



RIDAA
Repositorio Institucional
Digital de Acceso Abierto de la
Universidad Nacional de Quilmes



Universidad
Nacional
de Quilmes

Davies Sala, María Georgina

Rol de la actividad eléctrica en el desarrollo neuronal en el hipocampo adulto



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:

Davies Sala, M. G. (2018). *Rol de la actividad eléctrica en el desarrollo neuronal en el hipocampo adulto. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes*
<http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/791>

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

Rol de la actividad eléctrica en el desarrollo neuronal en el hipocampo adulto

TESIS DOCTORAL

María Georgina Davies Sala

geortrelew@yahoo.com.ar

Resumen

El giro dentado del hipocampo es una de las dos regiones del cerebro de mamíferos adultos en las cuales se producen neuronas durante toda la vida. Estas neuronas granulares dentadas (dentate granule cells: DGC) nacidas en el adulto maduran a lo largo de un período de aproximadamente 6 semanas, durante el cual exhiben una secuencia precisa de ensamblado de sus conexiones sinápticas aferentes y de la expresión de marcadores neuronales. La maduración neuronal en el adulto recapitula la secuencia descrita en el desarrollo, aunque la velocidad de maduración neuronal es menor. Estos cambios en la velocidad de maduración podrían estar orquestados tanto por un programa intrínseco como por señales ambientales. En esta tesis hemos estudiado la hipótesis de que la actividad eléctrica del propio nicho neurogénico podría actuar como modulador de la maduración de las DGCs. Para realizar estos estudios hemos utilizado un retrovirus murino con el fin de expresar tanto proteínas fluorescentes como otros genes en las DGCs nuevas. Inicialmente encontramos que la maduración neuronal en la región septal del hipocampo, que es eléctricamente muy activa, ocurre a una tasa muy alta. En contraposición con lo que sucede en la región temporal, que es menos activa eléctricamente y muestra una maduración neuronal lenta.

Luego determinamos que el ejercicio físico produce un aumento en la actividad eléctrica del hipocampo temporal y un consecuente incremento en la velocidad de maduración de las neuronas nuevas en esa área. El rol de la actividad eléctrica intrínseca en el control de la maduración fue investigado recurriendo a la sobreexpresión del canal de potasio de rectificación entrante Kir2.1 en las neuronas nuevas, para reducir su excitabilidad intrínseca. Estas neuronas mostraron una maduración muy lenta comparada con las neuronas control. Finalmente encontramos que la actividad neuronal intrínseca determina una mayor sobrevida de las DGCs nuevas. Hacia el final de la tesis describimos la construcción de una nueva herramienta que nos permitirá determinar con precisión el momento del desarrollo neuronal en el cual las nuevas DGCs son más sensibles a la presencia o ausencia de actividad eléctrica. Nuestros resultados revelan una nueva forma de plasticidad dependiente de actividad la cual actúa en la maduración neuronal, integración funcional y sobrevida de las neuronas nacidas en el hipocampo adulto.

Palabras clave: neurogénesis adulta, actividad eléctrica, sinaptogénesis, canales iónicos

Abstract

The dentate gyrus of the hippocampus is one of the two regions of adult mammalian brain that produces new neurons throughout life. These adult-born dentate granule cells (DGC) develop for about 6 weeks following a precise sequence of afferent synaptogenesis and dynamic expression of neuronal markers. Neuronal maturation in the adult hippocampus recapitulates the sequence of neuronal maturation that occurs during perinatal development but in a much slower rate. This observation suggests that functional integration of newborn granule cells into hippocampal circuits is orchestrated by the combination of environmental signals and intrinsic programs. In this thesis we have tested the hypothesis that electrical activity in the neurogenic niche could act as a developmental modulator of DGCs. We used murine leukemia-derived retroviruses to express fluorescent proteins and different transgenes in new

DGCs to address the question. Initially we found that neuronal maturation in septal region of hippocampus, which is electrically very active, occurred at a high rate. This observation was in contrast to what we found in the temporal region, it was electrically less active and DGC's showed a slower rate of maturation. We also found that physical exercise increases neuronal activity in the temporal hippocampus and accelerates maturation rate in this area. To study the role of intrinsic electrical activity in the control of neuronal maturation, we overexpressed an inward rectifying potassium channel Kir2.1 in newborn DGCs to diminish their intrinsic excitability. DGCs expressing Kir showed a slower rate of maturation compared to control neurons. We found that intrinsic neuronal activity determinates the survival rate in new neurons. Finally, we began to describe a novel tool that will allow us to manipulate intrinsic neuronal activity in an inducible fashion to address the maturation stages at which newborn DGCs are most sensitive to activity-induced maturation. Our findings reveal a novel type of activity-dependent plasticity acting on neuronal maturation, functional integration and survival of adult-born hippocampal neurons.

Keywords: adult neurogenesis, electrical activity, sinaptogénesis, ionic channels



**Universidad
Nacional
de Quilmes**

**Universidad Nacional de Quilmes
Comisión de Doctorado**

**Rol de la Actividad Eléctrica
en el Desarrollo Neuronal
en el Hipocampo Adulto**

**Tesis presentada para optar al título de Doctor
de la Universidad de Quilmes
en el área de Ciencias Básicas y Aplicadas**

Lic. María Georgina Davies Sala

**Director de Tesis: Alejandro F. Schinder
Consejero de Estudios: Diego A. Golombek
Lugar de Trabajo: Laboratorio de Plasticidad Neuronal, Fundación
Instituto Leloir
Ciudad de Buenos Aires, marzo de 2012**

Agradecimientos

A mi director de tesis, Alejandro Schinder, por haberme dado la posibilidad de realizar mi tesis doctoral en su laboratorio y por haberme iniciado en el camino de las neurociencias. Por su acompañamiento constante durante el transcurso de esta tesis, por sus opiniones sinceras, por sus ideas, su tiempo dedicado, su sabiduría y sobretodo por su humanidad.

A mis compañeros de laboratorio, a los de hoy y a los de ayer.

Los de ayer: en especial a M. Soledad Espósito porque me enseñó a trabajar en neurociencias y dedicó mucho de su valioso tiempo para formarme, a Verónica Piatti que también me enseñó a trabajar en neurociencias y por sus largas tardes de “brainstorming”. A Diego Laplagne, Gabriela Lombardi, Mariela Veggetti y Belén Prados.

Los de Hoy: a Lucas Mongiat, por su paciencia en todo, desde el Set up hasta el apoyo emocional del día a día, por su incondicionalidad para dar una mano y por la ayuda que me brindó para adquirir datos. A Antonia Marín Burgin, por brindar su conocimiento y experiencias, y la discusión constante. A Nico Morgenstern por cuidar el Set up de electrofisiología y siempre estar dispuesto a responder preguntas. A Damiana Giacomini por su incondicionalidad en cuestiones de Biología Molecular y construcción de vectores genómicos. A Mariela Trincherro, por su apoyo en todo tipo de inmunohistoquímica.

A Belén Pardi, Silvio Temprana y Diego Álvarez, los más nuevos del laboratorio.

A Guillermo Lanuza por sus sabios consejos e ideas, sin él esta tesis no hubiese tomado el rumbo que tomó, gracias también por la participación en el Comité de Seguimiento de Tesis de la Fundación Instituto Leloir.

A Osvaldo Uchitel y a Daniel Calvo por haber dedicado su tiempo, por sus ideas, comentarios y críticas durante el Comité de Seguimiento de Tesis.

A Diego Golombek por haber sido mi consejero de estudios durante todos estos años.

A mi familia, en especial:

A mis padres, Celia y Ansel, por el apoyo constante e incondicional durante el transcurso de todo el doctorado.

A mi hermana Carol, porque compartió intensamente junto a mí todos los tramos de mi doctorado y sobretodo por sus sabios consejos y su gran capacidad de escuchar al prójimo.

A mi hermano Christian, por sus consejos y por las largas charlas.

A mi hermana Ana, por darme su apoyo y por tener esos hijos hermosos.

A mis primos, por sacarme siempre una sonrisa, aún en momentos de tristeza.

A mis compañeros de facultad por apoyarme en estos años: Georgina, Axel, Javier, María Eugenia, Mariano, Juan Manuel, Silvina, Marcelo, Bettina y Diana.

A Mariana Hernández, por su acompañamiento durante el transcurso de mi etapa de doctorado.

A Susy y a Ricky, mis amigas de toda la vida.

A Ann Ward, por su apoyo incondicional.

Índice

Introducción	8
Estructura del hipocampo	8
Función del hipocampo	13
Neurogénesis adulta	16
Neurogénesis en el giro dentado adulto	17
Rol funcional de la neurogénesis en el hipocampo adulto	22
Impacto de la actividad del circuito en la neurogénesis en desarrollo y adulto	24
Diferencias en la actividad eléctrica neuronal en el giro dentado a lo largo del eje septo-temporal	28
 Objetivo de la tesis	 31
 Materiales y Métodos	 32
Construcción de los genomas retrovirales	32
Ensamblado de las partículas virales	33
Animales y cirugía estereotáxica	34
Electrofisiología	35
Inmunofluorescencia para BrdU	39
Perfusión, inmunofluorescencia e inmunohistoquímica	39
Microscopía óptica, confocal, de dos fotones y análisis de imágenes	41
Análisis estadístico	42

Resultados	44
Primera Parte - Desarrollo de las DGCs generadas a lo largo del eje septo-temporal del hipocampo adulto	
Objetivos y diseño experimental	44
Variación de la velocidad de maduración neuronal a lo largo del eje septo-temporal en el giro dentado adulto	45
Modulación de la actividad neuronal en la región temporal por actividad física y su efecto en el desarrollo de las DGCs nuevas	51
Diferencias en la sobrevivencia neuronal en la región septal versus temporal en ratones sedentarios y corredores	52
Segunda Parte - Modificación de la actividad intrínseca a nivel célula autónoma y su efecto en las DGCs nacidas en el adulto	
Objetivo y diseño experimental	55
Clonado de Kir2.1 mutado (Kir _{NC})	56
Expresión de Kir2.1 y Kir2.1 _{NC} in vivo	57
Efecto de Kir2.1 en la excitabilidad neuronal	60
Efecto de Kir2.1 en el desarrollo neuronal: aspectos morfológicos	62
Efecto de Kir2.1 en el desarrollo neuronal: expresión de marcadores	64
Efecto de Kir2.1 en el desarrollo neuronal: aspectos funcionales	68
Efecto de Kir2.1 en la sobrevivencia neuronal	71
Tercera Parte - Generación de nuevas herramientas para modular la excitabilidad intrínseca en ventanas de tiempo acotadas en las DGCs nacidas en el adulto	
Diseño experimental	73
Expresión de hM3D y hM4D en DGCs nuevas	75
Medición de la funcionalidad de hM4D y hM3D en DGCs nuevas	77

Conclusiones	79
Discusión	80
Bibliografía	88
Publicaciones	96
Anexo I	96

Introducción

La neurogénesis adulta en mamíferos es un proceso en el cual se generan neuronas funcionales a partir de precursores neurales, ésta ocurre durante toda la vida del individuo y solamente en dos regiones del cerebro: la zona subventricular de los ventrículos laterales y la zona subgranular del giro dentado del hipocampo. En la presente tesis se ha estudiado el desarrollo de las neuronas granulares nuevas generadas en el hipocampo adulto, en particular el impacto que genera la actividad eléctrica del circuito hipocampal en la maduración de dichas neuronas. También se estudió la excitabilidad intrínseca y su efecto en el desarrollo. Primero haremos una descripción de la estructura y función del hipocampo para poner en contexto el fenómeno de neurogénesis adulta. Luego, dado que es un campo con intensiva investigación, introduciremos los conocimientos generados hasta el inicio de la presente tesis. En la discusión incorporaremos trabajos de otros grupos de investigación realizados durante el transcurso de este trabajo.

Estructura del hipocampo

El hipocampo es una estructura bilateral que se encuentra debajo de la neocorteza y en la región medio-basal de los lóbulos temporales. Se extiende desde el septum hacia la amígdala a lo largo del lóbulo temporal, lo cual define el eje septo-temporal.

Debido a su estructura curva, el hipocampo ha llamado la atención de los antiguos anatomistas de la



Figura 1: Hipocampo humano disecado (izq.) comparado con un espécimen de *Hippocampus leiria* (der.). Extraído de "The hippocampus Book, página 30, Oxford press, 2007".

escuela de Alejandría, los cuales lo nombraron *Cornu Ammonis* (CA), en latín cuerno de carnero. Esta terminología continúa vigente hasta hoy para las subregiones CA1, CA2 y CA3. En 1564 el anatomista Italiano Giulio Cesare Aranzi lo nombró "*hippocampus*" (del griego *hippo*: caballo y *campus*: monstruo) debido a su parecido con el pez tropical, Figura 1.

La formación hipocampal está compuesta por cuatro regiones

corticales: el giro dentado, el hipocampo propiamente dicho (que abarca las regiones CA1, CA2 y

CA3), el complejo subicular (el cual se puede dividir en subiculum, presubiculum y parasubiculum) y la corteza entorrinal, la cual a su vez se subdivide en medial y lateral. La forma tridimensional de la formación hipocampal es compleja, es una estructura alargada y curvilínea que se extiende desde el septum (rostro-dorsal) hacia el lóbulo temporal incipiente (caudo-ventral) del cerebro. El eje alargado es llamado el eje “septo-temporal”, mientras que el eje ortogonal es conocido como “eje transversal” como se muestra en la figura 2 (Amaral & Witter, 1989). El giro dentado es una

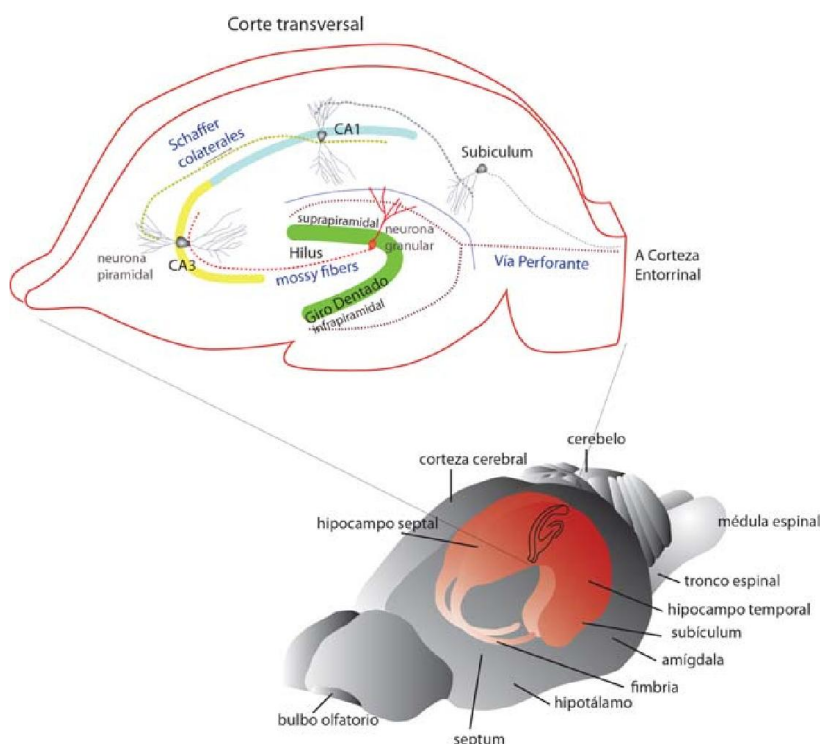


Figura 2: Esquema de cerebro de rata mostrando la ubicación del hipocampo. Arriba se muestra un corte transversal del hipocampo mostrando las diferentes regiones del circuito. En verde se muestra la capa granular del giro dentado, en amarillo CA3 y en celeste CA1. Los axones que conectan cada región se muestran en línea punteada con los nombres de las proyecciones en azul. Modificado de Amaral y Witter, 1989.

estructura cortical trilaminar con forma de V o U. Su forma no se modifica a lo largo del eje septo-temporal, aunque sí cambia la composición de su aferencia a lo largo de este eje, concepto que será expandido capítulos posteriores de esta tesis. Las células granulares dentadas (DGC) son el principal tipo celular en el giro dentado, sus cuerpos celulares (somas) altamente empaquetados se localizan en el *stratum granulosum* o capa granular. La parte de la capa granular que se encuentra entre CA3 y CA1 se la llama porción suprapiramidal y la porción opuesta se la llama infrapiramidal. La región

que une ambos brazos de la U es llamada cresta. Las dendritas se extienden desde la región apical del soma hacia la capa molecular (es la primer capa y está libre de células) y el axón nace de la región basal. El árbol dendrítico posee forma de cono y se bifurca a medida que atraviesa la capa molecular. Las dendritas son espinosas y se extienden hasta el final de la capa molecular (fisura). La mayor aferencia del giro dentado proviene de la corteza entorrinal, cuyas neuronas excitatorias glutamatérgicas proyectan axones por la vía perforante (Ramón y Cajal, 1911). La corteza entorrinal está compuesta por 6 capas pero sólo son dos de ellas las que proyectan hacia el giro dentado: la capa III formada por neuronas piramidales cuyos axones contactan con CA1, y la capa II formada por las neuronas estelares espinosas que proyectan hacia el giro dentado y CA3. La capa II de la corteza entorrinal a su vez se divide en medial (MEC, involucrada en el procesamiento de información espacial) y lateral (LEC, involucrada en el control emocional del comportamiento) (Ferbinteanu *et al.*, 1999; Hafting *et al.*, 2005; Witter *et al.*, 1989). La mayor eferencia del giro dentado son los axones de las GC, que fueron descritos por Ramón y Cajal en 1893 como “*mossy fibers*” (fibras musgosas) y son el componente principal del hilus (es la tercera capa). El axón de las DGC pose bifurcaciones colaterales en la región del hilus (región delimitada por la capa granular) y forma sinapsis con las neuronas piramidales de CA3 y con interneuronas GABAérgicas del hilus y de CA3. Las células piramidales de CA3 proyectan sus axones o fibras colaterales de Schaffer hacia CA1 a su vez estos axones también contactan dendritas de células mossy, interneuronas excitatorias del hilus. Por último, las neuronas de CA1 integran la información proveniente de CA3 y de la corteza entorrinal (capa III) y proyectan sus axones a través del subículum nuevamente hacia la corteza entorrinal (Figura 3). La capa molecular a su vez se divide en tres subcapas (interna, media y externa) a cada una de ellas la inervan axones de diferente procedencia, lo cual proporciona una alta especificidad de aferencia a cada región del árbol dendrítico de las neuronas granulares.

El tercio más interno de la capa molecular presenta aferencias provenientes de interneuronas del hilus, tanto de origen ipsilateral como contralateral de células mossy (Frotscher 1991), lo cual genera un “*loop*” excitatorio.

La LEC inerva el tercio más externo de la capa molecular, mientras que la MEC inerva el tercio medio. Estas interconexiones hacen del hipocampo un circuito sumamente complejo.

La actividad eléctrica y el flujo de la información del hipocampo está controlada por un grupo heterogéneo de interneuronas inhibitorias GABAérgicas que están distribuidas en todas las capas (Freund & Buzsáki, 1996), Figura 4. Las interneuronas del giro dentado, como en otras regiones corticales, pueden ser divididas en aquellas que forman sinapsis perisomáticas (células

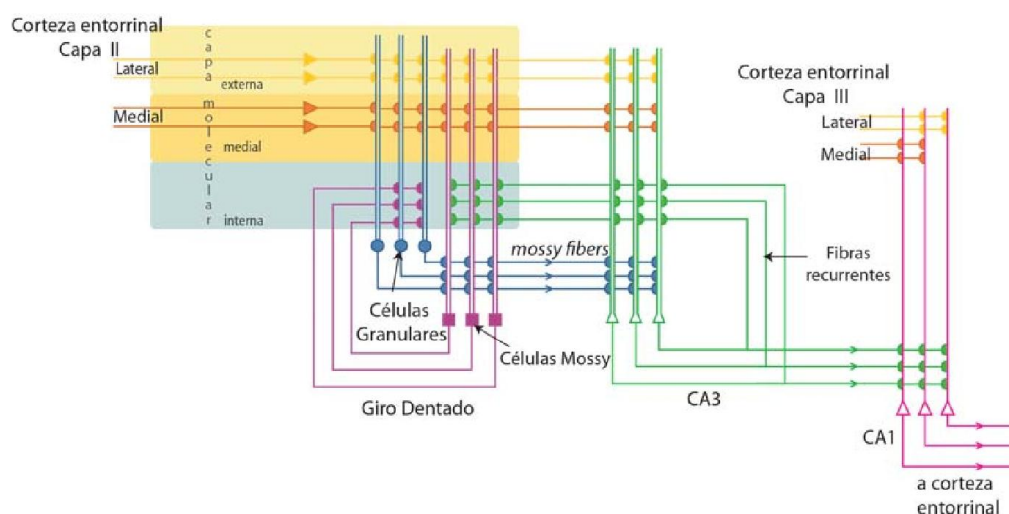


Figura 3: Diagrama del cableado del hipocampo (las interneuronas están excluidas) con la aferencia dual desde la corteza entorrinal lateral y medial. Dentro del hipocampo, las neuronas granulares proveen de aferencia vía las fibras mossy a las células mossy y de allí hacia CA3. Las neuronas piramidales de CA3 generan conexiones feedback hacia ellas mismas y hacia las células mossy, las cuales nuevamente proveen de aferencia excitatoria a las neuronas granulares en el primer tercio del árbol dendrítico.

basket), sinapsis dendríticas, y sinapsis axo-axónicas. Los somas de las neuronas basket están distribuidos dentro de la capa granular. Los axones, también concentrados en la capa granular, contactan los DGCs y también a interneuronas basket (Freund & Buzsáki, 1996). Las interneuronas axoaxónicas poseen axones que se ramifican ampliamente e inervan al segmento inicial del axón de las DGCs. Los somas de estas interneuronas se encuentran en el hilus o en la parte externa de la capa granular. Estos dos tipos de interneuronas ejercen un rol fundamental en el control de la eferencia de las DGCs y pueden contribuir a su sincronización debido a sus múltiples contactos.

Las interneuronas que inervan a las dendritas de las DGCs pueden tener sus cuerpos celulares

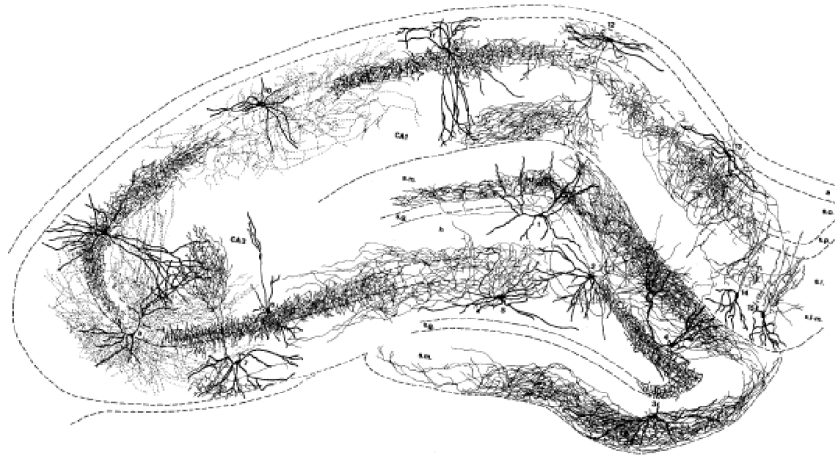


Figura 4: Superposición realizada a partir de dibujos de *camera lucida* de los diferentes interneuronas del giro dentado con el fin de mostrar la localización de sus somas y la distribución estratificada de sus proyecciones (Tomado de Freund TF y Buzsáki G de 1996).

en el hilus o la capa molecular. Las interneuronas del hilus cuyos axones proyectan hacia los dos tercios externos de la capa molecular son identificadas como *hilar perforant path associated cells* (HIPP) y están inervadas por las DGCs. Las neuronas GABAérgicas cuyos cuerpos celulares residen en la capa molecular reciben inervación directa de la vía perforante, son llamadas MOPP (*molecular layer perforant path associated cells*). Dependiendo de la localización, éstas cumplirán el rol de inhibición *feedforward* (los cuerpos celulares en la capa molecular) o inhibición *feedback* (los cuerpos celulares en el hilus). La inhibición *feedforward* es crítica para la regulación de la respuesta de las neuronas granulares a sus aferencias excitatorias (Freund & Buzsáki, 1996; Ewell *et al.*, 2010).

El hipocampo recibe además aferencias subcorticales entre las cuales se encuentran interneuronas GABAérgicas y neuronas principales colinérgicas que provienen de la banda diagonal de Broca medio-septal, también aferencias del área supramamilar, fibras serotoninérgicas del rafe, noradrenérgicas del locus ceruleus, y proyecciones dopaminérgicas que provienen del área tegmental ventral y fibras comisurales (Andersen, Hippocampus Book, Oxford Press, págs. 60-1).

Muchas de las aferencias que inervan al hipocampo lo hacen diferencialmente a lo largo del eje septo-temporal. Por ejemplo, la corteza entorrinal dorso-lateral inerva al hipocampo más septal y la corteza entorrinal ventro-medial inerva a la región más temporal del hipocampo (Amaral y

Witter, 1989). El hipocampo septal recibe principalmente aferencias de la neocorteza, mientras que el hipocampo temporal está mayoritariamente inervado por la amígdala, el hipotálamo y la corteza prefrontal (Dolorfo & Amaral 1998a y 1998b, Fanselow & Dong 2010). Estas diferencias en la aferencia serían las responsables de las diferentes funciones que se le atribuyen a estas dos regiones del hipocampo.

Función del hipocampo

Las funciones que se le atribuyen hoy en día al hipocampo son la de memoria y de la codificación espacial. La idea que la formación hipocampal está relacionada con la memoria surge de las observaciones de Brenda Milner sobre el paciente Henry Gustav Molaison, más conocido como 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 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, 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 el ganglio basal, 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 con el paso del tiempo son distribuidas en regiones corticales para formar una memoria permanente independiente de la formación hipocampal (Zola-Morgan & Squire, 1990).

Un desarrollo importante que permitió avanzar hacia el conocimiento de la función del hipocampo fue la implementación de microelectrodos para monitorear la actividad de neuronas individuales en el hipocampo de animales despiertos (O'Keefe & Dostrovsky, 1971; O'Keefe, 1976). 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 le permite al animal navegar por ambientes familiares, y elabora señales espacio-temporales que son dependientes del contexto. En estos experimentos se encontró que existían células que disparaban potenciales de acción cuando un animal está en un ambiente familiar. Como sólo disparaban dependiendo de la ubicación del animal se las llamó "place cells" o células de lugar. Disparan a una frecuencia de 1 Hz y de amplitud variable (O'Keefe & Nadel, 1978). Cada "place cell" dispara en respuesta a una ubicación determinada del animal, o "place field". El tamaño de los "place fields" a los que cada neurona responde aumenta en neuronas localizadas hacia regiones más temporales del hipocampo (Jung *et al.*, 1994). 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). Las células de lugar se encuentran en CA1 y CA3 (Fox & Ranck, 1975). La mayoría de las células piramidales hipocámpales codifican el "lugar" donde se ubica el animal debido a que disparan potenciales de acción en relación a la locación del animal y su ambiente, es independiente del comportamiento que esté llevando a cabo el animal en ese momento y no tiene relación con un estímulo en particular (Eichenbaum *et al.*, 1987). 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 (Figura 5) (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 también 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 y Squire, 1994).

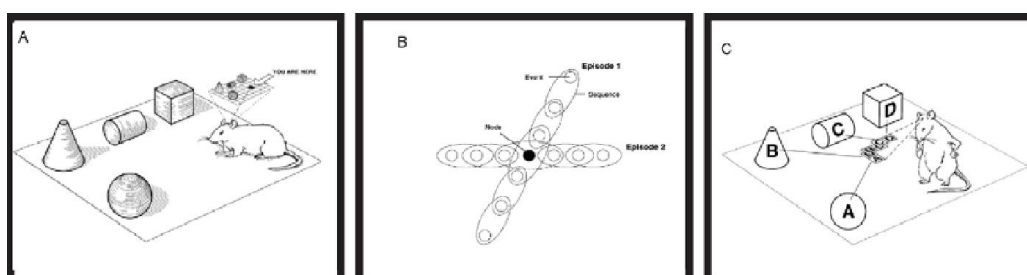


Figura 5: A-Eschema del concepto del hipocampo como “mapa cognitivo”. B- Modelo conceptual del procesamiento de la información a través de la “codificación nodal”, basado en la integración de eventos en común, temporales, espaciales o los dos. C- Esquema de la formación de memoria de espacio según la codificación nodal. Las neuronas codifican relaciones espaciales (por ejemplo pares AB, CD, etc) y la representación espacial se logra con la integración de la información en común de los diferentes pares de claves (Eichenbaum *et al.*, 1999)

Para dilucidar el rol del hipocampo en el procesamiento de la información se han hecho numerosos estudios, entre los cuales se encuentran las lesiones hipocampales focalizadas (lesiones generadas con colchicina). Estos estudios permitieron comprobar que el hipocampo cumple un rol crítico en tareas en las cuales el animal debe aprender a distinguir dos ambientes muy parecidos que contienen diferencias sutiles. Esta capacidad para extraer la información sutil pero específica se denomina “*pattern separation*” (Gilbert, 1998). Estas lesiones en el giro dentado afectaron en forma crítica el proceso de *pattern separation*, mientras que lesiones en CA1 no generaban ninguna alteración (Gilbert, 2001).

Los estudios de registros de actividad neuronal en animales despiertos sugieren que el giro dentado contribuye al *pattern separation* de dos maneras:

1) por medio de la ortogonalización, debido a la poca actividad de las neuronas granulares, genera un código “*sparse*” o ralo (Jung & Mc-Naughton, 1993; Leutgeb *et al.*, 2007). En el giro

dentado hay alrededor de un 2% de DGCs que están activas cuando el animal explora un ambiente (Chawla *et al.*, 2005; Ramírez-Amaya *et al.*, 2006; Tashiro *et al.*, 2007), por lo que eventos diferentes activarán poblaciones neuronales que no se superponen (ortogonales). En cambio, una sesión exploratoria activa un 25 % de la población de neuronas piramidales de CA1.

2) Debido a que el giro dentado puede reclutar poblaciones neuronales distintas cuando el animal representa una localización espacial diferente.

Por otra parte, si se tiene en cuenta que las neuronas de la corteza entorrinal son muy activas, y las células piramidales de CA3 presentan mapas espaciales estrictamente delimitados, existe una estación de relevo donde se produce esta separación; ésta estación de relevo sería el giro dentado (*pattern separation*,). (Leutgeb *et al.*, 2004; Fyhn *et al.*, 2007; Treves *et al.*, 2008.)

En experimentos realizados con pacientes utilizando escaneo de alta resolución se encontró que el giro dentado y CA3 aumentan su actividad global cuando los individuos son expuestos a una evaluación de memoria declarativa y deben discriminar entre dos objetos muy parecidos, es decir realizar *pattern separation*. En cambio, en la región de CA1 la actividad no cambió, lo cual implica que los objetos eran tratados como repeticiones (*pattern completion*) (Bakker *et al.*, 2008).

Neurogénesis adulta

Durante casi 100 años, luego del establecimiento de la teoría neuronal por Ramón y Cajal en 1911, se estableció que la generación de neuronas solamente ocurre durante el desarrollo. Dicho dogma se sustentaba en la complejidad de las conexiones del sistema nervioso que se creía incompatible con la integración de nuevas neuronas. Hubo, sin embargo, un descubrimiento que evidenció a este dogma como erróneo, ya que el cerebro adulto de los mamíferos puede generar neuronas nuevas (Altman & Das, 1965). La primera evidencia de integración funcional de neuronas generadas en el cerebro adulto se presentó en canarios (Paton & Nottebohm, 1984). Con la introducción de bromodeoxiuridina (BrdU es un análogo de timidina que se incorpora en la fase S del ciclo celular) se logró marcar los linajes neurales (Kuhn *et al.*, 1996), se reconfirmó el

descubrimiento realizado por Altman y se terminó de reafirmar que en mamíferos la neurogénesis adulta ocurre en dos regiones del cerebro: en la zona subventricular (SVZ) de los ventrículos laterales y en la zona subgranular del giro dentado del hipocampo (SGZ). Un paso importante en el conocimiento de la neurogénesis adulta y el desarrollo de las neuronas nuevas se llevó a cabo gracias al desarrollo de retrovirus modificados genéticamente, los cuales permitieron el marcado indeleble de las neuronas nuevas con proteínas fluorescentes. De esta manera se logró realizar experimentos de electrofisiología en rebanadas agudas de hipocampo donde se comprobó que las neuronas nuevas tenían propiedades de neuronas granulares (Van Praag *et al.*, 2002).

En la zona subventricular residen las células progenitoras neurales que se dividen y dan origen a neuroblastos que migran por la vía rostral migratoria hacia el bulbo olfatorio (BO), donde se dispersan radialmente y se diferencian a interneuronas. La mayoría de estas interneuronas nuevas se integran funcionalmente a los circuitos y más de la mitad sobrevive por largo tiempo (Carleton *et al.*, 2003; Petreanu y Alvarez-Buylla, 2002). Los detalles de la neurogénesis en el giro dentado del hipocampo se discuten en la siguiente sección.

Neurogénesis en el giro dentado adulto

El tipo de neuronas que el hipocampo genera durante toda la vida son las DGCs (dentate granule cells). En el adulto, las DGCs nuevas se originan a partir de células progenitoras neurales localizadas en la zona subgranular (SGZ) del giro dentado, definida como la región ubicada entre el hilus y la capa granular, Figura 6. Dichas células progenitoras son capaces de proliferar y luego diferenciarse en astrocitos, oligodendrocitos o neuronas (Gage FH, 2000; Zhao C *et al.*, 2008).

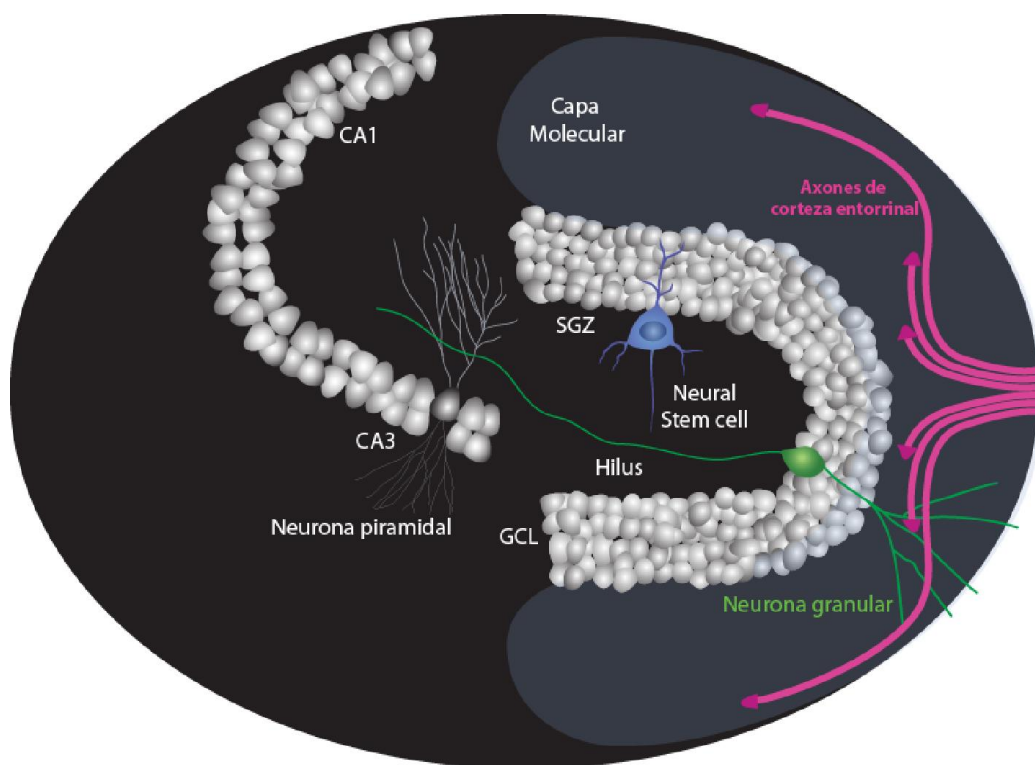


Figura 6: Esquema del hipocampo. GCL: capa granular del giro dentado. SGZ: zona subgranular. En azul se muestra una célula progenitora neural, verde se esquematiza una neurona granular. En fucsia los axones provenientes de la corteza entorrinal.

Los niveles basales de neurogénesis adulta son de unas 4.500 neuronas por día en ratas jóvenes adultas, lo que luego de un mes representa una proporción del 5% respecto de la población total de DGCs preexistentes (Cameron y McKay, 2001; Tashiro *et al.*, 2007). En las semanas siguientes un alto porcentaje de las neuronas generadas (entre un 50 % a un 75 %) muere antes de llegar a la madurez (Kempermann *et al.*, 2003).

Las células progenitoras neurales (células de tipo 1), exhiben una división lenta y se cree tendrían una capacidad proliferativa ilimitada, aunque eso está actualmente en discusión (Bonaguidi *et al.*, 2011; Encinas *et al.*, 2011). Expresan los marcadores nestina y Sox2 y proyectan un solo proceso que cruza toda la capa granular y se ramifica en la primera porción de la capa molecular. Luego de dividirse dan origen a un progenitor intermediario el tipo 2, que es más proliferativo y posee procesos cortos. Las células tipo 2 se subdividen a su vez en tipo 2a, que continúan expresando marcadores de célula madre, y tipo 2b, que comienzan a expresar marcadores

neuronales inmaduros como doublecortin (proteína asociada a microtúbulos) y la forma polisialica de la molécula de adhesión neuronal PSA-NCAM. Las células tipo 2b luego dan origen a las tipo 3, son neuroblastos con potencial proliferativo pero que no expresan marcadores de célula madre y dan origen a neuronas. Poseen receptores de GABA, que al activarse promueven la diferenciación neuronal (revisado por Toni *et al.*, 2011).

Gracias al desarrollo de retrovirus derivado de “Moloney murine leukemia virus” cuyo genoma fue modificado para expresar de manera constitutiva una proteína fluorescente, se pueden estudiar las neuronas nuevas nacidas en el adulto de manera de célula autónoma (Van Praag *et al.*, 2002). El retrovirus es inyectado intrahipocampalmente y solo infecta las células en división, es decir a los progenitores neurales 2b, de esta manera se logra la visualización morfológica de las neuronas infectadas en tejido vivo y también se conoce la edad de la neurona en estudio. Se realizaron experimentos en los cuales las neuronas nuevas fueron marcadas con retrovirus y luego se estudió la aferencia en los primeros días de su desarrollo, utilizando la técnica de patch clamp. A esta edad se encontró que las neuronas expresaban receptores de GABA y de glutamato, pero no tenían conexión sináptica aferente (Espósito *et al.*, 2005; Ge *et al.*, 2006).

El desarrollo de las DGCs nacidas en el adulto prosigue una serie de etapas definidas y conservadas que recapitulan el proceso de desarrollo embrionario (Espósito *et al.*, 2005; Piatti *et al.*, 2006). El proceso de maduración está altamente conservado entre la neurogénesis embrional, perinatal y adulta. Durante la primera etapa de desarrollo las neuronas nuevas adquieren el fenotipo neuronal, migran una corta distancia en la capa granular y reciben aferencia GABAérgica tónica (mediada por el GABA libre del ambiente extracelular). También comienzan a generar las primeras proyecciones dendríticas y axonal. El marcador neuronal que expresan es doublecortin (DCX), es una proteína asociada a microtúbulos cuando las neuronas están migrando y es un marcador que se utiliza para estudiar el grado de madurez de las neuronas.

En esta etapa del desarrollo, el cloro (Cl^-) juega un papel muy importante ya que su concentración intracelular es alta debido a la expresión del co-transportador de $\text{Cl}^-/\text{Na}^+/\text{K}^+$ NKCC1.

NKCC1 cataliza la entrada de Cl^- y K^+ utilizando la fuerza del gradiente de Na^+ . Cuando se activan los receptores de GABA generan una despolarización de la membrana, por lo que GABA es excitatorio en las DGCs nuevas. Esta despolarización es crucial para la maduración neuronal (Ge *et al.*, 2006). Durante la segunda semana de desarrollo las dendritas todavía no poseen espinas pero comienzan a recibir las primeras sinapsis GABAérgicas, cuyas corrientes muestran una cinética lenta (Espósito *et al.*, 2005). Luego de la segunda semana comienza a expresarse el cotransportador de Cl^-/K^+ KCC2, el cual extruye Cl^- hacia el medio extracelular, esta vez en favor del gradiente de K^+ . Este proceso disminuye la concentración intracelular de Cl^- y de esta manera GABA se transforma en inhibitorio (Ge *et al.*, 2006). En esta etapa las dendritas comienzan a crecer a lo largo de la capa molecular, alcanzando las aferencias de los axones (*perforant path*) que provienen de la corteza entorrinal, generando conexiones excitatorias glutamatérgicas (Espósito *et al.*, 2005; Ge *et al.*, 2006) y se observaron las primeras espinas dendríticas. También extienden sus axones hacia el hilus donde se conectan con sus eferentes, principalmente las interneuronas GABAérgicas del hilus, las mossy cells del hilus y con las células piramidales e interneuronas de CA3 (Zhao *et al.*, 2006). Los axones de las DGCs liberan glutamato sobre las células target del hipocampo (Toni *et al.*, 2008). La densidad de espinas dendríticas aumenta entre la tercera y la sexta semana, así como también la complejidad del árbol dendrítico. Durante el período de desarrollo abarcado entre la tercera y cuarta semana de edad estas neuronas muestran hiperexcitabilidad y un aumento en la plasticidad sináptica de las conexiones excitatorias aferentes (Mongiat *et al.*, 2009; Ge *et al.*, 2008). En este lapso las DGCs dejan de expresar DCX y comienzan a expresar Calbindin (Cb), es una proteína que participa del buffer de calcio intracelular, se lo utiliza como marcador de madurez. Una posible consecuencia fisiológica de la marcada plasticidad sináptica es que podría otorgar a las neuronas nuevas ventajas para competir con las neuronas maduras por la formación y estabilización de sinapsis aferentes (compite por los axones que provienen de la *perforant path*) y eferentes (Tashiro *et al.*, 2006; Toni *et al.*, 2007 y 2008). Estas propiedades permiten que las neuronas nuevas jóvenes integradas contribuyan de una manera única al procesamiento de la información del circuito (Marín Burgin *et*

al., 2012). El paso final en la integración sináptica es alcanzado con la formación de sinapsis perisomáticas de GABA, que son inhibitorias y de cinética rápida (Espósito *et al.*, 2005). Al llegar a un fenotipo neuronal maduro, las DGCs nuevas poseen propiedades eléctricas y morfológicas similares a las de las DGCs generadas durante el desarrollo perinatal (Laplagne *et al.*, 2006 y 2007). Lo anteriormente expuesto se resume en la figura 7.

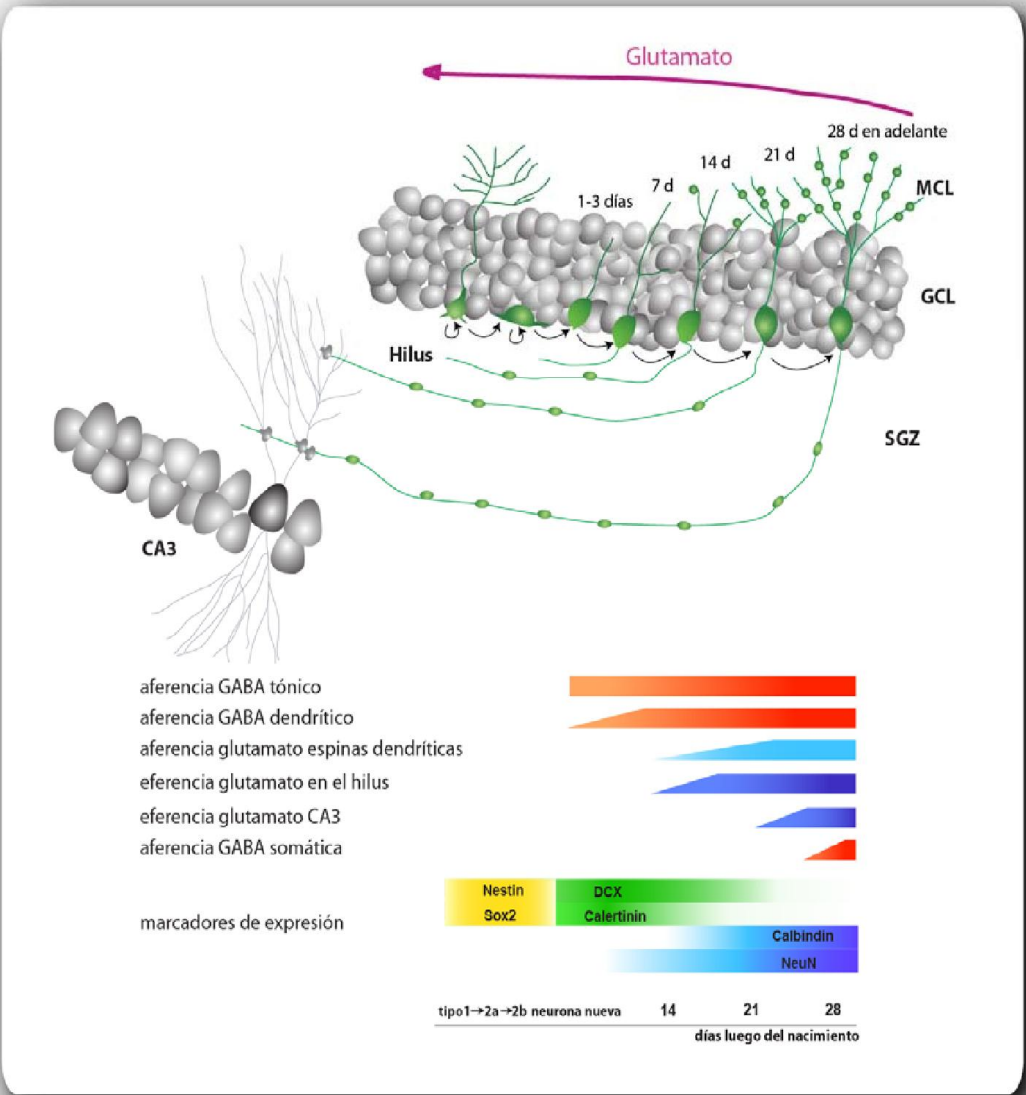


Figura 7: Esquema del curso temporal del desarrollo morfológico de las DGCs nacidas en el hipocampo adulto. También se muestra el desarrollo de la aferencia GABAérgica, glutamatérgica, las conexiones eferentes y las ventanas de tiempo en las cuales se expresan los marcadores neuronales. Datos obtenidos de Espósito *et al.*, 2005; Toni *et al.*, 2008 y modificado de Zhao *et al.*, 2008.

Rol funcional de la neurogénesis en el hipocampo adulto

La evidencia más convincente del rol que cumple la neurogénesis adulta en la memoria 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.

Un análisis del comportamiento de animales en los cuales la neurogénesis ha sido eliminada por agentes antimitóticos, reveló que los animales tienen 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 DGCs nuevas con un lentivirus que tiene modificado su genoma el cual 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 “*pattern separation*”.

Existen experimentos en los cuales se ha aumentado la neurogénesis adulta por medio de una estrategia genética, en la cual generaron ratones condicionales *knock out* para el gen proapoptótico Bax en los progenitores neurales. Estas neuronas se mueren en menor medida, hay más neuronas nuevas y sobreviven por más tiempo (Sahay *et al.*, 2011). Estos animales mostraron una mejor performance en test comportamentales en los cuales analizó su capacidad de discriminación de dos contextos similares. Se observó que el aumento en la neurogénesis adulta es suficiente para aumentar el “*pattern separation*”.

Aunque los ensayos de comportamiento que miden explícitamente “*pattern separation*” no han sido eficaces para establecer la conexión entre “*pattern separation*” y neurogénesis adulta, existen tests de memoria espacial en los cuales se necesita el reclutamiento del giro dentado. Estudios recientes muestran que las neuronas nuevas son necesarias para resolver ese tipo de

tareas. Esto es consistente con la idea que la neurogénesis adulta contribuye con el “*pattern separation*”. (Dupret *et al.*, 2008; Garthe *et al.*, 2009; Wojtowicz *et al.*, 2008).

El hecho que la proliferación neuronal y la sobrevivencia de las neuronas nuevas sean procesos modulables por estímulos fisiológicos también avala el rol funcional de la neurogénesis adulta. Un ejemplo de este proceso es el hecho que un ambiente enriquecido incrementa el número de neuronas nuevas debido a un aumento en la proliferación neuronal y en la sobrevivencia neuronal (Kempermann *et al.*, 1997; Kempermann *et al.*, 1998; Van Praag *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 2003; Tashiro *et al.*, 2007; Kronenberg *et al.*, 2003). Se ha demostrado que la actividad física voluntaria aumenta la proliferación neuronal, lo cual genera un número mayor de neuronas nuevas (Van Praag *et al.*, 1999; Brown *et al.*, 2003; Kronenberg *et al.*, 2003). Como ejemplo negativo es el hecho que el envejecimiento también afecta la tasa de generación de neuronas nuevas (Kempermann *et al.*, 1998) en situaciones de estrés (revisado por Mirescu y Gould, 2006), en aislamiento (Lu L. *et al.*, 2003) y en depresión (Duman *et al.*, 2004). Por último, ciertas condiciones patológicas como la presencia de convulsiones o la isquemia también son capaces de incrementar el número de neuronas nuevas en el giro dentado adulto (Parent y Lowenstein, 2002; Kokaia y Lindvall, 2003).

Existen evidencias de que la generación de neuronas nuevas en el hipocampo adulto contribuye al proceso de la memoria. Primero, la tasa de neurogénesis correlaciona positivamente con las habilidades de aprendizajes dependientes de hipocampo (Drapeau *et al.*, 2003). Segundo, las condiciones que aumentan el desempeño de la memoria aumentan la neurogénesis, mientras que las condiciones que no hay neurogénesis impiden el aprendizaje. (Kempermann *et al.*, 1997; Lemaire *et al.*, 2000)

Estudios en los cuales se evaluó el efecto del ambiente enriquecido y/o el ejercicio voluntario en la neurogénesis adulta, se encontró que existían variaciones en las capacidades de aprendizaje en el test del laberinto de agua de Morris. Este test es dependiente de hipocampo y es un laberinto en el cual los animales se colocan en una pileta redonda, con agua opaca y deben nadar hasta encontrar una plataforma que está sumergida. Deben guiarse por las claves ambientales para

hallar la plataforma. Esto sugirió que el aumento en la tasa de neurogénesis tiene un impacto positivo en la memoria espacial. El ejercicio voluntario o el ambiente enriquecido favorecía la habilidad para la memoria y aumentaba el número de neuronas granulares en el giro dentado (Kempermann *et al.*, 1997, 1998; Nilsson *et al.*, 1999; Dupret *et al.*, 2007).

La relación entre la pérdida y ganancia de función, une bidireccionalmente los cambios en los niveles de neurogénesis hipocampal adulta con la eficiencia en el “*pattern separation*” (Figura 8). Esto apoya la idea que las neuronas jóvenes nacidas en el adulto tienen propiedades únicas fundamentales para este tipo de funciones.

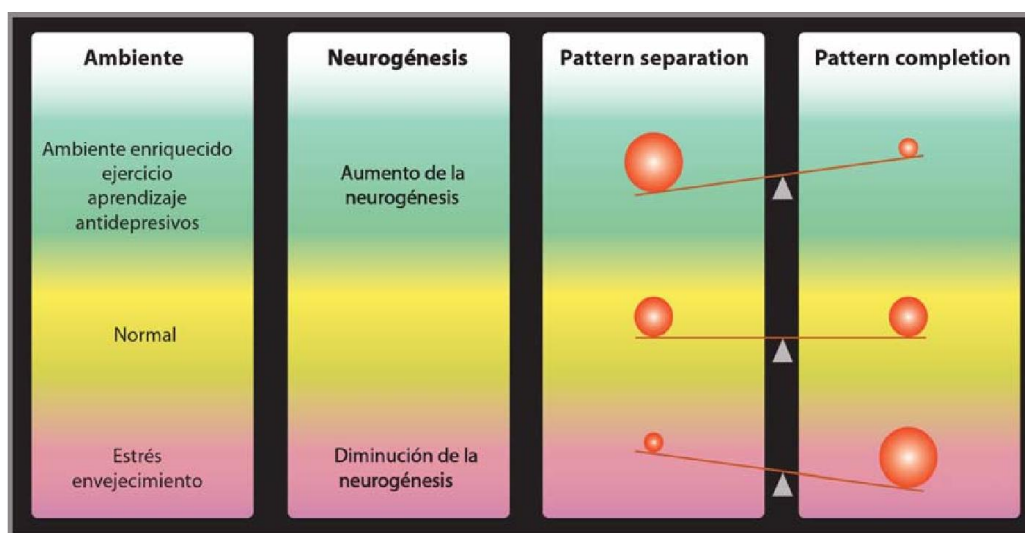


Figura 8: En esta figura se esquematiza la influencia del ambiente en la neurogénesis, en el *pattern separation* y *pattern completion*. Se propone que un aumento en la neurogénesis favorecería la capacidad de *pattern separation*, lo cual es ventajoso porque favorece la exploración y aprendizaje. Una disminución en la neurogénesis disminuiría el *pattern separation* y favorecería el *pattern completion*, lo cual implicaría generalización.

Impacto de la actividad del circuito en la neurogénesis en desarrollo y adulto

El tiempo que tarda una neurona nacida en el hipocampo adulto en alcanzar su total madurez varía entre especies y estas diferencias de velocidad de desarrollo de las neuronas nuevas existen aún en roedores. Por ejemplo, una neurona nacida en el cerebro adulto de una rata tarda aproximadamente 2 semanas en alcanzar el fenotipo maduro, mientras que (como describimos en la sección anterior), las neuronas que se desarrollan en el hipocampo adulto de ratones requieren entre seis a ocho semanas para alcanzar su estadio final de maduración. Esta variabilidad en la

velocidad de maduración entre especies de roedores dificulta la comparación entre las velocidades de maduración de los trabajos reportados.

La velocidad con que una neurona nueva madura en el hipocampo adulto de roedores, es mucho más lenta comparada respecto a lo que sucede durante el desarrollo perinatal (Overstreet-Wadiche *et al.*, 2004; Espósito *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2006; Jones *et al.*, 2003). Si comparamos ambos ambientes de desarrollo, en el cerebro perinatal existen patrones de actividad eléctrica llamados potenciales de despolarización gigantes (GDP). Son generados por la acción despolarizante de GABA (Ben-Ari, 1989). Estas despolarizaciones son la actividad inicial, son una señal primitiva con poca información que se propaga a lo largo de todo el cerebro. La principal función se cree que es la generación de oscilaciones de calcio (Ca^{++}) intracelular, aún en neuronas que poseen muy pocas sinapsis, es una modulación del crecimiento neuronal y sinaptogénesis. En el cerebro adulto estas GDP están ausentes, indicando que la manera de comunicación y desarrollo neuronal ha sido modificada en el desarrollo del individuo (Ben-Ari, 1989).

Varios estudios han demostrado que las corrientes de Ca^{++} regulan el desarrollo neuronal a nivel transcripcional, lo hacen a través de canales activados por voltaje. Durante el desarrollo neuronal la frecuencia de las oscilaciones o potenciales de acción de Ca^{++} generados por la entrada de Ca^{++} a través de los canales de Ca^{++} tipo N y L y por la liberación del Ca^{++} de almacenamientos intracelulares, regulan la aparición del neurotransmisor GABA durante el desarrollo. Esto fue demostrado en cultivos de neuronas espinales de *Xenopus*, estas oscilaciones de Ca^{++} regulan el transcripto de la enzima ácido glutámico descarboxilasa (GAD 67) y lo regulan antes de la aparición de la formación de sinapsis. La frecuencia de los potenciales de acción de Ca^{++} juega un papel muy importante en este proceso (Watt *et al.*, 2000). Se ha encontrado que en cultivos primarios de neuronas piramidales de rata la expresión de Calbindin durante el desarrollo puede ser modulada por los canales de Ca^{++} tipo Q y L. Estos resultados sugieren que estos canales actúan en sinergia para dirigir la diferenciación neuronal antes del establecimiento de los circuitos sinápticos (Boukhaddaou *et al.*, 2000). Estudios recientes han demostrado que alterando el patrón de

potenciales de Ca^{++} (los cuales son generados espontáneamente en diferentes clases de neuronas espinales embrionales), se genera un cambio en la expresión de neurotransmisores de una manera homeostática, para lograr un constante nivel de excitación. Estos cambios dependientes de la actividad en el terminal presináptico podrían generar que los axones se dirijan hacia nuevos blancos y generar sinapsis funcionales nuevas en un circuito diferente (revisado por Spitzer, 2004).

Para demostrar si el efecto de GABA en el ambiente del cerebro neonatal puede modular la velocidad de desarrollo, se estudió la neurogénesis en el giro dentado de ratones knock-out para GAD65, la enzima responsable de producir GABA vesicular. Se encontró una reducción de los GDPs en estos ratones, lo que coincidió con un retraso en la maduración de las DGCs postnatales (Overstreet-Wadiche *et al.*, 2006; Ge *et al.*, 2006). Estos experimentos demostraron el rol fundamental del neurotransmisor GABA en el desarrollo neuronal perinatal.

Se ha demostrado además que la capacidad de las neuronas nuevas nacidas en el adulto para integrarse al circuito y la velocidad con lo cual lo hacen puede ser modificada por cambios patológicos en la actividad eléctrica en el ambiente en el que dicha neurona se está diferenciando. Un ejemplo de ello es el que se observó cuando a un cerebro adulto se le indujo epilepsia, lo cual aceleró la neurogénesis adulta (Overstreet Wadiche *et al.*, 2006). Los somas de las neuronas se ubicaron ectópicamente, llegando hasta la capa molecular; en un ambiente normal, los somas de las neuronas granulares nuevas del adulto solo migran hasta el primer tercio de la capa granular (Mathews *et al.*, 2010). Asimismo, se observó que las dendritas se desarrollaron más rápido en los ratones que se les indujo epilepsia, éstas poseían una mayor longitud total y una mayor densidad de espinas dendríticas a menor edad que las neuronas de los ratones controles. Se observó que la conexión aferente de estas neuronas era aberrante y se encontró que poseían aferencias glutamatérgicas recurrentes (Overstreet Wadiche *et al.*, 2006). La velocidad de maduración puede verse afectada debido a cambios en el modo de acción despolarizante o hiperpolarizante de los neurotransmisores en las neuronas nuevas. Por ejemplo, en experimentos en los cuales se bloqueó el transportador de Cl^- , NKCC1 (por medio de un shRNAi) el cual genera alta concentración de Cl^-

intracelular cuando las neuronas son inmaduras, se logró bloquear la acción despolarizante de GABA durante las primeras etapas del desarrollo. A su vez, el bloqueo NKCC1 generó un retraso en la expresión de marcadores de maduración y un acortamiento en la longitud del árbol dendrítico. Esto se reflejó en un retraso de la maduración neuronal de más de una semana y una alteración de la conectividad aferente glutamatérgica y GABAérgica de las DGCs (Ge *et al.*, 2006). La figura 9 muestra un resumen de los trabajos anteriormente discutidos.

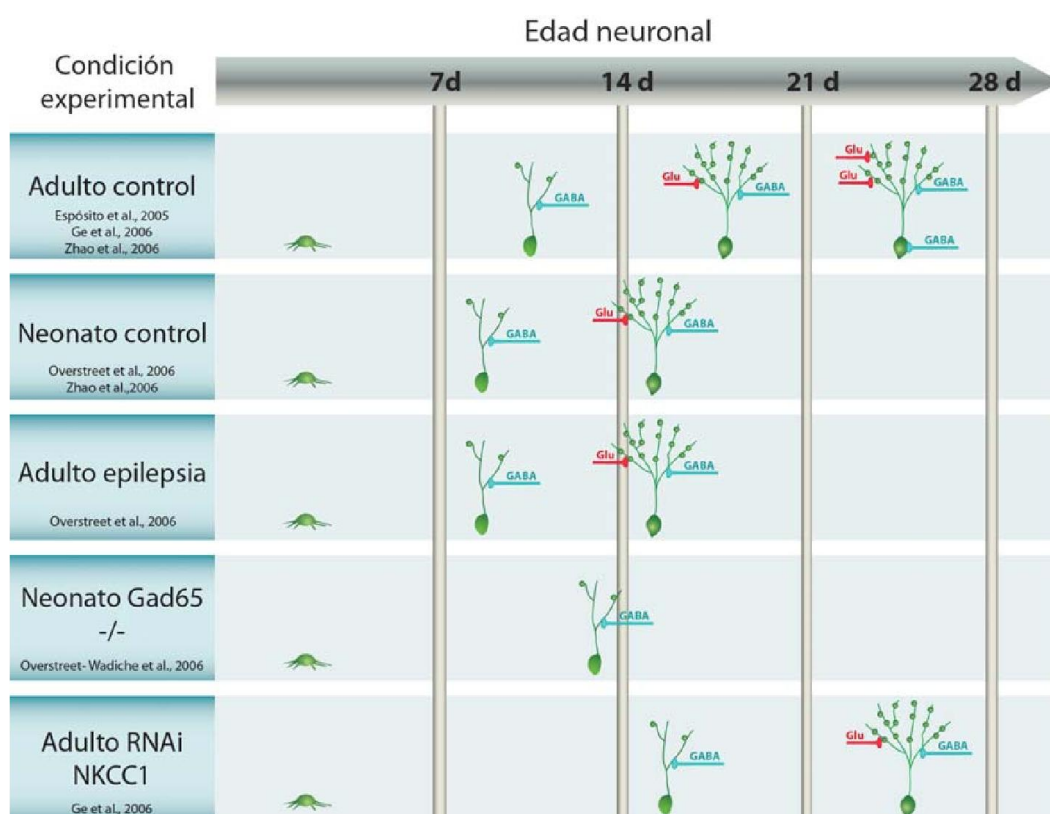


Figura 9: Grado de desarrollo de maduración neuronal en ratones a lo largo del tiempo bajo diferentes condiciones experimentales. En rojo se esquematiza el comienzo de la aferencia excitatoria glutamatérgica y en azul la aferencia GABAérgica. Tomado de Piatti y col. 2006

La progresión de neural stem cell (NSC) a neurona madura está sujeta a una exquisita coordinación controlada por una multitud de factores intrínsecos autónomos de célula (reguladores del ciclo celular, factores de transcripción y factores epigenéticos; Zhao *et al.*, 2008) y de factores extracelulares. Las moléculas que son críticas durante el desarrollo embrionario están conservadas y continúan modulando la actividad de las NSC y neurogénesis adulta. Un ejemplo de ello es la vía de

señalización de Wnt, esta vía influencia la proliferación de las NSC y la diferenciación durante el desarrollo embrionario. También es crucial en la neurogénesis adulta (Lie *et al.*, 2005; Wexler *et al.*, 2009). Wnt no solo se produce en los astrocitos sino también en las NSC. La señalización autócrina de Wnt genera la proliferación y totipotencialidad de NSC a través de la vía de $GDK\beta/\beta$ catenina. La activación de esta vía aumenta la expresión de NeuroD1 el cual promueve la diferenciación neuronal de NSC. En respuesta a Wnt las NSC aumentan la expresión de un retrotransposón Line1 el cual es importante para la sobrevivencia de las NSC. (Kuwabara *et al.*, 2009). Recientemente se ha encontrado que la cilia primaria es importante para el desarrollo del árbol dendrítico de las NSC, actúa mediando la activación de la vía de señalización de Wnt (Kumamoto *et al.*, 2012).

Toda la evidencia experimental anteriormente expuesta indicaría que además de la existencia de un programa genético intrínseco que dirige el desarrollo neuronal, existe una lectura del ambiente en el cual la neurona se desarrolla y esto llevaría a modificaciones en la velocidad de maduración.

Diferencias en la actividad neuronal en el giro dentado a lo largo del eje septo-temporal

Debido a las diferencias en la actividad basal de las neuronas en CA1 a lo largo de su eje septo-temporal (Jung *et al.*, 1994), en nuestro laboratorio se estudió si estas diferencias también existían a lo largo del eje septo-temporal de la GCL, lugar en el cual se desarrollan las neuronas granulares nuevas. Para ello se utilizó como sensor de actividad neuronal a la proteína Arc (activity related cytoskeleton associated protein), es un gen de respuesta inmediata (IEG) inducido por actividad neuronal (Korb E. & Finkbeiner S., 2011). Se midió la densidad de neuronas que expresaban este marcador en la región septal y en la temporal del giro dentado en ratones adultos jóvenes (9 semanas de edad) que permanecieron en sus jaulas estándar. Se observó un mayor porcentaje de neuronas granulares que expresaban Arc en la región septal que en la temporal

(Figura 10; Piatti *et al.*, 2011). Esta diferencia en la expresión de Arc en la GCL (nicho neurogénico) coincide con el gradiente de actividad que existe en la región CA1 del hipocampo.

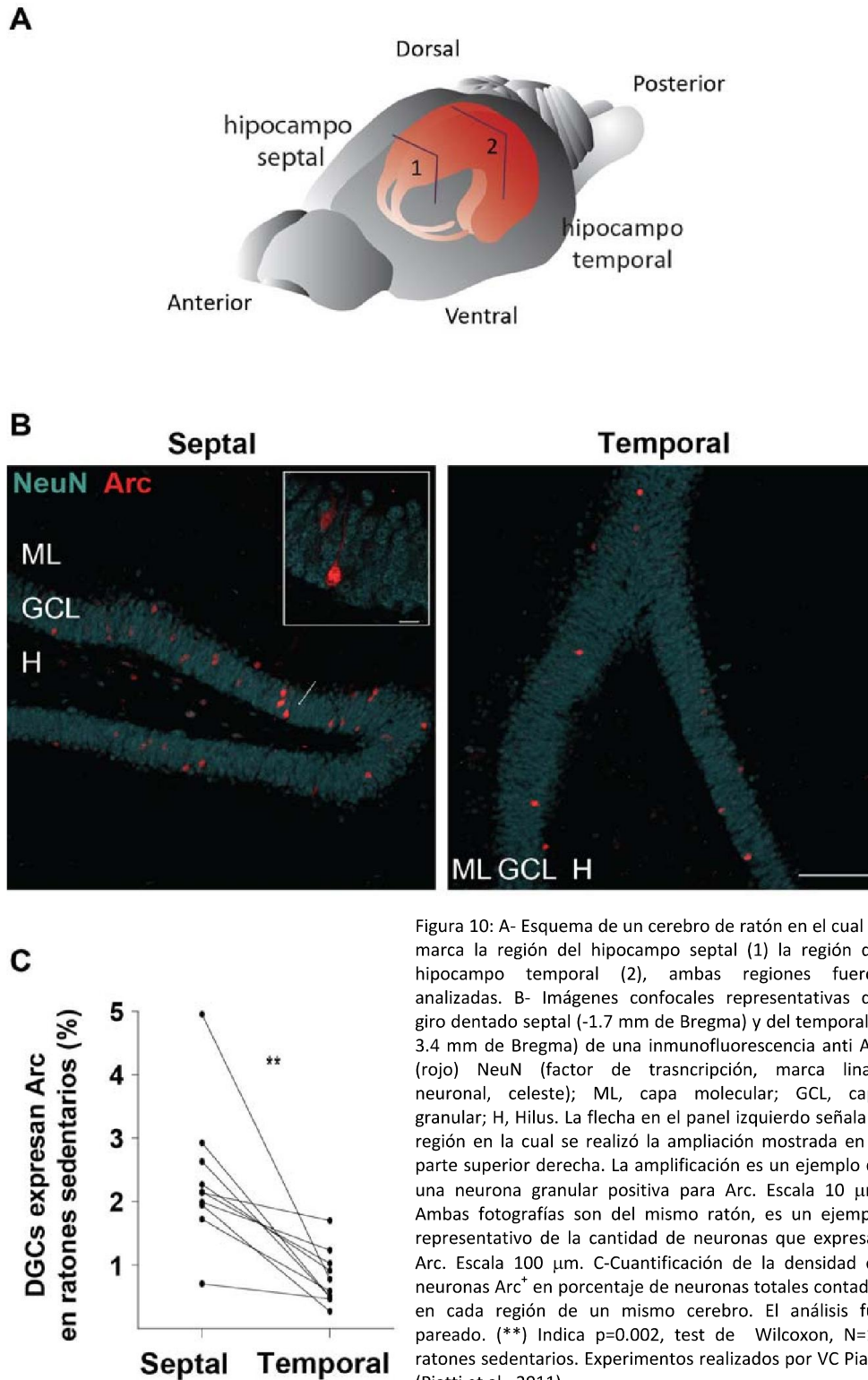


Figura 10: A- Esquema de un cerebro de ratón en el cual se marca la región del hipocampo septal (1) la región del hipocampo temporal (2), ambas regiones fueron analizadas. B- Imágenes confocales representativas del giro dentado septal (-1.7 mm de Bregma) y del temporal (-3.4 mm de Bregma) de una inmunofluorescencia anti Arc (rojo) NeuN (factor de transcripción, marca linaje neuronal, celeste); ML, capa molecular; GCL, capa granular; H, Hilus. La flecha en el panel izquierdo señala la región en la cual se realizó la ampliación mostrada en la parte superior derecha. La ampliificación es un ejemplo de una neurona granular positiva para Arc. Escala 10 μ m. Ambas fotografías son del mismo ratón, es un ejemplo representativo de la cantidad de neuronas que expresan Arc. Escala 100 μ m. C-Cuantificación de la densidad de neuronas Arc⁺ en porcentaje de neuronas totales contadas en cada región de un mismo cerebro. El análisis fue pareado. (**) Indica $p=0.002$, test de Wilcoxon, N=10 ratones sedentarios. Experimentos realizados por VC Piatti (Piatti *et al.*, 2011).

