



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

MODIFICACIONES PLÁSTICAS ESTRUCTURALES EN LAS CÉLULAS DEL HIPOCAMPO
QUE RESPONDEN A LA CONDUCTA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

MARIANA CARASATORRE MUSURUANA

DIRECTOR DE TESIS

DRA. SOFÍA YOLANDA DÍAZ MIRANDA, INB

COMITÉ TUTOR

DRA. MARTHA LILIA ESCOBAR RODRÍGUEZ

FACULTAD DE PSICOLOGÍA, UNAM

DRA. ELVIRA MARÍA GALÁRRAGA PALACIO

INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR, UNAM

JURIQUILLA, QUERÉTARO AGOSTO DE 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Los miembros del Jurado certificamos que la tesis elaborada por: Mariana Carasatorre Musuruana cuyo título es: Modificaciones plásticas estructurales en las células del hipocampo que responden a la conducta, se presenta como requisitos para obtener el grado de Doctor en Ciencias (Biomédicas) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Presidente

Dr. Roberto A. Prado Alcalá

Secretaria (Tutora)

Dra. Sofía Yolanda Díaz Miranda

Vocales

Dra. Ma. de la Luz Torner Aguilar

Dr. Alonso Fernández Guati

Dr. Rafael Gutiérrez Aguilar

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la oportunidad de realizar el Doctorado en Ciencias Biomédicas en el Instituto de Neurobiología.

Agradezco al programa de Posgrado en Ciencias Biomédicas (PCB), al Instituto de Neurobiología (INB) y a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por el apoyo brindado para la realización de mis estudios de doctorado. También agradezco al CONACyT por haberme otorgado la beca para llevar a cabo mis estudios del Doctorado. Registro N° 239669.

A la dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) por el apoyo de los proyectos de investigación UNAM PAPIIT IN216510-23 y IN-201613).

A la Unidad de Posgrado por las asesorías brindadas de Z. Martínez Estrella

A las Unidades de Apoyo del Instituto de Neurobiología, Campus UNAM Juriquilla Qro.

- Microscopía y Análisis de Imágenes, por el apoyo técnico de N. E. Hernández Ríos
- Enseñanza a la M en C. L. Casanova Rico y Ma del Carmen.
- Cómputo por la asistencia de los Ings. R. Martínez, S. Hernández y O. González
- Videoconferencia, a la Lic. L. Lara Ayala
- Bioterio, M.V.Z. J.M. García Servín
- Biblioteca del Campus, Dr. F.J. Valles y S. Medina.

Agradezco también a los miembros de mi comité tutorial; a la Dra. Sofía Yolanda Díaz Miranda, a la Dra. Martha Lilia Escobar Rodríguez y a la Dra. Elvira Galarraga Palacio por haberme aconsejado, por haberme apoyado y por haber contribuido a mi formación académica.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Ante todo y, muy en especial, quiero agradecer profundamente a mi compañero, maestro y amor, Víctor Ramírez Amaya. Por haberme enseñado tanto y con tanta pasión la mayor parte de lo que he aprendido durante este camino para llevar a cabo el doctorado en ciencias biomédicas, por apoyarme, aconsejarme y entender quién y cómo soy. Y, principalmente, por la increíble confianza que depositó en mí desde el primer día... A ti, Víc, te estoy infinitamente agradecida.

También quiero agradecer enormemente a la Dra. Sofía Yolanda Díaz Miranda, por haber confiado plenamente en mí y asumir mi tutoría. Porque como profesional y ser humano es un ejemplo de mujer; por sus fuerzas, sus ganas y su dedicación... Gracias Dra. Sofi.

Sin lugar a duda, no puedo dejar de reconocer el incondicional apoyo del que jamás carecí y es el de mi maravillosa familia; mi mamá, con su dulzura y constante comprensión; a mi papá con sus consejos acertados y su amor y a mi hermano quien me ha enseñado mucho sobre la nobleza y a quien adoro con el alma. Por supuesto a ti, abuelita Laly, porque siempre me has acompañado, me has cuidado y me has enseñado un verdadero ejemplo de vida; sos un ángel lleno de sabiduría y amor. Y, cómo no, a mi hermana del alma Vane, quien me ha enseñado mucho caminando a mi lado. Gracias!!!

También quiero agradecer a mi gran amiga Ire, quién me dio la mejor bienvenida a su país, México. Con su increíble calidez y la calidez de su familia pude sentirme realmente bienvenida en una tierra nueva y una nueva cultura social. Gracias amiga, por tu cariño y sincera amistad... Gracias.

A mis compañeros de laboratorio, a Dama, a Rafa, a Pao, a Alex, a Giovis, a Nayla, a Pascal, a Livi, a Cut y a Carlos... Muchas Gracias!! Porque, cada quién de una manera diferente me ha ayudado a crecer, me ha apoyado y me ha brindado su cálida amistad.

DEDICATORIA

Con todo mi amor, al ser que más amo... Matilda Sofía, porque, al igual que tu padre, me enseñaste mucho de la vida y me ayudaste a crecer como ser humano.

Seguiré creciendo para darte siempre, lo mejor de mí!

ÍNDICE GENERAL

Título	I
Sinodales	II
Agradecimientos Institucionales	III
Agradecimientos Personales	IV
Dedicatoria	V
Índice	VI
Referencias, Trabajos Anexos, Conclusiones Generales	VIII

RESUMEN	1
“ABSTRACT”	2
1. ANTECEDENTES	3
1.1. La memoria y los mecanismos neuronales que le subyacen	3
1.2. La Plasticidad y los Ensambls Neuronales	3
1.3. ¿Dónde se estudia el código poblacional y la dinámica de los ensambles?	4
1.4. ¿Cambia la estructura sináptica después de la experiencia?	5
1.5. Plasticidad sináptica estructural en el hipocampo en respuesta a la experiencia	6
1.6. ¿Cuál es su significado funcional?	10
2. HIPÓTESIS	17
3. OBJETIVOS GENERALES	17
4. JUSTIFICACIÓN DE LAS HERRAMIENTAS EXPERIMENTALES	18
5. INVESTIGACIONES REALIZADAS	21

5.1. Investigación #1	21
5.1.1. Introducción	21
5.1.2. Métodos	22
5.1.2.1. Sujetos	22
5.1.2.2. Procedimientos generales	23
5.1.2.3. Pre-Tratamiento Conductual	23
5.1.2.3.1. Laberinto acuático de Morris (LAM)	23
5.1.2.3.2. Control de Nado (CN)	24
5.1.2.3.3. Control Intacto (CI)	24
5.1.2.4. Tarea de no-igualación a la muestra de lugar con retraso (NIMLR)	25
5.1.2.5. Doble exploración espacial para catFISH	26
5.1.2.5.1. Exploración A	27
5.1.2.5.2. Exploración A'	27
5.1.2.5.3. Exploración B	27
5.1.2.6. Histología para catFISH	28
5.1.2.6.1. Remoción del cerebro y crioprotección	28
5.1.2.6.2. Hibridación in situ fluorescente para Arc (catFISH)	29
5.1.2.6.3. Adquisición y análisis de imágenes para la técnica de catFISH	30
5.1.2.6.3.1. Captura de imágenes	30
5.1.2.6.3.2. Análisis de imágenes	30
5.1.2.6.3.3. Índice de similitud	31
5.1.2.6.4. Inmunohistoquímica y Análisis de Map-2 y Sinaptofisina	32
5.1.2.6.4.1. Adquisición de imágenes	33
5.1.2.6.4.2. Análisis de imágenes en mosaicos	33
5.1.3. Resultados	34
5.1.3.1. Efecto del sobre-entrenamiento en el LAM en la Ejecución de una tarea conductual que requiere separación de patrones espacial	34
5.1.3.2. El método de imagenología “catFISH” revela que tanto la separación como el completamiento de patrones espaciales mejoran en los animales sometidos a una experiencia espacial	38
5.1.3.3. El análisis de la tinción de Sinaptofisina/Map2 evidencia la expansión de las FM y un incremento en la densidad de las colaterales de Schaffer	47
5.1.3.4. El área de tinción de Sinaptofisina en la región de CA3 correlaciona significativamente con las mediciones de separación y completamiento de patrones obtenidas mediante catFISH	51
5.1.4. Discusión	54
5.2. Investigación #2	62
5.2.1. Resumen	62
5.2.2. Introducción	62
5.2.3. Métodos	66
5.2.3.1. Sujetos	66
5.2.3.2. Grupos	66
5.2.3.3. Diseño experimental conductual	67
5.2.3.4. Bloqueo y sección de los tejidos	67
5.2.3.5. Inmunohistoquímica	68

5.2.3.6. Imagenología	69
5.2.3.7. Análisis de imágenes	70
5.2.4. Resultados	73
5.2.4.1. Laberinto acuático de Morris	73
5.2.4.2. Co-localización Arc y Map-2	74
5.2.5. Discusión	76
6.- Conclusiones generales de la Tesis de Doctorado	77
7. REFERENCIAS	79
8. ANEXOS	93

Anexo I Carasatorre M & Ramírez-Amaya V (2013) “Network, Cellular, and Molecular Mechanisms Underlying Long-Term Memory Formation”. Referencia completa.

Anexo II Carasatorre M, Ramírez-Amaya V & Díaz-Cintra SY (2014) “Plasticidad sináptica estructural en el hipocampo inducida por la experiencia espacial y sus implicaciones en el procesamiento de información. Neurología.

Anexo III Carasatorre M, Ramírez-Amaya V & Díaz-Cintra SY (2015) “Hippocampal Mossy Fiber Expansion Induced by Spatial Learning in Rats Improves Spatial Pattern Separation and also Pattern Completion” PLoS-One

RESUMEN

El sobre-entrenamiento en el laberinto acuático de Morris (LAM) induce la expansión de las fibras musgosas (FM) hipocampales en ratas adultas. Considerando que la vía de las FM se ha involucrado en la separación de patrones espaciales, en el presente trabajo evaluamos este mecanismo de procesamiento de información mediante el uso de una tarea de “no-igualación a la muestra de lugar con retraso”. Encontramos que los animales sometidos a una experiencia espacial, en comparación con los animales control intacto o ingenuos, presentan una mejor ejecución de esta tarea que requiere separación espacial de patrones, de hecho la ejecución de los intactos puede considerarse como discapacitada. Esta observación coincide con lo que observamos mediante un análisis de la actividad neuronal utilizando imagenología confocal, con él encontramos evidencia fisiológica de que la experiencia espacial mejora la separación y el completamiento de patrones espaciales. Al analizar las proyecciones hipocampales con inmunohistoquímica para Sinaptofisina encontramos evidencia de expansión de las FM en animales con previa experiencia espacial, lo que correlaciona significativamente con los valores de separación y completamiento de patrones obtenidos mediante imagenología. Estos resultados muestran que los defectos en el procesamiento de información en el hipocampo, posiblemente causados por la carencia de estimulación, pueden ser revertidos mediante retos conductuales que estimulen la función de esta sofisticada red neuronal, importante para la memoria episódica.

ABSTRACT

Spatial water maze (WM) overtraining induces hippocampal mossy fiber (MF) expansion, and it has been suggested that spatial pattern separation depends on the MF pathway in adult rats. We hypothesized that WM experience inducing MF expansion in rats would improve spatial pattern separation in the hippocampal network. We first tested this by using the delayed non-matching to place task (DNMP), in animals that had been previously trained on the water maze (WM) and found that these animals, as well as animals treated as swim controls (SC), performed better than home cage control animals the DNMP task. The "catFISH" imaging method provided neurophysiological evidence that hippocampal pattern separation improved in animals treated as SC, and this improvement was even clearer in animals that experienced the WM training. Moreover, these behavioral treatments also enhance network reliability and improve partial pattern separation in CA1 and pattern completion in CA3. By measuring the area occupied by synaptophysin staining in both the Stratum oriens and the Stratum lucidum of the distal CA3, we found evidence of structural synaptic plasticity that likely includes MF expansion. Finally, the measures of hippocampal network coding obtained with catFISH correlate significantly with the increased density of synaptophysin staining, strongly suggesting that structural synaptic plasticity in the hippocampus induced by the WM and SC experience is related to the improvement of spatial information processing in the hippocampus.

1. ANTECEDENTES

1.1 La memoria y los mecanismos neuronales que le subyacen

Una de las características más destacadas del ser humano y otros animales, es la capacidad de aprender y recordar. Podemos reconocer estímulos ocurridos mucho tiempo atrás, como la cara de una persona conocida o establecer asociaciones entre estímulos que perduren tanto que sea usual que a lo largo de la vida se responda de manera inmediata ante el sonido de un claxon, o bien el poder reconocer el contexto espacial del barrio en donde se creció y poder orientarse a la pequeña tienda donde se solían comprar las golosinas.

La información que adquirimos y que mantenemos como memoria se representa en el sistema nervioso central (SNC) mediante la actividad coordinada de grupos de neuronas que adquieren la capacidad de reproducir una y otra vez los patrones de actividad que se generan durante la experiencia. Esta idea sugiere que en el SNC la representación de la información que subyace a los diferentes procesos cognoscitivos, entre los que se incluye a la memoria, se lleva a cabo en conjuntos de neuronas a los que llamamos “ensambles” (Hebb, 1945). Esto es lo que se concibe como el código poblacional (Sakurai, 1999). Una manera gráfica en la que podemos plantear esta idea es haciendo una analogía entre las unidades neuronales y las letras del abecedario; no son las letras en sí mismas las que representan información, sino la combinación y el orden en que están dispuestas lo que da sentido a las palabras y frases.

1.2 La Plasticidad y los Ensamblajes Neuronales

El neuroanatomista Santiago Ramón y Cajal introdujo la idea de que las modificaciones en la conectividad sináptica en el SNC podía ser el sustrato de la memoria (Ramón y Cajal,

1909). Sin embargo, no fue sino hasta mediados del siglo pasado que Donald Hebb (1945) planteó formalmente lo que hoy en día mucha gente denomina “el postulado de Hebb”:

*“Cuando el axón de una célula A está lo suficientemente cerca como para excitar a una célula B y repetida o persistentemente la activa, **ocurren los procesos de crecimiento, o cambios metabólicos, en una o ambas células, de manera que la eficiencia con la que la célula A hace disparar a la célula B, aumenta**”.*

Hebb había encontrado en la idea de los circuitos reverberantes planteada por Lorente de Nó en los años 30s un argumento empírico para explicar que la reverberación de los “ensambles neuronales” era el mecanismo que promovía el fortalecimiento de las conexiones sinápticas en el ensamble y, de esa manera, adquiría la capacidad de reproducir los patrones de actividad que surgen durante la experiencia. Los ensambles pueden reproducir los patrones de actividad adquiridos tanto en ausencia de estímulos externos como ante la estimulación parcial con información relacionada al evento que dio lugar a la formación del recuerdo. Existen diferentes tipos de cambios en la eficiencia sináptica, algunos de los cuales tienden a perdurar más que otros. Se considera que los cambios en la estructura de la comunicación sináptica son los que tienden a perdurar más y por lo tanto, pueden ser los que subyacen a la memoria a largo plazo (Bailey & Kandel, 1993).

1.3. ¿Dónde se estudia el código poblacional y la dinámica de los ensambles?

El hipocampo ha resultado ideal para estudiar e identificar a los ensambles neuronales gracias a su disposición neuroanatómica, las características fisiológicas de sus neuronas, su capacidad plástica y su papel en la formación de la memoria.

Se sabe, desde hace más de 50 años, que el hipocampo es esencial para la formación de la memoria en el humano (Scoville & Milner, 1957) y en los animales (O’Keffe and Nadel

1978). El hipocampo está involucrado en el procesamiento de información episódica, mediante la integración de información espacial y temporal (Moscovitch, et al., 2006; Eichenbaum & Fortin, 2009). En esta estructura anatómica también se estudian los mecanismos celulares y moleculares de la plasticidad sináptica, mediante modelos experimentales como la potenciación a largo plazo (LTP), en donde la respuesta *post*-sináptica a un pulso de baja frecuencia se incrementa a largo-plazo después de la aplicación de varios trenes de estimulación de alta frecuencia (Bliss & Lømo, 1970; Bliss & Gardner-Medwin, 1973). Con este modelo experimental, se ha demostrado que la eficiencia sináptica varía como consecuencia de la historia de actividad de la vía, específicamente en las sinapsis de la vía estimulada (Bliss & Gardner-Medwin, 1973). Este hallazgo dio sustento empírico al postulado de Hebb y se propuso como un mecanismo que subyace la consolidación de la memoria espacial en el hipocampo (Morris, et al., 1986; Watkins & Jane, 2006). Sin embargo, la idea original de Hebb consideraba que podían ocurrir “procesos de crecimiento” lo que puede interpretarse como cambios en la estructura de la comunicación sináptica.

1.4. ¿Cambia la estructura sináptica después de la experiencia?

La evidencia empírica sobre cambios en la estructura neuronal como consecuencia de la experiencia comenzó a aparecer a principios de los años 60 cuando el grupo de Rosenzweig introdujo el paradigma de los ambientes enriquecidos. Inicialmente encontraron efectos de la experiencia animal en parámetros neuroanatómicos gruesos como el peso cerebral, el contenido de proteínas, y nucleótidos, pero posteriormente se demostró que la estimulación ambiental con ambientes enriquecidos induce también incrementos en la arborización dendrítica y generación de nuevas neuronas (Rosenzweig & Bennett, 1996). Desde entonces se notó una relación entre los cambios estructurales en la comunicación sináptica y una

mejoría en la capacidad de aprender. El estudio de Greenough y Anderson (1991) respaldó la idea de que la experiencia modifica la estructura neuroanatómica de la red neuronal, mediante estudios detallados con microscopía electrónica, con los que se demostró que al aprender habilidades motoras, la densidad de contactos sinápticos se incrementa en estructuras como el cerebelo y la corteza. Geinisman (2000) demostró que la inducción de LTP en la vía perforante que proyecta al giro dentado (GD) del hipocampo, incrementa la densidad de contactos sinápticos que arriban a las dendritas de las células granulares. Escobar y cols, 1997 observaron que la inducción de la LTP en las fibras musgosas incrementa la densidad de botones musgosos en el *Stratum Oriens (SO)* del CA3, visualizando las fibras musgosas con la técnica de Timm. Estos trabajos pusieron de manifiesto la alta capacidad plástica estructural del hipocampo y la pregunta que permanecía era si dichos cambios tan robustos podían ocurrir también en respuesta a la conducta.

1.5. Plasticidad sináptica estructural en el hipocampo en respuesta a la experiencia

La plasticidad estructural en el hipocampo se ha evidenciado mediante una gran variedad de procedimientos, principalmente aquellos que inducen epilepsia, Ben-Ari Y, Represa A. (1990) demostraron que la inducción de una condición epileptogénica promovía una clara transformación de la conectividad en el hipocampo, lo que se convirtió en un modelo de estudio que contribuyó a caracterizar en detalle la plasticidad estructural en el hipocampo.

Sin embargo, fue Altschuler (1979), quien proporcionó la primera evidencia de plasticidad sináptica estructural en el hipocampo en respuesta a una experiencia conductual. En su trabajo sometió a los animales tanto a un ambiente enriquecido como a una tarea de orientación espacial y compararon con controles sometidos a una rueda de actividad o con controles intactos. Con el uso de microscopía electrónica observó un incremento notable en la densidad

de contactos sinápticos en la región del CA3. Moser y cols. (1994) sometieron a animales a ambientes complejos que promueven el aprendizaje espacial y compararon la densidad de espinas dendríticas en la región de CA1 del hipocampo entre animales expuestos y otros no expuestos. Mediante microscopía confocal estudiaron los árboles dendríticos de las neuronas piramidales del CA1 (inyectando por un método iontoforético el fluoróforo amarillo lucifer) y observaron un incremento en la densidad de espinas en los animales sometidos al ambiente complejo. Además, en estos animales la ejecución de la tarea de laberinto de agua de Morris (LAM) era mejor que la de los animales controles. Posteriormente, reportaron que el incremento en la densidad de espinas en los animales sometidos al ambiente complejo se observa sólo en un subgrupo de segmentos dendríticos en el *Stratum Oriens (SO)* del CA1 (Moser, et al., 1997). En 1997, Ruzakov y colaboradores utilizando microscopía electrónica, encontraron que el entrenamiento en una tarea del laberinto acuático de Morris (LAM) promovía un cambio en la distribución de contactos sinápticos también en la región de CA1 del hipocampo, sin que esto implicara un incremento neto en la densidad sináptica, probablemente debido a la sección dendrítica analizada (Moser, et al., 1997). Además con el sobre entrenamiento en el LAM, los estudios de Ramírez-Amaya (1999 y 2001) demostraron que se incrementa notablemente la densidad de botones musgosos en el *SO* de la región de CA3 en el hipocampo, visualizados con la técnica de Timm. El análisis con microscopía electrónica corroboró los resultados y se observó que los cambios estructurales no ocurren en respuesta al estrés o la actividad motora durante el nado (Ramírez-Amaya, et al., 1999). Posteriormente, encontraron que el entrenamiento por 4 o 5 días en el LAM produce una mejor ejecución en la prueba de memoria realizada a los 7 y 30 días después de la adquisición, en contraste con animales entrenados durante 1 o 3 días (Ramírez-Amaya, et al., 2001). Además, correlacionaron positivamente el dato de la densidad de botones musgosos en

el *SO* del CA3 con la ejecución de la tarea de LAM, lo que sugería que el incremento en la densidad de botones musgosos podría estar relacionado con la formación de la memoria espacial (Ramírez-Amaya, et al., 2001).

Estos resultados provocaron gran interés en el grupo del Routenberg, quienes convirtieron el hallazgo en un modelo para estudiar plasticidad sináptica estructural en el hipocampo relacionado al aprendizaje espacial (Rekart, et al., 2007a). Ellos llamaron a esta modificación estructural de los contactos musgosos en el *SO* de CA3 expansión de las fibras musgosas, y lo visualizaron tanto con la técnica de Timm como con otros marcadores como Sinaptofisina (Holahan, et al., 2006), en dos diferentes cepas de ratas (Wistar misma cepa utilizada por Ramírez-Amaya, et al., 1999; 2001) y Long Evans (Holahan, et al., 2006), las que mostraron una mejor capacidad para aprender tareas espaciales en relación a las Wistar, y una proyección mayor de contactos musgosos al *SO* del CA3, aún antes de la experiencia espacial (Holahan, et al., 2006). También observaron que desde 24 horas después del último día de entrenamiento en el LAM, las ratas Long Evans expandían sus contactos musgosos al *SO* del CA3, mientras que las Wistar presentaron esta expansión a partir de los 7 días después de la última sesión de adquisición (Rekart, et al., 2007b). Los autores de estos trabajos sugieren que estas modificaciones estructurales podrían contribuir a la formación de la memoria y también facilitar la ejecución posterior de tareas de navegación espacial (Holahan, et al., 2006). También observaron que el incremento en la densidad de contactos musgosos en respuesta al entrenamiento en el LAM se observa en ratas pero no en ratones (Rekart, et al., 2007c). Otro grupo sin embargo, encontró que el entrenamiento en una tarea de LAM en ratones de la cepa C57BL/6, sí inducía un incremento en la densidad de contactos musgosos en el *SO* de CA3, visualizado con la técnica de tinción de Timm (Middei, et al., 2007). En los procedimientos conductuales no se encuentran datos que permitan reconciliar el contraste

entre estos resultados, sin embargo, una posible explicación es que las condiciones del hábitat pudieran explicar las diferencias. Por ejemplo, se ha mostrado que durante el desarrollo del animal, las fibras musgosas se expanden a la región del *SO* en CA3 y posteriormente se retraen, de manera dependiente de actividad (Holahan, et al., 2007). Esto sugiere que, cuando los animales son criados en condiciones de aislamiento, las fibras musgosas que proyectan al *SO* se retraen, mientras que en condiciones de estimulación se hace más probable que se mantengan o incluso que se estimule su proyección al *SO* de CA3.

El incremento en el área que ocupa la tinción de Timm en el *SO* en animales entrenados en el LAM se ha interpretado como sinaptogénesis (Ramírez-Amaya, et al., 1999; 2001) y congruentemente, se ha observado con microscopía electrónica que el entrenamiento en el LAM aumenta el volumen y la complejidad de las excrescencias espinosas en las dendritas apicales de las células piramidales de la región de CA3 (Stewart, et al., 2005), que es donde hacen sinapsis las fibras musgosas. Aunado a esto, con microscopía confocal de alta resolución y un sofisticado procedimiento de análisis de imágenes, Galimberti, et al., (2006) demostraron que la experiencia de un ambiente enriquecido incrementa el volumen y la complejidad de los botones musgosos que hacen contacto con las dendritas de CA3 en el hipocampo de ratones.

La evidencia experimental muestra que los cambios en la densidad de sinapsis musgosas se inducen solamente con tareas espaciales dependientes del hipocampo y no por tareas de navegación independientes de la función hipocampal (Holahan et al., 2006; McGonigal et al., 2012). No hay duda entonces de que la experiencia espacial, que involucra al hipocampo, promueve un incremento en la densidad y complejidad de los botones musgosos que arriban a las células piramidales de CA3 en el hipocampo, y la pregunta que queda es:

1.6. ¿Cuál es su significado funcional?

Las neuronas granulares que forman el giro dentado (GD) dan origen a los axones de las fibras musgosas (FM), algunas de sus terminales son enormes botones con características muy particulares que hacen contacto con las excrescencias espinosas en las dendritas de las células piramidales de CA3 (Amaral y Dent, 1981; Maccaferri, et al., 1988), mientras que las terminales de filopodios de las FM hacen contacto con interneuronas inhibitorias (Acsády, et al., 1998). Las terminales musgosas co-liberan glutamato, zinc y neuropéptidos (Kobayashi, 2010) y su “input” es tan poderoso (Blackstad y Kjaerheim, 1961) que McNaughton y Morris en 1987 lo consideraron como “detonantes” (Eccles, 1937) de la actividad de espigas de células piramidales de CA3. Una propuesta es que el GD tiene la función de ortogonalizar los patrones de información provenientes de la corteza entorrinal (Sclabassi, et al., 1988). En congruencia con esta idea, en el GD se reclutan del 2 al 3% de unidades neuronales durante el procesamiento de información espacial (Ramírez-Amaya, et al., 2005; Chawla, et al., 2005; Leutgeb, et al., 2007), lo que refleja un código escaso, con el cual es más viable una óptima separación de patrones, ya que es menos probable reclutar al mismo ensamble en diferentes representaciones. Por otra parte, los axones de las células piramidales (CP) del CA3, si bien proyectan aferencias a las CP del CA1, una característica es que también proyecta fibras colaterales recurrentes que hacen contacto con otras CP del CA3, en un gradiente próximo-distal y septo-temporal (Ishizuka, et al., 1995). Dada esta notable característica, se ha propuesto que la red recurrente del CA3 opera como un sistema de memoria auto-asociativa (McNaughton y Morris, 1987; Rolls, 1989), crucial para la formación de la memoria. La red del CA3 puede exagerar las diferencias entre las representaciones, logrando una separación excelente de patrones al igual que el GD, pero lo que sobresale es su capacidad de completar patrones, habilidad distintiva del CA3 (Guzowski, et al., 2004). Por esta razón es viable

pensar que el CA3 es la red principal de almacenamiento de información en el hipocampo (Leutgeb, et al., 2007).

Por otra parte, la información entrante que reciben las células piramidales del CA3 es diversa (Witter, 2007). La densidad de fibras que recibe el GD a través de las FM es muy escasa (Claiborne, et al., 1986), pero es determinante para la función del CA3 (Blackstad y Kjaerheim, 1961). Solamente entre 10 a 18 sinapsis musgosas hacen contacto con cada CP de CA3, mientras que el número de sinapsis por CP de vías más débiles como las colaterales de Shafer o las vías provenientes de las CP de CA1 están en el orden de los miles (Amaral, et al., 1990; ver Acsády et al., 1998). Las CP del CA3 reciben información sobre la distancia del desplazamiento del animal directamente de la corteza entorrinal, por medio de la vía perforante y esta misma información llega también, a través del GD, a las CP del CA3. De esta manera, las FM duplican la información que las CP del CA3 reciben de las piramidales de la corteza entorrinal. Por lo tanto, se ha sugerido que las FM dirigen el almacenamiento de nuevas representaciones, mientras que la vía perforante transmite la clave de información que inicia la recuperación de representaciones previamente almacenadas (Treves, et al., 2008), y gracias a sus conexiones recurrentes, la red de CA3 lleva a cabo la comparación de patrones, completando los patrones de actividad para reconocer así lo familiar o separándolos cuando las representaciones son diferentes.

Los modelos computacionales proponen que las FM inducen patrones de actividad en las CP de CA3, promoviendo un alto grado de separación, lo que permite que la nueva información prevalezca como una representación independiente, por encima de los patrones de actividad que representan los trazos de memorias previamente adquiridas (Treves y Rolls, 1992). Así, cuando la actividad de las recurrentes es estadísticamente más fuerte, la vieja memoria prevalece, pero si un nuevo patrón de actividad tiene que ser almacenado, primero se

recodifica y transforma en la red del GD y es transmitido por las FM como un patrón aparentemente aleatorio que llega a la red del CA3 (Treves et al., 2008). Se considera así, que la función de las FM es la de dirigir la codificación de nueva información, y no la de recuperar información previamente almacenada. Esto se explica, aparentemente, porque aun cuando las FM están provistas de plasticidad sináptica, como lo es el LTP, no son capaces de almacenar información porque la información entrante es demasiado escasa (Cerasti & Treves, 2010). La evidencia experimental apoya esta idea; por ejemplo, la inactivación reversible de las terminales del CA3 mediante inyecciones de dietil-ditiocarbamato (lo que inhibe transitoria pero específicamente las fibras musgosas) durante la adquisición de la tarea de LAM afecta la ejecución en la prueba de memoria (Lassalle, et al., 2000), pero si se inactiva inmediatamente antes de la recuperación de la memoria no se afecta la ejecución (Lee y Kesner, 2004; Florian y Rouillet, 2004). También la adquisición de una tarea de reconocimiento es alterada por la inactivación de las FM (Stupien, et al., 2003). Esto apoya la idea de que el GD dirige el almacenamiento de información en el CA3, estableciendo no solamente patrones discretos de actividad nuevos, sino nuevas representaciones completas (Cerasti & Treves, 2010).

Por otra parte, la escasez del código en el GD y su escaso “input” al CA3 podrían ser variables fundamentales para el almacenamiento de nueva información en esta red. Esto ha sido evaluado mediante un modelo que consideró valores obtenidos de manera experimental, de diferentes características funcionales del GD y del CA3, asumiendo una fuerza fija del input de las FM (Treves & Rolls, 1992). La simulación del modelo computacional mostró que el sistema mnémico se beneficia de una conectividad con alto grado de escasez. Sin embargo, notaron también que si esta escasez es alta provoca la disipación de la entrada de información, lo que significa que si las proyecciones musgosas llegan a proveer un “input” en extremo

escaso el sistema deja de funcionar de manera óptima (Cerasti & Treves, 2010). Es importante recordar que durante el desarrollo del hipocampo en roedores, la información proveniente de las FM al CA3 tiende a proyectarse de manera profusa a la región del *SO* pero si las condiciones de estimulación del animal son pobres estas fibras se retraen (Holahan, et al., 2007). Esto puede implicar que si las condiciones ambientales en donde se desarrolla el animal estimulan a la función hipocampal, las proyecciones musgosas serán más abundantes, proveyendo una entrada óptima que permita almacenar información en la red de CA3. En contraste, cuando las condiciones del ambiente son pobres, las proyecciones musgosas tenderán a ser muy escasas y en consecuencia su “input” será sub-óptimo, por lo que se verá afectada o disminuida la capacidad del hipocampo de codificar nueva información.

Esto es congruente con observaciones en las que animales de especies cercanas que ocupan hábitats diferentes, presentan diferencias claras en la densidad de FM infra piramidales al CA3, las cuales correlacionan con una mejor ejecución en varias tareas espaciales (Schwegler, et al., 1993; Bernasconi-Guastalla, et al., 1994; Pleskacheva, et al., 2000). De igual manera, diferentes densidades de botones musgosos en la vía infra piramidal en distintas cepas de roedores, predicen una ejecución diferente en tareas dependientes del hipocampo (Schwegler & Crusio, 1995). Los ratones de las cepas pigmentadas; como la DBA (color marrón diluido) que es la más antigua cepa endogámica, presentan una menor densidad de contactos musgosos en la vía infra piramidal en comparación con ratones de la cepa CD57/BL, y consecuentemente, los ratones de esta última cepa ejecutan mejor tareas dependientes del hipocampo (Crusio, et al., 1987; Schöpke, et al., 1991; Prior, et al., 1997). Consistentemente, la densidad de proyecciones musgosas de la vía infrapiramidal se correlaciona positivamente con la ejecución de una tarea de LAM (Schöpke, et al., 1991;

Prior, et al., 1997), lo que también correlaciona con otras tareas dependientes del hipocampo (Lipp, et al., 1988).

Ante toda esta evidencia, podemos interpretar que la formación de nuevas sinapsis musgosas en el *SO* del CA3 en respuesta a la experiencia (Ramírez-Amaya, et al., 1999; 2001) es un cambio plástico que mejora la codificación de nueva memoria espacial. Esto coincide con evidencia que muestra que la experiencia en tareas espaciales durante la adolescencia en ratas promueve un incremento en la densidad de FM en el *SO* del CA3 y una mejor ejecución de nuevas tareas espaciales cuando el animal es adulto (Keeley, et al., 2010; Wartman, et al., 2012). En síntesis, la función de la sinaptogénesis de las FM en respuesta a la experiencia espacial es mejorar la codificación de información en el hipocampo.

Sin embargo, retomando el planteamiento hebbiano, y considerando que la plasticidad sináptica estructural es la que tiende a perdurar (Bailey & Kandel, 1993), sigue siendo atractiva la idea de que estos cambios estructurales pudieran estar también implicados en el almacenamiento de la memoria adquirida, tal y como se sugirió previamente basándose en la correlación positiva obtenida entre la densidad de botones musgosos en el *SO* del CA3 y la ejecución en la prueba de memoria en el LAM (Ramírez-Amaya, et al., 2001). En apoyo a este planteamiento, un estudio reciente muestra que la experiencia conductual promueve un incremento en la densidad de conexiones musgosas con células inhibitorias y esto hace más precisa la recuperación de la memoria adquirida (Ruediger, et al., 2011). Es importante aclarar, que el giro dentado se comunica con sus objetivos post-sinápticos mediante tres tipos de terminales. Un tipo está conformado por las terminales musgosas grandes – botones musgosos gigantes-, que hacen contacto con las excresencias espinosas de las células piramidales de CA3 y con las células musgosas de CA3 en el hilus; las otras, son terminales finas de los filopodios que hacen contacto principalmente con interneuronas inhibitorias y

finalmente, existen varicocidades de paso que también hacen contacto con interneuronas. El número de contactos que las FM hacen con interneuronas es 10 veces más alto que el de los contactos con células piramidales (Acsády, et al., 1998).

En el trabajo de Ruediger et al. (2011) se mostró que un solo ensayo de aprendizaje en una tarea de condicionamiento al miedo o varias sesiones de adquisición en una tarea de LAM, a lo largo de 8 días, induce un incremento en la densidad de terminales de filopodio en relación a las terminales musgosas grandes. Esto se interpretó como un aumento en la inhibición proactiva (“Feed forward inhibition”). En congruencia con esta idea, observaron también que el entrenamiento en el LAM provoca que el número de neuronas que responden ante la recuperación de información se reduzca notablemente, evaluando la actividad mediante la detección de la expresión de un gen de expresión inmediata. Estos cambios en la densidad de contactos con interneuronas inhibitorias correlacionan temporalmente con la precisión de la memoria previamente adquirida (Ruediger, et al., 2011). Estos resultados apoyan la idea de que el incremento en la densidad de contactos de las FM podría estar relacionado con un almacenamiento más preciso de la información adquirida. Si bien esta posición podría parecer contraria a la idea de que el incremento en la densidad de contactos mejora la codificación de nueva información, se podría argumentar que no son necesariamente excluyentes. Es posible que al mejorarse la codificación de nueva información gracias al aumento de FM, las condiciones en las que la actividad fuera de línea de la red promueve esta plasticidad, podrían mejorar también la codificación de la información que se adquiere durante la adquisición de la tarea que promovió los cambios estructurales, sin que esto implique que la sinaptogénesis de las FM afecte la recuperación de memoria antiguas.

La evidencia experimental y los modelos propuestos proponen que la sinaptogénesis de las FM, en respuesta a la experiencia espacial, promueve un cambio general en la función

hipocampal. Dado esto, es probable que dicha sinaptogénesis pueda incidir también sobre otros mecanismos generales del funcionamiento de la red hipocampal como el reconocimiento estadístico de patrones (Marr, 1969; 1971). Este incluye a la separación y el completamiento de patrones, los que respectivamente permiten que la red hipocampal pueda distinguir de manera óptima entre diferentes representaciones y que la recuperación de episodios previamente almacenados se realice de manera eficiente (Guzowski, et al., 2004; Leutgeb, et al., 2007; Leutgeb, et al., 2005).

Para determinar de manera concluyente, si los cambios en la densidad de contactos musgosos participan en el almacenamiento de la información adquirida, es necesario determinar si dichos cambios ocurren o no en las neuronas responsables de procesar la información adquirida. Determinar de manera conclusiva el papel funcional de la sinaptogénesis de las FM en respuesta a la experiencia, requiere arduo trabajo experimental y mayor atención a los modelos de funcionamiento del hipocampo. Pero se tiene un modelo de plasticidad sináptica sobresaliente que permitirá esclarecer mecanismos trascendentales para entender el procesamiento de información en el SNC, y probablemente también ayude a identificar las unidades neuronales que subyacen a la memoria a largo plazo.

2. HIPÓTESIS

Considerando los antecedentes que hemos presentado, tenemos dos hipótesis principales sobre el papel funcional de la expansión de las fibras musgosas hipocampales inducida por la conducta:

- a) *Que la plasticidad estructural modifica la capacidad de procesamiento de información en la red hipocampal.*
- b) *Que los cambios estructurales ocurren principalmente en las células que responden a la conducta que dio origen a una memoria perdurable.*

Es importante aclarar que estas dos hipótesis no son excluyentes, y es posible diseñar experimentos *ex profeso* para tratarlas de manera adecuada e independiente y determinar con ello que los cambios en la estructura modifican la función de procesamiento de información en la red hipocampal y, por otro lado, si están relacionados o no con el almacenamiento de la información adquirida.

3. OBJETIVOS GENERALES

Determinar el efecto que la expansión de las fibras musgosas tiene en la función de procesamiento de información del hipocampo y evaluar la especificidad de estos cambios estructurales en las células que responden a la conducta del aprendizaje espacial. Esta aproximación permitirá determinar el papel funcional de los cambios estructurales inducidos por la conducta.

4. JUSTIFICACIÓN DE LAS HERRAMIENTAS EXPERIMENTALES

Para abordar el estudio funcional del hipocampo, contamos con métodos histológicos que permiten caracterizar los patrones neuroanatómicos y temporales (en el orden de minutos-horas) de la actividad neuronal. Esto se hace a través del monitoreo de la expresión de genes inmediatos tempranos que se inducen por actividad sináptica, como lo es Arc (Activity-Regulated Cytoskeleton-associated protein). La técnica de análisis compartamental y temporal de la actividad neuronal con hibridación *in situ* fluorescente (catFISH), nos permite evaluar ciertos aspectos del procesamiento de la información (Guzowski, et al., 1999), como al reconocimiento estadístico de patrones (Vazdarjanova, et al., 2004), que incluye tanto a la separación como al completamiento de patrones.

También, para evaluar si los cambios estructurales ocurren en las neuronas que responden a una conducta que dio lugar a una memoria perdurable, hemos planteado combinar la detección inmunohistoquímicas de proteínas estructurales para caracterizar la estructura de la comunicación sináptica con la detección de la proteína del gen de expresión inmediata Arc, para identificar las neuronas que responden a la conducta. Se usará la detección del gen Arc o Arg 3.1 por ser un gen de expresión inmediata temprana (IEGs) cuya transcripción se induce rápidamente por la actividad neuronal de alta frecuencia (Lyford, et al., 1995; Guzowski, et al., 1999; Steward y Worley 2001). La proteína de Arc cumple además un importante papel en la plasticidad sináptica (Bramham & Messaoudi, 2005; Shepherd & Bear, 2011; Okuno, 2011). Por ejemplo, Arc es importante para estabilizar los cambios en la eficiencia sináptica, por medio de un mecanismo conocido como escalamiento sináptico, lo que permite que los ensambles adquieran la capacidad de reproducir la información a largo plazo (Turrigiano, 1998). Este proceso de estabilización de la plasticidad sináptica se conoce

como proceso de consolidación (McGaugh, 2000). La evidencia sugiere fuertemente que la inducción de Arc está particularmente vinculada con los procesos de codificación de la información que se sostiene en la memoria (Guzowski et al., 2001; Tzingounis y Nicoll, 2006). La función de Arc en el escalamiento sináptico permite explicar un problema conceptual sumamente importante, en el cual, la noción fundamental es que la plasticidad sináptica ocurre específicamente en la vía estimulada. Esto se contrapone a la idea de que los mecanismos moleculares que subyacen a la plasticidad sináptica, como lo es la transcripción de genes y la traducción de estos a proteínas. Se ha propuesto por ello, que debe existir un mecanismo mediante el cual se marquen las sinapsis cambiantes, con lo que las señales moleculares distingan entre las sinapsis silentes (que no están cambiando su eficiencia) y las sinapsis activas (que están cambiando su eficiencia). A esto se le conoce como la hipótesis del “synaptic tagging”, el cual sería un mecanismo de plasticidad homeostática que permite que los cambios en la comunicación sináptica ocurran específicamente en las sinapsis que participan en la organización de un determinado ensamble neuronal (Frey & Morris, 1998; Martin & Kosik, 2002). Esto es un mecanismo fundamental si se considera que la plasticidad sináptica está regulada por la expresión de genes cuyos productos proteínicos se pueden localizar en toda la neurona. Se requiere así, de un mecanismo que permita lograr especificidad y la proteína de Arc participa en ello. Recientemente Okuno y colaboradores (2012) mostraron que Arc interactúa con la proteína cinasa II, dependiente de calcio o calcium/calmodulin-dependent protein kinase II-b (CAMKII-b, por sus siglas en inglés) específicamente en las dendritas no activadas, lo que hace que Arc promueva la endocitosis de receptores de tipo AMPA (α -amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol-propionato) en las sinapsis inactivas y por otro lado que CAMKII-b pueda contribuir al incremento en la eficiencia de las sinapsis activas, a esto le han llamado “inverse synaptic tagging” o marcado sináptico inverso.

Por otro lado, desde su descubrimiento, *Arc* se ha caracterizado como un gen cuya expresión se induce por actividad neuronal (Lyford, et al., 1995). De hecho, se puede inducir la expresión de *Arc* con trenes de alta frecuencia como son los que se usan para inducir la potenciación a largo plazo (Steward, et al., 1998) y tanto el promotor como el “enhancer” de *Arc* se pueden usar, como una herramienta de ingeniería genética, para que otros genes como el de la proteína fluorescente verde (GFP o green fluorescent protein o venus un cromóforo amarillo fluorescente) sean inducidos por actividad sináptica (Kawashima, et al., 2009; 2013). La expresión de *Arc* refleja fielmente las demandas cognitivas de una tarea espacial, a diferencia de otros genes como como *c-Fos* (proto-oncogén celular) o la proteína respuesta temprana de crecimiento *Zif268* (zinc finger proteína 225) que difieren en su fiabilidad (Guzowski, et al., 2001).

Por otro lado y conveniente para este diseño, se ha caracterizado ampliamente la expresión de *Arc* en neuronas del hipocampo después de las conductas de exploración espacial (Guzowski, et al., 1999; Vazdarjanova, et al., 2004, Ramírez-Amaya, et al., 2005) y se ha observado que la proporción de neuronas que presentan actividad de alta frecuencia y en las que se puede caracterizar su campo receptivo espacial (Markus, et al., 1994; Mizuseki, et al., 2012) es la misma que expresa tanto el mRNA de *Arc* como su proteína (Guzowski, et al., 1999; Ramírez-Amaya, et al., 2005). De esta manera, contabilizando el número de células que expresan el mRNA o la proteína de *Arc* en respuesta a conductas de exploración espacial (Guzowski, et al., 1999; Ramírez-Amaya, et al., 2005), se podrá establecer una correspondencia confiable con el porcentaje de neuronas que presentan actividad electrofisiológica de alta frecuencia en respuesta a la exploración espacial (o actividad de células de lugar).

5. INVESTIGACIONES REALIZADAS

5.1. Investigación #1

5.1.1. Introducción

Existe evidencia experimental amplia en la literatura que muestra que la experiencia promueve plasticidad sináptica estructural (Caroni, et al., 2012), y un ejemplo sobresaliente es que las ratas sometidas a un sobre-entrenamiento en la tarea de laberinto de agua de Morris (LAM) presentan una expansión de las fibras musgosas (FM) hipocampales (Ramírez-Amaya, et al., 1999; 2001; Holahan, et al., 2006). Esto se observa en diferentes cepas de ratas, en las que se presentan ligeras diferencias en la dinámica del remodelamiento estructural de la sinapsis musgosa (Holahan, et al., 2006), y también se ha observado en otras especies como el ratón (Middei, et al., 2007), en donde ocurre en respuesta a la exposición a un ambiente enriquecido y ante una tarea de condicionamiento al miedo (Galimberti, et al., 2006; Ruediger, et al., 2011).

Previamente se propuso que estos cambios en la estructura de la sinapsis podrían subyacer la formación de la memoria adquirida (Hebb, 1945; Bailey & Kandel, 2008; Ramírez-Amaya, et al., 2001). Sin embargo, aun cuando las FM cuentan con la capacidad de modificar sus pesos sinápticos, su escasa densidad sináptica en las neuronas piramidales de CA3 (Bischofberger, et al., 2010) y la escasa actividad de las neuronas granulares del giro dentado (Chawla, et al., 2005), hacen poco probable que las FM puedan almacenar información en la memoria a largo plazo (Cerasti & Treves, 2010).

Varios estudios indican que la función de las FM es dirigir la codificación de nueva información en la red recurrente del CA3, la que opera como una red auto-asociativa capaz de almacenar nueva información (Treves & Rolls, 1992; Lassalle, et al., 2000; Lee & Kesner, 2004). Para ello, las FM promueven la separación de patrones en la red del CA3 (Treves &

Rolls, 1992; Kesner, 2013) y a través de este proceso la información semejante es transformada en elementos de información de salida con menor solapamiento, lo que nos permite discriminar entre experiencias similares y almacenarlas separadamente (Yassa & Stark, 2011; Hunsaker & Kesner, 2013). Por el contrario, durante la recuperación de la información, la red del CA3 es capaz de realizar el completamiento de patrones cuando información parcial o distorsionada recupera información previamente almacenada (Yassa & Stark, 2011; Hunsaker & Kesner, 2013), pero al parecer, este proceso es dirigido por la vía perforante (Treves & Rolls, 1992). Tanto la separación como el completamiento de patrones espaciales son funciones de procesamiento de información de la red hipocámpal, y son características fundamentales de la memoria episódica, de gran relevancia para un procesamiento eficiente de información en el cerebro (Hunsaker & Kesner, 2013); por lo que cualquier alteración en estos procesos puede subyacer estados patológicos (Hanson & Madison, 2010), así como los déficits cognitivos observados durante la vejez (Burke, et al., 2010). Por estas razones el propósito del presente trabajo fue determinar si la expansión de las FM inducida por la conducta, afecta la separación de patrones espaciales.

5.1.2. Métodos

5.1.2.1. Sujetos

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 4 meses de edad, mantenidas en cajas individuales, situadas en un cuarto sonoro-amortiguado, con una temperatura de 22°C, con un ciclo invertido de luz/oscuridad de 12 h noche/12 h día con encendido a las 09:00 hs PM, recibiendo agua y comida *ad libitum*. Los animales fueron manipulados 10 minutos diariamente durante 7 días, hasta un día previo al inicio del experimento, con el propósito de disminuir el estrés de dichos animales.

5.1.2.2. Procedimientos generales

Los protocolos experimentales y los procedimientos con animales realizados en este trabajo se realizó conforme a las normas internacionales para el manejo y uso de animales de experimentación establecidas por el “National Institutes of Health” (NIH) y la “National Academy of Science”, el cual fue aprobado por el Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología (INB) de la Universidad Nacional Autónoma de México.

5.1.2.3. Pre-Tratamiento Conductual

5.1.2.3.1 Laberinto acuático de Morris (LAM)

Esta tarea, ofrece uno de los modelos más empleados en el estudio del aprendizaje y la memoria espacial en roedores (Morris, et al., 1986). El diseño empleado, consistió de un tanque circular negro de plástico con un diámetro de 1.5 metros y un alto de 1 metro, con un nivel de agua de 40 centímetros, manteniendo una temperatura de $(23 \pm 1) ^\circ\text{C}$. Se coloca una plataforma de acrílico transparente, sumergida 1 centímetro por debajo de este nivel. El cuarto es sonoro-amortiguado, con luz tenue provista por tres lámparas colocadas en 3 de las esquinas superiores, está pintado de blanco y en las paredes se colocan pistas visuales en cada punto cardinal. En cada ensayo se utilizan diferentes puntos de liberación contemplando que la distancia promedio, al punto de llegada de dos ensayos consecutivos, sea la misma para cualquier par de ensayos (Ramírez-Amaya, et al., 2001). Al final de los experimentos, todos los registros de cada animal por grupo se analizaron con el sistema de video (SMART, San Diego Instruments) y a partir de ello se obtuvo la latencia de llegada a la plataforma.

Los animales que fueron sometidos a 10 ensayos durante 5 días consecutivos. En cada ensayo, el animal fue colocado dentro del tanque mirando hacia la pared interna del tanque, en uno de los puntos designados para el inicio. Durante la prueba el animal puede escapar del

agua encontrando y subiendo a la plataforma de escape. Cada ensayo puede durar, como máximo 60 segundos dependiendo de cuánto aprenda el animal y, si en alguna oportunidad el animal no encuentre la plataforma entonces es guiado manualmente hacia la misma. Una vez que la rata encuentre la plataforma, se le deja permanecer en ella durante 30 segundos; luego se la retira y coloca en una caja (con una toalla seca) de descanso por un intervalo de 30 segundos para, seguidamente, comenzar el siguiente ensayo. La latencia (tiempo en segundos) de llegada a la plataforma de escape se emplea como una medida de adquisición.

5.1.2.3.2 Controles de nado (CN)

Los animales fueron sometidos a 5 sesiones de 10 ensayos cada una, en el mismo tanque en el que se llevó a cabo la tarea de LAM pero sin la plataforma y sin las pistas visuales empleadas durante el entrenamiento. Es importante notar que en este experimento los animales debían realizar 10 ensayos diarios durante 5 días y que la duración de cada uno de los ensayos es semejante al tiempo que duran los ensayos en los animales del grupo LAM, sin embargo es importante notar que la distancia de nado de los animales del presente grupo es mayor a la distancia de nado en este mismo grupo utilizado en experimentos previos (Ramírez-Amaya, et al., 2001).

5.1.2.3.3 Controles intactos (CI)

Este grupo se formó con 10 animales mantenidos en su caja habitación durante todo el período de pre-tratamiento, usados como testigo de las condiciones ambientales.

5.1.2.4. Tarea de no-igualación a la muestra de lugar con retraso (NIMLR)

Un día después del período de pre-tratamiento, todos los animales fueron sometidos a un período de 5 a 6 días de restricción alimenticia hasta que lograran alcanzar el 85-90% de su peso original. Siete días después del pre-tratamiento, una vez que los animales alcanzaron el peso corporal establecido, se continuó con dicha restricción y se comenzó con una sesión de habituación durante la cual cada animal fue introducido en el laberinto radial de ocho brazos (LRO) para que pudiera obtener los reforzadores accesibles de cada uno de los pasillos. Al final de cada pasillo hay una perforación en forma de círculo en donde se coloca el reforzador, en nuestro caso una pieza de cereal, ($\frac{1}{2}$ FrootLoops Kellogs®). En la tarea del DNMP este reforzador puede estar accesible o no dependiendo de si su contenedor está abierto o cerrado; en la condición cerrado el cereal está tapado por una rejilla que, si bien no permite que la rata lo agarre, sí permite que los olores que se desprenden de la pieza de cereal estén presentes en todos los brazos, por lo que descartamos que el factor olor funcione como pista. Las paredes de los pasillos son de acrílico transparente y por tanto permiten que el animal vea las claves espaciales colocadas en las paredes del cuarto. Esta habituación finalizaba cuando los animales comían u obtenían el reforzador de todos los pasillos. Al día siguiente de la habituación se continuó con la tarea de aprendizaje espacial en el LRO basándonos en el reporte descrito para esta tarea. Cada ensayo consta de dos episodios o épocas, a la primera se la denomina “muestra” y en ésta se abre sólo el brazo de salida y un brazo en el que, al final del pasillo se encuentra el reforzador disponible. La época termina cuando el animal se ubica espacialmente y encuentra el reforzador. En este momento el animal es colocado en una caja de espera durante 30 segundos. A la segunda época se le denomina “elección” y en ella se abren el brazo de salida, el brazo donde previamente se encontraba disponible el reforzador y un nuevo brazo con el reforzador disponible. Esta época termina cuando el animal toma la

pieza de cereal disponible solamente en el brazo recientemente abierto. Cuando el animal ingresaba hasta el final del brazo muestra o del brazo de salida, se consideraba como un error y cuando ingresaba a cualquiera de estos brazos de manera parcial se consideraba medio error.

El propósito de cada ensayo es que el animal logre distinguir la ubicación espacial de ambos brazos, de tal forma que, en la época de elección, identifique el brazo recién habilitado y obtenga en él la pieza de cereal. El tipo de separación se mantiene en los 4 ensayos diarios, pero la ubicación del brazo muestra y del brazo de elección varía en los 4 ensayos que se realizan por sesión (ver Figura 1B).

Durante la primera sesión de los 4 días de la prueba, en cada día se realizó un tipo de separación diferente (S1-45°; S2-90°, S3-135°; S4-180°) cambiando de forma aleatoria la posición (a la derecha o a la izquierda) del brazo muestra en relación al brazo de salida. En total son 4 sesiones, de 4 días cada una y de 4 ensayos por día, por lo tanto, el entrenamiento completo consta de 64 ensayos. Es importante señalar que entre ensayo y ensayo se limpia el laberinto con ácido acético al 6% para eliminar rastros de olor. Es de esperarse que el mejor desempeño ocurra para la separación 4 y la mayor cantidad de errores se cometan con la separación 1, ya que la dificultad de distinguir entre brazos adyacentes es mayor que la de distinguir entre brazos opuestos.

5.1.2.5. Doble exploración espacial

Se trabajó en dos cuartos sonoro-amortiguados: uno con dimensiones de 1.7 x 2.3 m (cuarto 1) y otro de 2.17 x 2.3 m (cuarto 2), respectivamente, en ambos se colocó una caja de acrílico transparente sobre una mesa de trabajo, con iluminación tenue y temperatura ambiente de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. En las 4 paredes de ambos cuartos se colocaron pistas visuales (carteles y figuras geométricas hechas de papel “foamy”) de manera alocéntrica para los

animales. En la figura 4, se indican las tres condiciones diferentes del ambiente de exploración.

5.1.2.5.1. Exploración en A

En el cuarto 1 se colocó una caja cuadrada (CC) de acrílico transparente de 70 cm de cada lado con paredes de 20cm de altura. La caja estaba recubierta por papel “foamy” amarillo con bandas del mismo papel negro (2cm de ancho) con las que se dividió el área de exploración en nueve cuadrantes del mismo tamaño.

5.1.2.5.2. Exploración en A'

En el cuarto 1 (igual que en la condición anterior) se colocó una caja rectangular (CR) de 65 X 75 cm de cada lado. La caja estaba recubierta por papel “foamy” rojo con bandas del mismo papel negro (2 cm de ancho) con las que se dividió el área de exploración en nueve cuadrantes del mismo tamaño.

5.1.2.5.3. Exploración en B

Cuarto 2 (con claves espaciales dispuestas en las paredes completamente diferentes a las que existen en el cuarto 1) con la CR previamente descrita.

El procedimiento conductual consistió en dos fases o épocas de exploración. Durante la primera, el animal fue transportado por primera vez al cuarto de conducta envuelto en una toalla blanca (previamente habituado a esta manipulación) y una vez dentro del cuarto se colocó en la caja de exploración en el cuadrante 1, por 15 segundos e inmediatamente después se movió al cuadrante 2 y así sucesivamente hasta haber explorado entre 2 y 3 veces todos los cuadrantes, en un lapso de 5 minutos.

Después de la primera exploración, se colocó al animal en su caja de habitación durante 25 minutos (tiempo necesario para permitir la translocación del mRNA de *Arc* desde el núcleo al citoplasma). Luego se sometió al animal a una segunda exploración de 5'. Esta segunda época de exploración se llevó a cabo en el mismo ambiente (A), o en otra caja en el mismo cuarto (A') o bien en otra caja en un cuarto diferente (B). Inmediatamente después de esta segunda exploración se procedió al sacrificio del animal y a la extracción inmediata del cerebro.

5.1.2.6. Histología para catFISH

5.1.2.6.1. Remoción del cerebro y crioprotección

La remoción del cerebro se llevó a cabo con suma rapidez, de tal manera que el tiempo que transcurrió entre el final de la exploración y el congelamiento del cerebro fue menor a 150 segundos, lo que permitió detener oportunamente la maquinaria celular impidiendo que el procedimiento del sacrificio induzca la transcripción de *Arc*. Una vez extraído, el cerebro, se colocó en un recipiente con 2-metil-butano, en un “baño maría” de solución de etanol con hielo seco para lograr congelar rápidamente el cerebro sin que se fracture. Éste es almacenado manteniendo la temperatura de congelación (-70°C). La disección de cada cerebro se hace posteriormente en un criostato y utilizando una matriz de disección (Electron Microscopy Sciences®), la primera sección es en plano sagital por la cisura inter-hemisférica, separando la corteza frontal y el cerebelo. Los hemisferios izquierdos son los primeros en ser utilizados para formar los bloques que posteriormente serán cortados en el criostato. Cada bloque se compone de 8 hemi-cerebros correspondientes a 8 diferentes subgrupos, los cuales se incluyen en un molde de plástico (VWR®) con Tissue-Tek® O.C.T.™ (Miles, Elkhart, IN), para generar un bloque sólido. En total se obtuvieron 4 bloques que fueron montados, orientados y

cortados en un criostato (Leica 1850®) a -20 °C, obteniéndose secciones coronales de 20 micrómetros de grosor, las cuales se recolectaron en laminillas SuperFrost Plus™ (VWR®). Para el análisis se emplearon entre 6 y 10 laminillas conteniendo el hipocampo dorsal (bregma -2.8 a -4.2, según 50).

5.1.2.6.2. Hibridación in situ fluorescente para Arc (catFISH)

Los tejidos seleccionados, fueron del hipocampo dorsal y fijados con una solución de paraformaldehído al 4%, y lavados con 2XSSC (Sigma®). Posteriormente tratados con una mezcla de acético anhídrido al 0.5% y trietanolamina al 1.5% y luego con una solución de acetona y metanol 1:1. A continuación fueron incubados en una solución buffer de pre-hibridación (Sigma) por 30 minutos a temperatura ambiente. La ribosonda antisentido para *Arc* fue sintetizada en nuestro laboratorio empleando nucleótidos marcados de dioxigenina. Ésta se diluyó en 100 µl de buffer de hibridación y se calentó a 95 °C por 5 minutos para su desnaturalización y luego se colocaron 100 ng a cada laminilla. La hibridación transcurrió durante 16-18 h, a una temperatura de 56 °C. Una vez concluida la hibridación se realizan lavados con 2XSSC y se trata a los tejidos con ARNasa A, con la que se destruye la sonda que no hibridó y los ARNs de simple cadena que quedan. Luego, la sonda hibridizada se detecta mediante inmunohistoquímica. Para la detección los tejidos se incuban a 4 °C, por 2 h, con anticuerpos anti-digoxigenina conjugado con peroxidasa (Roche Products, Hertfordshire, UK). El revelado se realiza con el sistema de amplificación TSA usando Cy3. El núcleo se contratiñó con “SYTOX Green ®”, para ver detalles 18, 19).

5.1.2.6.3. Adquisición y análisis de imágenes para la técnica de catFISH

5.1.2.6.3.1 Captura de imágenes

De cada bloque de tejido se seleccionaron las mejores preparaciones teñidas de manera homogénea y se capturaron 5 imágenes de la hibridación *in situ* para Arc en un microscopio confocal Zeiss LSM 510-Meta (Zeiss México) utilizando el objetivo de inmersión 40X/1.3 A.N. con una resolución en Z = 730 nm. Los láseres empleados fueron uno de helio/neón de 543 nm para excitar la señal de Cy3 (señal de Arc) y otro de Argón 488 nm para visualizar la señal de Sytox-green. Los parámetros de intensidad y contraste se establecieron (por cada preparación histológica) con la sección de cerebro de rata del grupo CC y se mantuvieron constantes para el resto de las adquisiciones de dicha preparación. De cada tejido de 20 µm se obtuvieron entre 34 y 39 planos en Z de aproximadamente 0.3 µm. Por cada cerebro, se capturaron 4 imágenes de los campos CA1 y 4 del CA3 del hipocampo dorsal.

5.1.2.6.3.2. Análisis de imágenes

Las imágenes confocales capturadas, se analizaron con el programa ImageJ (Wayne Rasband, NIH). Todas las imágenes se pre-procesaron con un filtro medio para reducir el ruido antes del conteo llevado a cabo por el experimentador. La señal de contra tinción nuclear, Sytox Green, se empleó para identificar los núcleos neuronales que se incluyeron en el análisis y distinguirlos de los núcleos de las células gliales que no se incluyeron. Como criterio de inclusión de unidades neuronales en el análisis se empleó la regla de los planos medios (ver Guzowski, et al., 1999; Vazdarjanova, et al., 2004; Ramírez-Amaya, et al., 2005). De esta manera se procedió al marcado de todos los núcleos neuronales que se evidencian en los planos de análisis y luego se los clasificó según las características de la señal.

Así la neuronas se clasificaron como: Nucleares (con *Arc* dentro del núcleo), citoplasmáticas (con *Arc* alrededor del núcleo), dobles (con ambas señales) o negativas. La señal “nuclear” se visualizó como dos focos discretos del transcrito, en donde cada foco ocupó al menos 3 planos del apilado de imágenes obtenidas con el microscopio confocal, la tinción “citoplásmática” se considera cuando más del 60% del núcleo se encuentra rodeado de señal, y se clasifica como “doble” si se cumplen ambas condiciones en la misma unidad. Todas las neuronas en donde ninguna de las condiciones anteriores esté presente, se consideraron negativas.

5.1.2.6.3.3. Índice de similitud

Con este índice de similitud podemos transformar la clasificación compleja hecha de la tinción de *Arc* obtenida a partir de la tinción con catFISH en un valor simple que nos permitió determinar la independencia de los ensambles activados en ambas épocas de exploración y se usó para comparar los patrones de actividad neuroanatómicas entre diferentes regiones (Vazdarjanova, et al., 2004), en este caso entre las redes hipocampales de CA3 y CA1. Este registro contempló las cuatro posibles clasificaciones (nucleares, citoplasmáticas, dobles y negativas) y las redujo a un valor simple de acuerdo a lo siguiente:

$$\text{Índice de similitud} = \text{"diff(E1E2)"} / (\text{"bajaEpoca"} - \text{"p(E1E2)"})$$

En donde:

“# Arc-Nuc” = El número total de células clasificadas como Arc nuclear positivas.

“# Arc-Cyt” = El número total de células clasificadas como Arc citoplasmático positivas.

“# Arc-Dob” = El número total de células clasificadas como Arc doble (nuclear y citoplasmático positivas).

“# Total-células” = El número total de células, incluyendo negativas (sin tinción de Arc) y las tres clasificaciones anteriores.

“Época 1” = (“#Arc-Cit” + “#Arc-Dob”) / “# células-totales”

“Época 2” = (“#Arc-Nuc” + “#Arc-Dob”) / “# células-totales”

“Época baja” = El valor más bajo entre “Época 1” vs “Época 2”
*"p(E1E2)" = “Época 1” * “Época 2”*
"diff(E1E2)" = ("#Arc-Doble"/"# Células-Totales") - "p (E1E2)"

Con esta fórmula, un valor igual a 1 significa que es exactamente la misma población neuronal la que se activa en ambas épocas conductuales, mientras que el valor igual a 0 indica que las poblaciones que se activan durante ambas épocas son estadísticamente independientes.

5.1.2.6.4 Inmunohistoquímica y Análisis De Map-2y Sinaptofisina

En las preparaciones adyacentes a las que se les realizó el análisis de catFISH, se le aplicó un procedimiento de inmunohistoquímica para MAP-2 y Sinaptofisina. Los tejidos se fijaron con paraformaldehído 2%, y se sometieron a un proceso de inactivación de la peroxidasa endógena, a través de una incubación con H₂O₂ al 0.6%, y pre-incubados con la solución de TSA-BB (buffer de bloqueo del kit TSA-PerkinElmer®) en donde posteriormente también se diluyó el anticuerpo primario, monoclonal hecho en ratón, anti Sinaptofisina (Sigma-Aldrich). La incubación del anticuerpo primario en dicha dilución se realizó durante toda la noche a 4°C. Se procedió al lavado con TBS para la segunda incubación del anticuerpo secundario hecho, en cabra, anti-ratón biotinilado, por 2 horas a temperatura ambiente 20°C. Dicha señal se amplificó con el sistema de Avidina-Biotina 2 (Vector Labs®) para finalmente ser revelado con el fluoróforo CY3 (Perkin Elmer®). Una vez realizada esta detección se procedió a la detección de MAP-2, con el mismo procedimiento anteriormente detallado, empleando como anticuerpo primario un anti-MAP-2 también hecho en ratón, por lo que se utiliza el sistema “Mouse on Mouse” (Vector Labs®) con el que se bloquea la IgG de ratón que se mantiene expuesta después de la primera detección. Este anticuerpo secundario también está biotinilado por lo que, antes de la amplificación, se utiliza el sistema

de bloqueo AB (Vector®) para evitar reacciones cruzadas. La señal de MAP-2 se reveló con el fluoróforo FIT-C. Finalmente se realizó una contra tinción para DNA con DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) para poder visualizar los núcleos.

5.1.2.6.4.1. Adquisición de imágenes

Se obtuvieron de las tinciones de MAP-2 y Sinaptofisina, se obtuvieron mosaicos de 30 imágenes, con el sistema MosaiX® del Ápotome (Carl Zeiss®, México, D.F. México), utilizando un objetivo de inmersión 25 X de 0.85 de AN, lográndose así una imagen completa del hipocampo. Se capturaron entre 5 y 8 mosaicos por animal. Los parámetros de capturas para cada preparación fueron estandarizados a partir de un animal control y se mantuvieron constantes para el resto de la preparación.

5.1.2.6.4.2. Análisis de imágenes en mosaicos

Para analizar el área de tinción de Sinaptofisina, se empleó el programa ImageJ. Luego se continuó con la delimitación de 14 regiones en el hipocampo. Éstas incluían el *Stratum Oriens* (SO) de CA3 dividido en 3 regiones (designadas en relación a la cercanía al giro dentado): distal (SOd), medial (SOM) y proximal (SOp); el *Stratum Lúcidum* (SL) también se le dividió en 3 regiones (según la cercanía al giro dentado): distal (SLd), medial (SLm), proximal (SLp); y el *Stratum Radiatum* (SR) dividido en 6 regiones designadas según su cercanía al giro dentado y su proximidad a los somas de las neuronas piramidales de CA3, respectivamente: distal proximal (SRdp), medial proximal (SRmp), proximal proximal (SRpp), distal distal (SRdd), medial distal (SRmd) y proximal distal (SRpd). También se delimitaron dos regiones para CA1: *Oriens* y *Radiatum*. Una vez delimitadas las regiones de interés, se midió el área que ocupa en ellas la tinción de Sinaptofisina y de MAP-2, utilizando un umbral de densidad

óptica que se mantuvo estable en las imágenes de todos los tejidos de la misma preparación y que se establecieron en los cerebros de los animales CI que se encontraron en cada uno de los bloques. Es importante señalar que todas las imágenes fueron pre-procesadas empleando el filtro mediano, lo que nos permitió homogenizar las imágenes para obtener niveles de señal adecuados para el análisis de todas las imágenes.

5.1.3. Resultados

5.1.3.1. Efecto del sobre-entrenamiento en el LAM en la ejecución de una tarea conductual que requiere separación de patrones espacial.

Para evaluar el efecto del LAM que induce expansión de las fibras musgosas (FM) hipocampales en la separación de patrones espaciales, se estudió primero conductualmente mediante el uso de la tarea de no-igualación a la muestra de lugar con retraso, la cual fue diseñada *ex profeso* para evaluar la capacidad de los animales de separar patrones espaciales (Clelland et al., 2009).

Se entrenó a ratas macho de la cepa Wistar en una tarea del LAM, el cual consistió en 10 ensayos diarios (5 pares de ensayos para el análisis estadístico) por un periodo de 5 días (ver métodos para más detalles). Se observó así una disminución significativa en la latencia para alcanzar la plataforma en cada uno de los días de entrenamiento (ANOVA de repetidas medidas): día 1, $F_{8,4} = 6.61$ $P < 0.001$, día 2, $F_{8,4} = 12.679$ $P < 0.001$, día 3, $F_{8,4} = 7.481$ $P < 0.001$, día 4, $F_{8,4} = 3.799$ $P = 0.0123$, y día 5, $F_{8,4} = 3.028$ $P = 0.0317$). Estos resultados son evidencia de que el procedimiento de entrenamiento en el LAM promueve la adquisición de un aprendizaje espacial. Es importante notar que en los últimos dos días los animales muestran que la disminución en la latencia de llegada a la plataforma es más tenue, lo que sugiere que los animales han alcanzado la fase asintótica del desempeño en esta tarea (Figura

1A) y lo cual puede considerarse como sobre-entrenamiento (Ramírez-Amaya, et al., 2001). Siete días después de que los animales fueron sobre-entrenados en la tarea de LAM (n=10), estos se sometieron al entrenamiento en la tarea de “no-igualación a la muestra de lugar con retraso” (NIMLR) y la ejecución en esta tarea se evaluó entre los animales previamente sobre-entrenados en la tarea de LAM en comparación con los animales CN (n=11) y con la de los animales CI (n=13).

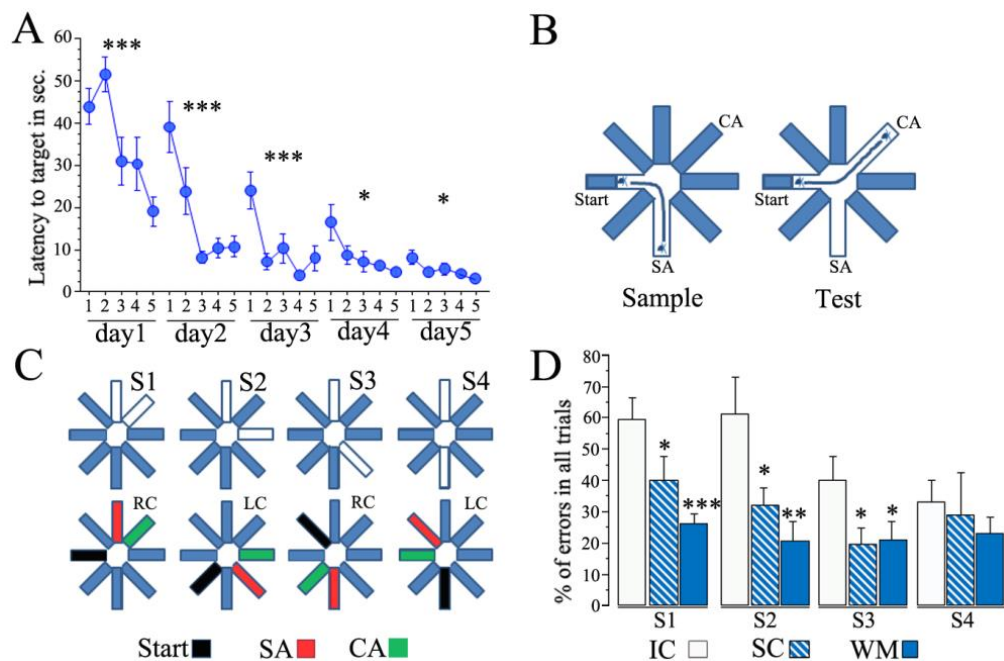


Figura 1. La separación de patrones espaciales medida con la tarea de NIMLR, mejora en animales previamente sometidos al laberinto de agua de Morris y al tratamiento de control de nado. A) La ejecución en la fase de entrenamiento en el laberinto de agua de Morris se expresa como la latencia de llegada al blanco; cada punto representa el promedio de la latencia de cada par de ensayos, dado que la distancia promedio a la plataforma de cada par es la misma que cualquier otro. Un total de 5 sesiones a lo largo de 5 días se llevaron a cabo (***) $p < 0.001$, * $p < 0.05$, repeated measures ANOVA). B) La tarea de NIMLR consiste en colocar a cada animal a la mitad del brazo de inicio y al abrirse la puerta del brazo se le permite al animal encontrar la comida al final del brazo muestra (SA); durante la siguiente fase el animal necesita encontrar el brazo de elección (CA), el cual es el único lugar en donde encontrará comida y que solo está abierto en la segunda fase. C) Se utilizan cuatro diferentes separaciones entre el SA y el CA; en la separación 1 (S1), los brazos SA y CA están adyacentes uno del otro; en la separación 2 (S2) un brazo separa al SA y el CA; en la separación 3 (S3) dos brazos separan al SA y CA; y finalmente en la separación 4 (S4), los brazos SA y CA están uno opuesto al otro, nótese que el brazo de inicio (en negro) está siempre a 45 grados ya sea del SA o del CA, y la posición del brazo reforzado durante la fase de elección (CA) alterna entre izquierda (LC) y derecha (RC) a través de los ensayos. D) Los resultados se expresan en el promedio de errores para cada separación, a través de todos los ensayos para cada uno de los grupos (\pm SEM); nótese que los grupos WM y SC presentan una cantidad de errores significativamente menor al grupo IC, excepto en S4 (***) $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$).

Los animales CN son animales sometidos a las mismas condiciones que los animales entrenados en el LAM pero sin entrenarlos a llegar a la plataforma y eliminando claves visuales en el cuarto de conducta (ver métodos). Los animales controles intactos (CI) son animales que se mantienen en su caja habitación durante las condiciones del pre-tratamiento conductual (entrenamiento en el LAM y CN).

La tarea de NIMLR se describe en detalle en los métodos, pero con el propósito de aclarar el significado de los resultados describimos aquí en términos generales los procedimientos y las variables que se miden. La tarea de NIMLR se lleva a cabo en un laberinto radial de 8 brazos, y en ella se evalúa la capacidad de un animal para elegir entre dos separaciones espaciales diferentes. En el “brazo muestra”, el animal obtiene una pieza de comida durante la fase inicial del entrenamiento, o fase muestra. En la fase de prueba, que ocurre 20 segundos después, la comida sólo puede obtenerse en el brazo elección (BE). En la separación 1 ($S1=45^\circ$), que es la más complicada, el BM y el BE están adyacentes; en la separación 2 ($S2=90^\circ$) hay un brazo de por medio entre ambos brazos; en la separación 3 ($S3=135^\circ$) hay dos brazos entre el BM y el BE y finalmente en la separación 4, la cual es considerada la más sencilla, ($S4=180^\circ$) hay 3 brazos entre uno y otro.

Durante la fase de elección, el animal precisa recordar el brazo previamente visitado, donde el alimento ya no se encuentra disponible, para distinguir el brazo donde ahora sí encontrará el alimento disponible (ver Figura 1B y métodos para más detalles). Una elección correcta es considerada cuando el animal ingresa al BE durante la fase de prueba, mientras que la entrada en cualquier otro brazo durante la fase de prueba es considerada como un error. Esto fue empleado para el análisis estadístico de los datos. Es importante notar que la posición del BM y el BE varían a través de los diferentes ensayos, incluso la disposición, ya sea a la

izquierda o a la derecha del BE en relación al BM varía entre los diferentes ensayos (ver Figura 1B y 1C y métodos para más detalles).

En S1 la proporción de errores entre los grupos tiene una variación altamente significativa (ANOVA de una vía: $F_{2,31} = 8.45$ $P < 0.01$), siendo las diferencias entre los grupo CN y CI significativas (*post hoc* Fisher $P < 0.05$) y entre los grupos LAM y CI altamente significativas ($P < 0.001$). Para la S2 también se encontraron diferencias altamente significativas entre los grupos ($F_{2,31} = 5.63$ $P < 0.01$) siendo también significativas las diferencias entre los grupo CN y CI ($P < 0.05$) y altamente significativas entre LAM y CI ($P < 0.001$). En las separaciones S3, se encontraron diferencias significativas entre grupos ($F_{2,31} = 3.8$ $P < 0.05$), siendo significativas tanto la diferencia entre LAM y CI como entre CN y CI ($P < 0.05$). En S4 no se encontraron diferencias significativas entre los grupos (Figura 1D).

Cuando se comparan el número de errores a lo largo de las diferentes separaciones (ANOVA de medidas repetidas) se encontraron diferencias significativas entre los grupos ($F_{2,31} = 5.528$ $P < 0.01$) y también Se encontraron diferencias significativas entre las diferentes separaciones ($F_{3,6} = 4.754$ $P < 0.01$).

El análisis *post hoc* de Fisher reveló que se comete un número de errores significativamente mayor en las separaciones S1 y S2 cuando se compararon con las separaciones S3 y S4 (P 's < 0.05), lo que indica que los errores se comenten principalmente en las separaciones más difíciles (S1 y S2). Cuando este análisis se hizo en cada grupo, se encontraron diferencias significativas sólo en el grupo CI ($F_{3,12} = 6.37$ $P < 0.01$), lo que significa que este grupo no distingue bien entre los brazos con separaciones cortas y por lo tanto presenta deficiencia en la separación de patrones espaciales llevada a cabo por el hipocampo (Clelland et al., 2009).

5.1.3.2. El método de imagenología “catFISH” revela que tanto la separación como el completamiento de patrones espaciales mejoran en los animales sometidos a una experiencia espacial

Posteriormente se estudió el correlato neurofisiológico del efecto del sobre-entrenamiento en la tarea de LAM en la separación de patrones, mediante un análisis de la actividad con el uso del método de imagenología “catFISH” (Guzowski, et al., 1999) o análisis compartamental y temporal de la actividad neuronal por medio de hibridación *in situ* fluorescente. Se detectó en el núcleo de la célula, al gen de expresión inmediata *Arc/Arg3.1*, después de 5 minutos de su expresión inducida por actividad neuronal y posteriormente, alrededor de 25 o 30 minutos, se translocó al citoplasma de la neurona. De esta manera se pudo distinguir a las neuronas activadas por dos diferentes experiencias de exploración espacial separadas por un intervalo de 30 minutos. A cada una de estas experiencias conductuales se las denominó “época”. Así, con esta técnica, se puede determinar el grado de solapamiento entre los 2 ensambles reclutados por cada una de las dos épocas. Por lo tanto, la separación de patrones espaciales ocurre cuando el grado de solapamiento es muy bajo y el completamiento de patrones espaciales cuando este grado es alto (Vazdarjanova, et al., 2004). Previamente se ha empleado catFISH para evaluar el completamiento y la separación de patrones espaciales (Vazdarjanova, et al., 2004). Para ello se expusieron a ratas a dos ambientes, los cuales fueron separados por un intervalo de 30 minutos y cada exploración duró 5 minutos. Las condiciones se muestran en la Figura 2 y fueron:

“A” – “A”;

“A” – “A(Obj)”;

“A” – “A(Conf)”;

“A” – “A(B)”;

“A” – “B”;

“A(OBJ)”: Modificación del tipo de objetos sin alterar la disposición de los mismos ni la caja de exploración en la que se encontraban.

“A(CONF)”: Modificación de la disposición de los objetos, sin alterar el tipo de objeto ni la caja de exploración en la que se encontraban.

“A(B)”: Modificación del cuarto donde se encuentra la misma caja de exploración conservando el tipo de objeto y la disposición de los mismos.

“B (B)”: Modificación total: Es un cuarto diferente, una caja diferente, objetos diferentes y disposición de éstos diferentes.

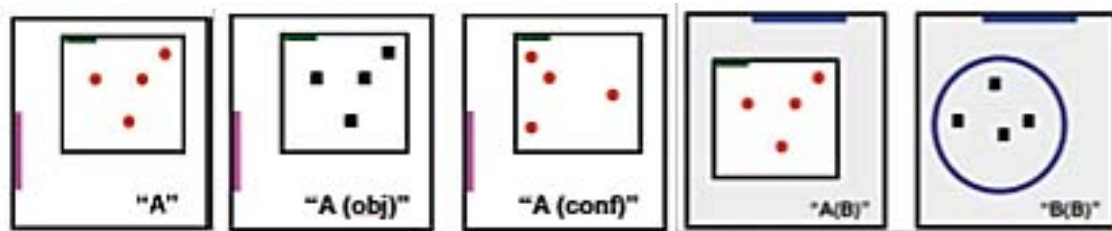


Figura 2. Esquema del protocolo de Vazdarjanova, et al 2004: Se puede ver la disposición y el tipo de objetos standard, en la caja (“A”). En el caso “A (obj)”, se mantiene la misma disposición pero varía el tipo de objeto. En “A (conf)”, lo que se mantiene es el tipo de objeto variando la disposición. En “A(B)”, la disposición y tipo de objetos es la misma pero lo que varía es el cuarto en donde se coloca la caja de exploración y en “B(B)”, se modifica tanto el tipo y la disposición del objeto como el cuarto en el que se encuentra la caja.

Cuando los animales fueron sometidos al ambiente “A” en dos ocasiones, se encontró con el catFISH que los ensambles activados en la región del CA1 y CA3 presentaban un alto nivel de solapamiento, lo que es indicativo de un mecanismo de completamiento de patrones. En cambio, exponiendo a las ratas a ambientes gradualmente diferentes “A(OBJ)” o “A(CONJ)” o “A(B)” (ver Figura 2), los ensambles activados del CA1 presentaron un menor grado de solapamiento, lo que indica una separación parcial de patrones. Solamente la exposición a

ambientes completamente distintos causó en el CA1 que los ensambles reclutados fueron estadísticamente independientes, lo que indicó que solo en estas condiciones la red neuronal del CA1 realiza separación completa de patrones espaciales. En la red neuronal del CA3 los resultados fueron notablemente distintos, ante los cambios en el ambiente, esto es, ante cambios graduales, la red neuronal del CA3 sigue reclutando prácticamente al mismo ensamble de neuronas que se activó originalmente, y solo ante un cambio completo en la condiciones del contexto, CA3 recluta ensambles altamente independientes de neuronas. Estos resultados sugieren que el CA3 tiende a completar patrones de información espacial y que solamente separa patrones ante cambios radicales en el ambiente, mientras que el CA1 recluta ensambles gradualmente diferentes en relación a los cambios graduales en el contexto.

Para analizar de manera más sencilla el solapamiento entre los grupos de neuronas reclutados, Vazdarjanova y cols. (2004) utilizaron una medida denominada índice de similitud (IS), la cual es una medida de la independencia de los conjuntos de células activas en las dos épocas o episodios conductuales que, cuando se acerca a 1, indica que el grupo de células reclutadas por cada evento conductual tiende a ser el mismo, mientras que al acercarse a 0 indica que los grupos de neuronas reclutadas por cada época son estadísticamente independiente (ver métodos para el cálculo del IS). Esta medida les permitió observar que las neuronas piramidales en CA3 son reclutadas en grupos independientes solamente cuando las diferencias en el ambiente son robustas, mientras que en el CA1 las respuestas a estos cambios ocurren de manera gradual.

De esta manera, un alto IS indica un proceso óptimo de completamiento de patrones, lo que significa que el sistema está reconociendo las similitudes en la experiencia y por ello recluta al mismo grupo de neuronas, mientras que un bajo IS indica un proceso de separación

de patrones, en cuyo caso el reconocimiento de las diferencias hace que se recluten conjuntos independientes de neuronas.

Dado que se ha probado previamente la utilidad de catFISH para analizar la separación y completamiento de patrones, utilizaremos esta herramienta para analizar los cambios funcionales en el hipocampo a consecuencia de la expansión de las FM inducida por la experiencia espacial.

En un grupo independiente de animales (n=42) se llevó a cabo el análisis de catFISH en las redes hipocampales del CA3 y del CA1, para evaluar la separación y el completamiento de patrones en respuesta a la experiencia de doble exploración espacial. Este análisis se llevó a cabo en animales pre-tratados en el LAM (n =13), en animales CN (n=13) y en animales CI (n=16). El pre tratamiento ocurrió 7 días previos al protocolo de estimulación conductual para catFISH. Este último consistió en dos experiencias de exploración espacial de 5 minutos cada una, separadas por un intervalo de 25 minutos. Entonces, cada uno de los 3 grupos de animales (LAM, CN y CI) fueron subdivididos en 3 subgrupos (n= 4 por grupo). Cada uno de los subgrupos se expuso a un régimen de exploración espacial diferente AA, AA' o AB. En la condición de exploración AA, ambas épocas de exploración se llevaron a cabo en exactamente el mismo ambiente (misma caja de exploración en el mismo cuarto de conducta); en la condición AA' los ambientes de exploración fueron medianamente diferentes (cambia la caja de exploración pero no el cuarto de conducta) y en la condición AB los ambientes de exploración fueron totalmente distintos (distinta caja de exploración y distinto cuarto de conducta) (ver la sección de los métodos para más detalle). Los 6 animales restantes sirvieron como controles de caja para evaluar la expresión basal de *Arc*. De esta manera cada uno de los grupos (CI, CN y LAM) estuvo conformado por 3 subgrupos y cada uno de estos subgrupos experimentó una de las 3 posibles condiciones de exploración espacial (AA, AA' o AB).

Resultaron así los siguientes 10 grupos:

CI	CN	LAM
CI-AA (n=4)	CN-AA (n=4)	LAM-AA (n=4)
CI-AA' (n=4)	CN-AA' (n=4)	LAM-AA' (n=4)
CI-AB (n=4)	CN-AB (n=4)	LAM-AB (n=4)
CI-CC (n=4)	CN-CC (n=1)	LAM-CC (n=1)

Debido a que la proporción de células activas no varía entre los animales de los grupos CI-CC, CN-CC y LAM-CC, se unieron a estos grupos en un solo grupo control denominado control de caja (CC).

El análisis de catFISH proporciona cuatro valores como producto de la caracterización de la tinción celular de *Arc* (Guzowski, et al., 1999; Vazdarjanova, et al., 2004). Estos valores son: **Arc nuclear**, que indica que se encontraron dos focos de transcripción de *Arc* en el núcleo, lo cual ocurre como producto de la respuesta de la célula a la segunda época de exploración; **Arc citoplasmático** que indica que se encontró la tinción de *Arc* rodeando el 60% del núcleo cuando la respuesta de la célula fue a la primer época de exploración; **Arc doble** en donde se cumplen los dos criterios descritos previamente, que indica que la célula respondió a ambas épocas de exploración; y **Arc negativo**, cuando no se encuentra tinción de *Arc*, lo que indica que la célula no respondió a ninguna de las épocas de exploración.

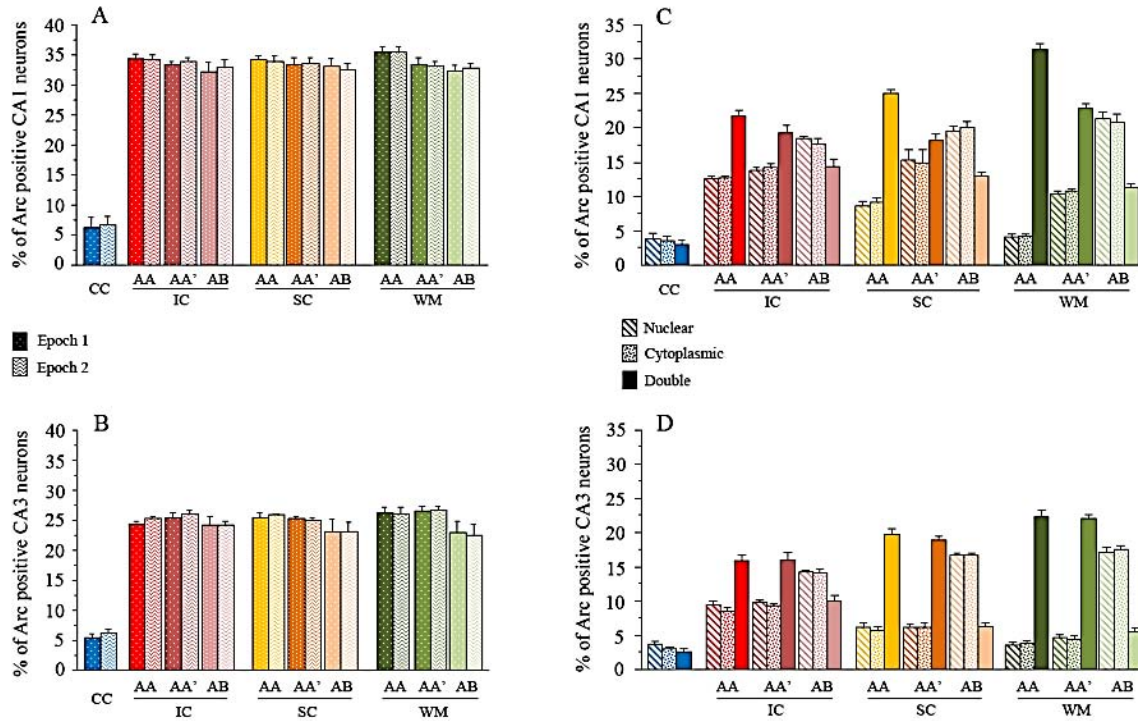


Figura 3. Resultados de catFISH. Las gráficas a la izquierda muestran el porcentaje de células positivas para *Arc* (todas las clasificaciones) en cada una de las épocas. Las barras sólidas representan a la época 1 y las barras con textura representan a la época 2. Nótese que en el CA1 (A) cada exploración espacial induce la expresión del mRNA de *Arc* en aproximadamente 33% de la población de neuronas piramidales. El ANOVA de una vía realizado para cada una de las épocas, mostró diferencias estadísticas entre grupos (Epoch 1: $F_{9,32} = 66.42$ $P < 0.01$; Epoch 2: $F_{9,32} = 83.56$ $P < 0.01$), y el análisis de Bonferroni respectivo reveló que todos los grupos mostraron un porcentaje de células positivas para *Arc* (todas las clasificaciones) significativamente ($P < 0.001$), más alto que lo encontrado en los animales control de caja mientras que al comparar el resto de los grupos no se encontraron diferencias significativas. En la red del CA3 (B) cada época conductual induce la expresión del mRNA de *Arc* en una población que representa el ~25% de las neuronas piramidales de CA3. El ANOVA de una vía, ejecutado en el porcentaje de neuronas de CA3 que expresan *Arc* en cada época, mostró diferencias estadísticamente significativas entre grupos (Epoch 1: $F_{9,32} = 142.89$ $P < 0.01$; Epoch 2: $F_{9,32} = 148.27$ $P < 0.01$), y su respectivo análisis *post hoc* de Bonferroni mostró de manera significativa que todos los grupos tienen mayor proporción de neuronas positivas a *Arc* (todas las clasificaciones) en comparación con el grupo control de caja ($P < 0.001$), mientras que no se detectaron diferencias entre el resto de los grupos. Estos resultados indican que cada evento de exploración espacial estimula la actividad neuronal tanto en el CA1 como en el CA3, y que dicha actividad recluta una proporción diferente de neuronas en cada una de las redes neuronales. El porcentaje de células con *Arc* en los diferentes compartimentos (diferentes clasificaciones) se muestra en las gráficas de la derecha. En éstas se distingue entre las neuronas clasificadas como *Arc*-nuclear (barras con patrón diagonal), *Arc*-citoplasmático (barras con puntos) y *Arc*-doble (barras solidas). Se observan diferencias claras entre las condiciones de doble-exploración tanto en el CA1 (B) (nuclear: $F_{9,32} = 71.81$ $P < 0.01$; citoplasmático: $F_{9,32} = 50.5$ $P < 0.01$; doble: $F_{9,32} = 106.313$ $P < 0.01$) como en el CA3 (D) (nuclear: $F_{9,32} = 112.19$ $P < 0.01$; citoplasmático: $F_{9,32} = 157.05$ $P < 0.01$; Doble: $F_{9,32} = 119.19$ $P < 0.01$). Estos resultados muestran que tanto en el CA1 como en el CA3, los animales pre-tratados en la experiencia espacial (LAM y SC) tienden a usar las mismas neuronas en la condición AA y un grupo más independiente de neuronas en la condición AB, en contraste con los animales pre tratados como controles intactos, en los cuales las diferencias en los ensambles reclutados entre estas condiciones de doble exploración no son tan notables (* $P < 0.001$).

Para simplificar los resultados del análisis de catFISH, empleamos el índice de similitud (IS), el cual como se explicó en los métodos, contempla los cuatro valores de clasificación de las células analizadas (negativas, *Arc*-Nuclear, *Arc*-Citoplasmático y *Arc*-Doble). Y como explicamos previamente, reduce el análisis de solapamiento a un solo valor que va de 0 a 1, y en donde 0 implica que las poblaciones neuronales reclutadas en ambas épocas son estadísticamente independientes, mientras que 1 significa que las poblaciones reclutadas en ambas épocas de exploración son las mismas (ver métodos y Vazdarjanova, et al., 2004).

La condición de CC fue empleada exclusivamente para determinar si la expresión del mRNA de *Arc* ocurre en respuesta a la exploración espacial (Figura 3). Por ello, para el posterior análisis en el que calculamos el IS excluimos al grupo CC.

Los resultados muestran que en ambas regiones el IS varía ante las diferentes condiciones de exploración (Figura 4). En CA1, el IS difiere significativamente entre los diferentes grupos ($F_{8,27} = 62.16$ $P < 0.01$). El análisis *post hoc* con Bonferroni, en el CA1, muestra que los animales que previamente fueron sometidos al entrenamiento en el LAM, cuando se someten a la condición de exploración AA, presentan un IS superior al de los animales CI (en AA), con una alta diferencia significativa ($P < 0.001$) e incluso superior al de los animales CN (en AA) también con una alta diferencia significativa ($P < 0.001$). Esto indica que, en los animales LAM, la red del CA1 mejora el completamiento de patrones espaciales. Cuando estos animales (LAM) se someten a la condición de exploración AA', no se encontró un incremento estadísticamente significativo en el IS en comparación con los animales CI. Un dato interesante es que entre las condiciones de exploración AA y AA' sí se encontró que los ISs presentan diferencias significativas ($P < 0.001$), siendo claramente mayor en los animales expuestos al mismo ambiente (AA). Esto sugiere que, ante cambios graduales en el ambiente, la red del CA1 de los animales pre tratados en el LAM recluta un ensamble gradualmente

diferente para llevar a cabo la separación parcial de patrones espaciales (Hayman & Jeffery, 2008). Curiosamente, esta diferencia entre los IS de las condiciones de exploración AA y AA' también ocurre en el grupo CN ($P < 0.001$) pero no en el grupo CI, lo cual sugiere que la separación parcial de patrones está deteriorada en el grupo CI y mejora en los grupos CN y LAM. En el caso de la condición de exploración AB, los animales LAM presentan un IS significativamente menor ($P < 0.05$) que el de los animales CI, lo cual sugiere que estos animales mejoran su capacidad de separar patrones. Esto no ocurre en los animales CN, en efecto, podemos observar que en este grupo, en ninguna de las condiciones se encuentran diferencias significativas con los IS respectivos del grupo CI.

En la región de CA3, ante las diferentes condiciones de exploración, el IS difiere significativamente entre los diferentes grupos ($F_{8,27} = 138.26$ $P < 0.01$). En esta red, el grupo LAM, presenta diferencias altamente significativas (P 's < 0.001) en las 3 condiciones de exploración (AA, AA' y AB), cuando se comparan con los respectivos IS del grupo CI. Como podemos notar, a diferencia de lo que ocurre en CA1, en CA3 no hay diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones de exploración AA y AA', en el grupo LAM. Esto nos muestra que la red de CA3 recluta ensambles con un alto grado de solapamiento, en respuesta a inputs levemente diferentes (AA'), y por lo tanto, a diferencia de CA1, completa patrones. Las diferencias altamente significativas en la condición AB evidencian una clara mejoría en la separación de patrones en este grupo.

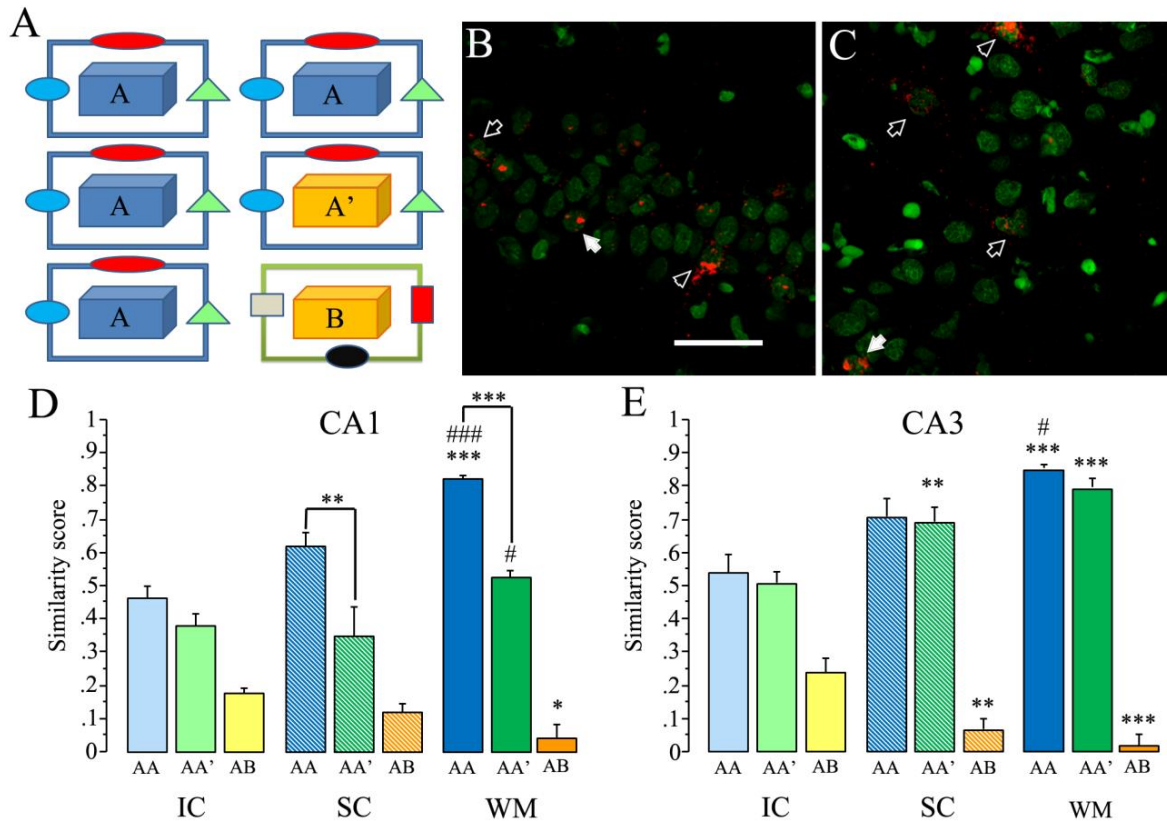


Figura 4. Separación y completamiento de patrones espaciales en la red hipocampal, evaluada mediante catFISH de *Arc*. A) Representación esquemática de los procedimientos de exploración en campo abierto utilizados para el análisis de catFISH; los animales exploraron el primer ambiente por 5 minutos, y 25 minutos después exploraron por otros 5 minutos el segundo ambiente, ya sea en la condición AA (misma caja, mismo cuarto), AA' (diferente caja mismo cuarto), o AB (diferente caja diferente cuarto). En B) y en C) se muestran ejemplos de imágenes confocales (1 plano filtrado del stack) usadas para el análisis de catFISH; en verde están las células contrateñidas con “Sytox-green”® y en rojo esta la señal del mRNA de *Arc*. Nótese que los núcleos neuronales tienen textura y en estas células la señal de sytox es tenue, mientras que la glía, cuyos núcleos son más pequeños, presentan un color sólido intenso. La señal de *Arc* se observa dentro del núcleo como 2 focos de transcripción (flechas negras), o como tinción citoplasmática rodeando el núcleo de la neurona (flechas blancas), y en algunas neuronas se observan ambas tinciones (cabeza de flecha). La barra representa 50 μm . En las gráficas de barras se presentan los resultados de los IS (\pm SEM) que se obtuvieron en CA1 (D) y en CA3 (E) de animales expuestos a la doble exploración en AA, AA', y AB, después de haber sido pre-tratados en las condiciones de control intacto (IC), control de nado (SC) o sobre-entrenados en el laberinto de agua (WM). El análisis post hoc con Bonferroni vs. su respectivo IC $***P < 0.001$, $**P < 0.01$, $*P < 0.05$; vs. su respectivo SC ($###P < 0.001$, $\#P < 0.05$) y las importantes diferencias entre grupo se muestran con una línea ($***P < 0.001$, $**P < 0.01$).

En el caso de los animales del grupo CN, encontramos diferencias estadísticamente significativas en la condición de exploración AA' y AB (P 's < 0.01) cuando comparamos con los respectivos IS del grupo CI, lo cual sugiere que estos animales también presentan ciertas

mejorías en su capacidad de completar y separar patrones. En este grupo, al igual que en el grupo LAM cuando los animales se someten a la condición de exploración AA' los animales llevan a cabo un completamiento de patrones espaciales.

En términos generales, el análisis de catFISH demuestra que en la red del CA1, los animales pre tratados en el LAM son los que mejoran su capacidad tanto de completar como de separar patrones, pero ambos grupos (LAM y CN) presentan la habilidad de la red del CA1 para reclutar ensambles parcialmente diferentes ante cambios graduales en el ambiente. En la red de CA3, sólo el grupo LAM mejora su capacidad de completar patrones, pero ambos grupos presentan la tendencia de reclutar poblaciones neuronales con alto grado de solapamiento ante la presencia de cambios graduales en el ambiente, en otras palabras, ante la condición de exploración AA' ambos grupos completan patrones espaciales. En el caso de la condición AB, también ambos grupos son muy eficientes en llevar a cabo la separación de patrones (lo cual podría ser una explicación plausible de los resultados obtenidos en la tarea de NIMLR).

5.1.3.3. El análisis de la tinción de Sinaptofisina/Map2 evidencia la expansión de las FM y un incremento en la densidad de las colaterales de Schaffer

Para confirmar que el sobreentrenamiento en el LAM induce la expansión de las FM (Ramírez-Amaya, et al., 1999; 2001; Holahan, et al., 2006), se llevó a cabo una doble inmunohistoquímica en las secciones adyacentes a las empleadas para el análisis de catFISH. La tinción de Sinaptofisina revela los botones pre-sinápticos tanto de las células granulares como de las piramidales (Holahan, et al., 2006; Pozzo-Miller, et al., 1999), mientras que la tinción de MAP2 se empleó como referencia para identificar las dendritas de las células piramidales (Caceres, et al., 1984; Di Stefano, et al., 2006).

Para el análisis los tejidos se separaron en los 3 diferentes grupos de pre-tratamiento: CI (n=16), CN (n=13) y LAM (n=13). En ellos se midió el área ocupada por la tinción de Sinaptofisina, dividido por el área delimitada a partir de la tinción de MAP2 (lo cual conforman las regiones de interés o ROIs por sus siglas en inglés, ver Figura 5).

Estas ROIs fueron dibujadas para segmentar las diferentes partes de las regiones dendríticas de CA3 y CA1 (ver métodos y la Figura 5). En la región de CA3 distinguimos el *Stratum Oriens* del *Stratum Lúcidum* y las porciones proximales y distales del *Stratum Radiatum* en relación a la proximidad al soma de las células piramidales de CA3. Cada una de estas regiones, a su vez, se dividió en 3 (distal, medial y proximal) según la proximidad al giro dentado, lo cual dio origen a un total de 12 ROIs para CA3, y para CA1 la segmentación consistió simplemente en distinguir el *Stratum Oriens* del *Stratum Radiatum*, lo cual dio origen a otras 2 ROIs.

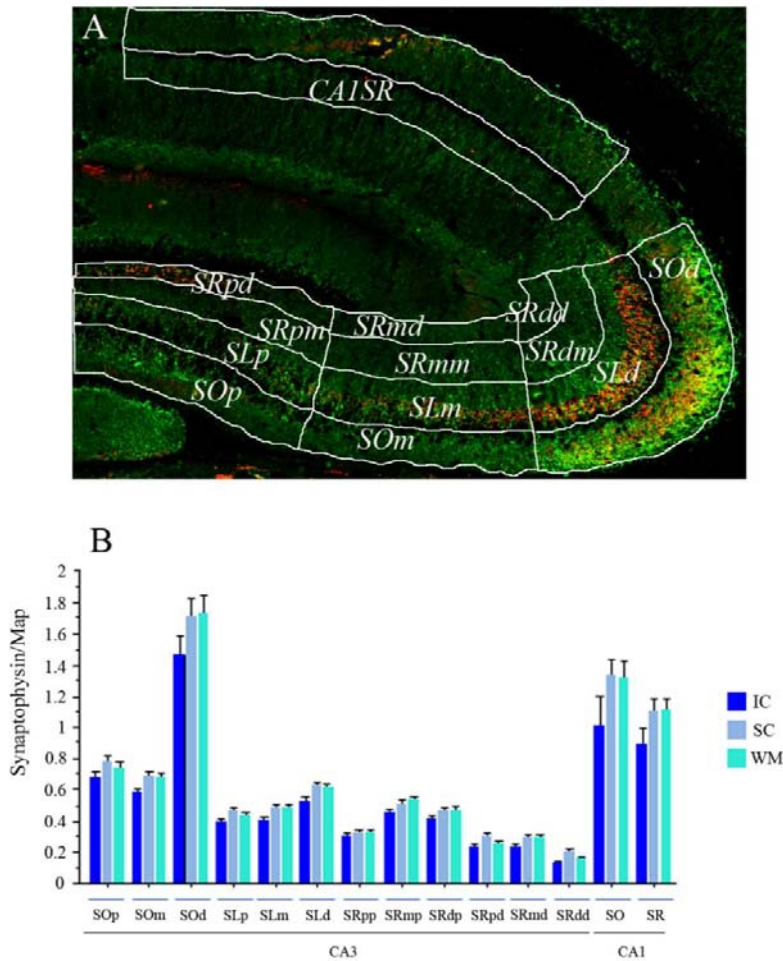


Figura 5. Segmentación de las regiones para el análisis de la tinción de Sinaptofisina/Map2, y resultados del área ocupada por Map2. Imagen representativa del hipocampo de rata teñido con Sinaptofisina y map/2 en la cual se dibujaron las ROIs para realizar el análisis del área ocupada por Sinaptofisina con el uso del programa Image J. Las ROIs incluyen a la región del Stratum Oriens del CA3 dividido en tres regiones basándose en su proximidad al giro dentado: *Stratum Oriens distal (SOd)*, *Stratum Oriens medial (SOM)*, y *Stratum Oriens proximal (SOp)*; el *Stratum Lúcidum* de CA3 también se dividió en 3 regiones, el *Stratum Lúcidum distal (SLd)*, *Stratum Lúcidum medial (SLm)*, y el *Stratum Lúcidum proximal (SLp)*; el *Stratum Radiatum* del CA3 se dividió en 6 regiones, primero dependiendo de la proximidad al giro dentado y segundo, dependiendo de la proximidad al soma: De esta manera quedaron las regiones del *Stratum Radiatum distal medial (SRdm)*, el *Stratum Radiatum medial medial (SRmm)*, el *Stratum Radiatum proximal medial (SRpm)*, el *Stratum Radiatum distal distal (SRdd)*, el *Stratum Radiatum medial distal (SRmd)*, y el *Stratum Radiatum proximal distal (SRpd)*. Las últimas 2 ROIs corresponden al *Stratum Oriens (CA1O)* y *Stratum Radiatum (CA1R)* de CA1. En la gráfica de barras (B) se muestran los resultados del análisis de la tinción de Map-2 expresado en pixeles cuadrados para cada ROI. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la tinción de Map-2 entre los diferentes grupos para ninguna de las ROIs.

Este análisis de las áreas teñidas con Sinaptofisina, en las diferentes ROIs reveló diferencias estadísticamente significativas entre grupos solamente en 3 de las 14 ROIs (Figura 6): en la región correspondiente al *Stratum Oriens distal* (*SOD*) de CA3 ($F_{2,39} = 10.77$ $p < 0.001$), en el *Stratum Lúcidum distal* de CA3 (*SLd*) ($F_{2,39} = 10.77$ $P < 0.001$) y en el *Stratum Oriens* del CA1 ($F_{2,39} = 5.78$ $P < 0.01$). En el *SOD* de CA3, el grupo LAM presenta un área de tinción de Sinaptofisina significativamente mayor que en los grupos CI (Fisher $P < 0.001$) y CN (Fisher $P < 0.01$), lo cual revela una considerable expansión de las FM en la región del *SOD* de CA3, en los animales sobre-entrenados en el LAM (Ramírez-Amaya, et al., 2001; Holahan, et al., 2006; Middei, et al., 2007). Sin embargo, también encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los grupos CN y CI ($p < 0.01$), lo que indica que también en los animales del grupo CN ocurre la expansión de las FM en la región del *SOD* de CA3.

En la región *SLd* de CA3, los animales del grupo LAM también presentan una mayor área de tinción de Sinaptofisina en comparación a los animales de los grupos CN y CI ($P < 0.01$ y $P < 0.001$ respectivamente), en esta región no se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos CN y CI. Esto indica una expansión de las FM en la región del *SLd* en CA3 en los animales del grupo LAM.

En el *SO* de CA1 de los grupos LAM y CN se observó un incremento estadísticamente significativo en el área de tinción de Sinaptofisina en comparación con los animales del grupo CI ($P < 0.01$ y $P < 0.05$ respectivamente), sin encontrarse diferencias entre los grupos LAM y CN. Esto indica que ambos grupos experimentaron un incremento en la densidad de las colaterales de Schaffer que arriban al *SO* de CA1.

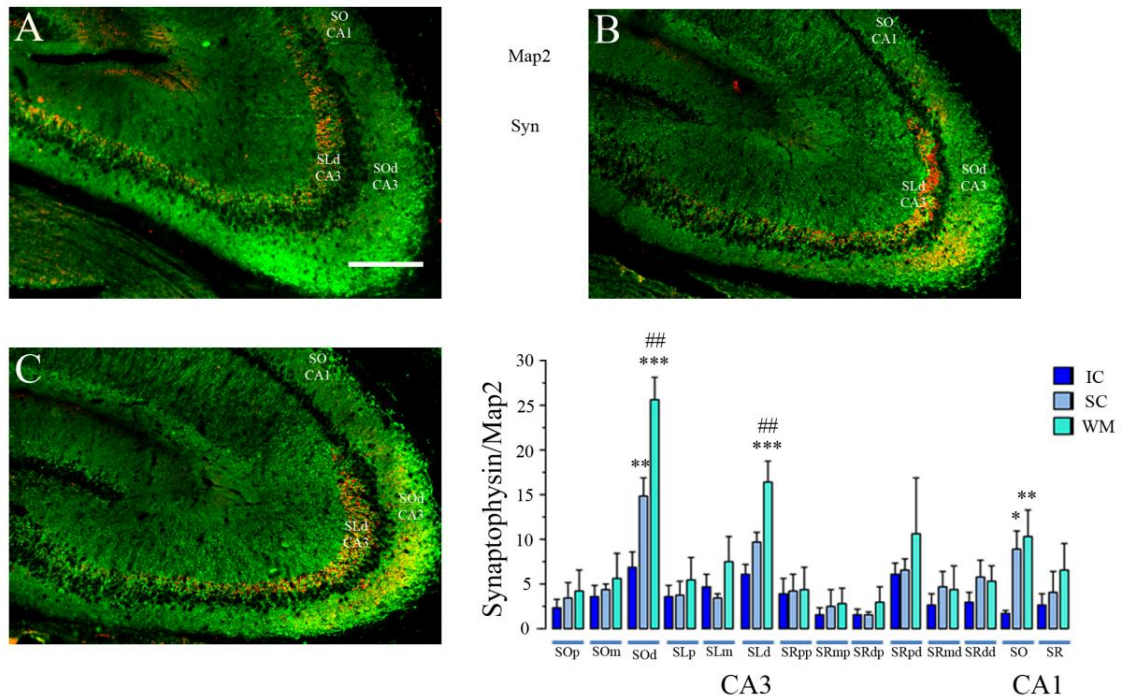


Figura 6. Análisis de la tinción de Sinaptofisina en el hipocampo. Imagen representativa del hipocampo, que incluye las regiones del CA3 y del CA1. En verde esta la tinción de Map-2 y en rojo la de Sinaptofisina, en tejidos de animales de los grupos IC (A), SC (B) y WM (C); la barra blanca representa 500 μ m. La grafica de barras (D) representa el promedio del área de tinción de Sinaptofisina entre el área de la región de Map2 (\pm SEM), para cada grupo (IC, SC, y WM) en cada una de las ROIs (ver métodos y la Figura 5). Nótese que solo en la región de CA3 *SOd* (*Stratum Oriens distal*), en la región de CA3 *SLd* (*Stratum Lúcidum distal*), y en la región de CA1, *SO* (*Stratum Oriens*) se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre grupo. El análisis *post hoc* de Fisher vs el IC *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$; vs. the SC ## $P < 0.01$.

5.1.3.4. El área de tinción de Sinaptofisina en la región de CA3 correlaciona significativamente con las mediciones de separación y completamiento de patrones obtenidas mediante catFISH

Dado que los IS difieren entre las condiciones de doble exploración espacial empleadas para el análisis de catFISH, se realizó un análisis de correlaciones entre las áreas de tinción y las condiciones de exploración contemplando las 3 condiciones (AA, AA' y AB), pero sin distinguir entre los grupos de pre-tratamiento (Figura 7).

Se encontró una correlación significativamente positiva entre el área teñida con Sinaptofisina en el *SOD* del CA3 y el IS obtenido para el CA3 luego de la condición de doble exploración AA ($r_{(40)} = 0.907$ $P < 0.001$) y también para condición AA' ($r_{(40)} = 0.870$ $P < 0.001$). Este gran resultado nos indica que la expansión de las FM en el *SOD* de CA3, claramente, podría estar participando en mejorar el completamiento de patrones. Por el contrario, en la condición AB la densidad de Sinaptofisina correlaciona negativamente, de manera significativa con el IS ($r_{(40)} = -0.884$ $P < 0.001$), lo cual sugiere que dicha expansión de las FM incrementa la separación de patrones en la red de CA3.

El área de tinción de Sinaptofisina en el *SOD* del CA3 también correlaciona con el IS obtenido a partir de la condición de doble exploración AA en CA1 ($r_{(40)} = 0.870$ $P < 0.001$), lo cual indica que la mejora en el completamiento de patrones que ocurre en CA1 puede estar relacionado con la expansión de las FM en el *SOD* del CA3. De igual manera, el IS obtenido luego de la exploración AB, en CA1, correlaciona negativamente con el área de tinción de Sinaptofisina en el *SOD* de CA3 ($r_{(40)} = 0.767$ $P < 0.01$) revelando que la mejoría en la separación de patrones en el CA1 también podría estar relacionada con la expansión de las FM en la región del *SOD* de CA3.

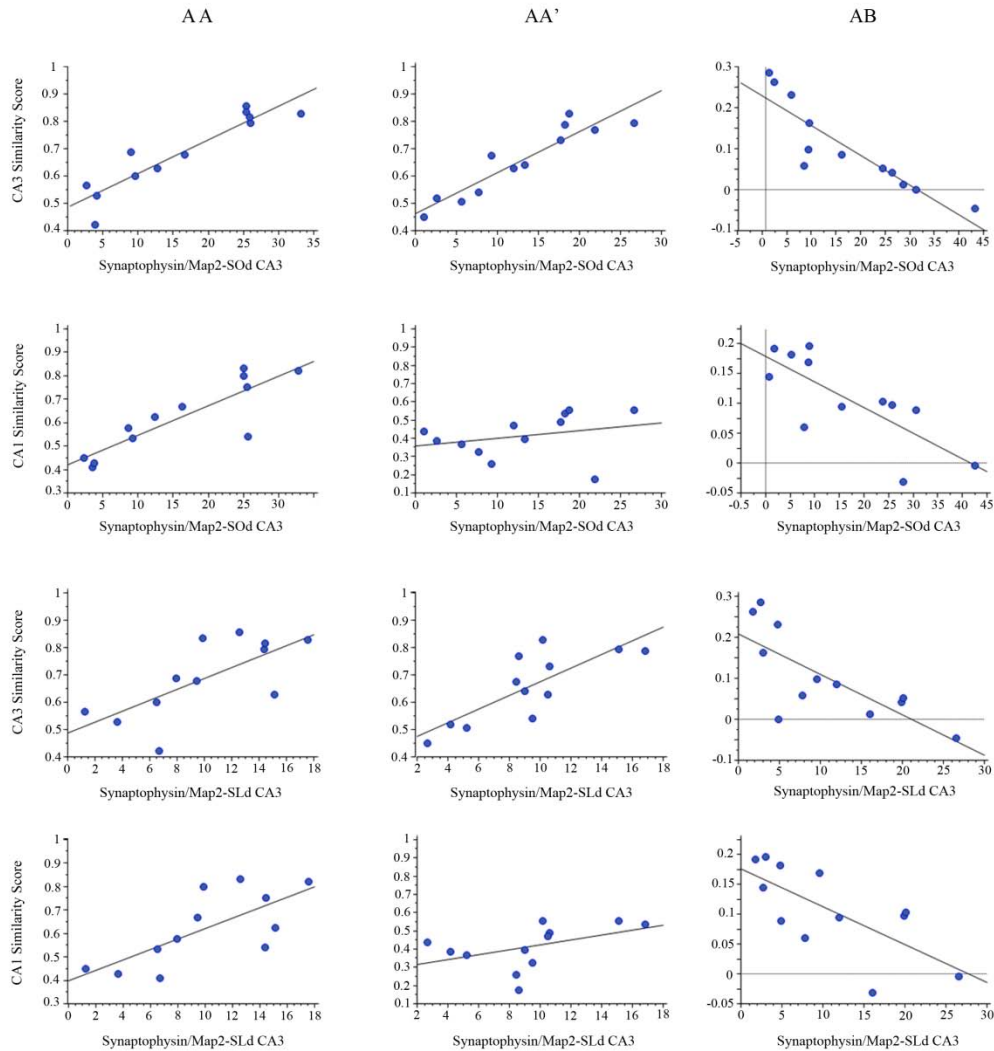


Figura 7. Correlaciones entre el área de Sinaptofisina y el IS. Las gráficas de correlación obtenidas entre el área de synaptofisina en el *Sod* y el IS en CA3 en las tres condiciones de doble exploración se presentan en la primera fila. En la segunda fila se presentan las correlaciones entre en IS de CA1 y el área de synaptofisina en CA3 *Sod*. En la tercera fila se presentan las correlaciones entre en IS de CA3 y el área de Sinaptofisina en CA3 *SLd* y finalmente en la cuarta fila se presentan las correlaciones entre el IS de CA1 y el área de Sinaptofisina en CA3 *SLd*. La primera columna representa las correlaciones para los IS obtenidos en la condición de doble exploración AA, donde se tiende a observar completamiento de patrones, en la segunda columna se presenta la correlación para la condición AA', en donde en CA3 se observa completamiento de patrones y en CA1 separación parcial de patrones y finalmente en la tercera columna se presentan los resultados para la condición AB en donde ambas redes realizan separación de patrones. ***P < 0.001, **P < 0.01, *P < 0.05.

Quando el análisis se llevó a cabo comparando el área de tinción de Sinaptofisina en la región del *SLd* de CA3 con el IS obtenido para CA3, se encontraron sólo correlaciones

significativas para AA $r_{(40)} = 0.639$ $P < 0.05$ y para AB $r_{(40)} = -0.747$ $P < 0.01$. Esto nos sugiere que la mejoría en el completamiento de patrones en la red de CA3 puede estar parcialmente relacionada con la expansión de las FM hallada en el *SLd*, en cambio, la separación de patrones sí presenta una relación más sólida con dicho cambio estructural. De la misma forma, la correlación entre el área de tinción de Sinaptofisina en la región del *SLd* y el IS obtenido para la red de CA1, fue significativa sólo en la condición de exploración AA ($r_{(40)} = 0.623$ $P < 0.05$) y altamente significativa la correlación negativa para la condición AB ($r_{(40)} = -0.722$ $P < 0.01$). Esto nos podría estar hablando acerca de que el completamiento de patrones y, particularmente, la separación de patrones en CA1 estarían relacionados con la expansión de las FM en el *SLd* de CA3. La tinción de Sinaptofisina en la región del *SO* de CA1 únicamente presenta un correlación negativa, significativa, con el IS en la red de CA3, en la condición de exploración AB ($r_{(40)} = -0.710$ $P < 0.05$), lo cual sugiere que la separación de patrones en CA3 está relacionada con una densidad incrementada de las colaterales de Schaffer en el *SO* de CA1.

5.1.4. Discusión

Estos resultados muestran que la experiencia espacial (LAM y SC) mejora la expresión conductual de la separación espacial de patrones y también mejora las medidas neurofisiológicas de separación y completamiento de patrones espaciales en la red hipocampal, obtenidas mediante el uso del IS, el cual resulta de un análisis de los datos de catFISH. El completamiento de patrones se mejoró particularmente en la región de CA3. Además, se encontró una correlación altamente significativa entre los IS y el área de tinción con Sinaptofisina, con los cuales medimos la expansión de las fibras musgosas (FMs) inducida por la experiencia previa. Esto sugiere que la proyección de las FMs está involucrada

no solo en la separación espacial de patrones, sino también en el completamiento de patrones, lo que demuestra que una función hipocampal sub-óptima puede ser mejorada en respuesta a la experiencia conductual.

Los resultados obtenidos con la ejecución de los animales de la tarea de NIMLR mostraron que los animales sometidos a una experiencia espacial (LAM y SC), discriminan adecuadamente aún en separaciones difíciles (S1), mientras que los animales controles intactos empiezan a mostrar defectos desde separaciones medianamente difíciles (como en S3).

En el trabajo en el que desarrollaron la tarea de NIMLR (Clelland, et al., 2009), la interpretación fue que los animales con un alto número de errores en las separaciones cortas presentaban una discapacidad en el mecanismo de separación de patrones de información espacial. En nuestro caso, los animales del grupo CI pueden considerarse discapacitados, mientras que los animales tratados en la tarea de LAM y la condición de CN mejoran notablemente esta condición a nivel conductual. Los resultados obtenidos mediante el análisis de catFISH fortalecen dicha interpretación, porque al comparar los ISs obtenidos en CA1 y en CA3 después de la doble exploración con los resultados obtenidos en estudios previos (Vazdarjanova, et al., 2004) coinciden de manera importante. Esto es, en CA1 los IS cambian en respuesta a variaciones menores en las características del ambiente, sugiriendo que CA1 reacciona a los cambios en la entrada de información creando como resultado representaciones diferentes (Vazdarjanova, et al., 2004; Leutgeb, et al., 2004; Guzowski, et al., 2004), lo que se puede interpretar como separación parcial de patrones (Hayman & Jeffery, 2008). Por otra parte, la respuesta de CA3 ante cambios en la información entrante es discontinua, con una clara tendencia a producir completamiento de patrones cuando los animales experimentan pequeños cambios en el ambiente, mientras que cambios drásticos

promueven la separación de patrones (Vazdarjanova, et al., 2004; Leutgeb, et al., 2004; Guzowski, et al., 2004); esto fue particularmente evidente en el grupo pre tratado en el LAM, seguido por el grupo CN. Mientras tanto, en los animales del grupo CI los IS obtenidos en ambas redes sugieren que la función de la red hipocampal está afectada, semejante a lo que pasa en enfermedades neurodegenerativas (Rosi S, et al. 2009). Notablemente, esta condición, es decir la deteriorada capacidad de separar y completar patrones de información espacial en las redes neuronales de CA1 y CA3 de los animales CI, mejora en los animales pre-tratados como CN y particularmente en los animales pre-tratados en la tarea de LAM. Es importante notar que la separación de patrones en CA3 mejora tanto en los animales del grupo CN como en los animales del grupo LAM, lo que podría explicar los resultados conductuales en la tarea de NIMLR.

Los defectos en la función hipocampal pueden resultar del aislamiento de los animales (Fone & Porkess, 2008), una condición que se ha reportado produce déficits en tareas dependientes del hipocampo y que producen un decremento en la expresión del factor de crecimiento neuronal (BDNF), un importante factor para el arreglo de los circuitos neuronales (Han, et al., 2011; Park & Poo, 2013), que puede ser responsable de mantener una adecuada función hipocampal cuando responde a la estimulación conductual (Kesslak, et al., 1998). Un modelo computacional reciente mostró que la conectividad escasa de las FM beneficia la función que estas fibras tiene en el procesamiento de información en el CA3 (Cerasti & Treves, 2010). Sin embargo, también destacan que dicha conectividad no puede ser sumamente escasa, ya que ello conduce a una función defectuosa de la red hipocampal (Cerasti & Treves, 2010).

Durante el desarrollo, las proyecciones de las FM al CA3 son abundantes, pero en ratas Wistar que habitan en cajas individuales, las FM se retraen aproximadamente en el día

postnatal 24, además, tanto la retracción como el crecimiento de las FM son dependientes de estimulación (Holahan, et al., 2007). Durante la adolescencia, la experiencia espacial en ratas promueve la expansión de las FM al *SOD* de CA3, lo que mejora la conducta de navegación espacial en ratas adultos (Keeley, et al., 2010). Especies cercanas que ocupan hábitats diferentes presentan diferentes densidades de FMs a CA3, lo que correlaciona con sus habilidades espaciales (Schwegler, et al., 1993; Pleskacheva, et al., 2000). Toda esta evidencia sugiere que condiciones ambientales empobrecidas pueden llevar a una atrofia de las FMs, pero esto puede revertirse mediante la estimulación de la función hipocampal.

Congruente con estas ideas, en el presente trabajo se encontró que el entrenamiento en la tarea de LAM promueve la expansión de FM en el *SOD* en CA3 como se ha reportado previamente (Ramírez-Amaya, et al., 1999; 2001; Holahan, et al., 2006; Middei, et al., 2007), y también en el *SLd* en CA3, semejante a lo que se ha observado previamente en animales sometidos a ambientes enriquecidos (Galimberti, et al., 2006). Aquí, la expansión de las FM en el *SOD* de CA3 se encontró también en animales sometidos a la condición de CN, lo que si bien contrasta con resultados previos (Ramírez-Amaya, et al., 1999; 2001), podría ser explicado por las diferentes condiciones del cuarto en donde se realiza la conducta (e.g. la iluminación) que podría promover cierto aprendizaje contextual (Tolman, 1948) no controlado o bien, podría explicarse por ejercicio físico extendido (ver métodos) que se sabe mejora la función hipocampal a través de mecanismos dependientes de BDNF (Bekinschtein et al., 2011; Khabour et al., 2013) que producen la expansión de las FMs en el *SOD* de CA3 (Toscano-Silva et al., 2010). Dicha expansión de las FMs en los animales tratados como en el grupo del CN puede explicar su mejoría en la separación y el completamiento de patrones de información espacial. Es importante considerar sin embargo, que dicha expansión de las FMs en el grupo CN es significativamente menor a la que se observa en los animales

sobrentrenados en la tarea de LAM, lo que sugiere que el aprendizaje espacial motivado podría disparar ciertos mecanismos celulares que subyacen una expansión robusta de las FMs.

Estos datos también muestran un incremento significativo en el área marcada con la de Sinaptofisina en el *SO* del CA1, tanto en ratas que experimentaron la tarea de LAM como aquellas sometidas al tratamiento del CN. De forma similar, se ha observado un incremento en la densidad de espinas en el *SO* de CA1 en ratas sometidas a un ambiente complejo (Moser, et al., 1994) y a ejercicio (Stranahan, et al., 2007). Esto sugiere la posibilidad de que tanto la expansión de las FM como un incremento en la densidad de colaterales de Schaffer, pudiera subyacer la mejoría en la separación y completamiento de patrones. Sin embargo, la correlación altamente significativa entre los IS que se obtienen en las redes del CA3 y del CA1 con la expansión de las FM en CA3, sugiere fuertemente que la vía de las FM cumple un papel prominente en la separación y el completamiento de patrones espaciales, y también indica que la optimización de la red del CA3 modula la separación y el completamiento de patrones en el CA1, como se había sugerido previamente por Hoang & Kesner (2008).

La red de CA3 recibe información de la lámina II de la corteza entorrinal, directamente a través de la vía perforante, la cual provee una proyección de aproximadamente 4000 sinapsis por neurona, e indirectamente a través de la red del giro dentado también llega información de la misma región de la corteza entorrinal, ya que el giro dentado es proyectado por fibras de paso de la vía perforante, y este a su vez provee una proyección escasa de aproximadamente 50 sinapsis por cada neurona piramidal del CA3. Esto duplica la información que la corteza entorrinal provee a la red del CA3. Pero las células piramidales del CA3 también reciben información de la misma red del CA3 por medio de las colaterales de Schaffer (Amaral, 1990; Bischofberger, et al., 2006), lo que representa aproximadamente 12,000 sinapsis por neurona. Esta característica del CA3 de poseer conexiones recurrentes sugiere que el CA3 funciona

como una red autoasociativa, la cual permite el almacenamiento de memoria episódica (Treves & Rolls 1992). La noción de que las FM actúan como detonadores de la actividad de las células piramidales del CA3, las cuales hacen disparar con alta confiabilidad la actividad de las células piramidales del CA3 (McNaughton & Morris, 1987), ha resultado en modelos computacionales que proponen que las FM son importantes para la codificación de nueva información, pero no para la recuperación de información previamente almacenada (Treves & Rolls 1992). Esta idea ha sido apoyada por evidencia experimental en donde se muestra que la inactivación de la vía de las FM bloquea la codificación de nueva información, pero no la recuperación de información previamente adquirida (Treves & Rolls 1992). Sin embargo, cuando comparamos los valores promedio de los pesos sinápticos de las 3 diferentes proyecciones que llegan a las células piramidales del CA3 (Urban, et al., 2001; Bischofberger, et al., 2006), resulta que las colaterales de Schaffer son las que proveen la entrada más importante. Las FM además se sabe que hacen contacto con interneuronas GABAérgicas en el *SL* de CA3, por medio de filopodios y grandes botones musgosos terminales (Jaffe & Gutiérrez, 2007), y dichas proyecciones exceden de manera importante el número de sinapsis musgosas que hacen contacto con las neuronas piramidales del CA3 (Acsády, et al., 1998). Además presentan sitios múltiples de liberación, en donde liberan diferentes tipos de neurotransmisores, incluyendo glutamato, BDNF, GABA y neuropéptidos, así como Zinc, el cual regula la actividad de receptores a NMDA (Jaffe & Gutiérrez, 2007). Las FM no solo son una vía de transmisión confiable de información, sino que posiblemente funcionan también como unidades de procesamiento de información (Bischofberger, et al., 2006), lo que sugiere que pueden funcionar como un interruptor, alternando entre un estado “apagado” cuando domina la inhibición y un estado “encendido” cuando las FM presentan una alta probabilidad de hacer disparar a las células piramidales del CA3 (Bischofberger, et al., 2006). De esta

manera, cuando un animal experimenta una serie de estímulos, ya sea que estén parcial o completamente asociados a un episodio familiar, los ensambles de células piramidales del CA3 que almacenan dicha información serán activados por las sinapsis de la vía perforante, y las sinapsis potenciadas de las fibras recurrentes de las células piramidales de CA3 harán prevalecer a los patrones de actividad almacenados en esta red auto-asociativa, lo que permitirá el completamiento del patrón de actividad previamente adquirido, lo cual requiere que la entrada de las FM este en el estado “apagado”. Congruentemente con esta idea, la inhibición de la actividad de células granulares viejas afecta el completamiento espacial de patrones (Nakashiba, et al., 2012). Además, el completamiento de patrones espaciales se ha sugerido que requiere de la inducción de plasticidad sináptica en la red recurrente del CA3 (Marr, 1971; Hasselmo, et al., 1995), y se ha visto que la estimulación en ráfagas de las FM induce potenciación a largo plazo heterosináptica en las sinapsis recurrentes del CA3 (Kobayashi & Poo 2004). Esto explicaría el papel de la expansión de las FM del CA3 en el completamiento de patrones. Su papel en la separación de patrones podría lograrse mediante un mecanismo de “el ganador lo toma todo” (Bischofberger, et al., 2006) en donde la entrada de las FM esta “encendido”, y en estas condiciones pueden conducir al almacenamiento de nueva información en la red del CA3 (Urban, et al., 2001), lo que es apoyado por abundante evidencia en la literatura, en donde se muestra la relevancia del giro dentado en la separación de patrones de información espacial y no espacial (Kesner, 2013).

La idea de que la expansión de las FM pudiera estar relacionada con el almacenamiento de la información adquirida (Bailey, et al., 2008) podría seguir siendo atractiva si consideramos que la expansión de estas proyecciones inducida conductualmente mejora la precisión de la memoria (Ruediger, et al., 2011), lo que probablemente se deba a una mejoría

en el completamiento y la separación de patrones de información espacial, en congruencia con propuestas previas (Urban, et al., 2001; Bischofberger, et al., 2006).

5.2. Investigación # 2

5.2.1. Resumen

Se sabe que las modificaciones estructurales que inducen la expansión de las FM, mejoran la separación y el completamiento de patrones espaciales, no se sabe si estas modificaciones estructurales inciden particularmente en el almacenamiento de la memoria adquirida. Para poder contribuir a responder esta pregunta se buscó determinar si la expansión de las FM ocurre principalmente en las neuronas que responden a la conducta. Para ello se combinó la detección de la expresión de *Arc* en dendritas de células piramidales de CA3, con la detección de Sinaptofisina y Map2, para determinar la densidad de botones musgosos en neuronas que responden a la conducta que dio origen a las modificaciones estructurales y comparar esta densidad de FM con neuronas no activas o en comparación con grupos independientes de animales, con neuronas activadas por otra conducta

5.2.2. Introducción

La segunda pregunta que se planteó en este proyecto buscó determinar si las células que se activan en respuesta a la conducta que produjo un recuerdo persistente, son aquellas que modifican la densidad de botones musgosos.

La estrategia que utilizada para responder esta pregunta se basó en la detección con inmunohitoquímica fluorescente de la proteína de *Arc* (para caracterizar a las unidades neuronales activadas) en combinación con la detección inmunofluorescente de la proteína asociada a los microtúbulos (MAP2, por sus siglas en inglés) para visualizar las dendritas y la Sinaptofisina (para la visualización de los botones presinápticos).

Como se mencionó previamente, *Arc* es un gen de expresión inmediata cuyo mRNA y proteína se utilizan ampliamente para identificar a las neuronas que han pasado por un

período de actividad. Pero existen otras características de *Arc* que ayudan para responder la pregunta planteada.

El mRNA de *Arc*, se sabe, viaja a las dendritas (Steward & Worley, 2001a; Morín, et al., 2011) por medio de un mecanismo que depende de un conjunto de proteínas que protegen y mueven al mRNA de *Arc* a las zonas activas de las dendritas (Bramham, et al., 2010; Okuno, 2011; Shepherd & Bear, 2011). Una vez en las dendritas, el mRNA de *Arc* puede ser traducido a proteína localmente por un proceso dependiente de la actividad sináptica (Bramham, et al., 2010). Esto, permite que *Arc* lleve a cabo una función plástica denominada escalamiento sináptico. Se sabe también que al interactuar con Endofilina y Dinamina, *Arc* promueve la endocitosis de receptores AMPA, lo que reduce la eficiencia de las sinapsis (Bramham, et al., 2008). Al parecer, esto lo lleva a cabo en las regiones post-sinápticas, no activadas, en donde la difusión de mensajeros como el Ca^{2+} promueve, inespecíficamente, incrementos en la eficiencia. Esto permite borrar los cambios inespecíficos después de procesos como el LTP, manteniendo a largo plazo el cambio en la eficiencia sináptica que ocurrió específicamente en la sinapsis estimulada (Okuno, 2011). Además, se ha obtenido cierta evidencia de que *Arc* puede estar involucrado en la generación de modificaciones estructurales a nivel post-sináptico (Peebles, et al., 2010), dado que *Arc* interactúa con proteínas del cito-esqueleto (Lyford, et al., 1995; Bramham, et al., 2010).

Esta propiedad de *Arc*, de viajar a las dendritas activas (Steward y Worley, 2001b; Morín, et al., 2011), ayuda a identificar las dendritas de las neuronas que han pasado por un periodo de actividad, inducido por la estimulación proporcionada.

En este caso, la idea fue la de entrenar a los animales en la tarea de LAM por 5 días y, después de 7 días, exponerlos a la prueba del LAM; con plataforma presente para no tener una condición diferente que pudiera reclutar unidades neuronales *de novo*. Con la estimulación

que genera la experiencia de la prueba en el LAM se esperaba reclutar (promover la actividad) neuronas de la población originalmente activadas. Esto se asume como válido de acuerdo a la teoría de Hebb (1949) a la experiencia de catFISH (Guzowski, et al., 1999; Ramírez-Amaya, et al., 2005), a la evidencia de registros electrofisiológicos crónicos en animales expuestos a la exploración espacial (Markus, et al., 1994) y a datos que surgen del uso de ratones transgénicos. En estos últimos, se pueden marcar permanentemente las neuronas que se activan por la conducta y evaluar, meses después, a las neuronas que responden durante la recuperación de la información, observándose que en el caso de una tarea de condicionamiento al miedo, las neuronas que se activan en la amígdala durante la prueba de memoria son un subgrupo de las neuronas originalmente activadas (Reijmers, et al., 2007).

Por lo expuesto, la estrategia experimental fue la de poder reactivar el recuerdo en línea (con la experiencia de la misma tarea) así, se reclutó una población de neuronas que es en su mayoría un subgrupo de las neuronas reclutadas originalmente por la experiencia de adquisición de la tarea. De acuerdo al planteamiento de Hebb (1949), las neuronas reclutadas por la información de la tarea serían aquellas que modifiquen la eficiencia de sus contactos sinápticos y, de acuerdo al mismo Hebb, uno de los mecanismos mediante el cual lo logran es a través de modificaciones estructurales, como las que advertimos mediante un incremento en la densidad de botones musgosos con el uso de la técnica de Timm. La tinción de Timm no tiene una versión fluorescente pero sí se puede hacer inmunohistoquímica fluorescente, tanto para *Arc* (Ramírez-Amaya, et al., 2005) como para Sinaptofisina (Hollahan, et al., 2007). La idea entonces fue la de obtener una triple tinción, para *Arc*, como marcador de células activadas; Sinaptofisina para estudiar la densidad de botones musgosos, MAP-2 para identificar la estructura de la dendrita (Morín, et al., 2011) y DAPI para teñir los núcleos de las células.

Pudiendo, con esto estudiar la densidad de botones musgosos en las células que responden y las que no responden a la conducta.

Lo anterior se hizo mediante un diseño de comparación entre grupos. De esta manera se determinó si las neuronas que responden a la conducta (que previamente produjo una memoria perdurable), son aquellas que modifican la densidad de contactos sinápticos. Esta metodología se eligió, no por ser la más poderosa o apropiada, sino por ser la disponible en las condiciones actuales en el laboratorio.

Idealmente, se pudiera repetir este estudio utilizando un vector viral HSV-GFP (y/o RFP) que permita visualizar fluorescentemente la estructura pre y/o post-sináptica de los botones musgosos y las dendritas del CA3, respectivamente, que al combinarlo con inmunohitoquímica fluorescente para *Arc* o con el ratón transgénico que expresa una proteína fluorescente bajo el control del promotor y reforzador de *Arc*, nos permita caracterizar con mejor resolución neuroanatómica los cambios en la estructura de las conexiones sinápticas de las células que responden a la conducta expresando *Arc*. Esto se llevará a cabo en un futuro, para realizar una estancia de investigación en la ciudad de Toronto, en donde se encuentra el laboratorio del Dr. Paul Frankland. Esto permitirá obtener imágenes de muy alta resolución con el microscopio confocal LSM-780 (Zeiss ®). Presentamos, sin embargo, los avances de la aproximación inmunohitoquímica diseñada para contestar la pregunta planteada en este segundo problema general.

5.2.3. Métodos

Es importante señalar que, para montar y optimizar los procedimientos inmunohitoquímicos, se realizó un piloto que incluía los mismos grupos del diseño final. Los resultados conductuales e histológicos, de dicho experimento, se omiten a fin de no alargar innecesariamente el texto. En el resto de la descripción metodológica se describe solamente el diseño y los procedimientos metodológicos del experimento principal.

5.2.3.1. Sujetos

Los sujetos fueron 38 ratas macho de la cepa Wistar de 4 meses de edad, situadas en un cuarto con temperatura controlada (25 ± 1) °C en un ciclo invertido de luz-oscuridad de 12 h. La comida y el agua se suministraron ad libitum a lo largo de todo el experimento.

5.2.3.2. Grupos

Se emplearon los siguientes 5 grupos experimentales, con una N= 6 animales por grupo:

- Grupo 1: Entrenamiento en el LAM con la prueba de memoria en las mismas condiciones de adquisición del LAM (LA-LA). Se entrenaron 10 ratas y se seleccionaron aquellas 6 cuyo aprendizaje fue valorado como estándar, a través de cálculos que contemplan la latencia promedio del primer día de entrenamiento, a la cual se le resta la latencia promedio del día 5.
- Grupo 2: Entrenamiento en el LAM con la prueba en una caja de exploración de campo abierto (LA-CE). De la misma manera, se entrenaron 10 ratas y se seleccionaron aquellas 6 cuyo aprendizaje fue valorado como estándar.
- Grupo 3: Control de nado, al cual se le expuso a la tina de agua para nado libre, removiendo las pistas visuales y la plataforma. La prueba se realizó en idénticas condiciones que la adquisición (CN-CN).

Grupo 4: Los animales de este grupo se mantuvieron en su caja habitación durante el entrenamiento y el día de la prueba recibieron los primeros 10 ensayos en la tarea de laberinto acuático de Morris (CI-LA).

-Grupo 5: En esta última condición los animales se mantuvieron en su caja habitación durante todo el experimento y se les sacrificó sin estimulación alguna (CI-CI).

5.2.3.3. Diseño experimental conductual: entrenamiento y prueba

La fase de entrenamiento en el LAM consistió en 10 ensayos diarios durante 5 días. Pasados 7 días luego del último día de la fase de adquisición o aprendizaje, se realizó la prueba de memoria, durante 5 minutos, variando ésta para cada grupo según lo descrito previamente. 60 minutos después de la prueba de retención se procedió a anestesiarse al animal con pentobarbital para, seguidamente, perfundirlo haciendo pasar por ésta solución salina al 0.9% heparinizada y luego paraformaldehído (PFA) al 4%. Se realizó la perfusión en un tiempo aproximado de 15 min \pm 2min.

5.2.3.4. Bloqueo y sección de los tejidos

Luego de la ejecución conductual, finalmente al animal se lo decapitó, se le extrajo el cerebro y éste se mantuvo unas horas en PFA siendo luego colocado en una solución de sacarosa al 10%, 20% y finalmente 30%, en PBS al 0.1 M. En el paso siguiente los cerebros fueron seccionados con una matriz (Electron Microscopy Sciences®) con la que se obtuvieron hemisecciones del cerebro de la rata que incluyeron todo el hipocampo. Diez de estas hemisecciones se incluyeron en cada bloque que se fabricó con un molde plástico (Electron Microscopy Sciences®) y se rellenó con la solución de Tissue-Tek O.C.T®, la cual se solidifica a baja temperatura y permite formar el bloque. De esta manera, cada uno de los 3

bloques, de 10 cerebros cada uno, incluyeron 2 animales de cada uno de los 5 grupos. Los bloques de tejido fueron seccionados con un criostato obteniendo cortes de 20 micrómetros, los cuales se recogieron con portaobjetos superfrost (VWR®). Éstas se dejaron secar a temperatura ambiente por dos días para poder luego ser procesadas para triple inmunohistoquímica de: MAP2, *Arc* y Sinaptofisina. Seguidamente las tinciones fueron contrateñidas con DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) para identificar los núcleos. Es importante mencionar que, dado que no se conocía exactamente cuál era la altura ni el sentido del corte ideal (horizontal, coronal o sagital) para visualizar la mejor longitud de las dendritas de las células piramidales de la región del CA3 del hipocampo, lo que se hizo fue perfundir algunas ratas extras para luego poder determinar la mejor orientación del corte. Lo que se observó fue que la mejor disposición de las dendritas teñidas con MAP2 se encontraba cuando el tejido se cortó sagitalmente, por lo que se eligió esta orientación para las secciones del tejido del experimento principal.

5.2.3.5. Inmunohistoquímica

Para obtener la triple inmunohistoquímica para MAP2, *Arc* y Sinaptofisina, se analizaron múltiples variables para estandarizar la técnica y finalmente se evaluó el orden de detección óptimo como así también los fluoróforos más adecuados para cada una de las detecciones. El mejor orden encontrado para la mejor detección, junto con la menor interferencia en las detecciones, fue: primero *Arc*, luego Sinaptofisina y finalmente MAP2; y los fluoróforos atribuidos para sus respectivas detecciones fueron: FIT-C, CY5 y CY3, respectivamente.

5.2.3.6. Imagenología

Es importante señalar que se realizaron diferentes pruebas para la captura de imágenes, en donde se compararon los resultados obtenidos con diferentes objetivos y dos diferentes sistemas de imagenología de señales fluorescentes, un sistema Ápotome y un LSM-780, ambos Zeiss®.

Después de una serie de pruebas se decidió capturar imágenes con un objetivo Planapocromático de 25 X / 0.85 AN y el software Mosai X con el sistema Ápotome de Zeiss, para obtener mosaicos que incluyeran todo el CA3. En éstas se llevó a cabo un análisis grueso de la densidad de botones con Sinaptofisina. Por otro lado estas imágenes sirvieron como referencia para la captura y ubicación de las imágenes que se obtuvieron con el sistema confocal LSM-780. Las imágenes confocales se adquirieron con el objetivo 40 X/ 1.3 AN y una resolución en Z de ~450nm (Figura 8). Los parámetros de captura de las imágenes se establecieron con el tejido de un animal del grupo CI-CI y los parámetros de Sinaptofisina y *Arc* se mantuvieron estables para la captura de las imágenes del resto de los tejidos, mientras que los parámetros de DAPI y MAP2 solo se ajustaron apenas para poder visualizar adecuadamente la estructura del núcleo y de las dendritas. Estas imágenes se obtuvieron de las diferentes regiones del CA3 en forma de muestras, sumando un total de 6 imágenes por tejido. Para la excitación de los fluoróforos se utilizaron los láseres de Argón 488nm, con el que se excitó el FITC (señal de *Arc*), un HeNe de 545nm con el que se excitó a Cy3 (MAP2), un DPSS de 655nm con el que se excitó a Cy5 (Sinaptofisina) y un láser multifotónico entonado a 750nm para excitar a DAPI (núcleos).

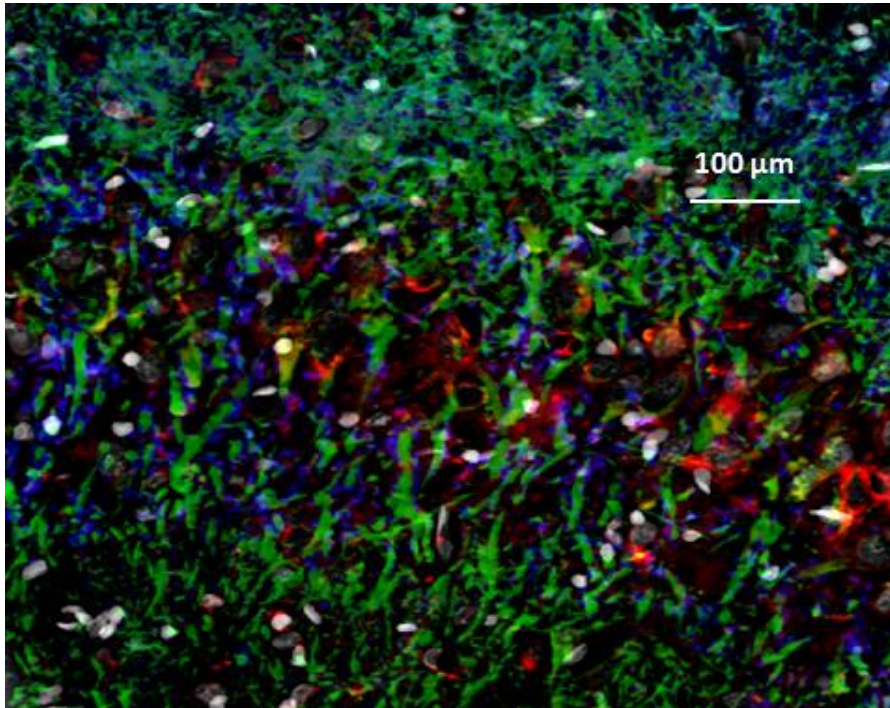


Figura 8. Imagen muestra de la triple inmunohistoquímica. Esta imagen fue tomada con el sistema confocal Zeiss-LSM-780 utilizando un objetivo de 40X/ 1.42 A. N. En verde visualiza MAP2, en azul Sinaptofisina, en rojo *Arc* y en blanco DAPI. Nótese que las dendritas teñidas con MAP2 están rodeadas de la tinción de Sinaptofisina y en algunos casos rellenas de la tinción de *Arc*. Los núcleos aparecen rodeados por MAP2 o *Arc*.

5.2.3.7. Analisis de imágenes

Se desarrollaron las estrategias de análisis de las imágenes basándonos en la descripción de los procedimientos y los criterios que rigen un análisis imparcial de las imágenes de acuerdo a las discusiones del tema que se puede apreciar en la literatura actual sobre el análisis de imágenes (Zinchuk V & Grossenbacher-Zinchuk, 2009). El programa que se empleó fue el imageJ. Antes de comenzar el análisis la imagen fue proyectada en el plano Z de lo que se obtuvo un sólo plano. Cada imagen fue pre-procesada por un filtro mediano, esto se realiza para reducir el nivel de ruido, homogenizar las intensidades ópticas medias de las imágenes y es una manera efectiva de reconstruir las imágenes, lo que de acuerdo a la literatura se recomienda para incrementar la confiabilidad del análisis y su potencia

(Landmann y Marbe, 2004). Se separan entonces los 4 canales (para MAP-2, *Arc*, Sinaptofisina y DAPI) y se seleccionan los canales de MAP-2 y *Arc* para generar una imagen mezcla en donde se tuvieron ambas señales que permitió seleccionar las dendritas. Esto, se estableció a partir de la observación de dendritas con *Arc* que no presentaban la señal de MAP-2. Una vez lograda esta combinación, se procedió a la selección y marcado de las dendritas a analizar, esto se denomina definición de la región de interés o ROI (por las siglas en inglés), para definir las ROIs que permitieran hacer la segmentación de las unidades dendríticas, se utilizó una herramienta del programa que permite el dibujo de líneas, cuya dirección y longitud se controló así como el grosor estable de 30um. De acuerdo a Ishizuka del grupo de Amaral (Ishizuka, et al., 1995) y recientemente corroborado en otro trabajo (Rollenhagen y Lübke, 2010), el grosor promedio de la dendrita de las células piramidales de CA3 es de 18um y los botones musgosos tienen un diámetro promedio de 5um (Rollenhagen y Lübke, 2010), por lo anterior, para obtener una región de tolerancia de 6um a cada lado de la dendrita el grosor promedio de la línea que se usó como herramienta para la selección de las ROIs en el análisis se estableció en 30um. Al hacer esta selección se tomó la precaución de marcar sólo aquellas dendritas que no estuvieran atravesadas por ninguna otra para evitar atribuirle a una dendrita, señal de Sinaptofisina que le pertenece a otra. En la Figura 9 se puede observar un ejemplo en el que con sólo el canal de MAP-2 (para obtener un ejemplo claro del marcado), se seleccionan algunas dendritas. De cada selección se obtienen imágenes independientes a las que se les aplica el análisis que se describe a continuación. En primer lugar se determina la cantidad y área de cada uno de los puntos de Sinaptofisina que flanquean la imagen de la dendrita y en segundo lugar, se hace un análisis del índice de co-localización de MAP-2 con *Arc*, para determinar si la dendrita pertenece a una célula activada. En el análisis de los puntos de Sinaptofisina, se marcó la región ocupada de la

dendrita en la imagen de MAP2-Arc y se hizo una extracción de ella para el análisis independiente del resto de los canales de la imagen. En este caso se analizó la tinción de Sinaptofisina estableciendo previamente un umbral de densidad óptica en un animal de un grupo control, que se mantiene para el análisis de la misma señal de Sinaptofisina, a lo largo de todos los tejidos que contiene el portaobjetos. Este umbral tiene el propósito de eliminar alguna señal inespecífica. Luego, se hace el análisis de puntos de Sinaptofisina presentes en esa selección (Figura 9B), obteniéndose la información de la cantidad de objetos, el área e intensidad de la marca de cada objeto y el índice de circularidad de cada punto de Sinaptofisina. Para analizar la activación de la dendrita seleccionada, se procedió igual que en el canal de Sinaptofisina pero en este caso para el canal mezclado de *Arc* y MAP-2. Se hizo la extracción de la imagen de cada uno de los canales y se procedió a aplicar un análisis de la co-localización (Figura 9C) de ambas señales. Esto se obtuvo a partir de los Coeficientes de Manders (Dunn, et al., 2011) M1 y M2 (cuánta de la señal de MAP-2 co-localiza con *Arc* y viceversa). También, en este mismo paso, se hace un análisis de la aleatoriedad de la señal de co-localización, a través del coeficiente de dispersión de Pearson, lo que nos permite seleccionar los tejidos en donde el índice de co-localización es real y descartar aquellos en donde la co-localización es aleatoria. Todo este análisis se repitió para cada una de las dendritas seleccionadas inicialmente en la imagen.

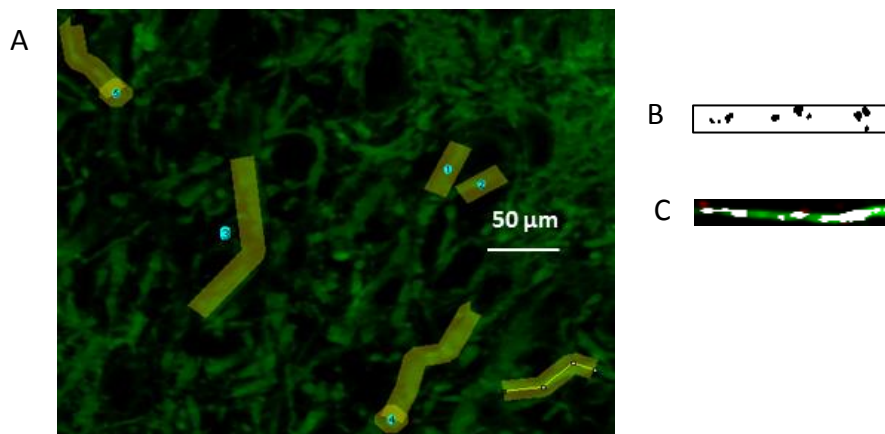


Figura 9. Segmentación de imágenes. En A, se muestra un ejemplo de imagen en la que se muestra solamente el canal de MAP. A partir de ésta se realiza la segmentación de dendritas. La línea amarilla tiene el grosor suficiente para incluir el grosor de la dendrita e incluir una zona de tolerancia, determinada con base a la distancia promedio estimada de los botones presinápticos, en la cual se identifican y analizan tal y como se describe en el texto, la señal de Sinaptofisina. Las imágenes de la derecha son ejemplos de las extracciones que se realizan con el programa ImageJ y en donde se lleva a cabo el análisis descrito. En B se muestra un ejemplo del análisis de co-localización de las señales de MAP-2 y *Arc*. En C se muestran, en rojo, los puntos de Sinaptofisina que se le atribuyen a dicha dendrita.

5.2.4. Resultados

5.2.4.1. Laberinto Acuático de Morris

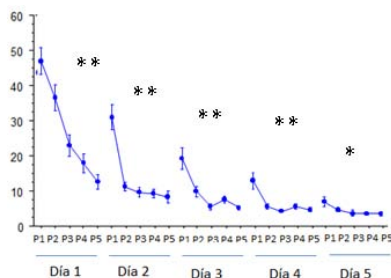


Figura 10. Laberinto acuático de Morris. Se presentan las medias \pm el SEM de la latencia promedio de dos ensayos subsiguientes, a lo largo de cada día. Los asteriscos encima de cada la curva de cada día representan diferencias estadísticamente significativas (** $P < 0.01$. * $P < 0.05$) obtenidas a partir del ANOVA de medidas repetidas.

Se le aplicó un ANOVA de medidas repetidas a los resultados de las latencias de llegada al blanco obtenidas a lo largo del proceso de adquisición de la tarea de LAM. Se obtuvieron los siguientes resultados Día 1: $F_{4,19} = 20.72$ $P < 0.001$; Día 2: $F_{4,19} = 29.64$ $P < 0.001$; Día 3: $F_{4,19} = 12.93$ $P < 0.001$; Día 4: $F_{4,19} = 8.31$ $P < 0.001$; Día 5: $F_{4,19} = 3.39$ $P < 0.131$).

5.2.4.2. Co-localización Arc y Map-2

El análisis de imágenes dio en primer lugar el índice de co-localización de Manders. La distribución de frecuencias que se presenta en una gráfica de percentiles (Figura 11) mostró la distribución de los índices de co-localización en la población de todas dendritas del CA3 en 4 de los 5 grupos experimentales (el resto del análisis está en curso). De esta manera observamos que la mayoría de las dendritas del grupo control (CI-CI) muestran un índice de co-localización bajo, mientras que los animales estimulados antes del sacrificio muestran claramente que la distribución del índice de co-localización está por encima de los controles. Considerando que, en los Cuernos de Ammon del hipocampo, las células que se activan por la conducta son aproximadamente entre 30 y 40% de la población, decidimos que el más alto índice de Manders observado en el 40% de población de dendritas sería considerado como indicador de una dendrita activa, de tal manera que a partir de un índice de Manders de 0.420 fue utilizado como indicador de actividad.

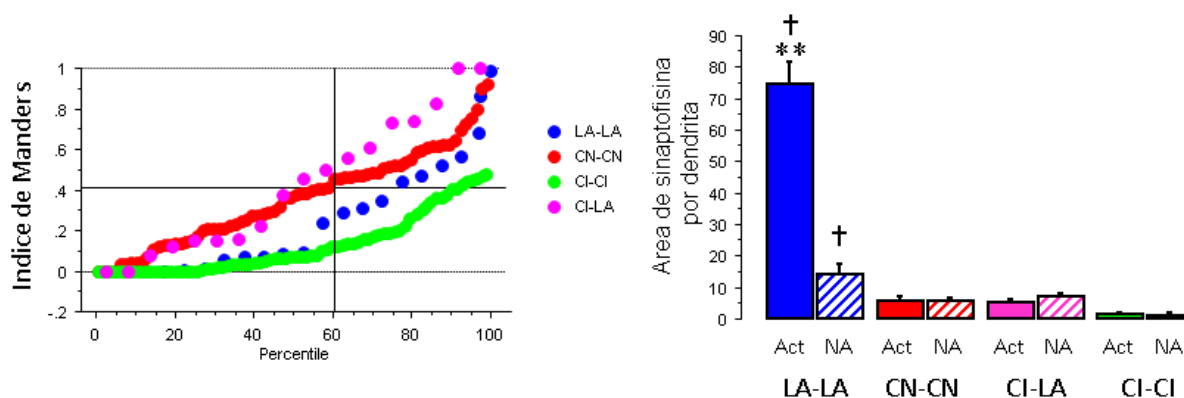


Figura 11. Colocalizaciones Arc y Map-2. En la gráfica de la Izquierda se muestran las distribuciones del índice de Manders para los diferentes grupos. Cada punto representa una dendrita analizada en los tejidos de los animales de los diferentes grupos. La línea que divide la distribución está ubicada en el percentil 60 y el valor del índice de Manders con el que cruza en los animales con los valores más altos se utilizó para la clasificación de las células activas. En la gráfica de la derecha se muestra el promedio de las áreas de Sinaptofisina por dendrita para las dendritas activas (Act) y no activas (NA) en los 4 grupos que, hasta ahora, se han podido incluir en el análisis. Los asteriscos muestran diferencias entre dendritas Act y NA en cada grupo (**P < 0.01), mientras que las cruces representan diferencias estadísticas con respecto a las dendritas con la misma clasificación en comparación al grupo CN-CN (+P < 0.05).

Los resultados parciales del análisis del área de Sinaptofisina, por dendrita, mostraron que los animales del grupo LA son los únicos que muestran una mayor área de Sinaptofisina en las dendritas activadas por la conducta. Sin embargo es importante notar que las dendritas NA presentan también una mayor área de Sinaptofisina en comparación con las dendritas con la misma clasificación de los animales del resto de los grupos. Estos resultados sugieren que las dendritas activas presentan una mayor densidad de Sinaptofisina. Para corroborar esto se realizó una correlación entre el índice de Manders y el área de Sinaptofisina y se encontró que en el grupo LA, se presenta una correlación de 0.765 altamente significativa ($P < 0.01$). Lo que indica que cuanto más co-localiza la proteína de *Arc* con MAP2, mayor es el área de Sinaptofisina en la dendrita. Las correlaciones entre estas dos variables en el resto de los grupos no fueron altas, estadísticamente ni significativas.

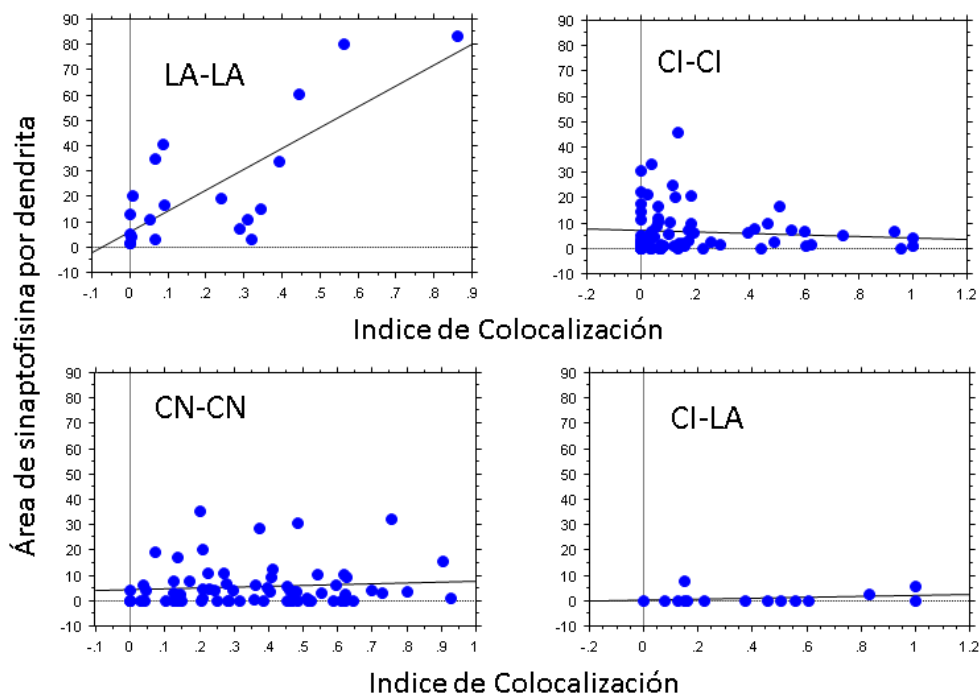


Figura 12. Correlaciones. Entre el área de Sinaptofisina por dendrita (cada punto) y el índice de co-localización de Manders en los diferentes grupos experimentales. Nótese que se observa una correlación positiva (estadísticamente significativa) solo entre las dendritas de los animales del grupo LA-LA ($P < 0.01$).

5.2.5. Discusión

En cuanto a la primera pregunta que nos hicimos, podemos decir que el análisis de los patrones de actividad con catFISH nos muestra que el sobreentrenamiento en la tarea de laberinto de agua de Morris mejora funcionalmente el hipocampo, particularmente el completamiento de patrones en CA1 y CA3, y la separación de patrones en CA3. Es importante observar que los animales de los grupos no entrenados en la tarea de LA presentan niveles de completamiento y separación, en CA1 y CA3, distintos de los reportados previamente (Vazdarjanova, et al, 2004). Sin embargo, en el caso de estos reportes previos, los animales son previamente expuestos a una sesión de laberinto de agua y habituados a las cajas de exploración espacial durante varios días, lo que podría mejorar el procesamiento de información espacial. La idea de que el entrenamiento en una tarea espacial mejora el funcionamiento del hipocampo se evidenció también con los resultados de la tarea DNMP en donde vimos que, al igual que en el caso anterior, los animales del grupo LA son los que mejor separan patrones y, consecuentemente, cometen menos errores que el resto de los animales.

Mediante la tinción con Sinaptofisina pudimos confirmar que los animales entrenados en la tarea de LA presentaban una mayor densidad de botones positivos a Sinaptofisina en la región de CA3, donde arriban las fibras musgosas, lo que sugiere un incremento en la densidad de contactos sinápticos como consecuencia del entrenamiento en el LA. Actualmente tenemos que completar el análisis de estos datos y, dado que estos se obtuvieron del mismo tejido del análisis de catFISH, podemos pensar en realizar un análisis de correlación entre la densidad de contactos sinápticos y la capacidad de separación y completamiento de patrones medida con el índice de similitud con catFISH.

En cuanto a la segunda pregunta, los resultados que hasta ahora hemos obtenido nos muestran que las dendritas de las neuronas que responden a la conducta que indujo una memoria perdurable son las que presentan una mayor área de tinción a Sinaptofisina, lo que sugiere que es en ellas en donde ocurrieron cambios en la densidad de contactos sinápticos. Sin embargo, el hecho de que las dendritas no activas de los animales del grupo LA tengan una mayor área de tinción a Sinaptofisina que las dendritas de CA3 de los animales del resto de los grupos, sugiere que también ocurre sinaptogénesis en las células que no están involucradas en el procesamiento de información de la tarea que dio lugar a una memoria perdurable, lo que podría ocurrir por la liberación de factores tróficos como BDNF, que sabemos se liberan postsinápticamente y podrían actuar parácrinamente en neuronas vecinas.

Ambos resultados nos muestran que el entrenamiento en la tarea de LAM induce modificaciones funcionales en el hipocampo, lo que mejora el procesamiento de información espacial y, de esta manera, la ejecución de los animales en tareas que dependen de ello. Pero es posible que dichos cambios ocurran principalmente en las células que respondan a la conducta que los originó y por ello están relacionados con la memoria que de esta se formó.

6. CONCLUSIONES GENERALES

Con la primera serie de experimentos aprendimos que la estimulación con una tarea espacial del hipocampo mejoró la ejecución conductual de los animales en una tarea que requiere que el hipocampo realice separación espacial de patrones. Esta misma estrategia de estimulación, logró mejorar los valores que de separación y completamiento de patrones se pueden obtener mediante catFISH, los cuales correlacionaron de forma importante con los valores que se obtienen de la densidad de botones musgosos, lo que sugiere que una mayor

conectividad de fibras musgosas promueve un mejor desempeño del hipocampo en las tareas de separación y completamiento de patrones espaciales.

Por otro lado el segundo estudio nos arrojó resultados que sugieren que si bien, la mayoría de las neuronas que presentan cambios en la estructura de sus conexiones sinápticas son aquellas que fueron reclutadas durante la adquisición de la tarea conductual que dio origen a las modificaciones estructurales, es importante resaltar que también se observan cambios en la densidad de contactos sinápticos en neuronas que no fueron reclutadas durante el aprendizaje de la tarea espacial. Esto sugiere que el aprendizaje espacial no solo promueve cambios plásticos estructurales en las neuronas responsables de procesar esa información en específico, sino que también en neuronas no involucradas.

En general esta evidencia apunta a que la experiencia espacial, es capaz de modificar la función hipocampal, que incluye a la separación y el completamiento de patrones, de una forma más general. Lo que sugiere que la experiencia en sí misma es capaz de optimizar mediante plasticidad sináptica estructural, el funcionamiento de gran parte de la red que utiliza para procesar dicha información.

7. REFERENCIAS

Acsády L, Kamondi A, Sík A, Freund T, Buzsáki G. GABAergic cells are the major postsynaptic targets of mossy fibers in the rat hippocampus. *J Neurosci*. 1998; 18:3386-403.

Altschuler RA. Morphometry of the effect of increased experience and training on synaptic density in area CA3 of the rat hippocampus. *J Histochem Cytochem*. 1979 27:1548-50.

Amaral DG, Dent JA. Development of the mossy fibers of the dentate gyrus: I. A light and electron microscopic study of the mossy fibers and their expansions. *J. Comp. Neurol*. 1981; 195:51-86.

Amaral DG, Ishizuka N, Claiborne B. Neurons, numbers and the hippocampal network. *Progr Brain Res*. 1990; 83; 1-11.

Bailey CH, Kandel ER. Structural changes accompanying memory storage. *Annu Rev Physiol* 1993; 55:397-426.

Bailey CH, Kandel ER. Synaptic remodeling, synaptic growth and the storage of long-term memory in Aplysia. *Prog Brain Res*. 2008; 169: 179–98.

Bekinschtein P, Oomen CA, Saksida LM, Bussey TJ. Effects of environmental enrichment and voluntary exercise on neurogenesis, learning and memory, and pattern separation: BDNF as a critical variable? *Semin Cell Dev Biol*. 2011; 22: 536–42.

Ben-Ari Y, Represa A. 1990. Brief seizure episodes induce long-term potentiation and mossy fibre sprouting in the hippocampus. *Trends Neurosci* 13:312–318.

Bernasconi-Guastalla S, Wolfer DP, Lipp HP. Hippocampal mossy fibers and swimming navigation in mice: correlations with size and left-right asymmetries. *Hippocampus*. 1994; 4:53-63.

Bischofberger J, Engel D, Frotscher M, Jonas P. Timing and efficacy of transmitter release at mossy fiber synapses in the hippocampal network. *Pflugers Arch*. 2006; 453: 361–72

Blackstad TW, Kjaerheim A. Special axo-dendritic synapses in the hippocampal cortex: electron and light microscopic studies on the layer of mossy fibers. *J Comp Neurol* 1961; 117:133–59.

Bliss TVP, Lømo T. Plasticity in a monosynaptic cortical pathway. *J. Physiol. (Lond.)* 1970; 207: 61P.

Bliss TVP, Gardner-Medwin AR. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized hippocampus following stimulation of the perforant path. *J. Physiol. (Lond.)* 1973; 232: 357–37.

Bramham CR, Alme MN, Bittins M et al., “The Arc of synaptic memory,” *Experimental Brain Research*. 2010; 200:125–140.

Bramham CR, Messaoudi E. BDNF function in adult synaptic plasticity: the synaptic consolidation hypothesis. *Prog Neurobiol.* 2005; 76:99–125.

Bramham CR, Worley PF, Moore MJ, Guzowski JF. The immediate early gene *arc/arg3.1*: regulation, mechanisms, and function. *J Neurosci.* 2008; 28:11760-7.

Burke SN, Wallace JL, Nematollahi S, Uprety AR, Barnes CA. Pattern separation deficits may contribute to age-associated recognition impairments. *Behav Neurosci.* 2010; 124: 559–73.

Cáceres A, Banker G, Steward O, Binder L, Payne M. MAP2 is localized to the dendrites of hippocampal neurons which develop in culture. *Brain Res.* 1984; 315: 314–8.

Caroni P, Donato F, Muller D. Structural plasticity upon learning: regulation and functions. *Nat Rev Neurosci.* 2012; 13: 478–90.

Cerasti E, Treves A. How informative are spatial CA3 representations established by the dentate gyrus? *PLoS Comput Biol.* 2010; 6:e1000759.

Chawla MK, Guzowski JF, Ramírez-Amaya V, Lipa P, Hoffman KL, Marriott LK, Worley PF, McNaughton BL, Barnes CA. Sparse environmentally selective expression of *Arc* RNA in the upper blade of the rodent fascia dentata by brief spatial experience. *Hippocampus.* 2005; 15:579-86.

Claiborne BJ, Amaral DG, Cowan WM. A light and electron microscopic analysis of the mossy fibers of the rat dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* 1986; 246:435-58.

Clelland CD, Choi M, Romberg C, Clemenson GD Jr, Fragniere A, Tyers P, et al. A functional role for adult hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation. *Science.* 2009; 325: 210–3.

Crusio WE, Schwegler H, Lipp HP. Radial-maze performance and structural variation of the hippocampus in mice: a correlation with mossy fiber distribution. *Brain Res.* 1987; 425: 182-5.

Di Stefano G, Casoli T, Fattoretti P, Baliotti M, Grossi Y, Giorgetti B, et al. Level and distribution of microtubule-associated protein-2 (MAP2) as an index of dendritic structural dynamics. *Rejuvenation Res.* 2006; 9: 94–8.

Dunn KW, Kamocka MM, McDonald JH. A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2011; 300: C723–C742.

Eccles JC. Synaptic and neuro-muscular transmission. *Physiol Rev* 1937; 17:538–55.

Eichenbaum H, Fortin NJ. The neurobiology of memory based predictions. *Philos. Trans Roy Soc Lond* 2009; 364:1183-91.

Escobar ML, Barea-Rodríguez EJ, Derrick BE, Reyes JA, Martinez JL Jr. Opioid receptor modulation of mossy fiber synaptogenesis: independence from long-term potentiation. *Brain Res.* 1997; 751:330-5.

Florian C, Roullet P. Hippocampal CA3-region is crucial for acquisition and memory consolidation in Morris water maze task in mice. *Behav Brain Res.* 2004; 154:365-74.

Fone KC, Porkess MV. Behavioural and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents-relevance to developmental neuropsychiatric disorders. *Neurosci Biobehav Rev.* 2008; 32: 1087–102.

Frey U, Morris RG. Synaptic tagging: implications for late maintenance of hippocampal long-term potentiation. *Trends Neurosci.* 1998; 21:181-8.

Galimberti I¹, Gogolla N, Alberi S, Santos AF, Muller D, Caroni P. Long-term rearrangements of hippocampal mossy fiber terminal connectivity in the adult regulated by experience. *Neuron.* 2006; 50:749-63.

Geinisman Y. Structural synaptic modifications associated with hippocampal LTP and behavioral learning. *Cereb Cortex.* 2000; 10:952-62.

Greenough WT, Anderson BJ. Cerebellar synaptic plasticity. Relation to learning versus neural activity. *Ann N Y Acad Sci.* 1991; 627:231-47.

Guzowski JF, Knierim JJ, Moser EI. Ensemble dynamics of hippocampal regions CA3 and CA1. *Neuron.* 2004; 44:581-4.

Han X, Wang W, Xue X, Shao F, Li N. Brief social isolation in early adolescence affects reversal learning and forebrain BDNF expression in adult rats. *Brain Res Bull.* 2011; 86: 173–8.

Hanson JE, Madison DV. Imbalanced pattern completion vs. separation in cognitive disease: network simulations of synaptic pathologies predict a personalized therapeutics strategy. *BMC Neurosci.* 2010; 11, 96.

Hasselmo ME, Schnell E, and Barkai E. Dynamics of learning and recall at excitatory recurrent synapses and cholinergic modulation in rat hippocampal region CA3. *J Neurosci.* 1995; 15: 5249–5262.

Hebb DO. *The Organization of Behavior: A Neuropsychological Theory.* John Wiley y Sons. 1945.

Hayman RM, Jeffery KJ. How heterogeneous place cell responding arises from homogeneous grids a contextual gating hypothesis. *Hippocampus.* 2008; 18: 1301–13.

Hoang LT, Kesner RP. Dorsal hippocampus, CA3, and CA1 lesions disrupt temporal sequence completion. *Behav Neurosci.* 2008; 122: 9–15.

Holahan MR, Honegger KS, Routtenberg A. Expansion and retraction of hippocampal mossy fibers during postweaning development: strain-specific effects of NMDA receptor blockade. *Hippocampus*. 2007; 17:58-67.

Holahan MR, Rekart JL, Sandoval J, Routtenberg A. Spatial learning induces presynaptic structural remodeling in the hippocampal mossy fiber system of two rat strains. *Hippocampus*. 2006; 16:560-70.

Hunsaker MR, Kesner RP. The operation of pattern separation and pattern completion processes associated with different attributes or domains of memory. *Neurosci Biobehav Rev*. 2013; 37: 36–58.

Ishizuka N, Cowan WM, Amaral DG. A quantitative analysis of the dendritic organization of pyramidal cells in the rat hippocampus. *J Comp Neurol*. 1995; 362:17-45.

Jaffe DB, Gutiérrez R. Mossy fiber synaptic transmission: communication from the dentate gyrus to area CA3. *Prog Brain Res*. 2007; 163: 109–32.

Kawashima T, Okuno H, Bito H. A new era for functional labeling of neurons: activity-dependent promoters have come of age. *Front Neural Circuits*. 2014 Apr 23;8:37.

Kawashima T, Okuno H, Nonaka M, Adachi-Morishima A, Kyo N, Okamura M, Takemoto-Kimura S, Worley PF, Bito H. Synaptic activity-responsive element in the Arc/Arg3.1 promoter essential for synapse-to-nucleus signaling in activated neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106:316-21.

Keeley RJ, Wartman BC, Häusler AN, Holahan MR. Effect of juvenile pretraining on adolescent structural hippocampal attributes as a substrate for enhanced spatial performance. *Learn Mem*. 2010; 17: 344-54.

Kesner RP. An analysis of the dentate gyrus function. *Behav Brain Res*. 2013; 254:1–7.

Kesslak JP, So V, Choi J, Cotman CW, Gomez-Pinilla F. Learning upregulates brain-derived neurotrophic factor messenger ribonucleic acid: a mechanism to facilitate encoding

and circuit maintenance? *Behav Neurosci.* 1998; 112:1012–1019

Khabour OF, Alzoubi KH, Alomari MA, Alzubi MA. Changes in spatial memory and BDNF expression to simultaneous dietary restriction and forced exercise. *Brain Res Bull.* 2013; 90: 19–24.

Kobayashi K. Hippocampal mossy fiber synaptic transmission and its modulation. *Vitam Horm.* 2010; 82:65-85.

Kobayashi K, Poo MM. Spike train timing-dependent associative modification of hippocampal CA3 recurrent synapses by mossy fibers. *Neuron.* 2004; 41: 445–54.

Landmann L1, Marbet P. Colocalization analysis yields superior results after image restoration. *Microsc Res Tech.* 2004; 64:103-12.

Lassalle JM, Bataille T, Halley H. Reversible inactivation of the hippocampal mossy fiber synapses in mice impairs spatial learning, but neither consolidation nor memory retrieval, in the Morris navigation task. *Neurobiol Learn Mem.* 2000; 73: 243–57. PMID: 10775494

Lee I, Kesner RP. Encoding versus retrieval of spatial memory: Double dissociation between the dentate gyrus and the perforant path inputs into CA3 in the dorsal hippocampus. *Hippocampus* 2004; 14: 66–76.

Leutgeb JK, Leutgeb S, Treves A, Meyer R, Barnes CA, McNaughton BL, Moser MB, Moser EI. Progressive transformation of hippocampal neuronal representations in "morphed" environments. *Neuron.* 2005; 48:345-58.

Leutgeb S, Leutgeb JK. Pattern separation, pattern completion, and new neuronal codes within a continuous CA3 map. *Learn Mem.* 2007; 14:745-57.

Leutgeb JK, Leutgeb S, Moser MB, Moser EI. Pattern separation in the dentate gyrus and CA3 of the hippocampus. *Science.* 2007; 315: 961-6.

Lipp HP, Schwegler H, Heimrich B, Driscoll P. Infrapyramidal mossy fibers and two-way avoidance learning: developmental modification of hippocampal circuitry and adult behavior of rats and mice. *J. Neurosci.* 1988; 8: 1905-21.

Lyford GL, Yamagata K, Kaufmann WE, Barnes CA, Sanders LK, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Lanahan AA, Worley PF. Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. *Neuron* 1995; 14(2):433-445.

Maccaferri G, Toth K, McBain CJ. Target-specific expression of presynaptic mossy fiber plasticity. *Science.* 1988; 279:1368-70.

Markus EJ, Barnes CA, McNaughton BL, Gladden VL, Skaggs WE. Spatial information content and reliability of hippocampal CA1 neurons: effects of visual input. *Hippocampus.* 1994; 4:410-21.

Marr D. A theory of cerebellar cortex. *J Physiol (Lond)* 1969; 202:437-70.

Marr D. Simple memory: a theory for archicortex. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1971; 262:23-81.

Martin KC, Kosik KS. Synaptic tagging -- who's it? *Nat Rev Neurosci.* 2002; 3: 813-20.

McGaugh JL. Consolidating memories. *Annu Rev Psychol.* 2015; 66:1-24.

McGonigal R, Tabatadze N, Routtenberg A. Selective presynaptic terminal remodeling induced by spatial, but not cued, learning: a quantitative confocal study. *Hippocampus.* 2012; 22:1242-55.

McNaughton BL, Morris RGM. Hippocampal synaptic enhancement and information storage within a distributed memory system. *Trends Neurosci* 1987; 10: 408-15.

Middei S, Vetere G, Sgobio C, Ammassari-Teule M. Landmark-based but not vestibular-based orientation elicits mossy fiber synaptogenesis in the mouse hippocampus. *Neurobiol Learn Mem.* 2007; 87:174-80.

Mizuseki K, Royer S, Diba K, Buzsáki G. Activity dynamics and behavioral correlates of CA3 and CA1 hippocampal pyramidal neurons. *Hippocampus*. 2012; 22:1659-80.

Morin JP, Quiroz C, Mendoza-Viveros L, Ramirez-Amaya V, Bermudez-Rattoni F. Familiar taste induces higher dendritic levels of activity-regulated cytoskeleton-associated protein in the insular cortex than a novel one. *Learn Mem*. 2011; 18: 610-6.

Morris RG, Anderson E, Lynch GS, Baudry M. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature*. 1986; 319:774-6.

Moscovitch M, Nadel L, Winocur G, Gilboa A, Rosenbaum RS. The cognitive neuroscience of remote episodic, semantic and spatial memory. *Curr Opin Neurobiol* 2006; 16:179-90.

Moser MB, Trommald M, Andersen P. An increase in dendritic spine density on hippocampal CA1 pyramidal cells following spatial learning in adult rats suggests the formation of new synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91:12673-5.

Moser MB, Trommald M, Egeland T, Andersen P. Spatial training in a complex environment and isolation alter the spine distribution differently in rat CA1 pyramidal cells. *J Comp Neurol*. 1997; 380:373-81.

Nakashiba T, Cushman JD, Pelkey KA, Renaudineau S, Buhl DL, McHugh TJ, et al. Young dentate granule cells mediate pattern separation, whereas old granule cells facilitate pattern completion. *Cell*. 2012; 149: 188–201.

O'Keefe J. & Nadel L. *The Hippocampus as a Cognitive Map*, 1978. (Oxford: Clarendon Press)

Okuno H. Regulation and function of immediate-early genes in the brain: beyond neuronal activity markers. *Neurosci Res*. 2011; 69:175-86.

Okuno H, Akashi K, Ishii Y, Yagishita-Kyo N, Suzuki K, Nonaka M, Kawashima T, Fujii H, Takemoto-Kimura S, Abe M, Natsume R, Chowdhury S, Sakimura K, Worley PF, Bito H. Inverse synaptic tagging of inactive synapses via dynamic interaction of Arc/Arg3.1 with CaMKII β . *Cell*. 2012; 149:886-98.

Park H, Poo MM. Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nat Rev Neurosci.* 2013; 14: 7–23.

Peebles CL, Yoo J, Thwin MT, Palop JJ, Noebels JL, Finkbeiner S. Arc regulates spine morphology and maintains network stability in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107: 18173-8.

Pleskacheva MG, Wolfer DP, Kupriyanova IF, Nikolenko DL, Scheffrahn H, Dell'Omo G, Lipp HP. Hippocampal mossy fibers and swimming navigation learning in two vole species occupying different habitats. *Hippocampus.* 2000; 10:17-30.

Pozzo-Miller LD, Inoue T, Murphy DD. Estradiol increases spine density and NMDA-dependent Ca²⁺ transients in spines of CA1 pyramidal neurons from hippocampal slices. *J Neurophysiol.* 1999; 81: 1404–11.

Prior H, Schwegler H, Ducker G. Dissociation of spatial reference memory, spatial working memory, and hippocampal mossy fiber distribution in two rat strains differing in emotionality. *Behav. Brain Res.* 1997; 87: 183-94.

Ramírez-Amaya Víctor, Escobar Martha L., Chao Vincent y *Bermúdez-Rattoni Federico. Synaptogenesis of mossy fibers induced by spatial water maze overtraining. *Hippocampus.* 1999; 9:631-6.

Ramírez-Amaya V, Balderas I, Sandoval J, Escobar ML, Bermúdez-Rattoni F. Spatial long-term memory is related to mossy fiber synaptogenesis. *J Neurosci.* 2001; 21:7340-8.

Ramírez-Amaya V, Vazdarjanova A, Mikhael D, Rosi S, Worley PF, Barnes CA. Spatial exploration-induced Arc mRNA and protein expression: evidence for selective, network-specific reactivation. *J Neurosci.* 2005; 25:1761-8.

Ramón y Cajal S. *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés.* A. Meloine Editeur. Paris. 1909. Traducción del doctor L. Azoulay, 2 volúmenes. 1911.

Reijmers LG, Perkins BL, Matsuo N, Mayford M. Localization of a stable neural correlate

of associative memory. *Science*. 2007; 317:1230–1233.

Rekart JL, Holahan MR, Routtenberg A. Presynaptic Structural Plasticity and Long- Lasting Memory: Focus on Learning-Induced Redistribution of Hippocampal Mossy Fibers. In: Bermúdez-Rattoni F, editor. *Neural Plasticity and Memory: From Genes to Brain Imaging*. Boca Raton (FL): CRC Press. 2007a. Capítulo 5.

Rekart JL, Sandoval CJ, Bermudez-Rattoni F, Routtenberg A. Remodeling of hippocampal mossy fibers is selectively induced seven days after the acquisition of a spatial but not a cued reference memory task. *Learn Mem*. 2007b; 14:416-21.

Rekart JL, Sandoval CJ, Routtenberg A. Learning-induced axonal remodeling: evolutionary divergence and conservation of two components of the mossy fiber system within Rodentia. *Neurobiol Learn Mem*. 2007c; 87:225-35.

Rollenhagen A1, Lübke JH. The mossy fiber bouton: the "common" or the "unique" synapse? *Front Synaptic Neurosci*. 2010; 2:2.

Rolls ET. Functions of neuronal networks in the hippocampus and neocortex in memory. In: JH. Byrne, WO. Berry, Eds. *Neural Models of Plasticity: Experimental and Theoretical Approaches*. San Diego: Academic Press. 1989; pp 240–65.

Rosenzweig, MR, Krech D, Bennett EL, Diamond MC. Effects of environmental complexity and training on brain chemistry and anatomy: a replication and extension. *J Comp Physiol Psychol*. 1962; 55:429-37.

Rosenzweig MR, Bennett EL. Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior. *Behav Brain Res*. 1996; 78:57-65.

Rosi S, Ramirez-Amaya V, Vazdarjanova A, Esparza EE, Larkin PB, Fike JR, Wenk GL, Barnes CA. Accuracy of hippocampal network activity is disrupted by neuroinflammation: rescue by memantine. *Brain*. 2009; 132: 2464–77.

Ruediger S, Vittori C, Bednarek E, Genoud C, Strata P, Sacchetti B, Caroni P. Learning-related feedforward inhibitory connectivity growth required for memory precision. *Nature*. 2011; 473:514-8.

Rusakov DA, Davies HA, Harrison E, Diana G, Richter-Levin G, Bliss TV, Stewart MG. Ultrastructural synaptic correlates of spatial learning in rat hippocampus. *Neuroscience* 1997; 80:69-77.

Sakurai Y. How do cell assemblies encode information in the brain? *Neurosci Biobehav Rev* 1999; 23:785-96.

Schöpke R, Wolfner DP, Lipp HP, Leisinger-Trigona MC. Swimming navigation and structural variations of the infrapyramidal mossy fibers in the hippocampus of the mouse. *Hippocampus*. 1991; 1: 315-28.

Schwegler H, Crusio WE. Correlations between radial-maze learning and structural variations of septum and hippocampus in rodents. *Behav. Brain Res*. 1995; 67: 29-41.

Schwegler H, Mueller GG, Crusio WE, Szemes L, Seress L. Hippocampal morphology and spatially related behavior in Long-Evans and CFY rats. *Hippocampus*. 1993; 3:1-7.

Scwabassi RJ, Eriksson JL, Port RL, Robinson GB, Berger TW. Nonlinear systems analysis of the hippocampal perforant path-dentate projection. I. Theoretical and interpretational considerations. *J Neurophysiol*. 1988; 60:1066-76.

Scoville WB, Milner B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1957; 20: 11-21.

Shepherd JD, Bear MF. New views of Arc, a master regulator of synaptic plasticity. *Nat Neurosci*. 2011; 14:279-284.

Stewart MG, Davies HA, Sandi C, Kraev IV, Rogachevsky VV, Peddie CJ, Rodriguez JJ, Cordero MI, Donohue HS, Gabbott PL, Popov VI. Stress suppresses and learning induces plasticity in CA3

of rat hippocampus: a three-dimensional ultrastructural study of thorny excrescences and their postsynaptic densities. *Neuroscience*. 2005; 131:43-54.

Steward O, Worley PF. Selective targeting of newly synthesized Arc mRNA to active synapses requires NMDA receptor activation. *Neuron*. 2001; 30:227–240.

Stranahan AM, Khalil D, Gould E. Running induces widespread structural alterations in the hippocampus and entorhinal cortex. *Hippocampus*. 2007; 17: 1017–22.

Stupien G, Florian C, Roulet P. Involvement of the hippocampal CA3-region in acquisition and in memory consolidation of spatial but not in object information in mice. *Neurobiol Learn Mem*. 2003; 80: 32-41.

Tolman EC. Cognitive maps in rats and men. *The Psychological Review*. 1948; 55: 189–208.

Toscano-Silva M, Gomes da Silva S, Scorza FA, Bonvent JJ, Cavalheiro EA, Arida RM. Hippocampal mossy fiber sprouting induced by forced and voluntary physical exercise. *Physiol Behav*. 2010; 101: 302–8.

Treves A, Rolls ET Computational constraints suggest the need for two distinct input systems to the hippocampal CA3 network. *Hippocampus* 1992; 2:189–99.

Treves A, Tashiro A, Witter ME, Moser EI. What is the mammalian dentate gyrus good for? *Neuroscience*. 2008; 154:1155-72.

Turrigiano GG, Leslie KR, Desai NS, Rutherford LC, Nelson SB. Activity-dependent scaling of quantal amplitude in neocortical neurons. *Nature*. 1998; 391:892–896

Tzingounis AV¹, Nicoll RA. Arc/Arg3.1: linking gene expression to synaptic plasticity and memory. *Neuron*. 2006; 52: 403-7.

Urban NN, Henze DA, Barrionuevo G. Revisiting the role of the hippocampal mossy fiber synapse. *Hippocampus*. 2001; 11: 408–17.

Vazdarjanova A, Ramírez-Amaya V, Insel N et al. Spatial exploration induces Arc, a plasticity-related immediate-early gene, only in calcium/calmodulin-dependent protein kinase II-positive principal excitatory and inhibitory neurons of the forebrain. *J Comp Neurol.* 2012; 498:317–329.

Wartman BC, Gervais NJ, Smith C, Comba R, Mumby DG, Holahan MR. Enhanced adolescent learning and hippocampal axonal projections following preadolescent spatial exposure to a water or dry maze. *Brain Res.* 2012; 1475:37-48.

Watkins JC, Jane DE. The glutamate story. *Br J Pharmacol.* 2006; 147: S100-8.

Witter MP. Intrinsic and extrinsic wiring of CA3: Indications for connectional heterogeneity *Learn. Mem.* 2007; 14: 705-13.

Yassa MA, Stark CE. Pattern separation in the hippocampus. *Trends Neurosci.* 2011; 34: 515–25.

Zinchuk V¹, Grossenbacher-Zinchuk O. Recent advances in quantitative colocalization analysis: focus on neuroscience. *Prog Histochem Cytochem.* 2009; 44:125-72.

8. ANEXOS

Metadata of the chapter that will be visualized in SpringerLink

Book Title		
Series Title	7854	
Chapter Title	Network, Cellular, and Molecular Mechanisms Underlying Long-Term Memory Formation	
Copyright Year	2012	
Copyright HolderName	Springer-Verlag Berlin Heidelberg	
Corresponding Author	Family Name	Ramírez-Amaya
	Particle	
	Given Name	Víctor
	Suffix	
	Division	Laboratorio (A-13) Redes Neuronales Plásticas y Cognición, Departamento de Neurobiología Conductual y Cognitiva, Instituto de Neurobiología
	Organization	Universidad Nacional Autónoma de México
	Address	Blvd Juriquilla 3001 Campus UNAM Juriquilla, 76230, Querétaro, QRO, México
	Email	vramirez@unam.mx
Author	Family Name	Carasatorre
	Particle	
	Given Name	Mariana
	Suffix	
	Division	Laboratorio (A-13) Redes Neuronales Plásticas y Cognición, Departamento de Neurobiología Conductual y Cognitiva, Instituto de Neurobiología
	Organization	Universidad Nacional Autónoma de México
	Address	Blvd Juriquilla 3001 Campus UNAM Juriquilla, 76230, Querétaro, QRO, México
	Email	
Abstract	<p>The neural network stores information through activity-dependent synaptic plasticity that occurs in populations of neurons. Persistent forms of synaptic plasticity may account for long-term memory storage, and the most salient forms are the changes in the structure of synapses. The theory proposes that encoding should use a sparse code and evidence suggests that this can be achieved through offline reactivation or by sparse initial recruitment of the network units. This idea implies that in some cases the neurons that underwent structural synaptic plasticity might be a subpopulation of those originally recruited; However, it is not yet clear whether all the neurons recruited during acquisition are the ones that underwent persistent forms of synaptic plasticity and responsible for memory retrieval. To determine which neural units underlie long-term memory storage, we need to characterize which are the persistent forms of synaptic plasticity occurring in these neural ensembles and the best hints so far are the molecular signals underlying structural modifications of the synapses. Structural synaptic plasticity can be achieved by the activity of various signal transduction pathways, including the NMDA-CaMKII and ACh-MAPK. These pathways converge with the Rho family of GTPases and the consequent ERK 1/2 activation, which regulates multiple cellular functions such as protein translation, protein trafficking, and gene transcription. The most detailed explanation may come from models that allow us to determine the contribution of each piece of this fascinating puzzle that is the neuron and the neural network.</p>	

Network, Cellular, and Molecular Mechanisms Underlying Long-Term Memory Formation

Mariana Carasatorre and Víctor Ramírez-Amaya

Abstract The neural network stores information through activity-dependent synaptic plasticity that occurs in populations of neurons. Persistent forms of synaptic plasticity may account for long-term memory storage, and the most salient forms are the changes in the structure of synapses. The theory proposes that encoding should use a sparse code and evidence suggests that this can be achieved through offline reactivation or by sparse initial recruitment of the network units. This idea implies that in some cases the neurons that underwent structural synaptic plasticity might be a subpopulation of those originally recruited; However, it is not yet clear whether all the neurons recruited during acquisition are the ones that underwent persistent forms of synaptic plasticity and responsible for memory retrieval. To determine which neural units underlie long-term memory storage, we need to characterize which are the persistent forms of synaptic plasticity occurring in these neural ensembles and the best hints so far are the molecular signals underlying structural modifications of the synapses. Structural synaptic plasticity can be achieved by the activity of various signal transduction pathways, including the NMDA-CaMKII and ACh-MAPK. These pathways converge with the Rho family of GTPases and the consequent ERK 1/2 activation, which regulates multiple cellular functions such as protein translation, protein trafficking, and gene transcription. The most detailed explanation may come from models that allow us to determine the contribution of each piece of this fascinating puzzle that is the neuron and the neural network.

M. Carasatorre · V. Ramírez-Amaya (✉)
Laboratorio (A-13) Redes Neuronales Plásticas y Cognición,
Departamento de Neurobiología Conductual y Cognitiva,
Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México,
Blvd Juriquilla 3001 Campus UNAM Juriquilla, 76230 Querétaro, QRO, México
e-mail: vramirez@unam.mx; vramirez1023@gmail.com

Abbreviations

Ach	Acetylcholine
AP5	(2R)-amino-5-phosphonovaleric acid
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BRs	β -adrenergic receptors
CA1	Cornu ammonis 1
CA3	Cornu ammonis 3
CaMKII	Ca ²⁺ /calmodulin-dependent kinase II
cAMP	Cyclic AMP
CatFISH	Compartmental analysis of temporal activity using fluorescent insitu hybridization
CBP	CREB binding protein
CNS	Central nervous system
CREB	cAMP response element-binding
D1	Dopamine receptor 1
D2	Dopamine receptor 2
DAG	Diacylglycerol
DG	Dentate Gyrus
Elk-1	E twenty-six (ETS)-like transcription factor 1
EPSP	Excitatory postsynaptic potential
ERK	Mitogen-activated protein kinase
GABA	Gamma-aminobutyric acid
GFP	Green fluorescent protein
GluR1	AMPA receptor subunit 1
H3	Histone 3
IEG	Immediate early gene
IP3	Inosito trisphosphate
LPT	Long-term potentiation
LTD	Long-term depression
M1	Muscarinic acetylcholine receptors 1
M2R	Muscarinic acetylcholine receptors 2
M3	Muscarinic acetylcholine receptors 3
M4R	Muscarinic acetylcholine receptors 4
MAP2	Microtubule-associated protein 2
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase
MK801	Dizocilpine
MSK1	Mitogen- and stress-activated kinase 1
NCAM	Neural cell adhesion molecule
NE	Endo-neuraminidase
NGF	Nerve growth factor
NMDA	N-Methyl-D-aspartic acid
NR 1	NMDA receptor subunit 1
NR 2	NMDA receptor subunit 2
NT	Neurotrophins

ODNs	Oligodeoxy nucleotides
PKA	Protein kinase A
PKC	Protein kinase C
PLC	Phospholipase C
PSD-95	Postsynaptic density protein 95
RSK2	Ribosomal protein S6 kinase 2
Ser/Thr kinase	Serine–threonine kinase
Tg	Transgenic
TrkB	Tyrosine kinase or BDNF/NT-3 growth factors receptor
Wave3	Actin nucleating factor

Contents

1	Introduction.....
2	How does the Neural Network Work?.....
3	What is Actually Occurring in the Biological Neural Network?.....
4	Triggering Signals.....
5	Downstream Signals.....
6	Participating Genes.....
7	Conclusion.....
	References.....

1 Introduction

Our learning or the information we acquire comes in diverse ways, either as explicit information that describes objects, places, or events or as implicit information that modulates behavioral responses and outcomes. Each different form of learning is processed by a particular neural network distributed throughout different brain regions. However, the mechanisms underlying these different information-processing tasks use basically the same network and cellular principles (Gilbert et al. 2001), and they may even use similar signal transduction pathways. Today, neuroscientists are generating a clearer picture of these underlying principles that help explain the cognitive processes of information acquisition and long-term memory formation. In this review we attempt to provide a general picture of network, cellular, and molecular mechanisms underlying long-term memory formation.

2 How does the Neural Network Work?

Features of the environment are detected by our sensory receptors that transduce these fragments of physical stimuli into patterns of neural activity. This process can be seen as an analog–digital information conversion; it represents the first limit

of our cognition and is determined by the characteristics of the sensory receptors of each species. Thus, the information we acquire depends on the features of the stimulus that can be extracted with our sensory detectors. But later, once the information is transduced into neural activity, the features of the stimuli are processed through distributed neural networks or circuits and later integrated in a holistic representation. In this way, the reality we perceive results from a reconstruction that our brain produces and depends on the features that were extracted from the environment and how they were integrated, which in turn depend on the way we have trained our brain to perform these information-processing tasks. These tasks use both serial and parallel neural pathways to achieve proper integration; importantly, however, all the processing occurs in *populations* of neurons, generating what is currently known as a population code (Sakurai 1998).

The theoretical proposal suggesting that objects or ideas are represented by the patterns of activity generated in groups of neurons was formally presented by Hebb (1943) in his book “The Organization of Behavior”. He suggested that groups of neurons, which he called “neural ensembles” that possess recurrent connections, such as the ones described by Lorente de Nó (1933, 1938a, b), have the ability to maintain the newly acquired patterns of neural activity through reverberation. Hebb then suggested that this reverberatory activity leads to changes in the efficacy of synapses, a phenomenon that we currently call “synaptic plasticity”. The idea is that synaptic plasticity stabilizes the ability of the cell assembly to reproduce the patterns of neural activity long after they were acquired through experience. The reproduction or reactivation of the activity patterns can occur either offline, which is in the absence of the stimuli, or online, which is in response to the original, a partial, or a distorted stimulus. Hebb’s ideas inspired the generation of computational neural network models that developed into the theory of the “attractor memory neural networks” (Lansner 2008).

The fundamental idea behind the computational models of “attractor memory neural networks” is basically the same; changes in the strengths of synaptic connections are required to stabilize the ability of the cell assembly to reproduce the neural activity patterns acquired through experience. These models integrate experimental observations obtained from different levels of analysis, as suggested by Marr (1982), and can display information-processing capabilities during simulation, such as associative memory and holistic perception (Mari 2004; Lansner 2009; Akrami et al. 2012). The models that integrate many biologically characterized variables, when designed with Hebbian synaptic changes can become self-organizing attractor neural networks models, which may be considered as the building blocks of neural network dynamics. These models provide the basic operations of the neural network, such as analog–digital conversion, categorization, association, and autoassociation (Akrami et al. 2012). These operations then turn into more sophisticated forms of cognitive tasks such as perception, learning, and memory or even language. The main operations displayed by these models also agree with Marr’s original suggestion that association and statistical pattern comparisons were the principal information-processing mechanisms of the neural network (Marr 1971). Several self-organizing attractor neural networks models

create a stable dynamic attractor with which the network can reproduce the neural activity patterns acquired earlier during experience. Neural ensembles formed in this way will subsequently serve as the elements responsible for reproducing the patterns of neural activity acquired during experience, and these activity patterns are actually the neural representation of the stimulus (Barlow 1972). If at any time the external stimuli or cues occur in a distorted or fragmented way but place the network in the basin of the attractor, the network dynamics will drive the neurons to reproduce (to some extent) the activity patterns that were exhibited during acquisition of the original experience. This is called pattern completion, and it is the mechanism through which the network reactivates the originally acquired activity pattern in response to partial or distorted information. Pattern completion explains holistic perception or what is also known as “the gestalt phenomenon”, while lateral inhibition will mediate perceptual rivalry in case of ambiguity between the stimuli and explains pattern separation.

Although Hebb’s ideas were generally correct, some important details were missing, and artificial recurrent neural network models initially had trouble achieving reverberatory activity (MacGregor and McMullen 1978; Lansner and Fransén 1992; Wilson and Bower 1992). These original models used a dense and symmetric connectivity that requires high-frequency neural activity to function properly (Hopfield 1982), in clear contrast to what has been described physiologically in the mammalian brain (Lansner 2009). But later, the models of recurrent neural networks integrated important biological features from cortical pyramidal cells, such as modular organization and functioning (Lansner 2009). Examples of these modules in the biological neural network, are the cortical columns (Mountcastle et al. 1967; Mountcastle 1997; Hubel and Wiesel 1959, 1962) or the clustered striosome–matrisome in the striatum (Amemori et al. 2011), and can also organize without clustering cells (Redish et al. 2001) but instead apparently in a modular dendritic branch composition (Ascoli et al. 2009). The models that integrate a modular architecture present a sparse and asymmetric connectivity at the neuron-to-neuron level, and symmetrical function at the mini column level (Lansner 2009). This symmetrical function of neuronal modules is now widely used to develop complex neural network models that can achieve sophisticated cognitive tasks. Other biological features that were integrated are synaptic features provided by glutamatergic transmission, particularly *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor function (Lansner and Fransén 1992; Traub et al. 1992), and the modulatory role of GABAergic interneurons (Mariño et al. 2005; Rudolph et al. 2007). These new models have reliably reproduced reverberatory activity in the neural network simulations and are able to properly achieve the cognitive endeavors.

Experimental findings of delayed persistent activity after stimulation (Romo and Salinas 2003; Lemus et al. 2007; Barak et al. 2010), neural activity associated with memory retrieval (Jacobs et al. 2012), and the existence of modules (or columns in the cortex) with feature selectivity (Mountcastle et al. 1967; Mountcastle 1997; Hubel and Wiesel 1959, 1962) suggest that memory as a whole consists of the integration of distributed features or pieces of the represented stimuli. One very

important advantage of this type of modular architecture is that newly acquired patterns of activity can build new representations on the foundation of network attractors acquired previously from other representations (Mari 2004). This fascinating idea was originally suggested by Jean Piaget (1954) and is currently being supported by neural network models. In the most basic computational models, memory retrieval occurs when the partial or distorted stimulus evolves into a pattern strongly correlated with one of the representations stored in the synaptic weights (Hopfield 1982). This is a universal mechanism for memory retrieval and the correlated activity of the reciprocally connected modules is potentially very relevant (Mari 2004).

The main factors that determine the effectiveness of attractor dynamics are: connectivity, representation sparseness, and the presence of noise (Akrami et al. 2012). One important question is how sparse is the representation. Computationally, it has been suggested that a sparse code will produce an efficient memory encoding, since distinct items are less likely to interfere when represented simultaneously, and it is more likely that a single-layer neural network can learn to generate a target output if the input is represented within a sparse population of neurons (Willshaw and Dayan 1990). On the other hand, a dense code imposes only one pattern at a given time, while superimposing more than one pattern creates decoding difficulties and introduces interference. This is why a dense code limits the number of memories that can be stored, while a sparse code enhances it. However, as we will see, it is not yet clear how the biological network achieves a sparse code.

Currently it is well accepted that activity-dependent synaptic plasticity is a principal mechanism for cell-assembly formation, and consequently for memory consolidation, which is the process through which memory is stabilized. Synaptic plasticity also determines the future dynamics of the neural network associated with memory retrieval and behavioral performance. The idea that reverberatory activity leads to synaptic plasticity may well be applied to both transient and persistent forms of synaptic plasticity, underlying both short-term and long-term memory.

However, it is possible that long-term memory may require long-lasting reverberatory activity or more rounds of it, in a way that enables the coincident activation of different signal transduction pathways to promote long-term synaptic plasticity, but it is also possible that salient signals may determine the fate of one particular representation by inducing a fast achieving plastic event. Neuroscientists know that changes in the synaptic weights occur with different temporal fates, which in turn is determined by the persistence of the synaptic changes and this underlies the duration of the corresponding memory (Dudai 2002).

Many details might be missing and it is not yet clear how the biological network achieves a code that allows efficient memory encoding and retrieval, but today we have substantial evidence suggesting that Hebb's ideas and the theory behind the computational modeling studies inspired by them are in general correct. Meanwhile, it is clear that if we characterized important properties of the neural network at the cellular, synaptic, and molecular levels, the resulting knowledge will

contribute enormously to understand the neural network dynamics, because the integration of these biological features into the computational models can change qualitatively and quantitatively the macroscopic dynamic of the neural network during simulation, and this will give us hints to better understand important details of the biological neural network function.

3 What is Actually Occurring in the Biological Neural Network?

About 20 years after the original proposal of Hebb, the Per Andersen laboratory started a visionary research endeavor that led to the experimental finding of long-term changes in the efficacy of synapses as a consequence of high-frequency stimulation (Lømo 1966). This was later characterized as long-term potentiation or LTP (Bliss and Lømo 1973), and it demonstrated that synapse efficiency could actually change as a result of the activity history of a particular pathway as it was previously proposed by Hebb (1949). This finding attracted considerable attention, and the cellular mechanisms underlying LTP were broadly studied (Abraham and Williams 2003; Lynch 2004; Abraham and Williams 2008). These studies started to uncover a prominent role of glutamate NMDA receptors (Lynch et al. 1988; Daw et al. 1993; Malenka 2003), the relevant dynamic calcium signals (Malenka 1991), and the role of other mechanisms such as retrograde messages (Zorumski and Izumi 1993), kinase activation (Routtenberg 1985), and transcriptional regulation (Pittenger and Kandel 1998). Attention was also directed toward the possible behavioral requirement for LTP; with this in mind, Richard Morris's group decided to block NMDA receptors to impair LTP induction and examine the behavioral performance in the Water Maze task. They demonstrated that impairing LTP in the hippocampus, which is involved in spatial information processing, also affected the animals' behavioral performance in the water maze spatial memory task (Morris et al. 1986). This result was confirmed by other laboratories using other behaviors and analyzing other brain regions, and a wide spectrum of evidence supporting this principle soon accumulated (see Martinez and Derrick 1996). In summary, the studies on LTP have demonstrated that activity-dependent synaptic plasticity is required for memory formation. This confirmed the idea that Hebbian modifications are required in the neural networks to achieve memory storage (Fig. 1).

However, the question of whether LTP was actually occurring as a consequence of the animal's experience remained elusive, possibly because some of the details implied in the neural ensemble hypothesis were overlooked, such as sparse coding and connectivity. When electrophysiological recordings were made in discrete regions of the CA1 dendritic tree after the animals learned an inhibitory avoidance task, changes in the efficacy of synapses were detected in some of the dendritic regions recorded (Whitlock et al. 2006), and this happened only in trained, but not

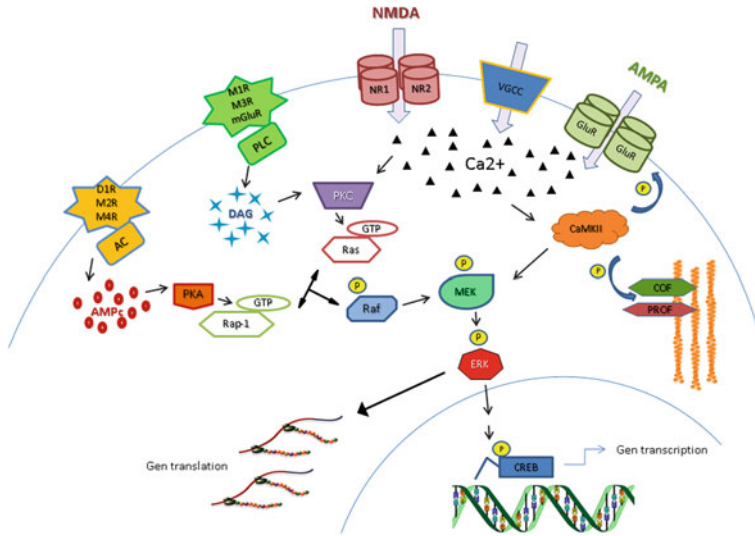


Fig. 1 Molecular mechanisms underlying structural synaptic plasticity: several signal transduction pathways that include a variety of transmembrane receptors are activated during information processing in the neural network. One pathway involves NMDA and AMPA receptors, and with the participation of voltage-dependent calcium channels, it triggers rapid Ca^{2+} influx; this in turn activates CaMKII, which is involved in remodeling spine structure since it interacts with the actin cytoskeleton and phosphorylates actin polymerization regulator proteins such as cofilin or profilin. This pathway also activates MEK, which is part of the MAP kinase pathways. In addition, the activation of muscarinic (M2 and M4) and dopaminergic receptors is associated with the activation of adenylate cyclase (AC) resulting in increased levels of cAMP; this second messenger activates PKA which, in turn, phosphorylates GTPases such as Rap-1. On the other hand, metabotropic receptors such as cholinergic M1 and M3 and metabotropic glutamate receptors (mGluR) are associated with phospholipase C (PLC), and their activation induces the production of the second messengers IP3 and DAG. This latter activates PKC, which phosphorylates certain GTPases such as Ras. It is clear that these pathways, involved in structural synaptic plasticity, converge in the activation of the MAP kinase pathway. The GTPase family (Rap-1, Ras, etc.) can phosphorylate Raf, which in turn phosphorylates MEK. Here at MEK is where the glutamate receptor activation, both ionotropic and metabotropic, converge. MEK phosphorylates ERK 1/2 triggering its downstream effects, such as translation regulation in the cytoplasm and gene transcription in the nucleus. The regulation of both translation and gene transcription may modulate important proteins related to structural synaptic plasticity. A prominent example is the transcription factor CREB, which regulates many other genes important for synaptic plasticity. Another way ERK 1/2 regulates transcription is through epigenetic transcription regulation, by phosphorylating H3. Various genes such as the IEG Arc, Zif268, and BDNF are involved in the molecular mechanisms underlying structural synaptic plasticity. Finally, cofilin (cof) and profilin (prof) are associated with the polymerization and depolymerization of actin filaments and their regulation is important for structural synaptic plasticity

in nontrained animals. This was a clear demonstration that LTP or changes in the efficacy of synapses occurred in a sparse population of inputs after a learning experience, which is completely consistent with the current neural network theory.

It has also been demonstrated that structural synaptic changes occurred as a consequence of the synaptic stimulation that induces LTP (Lynch and Baudry 1987; Markus and Petit 1989; Geinisman et al. 1992) and also as a consequence of behavioral experience (Greenough and Anderson 1991; Rampon et al. 2000; Holtmaat et al. 2008). The idea that structural synaptic changes are the underlying mechanism of neural ensemble stabilization was explicitly proposed in Hebb's original work (1949). Today, we know that behavioral experience can modify the neuroanatomical structure of the neural network. An early example was that motor skill learning increased the density of synaptic contacts in the cerebellum, as shown by electron microscopy (Greenough and Anderson 1991). Moser et al. (in 1994 and 1997) published several studies in which they measured dendritic spine density in the CA1 dendrites of animals that either were given a complex environment experience that promoted spatial learning or were treated as controls (social caging and single cage controls). They found that spine density in the CA1 basal dendrites (*stratum oriens*) was significantly higher in animals exposed to the complex environment than in controls. Importantly, the animals that experienced the complex environment also performed better than controls in a water maze task (Moser et al. 1997).

A major player in experience-dependent structural plasticity is the neural cell adhesion molecule (NCAM). Furthermore, polysialylation of NCAM which is known to be involved in structural synaptic plasticity (Regan and Fox 1995); enables NCAM to promote the relocation of synaptic contacts, instead of simply maintaining them. Endo-neuraminidase (NE) can cleave the bound of polysialic acid from NCAM (Finne et al. 1983), and the intraparenchymal administration of NE into the hippocampus after acquisition of a water maze task impairs spatial memory consolidation and LTP maintenance (Becker et al. 1996). This evidence suggested that spatial memory consolidation requires the induction of synaptic modifications in the hippocampus, and possibly synaptogenesis. Supporting this idea, an LTP-inducing stimulation produced clear structural synaptic plasticity, visualized with the Timm staining method (Escobar et al. 1997).

With this in mind, a series of experiments intended to test the possibility that spatial water maze training induces synaptic remodeling in the hippocampus, were undertaken. We used the Timm staining method to visualize the mossy fiber buttons in the CA3 dendrites and compared the density of these terminals in the CA3 from animals trained for several days in the Morris water maze task with that in the CA3 from swimming and cage control animals. The results revealed that animals overtrained in the Morris water maze task had a higher density of mossy fiber buttons in the CA3 *stratum oriens* compared to the other groups, including animals trained for fewer days (Ramirez-Amaya et al. 1999). Electron microscopy analysis confirmed this result, revealing a higher density of mossy fiber buttons in the CA3 *stratum oriens* with immature ultrastructural features. The conclusion was that an increase in the density of mossy fiber buttons occurred after Morris water maze overtraining, indicating that learning-induced mossy fiber synaptogenesis in the CA3 *stratum oriens*. Later, we found that water maze overtraining promoted a memory that lasted for about 30 days, and the animals' performance showed a

positive correlation with the density of mossy buttons in the CA3 *stratum oriens*, when all groups were included (Ramirez-Amaya et al. 2001). Interestingly, these structural changes were blocked by the systemic administration of an NMDA antagonist, applied before acquisition but not afterward; this treatment also impaired adequate performance in the water maze task, suggesting that NMDA receptors trigger the structural change, as we will see below. These results have been reproduced by others who found that the structural changes are first detectable several days after the training experience (Rekart et al. 2007), suggesting that synaptogenesis might be established by offline reactivation of the underlying neural network, which is consistent with the theory. However, the structural changes are observed in such an extensive area (Ramirez-Amaya et al. 2001) that they might be related to a change in hippocampal network function as well. Current unpublished observations from our laboratory (Carasatorre et al. 2011), obtained with catFISH and behavioral testing, are showing clear improvements in pattern completion and pattern separation in the hippocampi of animals that showed the structural changes as a consequence of spatial water maze overtraining.

These results could reflect structural changes that are nonspecific or unrelated to memory, raising the important question: Are the CA3 pyramidal cells that respond with activity to the behavioral experience that gave rise to the long-lasting memory, the same cells as those with modified synaptic density in their basal dendrites? We approached this question (Carasatorre and Ramirez-Amaya unpublished observations) by simultaneously staining MAP-2 to visualize the CA3 apical and basal dendrites, synaptophysin to detect the presynaptic buttons, and Arc protein to identify the activated cells. In the image analysis, we segmented the dendrites by characterizing MAP2 staining in the confocal stack, and we distinguished between the activated and nonactivated dendrites. This analysis was done in animals that either underwent a water maze experience 60 min before sacrifice, which was similar to their training for 5 days with a submerged platform; other groups contained animals that were pretrained as swimming controls and tested as such, animals that experienced the water maze task before sacrifice but instead of being previously trained they remained undisturbed in their home cage. Finally, one last group of animals did not receive any behavioral treatment at all and were therefore considered as cage controls. At the moment of writing this chapter, preliminary results are revealing an 8-fold increase in synaptophysin density that appears to be more pronounced in the MAP-2-Arc positive dendrites of water maze-treated animals. Interestingly, however, a significant 2- to 3-fold increase was also found in the nonactivated dendrites (nonArc positive MAP-2 only dendrites) of water maze-treated animals. Therefore, most of the synaptophysin and possibly the synapse density increase occur in the activated dendrites, but some might be occurring in the nonbehavioral specific activated dendrites. So far this finding supports the idea that structural synaptic plasticity is a persistent type of change in the neural synapses underlying long-term memory formation (Bailey and Kandel 1993), and it may well be one of the underlying mechanism that explains long-term memory formation (Bailey and Kandel 2008). Other studies

had found more subtle structural synaptic changes as a consequence of behavioral experience (Rusakov et al. 1997), so it is likely that the structural changes seen after behavioral experience (Ramirez-Amaya et al. 1999, 2001) have important implications for both network function and memory storage.

Nevertheless, further work is needed to distinguish which structural synaptic changes account for the fine tuning of the network function and which are truly related to the stabilization of the acquired representations and their maintenance in memory. It is important to note that the persistent forms of neural plasticity underlying long-term memory may also include homeostatic synaptic plasticity (Perez-Otano and Ehlers 2005; Shepherd et al. 2006; Rabinowitch and Segev 2008; Peebles et al. 2010; Sajikumar and Korte 2011) and changes in the intrinsic properties of the neuron activity (Marder et al. 1996; Barkai 2005; Narayanan and Johnston 2007). However, it is not clear yet whether this or other types of plasticity should occur in all or some of the inputs involved in the circuit or the neural units that were recruited. Since the molecular signals underlying plasticity are both deterministic and probabilistic, one may think that plasticity may have different strengths and temporal fates in each input and the neural units involved.

The theory also states that the neuronal population, as opposed to single neurons, will reliably encode the processed information; although single neurons process features from the stimulus, their activity is very noisy and not reliable enough to support storage and retrieval. In the 1980s, Georgopoulos and his group developed the population vector analysis for multiple-unit electrophysiological recording of motor cortical neurons of macaques performing an arm direction task (Georgopoulos et al. 1986; Kettner et al. 1988). They successfully demonstrated that groups of neurons encode motor information, in a way that the analysis of a neuronal population yielded enough information that could be used to predict the actual motor behavior of the primate (Georgopoulos et al. 1986; Kettner et al. 1988). A similar analysis done on the recorded activity of a population of hippocampal place cells, predicted the actual location of the animal during the exploration of a spatial environment (Wilson and McNaughton 1993); in this case, the larger the population of hippocampal neurons recorded, the more reliable the prediction of the animal's location became. In fact, today this notion is being exploited to develop motorized limbs for rehabilitation of subjects who have lost an arm or a leg. In this case, population recordings of the subject's own neural activity are used to control the limb movement (Velliste et al. 2008; Wang et al. 2010). Together, this evidence demonstrates that population coding is the mechanism of information processing in the brain, as suggested by the theory. The analysis methods currently being developed include promising new strategies to electrophysiologically detect functional ensembles of neurons (Tsien 2007; Chen et al. 2009).

Another prediction of the theory is that the neural units recruited during the acquisition of new information, or at least some of them, should be the ones activated during retrieval. Over short time intervals or moderately long-term memories (a few days), compelling evidence supporting this view was provided by electrophysiological recordings of place cells in the hippocampus. Place cells are

hippocampal pyramidal cells that show a clear increase in the firing rate when the animal is located in a particular place of the environment (Nadel and Eichenbaum 1999; Jeffery 2007; Moser and Moser 2008). This means that the firing rate of an individual neuron increases in one particular place, and this response is repeated most of the time when the animal travels through the *place field* of the cell. The area and placement of the place field, i.e., where the cell responds, remains in that location throughout daily recordings in the same environment (Thompson and Best 1990; Kentros et al. 2004). Also, with the catFISH analysis, in which we detect genes that are expressed immediately after synaptic neural activity and the location of the label within the cell, we can distinguish cells recently activated (5 min with two Arc foci) from those activated earlier (30 min, with Arc in the cytoplasm). It has been observed that the majority of the cells that are activated with one environment are activated again with exploration experience in the same environment (Guzowski et al. 1999). This result demonstrates that of the cells activated during acquisition, ~80 % are reactivated during retrieval. But for longer time intervals, the evidence is not quite clear. Electrophysiological recordings do not provide the best neuroanatomical resolution and the implanted electrodes may produce necrosis. Other methods to characterize the neuroanatomical patterns of activity with accurate cellular resolution might provide more accurate answers.

With an elegant transgenic mouse strategy that used the promoter of the immediate early gene (IEG) *cFos* attached to a tTA sequence that can activate a constitutive expressed tag (LacZ) when the system is activated in the absence of doxycycline, which maintains the system off. With this system Leon Reijmers group were able to label neurons, activated during the acquisition of a fear conditioning task, for a prolonged period of time after the experience. Three days later, the animals were exposed again to the same task and the acquisition-labeled neurons were compared with those activated during retrieval by detecting Zif268 expression. Here it was demonstrated that the neurons activated during retrieval were a subpopulation of the neurons activated during acquisition. However, the proportion of neurons that were recruited during retrieval was only about 12 % from those activated during acquisition (Reijmers et al. 2007). One source of error comes from the fact that the animals need to stop taking doxycycline about 24 h before the acquisition of the task, so some of the neurons tag with LacZ and may have been activated by other stimuli. More precise long-term labeling systems need to be developed to accurately determine how many cells recruited during acquisition are also recruited during long-term retrieval. If the idea suggesting that only a fraction of the originally recruited neurons are the ones that are recruited during retrieval is right, this will indicate that this subpopulation of neurons might be the ones that underwent synaptic plasticity, a notion that was also suggested by data obtained from offline reactivation.

According to the theory, the neuronal ensemble should also be able to reactivate offline or in the absence of further stimulation. This has also been experimentally demonstrated. Wilson and McNaughton (1994) recorded a population of neurons in hippocampal area CA1 and found that cells that were active together during spatial exploration also tended to fire together during the sleep period that

immediately followed the spatial experience. In this analysis, pairs of neurons that were classified as being ‘correlated’ or ‘uncorrelated’ maintained this classification during the reactivation period, suggesting that during sleep, the network replays the state imposed during the experience. We now know that place cell reactivation that occurs during sleep can also be observed during periods of wakeful rest (Karlsson and Frank 2009; Carr et al. 2011) or pauses during spatial behavior (Davidson et al. 2009), and that this reactivation produces a sequential replay of the activity patterns acquired during the initial experience (Karlsson and Frank 2009; