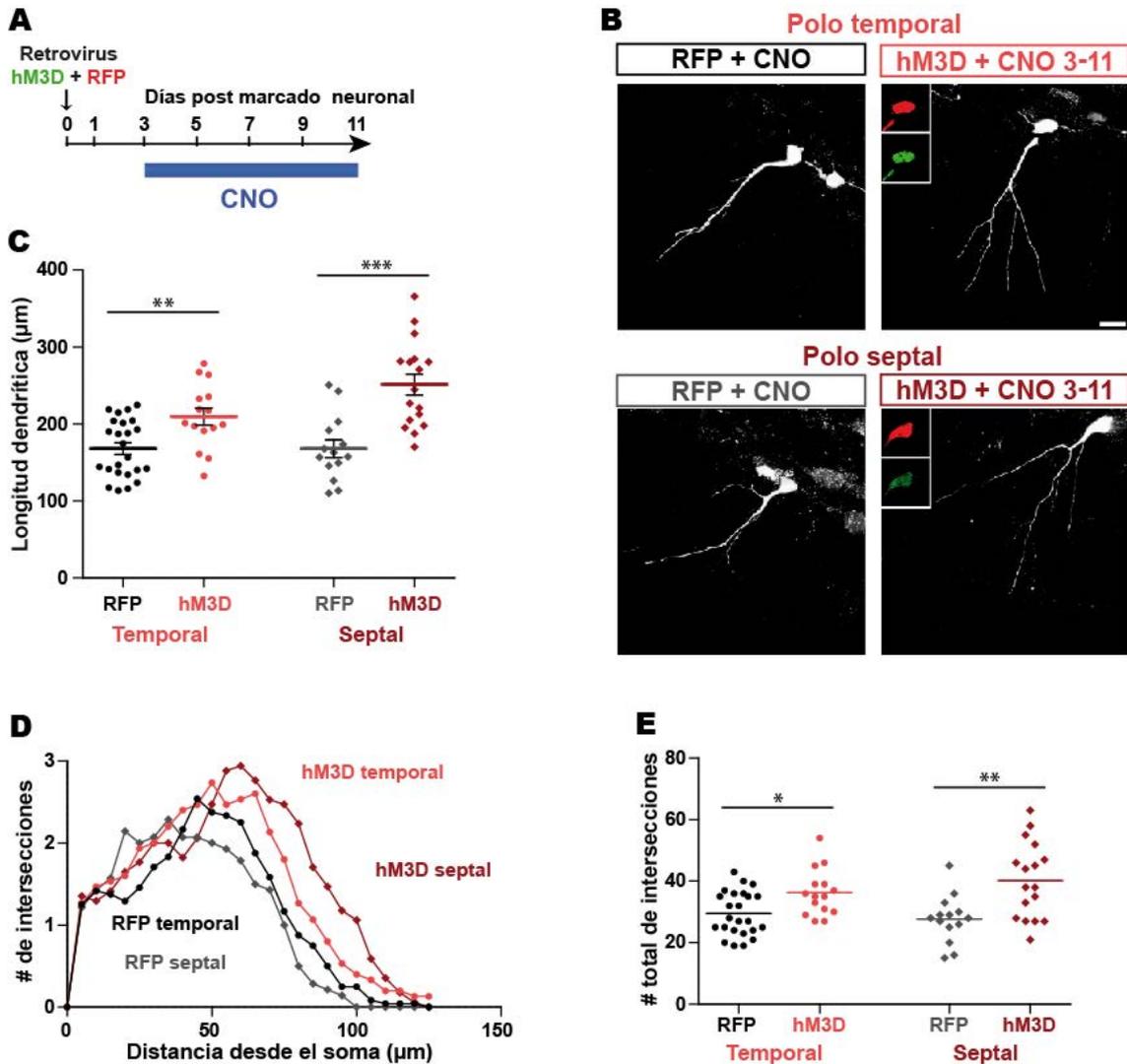


Figura 28. Efectos tempranos de la activación intrínseca de las CGs en desarrollo. (A) Diseño experimental. Se inyectó un RV-hM3D o RV-RFP en el GD para marcar una cohorte de nuevas CGs y se administró CNO desde el día 3 hasta el final del experimento. El análisis morfológico se realizó en las CGs-hM3D y en las CGs-RFP a los 11 dpi. (B) Imágenes confocales representativas de CGs de 11 dpi de ratones control (RFP + CNO) o estimulados (hM3D + CNO) del polo temporal y septal. Los recuadros internos muestran la colocalización de RFP con eGFP en el soma de las CGs coinfectadas. Escala: 20 μm . (C) Medidas de longitud de árbol dendrítico para cada grupo experimental. ** indica un $P = 0.0058$ luego de un test Mann-Whitney, con $n = 24$ y 15 (de 3 ratones) para las condiciones RFP y hM3D respectivamente. *** indica un $P < 0.0001$ luego de un test t con corrección de Welch, con $n = 14$ y 17 (de 3 ratones) para las condiciones RFP y hM3D respectivamente. (D – E) El análisis de Sholl muestra un incremento en la complejidad de las CGs-hM3D de 11 dpi tanto en el polo temporal como septal. * indica un $P = 0.0102$ y ** indica un $P = 0.0018$ luego de respectivos test t con corrección de Welch.

CGs-hM3D no tuvo incidencia en el desarrollo de las otras CGs, y sugiere que podría haber un efecto de competencia por los contactos provenientes de la corteza entorrinal.

Finalmente, analizamos el efecto de la estimulación intrínseca durante las etapas tempranas del desarrollo neuronal. La despolarización temprana provocó un aumento en el tamaño y la complejidad del árbol dendrítico de CGs-hM3D de 11 dpi del polo temporal del hipocampo (figura 28). Sorprendentemente, CGs-hM3D del polo septal mostraron un incremento aún mayor en el tamaño y la complejidad dendrítica, sugiriendo que las neuronas del polo septal también poseen la capacidad para modular su tasa de maduración.

Discusión

En esta sección nos propusimos encontrar el mecanismo que conecta las CGs maduras con las neuronas inmaduras desarrollándose en el hipocampo adulto. Mediante experimentos de optogenética y electrofisiología *ex vivo* con ratones genéticamente modificados logramos identificar un circuito en el GD que conecta la activación de una cohorte de CGs maduras con CGs de 10 días. El circuito disináptico encontrado consistió en: CG madura → IN-PV → CG inmadura. Además, evaluamos *in vivo* el circuito encontrado y vimos que las INs-PV median la maduración funcional inducida por AE en las nuevas CGs.

Es importante destacar que las CGs maduras corresponden a neuronas nacidas durante la adultez y que han completado su conectividad, es decir, que tienen al menos 8 semanas de desarrollo (Bergami et al 2015, Temprana et al 2015). Trabajos previos indican que durante el proceso de maduración las nuevas CGs atraviesan un período crítico en el que están desconectadas del circuito inhibitorio y sus sinapsis son fácilmente potenciadas (Ge et al 2007b, Mongiat et al 2009, Temprana et al 2015). Se ha propuesto que las nuevas CGs que atraviesan este período crítico servirían como mediadores de plasticidad dependiente de experiencia (Ge et al 2007b). En este sentido, sería pertinente saber si las CGs de 10 dpi pueden “detectar” la activación de CGs que están atravesando ese período crítico (4-6 semanas de edad). Si las CGs de 4-6 semanas están involucradas en el procesamiento de la información es aún tema de debate.

El efecto despolarizante de GABA en neuronas inmaduras ha sido bien documentado (Ben-Ari 2002, Overstreet Wadiche et al 2005, Tozuka et al 2005), como así también su rol durante la formación de los circuitos neurales (Akerman & Cline 2007). Vimos que la activación optogenética de INs-PV despolariza a las CGs de 10 dpi, con una amplitud levemente mayor en respuesta a trenes estimulación de alta frecuencia (figura **22**). Notablemente, esa despolarización tiene un tiempo de decaimiento largo, posiblemente por las propiedades inmaduras de las CGs de 10 dpi (alto R_{input} , figura **18**). Teniendo en cuenta que la despolarización por GABA en neuronas inmaduras permite la apertura de los canales de Ca^{2+} dependiente de voltaje y la posterior entrada de Ca^{2+} a la célula (Karten et al 2006, Toni & Schinder 2015), la observación previa adquiere particular relevancia: La despolarización mediada por GABA permitiría la entrada de Ca^{2+} a la célula que, a través de algún efector específico, mediaría los efectos celulares observados en las nuevas CGs.

Trabajos previos han demostrado que la exposición a un AE activa e induce la expresión de genes de respuesta inmediata en neuronas de la corteza y el hipocampo (Guzowski et al 1999, Hall et al 2001, Nitz & McNaughton 2004, Reijmers et al 2007). Además, vimos previamente que la exposición a un AE induce la expresión de Arc en CGs maduras del GD (figura **9**) (Chawla et al 2005, Huckleberry et al 2015, Meconi et al 2015, Piatti et al 2011, Ramirez-Amaya et al 2013, Tashiro et al 2007). En esta sección mostramos que en esos mismos ratones, también se indujo la expresión de cFos en INs-PV (figura **23**). Estos resultados son comparables con los reportados previamente (Restivo et al 2015, Temprana et al 2015), y demuestran que el AE induce la activación de CGs maduras e INs-PV en el GD.

Las INs-PV intervienen en la inhibición perisomática de las principales células del hipocampo (Freund & Buzsaki 1996, Hosp et al 2014, Kepecs & Fishell 2014, Kraushaar & Jonas 2000). Estudios de microscopia electrónica indican que las INs-PV son el primer contacto que reciben las CGs en su desarrollo (Song et al 2013). Además, se ha visto que la activación tónica de las INs-PV disminuye la proliferación de los progenitores y promueve el mantenimiento de la quiescencia en las células tipo 1 del GD (Song et al 2013, Song et al 2012). En este trabajo, vimos que la activación de las INs-PV es suficiente para promover la maduración de las CGs en desarrollo (figura **24**). Mas aún, la maduración neuronal inducida por el enriquecimiento ambiental fue bloqueada por la inhibición de las INs-PV, indicando que esta población de interneuronas es la encargada de transmitir la señal generada por la exposición a

un ambiente enriquecido (figura **25**). Además, el rol de GABA en todo el proceso de neurogénesis adulta ha sido ampliamente reportado (Chancey et al 2013, Dieni et al 2012, Ge et al 2006, Ge et al 2007a, Karten et al 2006, Overstreet Wadiche et al 2005, Tozuka et al 2005); incluso, las INs-PV han sido implicadas en la en la generación y maduración de las nuevas CGs (Song et al 2013, Song et al 2012). Nuestros resultados proveen un mecanismo preciso por el cual un estímulo natural tal como el AE actúa a nivel del circuito hipocampal promoviendo la maduración de las nuevas CGs. En conjunto, estos datos indican que las INs-PV orquestan la generación y la maduración de las CGs que se desarrollan en el hipocampo adulto.

El rol propuesto de las INs-PV, junto con el hecho de que GABA es excitatorio en las CGs inmaduras, plantea la posibilidad de que despolarización directa tenga algún efecto en el desarrollo neuronal. Evaluamos esta posibilidad mediante la expresión del receptor hM3D en las nuevas CGs del GD. Notablemente, la despolarización directa fue suficiente para acelerar la tasa de maduración neuronal en el contexto de un GD relativamente silente (condiciones sedentarias, sin estímulos ambientales), lo que indica que las nuevas CGs pueden acelerar su maduración en una virtual ausencia de la señal proveniente de las INs-PV (figura **26**). Este dato adquiere particular relevancia en el contexto de una posible estrategia terapéutica para la reparación de tejidos neurales. Avances recientes en el campo de la biología del desarrollo y las células madre han demostrado que la regeneración basada en la activación de mecanismos endógenos es factible (Andres et al 2008, Lois & Kelsch 2014, Ohab et al 2006, Okano et al 2007, Sohur et al 2006). Sin embargo, el mayor desafío que enfrentan las células al desarrollarse en zonas no neurogénicas es sobrevivir al ambiente poco permisivo e incorporarse a la red neuronal preexistente (Heinrich et al 2014, Heinrich et al 2010, Heinrich et al 2011, Karow et al 2012, Karow et al 2014, Nakagomi et al 2009, Okano et al 2007, Shin et al 2000). Nuestros resultados indican que la maduración e integración neuronal puede favorecerse mediante la despolarización intrínseca independientemente de la señalización provista por las INs-PV, lo que plantea un horizonte promisorio en este sentido.

La despolarización directa durante el período crítico de maduración (días 9 a 11 del desarrollo neuronal) fue suficiente para promover la integración funcional en las nuevas CGs. Sorprendentemente, dos días de despolarización en las CGs después del período crítico no tuvieron ningún efecto sobre el desarrollo neuronal, lo que sugiere que las CGs pierden la capacidad de responder a esa activación (figura **27**).

Una posibilidad es que el efector celular responsable de desencadenar los efectos del AE (y por extensión, de la activación de las INs-PV y de la despolarización directa) deje de expresarse una vez terminado el período crítico de maduración; esta idea es compatible con la hipótesis planteada previamente que involucra la entrada de Ca^{2+} a la célula en respuesta a la despolarización inducida por GABA (Karten et al 2006, Toni & Schinder 2015). Un trabajo reciente mostró que 2 horas de AE inducen la activación de sinapsis silentes en CGs nuevas (POMC, CGs de alrededor de 11 dpi), a través de un mecanismo que involucra la despolarización mediada por GABA y la activación de receptores de tipo NMDA (Chancey et al 2013, Wang & Kriegstein 2008), lo que sería completamente compatible con nuestros resultados, así como también con la hipótesis de la entrada de Ca^{2+} . En este contexto, es interesante mencionar que este periodo crítico de maduración, integración y supervivencia neuronal tiene lugar antes de que sobrevenga la oleada de apoptosis, entre la segunda y tercera semana del desarrollo de las nuevas CGs (Jagasia et al 2009, Tashiro et al 2007, Zhao et al 2008). Nuestros resultados indican que las nuevas CGs que son estimuladas durante el período crítico (por ejercicio o AE) aceleran su maduración y sobreviven la oleada de muerte; las CGs que no son estimuladas en ese período tendrían una mayor tasa de muerte celular y las pocas que sobreviven se desarrollan más lentamente.

Trabajos previos mostraron que el ejercicio voluntario induce una aceleración de la maduración en las nuevas CGs del polo temporal del hipocampo, sin afectar prácticamente la maduración del polo septal (Piatti et al 2011). Nuestros resultados indican que las nuevas CGs del polo septal aceleran su maduración en respuesta a la despolarización intrínseca durante las etapas iniciales del desarrollo (figura 28). Este dato avala la idea de que tanto las CGs que se desarrollan en el polo temporal como las que lo hacen en el polo septal modulan su tasa de maduración en respuesta a estímulos específicos. En este sentido, trabajos actuales de nuestro laboratorio también aportarían datos en apoyo a esta hipótesis: La maduración de las nuevas CGs en animales envejecidos está enlentecida, y el ejercicio voluntario acelera la maduración de las CGs que se desarrollan en el polo septal del GD (Trincheró y colaboradores, manuscrito en preparación).

Discusión general

Nuestros resultados revelan un circuito de feedback positivo que remodela el circuito de la capa granular y que es influenciado directamente por el comportamiento. Mediante este feedback las CGs maduras activan a las INs-PV lo que a su vez acelera la integración funcional de las siguientes cohortes de CGs inmaduras, un proceso que nosotros llamamos “preparado” (o “priming” en inglés). En condiciones basales, las nuevas CGs se vuelven potencialmente relevantes para procesar información a las 4 semanas de edad (Esposito et al 2005, Mongiat et al 2009, Temprana et al 2015, Toni & Schinder 2015). En ese momento es cuando reciben suficiente excitación cortical como para ser activadas por una experiencia y adquirir la capacidad de refinar sus contactos corticales excitatorios de forma dependiente de actividad, un proceso que podría ser relevante para el aprendizaje (Ge et al 2007b, Kropff et al 2015, Marin-Burgin et al 2012). Nuestros resultados muestran que una breve experiencia exploratoria en un ambiente enriquecido actúa sobre las CGs en desarrollo mucho antes de que adquieran contactos excitatorios corticales, acelerando la sinaptogénesis glutamatérgica, lo que podría disminuir el intervalo requerido para alcanzar relevancia funcional en el procesamiento de la información por parte del animal.

En nuestro concepto, las CGs “preparadas” (o “primed”) incrementan rápidamente sus contactos excitatorios al tiempo que mantienen la excitabilidad potenciada (alta resistencia de input), lo que resulta en neuronas inmaduras con una conectividad expandida. Esto podría favorecer su reclutamiento por señales corticales y potenciar su plasticidad sináptica dependiente de actividad en respuesta a nuevos retos (Dupret et al 2007, Kropff et al 2015, Marin-Burgin et al 2012, Marin-Burgin & Schinder 2012, Tashiro et al 2006). Como el “priming” es mediado por interneuronas GABAérgicas y ocurre en CGs inmaduras que carecen de excitación, podría servir como un mecanismo generalizado que prepara a las nuevas neuronas para ser reclutadas de una manera que no está restringida a la experiencia desencadenante, maximizando los recursos disponibles (Danielson et al 2016, Jessberger & Kempermann 2003, Shors et al 2001, Tashiro et al 2007, Tashiro et al 2006). Esta cohorte de CGs muy conectadas y altamente excitables podría ser particularmente propensa a ser reclutada por la información entrante, lo que fortalecería sus

conexiones y promovería su permanencia en el circuito que codifica las características relevantes de la experiencia novedosa.

Métodos

Producción de los vectores virales

Para la identificación y marcado de neuronas nacidas en el hipocampo adulto se utilizó un vector retroviral no replicativo basado en el virus de la leucemia murina de Moloney. La solución viral concentrada fue preparada con células HEK293T como línea empaquetadora, y colectada por medio de dos rondas de ultra-centrifugación. La línea celular HEK293T fue mantenida en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con alta glucosa, suplementado con de suero fetal bovino (10%) y glutamina (2 mM). Los plásmidos se transfectaron utilizando polietilenimina deacetilada (PEI). Las partículas retrovirales fueron ensambladas usando tres plásmidos separados que codifican para la cápside (CMV-vsfg), las proteínas virales (CMV-gag/pol) y los transgenes. El plásmido del transgén fue modificado para expresar las distintas construcciones genéticas utilizadas en este trabajo, como se detalla a continuación:

- Proteína fluorescente roja (RFP), bajo el promotor CAG.
- Proteína fluorescente verde (GFP) fusionada al receptor sintético acoplado a proteína G hM3D, bajo el promotor CAG.
- Proteína fluorescente amarilla (YFP) fusionada al canal iónico Channelrhodopsin-2, bajo el promotor Ubi.

Los partículas de virus adeno-asociado (AAV) fueron provistas por el laboratorio de Silvia Arber (Basilea, Suiza).

Líneas murinas genéticamente modificadas

Se utilizaron ratones genéticamente modificados, mantenidos en condiciones estándar, hasta 5 ratones por jaula. Los ratones fueron criados en el bioterio del instituto, bajo supervisión de los responsables del mismo, en un rack microventilado marca Allentown. Todas las líneas genéticamente modificadas fueron mantenidas en background C57Bl6/J.

Las siguientes líneas “driver” fueron utilizadas:

- $Ascl1^{CreERT2}$ ($Ascl1^{tm1(Cre/ERT2)Jejo/J}$): Expresa la recombinasa Cre fusionada al receptor de estrógeno (Estrogen Receptor, ER) bajo el control del promotor de *Ascl1*; la recombinasa se expresa en aquellas células que expresan *Ascl1*, pero solo puede translocar al núcleo cuando se administra tamoxifeno (Kim et al 2011).
- $Pvalb^{Cre}$ ($Pvalb^{tm1(Cre)Arbr/J}$): Expresa la recombinasa Cre bajo el promotor de parvalbumina (PV); la recombinasa se expresa en células PV⁺ (Hippenmeyer et al 2005, Madisen et al 2010).

Ratones de la línea driver $Ascl1^{CreERT2}$ se cruzaron con ratones de la línea reportera condicional $CAG^{loxStop-tdTomato}$ (clon Ai14) (B6;129S6- $Gt(ROSA)26Sor^{tm14(CAG-tdTomato)Hze/J}$), para generar ratones $Ascl1^{CreERT2};CAG^{loxStopTom}$, usados en los experimentos de las figuras **4-6** y **14** para marcar células granulares nacidas en el cerebro adulto. A estos ratones se les administró tamoxifeno (120 µg/g, cuatro inyecciones en dos días consecutivos, para los experimentos de las figuras **4-6**; 150 µg/g, dos inyecciones en un día, para los experimentos de la figura **14**) para promover la expresión permanente de td-Tomato (Tom), en la progenie de las células progenitoras que expresan *Ascl1* al momento de la inducción con TAM.

Ratones $Ascl1^{CreERT2}$ y $CAG^{loxStopChr2-EYFP}$ (clon Ai32) ($Gt(ROSA)26Sor^{tm32(CAGCOP4*H134R/EYFP)Hze/J}$) se cruzaron para generar ratones $Ascl1^{CreERT2};CAG^{loxStopChr2}$. A estos ratones se les administró tamoxifeno (120 µg/g, cuatro inyecciones en dos días consecutivos), lo que resultó en la expresión de

Channelrhodopsin 2 (ChR2) en la progenie de las células progenitoras que expresan *Ascl1* al momento de la inducción con TAM.

Ratones de la línea *Pvalb^{Cre}* se cruzaron con ratones *CAG^{floxStop-tdTomato}* y *CAG^{floxStopChR2-EYFP}*, para generar ratones *Pvalb^{Cre};CAG^{floxStopTom}* y *Pvalb^{Cre};CAG^{floxStopChR2-EYFP}*, respectivamente. Estos ratones presentaron expresión constitutiva de Tom o ChR2 en las interneuronas GABAérgicas PV⁺.

Para la identificación de los animales genéticamente modificados se realizó una PCR para cada uno de los genes correspondientes. La reacción se realizó a partir de ADN purificado de una porción de la cola extraída de ratones de 2-3 semanas de edad.

Marcado neuronal por BrdU

Para realizar el experimento de la figura 7, ratones “wild type” C57Bl6/J adultos recibieron dos inyecciones intraperitoneales diarias separadas por 8 horas durante dos días consecutivos de una solución fisiológica normal conteniendo bromodeoxiuridina (BrdU) en una dosis de 50 mg/kg. El BrdU se disolvió en solución fisiológica y luego se filtró en esterilidad (0.22 µm) previo a cada inyección. A los fines prácticos, se consideró el día de la primer inyección como el día de nacimiento de las neuronas.

Cirugía estereotáxica

Ratones “wild type” C57Bl6/J o ratones genéticamente modificados fueron anestesiados por inoculación intraperitoneal con ketamina y xilacina (150 µg de ketamina / 15 µg de xilacina en 10 µl de solución salina por g). Una vez anestesiado, cada ratón fue colocado en un aparato estereotáxico, donde se procedió a marcar bajo lupa las coordenadas de inyección. Los diferentes virus utilizados (RVs, AAVs o mezclas) fueron inyectados en el GD a una velocidad promedio de 0.15 µl/min usando pipetas microcapilares calibradas estériles estiradas por calor con un puller. El sitio de inyección se determinó en la siguiente coordenadas desde bregma para la región

temporal: -2.4 antero-posterior, -2.6 lateral, -2.1 ventral. Una sola inyección fue suficiente para marcar un número sustancial de células precursoras neurales en la mayoría de los experimentos. En los experimentos que se realizaron para expresar el receptor hM3D en neuronas granulares maduras, se usaron dos sitios de inyección para maximizar el número de células marcadas: -2.0 antero-posterior, -1.5 lateral, -1.9 ventral y -2.4 antero-posterior, -2.6 lateral, -2.1 ventral. En la coordenada marcada se afinó el hueso craneal usando un taladro y se retiró el hueso restante por medio de una aguja estéril, procurando no dañar la corteza y sin retirar la duramadre. Una vez infundido el virus, se procedió a cerrar la piel del animal utilizando cemento ultrarrápido en base a cianoacrilato “La Gotita”. Finalmente se observó la recuperación adecuada de los animales.

Perfusión y corte

Los animales fueron anestesiados con la misma composición de la anestesia utilizada para la cirugía. La perfusión intracardiaca se realizó por el ventrículo izquierdo a un flujo de entre 6 y 8 ml/min, primero con 50 ml de solución fisiológica con heparina (2.5 U/ml) y luego con 100 ml de paraformaldehído (PFA) 4 % en buffer fosfato (PB) 0.1 M pH 7.2. El cerebro fue removido y almacenado en PFA 4% a 4° C durante una o dos noches. Posteriormente los cerebros fueron transvasados a un recipiente con sacarosa al 30 % en PB 0.1 M y mantenidos a 4° C hasta que descendieron al fondo del recipiente. Luego se procedió al corte por micrótopo. Para ello los cerebros fueron lavados dos veces con PB 0.1 M, se secaron, se removió el cerebelo y el bulbo olfatorio. Se los colocó sobre una gota de PBS sobre la platina del micrótopo de deslizamiento, previamente enfriada con hielo seco. De esta manera el PBS se congela simultáneamente con el cerebro, al cual inmediatamente se agrega hielo seco finamente molido para su congelamiento rápido, y se lo deja durante 2 minutos. Inmediatamente se lo cortó en secciones coronales de 40 µm o 60 µm de espesor, dependiendo el análisis posterior. Estas secciones fueron recolectadas en solución criopreservadora (3 volúmenes de glicerol, 3 volúmenes de etilenglicol y 4 volúmenes de PB 0.2 M) y almacenadas a -20° C hasta el momento en que se realizó la inmunofluorescencia.

Inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia se llevó a cabo en secciones coronales de 40, 60 o 400 μm de espesor mediante el sistema free floating (rodajas libres en solución). Se analizaron neuronas de la zona temporal (posterior) del GD, correspondiente a las secciones del polo ventral del hipocampo (-2.8 a -3.88 mm desde bregma) de acuerdo al atlas de ratón (Paxinos & Franklin 2004). Los anticuerpos fueron aplicados en TBS con 3% de suero de burro y 0.25% Tritón X-100. Se realizaron inmunofluorescencias dobles o triples usando los siguientes anticuerpos: HA-tag (monoclonal de rata, clon 3F10; 1:250; Roche; gentilmente cedido por Graciela Boccaccio), PV (monoclonal de ratón, PV235; 1:1000; Swant), Arc (policlonal de conejo; 1:500; Synaptic Systems), NeuN (monoclonal de ratón; 1:50; gentilmente cedido por F. H. Gage, Salk Institute for Biological Studies, La Jolla, CA), GFP (policlonal de pollo; 1:500; Aves), RFP (policlonal de conejo; 1:500; Rockland Immunochemicals Inc.), DCX (policlonal de cabra; 1:100; Santa Cruz Biotechnology), calbindin D-28k (Cb, policlonal de conejo; 1:1000; Swant), Sox2 (policlonal de cabra, 1:500; Santa Cruz Biotechnology) y BrdU (monoclonal de rata, 1:250; Abcam). Los correspondientes anticuerpos secundarios utilizados se listan a continuación: anti-ratón Cy5, anti-pollo Cy5, anti-pollo Cy2, anti-conejo Cy3, anti-conejo Cy5, anti-cabra Cy5, anti-rata Cy2, todos obtenidos en burro (1:250; Jackson ImmunoResearch).

El protocolo de inmunofluorescencia consistió en:

- 1) 3 lavados de 5 minutos con TBS 1X (TBS 10x: 132.2g de Trizma HCl; 19.4g de Trizma Base y 90 g de NaCl llevado a 1 l de agua pH 7.5) con agitación a temperatura ambiente.
- 2) 1 hora de bloqueo (Solución de bloqueo: TBS con suero de burro y 0.25% de Triton X-100) con agitación a temperatura ambiente.
- 3) 48 a 72 horas de incubación con el anticuerpo primario con agitación a 4° C.
- 4) 2 lavados de 15 minutos con TBS 1X con agitación a temperatura ambiente.
- 5) 15 minutos de bloqueo con agitación a temperatura ambiente.
- 6) 2 horas de incubación con el anticuerpo secundario con agitación a temperatura ambiente.
- 7) 3 lavados de 5 minutos con TBS 1X con agitación a temperatura ambiente.
- 8) 10 minutos de incubación con solución de DAPI (4',6-daimidino-phenylindole, Sigma D9542), 5 μl del stock en 50 ml de TBS1X (Stock a -20° C 1mg/ml, 3mM)) para contraste fluorescente.

9) 4 lavados de 5 minutos con TBS 1X con agitación temperatura ambiente.

10) Montaje con PVA-DABCO (2.5% de polivinilalcohol y 2.5 % de DABCO en glicerol y 0.2 M de Tris HCl pH8,5)

11) Los portaobjetos fueron mantenidos en oscuridad y a 4° C para aumentar la estabilidad de los fluoróforos.

Microscopía confocal

Todas las imágenes se obtuvieron a través de microscopía confocal en las instalaciones del Instituto Leloir, en los siguientes microscopios: Zeiss LSM Pascal, Zeiss LSM 510 Meta y Zeiss LSM 710 NLO. Siempre que fue posible, tanto la toma de imágenes como el análisis posterior, se realizó de forma ciega para el operador, excepto en los experimentos de colocalización.

Para el análisis de expresión de Sox2, Arc, NeuN, DCX y Calbindin, se adquirieron imágenes (40x; NA: 1.3 de inmersión en aceite; y 40x; NA: 1.2 de inmersión en agua) de rodajas de 40 o 60 μm de espesor y la colocalización fue evaluada en z-stacks usando múltiples planos para cada célula. La densidad de CGs-RFP mostradas en el experimento de sobrevivida (figura **12**) se calculó midiendo el área de la capa granular teñida con NeuN o DAPI.

Para las medidas de largo dendrítico, se adquirieron imágenes (40x; NA: 1.3 de inmersión en aceite) de rodajas de 60 μm de espesor, tomando z-stacks de 35-50 secciones ópticas, con un airy de 1, a intervalos de 0.8 μm . Debido a que el RV-hM3D genera una intensidad de fluorescencia débil e insuficiente para realizar las medidas dendríticas, la caracterización de las CGs-hM3D se llevó a cabo luego de una coinfección con una mezcla de retrovirus eGFP-hM3D y RFP en una relación 2:1. Solo las CGs-RFP y que expresaban eGFP en el soma fueron incluidas en el análisis. El largo dendrítico total fue medido en proyecciones tridimensionales obtenidas a partir del z-stack utilizando el programa provisto por Zeiss (LSM Image Browser).

Para la medición de densidad de espinas, se obtuvieron imágenes (63x; NA: 1.4 de inmersión en aceite) de rodajas de 60 μm de espesor, tomando z-stacks de 50-140 secciones ópticas, con un airy de 1, a intervalos de 0.1 μm . Las espinas dendríticas se

post operación). En la segunda cirugía, 7 semanas después, un retrovirus CAG-RFP (1 μ l) fue inyectado en el polo temporal del GD derecho. A estos ratones se les administró CNO (1-5 μ g/g) en el agua de beber durante los días 8 a 12 o 9 a 11 del desarrollo de las neuronas RFP, y se sacrificaron a los 21 dpi para su análisis posterior por inmunofluorescencia. Los ratones correspondientes al grupo control fueron sometidos a las mismas cirugías, pero recibieron agua en lugar de CNO.

Activación quimiogénica de las GCs en desarrollo: Para manipular la actividad intrínseca de las neuronas en desarrollo, ratones C57Bl6/J de 6-7 semanas recibieron una combinación de RV-RFP (0.5 μ l) y RV-hM3D (1 μ l) en el GD derecho, de forma tal de obtener CGs-RFP que expresaban eGFP en el soma (ver sección Microscopía confocal). Se administró a los ratones CNO (1-5 mg/kg) en el agua de beber durante los períodos indicados y se sacrificaron a los 21 dpi para su análisis posterior por inmunofluorescencia. Para este experimento se realizaron dos controles: Un control en el que los ratones recibieron CNO pero no fueron inyectados con RV-hM3D; y un control del receptor sintético, en el que los ratones fueron inyectados con RV-hM3D, pero no recibieron CNO.

Activación quimiogénica de interneuronas PV: Machos Pvalb^{Cre} de 6-7 semanas recibieron una mezcla de virus consistente en: RV-RFP (1 μ l), para marcar una población de progenitores que se encuentran en división al momento de la cirugía; y un virus adeno-asociado (AAV) que codifica para el receptor sintético PSAM-5HT3 (1 μ l), para marcar las interneuronas PV que expresan la recombinasa Cre. El agonista PSEM₃₀₈ (10 mg/kg) fue administrado 9 días después de la cirugía, mediante inyecciones intraperitoneales (una cada 6 horas durante 48 horas). Para este experimento se realizaron dos controles: Un control de la droga PSEM, en el que ratones “wild type” recibieron un RV-RFP para marcar una población de neuronas nuevas, y luego se les administró PSEM₃₀₈ (10 μ g/g); y un control del receptor sintético, en el que ratones Pvalb^{Cre} recibieron la mezcla RV + AAV, pero recibieron vehículo (solución fisiológica) en lugar de la droga PSEM₃₀₈.

Inactivación quimiogénica de interneuronas PV: Ratones Pvalb^{Cre} hembra de 3 semanas recibieron dos inyecciones (0.25 μ l septal y 0.25 μ l temporal) de un AAV con la construcción CAG-hM4D, permitiendo la expresión del receptor sintético inhibidor hM4D en las interneuronas PV. Tres semanas después, se sometió a los ratones a una segunda cirugía en la que se les inyectó un RV-RFP. Entre los días 9 y 11 se

expuso a los ratones a un AE. Entre los días 8 y 12 del desarrollo de las neuronas RFP, se administró la droga CNO en el agua de beber, para inhibir a las interneuronas PV. Para este experimento se realizaron dos controles: Un control “de efecto positivo”, en el que ratones Pvalb^{Cre} recibieron los mismos virus y fueron expuestos al AE, pero no se les administró CNO; y un control “de efecto negativo”, en el que ratones Pvalb^{Cre} recibieron los mismos virus y se les administró CNO, pero no fueron expuestos a AE.

Electrofisiología

Preparación de las rebanadas: Los ratones fueron anestesiados y decapitados a los tiempos post-marcado según se indica, tras lo cual se realizaron rodajas transversales de hipocampo. Los cerebros fueron removidos e inmersos en una solución de disección fría carbogenada (95% O₂ / 5% CO₂) conteniendo (en mM): 110 cloruro de colina, 2.5 KCl, 2.0 NaH₂PO₄, 25 NaHCO₃, 0.5 CaCl₂, 7 MgCl₂, 20 glucosa, 1.3 ascorbato de sodio, 3.1 piruvato de sodio y 4 ácido kinurénico (KYN). Se procedió luego a aislar el hipocampo y realizar cortes coronales (400 µm de espesor) utilizando un vibrátomo. Las rodajas fueron transferidas a una cámara conteniendo fluido cerebroespinal artificial (ACSF) carbogenado con la siguiente composición: 125 NaCl, 2.5 KCl, 2 NaH₂PO₄, 25 NaHCO₃, 2 CaCl₂, 1.3 MgCl₂, 1.3 ascorbato de sodio, 3.1 piruvato de sodio, y 10 glucosa. La osmolaridad del ACSF se estableció en el rango 310-320 mOsm. Las rodajas se burbujearon con 95% O₂ / 5% CO₂ y fueron mantenidas a 30°C durante al menos 1 hora antes del comienzo de los experimentos. Los experimentos mostrados en la figura **22** fueron realizados en rodajas horizontales de 350 µm conteniendo los dos hipocampos.

Registros: Para los experimentos mostrados en las figuras **14**, **18** y **19**, se obtuvieron registros de whole-cell usando microelectrodos (4-6 MΩ) conteniendo una solución interna de composición (en mM): 150 gluconato de K, 4 MgCl₂, 0.1 EGTA, 1 NaCl, 10 HEPES, 4 ATP-tris y 10 fosfocreatina. Para los experimentos de las figuras **6**, **17**, **20** y **21**, se obtuvieron registros de whole-cell usando microelectrodos conteniendo una solución interna de composición (en mM): 130 CsOH, 130 ácido D-glucónico, 3 MgCl₂, 0.2 EGTA, 1 NaCl, 0.4 CsCl, 10 HEPES, 4 ATP-tris, 0.3 GTP-tris, y 10 fosfocreatina. Los registros de current-clamp de la figura **22** se obtuvieron usando microelectrodos conteniendo (en mM): 110 gluconato de K, 30 KCl, 4 MgCl₂, 0.1 EGTA, 5 NaCl, 10

HEPES, 4 ATP-tris y 10 fosfocreatina, determinando un equilibrio de Cl^- de -30 mV. Las neuronas registradas fueron identificadas visualmente mediante videomicroscopia de fluorescencia y de DIC infrarrojo. Los criterios para incluir una célula en el análisis fueron: confirmación visual de Tom o RFP en la punta de la micropipeta; la adhesión del soma marcado cuando se realizaba la succión; y una corriente de leak absoluta menor 100 pA a un potencial de holding (V_h). La resistencia de serie fue típicamente 15-25 $\text{M}\Omega$, y se descartaron los experimentos si esta resistencia era mayor a 30 $\text{M}\Omega$. Los registros de whole-cell voltage-clamp se obtuvieron a $V_h = -70$ mV. La capacitancia de membrana (C_m) y la resistencia de input (R_{input}) se obtuvieron a partir de trazos de corrientes evocadas por un pulso hiperpolarizante (10 mV, 100 ms). En los registros de current-clamp, el potencial de reposo de la membrana se mantuvo a -70 mV mediante la aplicación de una corriente de holding. El umbral de disparo se calculó aplicando pulsos sucesivos de corrientes despolarizantes (10 pA, 500 ms) que llevaron el potencial de membrana desde el reposo a 0 mV. Las corrientes postsinápticas excitatorias espontáneas (sEPSCs) se registraron también a un holding potencial de -70 mV. Todos los registros fueron realizados a temperatura ambiente (23 ± 2 °C), obtenidos utilizando amplificadores Axopatch 200B, filtrados (filtro pasabajo: 2 – 5 KHz), digitalizados, y adquiridos a una frecuencia de 10-20 kHz en una PC utilizando el software pClamp 9.

Optogenética: Las secciones hipocampales que contenían CGs expresando ChR2 (ChR2-CGs) se prepararon 8 semanas luego de la cirugía retroviral (para los experimentos con ratones $\text{PV}^{\text{Cre}}; \text{CAG}^{\text{floXStopTom}}$) o luego de la recombinación con tamoxifeno (para los experimentos con ratones $\text{Ascl1}^{\text{CreERT2}}; \text{CAG}^{\text{floXStopChR2}}$). Las rodajas que contenían interneuronas PV expresando ChR2 se obtuvieron de forma similar 10 días luego de la cirugía con RV-RFP. Las neuronas que expresaban ChR2 se estimularon utilizando una fuente laser de 447 nm a través del sistema óptico del microscopio de epifluorescencia y comandado por el software de adquisición. Se realizaron registros de corrientes postsinápticas (PSCs) evocadas por laser en CGs-RFP y se compararon con los registros de CGs maduras localizadas en el tercio externo de la capa granular. Se aplicaron pulsos de luz (1 ms para CGs-ChR2 y 200 μs para INs-PV-ChR2) a 0.07 Hz al tiempo que se registraron las PSCs en voltage-clamp. Las PSCs excitatorias (EPSCs) se obtuvieron clampeando las neuronas al potencial de reversión de las PSCs inhibitorias (IPSCs; $V_h = -70$ mV), mientras que las IPSCs se obtuvieron al potencial de reversión de las EPSCs ($V_h = -70$ mV). Las corrientes glutamatérgicas se bloquearon con 4 mM de ácido kinurénico, y las

corrientes GABAérgicas se bloquearon con 100 μM de picrotoxina (PTX) o 20 μM de bicuculina. Para los registros de current-clamp de la figura **22**, se estimuló con trenes de pulsos lumínicos (5 pulsos, 1 ms, 40 Hz) a través del software de adquisición a una potencia de 70 mW.

Análisis de datos: El análisis de los datos electrofisiológicos se realizó off-line mediante el uso de rutinas caseras de Matlab. La detección y el análisis de las sEPSCs se realizó manualmente usando el software Mini Analysis. Los parámetros cinéticos mostrados en las figuras **17**, **20** y **21** se midieron a partir de trazos promedio como se detalla a continuación: tiempo de crecimiento: desde el 20 al 80 % de la máxima amplitud; latencia: desde el estímulo al 5 % de la máxima amplitud. En todos los registros electrofisiológicos y el análisis, el operador estuvo ciego al grupo experimental bajo estudio.

Análisis estadístico

La estadística usada en esta tesis se describe en la leyenda de cada figura y en el texto. A menos que se especifique de otra manera, los datos se presentan como la media \pm SEM. La normalidad se evaluó utilizando el test Shapiro-Wilk, el test omnibus D'Agostino & Pearson, y el test Kolmogorov-Smirnov, con un *P* valor de 0.05. Cuando los datos reunieron las condiciones de normalidad (distribución gaussiana y varianza equivalente), se realizó un test de t no pareado con corrección de Welch o un ANOVA con Bonferroni's post-hoc test. En los casos en los que los datos no reunieron los criterios de normalidad, se usaron test no paramétricos: Test Mann-Whitney para comparaciones independientes, y test Kruskal-Wallis para comparaciones múltiples.

Bibliografía

- Abrous DN, Koehl M, Le Moal M. 2005. Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *Physiological reviews* 85: 523-69
- Acsady L, Kamondi A, Sik A, Freund T, Buzsaki G. 1998. GABAergic cells are the major postsynaptic targets of mossy fibers in the rat hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18: 3386-403
- Aimone JB, Deng W, Gage FH. 2011. Resolving new memories: a critical look at the dentate gyrus, adult neurogenesis, and pattern separation. *Neuron* 70: 589-96
- Aimone JB, Wiles J, Gage FH. 2006. Potential role for adult neurogenesis in the encoding of time in new memories. *Nature neuroscience* 9: 723-7
- Akerman CJ, Cline HT. 2007. Refining the roles of GABAergic signaling during neural circuit formation. *Trends in neurosciences* 30: 382-9
- Alexander GM, Rogan SC, Abbas AI, Armbruster BN, Pei Y, et al. 2009. Remote control of neuronal activity in transgenic mice expressing evolved G protein-coupled receptors. *Neuron* 63: 27-39
- Altman J. 1969. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *The Journal of comparative neurology* 137: 433-57
- Altman J, Das GD. 1965. Post-natal origin of microneurons in the rat brain. *Nature* 207: 953-6
- Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM. 2002. Neurogenesis in adult subventricular zone. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22: 629-34
- Alvarez P, Squire LR. 1994. Memory consolidation and the medial temporal lobe: a simple network model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 7041-5
- Amaral DG, Ishizuka N, Claiborne B. 1990. Neurons, numbers and the hippocampal network. *Progress in brain research* 83: 1-11
- Amaral DG, Scharfman HE, Lavenex P. 2007. The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Progress in brain research* 163: 3-22
- Amaral DG, Witter MP. 1989. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* 31: 571-91
- Andersen J, Urban N, Achimastou A, Ito A, Simic M, et al. 2014. A transcriptional mechanism integrating inputs from extracellular signals to activate hippocampal stem cells. *Neuron* 83: 1085-97
- Andersen PO, Morris RG, Amaral DG, Bliss T, O'Keefe J. 2007. *The Hippocampus Book*. Oxford University Press.
- Andres RH, Choi R, Steinberg GK, Guzman R. 2008. Potential of adult neural stem cells in stroke therapy. *Regenerative medicine* 3: 893-905
- Ben-Ari Y. 2002. Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nature reviews. Neuroscience* 3: 728-39
- Bergami M, Masserdotti G, Temprana SG, Motori E, Eriksson TM, et al. 2015. A critical period for experience-dependent remodeling of adult-born neuron connectivity. *Neuron* 85: 710-7
- Bergmann O, Spalding KL, Frisen J. 2015. Adult Neurogenesis in Humans. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 7: a018994

- Bertrand N, Castro DS, Guillemot F. 2002. Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nature reviews. Neuroscience* 3: 517-30
- Bonaguidi MA, Song J, Ming GL, Song H. 2012. A unifying hypothesis on mammalian neural stem cell properties in the adult hippocampus. *Current opinion in neurobiology* 22: 754-61
- Bonaguidi MA, Wheeler MA, Shapiro JS, Stadel RP, Sun GJ, et al. 2011. In vivo clonal analysis reveals self-renewing and multipotent adult neural stem cell characteristics. *Cell* 145: 1142-55
- Bond AM, Ming GL, Song H. 2015. Adult Mammalian Neural Stem Cells and Neurogenesis: Five Decades Later. *Cell stem cell* 17: 385-95
- Brown J, Cooper-Kuhn CM, Kempermann G, Van Praag H, Winkler J, et al. 2003. Enriched environment and physical activity stimulate hippocampal but not olfactory bulb neurogenesis. *The European journal of neuroscience* 17: 2042-6
- Bruel-Jungerman E, Laroche S, Rampon C. 2005. New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment. *The European journal of neuroscience* 21: 513-21
- Buckmaster PS, Strowbridge BW, Kunkel DD, Schmiede DL, Schwartzkroin PA. 1992. Mossy cell axonal projections to the dentate gyrus molecular layer in the rat hippocampal slice. *Hippocampus* 2: 349-62
- Cameron HA, McKay RD. 2001. Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *The Journal of comparative neurology* 435: 406-17
- Castro DS, Martynoga B, Parras C, Ramesh V, Pacary E, et al. 2011. A novel function of the proneural factor *Ascl1* in progenitor proliferation identified by genome-wide characterization of its targets. *Genes & development* 25: 930-45
- Claiborne BJ, Amaral DG, Cowan WM. 1990. Quantitative, three-dimensional analysis of granule cell dendrites in the rat dentate gyrus. *The Journal of comparative neurology* 302: 206-19
- Clelland CD, Choi M, Romberg C, Clemenson GD, Jr., Fragniere A, et al. 2009. A functional role for adult hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation. *Science* 325: 210-3
- Cohen NJ, Squire LR. 1980. Preserved learning and retention of pattern-analyzing skill in amnesia: dissociation of knowing how and knowing that. *Science* 210: 207-10
- Conklin BR, Hsiao EC, Claeysen S, Dumuis A, Srinivasan S, et al. 2008. Engineering GPCR signaling pathways with RASSLs. *Nature methods* 5: 673-8
- Cotman CW, Berchtold NC, Christie LA. 2007. Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. *Trends in neurosciences* 30: 464-72
- Chan JP, Cordeira J, Calderon GA, Iyer LK, Rios M. 2008. Depletion of central BDNF in mice impedes terminal differentiation of new granule neurons in the adult hippocampus. *Molecular and cellular neurosciences* 39: 372-83
- Chancey JH, Adlaf EW, Sapp MC, Pugh PC, Wadiche JI, Overstreet-Wadiche LS. 2013. GABA depolarization is required for experience-dependent synapse unsilencing in adult-born neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33: 6614-22
- Chancey JH, Poulsen DJ, Wadiche JI, Overstreet-Wadiche L. 2014. Hilar mossy cells provide the first glutamatergic synapses to adult-born dentate granule cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 34: 2349-54
- Chawla MK, Guzowski JF, Ramirez-Amaya V, Lipa P, Hoffman KL, 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: 579-86
- Christian KM, Song H, Ming GL. 2014. Functions and dysfunctions of adult hippocampal neurogenesis. *Annual review of neuroscience* 37: 243-62
- Danielson NB, Kaifosh P, Zaremba JD, Lovett-Barron M, Tsai J, et al. 2016. Distinct Contribution of Adult-Born Hippocampal Granule Cells to Context Encoding. *Neuron* 90: 101-12

- Deng W, Mayford M, Gage FH. 2013. Selection of distinct populations of dentate granule cells in response to inputs as a mechanism for pattern separation in mice. *eLife* 2: e00312
- Desmond NL, Levy WB. 1985. Granule cell dendritic spine density in the rat hippocampus varies with spine shape and location. *Neuroscience letters* 54: 219-24
- Dhaliwal J, Lagace DC. 2011. Visualization and genetic manipulation of adult neurogenesis using transgenic mice. *The European journal of neuroscience* 33: 1025-36
- Dieni CV, Chancey JH, Overstreet-Wadiche LS. 2012. Dynamic functions of GABA signaling during granule cell maturation. *Frontiers in neural circuits* 6: 113
- Dieni CV, Nietz AK, Panichi R, Wadiche JI, Overstreet-Wadiche L. 2013. Distinct determinants of sparse activation during granule cell maturation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33: 19131-42
- Dong S, Rogan SC, Roth BL. 2010. Directed molecular evolution of DREADDs: a generic approach to creating next-generation RASSLs. *Nature protocols* 5: 561-73
- Drew LJ, Fusi S, Hen R. 2013. Adult neurogenesis in the mammalian hippocampus: why the dentate gyrus? *Learning & memory* 20: 710-29
- Dupret D, Fabre A, Dobrossy MD, Panatier A, Rodriguez JJ, et al. 2007. Spatial learning depends on both the addition and removal of new hippocampal neurons. *PLoS biology* 5: e214
- Dupret D, Revest JM, Koehl M, Ichas F, De Giorgi F, et al. 2008. Spatial relational memory requires hippocampal adult neurogenesis. *PloS one* 3: e1959
- Eichenbaum H, Dudchenko P, Wood E, Shapiro M, Tanila H. 1999. The hippocampus, memory, and place cells: is it spatial memory or a memory space? *Neuron* 23: 209-26
- Encinas JM, Vaahtokari A, Enikolopov G. 2006. Fluoxetine targets early progenitor cells in the adult brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 8233-8
- Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, et al. 1998. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature medicine* 4: 1313-7
- Ernst A, Frisen J. 2015. Adult neurogenesis in humans- common and unique traits in mammals. *PLoS biology* 13: e1002045
- Esposito MS, Piatti VC, Laplagne DA, Morgenstern NA, Ferrari CC, et al. 2005. Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25: 10074-86
- Freund TF, Buzsaki G. 1996. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6: 347-470
- Frotscher M, Seress L, Schwedtfeger WK, Buhl E. 1991. The mossy cells of the fascia dentata: a comparative study of their fine structure and synaptic connections in rodents and primates. *The Journal of comparative neurology* 312: 145-63
- Garthe A, Behr J, Kempermann G. 2009. Adult-generated hippocampal neurons allow the flexible use of spatially precise learning strategies. *PloS one* 4: e5464
- Ge S, Goh EL, Sailor KA, Kitabatake Y, Ming GL, Song H. 2006. GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature* 439: 589-93
- Ge S, Pradhan DA, Ming GL, Song H. 2007a. GABA sets the tempo for activity-dependent adult neurogenesis. *Trends in neurosciences* 30: 1-8
- Ge S, Yang CH, Hsu KS, Ming GL, Song H. 2007b. A critical period for enhanced synaptic plasticity in newly generated neurons of the adult brain. *Neuron* 54: 559-66
- Goldman SA, Nottebohm F. 1983. Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80: 2390-4
- Gould E, Beylin A, Tanapat P, Reeves A, Shors TJ. 1999. Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nature neuroscience* 2: 260-5
- Gross CG. 2000. Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. *Nature reviews. Neuroscience* 1: 67-73

- Gu Y, Arruda-Carvalho M, Wang J, Janoschka SR, Josselyn SA, et al. 2012. Optical controlling reveals time-dependent roles for adult-born dentate granule cells. *Nature neuroscience* 15: 1700-6
- Guzowski JF, McNaughton BL, Barnes CA, Worley PF. 1999. Environment-specific expression of the immediate-early gene Arc in hippocampal neuronal ensembles. *Nature neuroscience* 2: 1120-4
- Hadjantonakis AK, Dickinson ME, Fraser SE, Papaioannou VE. 2003. Technicolour transgenics: imaging tools for functional genomics in the mouse. *Nature reviews. Genetics* 4: 613-25
- Hall J, Thomas KL, Everitt BJ. 2001. Cellular imaging of zif268 expression in the hippocampus and amygdala during contextual and cued fear memory retrieval: selective activation of hippocampal CA1 neurons during the recall of contextual memories. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21: 2186-93
- Han ZS, Buhl EH, Lorinczi Z, Somogyi P. 1993. A high degree of spatial selectivity in the axonal and dendritic domains of physiologically identified local-circuit neurons in the dentate gyrus of the rat hippocampus. *The European journal of neuroscience* 5: 395-410
- Harzsch S, Dawirs RR. 1996. Neurogenesis in the developing crab brain: postembryonic generation of neurons persists beyond metamorphosis. *Journal of neurobiology* 29: 384-98
- Heigele S, Sultan S, Toni N, Bischofberger J. 2016. Bidirectional GABAergic control of action potential firing in newborn hippocampal granule cells. *Nature neuroscience* 19: 263-70
- Heinrich C, Bergami M, Gascon S, Lepier A, Vigano F, et al. 2014. Sox2-mediated conversion of NG2 glia into induced neurons in the injured adult cerebral cortex. *Stem cell reports* 3: 1000-14
- Heinrich C, Blum R, Gascon S, Masserdotti G, Tripathi P, et al. 2010. Directing astroglia from the cerebral cortex into subtype specific functional neurons. *PLoS biology* 8: e1000373
- Heinrich C, Gascon S, Masserdotti G, Lepier A, Sanchez R, et al. 2011. Generation of subtype-specific neurons from postnatal astroglia of the mouse cerebral cortex. *Nature protocols* 6: 214-28
- Henze DA, Wittner L, Buzsaki G. 2002. Single granule cells reliably discharge targets in the hippocampal CA3 network in vivo. *Nature neuroscience* 5: 790-5
- Hippenmeyer S, Vrieseling E, Sigrist M, Portmann T, Laengle C, et al. 2005. A developmental switch in the response of DRG neurons to ETS transcription factor signaling. *PLoS biology* 3: e159
- Hosp JA, Struber M, Yanagawa Y, Obata K, Vida I, et al. 2014. Morpho-physiological criteria divide dentate gyrus interneurons into classes. *Hippocampus* 24: 189-203
- Houser CR. 2007. Interneurons of the dentate gyrus: an overview of cell types, terminal fields and neurochemical identity. *Progress in brain research* 163: 217-32
- Huckleberry KA, Kane GA, Mathis RJ, Cook SG, Clutton JE, Drew MR. 2015. Behavioral experience induces zif268 expression in mature granule cells but suppresses its expression in immature granule cells. *Frontiers in systems neuroscience* 9: 118
- Hvoslef-Eide M, Oomen CA. 2016. Adult neurogenesis and pattern separation in rodents: A critical evaluation of data, tasks and interpretation. *Front. Biol.*
- Jagasia R, Steib K, Englberger E, Herold S, Faus-Kessler T, et al. 2009. GABA-cAMP response element-binding protein signaling regulates maturation and survival of newly generated neurons in the adult hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29: 7966-77
- Jessberger S, Kempermann G. 2003. Adult-born hippocampal neurons mature into activity-dependent responsiveness. *The European journal of neuroscience* 18: 2707-12
- Kaplan MS, Bell DH. 1983. Neuronal proliferation in the 9-month-old rodent-radioautographic study of granule cells in the hippocampus. *Experimental brain research* 52: 1-5

- Kaplan MS, Hinds JW. 1977. Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science* 197: 1092-4
- Karow M, Sanchez R, Schichor C, Masserdotti G, Ortega F, et al. 2012. Reprogramming of pericyte-derived cells of the adult human brain into induced neuronal cells. *Cell stem cell* 11: 471-6
- Karow M, Schichor C, Beckervordersandforth R, Berninger B. 2014. Lineage-reprogramming of pericyte-derived cells of the adult human brain into induced neurons. *Journal of visualized experiments : JoVE*
- Karten YJ, Jones MA, Jeurling SI, Cameron HA. 2006. GABAergic signaling in young granule cells in the adult rat and mouse dentate gyrus. *Hippocampus* 16: 312-20
- Kaslin J, Ganz J, Brand M. 2008. Proliferation, neurogenesis and regeneration in the non-mammalian vertebrate brain. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 363: 101-22
- Kempermann G. 2015a. Activity Dependency and Aging in the Regulation of Adult Neurogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 7
- Kempermann G. 2015b. Adult Neurogenesis: An Evolutionary Perspective. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 8: a018986
- Kempermann G, Gage FH. 1999. Experience-dependent regulation of adult hippocampal neurogenesis: effects of long-term stimulation and stimulus withdrawal. *Hippocampus* 9: 321-32
- Kempermann G, Gast D, Kronenberg G, Yamaguchi M, Gage FH. 2003. Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development* 130: 391-9
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. 1997. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386: 493-5
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. 1998. Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18: 3206-12
- Kempermann G, Wiskott L, Gage FH. 2004. Functional significance of adult neurogenesis. *Current opinion in neurobiology* 14: 186-91
- Kepecs A, Fishell G. 2014. Interneuron cell types are fit to function. *Nature* 505: 318-26
- Kim EJ, Ables JL, Dickel LK, Eisch AJ, Johnson JE. 2011. Ascl1 (Mash1) defines cells with long-term neurogenic potential in subgranular and subventricular zones in adult mouse brain. *PloS one* 6: e18472
- Kim EJ, Leung CT, Reed RR, Johnson JE. 2007. In vivo analysis of Ascl1 defined progenitors reveals distinct developmental dynamics during adult neurogenesis and gliogenesis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27: 12764-74
- Knierim JJ, Neunuebel JP. 2016. Tracking the flow of hippocampal computation: Pattern separation, pattern completion, and attractor dynamics. *Neurobiology of learning and memory* 129: 38-49
- Kornack DR, Rakic P. 1999. Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 5768-73
- Kraushaar U, Jonas P. 2000. Efficacy and stability of quantal GABA release at a hippocampal interneuron-principal neuron synapse. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20: 5594-607
- Kropff E, Yang SM, Schinder AF. 2015. Dynamic role of adult-born dentate granule cells in memory processing. *Current opinion in neurobiology* 35: 21-6
- Laplagne DA, Esposito MS, Piatti VC, Morgenstern NA, Zhao C, et al. 2006. Functional convergence of neurons generated in the developing and adult hippocampus. *PLoS biology* 4: e409

- Lie DC, Colamarino SA, Song HJ, Desire L, Mira H, et al. 2005. Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. *Nature* 437: 1370-5
- Lim DA, Alvarez-Buylla A. 2016. The Adult Ventricular-Subventricular Zone (V-SVZ) and Olfactory Bulb (OB) Neurogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 8
- Lin CW, Sim S, Ainsworth A, Okada M, Kelsch W, Lois C. 2010. Genetically increased cell-intrinsic excitability enhances neuronal integration into adult brain circuits. *Neuron* 65: 32-9
- Lois C, Kelsch W. 2014. Adult neurogenesis and its promise as a hope for brain repair. *Frontiers in neuroscience* 8: 165
- Lledo PM, Alonso M, Grubb MS. 2006. Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nature reviews. Neuroscience* 7: 179-93
- Ma DK, Kim WR, Ming GL, Song H. 2009. Activity-dependent extrinsic regulation of adult olfactory bulb and hippocampal neurogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1170: 664-73
- Madisen L, Zwingman TA, Sunkin SM, Oh SW, Zariwala HA, et al. 2010. A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nature neuroscience* 13: 133-40
- Magnus CJ, Lee PH, Atasoy D, Su HH, Looger LL, Sternson SM. 2011. Chemical and genetic engineering of selective ion channel-ligand interactions. *Science* 333: 1292-6
- Marin-Burgin A, Mongiat LA, Pardi MB, Schinder AF. 2012. Unique processing during a period of high excitation/inhibition balance in adult-born neurons. *Science* 335: 1238-42
- Marin-Burgin A, Schinder AF. 2012. Requirement of adult-born neurons for hippocampus-dependent learning. *Behavioural brain research* 227: 391-9
- Marr D. 1971. Simple memory: a theory for archicortex. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 262: 23-81
- McBain CJ. 2008. Differential mechanisms of transmission and plasticity at mossy fiber synapses. *Progress in brain research* 169: 225-40
- Meconi A, Lui E, Marrone DF. 2015. Sustained Arc expression in adult-generated granule cells. *Neuroscience letters* 603: 66-70
- Mich JK, Signer RA, Nakada D, Pineda A, Burgess RJ, et al. 2014. Prospective identification of functionally distinct stem cells and neurosphere-initiating cells in adult mouse forebrain. *eLife* 3: e02669
- Ming GL, Song H. 2005. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annual review of neuroscience* 28: 223-50
- Ming GL, Song H. 2011. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron* 70: 687-702
- Mongiat LA, Esposito MS, Lombardi G, Schinder AF. 2009. Reliable activation of immature neurons in the adult hippocampus. *PloS one* 4: e5320
- Mongiat LA, Schinder AF. 2011. Adult neurogenesis and the plasticity of the dentate gyrus network. *The European journal of neuroscience* 33: 1055-61
- Nakagomi T, Taguchi A, Fujimori Y, Saino O, Nakano-Doi A, et al. 2009. Isolation and characterization of neural stem/progenitor cells from post-stroke cerebral cortex in mice. *The European journal of neuroscience* 29: 1842-52
- Nitz D, McNaughton B. 2004. Differential modulation of CA1 and dentate gyrus interneurons during exploration of novel environments. *Journal of neurophysiology* 91: 863-72
- Nottebohm F. 2002a. Neuronal replacement in adult brain. *Brain research bulletin* 57: 737-49
- Nottebohm F. 2002b. Why are some neurons replaced in adult brain? *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22: 624-8
- Nottebohm F. 2004. The road we travelled: discovery, choreography, and significance of brain replaceable neurons. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1016: 628-58
- O'Keefe J. 1976. Place units in the hippocampus of the freely moving rat. *Experimental neurology* 51: 78-109

- O'Keefe J, Dostrovsky J. 1971. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain research* 34: 171-5
- O'Keefe J, Nadel L. 1978. The Hippocampus as a Cognitive Map. *Oxford University Press*
- Ohab JJ, Fleming S, Blesch A, Carmichael ST. 2006. A neurovascular niche for neurogenesis after stroke. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26: 13007-16
- Okano H, Sakaguchi M, Ohki K, Suzuki N, Sawamoto K. 2007. Regeneration of the central nervous system using endogenous repair mechanisms. *Journal of neurochemistry* 102: 1459-65
- Overstreet-Wadiche LS, Bensen AL, Westbrook GL. 2006a. Delayed development of adult-generated granule cells in dentate gyrus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26: 2326-34
- Overstreet-Wadiche LS, Bromberg DA, Bensen AL, Westbrook GL. 2006b. Seizures accelerate functional integration of adult-generated granule cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26: 4095-103
- Overstreet Wadiche L, Bromberg DA, Bensen AL, Westbrook GL. 2005. GABAergic signaling to newborn neurons in dentate gyrus. *Journal of neurophysiology* 94: 4528-32
- Parent JM, Lowenstein DH. 2002. Seizure-induced neurogenesis: are more new neurons good for an adult brain? *Progress in brain research* 135: 121-31
- Parent JM, Murphy GG. 2008. Mechanisms and functional significance of aberrant seizure-induced hippocampal neurogenesis. *Epilepsia* 49 Suppl 5: 19-25
- Parent JM, Yu TW, Leibowitz RT, Geschwind DH, Sloviter RS, Lowenstein DH. 1997. Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17: 3727-38
- Park H, Poo MM. 2013. Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nature reviews. Neuroscience* 14: 7-23
- Paxinos G, Franklin KB. 2004. *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. Gulf Professional Publishing.
- Pei Y, Rogan SC, Yan F, Roth BL. 2008. Engineered GPCRs as tools to modulate signal transduction. *Physiology* 23: 313-21
- Piatti VC, Davies-Sala MG, Esposito MS, Mongiat LA, Trincherro MF, Schinder AF. 2011. The timing for neuronal maturation in the adult hippocampus is modulated by local network activity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31: 7715-28
- Piatti VC, Esposito MS, Schinder AF. 2006. The timing of neuronal development in adult hippocampal neurogenesis. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 12: 463-8
- Piatti VC, Ewell LA, Leutgeb JK. 2013. Neurogenesis in the dentate gyrus: carrying the message or dictating the tone. *Frontiers in neuroscience* 7: 50
- Ramirez-Amaya V, Angulo-Perkins A, Chawla MK, Barnes CA, Rosi S. 2013. Sustained transcription of the immediate early gene Arc in the dentate gyrus after spatial exploration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33: 1631-9
- Rangel LM, Alexander AS, Aimone JB, Wiles J, Gage FH, et al. 2014. Temporally selective contextual encoding in the dentate gyrus of the hippocampus. *Nature communications* 5: 3181
- Reijmers LG, Perkins BL, Matsuo N, Mayford M. 2007. Localization of a stable neural correlate of associative memory. *Science* 317: 1230-3
- Restivo L, Niibori Y, Mercaldo V, Josselyn SA, Frankland PW. 2015. Development of Adult-Generated Cell Connectivity with Excitatory and Inhibitory Cell Populations in the

- Hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 35: 10600-12
- Rolls ET, Treves A. 1998. Neural Networks and Brain Function. *OXFORD UNIVERSITY PRESS*
- Sahay A, Scobie KN, Hill AS, O'Carroll CM, Kheirbek MA, et al. 2011a. Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. *Nature* 472: 466-70
- Sahay A, Wilson DA, Hen R. 2011b. Pattern separation: a common function for new neurons in hippocampus and olfactory bulb. *Neuron* 70: 582-8
- Scoville WB, Milner B. 1957. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 20: 11-21
- Schmidt-Hieber C, Jonas P, Bischofberger J. 2004. Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature* 429: 184-7
- Segovia G, Del Arco A, de Blas M, Garrido P, Mora F. 2008. Effects of an enriched environment on the release of dopamine in the prefrontal cortex produced by stress and on working memory during aging in the awake rat. *Behavioural brain research* 187: 304-11
- Shin JJ, Fricker-Gates RA, Perez FA, Leavitt BR, Zurakowski D, Macklis JD. 2000. Transplanted neuroblasts differentiate appropriately into projection neurons with correct neurotransmitter and receptor phenotype in neocortex undergoing targeted projection neuron degeneration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20: 7404-16
- Shors TJ, Miesegaes G, Beylin A, Zhao M, Rydel T, Gould E. 2001. Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature* 410: 372-6
- Shors TJ, Townsend DA, Zhao M, Kozorovitskiy Y, Gould E. 2002. Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning. *Hippocampus* 12: 578-84
- Snyder JS, Ferrante SC, Cameron HA. 2012. Late maturation of adult-born neurons in the temporal dentate gyrus. *PLoS one* 7: e48757
- Snyder JS, Hong NS, McDonald RJ, Wojtowicz JM. 2005. A role for adult neurogenesis in spatial long-term memory. *Neuroscience* 130: 843-52
- Sohur US, Emsley JG, Mitchell BD, Macklis JD. 2006. Adult neurogenesis and cellular brain repair with neural progenitors, precursors and stem cells. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 361: 1477-97
- Song J, Sun J, Moss J, Wen Z, Sun GJ, et al. 2013. Parvalbumin interneurons mediate neuronal circuitry-neurogenesis coupling in the adult hippocampus. *Nature neuroscience* 16: 1728-30
- Song J, Zhong C, Bonaguidi MA, Sun GJ, Hsu D, et al. 2012. Neuronal circuitry mechanism regulating adult quiescent neural stem-cell fate decision. *Nature* 489: 150-4
- Spalding KL, Bergmann O, Alkass K, Bernard S, Salehpour M, et al. 2013. Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell* 153: 1219-27
- Squire LR. 2009. Memory and brain systems: 1969-2009. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29: 12711-6
- Squire LR, Zola-Morgan JT. 2011. The cognitive neuroscience of human memory since H.M. *Annual review of neuroscience* 34: 259-88
- Stachniak TJ, Ghosh A, Sternson SM. 2014. Chemogenetic synaptic silencing of neural circuits localizes a hypothalamus->midbrain pathway for feeding behavior. *Neuron* 82: 797-808
- Sternson SM, Roth BL. 2014. Chemogenetic tools to interrogate brain functions. *Annual review of neuroscience* 37: 387-407
- Sun GJ, Sailor KA, Mahmood QA, Chavali N, Christian KM, et al. 2013. Seamless reconstruction of intact adult-born neurons by serial end-block imaging reveals complex axonal guidance and development in the adult hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33: 11400-11

- Tashiro A, Makino H, Gage FH. 2007. Experience-specific functional modification of the dentate gyrus through adult neurogenesis: a critical period during an immature stage. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27: 3252-9
- Tashiro A, Sandler VM, Toni N, Zhao C, Gage FH. 2006. NMDA-receptor-mediated, cell-specific integration of new neurons in adult dentate gyrus. *Nature* 442: 929-33
- Taupin P. 2007. BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: paradigms, pitfalls, limitations, and validation. *Brain research reviews* 53: 198-214
- Temprana SG, Mongiat LA, Yang SM, Trincherro MF, Alvarez DD, et al. 2015. Delayed coupling to feedback inhibition during a critical period for the integration of adult-born granule cells. *Neuron* 85: 116-30
- Toni N, Laplagne DA, Zhao C, Lombardi G, Ribak CE, et al. 2008. Neurons born in the adult dentate gyrus form functional synapses with target cells. *Nature neuroscience* 11: 901-7
- Toni N, Schinder AF. 2015. Maturation and Functional Integration of New Granule Cells into the Adult Hippocampus. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 8: a018903
- Torborg CL, Nakashiba T, Tonegawa S, McBain CJ. 2010. Control of CA3 output by feedforward inhibition despite developmental changes in the excitation-inhibition balance. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30: 15628-37
- Tozuka Y, Fukuda S, Namba T, Seki T, Hisatsune T. 2005. GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells. *Neuron* 47: 803-15
- Treves A, Rolls ET. 1992. Computational constraints suggest the need for two distinct input systems to the hippocampal CA3 network. *Hippocampus* 2: 189-99
- Treves A, Tashiro A, Witter MP, Moser EI. 2008. What is the mammalian dentate gyrus good for? *Neuroscience* 154: 1155-72
- Urban DJ, Roth BL. 2015. DREADDs (designer receptors exclusively activated by designer drugs): chemogenetic tools with therapeutic utility. *Annual review of pharmacology and toxicology* 55: 399-417
- Urban N, Guillemot F. 2014. Neurogenesis in the embryonic and adult brain: same regulators, different roles. *Frontiers in cellular neuroscience* 8: 396
- van Praag H, Kempermann G, Gage FH. 1999. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nature neuroscience* 2: 266-70
- van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH. 2002. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 415: 1030-4
- van Strien NM, Cappaert NL, Witter MP. 2009. The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. *Nature reviews. Neuroscience* 10: 272-82
- Vazdarjanova A, Ramirez-Amaya V, Insel N, Plummer TK, Rosi S, et al. 2006. Spatial exploration induces ARC, a plasticity-related immediate-early gene, only in calcium/calmodulin-dependent protein kinase II-positive principal excitatory and inhibitory neurons of the rat forebrain. *The Journal of comparative neurology* 498: 317-29
- Vivar C, Potter MC, van Praag H. 2013. All about running: synaptic plasticity, growth factors and adult hippocampal neurogenesis. *Current topics in behavioral neurosciences* 15: 189-210
- Wang DD, Kriegstein AR. 2008. GABA regulates excitatory synapse formation in the neocortex via NMDA receptor activation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28: 5547-58
- Wang JW, David DJ, Monckton JE, Battaglia F, Hen R. 2008. Chronic fluoxetine stimulates maturation and synaptic plasticity of adult-born hippocampal granule cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28: 1374-84

- Wang L, Chang X, She L, Xu D, Huang W, Poo MM. 2015. Autocrine action of BDNF on dendrite development of adult-born hippocampal neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 35: 8384-93
- Waterhouse EG, An JJ, Orefice LL, Baydyuk M, Liao GY, et al. 2012. BDNF promotes differentiation and maturation of adult-born neurons through GABAergic transmission. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32: 14318-30
- Wilson MA, McNaughton BL. 1993. Dynamics of the hippocampal ensemble code for space. *Science* 261: 1055-8
- Winocur G, Wojtowicz JM, Sekeres M, Snyder JS, Wang S. 2006. Inhibition of neurogenesis interferes with hippocampus-dependent memory function. *Hippocampus* 16: 296-304
- Wojtowicz JM, Askew ML, Winocur G. 2008. The effects of running and of inhibiting adult neurogenesis on learning and memory in rats. *The European journal of neuroscience* 27: 1494-502
- Yang SM, Alvarez DD, Schinder AF. 2015. Reliable Genetic Labeling of Adult-Born Dentate Granule Cells Using Ascl1 CreERT2 and Glast CreERT2 Murine Lines. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 35: 15379-90
- Zambrana C, Marco EM, Arranz L, de Castro NM, Viveros MP, de la Fuente M. 2007. Influence of aging and enriched environment on motor activity and emotional responses in mice. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1100: 543-52
- Zhao C, Deng W, Gage FH. 2008. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 132: 645-60
- Zhao C, Teng EM, Summers RG, Jr., Ming GL, Gage FH. 2006. Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26: 3-11
- Zola-Morgan SM, Squire LR. 1990. The primate hippocampal formation: evidence for a time-limited role in memory storage. *Science* 250: 288-90

Trabajos publicados en el marco de esta tesis

Silvio G. Temprana, Lucas A. Mongiat, Sung M. Yang, Mariela F. Trincherro, **Diego D. Alvarez**, Emilio Kropff, Damiana Giacomini, Natalia Beltramone, Guillermo M. Lanuza, y Alejandro F. Schinder: “Delayed Coupling to Feedback Inhibition during a Critical Period for the Integration of Adult-Born Granule Cells”; **Neuron**, Enero de 2015.

Sung M. Yang, **Diego D. Alvarez** y Alejandro F. Schinder: “Reliable genetic labeling of adult-born dentate granule cells using *Ascl1*CreERT2 and *GLAST*CreERT2 murine lines”; **The Journal of Neuroscience**, Noviembre de 2015. Primera autoría compartida con Sung M. Yang.

Diego D. Alvarez, Damiana Giacomini, Sung M. Yang, Mariela F. Trincherro, Silvio G. Temprana, Karina A. Büttner, Natalia Beltramone y Alejandro F. Schinder: “A disynaptic feedback network activated by experience promotes the integration of new granule cells”; **Science**, Octubre de 2016. Primera autoría compartida con Damiana Giacomini.