Las neuronas nuevas generadas en el hipocampo adulto siguen una secuencia estereotipada de eventos durante su desarrollo (Espósito *et al.*, 2005). Existe una mayor actividad eléctrica en la capa granular septal (Piatti *et al.*, 2011) comparada con la temporal en ratones sedentarios. Llamativamente se ha encontrado que en condiciones patológicas la velocidad de desarrollo neuronal se ve acelerada por el aumento de la actividad eléctrica del medio donde estas neuronas maduran (Overstreet-Wadiche *et al.*, 2006). Cabe preguntarse entonces si el gradiente de actividad eléctrica de la GCL a lo largo del eje septo temporal de la capa granular afecta la velocidad de desarrollo de las neuronas nuevas y su capacidad para integrarse a los circuitos preexistentes en condiciones fisiológicas.

Debido a toda la evidencia experimental anteriormente expuesta, proponemos la **hipótesis** de que la secuencia de eventos que ocurre durante el desarrollo de las neuronas granulares nacidas en el giro dentado adulto estaría determinada por un programa autónomo de célula, pero la velocidad con la que ocurre el desarrollo neuronal y la integración al circuito preexistente podría ser modulada por la actividad eléctrica del ambiente, así como también podría ser modulada por la actividad eléctrica intrínseca de las neuronas.

Objetivos de la tesis

El objetivo general de la presente tesis es investigar acerca de los factores que determinan las características del desarrollo de las DGCs generadas en el hipocampo adulto, tanto en cuanto a factores intrínsecos como extrínsecos. El foco se ha centrado en el rol de la actividad eléctrica en la modulación del desarrollo neuronal. Para ello hemos propuesto tres objetivos concretos a estudiar:

- 1- Estudiar el desarrollo de las DGCs generadas en el hipocampo adulto en condiciones variables de la actividad eléctrica en el nicho neurogénico.
- 2- Estudiar los efectos de los niveles de actividad intrínseca en el desarrollo de las DGCs nuevas.
- 3- Determinar si existe una ventana de tiempo acotada durante la cual las DGCs nuevas responden a diferentes niveles de actividad intrínseca.

Materiales y Métodos

Construcción de los genomas retrovirales

Los clonados fueron realizados a partir de un vector retroviral no replicativo derivado del “Moloney murine leukemia virus” (MMLV) modificado para expresar GFP bajo el promotor CAG (Zhao *et al.*, 2006). El promotor CAG es un promotor constitutivo fuerte que contiene las secuencias enhancers del promotor CMV, el promotor de β - actina de pollo y un intrón sintético. Este vector también contiene un elemento post-transcripcional del virus de la hepatitis (WPR) que estabiliza al transcripto aumentando la exportación nuclear y por lo tanto aumenta la producción de la proteína que se quiere expresar.

En esta tesis se utilizaron las siguientes construcciones genómicas retrovirales:

- CAG-GFP, CAG es un promotor constitutivo fuerte y río abajo expresa la proteína verde fluorescente (**Green Fluorescent Protein**).
- CAG-RFP expresa la proteína roja fluorescente (**Red Fluorescent Protein**) construido por Diego A. Laplagne durante su tesis doctoral.
- CAG-Kir2.1-IRES-GFP y CAG-Kir2.1-IRES-RFP, este virus expresa un canal de rectificación entrante de potasio (Kir2.1). Se lo construyó con el fin de disminuir la resistencia de membrana de la neurona y de esta manera disminuir la excitabilidad intrínseca neuronal. La secuencia IRES, es una secuencia de entrada del ribosoma, se generan dos proteínas independientes (bicistrónico), pero la eficiencia de traducción de la proteína río abajo de la secuencia IRES (la proteína reportera fluorescente) es menor que la primera, lo cual dificulta la visualización de las neuronas por medio de la proteína reportera. Ambos virus fueron construidos por M. Soledad Espósito en su tesis doctoral.
- CAG-Kir_{NC}-IRES-RFP y CAG-Kir_{NC}-IRES-GFP, este virus expresa el canal Kir2.1 mutado en el poro del canal, se lo construyó como control de especificidad del virus que expresa Kir2.1. La construcción de este virus se detalla en el Anexo I.
- CAG-GFP-2A-hM3D y CAG-GFP-2A-hM4D, son virus que expresan receptores los cuales son solamente activables por ligandos sintéticos, actúan a través de proteína G. Se los construyó con el fin de modular la excitabilidad neuronal en ventanas de tiempo determinadas. La secuencia 2A deriva de *picornavirus*, la cual codifica para un péptido autoclivable. El virus expresa dos proteínas independientes, el receptor hM3D o el hM4D y la proteína reportera GFP.

Construcción de hM3D y hM4D

Con el fin de modular la excitabilidad intrínseca de las neuronas durante ventanas de tiempo decidimos utilizar la tecnología de los Receptores Activables Solamente por Ligandos Sintéticos (RASSLs; Armbruster *et al.*, 2007; Alexander *et al.*, 2009). Los receptores hM3D y hM4D son derivados del receptor muscarínico humano, están mutados con el fin que se activen solo por una droga sintética. Para poder diferenciar estos receptores del endógeno, poseen la secuencia del epítipo de hemaglutinina (HA), los cDNA de estos receptor fueron cedidos gentilmente por Bryan Roth, Universidad de Carolina del Norte. Con el objetivo de aumentar la eficiencia de la expresión de la proteína reportera se cambió el sistema de expresión bicistrónico del IRES por uno monocistrónico. Para ello se utilizaron las propiedades del péptido autoclivable de la proteína 2A de picornavirus (Trichas *et al.*, 2008). Se intercaló la secuencia nucleotídica 2A entre las dos proteínas a expresar: GFP-2A-hM3D y GFP-2A-hM4D. Esto genera una sola molécula de RNA mensajero. Cuando el ribosoma llega a la secuencia 2A, ésta se traduce y se autocliva, la independencia de las proteínas expresadas se logra co-traduccionalmente. El beneficio es que el transgen y la proteína reportera se expresan con iguales niveles (una molécula de proteína reportera por cada una del transgen). Las construcciones del genoma retroviral fueron hechas por Damiana Giacomini en nuestro laboratorio.

Ensamblado de las partículas virales

La producción de los retrovirus utilizados en esta tesis fue realizada mediante una triple transfección de células HEK 293T con los siguientes plásmidos: un plásmido conteniendo los genes para la proteína de cápside (CMV-vsug), otro conteniendo las enzimas virales (CMV-gag/pol) y un tercer plásmido conteniendo el genoma viral con o sin transgen (CAG-IRES-GFP). Dichos plásmidos fueron producidos en cultivo de bacterias *E.coli DH5 α* y purificados en condiciones libres de endotoxina (*Maxiprep endotoxin-free*, QIAGEN). Las células HEK 293T fueron cultivadas en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCO, Invitrogen) suplementado con: 10% de suero fetal bovino, glutamina (200 mM) y gentamicina (50 mg/ml). Estas células fueron transfectadas (cuando

llegaron a una confluencia del 75 %) con lipofectamina 2000 ó polyethylenimine (PEI) (Boussif *et al.*, 1995) (7.5, 15 y 22.5 µg de CMV-vsug, CMV-gag/pol y genoma viral respectivamente con 600 µl de lipofectamina ó 420 µl de PEI por cada 12 placas P100 de células). Luego de 48hs de la transfección el sobrenadante conteniendo el retrovirus fue cosechado, filtrado y concentrado mediante dos rondas de ultracentrifugación. Finalmente, el retrovirus fue resuspendido en PBS Hyclone (libre de endotoxina) y conservado a -80°C hasta el momento de su uso. Las partículas virales pueden ser conservadas durante años en estas condiciones sin comprometer su capacidad infectiva. Los títulos virales fueron de aproximadamente 10^5 partículas/µl. Para los experimentos de coinfección en los experimentos de la medición de sobrevivencia neuronal se utilizó una mezcla de CAG-GFP y CAG-Kir-IRES-RFP (o CAG-Kir_{NC}-IRES-RFP) de 1:10. Para los experimentos de medición de árbol dendrítico y densidad de espinas se utilizó una mezcla de retrovirus de CAG-RFP y CAG-Kir-IRES-GFP en una relación 1:5. Durante el transcurso de la tesis el retrovirus fue producido con la ayuda de Gabriela Lombardi, Mariela Vegetti y Damiana Giacomini.

Animales y cirugía estereotáxica

Se utilizaron ratones C57BL/6J hembra de entre 6 y 7 semanas de edad. Los animales se mantuvieron en jaulas en grupos de 4 o 6 a partir de tres días antes de la operación, con o sin ruedas según se describe en la sección de resultados. Se utilizó como máximo una rueda cada 3 individuos, y esta se dejó en la jaula durante todo el experimento. Los ratones fueron anestesiados con una dosis intraperitoneal de 150 µg ketamina / 15 µg xylacina en 10 µl de solución salina por gramo de ratón, la cual mantuvo a los animales anestesiados durante aproximadamente dos horas. Luego se rasuró la cabeza, se colocó al animal en el aparato estereotáxico bajo lupa y se marcaron las coordenadas para la inyección del retrovirus, siempre realizadas en el hemisferio derecho. Se utilizaron tres juegos de coordenadas (tomadas desde el bregma):

- 1) inyección normal: -2 mm anteroposterior, 1.5 mm lateral y 1.9 mm ventral; se utilizó en los experimentos de inmunofluorescencia y electrofisiología. Esta inyección fue utilizada en los experimentos en los cuales se analizó el fenotipo de las neuronas Kir y de las neuronas que expresaban los RASSLs.

- 2) inyección septal: -1.9 mm anteroposterior, 1.7 mm lateral y 1.8 mm ventral, utilizada sólo en experimentos de electrofisiología. Esta inyección fue utilizada en experimentos de análisis septo-temporal.
- 3) inyección temporal: -2.4 mm anteroposterior, 2.6 mm lateral y 2.1 mm ventral, utilizada sólo en experimentos de electrofisiología. Esta inyección fue utilizada en experimentos de análisis septo-temporal.

Luego, se afinó el cráneo utilizando un taladro de odontólogo, se troqueló el hueso afinado con una aguja muy fina y se quitó el resto del cráneo con una pinza fina. Esta metodología minimiza la inflamación ya que deja intacta la dura madre y, por ende, no se daña la corteza. Se inyectó 1 μ l de retrovirus a una velocidad de 0.15 μ l/min, con un microcapilar estéril calibrado (Sigma) y estirado con un puller. La sutura de la piel del animal se realizó con cemento ultrarrápido a base de cianocrilato.

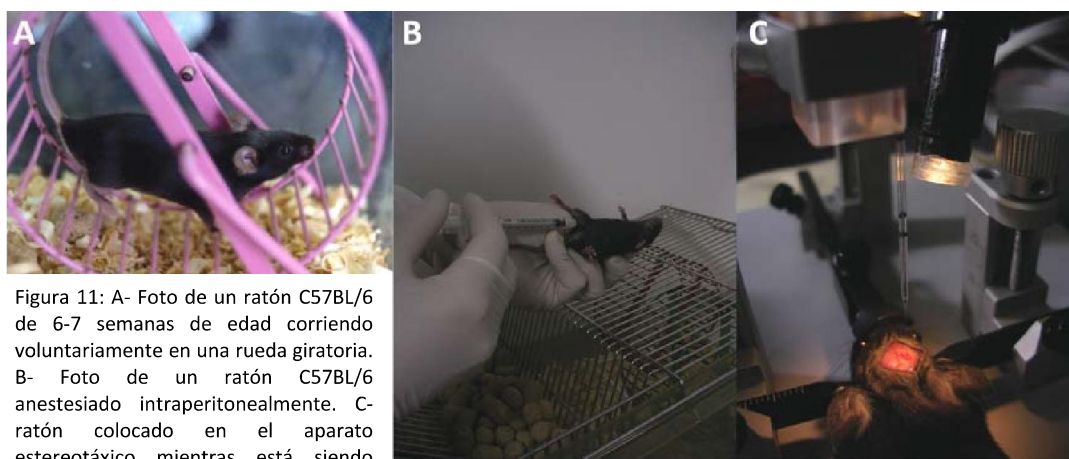


Figura 11: A- Foto de un ratón C57BL/6 de 6-7 semanas de edad corriendo voluntariamente en una rueda giratoria. B- Foto de un ratón C57BL/6 anestesiado intraperitonealmente. C- ratón colocado en el aparato estereotáxico mientras está siendo inyectado con un retrovirus en el giro dentado.

Electrofisiología

Los experimentos de electrofisiología se llevaron a cabo en rebanadas agudas de hipocampo. Se realizaron mediciones de parámetros electrofisiológicos de las DGCs nacidas en el giro dentado adulto a diferentes días luego de la inyección retroviral (dpi). Las DGCs nuevas fueron identificadas bajo microscopía de fluorescencia por la expresión de GFP o RFP, según corresponda.

Corte de rebanadas de cerebro:

Los ratones fueron anestesiados igual que para la cirugía y luego decapitados. Se removió el cerebro en una solución de disección fría burbujeada con carbógeno (95% O₂, 5% CO₂), se lo depositó sobre un papel de filtro apoyado sobre una superficie horizontal firme y fría. Se cortó por la línea media en forma sagital y se aisló el hemisferio derecho, luego se hicieron dos cortes transversales y se descartó el cerebelo y bulbo olfatorio, obteniendo así un *cubo* que contiene al hipocampo. Se hizo un corte en la parte más dorsal de la corteza para que quede plana y horizontal, debido a que ese lado es con el que se adhiere (con Suprabond gel) el tejido a la platina del vibrátomo (Leica VT1200 S). Se agregó solución de disección fría y previamente burbujeada y se realizaron cortes horizontales de 400 µm de espesor con cuchillas SuperSilver (Gillette). La velocidad de corte fue de 0,07mm/s y el ángulo de corte de 15°. Las rebanadas eran depositadas con una pipeta Pasteur en una cámara de incubación que contenía ACSF (artificial cerebrospinal fluid) burbujeada con carbógeno y mantenida a 30° C en un baño de agua. Composición de la solución de disección (mM): 2.5 KCl, 2 NaH₂PO₄, 25 NaHCO₃, 0.5 CaCl₂, 7 MgCl₂, 20 glucosa, 1.3 ascorbato de sodio, 0.6 piruvato de sodio, 110 cloruro de colina y 4 de ácido kinurénico. La solución ACSF contiene (mM): 125 NaCl, 2.5 KCl, 2 NaH₂PO₄, 25 NaHCO₃, 2 CaCl₂, 1.3 MgCl₂, 10 glucosa, 1.3 ascorbato de sodio, 3.1 piruvato de sodio, 315 mOsm.

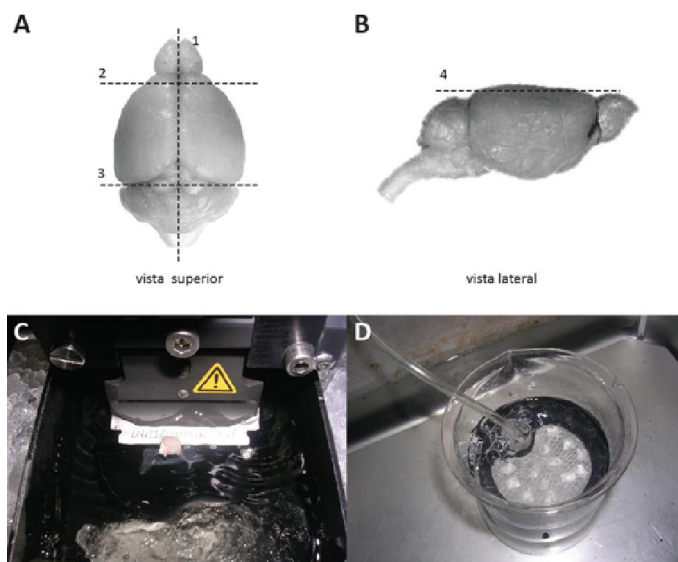


Figura 12: A- vista superior del cerebro de ratón, la línea punteada señala los cortes realizados con el bisturí previo al pegado sobre la platina del vibrátomo. Se deshecha el hemisferio izquierdo (1) y se remueve el bulbo olfatorio (2) y el cerebelo (3) B- vista lateral, se nivela la región dorsal (4) y se pega esta cara hacia abajo en la platina. C- foto del cerebro de ratón siendo cortado por la cuchilla en el vibrátomo en solución de disección burbujeada. D: Dispositivo con las secciones de 400 µm en ACSF burbujeado con carbógeno y mantenido a 30°

Registros electrofisiológicos:

Los registros fueron hechos mediante la técnica de patch clamp en configuración whole cell, a temperatura ambiente (24 ± 2 °C). Se utilizaron microelectrodos con una resistencia de entre 3 y 5 MΩ, obtenidos a partir de capilares de vidrio (Garner KG-33, diámetro interno y externo 1 y 1,5 mm respectivamente) estirados con un puller (Narishige PP-830). En el set-up de electrofisiología, las rebanadas de hipocampo fueron colocadas en la cámara de registro con un flujo de perfusión con ACSF de 2-3 ml/minuto. Las neuronas transducidas con el retrovirus fueron identificadas por su fluorescencia en un microscopio de Leica DMLFS, con un objetivo de inmersión en agua de 63X y apertura numérica (NA) de 0.9. Los registros fueron realizados con un amplificador Axopatch 200B (Molecular Devices), digitalizados mediante una tarjeta de adquisición DigiData 1322A (Molecular Devices) controlada por el software pCLAMP9. Durante los registros se adquirieron además imágenes con una cámara Hamamatsu, controlada por el software Wasabi (Nullsoft).

Los registros en voltage clamp fueron realizados, cuando no se indica lo contrario, a un potencial de membrana de -80 mV. En todos los registros excepto los de corriente GABAérgica, se utilizó en la pipeta una solución “Interna normal”. Para el registro de corrientes GABAérgicas espontáneas miniatura el potencial de membrana fijado (Vhold) en -80 mV se utilizó una solución con “Cl⁻ simétrico”, donde la concentración de Cl⁻ en la pipeta es igual que en la solución externa (ACSF). Composición de las soluciones en mM:

Interna normal: 120 gluconato de K, 20 KCl, 5 NaCl, 4 MgCl₂, 0.1 EGTA, 10 Hepes, 4 ATP, 0.3 GTP, 10 fosfocreatina-Tris (pH 7.3 y 290 mOsm).

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

Para asegurarnos de que los registros fuesen realizados en DGCs transducidas y no en neuronas vecinas se utilizaron colorantes fluorescentes en la solución de la pipeta: Alexa Fluor 594 (en células GFP⁺) o Alexa Fluor 488 (en células RFP⁺) 5 µg/ml (Invitrogen). Se analizaron las neuronas en las cuales colocalizaba la fluorescencia de la proteína reportera con la fluorescencia de la solución

interna, la corriente de fuga a -80 mV fue <100 pA y la resistencia de acceso <30 Ω M durante el experimento.

La resistencia de membrana (R_m), la resistencia de acceso (R_s) y la capacitancia (C_m) se calcularon a partir de la corriente obtenida en respuesta a pulsos hiperpolarizantes de 10 mV y 40 ms de duración en voltage clamp, y con un filtro analógico de 10 kHz y frecuencia de muestreo de 50 kHz. R_m y R_s se calcularon a partir del valor de corriente en estado estacionario y del valor pico, respectivamente. C_m se calculó a partir del área de la corriente capacitiva.

La medición de las corrientes de tipo inward rectifier (I_{Kir}) y corrientes de fuga se realizaron aplicando escalones sucesivos de a 5 mV y 100 ms de duración, desde -130 mV hasta -40 mV. Luego se realizó una curva I-V midiendo el valor de la corriente en estado estacionario y se calculó el valor de la conductancia para la componente de K^+ entrante realizando una regresión lineal con dicha curva I-V pero considerando únicamente los valores desde -130 a -90 mV. Debido a que los canales I_{Kir} son bloqueados por Mg^{++} y poliaminas cuando la corriente de potasio es saliente, el valor de la conductancia de la componente saliente refleja principalmente la conductancia de los canales de fuga de la membrana. Ese valor se calculó a partir de la curva I-V obtenida anteriormente, pero la regresión lineal fue calculada con los valores entre -60 y -40 mV (Figura 13). La conductancia de I_{Kir} se calculó restando la conductancia de fuga a la conductancia entrante.

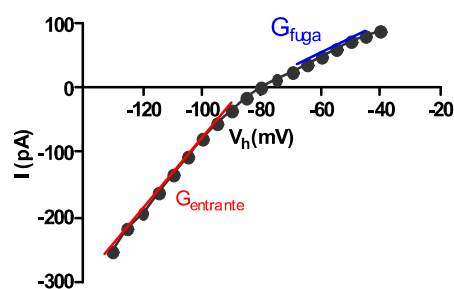


Figura 13: Ejemplo de mediciones de $G_{entrante}$ y G_{fuga} . Se muestra una curva I-V realizada en voltage clamp.

El estudio de los potenciales de acción se llevó a cabo en current clamp, la línea de base se mantuvo a -70 mV. Se aplicaron pulsos de corriente despolarizantes de intensidad creciente (cada 5 pA) y de 200 ms de duración. Se contó el número de espigas para cada escalón aplicado. Las despolarizaciones subumbrales fueron medidas en ausencia de potenciales de acción, para inyecciones de corriente de 5, 10, 15 y 20 pA.

Las corrientes postsinápticas miniatura glutamatérgicas (mEPSCs) se midieron en presencia de picrotoxina 100 μ M (antagonista específico de los receptores GABA_A), CGP55845 100 nM (antagonista de los receptores GABA_B) y tetrodotoxina 0.5 μ M (TTX, antagonista específico de los canales de sodio voltaje dependientes). Las corrientes sinápticas miniatura GABAérgicas (mIPSCs) se midieron en presencia de 4 mM de ácido kynurénico (antagonista de los receptores de glutamato NMDA y AMPA), TTX 0.5 μ M y CGP55845 100 nM. Los registros de eventos miniatura se obtuvieron con un filtro analógico de 2 kHz. Se analizaron los eventos utilizando el programa Mini Analysis (Synaptosoft), luego fueron confirmados visualmente para eliminar los artefactos y el ruido. Se midió la frecuencia y la amplitud media de la población de eventos.

Inmunofluorescencia para BrdU

Los animales de entre 6 y 7 semanas de edad fueron inyectados intraperitonealmente con 50 μ g de BrdU (análogo de timidina) por gramo de animal para marcar las células en división del giro dentado adulto. BrdU (Sigma) se disolvió en solución fisiológica (0,9% NaCl) 10 mg/ml y luego fue filtrada con un filtro 0,22 μ m antes de cada inyección. Para el estudio de sobrevivencia neuronal se aplicaron en un día 3 dosis separadas por 6 horas cada una. Se eligió este tiempo debido a que es el descripto que dura el ciclo celular de las NPCs en el giro dentado de ratones adultos (Burns & Kuan, 2005). Los animales fueron sacrificados a los 7 y 35 días posteriores a la inyección (dpi) intraperitoneal.

Perfusión, inmunofluorescencia e inmunohistoquímica

Los animales fueron anestesiados igual que para cirugía. La perfusión intracardiaca se realizó por el ventrículo izquierdo a un flujo de entre 5 y 6 ml/minuto, 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 toda la noche. Al día siguiente los cerebros fueron transvasados a un recipiente con sacarosa al 30 % en PB

0.1 M y mantenidos a 4° C hasta que descieran al fondo del recipiente. Luego se procedió al corte por micrótopo. Para ello los cerebros fueron lavados 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 Leica SM 2000R, 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 realiza la inmunofluorescencia. Ver protocolo de inmunofluorescencia en Anexo I.

Todos los anticuerpos fueron aplicados en solución de bloqueo (ver Anexo I). Los anticuerpos utilizados fueron: NeuN, anticuerpo monoclonal de ratón (dilución 1:50, FH Gage, UCSD); DCX, anticuerpo policlonal de conejo (1:750, cedido por C. Walsh, Harvard Medical School, Cambridge); GFP, anticuerpo policlonal de pollo (1:500 AVES); Calbindin D-28, anticuerpo policlonal de conejo (1:1000, Swant); calretinin, anticuerpo policlonal de conejo (1:1000, Swant); RFP, anticuerpo policlonal de conejo (1:200 Millipore); BrdU, anticuerpo monoclonal de rata (1:200, Abcam); HA anticuerpo policlonal de conejo (1:1000, Sigma); Arc, anticuerpo policlonal de conejo (1:500, Synaptic Systems). Los anticuerpos secundarios se diluyeron 1:250: anti ratón Cy5, anti conejo Cy3, anti rata Cy3, anti pollo Cy2 (Jackson ImmunoResearch).

Para el estudio de morfología del árbol dendrítico en el microscopio de dos fotones, los cerebros fueron cortados en secciones coronales de 400 µm utilizando un vibrátomo, en forma similar a la que se usó para las rebanadas agudas. Luego del corte las secciones fueron mantenidas en PFA 4% en PB 0.1 M durante una noche, lavadas, y montadas en PVA DABCO.

La inmunohistoquímica realizada para los experimentos de sobrevivencia neuronal en las regiones septal y temporal, se realizó con el protocolo anti BrdU y revelado con DAB (ver Anexo I). Se utilizaron 7 secciones, comenzando por la más septal y se tomó 1 sección cada 4 hasta llegar a un

total de 7. Para la región temporal se tomaron las secciones de la siguiente manera: la sección más temporal fue la primera y de ahí se tomó 1 sección cada 4, se tomaron un total de 7 secciones. Ver el protocolo de inmunohistoquímica anti BrdU en el Anexo I.

Microscopía óptica, confocal, de dos fotones y análisis de imágenes

Los estudios se realizaron utilizando secciones coronales de la región septal (-0.9 a -1.9 del Bregma) o temporal (-2.7 a -3.88 del Bregma) o secciones a lo largo de todo el hipocampo dependiendo de los experimentos. Los límites de las coordenadas septales y temporales se definieron con las coordenadas dispuestas en el atlas del cerebro de ratón de Paxinos & Franklin. El conteo de células BrdU⁺ reveladas con DAB, se realizó con un microscopio óptico Leica DM LS2, objetivo 100X, NA de 1.25, inmersión en aceite, y las imágenes se adquirieron con un microscopio Zeiss Axiovert. Las imágenes de inmunofluorescencia se adquirieron utilizando un microscopio confocal Zeiss LSM 510 Meta o Zeiss LSM Pascal (Zeiss, Jena, Alemania), excepto las tomadas para medir el árbol dendrítico total en secciones de 400 μ m, que fueron adquiridas con un microscopio multifotón Zeiss LSM 710 NLO.

Las imágenes de inmunofluorescencia adquiridas para el análisis de colocación se tomaron a lo largo del eje Z de cada neurona GFP⁺ en planos ópticos únicos de un espesor de 0,7 a 1 μ m para los diferentes fluoróforos, aumento digital de 1 o 2, objetivo 40x, NA de 1.2 y la inmersión en agua. Se definió como DGC positiva para un cierto marcador aquella que colocaba con dicho marcador en al menos la mitad de todos los planos que abarcaban el soma en el eje Z. En el análisis se incluyeron las células GFP⁺ localizadas en la SGZ (espesor de 10 μ m) y en toda la GCL.

Para el análisis de morfología de árbol dendrítico en rodajas de 60 μ m se utilizó un objetivo 40x, de NA 1.3, inmersión en aceite y el aumento digital varió entre 0.7 y 1. Se realizó un stack (una pila de los planos ópticos obtenidos) a lo largo del eje Z y fue proyectada sobre el plano XY, esta proyección fue la que se utilizó para las mediciones morfológicas del árbol dendrítico total. Se reconstruyeron los planos en tres dimensiones, se realizó un set de 16 proyecciones panorámicas en

los ejes X-Y a diferentes ángulos del stack. Los Z-stacks involucraron diferentes cantidades de planos ópticos (1 μm de espesor cada uno) de acuerdo al volumen del árbol dendrítico de la neurona analizada.

Para el conteo de espinas dendríticas, las imágenes fueron adquiridas con un objetivo de 63X, NA 1.4 de inmersión en aceite, se tomaron de 40 a 200 planos en el eje Z a intervalos de a 0.1 μm . Luego se realizó una proyección en un solo plano (XY). En esta proyección se identificó manualmente cada espina, incluyendo todas aquellas que estuvieran dentro de los 2 μm de distancia de la dendrita. Los fragmentos de dendrita que se tomaron para hacer la medición se encontraban dentro de capa molecular medial y tenían al menos 50 μm de longitud (Piatti *et al.*, 2011). Todas las imágenes se analizaron utilizando el software Zeiss LSM Image Browser.

Las imágenes tomadas con el microscopio multifotón LSM 710 NLO fueron adquiridas con un objetivo de 20X, acercamiento variable entre 0.7 y 1, con una NA de 1.0 y de inmersión en agua. Se utilizó el láser pulsado Chameleon Ultra II (Coherent). Se tomaron entre 200 y 400 planos ópticos a intervalos de 1 μm . El árbol dendrítico fue medido manualmente sobre las proyecciones sobre el plano XY del z-stack. Para la adquisición y análisis de imágenes se utilizó el software ZEN 2009 (Zeiss).

Análisis estadístico

Todos los datos de la presente tesis fueron analizados estadísticamente utilizando los programas GraphPad Prism 5 o Infostat (Universidad de Córdoba). Las comparaciones entre neuronas de la región septal o temporal de un mismo animal se realizaron con un análisis pareado. Cuando los datos cumplían con la normalidad (distribución de Gauss e igualdad de varianza), se realizaron t-test de dos colas o ANOVA, con post-hoc test de Bonferroni. En los casos en que no se cumplía la normalidad, los datos fueron transformados mediante diferentes funciones, según lo indicado (para lograr la normalidad). En aquellos casos donde no fuese posible aplicar una transformación para lograr normalidad en las distribuciones, se utilizaron tests no paramétricos de la

siguiente manera: Mann-Whitney para comparaciones independientes, Wilcoxon para comparaciones pareadas, y Kruskal Wallis seguido de Dunn o Conover para comparaciones múltiples.

Resultados

Primera Parte - Desarrollo de las DGCs generadas a lo largo del eje septo-temporal del hipocampo adulto

Objetivos y diseño experimental

En la primera parte de la tesis el objetivo fue evaluar si la actividad eléctrica del circuito modula o afecta la velocidad de maduración de las neuronas nuevas nacidas en el giro dentado adulto.

Trabajos previos han demostrado que la GCL posee un gradiente septo-temporal en cuanto a la actividad eléctrica medida por Arc (Piatti *et al.*, 2011). También se ha demostrado que un aumento en el grado de actividad eléctrica patológica (convulsiones) del giro dentado adulto afecta la maduración de las DGCs nuevas. Para determinar si la velocidad de maduración es modulada por los niveles de actividad eléctrica basal del microambiente en condiciones fisiológicas, se llevaron a cabo los siguientes experimentos:

1) Se investigó si la tasa de maduración de las DGCs varía en las regiones septal versus temporal del hipocampo, y si dicha variación se correlaciona con el grado de actividad de los circuitos neuronales locales. Para identificar las neuronas nuevas en tejido vivo y fijado, se utilizó un retrovirus que codifica a la proteína fluorescente verde (GFP) y es capaz de integrarse únicamente en el genoma de células en división (Van Praag *et al.*, 2002). Dicho retrovirus fue inyectado en el giro dentado de ratones C57BL/6 de 6-7 semanas de edad mediante una inyección estereotáxica en la región septal, medial o temporal. La expresión de GFP permitió identificar inequívocamente a las neuronas nacidas en el giro dentado adulto tanto en tejido vivo como fijado, y fue posible estimar la edad neuronal de acuerdo al tiempo transcurrido después de la inyección (dpi) (Espósito *et al.*, 2005). Las propiedades electrofisiológicas de las neuronas GFP⁺ identificadas bajo microscopio de fluorescencia fueron medidas mediante la técnica de patch clamp en configuración whole-cell en

rebanadas agudas de hipocampo de 400 μm de espesor de la región septal o temporal. Con el fin de establecer el curso temporal del desarrollo funcional se midieron las propiedades eléctricas de neuronas GFP⁺ desde 14 a 42 dpi. Como parámetro de madurez se utilizó la resistencia de membrana (R_m), que es una medida de la densidad de canales en la membrana plasmática. También se estudió la colocalización con Calbindin, un marcador neuronal de expresión tardía (presente en las DGCs maduras). Estos últimos experimentos se realizaron en colaboración con V. Piatti y M. Trinchero.

2) Se analizó la arborización dendrítica de las DGCs nuevas a los 21 dpi, en la región septal y temporal. Se eligió esta edad debido a que es la edad en la cual se encontró la mayor diferencia septo-temporal en el grado de desarrollo neuronal.

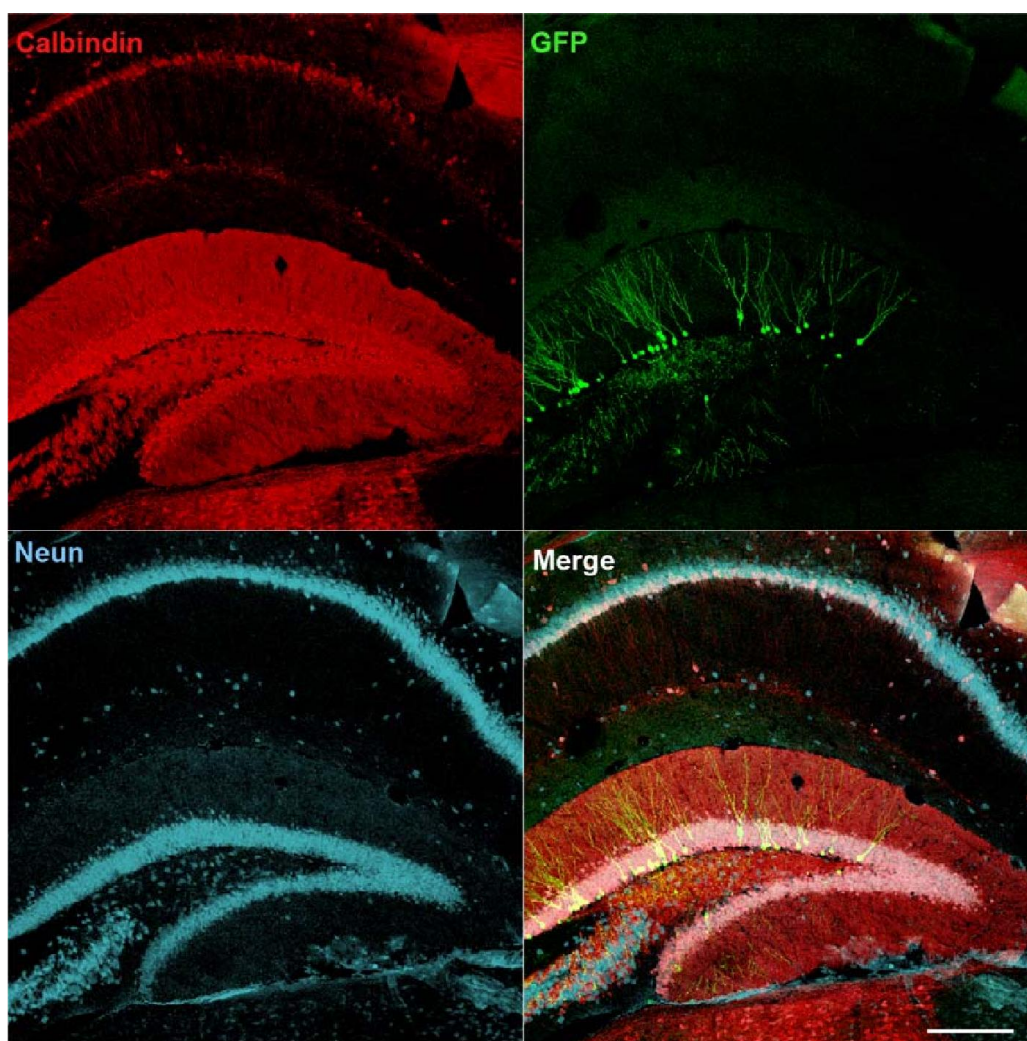
3) Se estudió si los cambios en la actividad eléctrica del nicho neurogénico pueden afectar la tasa de maduración neuronal. Estos experimentos fueron realizados en colaboración con V. Piatti.

4) Se investigó si diferencias en la actividad del nicho neurogénico afectan la supervivencia de las DGCs nuevas.

Variación de la velocidad de maduración neuronal a lo largo del eje septo-temporal en el giro dentado adulto

La mayor actividad basal en el circuito, se encontró en la región septal del giro dentado (observado como una mayor densidad de DGCs que expresan Arc, figura 10), esta observación nos llevó a investigar si el grado de actividad local podría influir la velocidad de maduración neuronal. Para ello se inyectó un retrovirus que expresa GFP y se analizó el grado de madurez en DGCs localizadas en el giro dentado septal y dorsal a diferentes tiempos. Para analizar el grado de madurez de las neuronas, inicialmente se hizo un estudio de colocalización por microscopía confocal con el marcador de madurez Calbindin. En la figura 14 se puede observar en las imágenes de la parte superior la señal de Calbindin (rojo), GFP (verde), NeuN (celeste, un factor de transcripción que se expresa en ciertos tipos neuronales), y por último la superposición de todas las anteriores. El estudio se llevó a cabo analizando la colocalización de neuronas GFP⁺ con Calbindin en ambas regiones

septal (S) y temporal (T) de un mismo ratón a lo largo del desarrollo neuronal, 14, 21, 28 y 56 dpi. El análisis estadístico se realizó con un ANOVA de dos vías, el cual dio como resultado la máxima diferencia de colocación a los 21 dpi, como se observa en la figura 14 gráfico inferior. Los estudios de expresión de Cb indican que las DGCs de la región septal y temporal del giro dentado muestran una expresión máxima a los 28 dpi, lo cual sugeriría que las neuronas habrían alcanzado su nivel de madurez completa. Sin embargo, este análisis sólo evalúa la presencia o ausencia de un marcador en forma “todo o nada”, pero no permite establecer posibles diferencias cuantitativas en cuanto al grado de madurez. Por otra parte no hay evidencias sólidas respecto al estadio de desarrollo preciso donde comienza a expresarse Cb. Estos experimentos se llevaron a cabo en colaboración con V. Piatti y M. Trincherio.



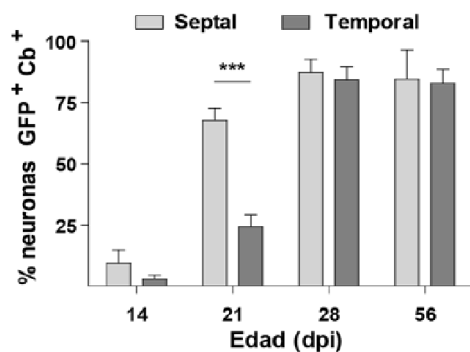


Figura 14: superior: Imágenes de una inmunofluorescencia triple en una sección septal, las neuronas transducidas tienen 21 dpi. Escala 200 μ m. Gráfico Inferior: Cuantificación del porcentaje de neuronas GFP⁺ que colocalizan con Calbindin a diferentes dpi en las diferentes regiones analizadas, $n=4$ ratones y 257 neuronas (14 dpi), 8 ratones y 444 neuronas (21 dpi), 5 ratones y 279 neuronas (28 dpi), 4 ratones y 183 neuronas (56 dpi). *** indica $p=0.001$, ANOVA con test Bonferroni's *post hoc*.

Por estos motivos se decidió ampliar el espectro de parámetros para evaluar este problema en forma cuantitativa. Se estudió entonces R_m , que depende principalmente de la cantidad de canales de K^+ en la membrana plasmática. Neuronas más maduras expresan una mayor densidad de canales y, por lo tanto, R_m disminuye (Espósito *et al.*, 2005). Se midió R_m a 14, 21, 28 y 42 dpi utilizando registros en configuración whole cell de la técnica de voltage clamp. Se inyectaron pulsos hiperpolarizantes y se midió la corriente evocada al estado estacionario. En la parte A de la figura 15 se muestran registros representativos de neuronas a diferentes edades en la región septal y temporal. Las neuronas de 14 dpi mostraron propiedades altamente inmaduras tanto en la región septal como temporal ($R_m = 4.49 \pm 0.54$ G Ω vs. 3.88 ± 0.48 G Ω). Una semana más tarde se encontró una fuerte diferencia, en consonancia con los resultados observados por expresión de Cb: $R_m = 0.63 \pm 0.93$ G Ω vs. 1.90 ± 0.42 G Ω , con $p < 0.001$. Esto indica un grado de maduración más avanzado en las DGCs de la región septal (figura 15.A, B). Notablemente y en contraposición a los resultados observados con Cb, los valores de R_m a los 28 dpi todavía mostraron diferencias entre regiones: $R_m = 0.67 \pm 0.07$ G Ω vs. 1.40 ± 0.23 G Ω , aunque esta diferencia no es estadísticamente significativa. A los 42 dpi la R_m fue de 0.39 ± 0.04 G Ω y 0.44 ± 0.08 G Ω en la región septal y temporal respectivamente. Estos resultados indicaron que a lo largo del desarrollo neuronal R_m disminuyó a mayor velocidad en la región septal respecto de la temporal, es decir la velocidad de maduración fue mayor en la región septal. A los 21 dpi la diferencia fue máxima (menor R_m en la región septal) y siguió la tendencia hacia los 28 dpi, ya a la edad de 42 dpi alcanzó el mismo valor en ambas regiones reflejando que llegaron a un mismo grado de madurez.

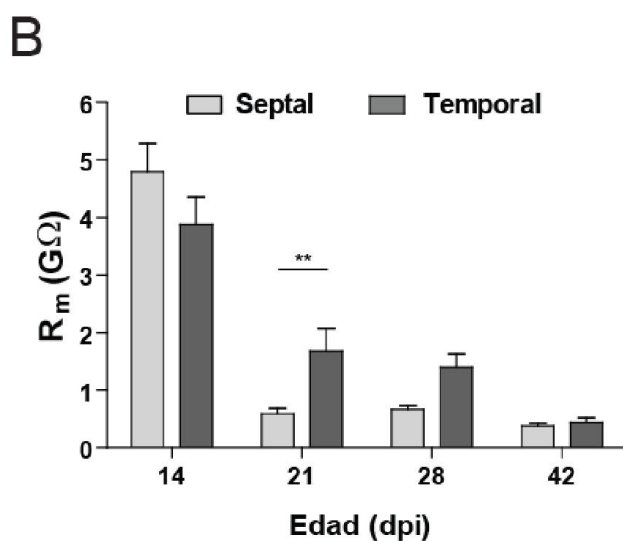
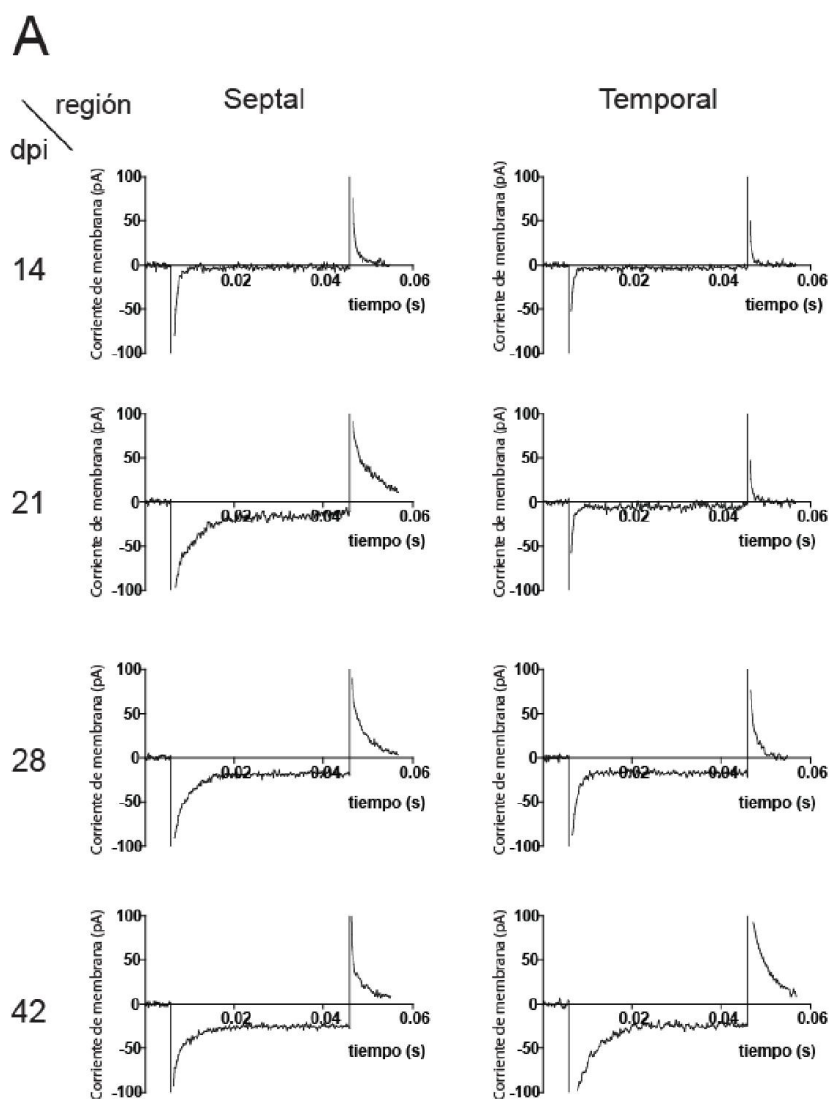


Figura 15 A: Registros representativos de neuronas a diferentes edades y regiones, de los cuales se calculó R_m . B: Cuantificación de la medición de R_m de neuronas GFP⁺ en la región septal y temporal a diferentes dpi; 14 dpi: septal n=14, temporal n=13; 21 dpi: septal n=25, temporal n=24; 28 dpi: septal n=19, temporal n=16; 42 dpi septal n=6, temporal n=9. El análisis estadístico se llevó a cabo con un ANOVA de 2 vías. Bonferroni post-test. En todos los casos la barra muestra la media $\pm$ ES.

Las mediciones de R_m y colocación con Cb reflejaron diferencias en la velocidad de desarrollo de las poblaciones neuronales, siendo más rápida la velocidad de desarrollo de las neuronas nuevas en la región septal, lo cual coincide con un mayor nivel de actividad basal de la GCL. Ambas poblaciones de neuronas llegaron al mismo nivel de madurez a los 42 dpi (medición de R_m), mientras que a los 21 dpi se observó la máxima diferencia en ambas mediciones (R_m y Cb).

Los valores de R_m y colocación con Cb reflejan una diferencia en la tasa de maduración entre la región septal y la temporal, esta diferencia también debería observarse en los parámetros morfológicos. Para ello se estudió la longitud del árbol dendrítico total a los 21 dpi en ambas regiones, la cuantificación se dificulta debido a la disposición del árbol dendrítico de las DGCs a lo largo de la capa molecular. Las dendritas proyectan perpendicularmente a la GCL y en forma de cono, con lo cual en los cortes coronales de 60 μm de espesor las dendritas de una neurona de la región septal se observan enteras, en cambio cuando avanzamos hacia la región temporal el giro dentado comienza a curvarse y los cortes ya no son perpendiculares al eje septo-temporal por lo que los árboles dendríticos de las neuronas en esta región se observan cortados. Para obtener neuronas con árboles dendríticos relativamente completos en secciones de cerebro se debió realizar cortes de gran espesor (400 μm) y en forma transversal al eje del hipocampo, lo cual no se consigue con los típicos cortes coronales u horizontales debido a la curvatura del hipocampo. Este análisis debió ser realizado con un microscopio de dos fotones que permitió obtener imágenes con buena penetración del haz confocal debido a su longitud de onda en el rango infrarrojo y el bajo background de fluorescencia que emite el tejido con este tipo de tecnología. En la figura 16 se muestran ejemplos de reconstrucciones de z-stacks en el plano XY de una neurona en la región septal y una de la región temporal. Se midieron 9 neuronas de 21 dpi de la región septal y 12 neuronas de la región temporal. La longitud observada fue de $891 \pm 73 \mu\text{m}$ y $395 \pm 63 \mu\text{m}$ (media $\pm$ ES), respectivamente. De esta manera se afirmó la diferencia en la madurez encontrada en ambas regiones a la edad de 21 dpi (Figura 16), la cual se vio reflejada también en este parámetro, confirmando así que las neuronas en la región septal maduran a mayor velocidad que en la región temporal en ratones sedentarios.

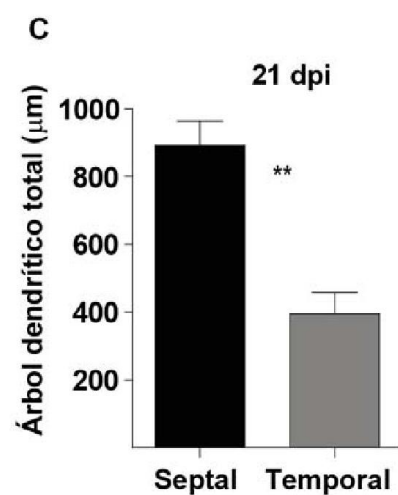
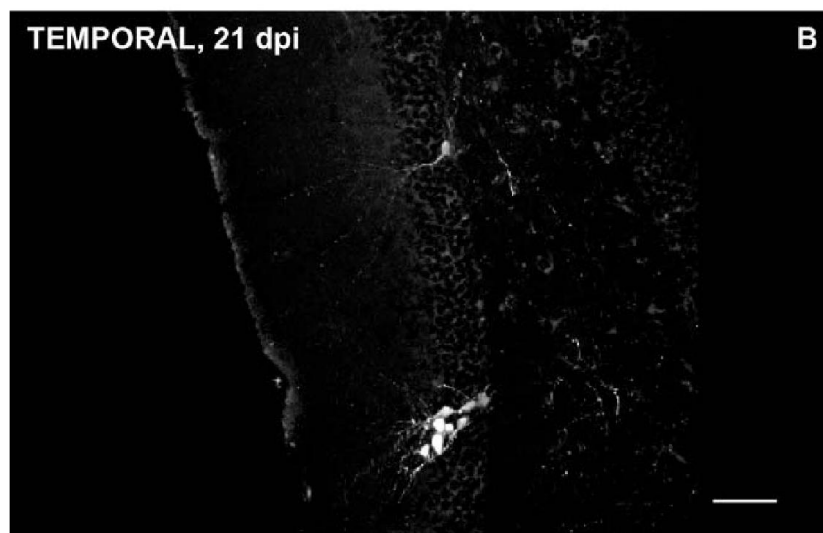
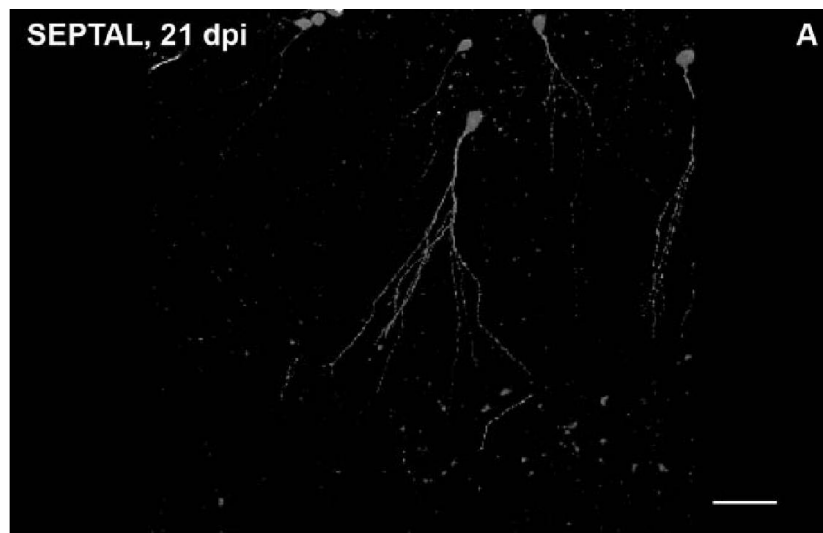


Figura 16: Ejemplos de morfología de neuronas de 21 dpi GFP⁺ de la región septal (superior) y de la región temporal (inferior), proyecciones de entre 100 y 150 planos ópticos. Escala: 50 μm . C- Cuantificación del árbol dendrítico de neuronas GFP⁺ de 21 dpi de la región septal n=7 y temporal n= 12. ** p= 0.0015. Se muestra el promedio $\pm$ ES. Se realizó Mann-Whitney test.

Modulación de la actividad neuronal en la región temporal por actividad física y su efecto en el desarrollo de las DGCs nuevas

Para investigar el efecto de la actividad neuronal del ambiente local a la tasa de maduración neuronal, buscamos un estímulo fisiológico que module la actividad del circuito hipocampal. La actividad de la red hipocampal está acoplada a la locomoción (Vanderwolf, 1969; Foster *et al.*, 1989). Por lo tanto, la tasa de disparo aumenta con la velocidad del ejercicio a lo largo del eje longitudinal del hipocampo. (Czurkó *et al.*, 1999; Maurer *et al.*, 2005). Exploramos entonces el efecto de correr en los niveles basales de actividad de la GCL.

Se midió la actividad basal de la GCL en grupos de ratones corredores, en estas condiciones los ratones corren aproximadamente 3 kilómetros por noche (resultados no publicados y Allen *et al.*, 2001). Se realizó la cuantificación de Arc al igual que en la figura 10 de la introducción y se encontró que en estas condiciones la actividad basal en la región septal se mantiene constante, pero en la región temporal tiene un aumento sustancial (~150%) y es igual a la de la región septal (Figura 17.A), estos experimentos fueron llevados a cabo por V. Piatti y M. Trincherro. Comparando estos resultados con los de la figura 10.C se observó que la actividad basal en la región septal de ratones corredores no aumenta respecto de la misma en ratones sedentarios. En los experimentos descriptos en las figuras anteriores la actividad basal de la GCL correlaciona con el grado de madurez

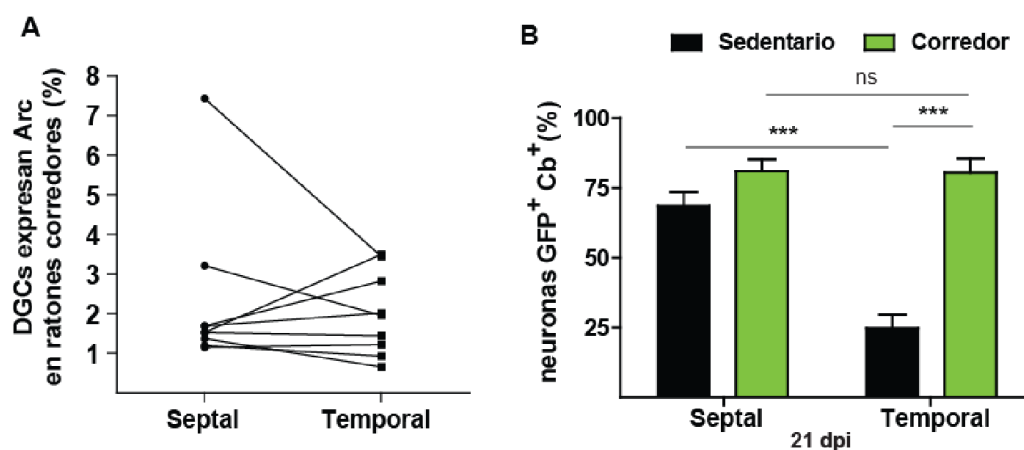


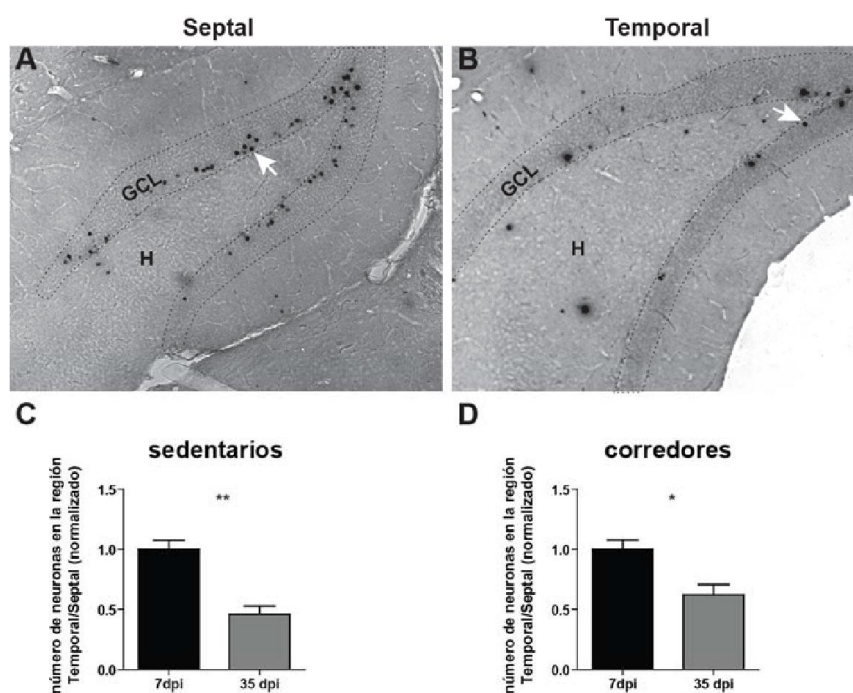
Figura 17: A- Cuantificación de la densidad de neuronas Arc⁺ en porcentaje de neuronas totales contadas en cada región de un mismo cerebro, ratones de 10 semanas de edad corredores. Se realizó un test pareado y no se encontró diferencias significativas p=0.73 test Wilcoxon, n= 9 ratones. B- Cuantificación de neuronas GFP⁺ de 21 dpi que colocalizan con Calbindin, los datos de ratones sedentarios son los mismos que en la figura 12 se analizaron 462 neuronas de 8 ratones.

de las neuronas nuevas a lo largo del eje septo-temporal siendo la máxima diferencia a los 21 dpi. Dado que los ratones corredores muestran un aumento de actividad basal solamente en la región temporal de la GCL, se decidió analizar la maduración de las neuronas nuevas a 21 dpi en estas condiciones. Para ello se midió la colocalización de las DGCs GFP⁺ de 21 dpi con Cb (Figura 17.B). Contrariamente a lo descripto en animales sedentarios, se encontró que no existen diferencias en los porcentajes de colocalización entre las DGCs de la región septal y temporal en ratones corredores a los 21 dpi, indicando que las neuronas aceleran la velocidad de maduración en la región temporal debido a la actividad física. Este incremento en la velocidad de maduración se correlaciona con el aumento en la actividad del circuito medido como mayor densidad de neuronas que expresan Arc en la GCL.

Diferencias en la sobrevida neuronal en la región septal versus temporal en ratones sedentarios y corredores

Con el objetivo de analizar si la sobrevida neuronal es afectada por la actividad basal del circuito, se estudió la sobrevida neuronal en la región septal versus la región temporal en ratones sedentarios y en ratones corredores. Se realizaron experimentos de marcado con BrdU de las neuronas nuevas en ratones de entre 6 y 7 semanas de edad. El revelado de BrdU se realizó con DAB para facilitar el análisis posterior. Se analizaron 7 secciones septales y 7 secciones temporales de cada ratón, tomadas 1 en 4, la primera sección que se tomó en la región septal es donde comienza el giro dentado, de la región temporal es donde termina el giro dentado. Se hizo el muestreo de esta manera de modo de estandarizar el área analizada entre ratones, así se recolectaron las mismas secciones en cada ratón y se pudo realizar un análisis independiente del área. Se contaron las neuronas en la región septal y en la temporal de cada ratón (en las 7 secciones de cada uno) y se calculó el cociente entre el número de neuronas septales y temporales. Se analizaron dos edades neuronales 7 dpi y 35 dpi, de dos grupos: ratones sedentarios y corredores. En las figuras 18.A y 18.B se muestran micrografías de una sección septal (A) y una sección temporal (B) de una

inmunohistoquímica anti BrdU revelada con DAB, de un ratón sedentario. El gráfico 18.C muestra que las neuronas nuevas sobreviven menos en la región temporal que en la región septal, a los 35 dpi se observa una reducción de un 54 % respecto de 7 dpi, $p = 0.0036$ (test no paramétrico de Mann Whitney). En ratones corredores se observó una reducción levemente menor, de un 33 %, $p=0.012$ t-test (figura 18.D), pero significativa. Estos resultados indican que el aumento de la actividad en el nicho neurogénico (debido a la actividad física) no favorece la supervivencia neuronal en la región temporal debido a que la diferencia a 35 dpi no es significativa si comparamos la supervivencia de las neuronas a esta edad en los ratones sedentarios vs los ratones corredores, t-test $p = 0,09$ ns. La actividad eléctrica del circuito no modula la supervivencia de las neuronas nuevas en la región temporal del hipocampo adulto, pero si la maduración.



Una neurona que nace en un ambiente se desarrolla a una velocidad y tiene una probabilidad de sobrevivir. Una neurona que se desarrolla en un ambiente eléctricamente más activo, aumenta su velocidad de maduración y tiene la misma probabilidad de supervivencia que aquella que se desarrolla en un ambiente eléctricamente menos activo. Qué sucede entonces con una neurona que se

desarrolla en un ambiente eléctricamente activo pero su velocidad de maduración está disminuida?

Esta pregunta se responderá en la siguiente parte de esta tesis.

Segunda Parte- Modificación de la actividad intrínseca y su efecto en las DGCs nacidas en el hipocampo adulto

Objetivo y diseño experimental

En la segunda parte de la presente tesis el objetivo fue disminuir la excitabilidad intrínseca de las neuronas, de modo de tratar de silenciarlas eléctricamente y sin modificar el ambiente que las rodea, para luego analizar su desarrollo y conectividad. Para ello se utilizó un retrovirus modificado que expresaba un canal de rectificación entrante de potasio Kir2.1.

Debido a que la actividad eléctrica de las regiones septales y temporales correlaciona con la tasa de maduración, el efecto en la velocidad de maduración podría ser debido a la actividad eléctrica, pero no podemos descartar otras propiedades del nicho neurogénico o la posibilidad de que existan diferencias en las células progenitoras neurales. Entonces nos propusimos caracterizar el efecto de alteraciones en la excitabilidad intrínseca en el desarrollo neuronal y conectividad de manera de célula autónoma. La estrategia elegida se basó en reducir la excitabilidad para disminuir la actividad despolarizante (sub o supraumbral) de las DGCs nuevas durante su desarrollo, de esta manera tratar de silenciarlas eléctricamente. Para ello se redujo la R_m a través de la sobreexpresión de un canal de K^+ de rectificación entrante (Kir2.1) utilizando vectores retrovirales (Burrone *et al*, 2002; Cancedda *et al*, 2007). También se utilizó como control de especificidad un mutante del canal que no conduce K^+ (Kir2.1_{NC}).

Para determinar los efectos de la disminución de la actividad eléctrica intrínseca en el desarrollo neuronal:

- 1) Se modificó el genoma retroviral utilizado hasta el momento para expresar Kir y Kir_{NC} (mutado). Se logró identificar las neuronas que expresaban el canal por la fluorescencia de la proteína reportera GFP o RFP en tejido fijado y vivo.
- 2) Se analizó el grado en que la expresión de Kir2.1 altera la excitabilidad de las DGCs nuevas.

- 3) Se estudió el desarrollo de las DGCs que expresan Kir2.1 desde el punto de vista morfológico y desde el funcional.
- 4) Se analizó la sobrevivencia de las DGCs nuevas con excitabilidad reducida a lo largo de su desarrollo.

Clonado de Kir2.1 mutado (Kir_{NC})

Si bien la expresión de Kir2.1 se utilizó como herramienta para reducir la excitabilidad neuronal, la expresión de una proteína de membrana podría además producir alteraciones inespecíficas en el desarrollo neuronal. Por ello se generó un canal Kir2.1 con un poro no conductivo, para utilizarlo como control de sobreexpresión de una proteína similar que no alteraría la excitabilidad neuronal. Se realizó una mutagénesis sitio dirigida para cambiar los aminoácidos glicina₁₄₄, tirosina₁₄₅, glicina₁₄₆ (GYG) por tres alaninas (AAA) de Kir2.1 de ratón. Los tres aminoácidos GYG son esenciales para la conductividad del poro. Estudios previos demostraron que el mutante AAA efectivamente no conduce (Burrone *et al.*, 2002). Luego, el canal mutado fue clonado en el vector que contenía el genoma viral. La mutagénesis sitio dirigido fue hecha por PCR como se describió en el Anexo I. En la figura 19 se esquematizan los pasos realizados. En primer lugar se realizaron dos PCRs con primers modificados que contenían la secuencia de nucleótidos cambiada para que se generaran las mutaciones puntuales. Estas dos PCRs se utilizaron como molde para que el canal contenga la mutación anteriormente descrita, luego se realizó la PCR solapada u “*overlapped*” como se muestra en la figura 19. La PCR fue ligada al vector TOPO Zero Blunt, luego se lo digirió con BamH1, para extraer el Kir_{NC} y ligarlo al vector que contenía anteriormente al Kir2.1-IRES-RFP. Lo mismo fue realizado para construir el genoma retroviral CAG-Kir_{NC}-IRES-GFP, figura 19 parte derecha. Dado que los canales Kir son heterotetrámeros que requieren cuatro subunidades funcionales, Kir_{NC} podría eventualmente actuar como dominante negativo, titulando los canales Kir endógenos y así aumentar la excitabilidad neuronal, debido a la disminución en la conductancia de K⁺.

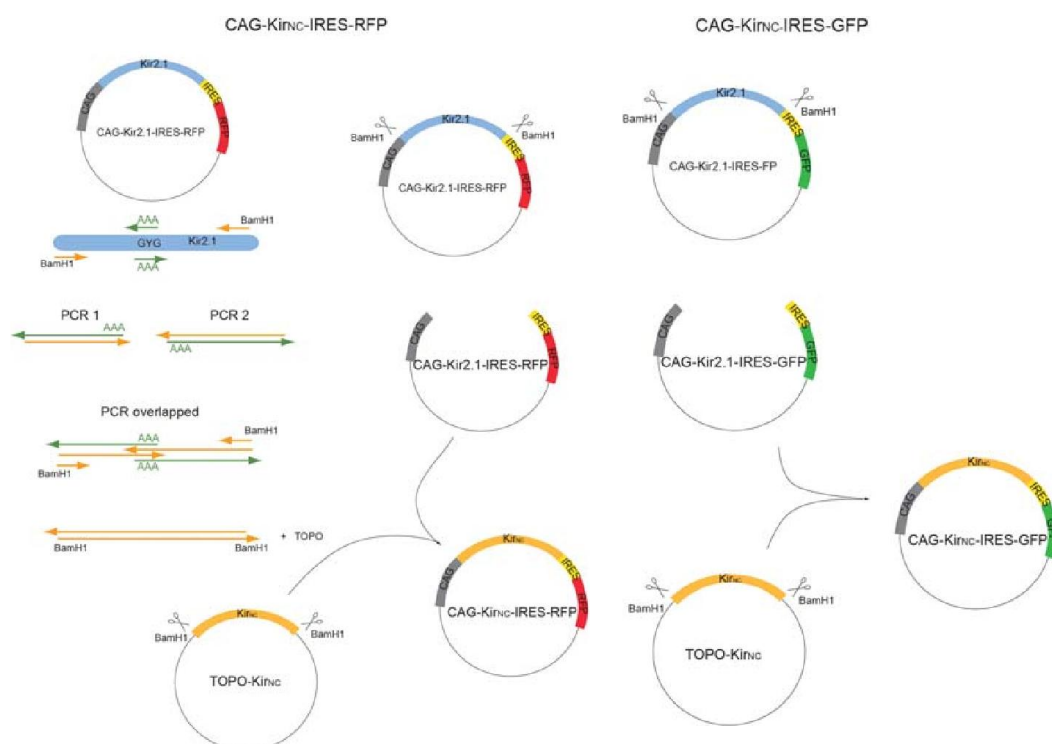


Figura 19: En la parte izquierda se esquematizó la secuencia de PCR que se realizó, en la parte media y derecha se muestran gráficamente las digestiones y ligaciones que se efectuaron para construir los genomas retrovirales.

Expresión de Kir2.1 y Kir2.1_{NC} in vivo

Para evaluar si las construcciones virales eran funcionales in vivo se inyectó el virus CAG-Kir2.1-IRES-GFP (Kir-GFP) o el CAG-Kir_{NC}-IRES-GFP (Kir_{NC}-GFP) en el giro dentado adulto. Los ratones fueron mantenidos en jaulas que en su interior contenían ruedas giratorias con el fin de aumentar la neurogénesis y lograr una mayor infectividad retroviral (en general, insertos grandes tienden a reducir la eficiencia del título viral). Luego de tres semanas post inyección se midieron los niveles de rectificación entrante de las DGCs transducidas con los diferentes virus: Kir-GFP, GFP o RFP como controles negativos, y Kir_{NC}-GFP como control de especificidad. En la figura 20.A se muestran ejemplos de las corrientes obtenidas en registros de voltage clamp en neuronas expresando los diferentes virus. El trazo celeste corresponde a una neurona que expresa Kir2.1, donde se observa claramente el aumento de la corriente a valores hiperpolarizados respecto de las DGCs control

(trazo negro), lo cual está también representado en las curvas I-V de la figura 20.B. En las curvas se distinguen dos pendientes, aquella en los potenciales más despolarizados representa la conductancia de pérdida; la pendiente observada en los potenciales hiperpolarizados representa la suma de la conductancia de los canales de fuga (o pérdida) más la conductancia de K^+ de rectificación entrante. Se encontró que a los 21 dpi las DGCs que sobreexpresan Kir muestran una conductancia entrante (g_{kir}) alrededor del triple que los controles (figura 20.C). En forma consistente, se observó una disminución en la R_m en las neuronas Kir2.1, lo cual es también el reflejo de una reducción en la excitabilidad intrínseca, figura 20.D. En cambio, las neuronas que expresan Kir_{NC} mostraron una reducción en g_{kir} significativa y un aumento marcado en R_m , lo cual indica que el canal estaría funcionando como dominante negativo, reduciendo la corriente Kir endógena. Por último, la sobreexpresión de Kir produjo una hiperpolarización en V_m , llevándola hacia valores más cercanos al potencial de equilibrio de K^+ (aproximadamente -105 mV), Figura 20.E, nótese que Kir_{NC} mostró una tendencia opuesto (que no es estadísticamente significativa), de acuerdo a un posible efecto de dominante negativo. Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de Kir es una herramienta adecuada para reducir la excitabilidad neuronal en las DGCs nuevas.

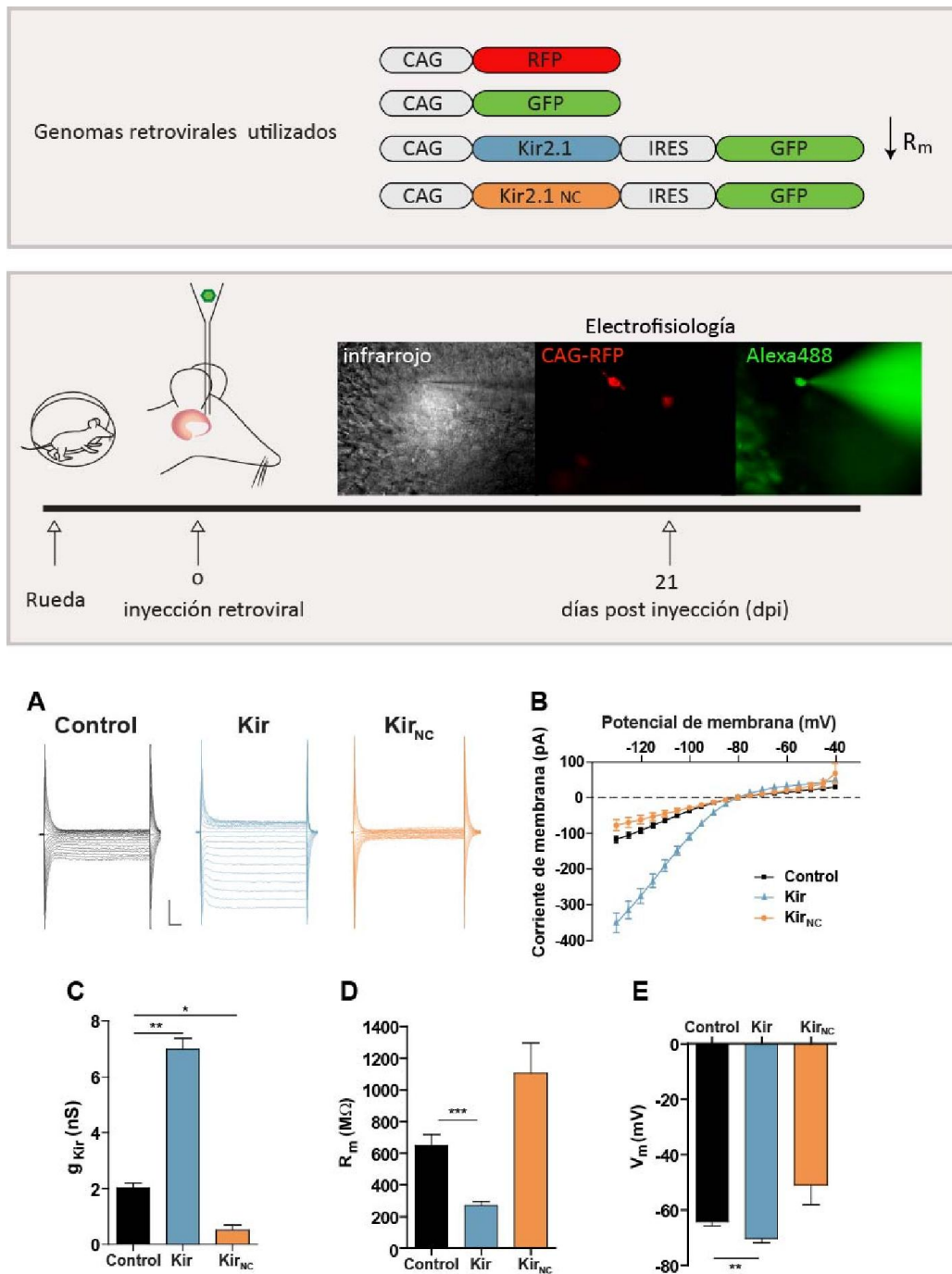


Figura 20: En el recuadro superior se esquematizan los genomas virales inyectados en esta sección experimental. Abajo se muestra una línea temporal con el diseño experimental de expresión *in vivo* de Kir2.1 y sus controles. A la derecha se muestran micrografías de infrarrojo (donde se ve la pipeta de patch) y de fluorescencia. En rojo se muestra una DGC de 21 dpi que expresa RFP, en verde el colorante utilizado para corroborar que la neurona correcta fue registrada. A- Escalones de voltaje (5mV, 100 ms) desde -130 a -40 mV; Escalas: 100 pA, 10 ms. B- Curva I-V generada a partir de los datos de A n= 12 (control), 12 (Kir) y 16 (Kir_{NC}). C- Promedio de los valores de g_{Kir} . Los valores de conductancia fueron obtenidos a partir de la curva I-V desde -130 mV a -90 mV. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Kruskal Wallis y post-hoc Dunn). D y E- Promedio de resistencia de membrana y potencial de reposo, n=22 (control), 29 (Kir) y 17 (Kir_{NC}) ** $p < 0.001$ y $p < 0.0001$, Kruskal Wallis seguido de un post test de Dunn.

Efecto de Kir2.1 en la excitabilidad neuronal

Luego de lograr una alta expresión del canal Kir2.1 en las neuronas nuevas (un aumento de casi tres veces de la conductancia de K^+ , (figura 20.C), se analizó si esta corriente puede afectar la excitabilidad neuronal en términos de actividad despolarizante. Nos propusimos investigar qué ocurría con las depolarizaciones subumbrales en las neuronas transducidas con los diferentes virus (control, Kir y Kir_{NC}). Las despolarizaciones subumbrales y supraumbrales de las neuronas están relacionadas con la elevación de calcio intracelular, con el remodelado de cromatina, segundos mensajeros y regulación transcripcional (revisado por Wiegert *et al.*, 2010). Se observó que las neuronas Kir tienen una menor despolarización de su membrana a valores subumbrales comparadas con las neuronas controles (CAG-GFP o CAG-Kir_{NC}) indicando que tiene afectada su excitabilidad de membrana en respuesta a pequeñas inyecciones de corriente, Figura 21.D. También estudiamos lo que ocurría en estas neuronas con la actividad neuronal medida como potenciales de acción (PA). Para ello se midió la frecuencia de disparo de PA en respuesta a inyecciones sucesivas de corrientes despolarizantes supraumbrales de la membrana en las DGCs de 21 dpi expresando GFP, Kir y Kir_{NC}. No se observó diferencias significativas entre los tipos neuronales y su despolarización de membrana supraumbral, como muestra en la figura 21.H. En el gráfico se evidenció que la curva que representa a las neuronas Kir tiene un leve corrimiento hacia la derecha respecto de las neuronas control y de las Kir_{NC}. Este desplazamiento demuestra que una neurona Kir dispara su primer potencial de acción a una mayor corriente inyectada que las neuronas controles. Si bien el efecto de Kir en el disparo de PA a 21 dpi es muy sutil, el desplazamiento de la curva hacia la derecha es mayor en neuronas de 28 y 35 dpi (resultados previos Tesis Doctoral de S. Espósito), esto indicaría que a medida que las neuronas maduran el efecto de Kir es mayor. Estos resultados indican que las neuronas que sobreexpresan Kir a los 21 dpi estarían respondiendo con las mismas características que los controles si tienen la misma aferencia supraumbral pero no responden de igual modo ante despolarizaciones subumbrales. Este “silenciamiento” subumbral podría ser el responsable de efectos en el desarrollo de las neuronas nuevas que sobreexpresan Kir.

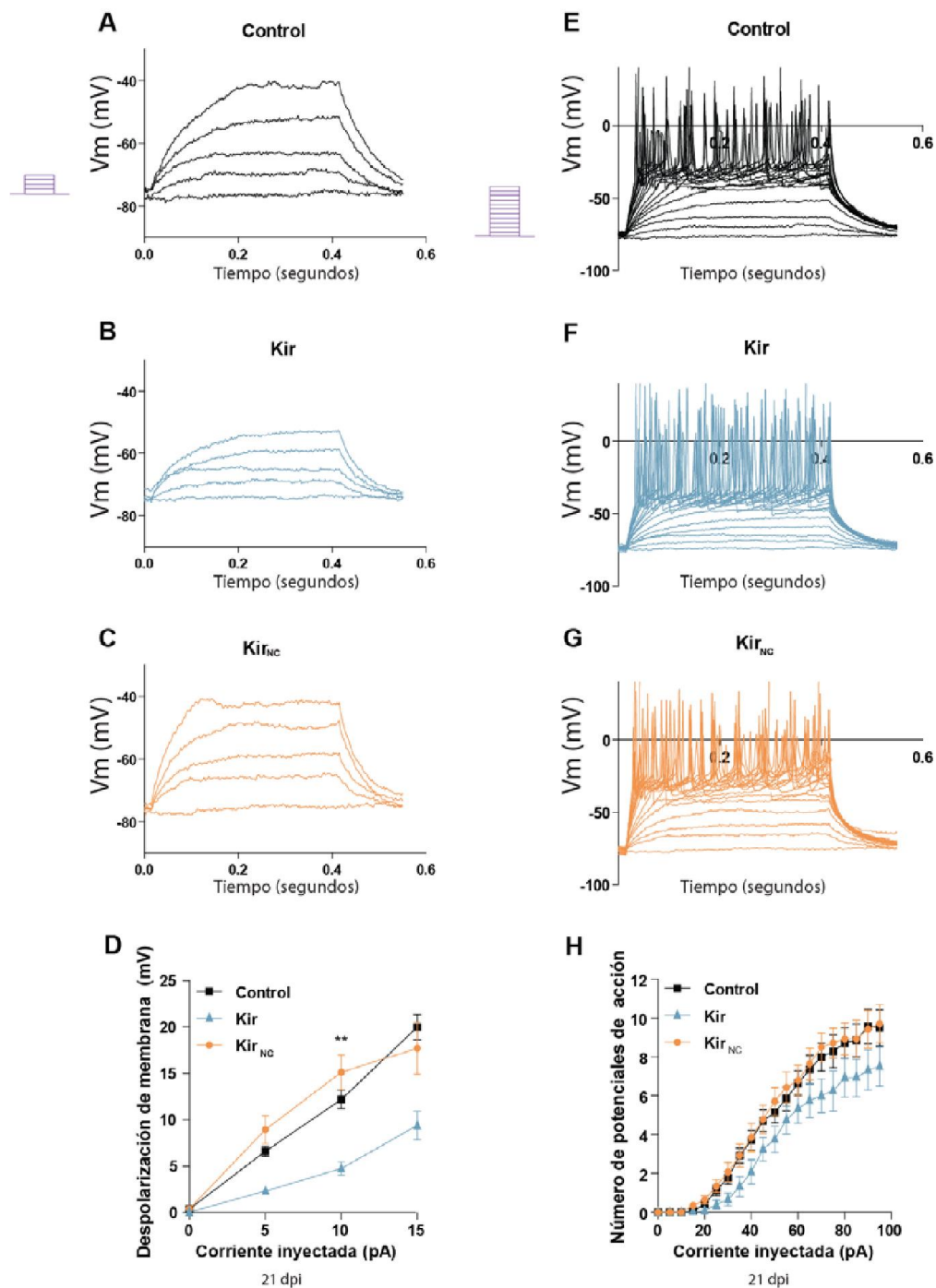


Figura 21: Disminución de la excitabilidad debido a la expresión de Kir2.1. Parte superior izquierda: en violeta protocolo de escalones de corriente despolarizantes, (5 pA, 400 ms de duración, 20 escalones en total). A, B y C: Trazos representativos en current clamp de una neurona de 21 dpi control (negro), kir (celeste) Kir_{NC} (naranja) a las cuales se les aplicó el protocolo. D- Cuantificación en current clamp de la respuesta supraumbra (potenciales de acción) a los escalones de corriente despolarizante inyectada, el número de neuronas analizadas fue de 14 (control), 12 (Kir) y 14 (Kir_{NC}). E, F y G: primeros 5 escalones depolarizantes de los trazos en A, B y C, con una escala diferente para observar la diferencia en voltaje entre los diferentes tratamientos. H- Análisis en current clamp de las despolarizaciones de membrana subumbral (V_m mantenido entre -70 y -80 mV) en respuesta a los escalones de corriente inyectados, el número de neuronas analizado para cada caso fue de n=19 (control), 14 (Kir) y 14 (Kir_{NC}). Para lograr la normalidad los datos fueron transformados con la función logaritmo natural. ** $p < 0.01$ ANOVA de dos vías con post test de Bonferroni. Todos los datos representan la media $\pm$ ES.

Efecto de Kir2.1 en el desarrollo neuronal: aspectos morfológicos

Se estudió el impacto de la reducción de la actividad neuronal (sobreexpresión de Kir) en el árbol dendrítico de DGCs de 21 y 35 dpi. Inicialmente, el análisis del árbol dendrítico de las neuronas Kir⁺, mostró ciertas dificultades debidas a la baja expresión de la proteína reportera en el retrovirus Kir-GFP. En esta construcción, GFP se sitúa río abajo de la secuencia IRES, y por lo tanto presenta niveles de traducción menores a aquellas construcciones en las que el gen reportero flanquea directamente al promotor (CAG-GFP). Los niveles de fluorescencia así obtenidos son insuficientes para realizar microscopía confocal de calidad adecuada para la observación del árbol dendrítico, aunque permiten identificar el soma de las DGCs transducidas. Para resolver este problema las DGCs nuevas fueron co-transducidas con Kir-GFP y otro retrovirus expresando RFP, de tal forma de poder estudiar la morfología de aquellas neuronas RFP⁺ que mostraran colocalización de rojo y verde (Kir) en el soma, figura 22.A y 22.B. Se midió el árbol dendrítico de neuronas control y Kir. Se encontró que las neuronas que sobreexpresan Kir tienen el árbol dendrítico significativamente reducido a los 21 y a los 35 dpi. Estas neuronas también poseen menor cantidad de ramificaciones en sus árboles dendríticos a los 35 dpi, lo cual muestra una menor complejidad en el árbol. La reducción del desarrollo del árbol dendrítico es un indicio que la maduración neuronal está retrasada. Para confirmar que las neuronas tenían reducido su árbol dendrítico, se decidió analizar la capacitancia (Cm) de las neuronas a diferentes edades.

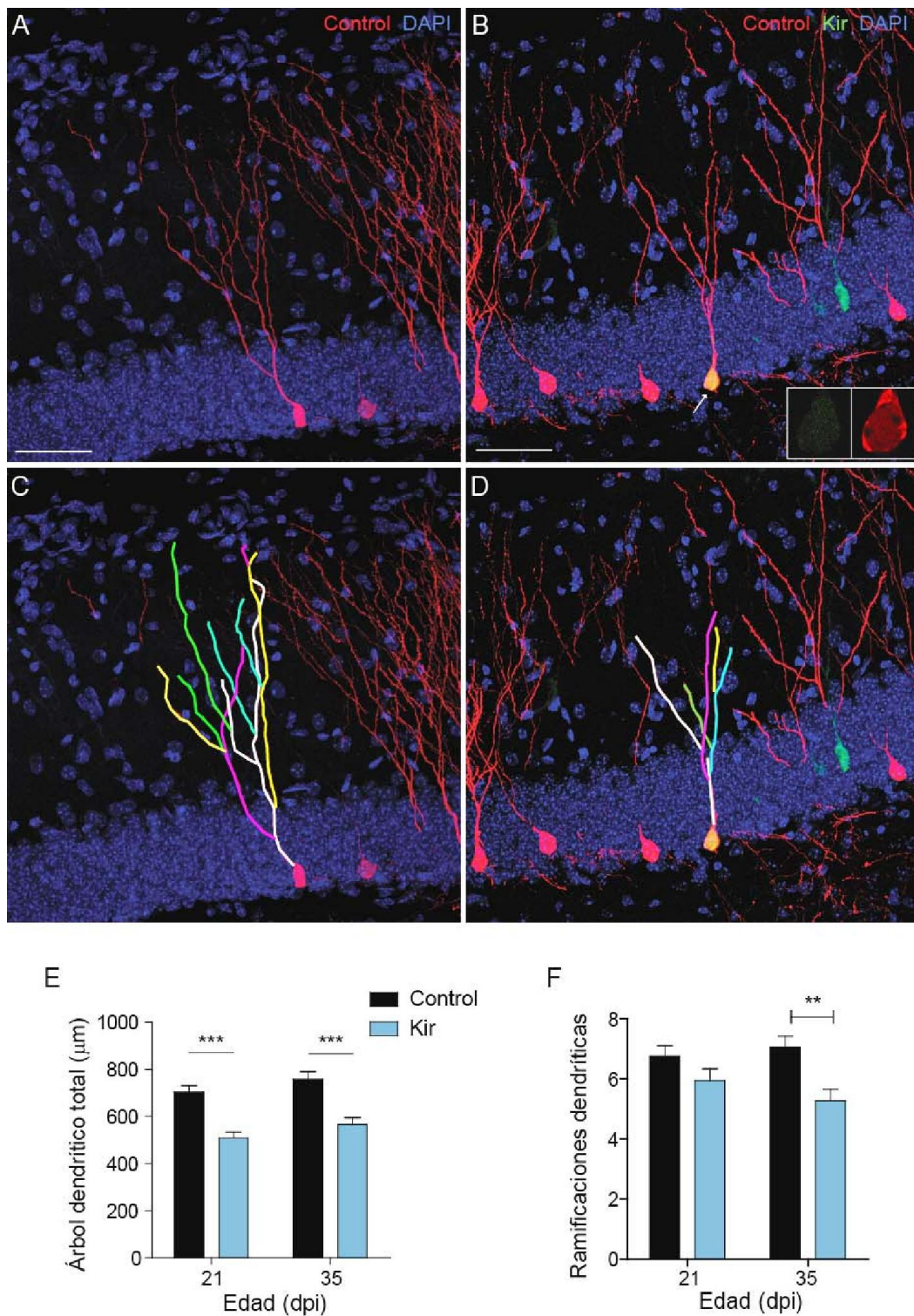


Figura 22: La reducción de la excitabilidad en la morfología neuronal de las DGC nacidas en el adulto A y B- Neuronas de 21 dpi expresando el reportero fluorescente solo (RFP, rojo) o coinfectada con Kir (GFP, verde). DAPI (azul fue utilizado para marcar la GCL). Escala 50 μm . En la figura B en la parte inferior se observa un acercamiento de un plano confocal simple de los canales rojo y verde por separado, son de la neurona que está señalada con la flecha. C y D – Ejemplos de mediciones de los árboles dendríticos, en colores se observa cada uno de los fragmentos de dendrita analizados. E- Cuantificación de la longitud total de los árboles dendríticos de neuronas a diferentes edades en secciones de 60 μm de espesor. *** $p < 0.001$ ANOVA de dos vías con Bonferroni post test. N= 14-20 neuronas obtenidas de 5 a 8 ratones. F- Cuantificación de las ramificaciones que posee cada árbol dendrítico. ** $p < 0.01$ ANOVA de dos vías con Bonferroni post test. N= 14-20 neuronas obtenidas de 5 a 8 ratones. Las barras representan media $\pm$ ES.

Cm es proporcional al área de la membrana neuronal. Por lo tanto, si las DGCs que expresan Kir son mas pequeñas esto debería también reflejarse en el valor de Cm. Registros electrofisiológicos revelaron que las DGCs que sobreexpresan Kir muestran valores reducidos de Cm a los 21 y 35 dpi comparados con las DGCs que expresan GFP/RFP o Kir_{NC} (figura 23). Cabe destacar que los valores de Cm de las neuronas que expresan Kir_{NC} y GFP son similares, lo cual indica que el efecto de Kir sobre la morfología es específico de la reducción de excitabilidad y no se debe a la sobreexpresión del canal en la membrana. La reducción observada en el área de membrana de las neuronas Kir (como la medida de la capacitancia) es coincidente con la reducción de la longitud del árbol dendrítico observada a 21 y 35 dpi (Figura 22.E), estos experimentos indican que existe un retraso en la maduración de las neuronas que sobreexpresan Kir2.1.

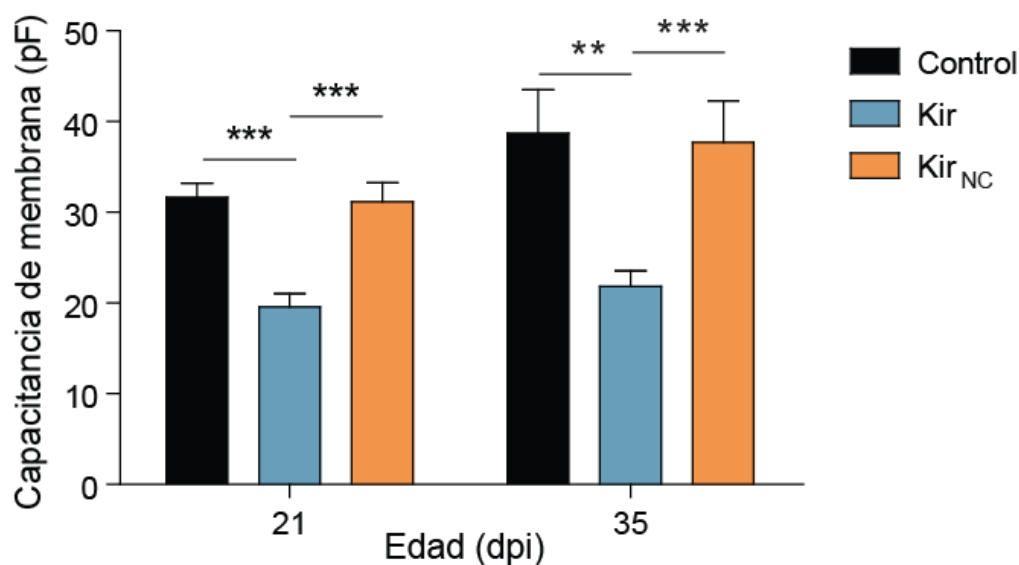


Figura 23: Medición de la capacitancia (Cm) en voltage clamp de neuronas de 21 y 35 dpi que sobreexpresan GFP, Kir2.1 o Kir_{NC}. Debido a la expresión de Kir indujo una reducción significativa de Cm, pero no así con GFP o Kir_{NC}. Los datos de 35 dpi fueron transformados con la función log para que logren normalidad. **p<0.01, ***p<0.001 ANOVA de dos vías con psot test de Bonferroni, n (nro de neuronas de al menos 3 animales diferentes)= 42 (21 dpi, control), 41 (21 dpi Kir), 17 (21 dpi Kir_{NC}), 15 (35 dpi, control), 15 (35 dpi, Kir_{NC}) y 11 (35 dpi, Kir_{NC}). Las barras representan media ±SEM.

Efecto de Kir2.1 en el desarrollo neuronal: expresión de marcadores

Se estudió el efecto de la disminución de la actividad eléctrica intrínseca en el fenotipo neuronal. Estos experimentos fueron llevados a cabo en ratones corredores para ecualizar el nivel de

actividad basal al nivel máximo en la región septal y en la temporal. Se estudió la colocación de neuronas que expresan GFP, Kir o Kir_{NC} con diferentes marcadores neuronales a lo largo de su desarrollo. Los marcadores utilizados para este análisis fueron: Calbindin (indica madurez neuronal) o Doublecortin o Calretinin (inmadurez neuronal). Estos marcadores se expresan a diferentes edades de las neuronas en desarrollo, lo cual nos permite trazar ventanas de crecimiento y medir la velocidad de desarrollo de una neurona que nace en el adulto. Con este estudio pudimos determinar la velocidad de maduración de las neuronas nuevas que se desarrollan con una menor actividad intrínseca.

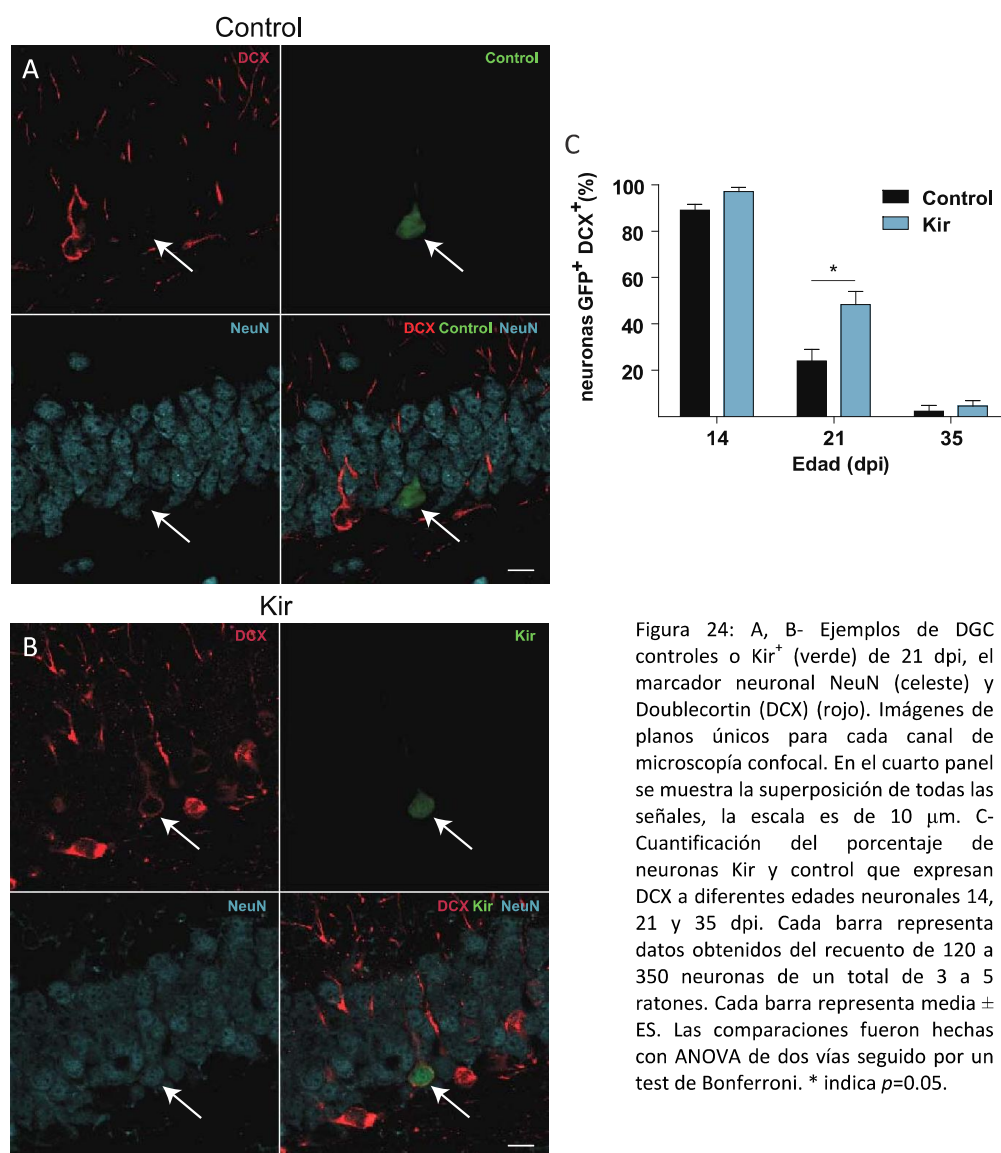


Figura 24: A, B- Ejemplos de DGC controles o Kir⁺ (verde) de 21 dpi, el marcador neuronal NeuN (celeste) y Doublecortin (DCX) (rojo). Imágenes de planos únicos para cada canal de microscopía confocal. En el cuarto panel se muestra la superposición de todas las señales, la escala es de 10 μ m. C- Cuantificación del porcentaje de neuronas Kir y control que expresan DCX a diferentes edades neuronales 14, 21 y 35 dpi. Cada barra representa datos obtenidos del recuento de 120 a 350 neuronas de un total de 3 a 5 ratones. Cada barra representa media $\pm$ ES. Las comparaciones fueron hechas con ANOVA de dos vías seguido por un test de Bonferroni. * indica $p=0.05$.

Se encontró que el grado de colocalización de doublecortin con las neuronas que expresan Kir2.1 es casi el doble que el de neuronas controles a los 21 dpi (figura 24.C). A los 14 dpi y 35 dpi la diferencia entre las neuronas control y las Kir no fue significativa mostrando que este retraso en la expresión de DCX es temporario y que luego las neuronas Kir continúan desarrollándose.

Se estudió luego el patrón de expresión a lo largo del tiempo de Calbindin (Cb).

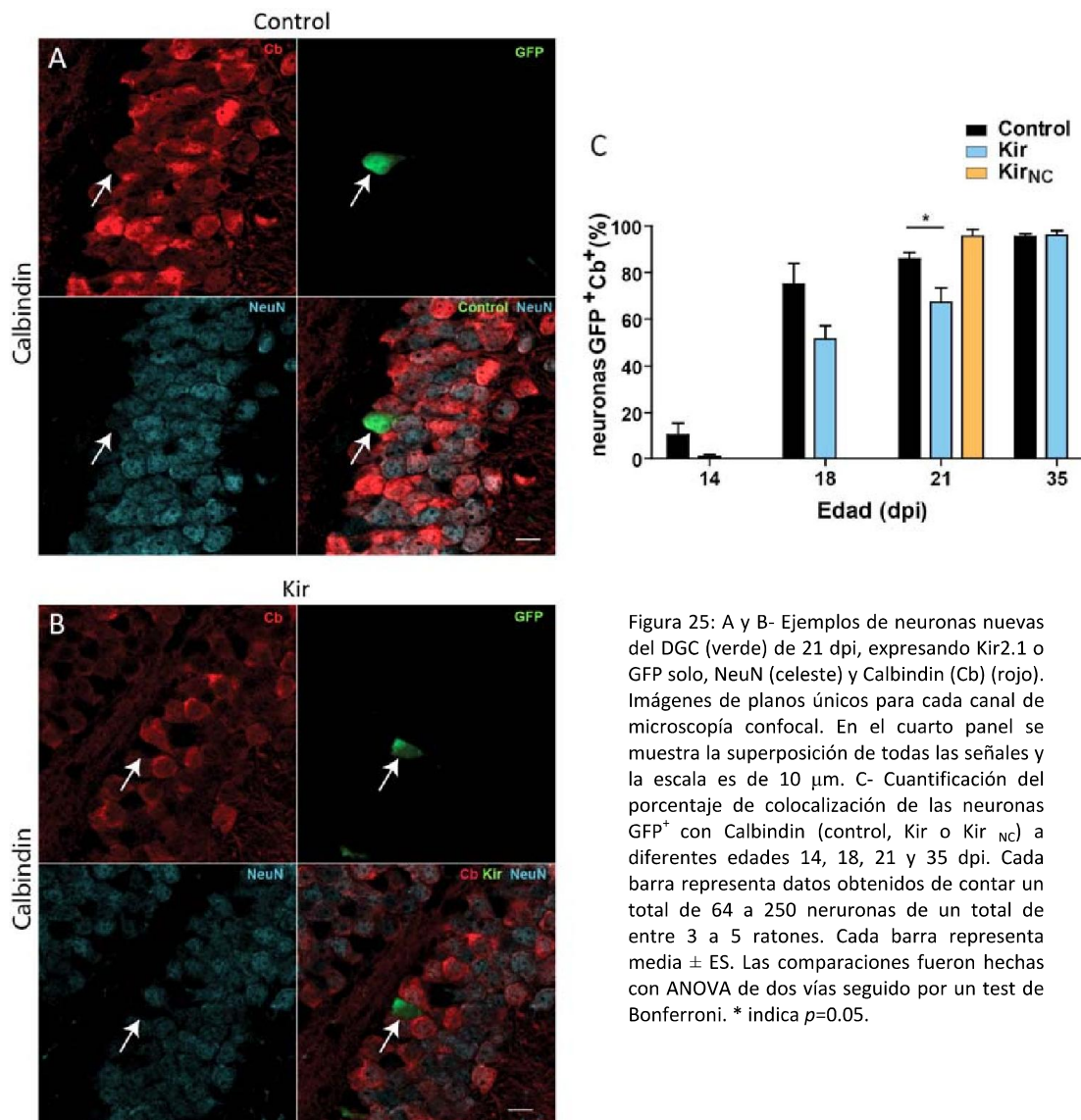


Figura 25: A y B- Ejemplos de neuronas nuevas del DGC (verde) de 21 dpi, expresando Kir2.1 o GFP solo, NeuN (celeste) y Calbindin (Cb) (rojo). Imágenes de planos únicos para cada canal de microscopía confocal. En el cuarto panel se muestra la superposición de todas las señales y la escala es de 10 μ m. C- Cuantificación del porcentaje de colocalización de las neuronas GFP⁺ con Calbindin (control, Kir o Kir_{NC}) a diferentes edades 14, 18, 21 y 35 dpi. Cada barra representa datos obtenidos de contar un total de 64 a 250 neuronas de un total de entre 3 a 5 ratones. Cada barra representa media $\pm$ ES. Las comparaciones fueron hechas con ANOVA de dos vías seguido por un test de Bonferroni. * indica $p=0.05$.

Se analizó la expresión de Cb en las neuronas que sobreexpresan Kir 2.1 y se observó que estas poseían niveles reducidos de la expresión de Cb comparada con sus pares que solo expresan GFP o

Kir_{NC} a los 21 dpi. Notablemente, las neuronas que sobreexpresan Kir_{NC} se comportan como las neuronas que solo expresan GFP (figura 25.C), lo cual indica que el defecto en el fenotipo inducido por Kir es específico de la reducción de la excitabilidad. A los 35 dpi DCX estaba ausente y la expresión de Cb fue máxima en neuronas Kir y controles, lo cual sugiere que las neuronas Kir han alcanzado el patrón de expresión de madurez en un ambiente activo eléctricamente.

También se analizó la expresión de Calretinin en las neuronas que sobreexpresan Kir en la figura 26, panel A se muestra una fotografía de microscopía confocal panorámica de una sección, en rojo la marca de calretinin, se aprecia la marca de este marcador en la zona subgranular donde se

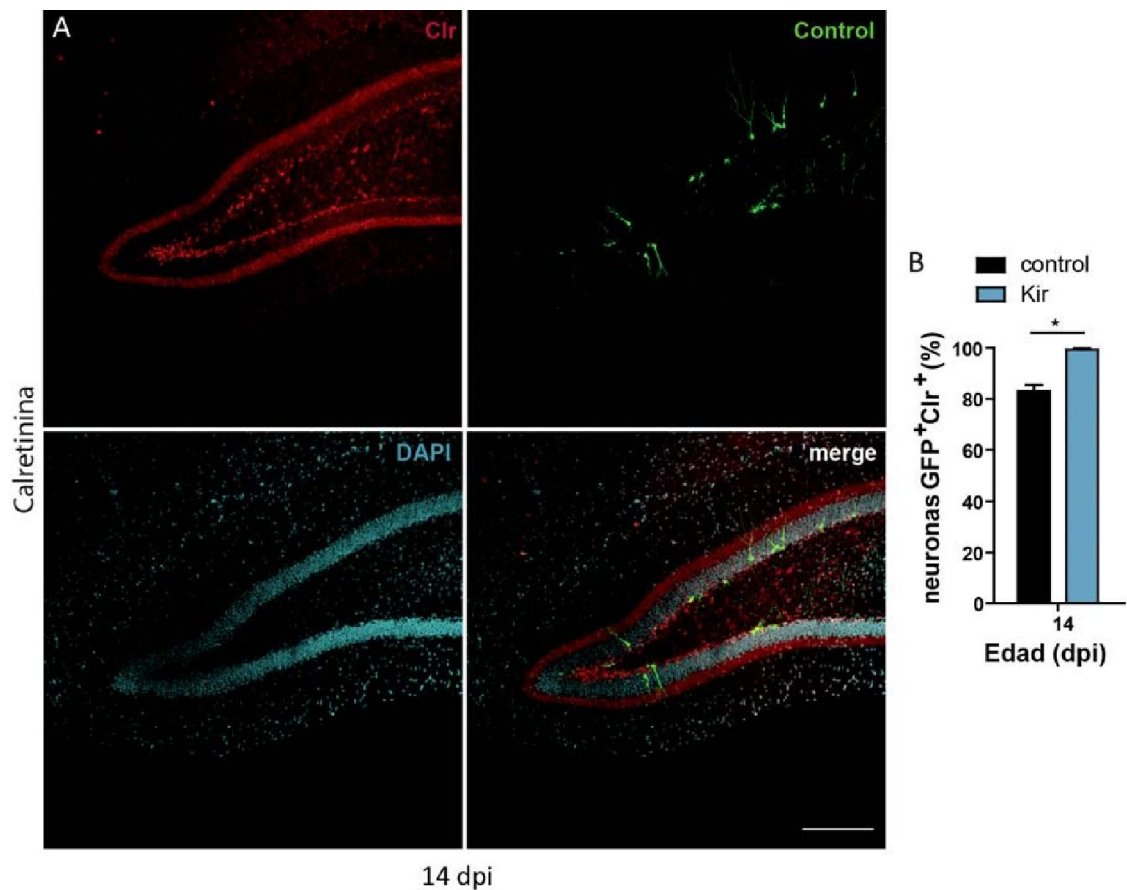


Figura 26: A – Proyección de planos confocales panorámicos de una inmunofluorescencia para calretinin, en verde se muestra neuronas controles de 14 dpi. En azul el marcador de ADN, DAPI. Escala: 100 μ m. B- Cuantificación del porcentaje de colocación de las neuronas control o Kir de 14 dpi. Por cada barra se contaron de 102 a 238 neuronas de 3 ratones. T-test * $p < 0.05$

ubican las neuronas inmaduras y también en el primer tercio interior de la GCL, en verde neuronas de 14 dpi transducidas con el virus control, en azul DAPI y en el cuarto panel la superposición de las señales anteriormente mencionadas. Se cuantificó el porcentaje de colocación de neuronas

controles y neuronas Kir a los 14 dpi y se obtuvieron los valores mostrados en la figura 26.B. Este parámetro también coincide con los anteriores y demuestra que las neuronas que expresan Kir poseen un menor grado de madurez a los 14 dpi comparada con las neuronas que solo expresan GFP.

Todos los resultados expuestos en esta sección indican que las neuronas Kir, aquellas neuronas que presentan la excitabilidad disminuida, poseen un retraso en la maduración debido a que colocalizan en mayor medida con marcadores de inmadurez y en menor porcentaje con marcadores de madurez neuronal a lo largo de su desarrollo. A los 35 dpi la diferencia ya no es visible debido a que llegan al máximo o al mínimo de expresión dependiendo del marcador que estemos observando. La actividad intrínseca sería entonces un factor esencial para una eficaz velocidad de desarrollo de las DGCs nacidas en el adulto.

Efecto de Kir2.1 en el desarrollo neuronal: aspectos funcionales

Luego de demostrar que las neuronas nuevas que expresan Kir2.1 poseen una menor velocidad de maduración que las neuronas controles (GFP o Kir_{NC}) y que poseen un árbol dendrítico más reducido aún a los 35 dpi y esta característica es mantenida en el tiempo, estudiamos si la disminución en la longitud del árbol dendrítico se ve reflejada en la integración funcional. Para hacer este estudio se realizaron experimentos de patch clamp en configuración whole cell y se midió las corrientes miniaturas excitatorias e inhibitorias. Se analizó la frecuencia y la amplitud de eventos. Las neuronas que expresaban Kir mostraron una menor frecuencia de mEPSCs y mIPSC que las neuronas controles, con pequeñas diferencias en la amplitud. Esto refleja una limitada conectividad aferente, como se muestra en la figura 27.

La diferencia observada en cuanto a la amplitud de los mEPSCs a los 21 dpi, podría deberse a que los receptores glutamatérgicos están concentrados en mayor medida en los pocos contactos excitatorios funcionales o aunque muy poco probable también podría significar que las vesículas presinápticas contienen mayor cantidad de moléculas de glutamato. A los 35 dpi la amplitud ya no

fue significativamente mayor pero sí lo siguió siendo la frecuencia de mEPSC, lo cual significa que las neuronas Kir siguen teniendo menor aferencia excitatoria que sus pares controles (Figura 27.B). Al medir los mIPSCs a los 35 dpi se encontró que las neuronas Kir poseen una menor cantidad de contactos GABAérgicos debido a la disminución en la frecuencia (Figura 27.C). Esto tal vez se deba a un balance homeostático a nivel de célula autónoma entre la excitación y la inhibición.

Dado que las neuronas Kir muestran una menor frecuencia de mEPSC y las espinas dendríticas son el lugar donde se forman las sinapsis glutamatérgicas, decidimos investigar si las neuronas Kir poseían una menor cantidad de espinas dendríticas. Para ello medimos la densidad de espinas de neuronas Kir y control de 21 y 35 dpi de dendritas que se ubican en la capa molecular medial. No encontramos diferencias entre las neuronas Kir y control a los 21 y 35 dpi (Figura 27.F), indicando que la formación de espinas no fue afectada. La disminución en la frecuencia de mEPSC en las neuronas Kir se podría explicar entonces a que el número total de espinas dendríticas es menor, ya que si uno multiplica la densidad de espinas por la longitud del árbol dendrítico se podría contabilizar el número total de espinas. Las neuronas Kir poseen una longitud de árbol dendrítico menor a 21 y 35 dpi (Figura 22.E) e igual densidad de espinas que la control, de esta manera obtenemos que el número total de espinas dendríticas en las neuronas Kir es menor y se puede explicar la diferencia en mEPSC. Estos resultados demuestran que la reducción de la excitabilidad intrínseca retrasa la velocidad de maduración en un ambiente activo eléctricamente.

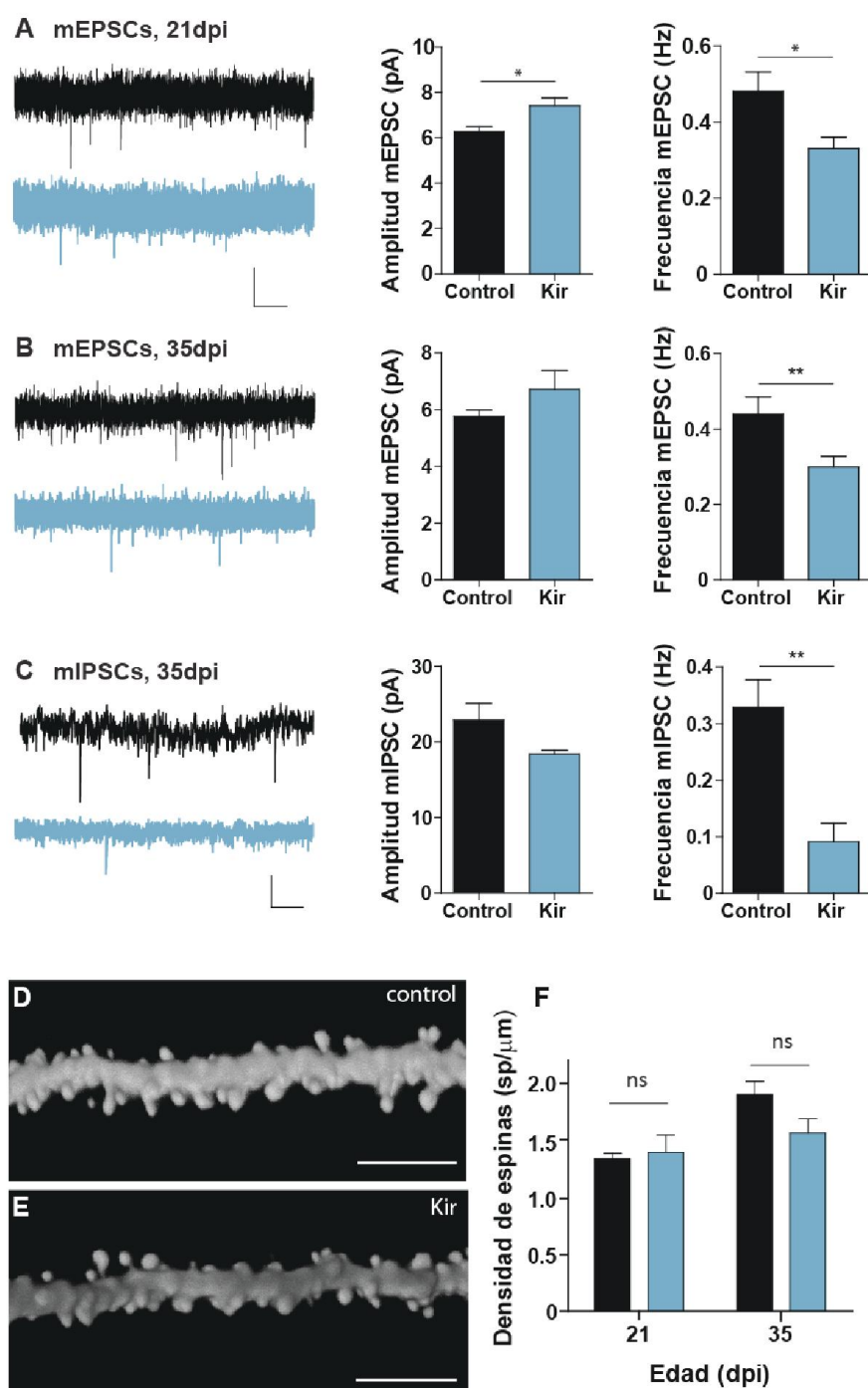


Figura 27: Conectividad de las neuronas que expresan Kir en el circuito hipocampal. A- en negro se muestra un registro representativo en patch clamp configuración whole cell en voltage clamp de neuronas de 21 dpi que expresan GFP, en azul el mismo tipo de registro de una neurona que expresa Kir2.1. A la derecha se encuentran las cuantificaciones de mEPSC n=8 (control) y n=14 (Kir) * p= 0.025 (amplitud) y * p= 0.012 (frecuencia) t- tests. B- Los registros igual que en A, la edad de las neuronas es de 35 dpi. n=14 para neuronas control y el mismo n para neuronas Kir **p=0.0094 (frecuencia), Mann-Whitney test. Escala en A y en B 5pA y 1s. En A y en B los registros fueron tomados en presencia de picrotoxina. C- Registros igual que en A y B pero de corrientes inhibitorias. Los registros fueron tomados en presencia de Kynurénico. n=12 (control) y n=8 (Kir). **p=0.0018, Mann-Whitney test. Escala 20pA y 1 s. D- Proyección en Z-stack de planos confocales de espinas dendríticas de una neurona control y en E de una neurona Kir. Escala 5 μ m. F- Cuantificación de la densidad de espinas dendríticas (número de espinas dendrítica por μ m de dendrita) de n= 16 fragmentos (21 dpi control, en negro), n=13 fragmentos (21 dpi Kir, en celeste), n= 20 fragmentos (35 dpi control, en negro), n= 13 fragmentos (35 dpi Kir, en celeste). Los fragmentos son de al menos tres ratones diferentes para cada barra. No se encontraron diferencias significativas. Las barras representan la media $\pm$ ES.

Efecto de Kir2.1 en la sobrevida neuronal

En la neurogénesis adulta, una gran proporción de las DGCs nuevas (>50 %) muere entre la segunda y la cuarta semana de desarrollo (Kempermann *et al.*, 2003). Estudios previos mostraron que la sobrevida de las DGCs podría depender de una competencia por actividad glutamatérgica aferente (Tashiro *et al.*, 2006). En este contexto, un retraso en la maduración podría generar una “desventaja” en las nuevas DGCs al momento de competir con otras neuronas. Dado que el retraso de la maduración en neuronas que sobreexpresan Kir ocurre dentro de este intervalo, se diseñó una estrategia que permita comparar la sobrevida neuronal de los diferentes grupos (Kir, Kir_{NC} y RFP). Para ello se realizaron inyecciones intrahipocampales de mezclas de virus GFP + Kir-RFP en una relación de 1:10 y se sacrificó parte de los animales a los 9 dpi (antes de la ola de apoptosis) y el resto a los 35 dpi (cuando ya se seleccionaron las DGCs que sobreviven) (Figura 28.A). La idea fue que esta estrategia nos permitiría normalizar la proporción de neuronas Kir⁺ que sobrevive a los 35 dpi respecto de aquellas presentes a los 9 dpi, a su vez todas ellas normalizadas a la población de neuronas control (RFP). De esta forma además se normalizó la transducción retroviral entre diferentes cerebros y experimentos. Luego se dividió el número de neuronas Kir/control y se obtuvo una relación de células a los 9 dpi, la cual a su vez fue normalizada como valor 1. Se realizó el mismo procedimiento en las neuronas de 35 dpi. Se observó que la relación de neuronas Kir/control a los 35 dpi disminuyó cerca de un 40 %, indicando que la población de neuronas Kir mostró una sobrevida menor que las neuronas controles. Al realizar el mismo experimento con Kir_{NC} se observó que las neuronas Kir_{NC} sobrevivieron más que las control, alrededor de un 20%. Esto pudo deberse a que el canal actúa como dominante negativo aumentando la excitabilidad intrínseca, lo cual favorecería la activación y por lo tanto la integración y sobrevida de estas neuronas nuevas (Figura 28.E). Este experimento muestra que la sobreexpresión del canal Kir2.1 favorece la muerte neuronal a edades tempranas, lo cual indicaría que la actividad eléctrica intrínseca es esencial para favorecer la sobrevida neuronal. Estos experimentos

fueron realizados en ratones corredores de modo de ecualizar la actividad eléctrica en la región septal y temporal y que sea máxima.

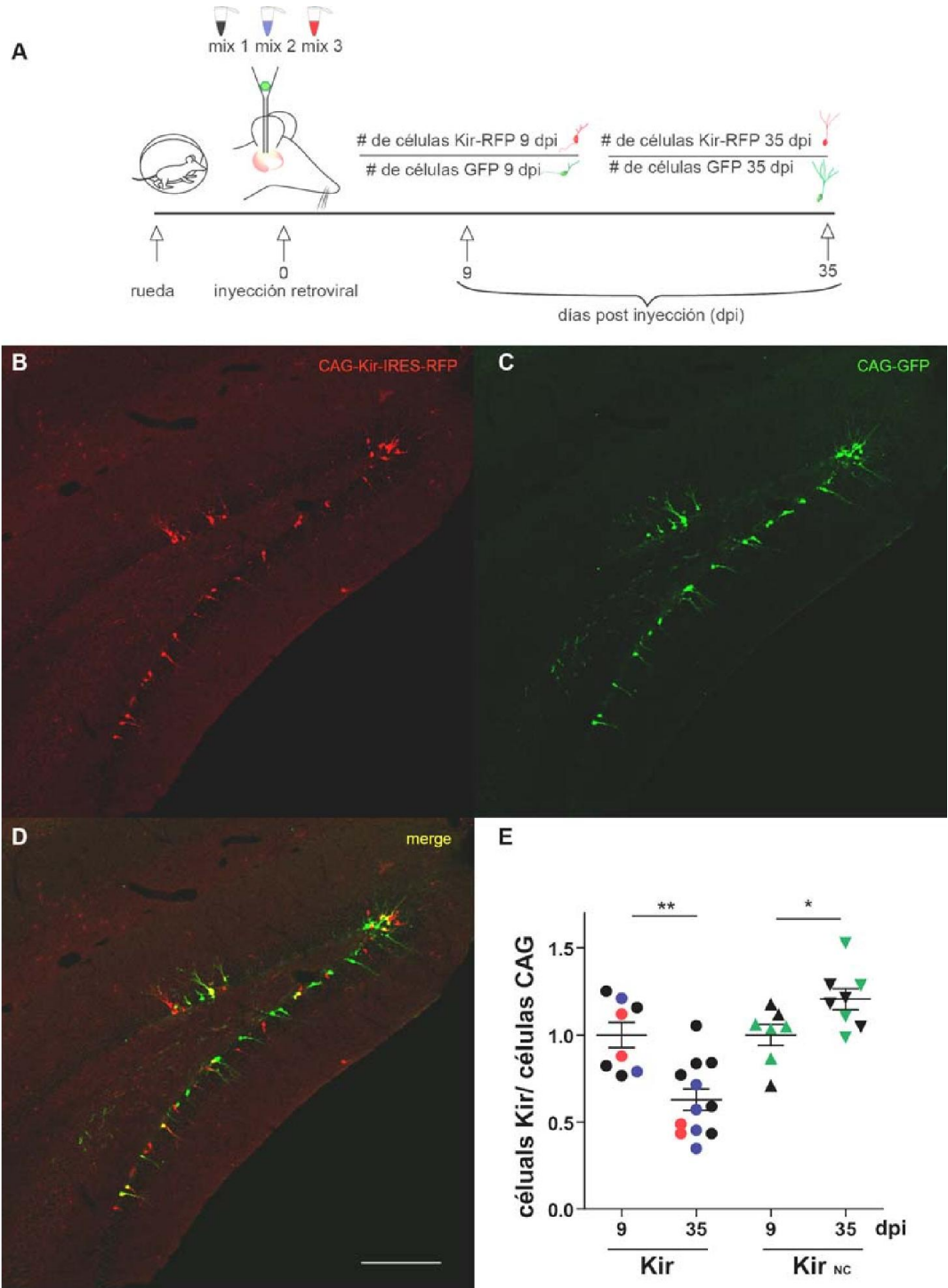


Figura 28: A- Esquema del diseño experimental. B- Se muestra una proyección en el plano XY de una inmunofluorescencia anti RFP (neuronas Kir) de neuronas de 9 dpi, en C se muestra la inmunofluorescencia anti GFP y en D la superposición de ambas imágenes. Escala 200 μ m. E- Cuantificación del experimento de sobrevida. T-test.

Tercera Parte- Generación de nuevas herramientas para modular la excitabilidad intrínseca en ventanas de tiempo acotadas en las DGCs nuevas

Diseño experimental

En la tercera parte, el objetivo es generar herramientas para aumentar o disminuir la excitabilidad intrínseca de las neuronas nuevas en ventanas acotadas de tiempo. Estas herramientas nos servirán para estudiar si existe un período crítico en el cual la actividad eléctrica intrínseca es esencial en el desarrollo e integración de estas neuronas. Para ello se utilizarán retrovirus modificados que expresarán Receptores Activables Solo por un Ligando Sintético (RASSL) (Armbruster *et al.*, 2007; Alexander *et al.*, 2009.).

En la sección anterior demostramos que la actividad eléctrica es fundamental para el apropiado desarrollo, integración al circuito y supervivencia de las DGCs nacidas en el adulto. La limitación de la estrategia de expresar el canal Kir 2.1 en el genoma retroviral, fue que este canal se expresó desde el día que las neuronas fueron infectadas y se siguió expresando durante toda la vida de las neuronas. La pregunta que queda abierta es si la actividad neuronal es necesaria durante toda la etapa de desarrollo de las neuronas o si hay un período crítico en el cual la actividad eléctrica intrínseca es esencial para una eficiente integración al circuito. Al utilizar la estrategia de sobreexpresar el canal Kir_{NC} con el retrovirus, no fue posible demostrar que éste es un dominante negativo fuerte (es decir que titule la mayoría de los canales Kir endógenos) y que aumente la excitabilidad de las neuronas nuevas de manera eficaz. Es interesante plantear la hipótesis de qué sucedería si las neuronas nuevas nacidas en el adulto tuviesen una excitabilidad elevada, de modo de aumentar la actividad eléctrica y cómo sería su desarrollo y su integración al circuito.

Los RASSLs son receptores derivados del receptor humano de acetilcolina y están asociados a proteína G inhibitoria (el receptor RASSL hM3D) o activadora (el receptor RASSL hM4D)

(Armbruster *et al.*, 2007; Alexander *et al.*, 2009). A su vez las proteínas G inhiben o activan canales rectificadores entrantes de K^+ asociados a proteína G (GIRKS). El receptor hM3D está asociado a una proteína G inhibitoria la cual al activarse cierra los canales GIRK, disminuye la actividad de los canales entrantes rectificadores de K^+ , la neurona disminuye la conductancia de K^+ , despolariza la membrana y con ello aumenta la excitabilidad neuronal. Los receptores hM4D están asociados a proteínas G activadoras, las cuales abren canales GIRK, aumenta la conductividad del K^+ llevando la membrana a potenciales más hiperpolarizados y la neurona es menos excitable (es un análogo de la expresión de Kir2.1). Los RASSLs solo se activan con un ligando sintético: CNO (clozapine-*N*-oxide) y no se activan por acetilcolina, es el agonista endógeno del receptor del cual derivan los RASSLs. El receptor hM4D ha sido transitoriamente expresado en neuronas de hipocampo cultivadas *in vitro*. Al agregar CNO al medio extracelular se produjo una hiperpolarización del Vm de las neuronas y previno el disparo de potenciales de acción en estas neuronas. El CNO activa una respuesta celular en neuronas que expresan exógenamente el hM4D y demuestra su utilidad para silenciar neuronas (Armbruster *et al.*, 2007). Por otro lado se han modificado genéticamente ratones que expresan el receptor hM3D bajo el promotor CaMKII α -tTA. Estos ratones expresaron el receptor en grandes regiones de la corteza y luego de 3 horas de la administración de CNO se logró medir estado de epilepsia en varios individuos, demostrando la capacidad que tiene este receptor de producir potenciales de acción en neuronas *in vivo* (Alexander *et al.*, 2009). CNO atraviesa la barrera hematoencefálica y puede ser administrado intraperitonealmente o por vía oral en el agua (Bender *et al.*, 1994). Al diseñar las construcciones virales también se tuvo en cuenta el modo de generar proteínas independientes de la proteína reportera y que a su vez tengan altos niveles de expresión (la secuencia IRES es muy ineficiente al traducir la proteína río abajo). Para ello se utilizó la proteína 2A derivada de picornavirus, la cual se autocliva co-traduccionalmente (funciona como una inteína, es una *self-clivaje protein*) generando una proteína reportera (en este caso GFP-2A) y otra proteína independiente que se quiere expresar fusionada sólo con 2 aminoácidos de la secuencia 2A como se muestra en la figura 29 (Trichas *et al.*, 2008). Los RASSLs tienen una secuencia de hemaglutinina

(HA) que les permite ser detectados por inmunofluorescencia debido a que no existen anticuerpos que puedan distinguirlos del receptor de acetilcolina endógeno. Se generaron las construcciones virales y se inyectó el retrovirus intrahipocampalmente, los ratones poseían ruedas en sus jaulas para aumentar la cantidad de neuronas transducidas. Se caracterizó la expresión de los receptores y la acción autocatalítica del péptido 2A. Para completar los estudios se analizó la funcionalidad de los receptores hM4D utilizando técnicas electrofisiológicas en rebanadas agudas de hipocampo adulto. Se estudió además la funcionalidad de los receptores hM3D *in vivo* luego de la administración intraperitoneal de CNO, para lo cual se analizó la expresión del gen de respuesta inmediata Arc en neuronas GFP⁺ expresando h3MD.

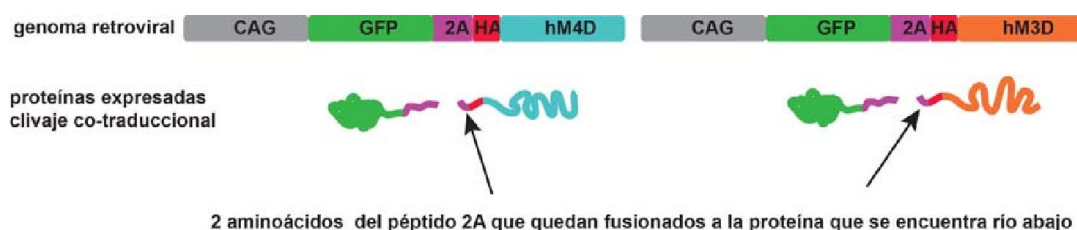


Figura 29: Esquema representando la configuración final de las proteínas luego que son traducidas. En la parte superior se esquematizan los genomas retrovirales de las construcciones utilizadas en esta sección de la tesis.

Expresión de hM3D y hM4D en DGCs nuevas

Con el fin de estudiar la funcionalidad de las construcciones virales generadas, se analizó la expresión de los receptores hM3D, hM4D y la proteína reportera GFP en las neuronas nuevas. Para ello se inyectaron intrahipocampalmente ratones de 6 a 7 semanas de edad, con la construcción viral conteniendo al genoma de GFP-2A-hM3D o GFP-2A-hM4D, figura 29. Luego de 4 semanas, los ratones fueron sacrificados y se realizó una inmunofluorescencia en rodajas de cerebro de ratón para detectar el epítopo HA. Se analizó la expresión de las diferentes proteínas por microscopía confocal. En la figura 30.A, se observa el soma de neurona transducida con el virus CAG-GFP-2A-hM3D, en rojo el patrón de distribución del epítopo HA y en verde el patrón de GFP. Se utilizó una función del software la cual permite analizar la intensidad de fluorescencia de los canales utilizados

a lo largo de un vector. Sobre el vector que se realizó el perfil de fluorescencia de ambos canales, se observa mayor intensidad de fluorescencia roja (canal que representa a la marca de HA que está fusionada al receptor hM3D) en la región de la membrana plasmática. La fluorescencia de GFP se observa de manera difusa y con igual intensidad a lo largo del soma, indicando que la proteína se encuentra en el citoplasma y distribuida uniformemente. Este patrón indica dos cosas: el receptor hM3D está inserto en la membrana y no está fusionado a GFP, lo cual demuestra que el péptido autoclivable 2A ha realizado el clivaje del enlace peptídico y se generaron dos proteínas independientes, el receptor hM3D y la proteína GFP. En la figura 30.B se muestra el mismo análisis que en 30.A pero para la construcción viral CAG-GFP-2A-hM4D.

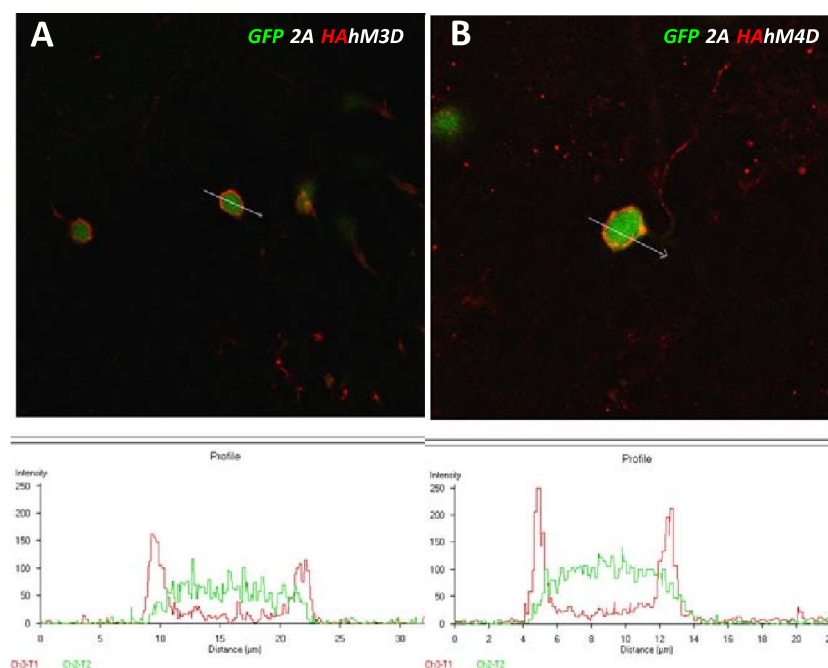


Figura 30: Inmuno fluorescencia anti HA. A- Neurona de 28 dpi infectada con el virus GFP-2A-HAhM3D, en la parte superior se muestra un plano único de una foto tomada con el microscopio confocal. En rojo se muestra la marca del epítoto HA en verde se observa la fluorescencia de la proteína GFP. La flecha blanca representa un vector analítico de la intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias. El perfil indica la intensidad de fluorescencia pixel por pixel a lo largo del vector, y se describe en la parte inferior de la figura, en el eje x se expresa la distancia recorrida por el vector en micrómetros y en el eje Y la intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias para los dos canales. B- Igual que en la figura A, pero la neurona fue infectada con el virus que codifica para la construcción GFP-2A-HAhM4D. La escala es el vector para cada una de las fotos

Medición de la funcionalidad de hM4D y hM3D en DGCs nuevas

Se realizaron ensayos funcionales del receptor hM4D, para ello los ratones fueron inyectados con el retrovirus a las 6 -7 semanas de edad. Luego de 3 semanas los ratones se sacrificaron y se realizaron experimentos de patch clamp en configuración whole cell en rodajas agudas de hipocampo. Se midió la resistencia de membrana de las neuronas GFP⁺ antes y después del agregado de 10 μ M CNO en el flujo de perfusión. La resistencia membrana (R_m) toma su valor en función de los canales insertos en la membrana que se encuentran abiertos, si la R_m cambia podemos saber si algún canal modificó su conductancia. Al agregar CNO, se une al receptor, este activa a una proteína G activadora, la cual genera la apertura de canales GIRK, de esta manera la resistencia de membrana disminuye. En la figura 31 se muestra la R_m de 4 neuronas GFP⁺ de 3 semanas de edad sin CNO. La R_m fue medida con un pulso hiperpolarizante de 10 mV y 40 ms de duración (como se describe en materiales y métodos) antes y 5 minutos después del agregado de la droga. En la figura 31 se observa una disminución en el valor de la R_m . Esta diferencia es significativa, lo cual indicaría que el receptor está disminuyendo la excitabilidad de la neurona. Este resultado es preliminar debido a que el número de neuronas analizado hasta el momento es bajo.

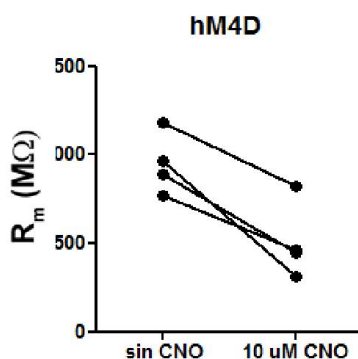


Figura 31: Gráfico mostrando la resistencia de membrana (R_m) antes y después del agregado de 10 μ M de CNO.

Con el fin de medir la actividad in vivo del receptor hM3D en neuronas nacidas en el adulto, se realizaron estudios de colocalización de neuronas GFP⁺ de 28 dpi con la proteína Arc, que se expresa cuando la neurona dispara potenciales de acción. Para ello se inyectó IP 10mg/Kg de CNO

(en ratones que habían sido inyectados intrahipocampalmente 28 días antes con el virus CAG-GFP-2A-hM3D) y luego, a diferentes tiempos post inyección de CNO se perfundió a los animales y se realizó una inmunofluorescencia anti Arc y se contó el porcentaje de colocación de neuronas $GFP^+ Arc^+$. En la figura 32 se muestra un ejemplo de una proyección en el plano XY de varios planos confocales de una inmunofluorescencia anti GFP^+ (verde) y anti Arc (rojo) a las 7 horas de la inyección intraperitoneal de CNO (en el panel de la derecha se observan neuronas amarillas lo cual indica la superposición de los colores, es decir la colocación). La cuantificación de la colocación total está en proceso de análisis. El resultado de haber encontrado neuronas de 28 dpi colocándose con Arc es muy positivo ya que en nuestro laboratorio no hemos encontrado DGCs nacidas en el adulto de 28 dpi que sean positivas para este marcador de actividad. Tampoco hay bibliografía en la cual describan que a los 28 dpi las DGCs nuevas colocan con este marcador de actividad.

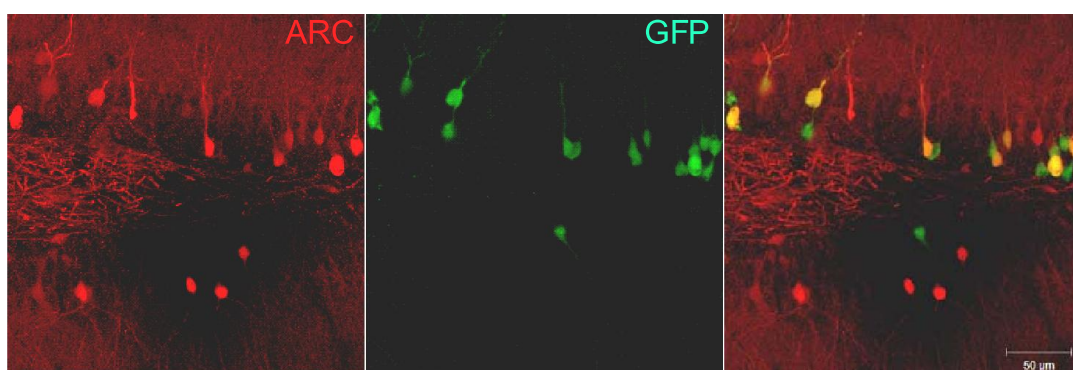


Figura 32: Inmunofluorescencia anti Arc en el panel izquierdo, anti GFP en el panel central, a la derecha se muestra la superposición de ambas micrografías.

En esta sección hemos construido herramientas novedosas que funcionarían como activadores o inhibidores de la actividad neuronal. Estamos llevando a cabo experimentos para demostrar la activación de estos receptores en las DGCs nacidas en el adulto por medio de la administración de la droga vía oral. Los experimentos están en proceso de análisis.

Conclusiones

La diferencia en la actividad eléctrica de la GCL a lo largo del eje septo temporal en los ratones sedentarios muestra una correlación entre la actividad del circuito y la velocidad de maduración de las neuronas nuevas. Esto significa que la velocidad con la cual una neurona se desarrolla está afectada por la actividad eléctrica del circuito que la rodea. Al aumentar la actividad eléctrica por medio del ejercicio físico en la región temporal, ésta se correlacionó con un aumento en la velocidad del desarrollo neuronal en dicha región. La sobrevida neuronal se vio afectada en la región temporal, pero ésta no se moduló por la actividad física, la sobrevida no aumentó en esta región al exponer a los ratones a ejercicio físico, lo cual quiere decir que la sobrevida neuronal no se ve modificada por la actividad eléctrica del medio ambiente, solo la velocidad de maduración es modulable por este factor.

La reducción en la excitabilidad intrínseca inducida a través de la sobreexpresión de Kir2.1 genera un enlentecimiento de la maduración neuronal a partir de la segunda semana de desarrollo. Estos resultados demuestran que el desarrollo neuronal es modulado por la actividad del circuito a través de la despolarización subumbral y/o el disparo de potenciales de acción específicamente. Notablemente, este mecanismo de regulación se hace evidente cuando las neuronas poseen una excitabilidad madura y comienza a desarrollarse la innervación glutamatérgica. Las neuronas que expresan Kir, al no poder conectarse con el circuito como sus pares controles, mueren prematuramente. En cambio las neuronas que sobreexpresan Kir_{NC}, las cuales podrían tener aumentada su excitabilidad intrínseca y de esta manera la actividad neuronal aumentada, sobreviven en mayor porcentaje que las neuronas controles. Esto demuestra que la actividad eléctrica neuronal es traducida como una señal para la maduración de las DGCs nacidas en el adulto y para la sobrevida de estas neuronas nuevas.

Hemos logrado construir nuevas herramientas que aumentan o disminuyen la actividad neuronal de manera de célula autónoma. Se pueden controlar de manera remota y durante ventanas de tiempo acotadas.

Discusión

En la primera parte de esta tesis nos propusimos estudiar el efecto de la actividad del circuito en el desarrollo neuronal de las neuronas nuevas del giro dentado adulto. En trabajos previos (Overstreet-Wadiche *et al.*, 2006) se demostró que un aumento inducido en la actividad eléctrica de manera patológica (convulsiones) aumentaba la velocidad de desarrollo neuronal. En nuestro laboratorio se encontró que en la región septal del hipocampo la actividad eléctrica del circuito es mayor que en la región temporal, figura 10 de la introducción, esta diferencia encontrada nos volcó a estudiar la velocidad del desarrollo neuronal en estas dos regiones. Gracias a la utilización de retrovirus pudimos hacer experimentos electrofisiológicos y de medición de morfología neuronal individual a diferentes tiempos de la vida de las neuronas, lo cual nos permitió tener datos precisos de R_m y longitud de árbol dendrítico total. Se encontró que en un ambiente más activo eléctricamente (la región septal) las neuronas se desarrollan a mayor velocidad. En base a estos resultados se estudió lo que sucedía si se modulaba la actividad eléctrica de una región de la GCL. Se encontró que al exponer a los ratones al ejercicio físico voluntario la actividad eléctrica de la GCL (medida como la cantidad de neuronas totales Arc⁺) aumentaba en la región temporal (figura 17.A). En estudios previos se había demostrado que el aumento de la actividad física aumentaba la tasa neurogénica en la región dorsal del giro dentado (Snyder *et al.*, 2009). Se estudió la velocidad de desarrollo neuronal en la región temporal cuando los ratones hacían ejercicio voluntario y se observó que al aumentar la actividad eléctrica de la GCL, aumentaba la velocidad del desarrollo neuronal entre la segunda y la quinta semana de vida de las neuronas en esta región. Con estos datos se aportó una función adicional al ejercicio físico en la neurogénesis adulta del hipocampo, la cual consiste en la aceleración de la maduración neuronal, hasta ahora no descrito a nivel de célula autónoma, reportado en Piatti *et al.*, 2011. En un trabajo de Wu y colaboradores (2008) se analizó la maduración de neuronas DCX⁺ en el giro dentado de ratones de mediana y avanzada edad los cuales estuvieron sometidos a una cinta para correr de manera controlada durante 5 semanas. El ejercicio

físico aumentó el porcentaje de neuronas DCX⁺ y las neuritas se extendían a lo largo de toda la capa molecular (MCL). También observaron una disminución en la proporción de neuronas DCX⁺ con dendritas basales o paralelas a la GCL, lo cual es comparable con un avance en la secuencia de maduración neuronal (Espósito *et al.*, 2005; Ge *et al.*, 2006).

El fenómeno de aumentar la velocidad en la maduración neuronal solo se observó específicamente en el giro dentado temporal de ratones corredores, donde el ejercicio aumentó la actividad de la GCL, por lo que la maduración neuronal dependió de la actividad del circuito local. Estudiamos entonces si la actividad eléctrica del circuito impactaba de alguna manera en la sobrevivencia de las neuronas nuevas, ya que estudios previos daban indicios que la sobrevivencia neuronal de las neuronas nuevas aumentaba cuando los ratones eran expuestos a un ambiente enriquecido (Nilsson *et al.*, 1999). Wu y colaboradores también describieron que la sobrevivencia de neuronas nuevas nacidas en ratones de mediana edad era incrementada cuando los ratones eran expuestos a una rueda para aumentar actividad física. En esta tesis se encontró que las neuronas de la región temporal sobreviven menos que las neuronas que se desarrollaban en la región septal de los ratones sedentarios, figura 18. Se estudió si un aumento en actividad eléctrica del circuito en la región temporal modularía la sobrevivencia de las DGCs en la región temporal, para ello se realizaron experimentos de sobrevivencia neuronal en ratones corredores. Se observó que la sobrevivencia neuronal a los 35 dpi en la región temporal no se ve incrementada respecto de la septal por un aumento en la actividad eléctrica del circuito. El porcentaje de neuronas que sobrevive en la región temporal comparada con la septal es igual en ratones sedentarios y corredores. Estos resultados sugieren que la maduración neuronal estaría afectada por factores que se liberan cuando un animal se ejercita voluntariamente, por ejemplo BDNF (brain derived neurotrophic factor) (Seifert *et al.*, 2010), pero también se ha visto que existe un tipo de plasticidad neuronal en ratones corredores que es independiente de BDNF (Ferreira *et al.*, 2011). Estos factores actuarían en sinergia con la actividad del circuito aumentando la velocidad de desarrollo neuronal. En cambio la sobrevivencia neuronal en la región temporal de los ratones corredores no estaría modulada por la actividad del circuito. Lo que

se ha demostrado recientemente es que el ejercicio físico voluntario aumenta la sobrevivencia de los progenitores tipo 3 y sería la vía de Notch la involucrada en este proceso (Brandt *et al.*, 2010).

La idea de que la actividad intrínseca aumenta la sobrevivencia neuronal, se demostró en experimentos en los cuales se estimuló con un protocolo de alta frecuencia la vía perforante y se indujo la expresión del gen de respuesta temprana (IEG) Arc/Arg3.1 en la GCL, las neuronas que expresaban este gen lograron una mayor sobrevivencia (Kuipers *et al.*, 2009). También lograron una mayor sobrevivencia neuronas granulares que expresaban IEG relacionados con actividad neuronal como lo son Zif 268 o c-fos (Tashiro *et al.*, 2007). La sobrevivencia neuronal también se vio afectada cuando las DGCs expresaban un dominante negativo de CREB el cual fue expresado en las neuronas por medio de un retrovirus (Jagasia *et al.*, 2009). CREB es un factor de transcripción que responde a AMP cíclico y es un efector de respuesta rápida intracelular de factores de crecimiento (Lonze y Ginty, 2002). Hay evidencia que la señalización vía CREB está regulada dependiendo de actividad durante la neurogénesis en la zona subventricular y participa de la maduración neuronal (Giachino *et al.*, 2005).

BDNF es una proteína secretada, de la familia de las neurotrofinas que tiene numerosas funciones en el desarrollo y en la plasticidad del sistema nervioso. (Poo, 2001). BDNF está involucrado en la proliferación, diferenciación, plasticidad sináptica y sobrevivencia neuronal (revisado en Mattson 2008, Cotman & Berchtold, 2002.) La exposición a una amplia gama de estímulos ambientales lleva a la expresión del mRNA de BDNF en las regiones del cerebro que fueron activadas, sugiriendo que la inducción de la transcripción de BDNF es un mecanismo común para la modulación ambiental de la función neuronal (Lu B. *et al.*, 2003). El ejercicio voluntario genera un aumento de BDNF en todo el hipocampo de ratones adultos y esto produce un aumento en la neurogénesis adulta (Kobilo *et al.*, 2011). La falta de BDNF (ratones knock-out) en el hipocampo no permite el desarrollo ni la sobrevivencia de las neuronas nuevas (Choi *et al.*, 2009). Por otro lado Bergami y colaboradores, estudiaron el desarrollo de las DGC en el adulto de un ratón knock out

condicional inducible, en el cual se deletaba el receptor de BDNF, TrkB, a los 28 dpi estas neuronas presentaban defectos en el desarrollo morfológico y en su sobrevivencia.

Con los resultados observados en esta tesis, si BDNF hubiese sido el único factor involucrado en el desarrollo neuronal, deberíamos haber encontrado un aumento en la velocidad de desarrollo no solo en la región temporal, sino también en la región septal de los ratones corredores respecto de los sedentarios. El hecho que no hayamos encontrado un incremento en la tasa de maduración de la región septal de los ratones corredores respecto de los sedentarios, nos da indicios que BDNF no es el único factor que acelera la maduración. Proponemos que la actividad eléctrica intrínseca también tiene que estar ejerciendo un rol, debido a que solo se aceleró la maduración en aquella región que aumentó la actividad eléctrica del circuito. Se han propuesto efectos sinérgicos entre la actividad neuronal y BDNF para la modulación de la conectividad y la plasticidad sináptica (Schinder and Poo, 2000). BDNF modula la transmisión sináptica y también la respuesta de las neuronas postsinápticas dependiendo de la actividad simultánea de ambas neuronas, de las concentraciones de calcio y de la actividad de los receptores de glutamato del tipo NMDA (Pozzo-Miller 2006). Existen indicios que habría una retroalimentación positiva entre la expresión de Arc y BDNF en la potenciación a largo plazo (LTP). La síntesis de Arc es requerida para la inducción y mantenimiento de LTP inducido por BDNF (Messaoudi *et al.*, 2007), esta potenciación induce un aumento en la expresión de Arc en las mismas neuronas (Ying *et al.*, 2002).

La incorporación de neuronas nuevas al circuito hipocampal podría representar un mecanismo de plasticidad estructural de esta región del cerebro con propiedades específicas dependiendo del estado de actividad eléctrica del circuito como de actividad física del animal. Este mecanismo puede modular el número de neuronas nuevas y a su vez el tiempo que tardan estas unidades funcionales en integrarse completamente al circuito, dándole una propiedad única que es la plasticidad del circuito a través del tiempo de maduración neuronal.

En la segunda parte de esta tesis estudiamos si las despolarizaciones subumbrales y el consiguiente disparo de potenciales de acción (actividad eléctrica intrínseca) de una neurona en desarrollo en respuesta a señales ambientales afectan el proceso de maduración de las neuronas nacidas en el giro dentado adulto. Para este estudio se redujo la excitabilidad neuronal in vivo, sin alterar el ambiente que la rodea, se modificó el genoma de MMLV para que exprese un canal de potasio de rectificación entrante (Kir2.1) y como control de especificidad un Kir2.1 que no conducía corriente, denominado Kir_{NC} (Burrone *et al.*, 2002). Con esta estrategia se logró reducir la R_m con lo cual se logró disminuir las despolarizaciones subumbrales a los 21 dpi y la excitabilidad a partir de los 35 dpi (tesis doctoral Soledad Espósito). La alteración de la excitabilidad produjo cambios en los marcadores de maduración a partir de la segunda semana de desarrollo, como se puede observar en la figura 26, las neuronas Kir poseen una mayor expresión de calretinin, es una proteína que se expresa cuando la neurona es inmadura. A partir de la tercera semana cuando estas neuronas comienzan a conectarse al circuito, los marcadores de maduración neuronal se vieron afectados. DCX es un marcador de inmadurez, a los 21 dpi las neuronas Kir poseen un significativo aumento de la colocalización con este marcador respecto de las controles (Figura 24). Por otro lado a esta misma edad, el marcador de madurez Calbindin, mostró diferencias de expresión en las neuronas Kir, en este caso un menor porcentaje de colocalización que sus pares controles. (Figura 25). Se observó una atrofia a nivel de desarrollo del árbol dendrítico. En conclusión, la sobreexpresión de Kir2.1 trajo como consecuencia principal un retraso en el desarrollo neuronal que se evidenció a partir de la segunda semana de edad. Estos hallazgos permiten demostrar que la actividad eléctrica neuronal modula el proceso de desarrollo en el giro dentado adulto a través de la acción directa de la actividad del circuito.

En los estudios de conectividad aferente excitatoria e inhibitoria encontramos que las neuronas que sobreexpresaban Kir poseían una cantidad inferior de contactos sinápticos a los 21 y 35 dpi, reflejada en la disminución de la frecuencia de mEPSCs, curiosamente estos eventos poseían mayor amplitud (solamente a los 21 dpi). Por otro lado la cantidad de contactos inhibitorios

medidos como frecuencia de mIPSCs, también fue menor en las neuronas de 35 dpi. Estas diferencias pueden ser debido a una compensación homeostática sináptica que están llevando a cabo las neuronas que se desarrollan en condiciones menos excitables y por consecuencia con menor actividad eléctrica. Estas neuronas se están desarrollando en una red compleja la cual esta compuesta por diferentes tipos celulares, tanto neuronas excitatorias como inhibitorias. Pequeños cambios en el balance entre la excitación y la inhibición (balance E/I) pueden tener un fuerte impacto en el desarrollo y actividad de esa neurona, este balance está estrictamente regulado. La capacidad de la red para compensar las perturbaciones internas o externas para lograr mantener un patrón de disparo o una excitabilidad adecuada, no es trivial y requiere de mecanismos que ajusten la fuerza de la excitación y de la inhibición de cada una de las neuronas. Existen formas de homeostasis sináptica que ocurren a través de cambios en la función de la presinapsis o de la postsinapsis (revisado en Turrigiano 2011). Tal vez sean estos mecanismos los que regularon el balance de excitación/inhibición de las neuronas que sobreexpresaban Kir. Existen mecanismos biofísicos que le permiten a las neuronas escalar la fuerza sináptica para incrementarla o disminuirla. Este “escalado sináptico” es un proceso autónomo de célula en el cual las neuronas censan su propia actividad a través de cambios en el disparo de potenciales de acción (PA), despolarizaciones subumbrales y entrada de Ca^{++} . Por ejemplo, se ha encontrado que el bloqueo selectivo de neuronas piramidales corticales genera un escalado de la fuerza sináptica del mismo grado que el que genera el bloqueo de la actividad de la red, este proceso requiere que disminuya la entrada somática de calcio, genera una reducción en la activación de la kinasa dependiente de calcio calmodulina CaMKK y genera una reducción en la transcripción (Ibata *et al.*, 2008). Esta señalización luego conduce a una acumulación de receptores AMPA (AMPA) en la membrana de todas las sinapsis excitatorias, escalando hacia arriba la amplitud de los eventos miniatura y aumentando la transmisión sináptica. Este aumento de AMPAR en respuesta al bloqueo de la actividad se detectó como un aumento de la densidad de la subunidad AMPA GluR2 (Gainey *et al.*, 2009). Esto es distinto a lo que sucede durante LTP, ya que la subunidad que cambia su expresión en ese caso es GluR1.

(Malenka y Bear, 2004). En nuestros experimentos de medición de aferencia excitatoria a través del estudio de mEPSC observamos que las neuronas Kir muestran una escalado sináptico en respuesta a la disminución de actividad, basados en el aumento de la amplitud de las respuestas miniatura excitatorias. Por otro lado no encontramos un aumento en la cantidad de sinapsis excitatorias, pero si observamos una disminución en la cantidad de contactos sinápticos inhibitorios, reflejados en la disminución de la frecuencia de mIPSCs. Podríamos especular que estos cambios en el balance de excitación /inhibición en la aferencia en las neuronas Kir, podrían responder a estabilizar la capacidad de disparo de potenciales de acción de las DGCs, lo cual a su vez controlaría la tasa de desarrollo.

Todos estos efectos en el desarrollo y conectividad sináptica neuronal nos llevaron a preguntarnos los efectos que producen en la sobrevivencia neuronal. Desarrollamos experimentos para probar la hipótesis de que la excitabilidad neuronal y por consecuencia la actividad eléctrica intrínseca afecta la sobrevivencia de las neuronas nacidas en el adulto. Se comparó la sobrevivencia de neuronas que tenían disminuida su excitabilidad intrínseca debido a la expresión de Kir2.1 o neuronas controles que expresan Kir2.1_{NC} que tienen la excitabilidad aumentada ya que poseen menor conductancia de K⁺ (g_{Kir}), el potencial de membrana (V_m) de las neuronas que sobreexpresan Kir2.1_{NC} está mas despolarizado y la R_m es alto (Figura 20). Encontramos que las neuronas que tienen la excitabilidad disminuida, sobreviven casi un 40 % menos que las neuronas controles a los 35 dpi (figura 28). En cambio las neuronas que sobreexpresaban Kir_{NC} no solo sobreviven un 20 % más de sobrevivencia que sus pares controles a los 35 dpi, sino que además no tienen retraso en la maduración. Estos resultados indicarían que la excitabilidad intrínseca y la capacidad de disparar potenciales de acción con un menor estímulo o generar despolarizaciones subumbrales serían factores claves para la sobrevivencia de las neuronas nuevas nacidas en el hipocampo adulto. Recientemente se demostró que la actividad eléctrica está involucrada en la sobrevivencia de neuronas nacidas en el hipocampo y en el bulbo olfatorio. En el hipocampo, la activación del receptor de NMDA promueve la integración y sobrevivencia de las DGC nacidas en el adulto (Brüel-Junggerman *et al.*, 2006; Tashiro *et al.*, 2006). En el

bulbo olfatorio, la señalización vía NMDA es crítica para la sobrevivencia de los neuroblastos a través del “rostral migratory stream” (Platel *et al.*, 2010).

En un trabajo de Lin y colaboradores en 2010, reportaron que al disminuir la actividad eléctrica de progenitores neurales, por medio de la inyección de un retrovirus codificante para Kir2.1 en la zona subventricular, observaron que las interneuronas del bulbo olfatorio que tenían disminuida la excitabilidad sobrevivían menos que las controles. En cambio, cuando transdujeron los progenitores con un canal de sodio voltaje dependiente NaChBac (genera hiperexcitabilidad en las neuronas), las interneuronas generadas sobrevivían más que sus pares controles aún cuando se les deletó el receptor de NMDA. Más aún, se demostró que modificando los niveles de actividad intrínseca no afectó el desarrollo ni el nivel de integración y conectividad de las neuronas nacidas en el bulbo olfatorio adulto (Kelsch *et al.*, 2009). En contraste, nosotros hemos encontrado que la actividad eléctrica influye de gran manera el grado de maduración neuronal y la integración funcional de las neuronas nacidas en el hipocampo adulto.

Estos resultados demuestran el importante rol que cumple la actividad neuronal intrínseca en regular la integración de neuronas generadas en el adulto de modo de célula autónoma y que la actividad neuronal es la que gobierna la sobrevivencia de las neuronas nuevas.

Todos estos resultados demuestran que las DGC con niveles reducidos de actividad intrínseca maduran más lento que aquellas que son más activas eléctricamente. Esta observación es consistente con la baja tasa de maduración observada en la región temporal del giro dentado de los ratones sedentarios. Sin embargo el mecanismo específico por el cual se observa el retraso neuronal es poco claro, podrían ser muchos factores actuando en conjunto.

Concluimos que el nivel de actividad de la red en conjunto determina el nivel de actividad de cada neurona en desarrollo y consecuentemente controla el tiempo en el cual cada neurona se mantiene inmadura. Proponemos entonces que la modulación dependiente de actividad de la maduración neuronal es una nueva manera de plasticidad hipocámpal.

Bibliografía

- Alexander GM, Rogan SC, Abbas AI, Armbruster BN, Pei Y, Allen JA, *et al.* (2009). Remote Control of Neuronal Activity in Transgenic Mice Expressing Evolved G Protein-Coupled Receptors. *Neuron*, 63(1), 27-39.
- Altman, J & Das, G (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *Journal of Comparative Neurology*, 124, 319-336.
- Alvarez P, Squire LR. (1994). Memory consolidation and the medial temporal lobe: a simple network model. *PNAS*, 91(15), 7041-5.
- Allen DL, Harrison BC, Maass A, Bell ML, Byrnes WC, Leinwand LA. (2001). Cardiac and skeletal muscle adaptations to voluntary wheel running in the mouse. *J Appl Physiol*. 90(5):1900-8.
- Amaral D & Witter M (1989). The three dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience*, 31(3), 571-591.
- Andersen, P. (2007). *The Hippocampus book*. Oxford Press, 60-61.
- Armbruster BN, Li X, Pausch MH, Herlitze S & Roth L (2007). Evolving the lock to the key to create a family of G protein-coupled receptors potentially activated by an inert ligand. *PNAS*, 104, 5163-5168.
- Bakker A, Kirwan CB, Miller M, & Stark CE (2008). Pattern Separation in the Human Hippocampal CA3 and Dentate Gyrus. *Science*, 319(March), 1640-1642.
- Ben-Ari Y, Cherubini E, Corradetti R, Gaiarsa JL. (1989). Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. *J Physiol.*, 416, 303-25
- Bender D, Holschbach M, Stöcklin G. (1994). Synthesis of n.c.a. carbon-11 labelled clozapine and its major metabolite clozapine-N-oxide and comparison of their biodistribution in mice. *Nucl Med Biol*. 21(7):921-5.
- Bergami M, Rimondini R, Santi S, Blum R, Götz M, Canossa M. (2008). Deletion of TrkB in adult progenitors alters newborn neuron integration into hippocampal circuits and increases anxiety-like behavior. *PNAS*, 105 (40), 15570-5.
- Bonaguidi MA, Wheeler MA, Shapiro JS, Stadel RP, Sun GJ, Ming GL, Song H. (2011). In vivo clonal analysis reveals self-renewing and multipotent adult neural stem cell characteristics. *Cell*, 145 (7), 1142-55.
- Boukhaddaou H, Sieso V, Scamps F, Vigues S, Roig A, Valmier J (2000). Q- and L-type calcium channels control the development of Calbindin phenotype in hippocampal pyramidal neurons in vitro. *Eur J Neurosc.*, 12, 2068-2078.
- Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, Behr JP. (1995). A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *PNAS*, 92(16), 7297-301.

- Brandt MD, Maass A, Kempermann G, Storch A. (2010). Physical exercise increases notch activity, proliferation and cell cycle exit of type-3 progenitor cells in adult hippocampal neurogenesis. *Eur J Neurosci.*, 32(8), 1256-64.
- Brown JP, Couillard-Després S, Cooper-Kuhn CM, Winkler J, Aigner L, Kuhn HG. (2003). Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *J Comp Neurol.*, 467(1), 1-10.
- Brüel-Jungfermann E, Davis S, Rampon C, and Laroche S (2006) Long-term potentiation enhances neurogenesis in the adult dentate gyrus. *J Neurosci.* 26, 5888 –5893.
- Burns KA & Kuan CY. (2005). Low doses of bromo- and iododeoxyuridine produce near saturation labeling of adult proliferative populations in the dentate gyrus. *Eur J Neurosci.*, 21(3), 803-7.
- Burrone J, O'Byrne, M & Murthy V. (2002). Multiple forms of synaptic plasticity triggered by selective suppression of activity in individual neurons. *Nature*, 420, 414-418.
- Cameron HA & McKay RD. (2001). Adult Neurogenesis Produces a Large Pool of New Granule Cells in the Dentate Gyrus. *Journal of Comparative Neurology*, 417(January), 406 - 417.
- Cancedda L, Fiumelli H, Chen K & Poo M. (2007). Excitatory GABA Action Is Essential for Morphological Maturation of Cortical Neurons. *Journal of Neuroscience*, 27(19), 5224 -5235
- Carleton A, Petreanu LT, Lansford R, Alvarez-Buylla A & Lledo PM. (2003). Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb. *Nature Neuroscience*, 6(5), 507-18.
- Chawla MK, Guzowski JF, Lipa P, Hoffman KL, Marriott LK, Worley PF, *et al.* (2005). Sparse, Environmentally Selective Expression of Arc RNA in the Upper Blade of the Rodent Fascia Dentata by Brief Spatial Experience. *Hippocampus*, 586(May), 579-586.
- Choi SH, Li Y, Parada LF, Sisodia SS. (2009). Regulation of hippocampal progenitor cell survival, proliferation and dendritic development by BDNF. *Mol Neurodegener*, 4:52.
- Clelland CD, Choi M, Romberg C, Clemenson GD, Fragniere A, Tyers P, Jessberger S, Saksida LM, Barker RA, Gage FH and Bussey, TJ. (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 (4466), 207-10.
- Cotman CW & Berchtold NC. (2002). Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci*, 25(6), 295-301.
- Czurko A, Hirase H, Csicsvari J, Buzsáki G (1999) Sustained activation of hippocampal pyramidal cells by “space clamping” in a running wheel. *Eur J Neurosci.*, 11,344 –352.
- Dolorfo CL & Amaral DG. a (1998). Entorhinal cortex of the rat: topographic organization of the cells of origin of the perforant path projection to the dentate gyrus. *J Comp Neurol.*, 398(1), 25-48.
- Dolorfo CL & Amaral DG. b (1998). Entorhinal cortex of the rat: organization of intrinsic connections. *J Comp Neurol.*, 398(1), 49-82.

- Drapeau E, Mayo W, Aurousseau C, Le Moal M, Piazza PV, Abrous DN. (2003). Spatial memory performances of aged rats in the water maze predict levels of hippocampal neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 14385–14390
- Duman RS. (2004). Depression: a case of neuronal life and death? *Biol Psychiatry*, 56(3), 140-5
- Dupret D, Fabre A, Döbrössy MD, Panatier A, Rodríguez JJ, Lamarque S, Lemaire V, Olié SH, Piazza PV, Abrous DN. (2007). Spatial learning depends on both the addition and removal of new hippocampal neurons. *Plos Biol*. 5(8), e214.
- Dupret D, Revest JM, Koehl M, Ichas F, De Giorgi F, Costet P, Abrous DN, Piazza PV. (2008). Spatial Relational Memory Requires Hippocampal Adult Neurogenesis. *PLoS One*. 3(4):e1959.
- Eichenbaum H, Kuperstein M, Fagan A & Nagode J. (1987). Cue-Sampling and Goal-Approach Correlates of Hippocampal Activity in Rats Performing an Odor-Discrimination Task. *Journal of Neuroscience*, 7(March), 719-732.
- 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? *Science*, 23, 209-226.
- Encinas JM, Michurina TV, Peunova N, Park JH, Tordo J, Peterson DA, Fishell G, Koulakov A, Enikolopov G. (2011). Division-coupled astrocytic differentiation and age-related depletion of neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell*, 8(5), 566-79.
- Esposito MS, Piatti V C, Laplagne D, Morgenstern NA, Ferrari CC, Pitossi FJ, Schinder AF. (2005). Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. *J. Neurosci*, 25 (44), 10074-10086.
- Ewell, L. A., & Jones, M. V. (2010). Frequency-Tuned Distribution of Inhibition in the Dentate Gyrus. *J. Neurosci*, 30(38), 12597-12607.
- Fanselow MS, Dong HW. (2010). Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron*. 65(1), 7-19.
- Ferbinteanu J & McDonald R J. (1999). Lesions of the medial or lateral perforant path have different effects on hippocampal contributions to place learning and on fear conditioning to context. *Behavioural Brain Research*, 101, 65 - 84.
- Ferreira AF, Real CC, Rodrigues AC, Alves AS, Britto LR. (2011). Short-term, moderate exercise is capable of inducing structural, BDNF-independent hippocampal plasticity. *Brain Research*, 1425, 111-22.
- Foster TC, Castro CA, McNaughton BL (1989) Spatial selectivity of rat hippocampal neurons: dependence on preparedness for movement. *Science*, 244, 1580–1582.
- Fox SE & Ranck JB Jr (1975). Localization and anatomical identification of theta and complex spike cells in dorsal hippocampal formation of rats. *Exp Neurol*; 49(1 Pt 1),299-313
- Freund T F, & Buzsaki G. (1996). Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*, 6(4), 347-470.
- Frotscher M. (1991). Target cell specificity of synaptic connections in the hippocampus. *Hippocampus*. 1(2), 123-30.

- Fyhn M, Hafting T, Treves A, Moser M & Moser E I. (2007). Hippocampal remapping and grid realignment in entorhinal cortex. *Nature*, 446 (7489), 190-194.
- Gage FH. (2000). Mammalian neural stem cells. *Science*, 287 (5457), 1433-8. Review.
- Gainey MA, Hurvitz-Wolff JR, Lambo ME, Turrigiano GG. (2009). Synaptic scaling requires the GluR2 subunit of the AMPA receptor. *J Neurosci.*, 29(20), 6479-89.
- Garthe, A., Behr, J., & Kempermann, G. (2009). Adult-Generated Hippocampal Neurons Allow the Flexible Use of Spatially Precise Learning Strategies. *Plos One*, 4(5).
- Ge S, Goh E., Sailor K A, Kitabatake Y, Ming GL, Song H, *et al.* (2006). GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature*, 439, 589-593.
- Ge S, Sailor K A, Ming G & Song, H. (2008). Synaptic integration and plasticity of new neurons in the adult hippocampus. *The Journal of Physiology*, 586(16), 3759-65.
- Giachino C, De Marchis S, Giampietro C, Parlato R, Perroteau I, Schütz G, Fasolo A, Peretto P (2005) cAMP response element-binding protein regulates differentiation and survival of newborn neurons in the olfactory bulb. *J Neurosci*, 25, 10105–10118.
- Gilbert PE, Kesner RP, & Decoteau W. (1998). Memory for Spatial Location: Role of the Hippocampus in Mediating Spatial Pattern Separation. *Journal of neuroscience*, 18(2), 804-810.
- Gilbert PE, Kesner RP, Lee I. (2001) Dissociating hippocampal subregions: double dissociation between dentate gyrus and CA1. *Hippocampus*, 11(6), 626-36.
- Hafting T, Fyhn M, Molden S, Moser M & Moser EI. (2005). Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. *Nature*, 436(August), 801-806.
- Ibata K, Sun Q, Turrigiano GG. (2008). Rapid synaptic scaling induced by changes in postsynaptic firing. *Neuron*, 27;57(6), 819-26.
- Jagasia R, Steib K, Englberger E, Herold S, Faus-Kessler T, Saxe M, Gage FH, Song H, Lie DC. (2009). GABA-cAMP response element-binding protein signaling regulates maturation and survival of newly generated neurons in the adult hippocampus. *J Neurosci.* 29(25), 7966-77.
- Jones SP, Rahimi O, O'Boyle MP, Diaz DL, Claiborne BJ (2003) Maturation of granule cell dendrites after mossy fiber arrival in hippocampal field CA3. *Hippocampus*, 13,413-427.
- Jung MW, McNaughton BL. (1993). Spatial selectivity of unit activity in the hippocampal granular layer. *Hippocampus*.3(2), 165-82.
- Jung MW, Wiener SI, McNaughton BL. (1994) Comparison of spatial firing characteristics of units in dorsal and ventral hippocampus of the rat. *Journal of Neuroscience*, 14(12), 7347-56.
- Kelsch W, Lin CW, Mosley CP, Lois C (2009) A critical period for activity-dependent synaptic development during olfactory bulb adult neurogenesis. *J Neurosci.*, 29, 11852–11858.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. (1997) More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*. 386(6624), 493-5.

- Kempermann G, Brandon EP, Gage FH (1998) .Environmental stimulation of 129/SvJ mice causes increased cell proliferation and neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Curr Biol.*, 8 (16), 939-42.
- 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, 391-399.
- Kobilo T, Liu QR, Gandhi K, Mughal M, Shaham Y, van Praag H.(2011). Running is the neurogenic and neurotrophic stimulus in environmental enrichment. *Learn Mem*, 8(9), 605-9
- Kokaia Z, Lindvall O. (2003).Neurogenesis after ischaemic brain insults. *Curr Opin Neurobiol*, 13(1), 127-32.
- Korb E, Finkbeiner S. (2011). Arc in synaptic plasticity: from gene to behavior. *Trends Neurosci*, 34(11), 591-8.
- Kronenberg G, Reuter K, Steiner B, Brandt MD, Jessberger S, Yamaguchi M, *et al.* (2003). Subpopulations of Proliferating Cells of the Adult Hippocampus Respond Differently to Physiologic Neurogenic Stimuli. *Journal of Comparative Neurology*, 467 (April), 455- 463.
- Kuhn GH & Gage FH. (1996). Neurogenesis in the Dentate Gyrus of the Adult Rat: Age- related Decrease of Neuronal Progenitor Proliferation. *Journal of neuroscience*, 16(6), 2027-2033.
- Kuipers SD, Tiron A, Soule J, Messaoudi E, Trentani A, *et al.* (2009) Selective Survival and Maturation of Adult-Born Dentate Granule Cells Expressing the Immediate Early Gene Arc/Arg3.1. *PLoS ONE* 4(3), e4885.
- Kumamoto N, Gu Y, Wang J, Janoschka S, Takemaru KI, Levine J, Ge S. (2012). A role for primary cilia in glutamatergic synaptic integration of adult-born neurons. *Nat Neurosci*. Feb 5. Epub ahead of print.
- Kuwabara T, Hsieh J, Muotri A, Yeo G, Warashina M, Lie DC, Moore L, Nakashima K, Asashima M, Gage FH. (2009). Wnt-mediated activation of NeuroD1 and retro-elements during adult neurogenesis. *Nat Neurosci*. 12, 1097–1105.
- Laplagne DA, Espósito MS, Piatti VC, Morgenstern NA, Zhao C, van Praag H, Gage FH, Schinder AF. (2006). Functional convergence of neurons generated in the developing and adult hippocampus. *PLoS Biol*, 4(12), e409
- Laplagne DA, Kamienkowski JE, Espósito MS, Piatti VC, Zhao C, Gage FH, Schinder AF. (2007). Similar GABAergic inputs in dentate granule cells born during embryonic and adult neurogenesis. *Eur J Neurosci*.(10), 2973-81.
- Lemaire V, Koehl M, Le Moal M, Abrous DN. (2000). Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus. *PNAS*, 97(20), 11032-7.
- Leutgeb JK, Leutgeb S, Moser M, & Moser E I. (2007). Pattern Separation in the Dentate Gyrus and CA3 of the Hippocampus. *Science*, 315, 961-966.
- Leutgeb S, Leutgeb J K, Treves A, Moser M & Moser E I. (2004). Distinct Ensemble Codes in Hippocampal Areas CA3 and CA1. *Science*, 305(5688), 1295-1298.

Lie DC, Colamarino SA, Song HJ, Desire L, Mira H, Consiglio A, Lein ES, Jessberger S, Lansford H, Dearie AR, *et al.* (2005). Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. *Nature*, 437, 1370–1375.

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, 32–39.

Lonze BE & Ginty DD. (2002). Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron*, 35(4), 605–23.

Lu L, Bao G, Chen H, Xia P, Fan X, Zhang J, Pei G, Ma L. (2003). Modification of hippocampal neurogenesis and neuroplasticity by social environments. *Exp Neurol*, 183(2), 600–9.

Lu B. BDNF and activity-dependent synaptic modulation. (2003). *Learn Mem.*, 10(2), 86–98.

Malenka RC, Bear MF. (2004). LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron*, 44(1), 5–21.

Marín-Burgin A, Mongiat LA, Pardi MB, Schinder AF. (2012). Unique Processing During a Period of High Excitation/Inhibition Balance in Adult-Born Neurons. *Science*. [Epub ahead of print].

Mathews EA, Morgenstern NA, Piatti VC, Zhao C, Jessberger S, Schinder AF, Gage FH. (2010). A distinctive layering pattern of mouse dentate granule cells is generated by developmental and adult neurogenesis. *J Comp Neurol*, 518(22), 4479–90.

Mattson MP. (2008). Glutamate and neurotrophic factors in neuronal plasticity and disease. *Ann NY acad Sci.* 1144, 97–112.

Maurer AP, Vanrhoads SR, Sutherland GR, Lipa P, McNaughton BL. (2005). Self-motion and the origin of differential spatial scaling along the septotemporal axis of the hippocampus. *Hippocampus* 15, 841– 852.

Messaoudi E, Kanhema T, Soulé J, Tiron A, Dagyte G, da Silva B, Bramham CR. (2007). Sustained Arc/Arg3.1 synthesis controls long-term potentiation consolidation through regulation of local actin polymerization in the dentate gyrus in vivo. *J Neuroscience*, 27(39), 10445–55.

Mirescu C & Gould E. (2006). Stress and adult neurogenesis. *Hippocampus*. 16(3), 233–8.

Mongiat LA, Esposito MS, Lombardi G & Schinder AF. (2009). Reliable Activation of Immature Neurons in the Adult Hippocampus. *Plos One*, 4(4).

Nilsson M, Perfilieva E, Johansson U, Orwar O, Eriksson PS. (1999) Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory. *Neurobiol*, 39(4), 569–78.

O’Keefe J (1976). Place units in the hippocampus of the freely moving rat. *Exp. Neurol.* 57, 78–109.

O’Keefe J & Dostrovsky J (1971). The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence for unit activity in the freely moving rat. *Brain Research*. 34, 171–175.

O’Keefe J & Nadel L (1978). *The Hippocampus as a Cognitive Map*. Oxford University Press.

Overstreet LS, Hentges ST, Bumashny VF, Souza FS., Smart JL, Santangelo AM, *et al.* (2004). A Transgenic Marker for Newly Born Granule Cells in Dentate Gyrus. *Journal of Neuroscience*, 23(13), 3251-3259.

Overstreet-Wadiche LS, Bromberg DA, Bensen AL, Westbrook GL. (2006). Seizures accelerate functional integration of adult-generated granule cells. *J Neurosci*. 26(15), 4095- 103

Parent JM, Lowenstein DH. (2002). Seizure-induced neurogenesis: are more new neurons good for an adult brain? *Prog Brain Res.* ; 135, 121-31

Paton JA, Nottebohm FN. (1984) Neurons generated in the adult brain are recruited into functional circuits. *Science*, 225(4666), 1046-8.

Petreaanu L, Alvarez-Buylla A. (2002). Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction. *J Neurosci.*, 22(14), 6106-13.

Piatti VC, Espósito MS & Schinder AF. (2006). The Timing of Neuronal Development in Adult Hippocampal Neurogenesis. *The Neuroscientist*, 12(6), 463-468.

Piatti VC, Davies-Sala MG, Espósito MS, Mongiat LA, Trincherro MF, Schinder AF. (2011). The timing for neuronal maturation in the adult hippocampus is modulated by local network activity. *J Neurosci.*, 31(21), 7715-28.

Platel JC, Dave KA, Gordon V, Lacar B, Rubio ME, Bordey A (2010) NMDA receptors activated by subventricular zone astrocytic glutamate are critical for neuroblast survival prior to entering a synaptic network. *Neuron*, 65, 859–872.

Poo MM. Neurotrophins as synaptic modulators. (2001). *Nat Rev Neurosci*. 2(1):24-32.

Pozzo-Miller L. (2006). BDNF enhances dendritic Ca²⁺ signals evoked by coincident EPSPs and back-propagating action potentials in CA1 pyramidal neurons. *Brain Res.* 1104(1), 45-54.

Ramirez-Amaya V, Marrone D F, Gage F H, Worley P F & Barnes C A. (2006). Integration of New Neurons into Functional Neural Networks. *Journal of Neuroscience*, 26(47), 12237-12241

Ramón y Cajal, S. (1911) *Histologie du Système Nerveux de l'Homme et des Vertébrés*. Maloine Paris, France. Este libro fue publicado en inglés en 1995 como "Histology of the Nervous System of Man and Vertebrates (translated by N. Swanson and L.W. Swanson), Oxford University Press.

Sahay A, Scobie K, Hill A, O'Carroll K, Kheirbek MA, Burghardt NS, Fenton AA, Dranovsky A and Hen R. (2011). Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. *Nature*, 472(7344), 466–470.

Schinder AF and Poo M. (2000). The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity. *Trends in Neuroscience*, 23, 639-645.

Scoville WB, Milner B J. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. (1), 11-21.

Seifert T, Brassard P, Wissenberg M, Rasmussen P, Nordby P, Stallknecht B, Adser H, Jakobsen AH, Pilegaard H, Nielsen HB, Secher NH. (2010). Endurance training enhances BDNF release from the human brain. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 298(2), R372-7.

- Snyder JS, Radik R, Wojtowicz JM, Cameron HA. (2009) Anatomical gradients of adult neurogenesis and activity: young neurons in the ventral dentate gyrus are activated by water maze training. *Hippocampus*, 19(4), 360-70.
- Spitzer NC, Root CM, Borodinsky LN. (2004). Orchestrating neuronal differentiation: patterns of Ca²⁺ spikes specify transmitter choice. *Trends Neurosci.* 27(7):415-21.
- Squire LR. (2009). The Legacy of Patient H.M. for Neuroscience. *Neuron*. January 15; 61(1): 6–9.
- 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(August), 929-933.
- 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. *J Neurosci*, 27(12), 3252-9.
- Toni N, Teng EM, Bushong EA, Aimone JB, Zhao C, Consiglio A, van Praag H, Martone ME, Ellisman MH, Gage FH. (2007). Synapse formation on neurons born in the adult hippocampus. *Nat Neurosci.* 10(6), 727-34.
- Toni N, Laplagne DA, Zhao C, Lombardi G, Ribak CE, Gage FH, Schinder AF (2008) Neurons born in the adult dentate gyrus form functional synapses with target cells. *Nat Neuroscience*, 11, 901-907.
- Toni N & Sultan S. (2011). Synapse formation on adult born hippocampal neurons. *European Journal of Neuroscience*, 33, 1062-1068.
- Treves A, Tashiro A, Witter M & Moser E I. (2008). What is the mammalian dentate gyrus good for? *Neuroscience*, 154(4), 1155-72.
- Trichas G, Begbie J, Srinivas S. (2008). Use of the viral 2A peptide for bicistronic expression in transgenic mice. *BMC Biol.*, 6, 40.
- Turrigiano G. (2011). Too many cooks? Intrinsic and synaptic homeostatic mechanisms in cortical circuit refinement. *Annu Rev Neurosci.* 34, 89-103.
- Van Praag H, Kempermann G & Gage F H. (1999). Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nature*, 2(3), 266-270.
- Van Praag H, Kempermann G, Gage FH. (2000). Neural consequences of environmental enrichment. *Nat Rev Neurosci*, 1(3), 191-8
- Van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH, *et al.* (2002). Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature*, 415(February), 1030-1034.
- Vanderwolf CH. (1969). Hippocampal electrical activity and voluntary movement in the rat. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 26, 407– 418.
- Watt SD, Gu X, Smith RD, Spitzer NC. (2000) Specific frequencies of spontaneous Ca²⁺ transients upregulate GAD 67 transcripts in embryonic spinal neurons. *Mol Cell Neurosc.*, 16(4):376-87.

Wexler EM, Paucer A, Kornblum HI, Plamer TD, Geschwind DH. (2009). Endogenous Wnt signaling maintains neural progenitor cell potency. *Stem Cells*, 27,1130–1141.

Wiegert JS and Bading H. (2010). Activity-dependent calcium signaling and ERK-MAP kinases in neurons: A link to structural plasticity of the nucleus and gene transcription regulation. *Cell Calcium*. 49, 296–305.

Wilson MA & McNaughton BL. (1993). Dynamics of the hippocampal ensemble code for space. *Science*, 261(5124), 1055-8.

Witter MP & Lopes FH. (1989). Functional organization of the extrinsic and intrinsic circuitry of the parahippocampal region. *Progress in Neurobiology*, 33, 161-253.

Wojtowicz JM, Askew ML, Winocur G. (2008). The effects of running and of inhibiting adult neurogenesis on learning and memory in rats. *Eur J Neurosci*. 27(6), 1494-502.

Wu CW, Chang YT, Yu L, Chen HI, Jen CJ, Wu SY, Lo CP, Kuo YM. (2008). Exercise enhances the proliferation of neural stem cells and neurite growth and survival of neuronal progenitor cells in dentate gyrus of middle-aged mice. *J Appl Physiol*. 105(5), 1585-94.

Ying SW, Futter M, Rosenblum K, Webber MJ, Hunt SP, Bliss TV, Bramham CR. (2002). Brain-derived neurotrophic factor induces long-term potentiation in intact adult hippocampus: requirement for ERK activation coupled to CREB and upregulation of Arc synthesis. *J Neurosci*. 22(5), 1532-40.

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. *J Neurosci.*, 26(1), 3-11.

Zhao C, Deng W & Gage FH. (2008). Mechanisms and Functional Implications of Adult Neurogenesis. *Cell*, 645-660.

Zola-Morgan SM, Squire LR. (1990). The primate hippocampal formation: evidence for a time-limited role in memory storage. *Science*, 250(4978), 288-90.

Publicaciones

El trabajo de esta tesis dio origen a la publicación “The timing for neuronal maturation in the adult hippocampus is modulated by local network activity” Piatti VC*, Davies-Sala MG*, Espósito MS*, Mongiat LA, Trinchero MF, Schinder AF. Publicado en la revista *Journal of Neuroscience* el 25 de mayo de 2011; 31(21); 7715-28.

* Autores con igual contribución.

Anexo I

Construcción de Kir2.1_{NC}

Para completar el estudio del efecto de Kir2.1 se construyó un canal mutado Kir2.1_{NC}, lo llamamos NC por las siglas en inglés de “non conducting”. Anteriormente fue caracterizado y utilizado por otros grupos (Burrone J *et al.* 2002). Se hizo mediante mutagénesis sitio dirigida (PCR overlapped), se utilizó como molde de PCR el genoma del vector retroviral CAG-Kir2.1 IRES RFP, se mutaron tres aminoácidos del poro del canal, se sustituyeron la glicina₁₄₄, tirosina₁₄₅, glicina₁₄₆ (GYG) por tres alaninas (AAA). Estos aminoácidos son esenciales para la selectividad del poro, por lo tanto esta mutación generó un canal que no conduce potasio. Para realizar la mutagénesis sitio dirigida se diseñaron primers específicos para cambiar la secuencia GYG por AAA. La secuencia aminoacídica de Kir2.1 de ratón es la siguiente y en gris se muestran los aminoácidos del poro que fueron reemplazados por alaninas:

Secuencia aminoacídica de Kir2.1 de ratón:

MGSVRTNRYSIIVSSEEDGMKLATMAVANGFGNGKSKVHTRQQCRSRFVKKGHCNVQFINVGEKGQRY
LADIFTTCVDIRWRWMLVIFCLAFVLSWLFFGCVFWLIALHGDLDTSKVSACVSEVNSFTAFLFS
IETQTTI**GYG**FRCVTDECPIAVFMVVFQSIIVGCIIDAFIIGAVMAKMAKPKKRNETLVFSHNAVIAMR
DGKLCMLWRVGNLRKSHLVEAHVRAQLLKSRTSEGEYIPLDQIDINVGFDSGIDRIFLVSPITIVHE
IDEDSPLYDLSKQDIDNADFEIVVILEGMVEATAMTTQCRSSYLANEILWGHRYEPVLFEEKHYKVD
YSRFHKTYEVPNTPLCSARDLAEKKYILSNANSFCYENEVALTSKEEEEEDSENGVPESTSTDSPPGID
LHNQASVPLEPRPLRRESEI

Secuencia nucleotídica de Kir2.1 en el genoma retroviral:

En color rojo se muestra la secuencia nucleotídica completa del cDNA de kir2.1 de ratón (1287 nucleótidos) con su respectivo codón de iniciación y terminación marcados en negrita. Sombreado en gris al comienzo y al final de la secuencia, se muestra la región de apareamiento con los primers diseñados para el subclonado. En la región del medio sombreado de color amarillo se marca la secuencia de aminoácidos del poro del canal que serán mutados:

GCA**atggggcagtgtagaa**ccaaccgctacagcatcgtctcttcggaggaagatggcatgaagctggc
cactatggcagttgccaatggcttttgggaatggcaagagtaaagtccatacccgacaacagtgcagga
gccgctttgtgaagaaagatggtcattgcaatgttcagtttatcaacgtgggtgagaagggaagaggg

tacctggcagacatctttactacctgtgtcgacatccgctggaggtggatgctgggttatcttctgtct
 tgccttcgtgctctcctggctgttctttggctgtgtgttttggttgatagccctgctccatggggatc
 tagatacttctaaagtgagcaaagcatgcgtgtcgaggtcaacagcttcacggctgccttcctcttc
 tccatcgagaccagacaaccatt**ggctatggt**ttcaggtgtgtgacagacgagtgcccaattgctgt
 cttcatgggtggtattccagtcattttaggctgcatcattgacgccttcattcattgggtgcagtcattgg
 cgaagatggcaaagccaaagaagagaaatgagactcttgtcttcagtcacaatgctgtgattgccatg
 agggatggcaaactctgcttgatgtggagagtgggtaaccttcgaaagagccaccttggtggaagctca
 tgtccgggacagcttctcaaacttaggatcattcagaaggggagtatatccctttggaccagatag
 acatcaatgttggttttgatagtgggaattgaccgcataatttctagtgtcccccatactatcggtcac
 gaaatagatgaagacagccctttatatgacttgagtaagcaggacattgacaatgcagactttgaaat
 tgttgtcactactggaaggcatggtggaggcgactgccatgacaactcaatgccggagttcgtatctgg
 ccaatgaaattctctggggtcacgcctatgagccagtgtctttgaagagaaacactactataaagta
 gactattcaagattccataagacttatgaagtacctaacacccccctttgtagtgccagagacttagc
 agagaagaaatacatcctttcaaattgcaaattcattttgctatgaaaatgaagttgccctaacaagca
 aagaggaagaggaggatagtgagaacggagtcccagagagcacaagcacagactcacctcctggcata
 gatctccacaaccagggaagcgtacctctagagcccaggcccttaaggcgagaatcgagagata**tga**CT
 GGCTGATTCCGTCTTTGGAATACTTACTTTGCTACACAGCCTGACGTTGGTC

La región sombreada de amarillo corresponde a **ggctatggt** en cursiva y negrita se resaltan los nucleótidos del código genético que se cambiaron para que los codones codifiquen para alaninas, la secuencia original se reemplazó por: **gccgctgct**.

Primers utilizados:

Nro 1-mutación primer orientación 5'→3'(foward): 5'gacaaccattg**gccgctgct**tttcaggtgtg
 3'

Nro 2-mutación primer orientación 3'→5'(reverse): 5'cacacctgaaag**gcagcgg**caatgggtgtc
 3'

Nro 3-subclonado primer región 5'→(foward):5' ATGGATCCGCA**atggggcagtg**tgagaa 3'

Nro4-subclonado primer región 3'→(reverse):5' GGGATCCGACCAACGTCAGGCTGTGTAG 3'

Se utilizó como molde el genoma del retrovirus CAG-Kir2.1-IRES-RFP y se realizaron dos PCRs, una con el juego de primers nro 3 y nro 2, y en la otra reacción se utilizaron los primers nro 1 y nro 4. Se obtuvieron dos fragmentos de PCR de 459 y de 928 nucleótidos respectivamente, los cuales fueron purificados del gel de agarosa con un kit "geneclean" y éstos fueron utilizados como

molde para una PCR overlapped, en la cual se utilizaron los primers nro 3 y nro 4. El fragmento final overlapped fue ligado al vector TOPO cloning y enviado a secuenciar para confirmar la mutación puntual. Una vez obtenida la colonia positiva del vector TOPO (Zero Blunt TOPO, Invitrogen) con el inserto Kir_{NC}, el plásmido fue amplificado, purificado y digerido con la enzima BamH1. El vector conteniendo el genoma viral CAG-Kir2.1-IRES-RFP también fue digerido con BamH1 para extraer el Kir2.1 que contenía, se purificó del gel el vector viral sin inserto y se ligó con Kir2.1_{NC} digerido extraído del plásmido TOPO. Una vez obtenidos los clones positivos, se envió a secuenciar el vector del genoma retroviral para la confirmación de la mutación puntual. El mismo procedimiento se hizo para clonar el canal Kir2.1_{NC} en el genoma viral para realizar la construcción CAG-Kir2.1_{NC}-IRES-GFP.

El detalle de los protocolos utilizados se describe a continuación:

Transformación de bacterias *E.coli* DH5 α con el vector CAG-Kir-IRES-RFP por shock térmico:

- 1) 50 μ l de cultivo de bacterias competentes químicas
- 2) 1 μ l de plásmido
- 3) 30 minutos en hielo
- 4) 1 minuto a 42°C
- 5) 2 minutos en hielo
- 6) Se agrega 1 ml de LB y se agita en agitador horizontal a 37 ° C durante 1 hora
- 7) Se siembra una placa de LB Agar con antibiótico de selección en este caso Ampicilina
- 8) Se lo deja toda la noche a 37° C

De esta placa se selecciona una colonia aislada y se la deja crecer toda la noche en LB con ampicilina. Al día siguiente se cosechan las bacterias y se realiza una miniprep o minipreparación de DNA, que es el proceso para purificar el DNA del resto de la bacteria por medio de lisis alcalina desarrollado por Birnboim y Doly. El método se basa en una desnaturalización por alto pH del ADN plasmídico y cromosómico, pero al reducir el pH con acetato, el único que se puede renaturalizar es el DNA plasmídico porque queda covalentemente cerrado.

Miniprep:

- 1) Centrifugación de las bacterias 2 minutos a 10000 rpm. Se descarta el sobrenadante
- 2) Se resuspenden las bacterias con vórtex en 300 μ l de solución 1

- 3) Se agregan 300 µl de solución 2, se mezcla por inversión 3 veces, se lo deja como máximo 5 minutos a temperatura ambiente
- 4) Agregado de 300 µl de solución 3, se mezcla por inversión 10 veces y se deja 10 minutos en hielo.
- 5) Centrifugación a 13000 RPM a 4°C 10 minutos, el sobrenadante se pasa a un tubo limpio y se le agrega RNAsa A. Se incuba 1 hora a 37° C.
- 6) Agregado de 700 µl de isopropanol. Centrifugado 30 minutos 13000 rpm 4°C
- 7) Transvasar el sobrenadante a un tubo limpio y agregar 1 ml de etanol 70% en agua, centrifugar 10 minutos a 13000 rpm
- 8) Descartar el sobrenadante y dejar secar el pellet
- 9) Resuspensión en 50 µl de agua bidestilada o miliq autoclavada.

El DNA obtenido fue cuantificado por un espectrofotómetro, se midió la absorbancia a 260 nm que es la longitud de onda que absorbe el DNA y a 280 nm es la longitud de onda que absorbe los anillos aromáticos del triptófano, se cuantifican las proteínas de la muestra para medir el grado de pureza de la purificación. Luego se corrió un gel de agarosa para comprobar que en la muestra no haya DNA genómico ni tampoco contaminaciones con RNA. Una vez obtenido el DNA plasmídico (molde), se realizaron dos PCR para amplificar los dos fragmentos de Kir2.1 en los cuales se inserta la mutación.

PCR:

PCR 1 fragmento de 459 pares de bases		PCR 2 fragmento de 928 pares de bases		Ciclos:	
MgSO ₄ (50mM)	2µl	MgSO ₄ (50mM)	2µl	94°C 5 min	
Buffer de PCR 10x	5µl	Buffer de PCR 10x	5µl	35 ciclos:	94°C 45 seg
dNTP (100mM)	2µl	dNTP (100mM)	2µl		63°C 60 seg
ADNc	xµl	ADNc	xµl		68°C 60 seg
Primer nro 3 (100ng/µl)	2µl	Primer nro1 (100ng/µl)	2µl	68°C 10 min	
Primer nro 2 (100ng/µl)	2µl	Primer nro 4 (100ng/µl)	2µl	Recuperación de las bandas	
Taq polimerasa alta fidelidad	1µl	Taq polimerasa alta fidelidad	1µl	Purificación en gel de agarosa	
H ₂ O, hasta completar	50µl	H ₂ O, hasta completar	50 µl		

Las reacciones de PCR se corrieron por electroforesis en un gel de agarosa 1% con Bromuro de etidio 0,01% en buffer TAE1X a 90 mV. Las bandas correspondientes a los fragmentos de DNA a purificar se cortaron del gel visualizándolas por medio de transiluminación por UV y se purificaron con el kit “Wizard DNA Cleanup® System” (PROMEGA), siguiendo las instrucciones del fabricante

PCR overlapped:

Los dos fragmentos de PCR producidos anteriormente poseen una región de 29 nucleótidos de solapamiento, que es la región en la cual se insertan las mutaciones. En esta PCR lo que se realiza primero es un gradiente de temperatura sin primers para que los dos fragmentos de DNA se solapen y complementen sus hebras de DNA hacia el 3', el gradiente se realiza desde de 95°, 90°... hasta 40 ° C, 30 segundos a cada temperatura y luego 1 minuto a 68° C, luego de estos ciclos, los moldes están completamente sintetizados y se le agrega los primers para que comience la reacción de PCR.

MgSO ₄ (50mM)	2µl	Ciclos:
Buffer de PCR 10x	5µl	94°C 5 min
dNTP (100mM)	2µl	35 ciclos: 94°C 45 seg
ADNc	xµl	63°C 60 seg
Primer nro 3 (100ng/µl)	2µl	68°C 60 seg
Primer nro 4 (100ng/µl)	2µl	68 °C 10 min
Taq polimerasa alta fidelidad	1µl	Recuperación de la banda
H ₂ O, hasta completar	50 µl	Purificación en gel de agarosa

El fragmento obtenido se purificó del gel como mencionamos anteriormente y fue ligado al vector TOPO según recomendaciones del fabricante (Zero Blunt TOPO, Invitrogen). Con la reacción de la ligación se transformaron bacterias *E. coli*. competentes químicas por el método de shock térmico y se las sembró en medio LB agar conteniendo kanamicina como antibiótico de selección. Se dejaron una noche a 37 °C y se seleccionaron varias colonias para la extracción de su DNA plasmídico y se testeó si contenían el inserto analizando el patrón de corte de enzimas. Las colonias positivas fueron confirmadas por secuenciación para chequear que estuviese la mutación deseada.

El vector que contenía el inserto Kir2.1_{NC} fue digerido con la enzima BamH1 (New England Biolabs), la banda correspondiente a Kir2.1_{NC} de 1287 nucleótidos fue purificada del gel. También digerimos con BamH1 el vector que contiene CAG-Kir-IRES-RFP y purificamos la banda correspondiente al vector de 6000 pares de bases aproximadamente. La reacción de digestión fue la siguiente:

- 10 µg DNA
- 2 µl de buffer 10x BamH1
- 2 µl de BSA (10mg/ µl)
- 2 µl de BamHI

- H₂O hasta completar 20 µl

La mezcla se incubó durante 3 horas a 37° C. Luego se le agregó al vector fosfatasa alcalina para removerle los grupos fosfato y evitar la religación del mismo. La enzima que se utilizó fue SAP de Promega se siguió con las instrucciones del fabricante se la incubó 1 hora a 37° C. Luego las bandas fueron cortadas del gel y purificadas, una vez purificadas se corrió un gel de agarosa para cuantificar la masa, para luego proceder a la ligación de ambas moléculas.

Ligación:

Una vez cuantificadas por gel de agarosa 1% + Br Et 0.01%, se utilizaron las siguientes relaciones inserto/plásmido 1:1, 3:1 y 5:1. Las ligaciones se armaron en un volumen final de 10µl conteniendo: 1µl de Buffer de Ligación, 0,5µl de T4 Ligasa (5 U/µl) y H₂O hasta completar el volumen. Las muestras se incubaron toda la noche a 16° C ó 2-3 hs a temperatura ambiente. La reacción se detuvo mediante una incubación a 65° C por 10 minutos. Luego, se transforman bacterias *E.coli* DH5α electrocompetentes debido a que el vector ligado al inserto es de un gran tamaño casi 8 kilo pares de bases, se necesitan bacterias muy eficientes, es decir que puedan captar más moléculas de DNA y más grandes, por ello utilizamos estas bacterias.

Electroporación:

1. 50-100µl de cultivo saturado de bacterias electrocompetentes
2. 2µl de plásmido
3. 10 minutos en hielo
4. Transferir a cubeta de electroporación
5. Electroporar a 2,5 Kv, 25 µF y 200Ω τ4,6-4,7
6. Lavar inmediatamente con 1ml de SOB y pasar a un tubo estéril.
7. Incubar por 1 hora en agitación a 200 rpm a 37° C
8. Sembrar en medio LB-Ampicilina sólido y dejar crecer a 37° C toda la noche

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

Soluciones y buffers:

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

Soluciones para Miniprep:

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

Protocolo de inmunofluorescencia normal:

Las inmunofluorescencias fueron realizadas con la técnica de “free floating” (rodajas libres en solución) utilizando secciones a lo largo de todo el eje septo-temporal del hipocampo o solo de los polos septales y temporales, dependiendo del experimento a realizar. El protocolo consistió en:

- 1) 3 lavados de 5 minutos con TBS 1 X (TBS 10x: 132,2g de Trizma HCl; 19,4g de Trizma Base y 90 g de NaCl llevado a 1 Lt 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) 72 horas de incubación con el anticuerpo primario con agitación a 4° C.
- 4) 2 lavados de 15 minutos con TBS 1 X con agitación a temperatura ambiente.
- 5) 15 minutos de bloqueo con agitación a temperatura ambiente.
- 6) 2 horas de incubación con el anticuerpo secundario con agitación a temperatura ambiente.
- 7) 3 lavados de 5 minutos con TBS 1 X con agitación a temperatura ambiente.
- 8) 10 minutos de incubación con solución de DAPI (4',6-daimidino-phenylindole, Sigma D9542), 3 µl del stock en 30 ml de TBS1X (Stock a -20° C 1mg/ml, 3mM)) para contraste fluorescente.
- 9) 4 lavados 5 minutos con TBS1X 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 se mantienen en oscuridad y a 4° C para aumentar la estabilidad de los fluoróforos.

Este protocolo fue modificado para la inmunofluorescencia en la cual se utilizaba el anticuerpo primario anti Calbindin, en ese caso para descubrir el epítipo se agregó un paso entre el

1 y el 2 se hizo una incubación en Metanol absoluto durante 20 minutos a temperatura ambiente y luego se lavó con TBS 1X, 5 veces durante 5 minutos.

Protocolo de inmunohistoquímica anti BrdU:

- 1) 3 lavados de 5 minutos con TBS 1 X (TBS 10x: 132,2g de Trizma HCl, 19,4g de Trizma Base y 90 g de NaCl llevado a 1 Lt de agua pH 7,5) con agitación a temperatura ambiente.
- 2) Inhibición de peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 0.6% en TBS durante 30 minutos con agitación.
- 3) 3 lavados de 5 minutos en TBS 1X con agitación
- 4) 1 hora de bloqueo (Solución de bloqueo: TBS con suero de burro y 0.25% de Triton X-100) con agitación a temperatura ambiente.
- 5) 48 ó 72 horas de incubación con el anticuerpo primario con agitación a 4° C, en este caso anti BrdU rata.
- 6) 2 lavados de 15 minutos con TBS 1 X con agitación a temperatura ambiente.
- 7) 15 minutos de bloqueo con agitación a temperatura ambiente
- 8) Incubación con anticuerpo secundario diluido solución de bloqueo, se deja 2 horas a temperatura ambiente, se utiliza anticuerpo secundario anti rata conjugado con Biotina dilución 1:250.
- 9) Mientras tanto se prepara la solución del kit ABC/Elite y se mantiene a 4° C se debe incubar al menos 30 minutos en hielo. Se agrega 9 µl de A en TBS, se vortexea y se agregan 9 µl de B, vortexear.
- 10) Se hacen 3 lavados de 5 minutos en TBS 1X con agitación a temperatura ambiente.
- 11) Se incuba con el kit standard ABC/Elite durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación.
- 12) Se va preparando una solución de NiCl₂ para dar más contraste a la tinción, esta solución se mantiene a 4° C. (Solución Níquel, 50 µl de NiCl₂ (8%) cada 10 ml de TBS 1X)
- 13) Se lavan las secciones 3 veces durante 5 minutos con TBS 1X, agitación temperatura ambiente.
- 14) Se prepara la solución de DAB (125 µl de DAB, 3 µl de H₂O₂ al 30% y 10 ml de solución de Níquel preparada en el paso 12)
- 15) Se realiza la reacción de DAB, el tiempo de reacción se debe estandarizar en paralelo, generalmente entre 10 y 13 minutos. La reacción se detiene pasando las rodajas a un well con TBS1X.
- 16) Se hacen 4 lavados de 5 minutos en TBS 1X agitación temperatura ambiente.
- 17) Se monta con PVA DABCO.

Abreviaturas

ES: error estándar
dpi: días post inyección
GCL: capa granular
DG: giro dentado
DGC: neuronas granulares del giro dentado
PCR: reacción en cadena de la polimerasa

NGC: neuronas granulares
Kir2.1: canal de rectificación entrante de potasio 2.1
Kir_{NC}: canal de rectificación entrante de potasio 2.1 con el poro del canal mutado, no conduce K⁺
hM3D: RASSL modificado asociado a proteína G inhibitoria
hM4D: RASSL modificado asociado a proteína G activadora
LEC: corteza lateral entorrinal
MEC: corteza medial entorrinal
SVZ: zona subventricular
SGZ: zona subgranular
BrdU: Bromo deoxiuridina
IRES: Sitio de entrada del ribosoma
MMLV: moloney murine leukemia virus
CNO: clonazepine-N-oxide
RASSL receptores activables solo por ligando sintético:
2A: secuencia de péptido autoclivable derivado de picornavirus
Arc: Activity related cytoskeleton protein
IEG: immediately early gen, gen de respuesta inmediata
BDNF: brain derived neurotrophic factor
R_m: Resistencia de la membrana
MCL: capa molecular (molecular cell layer)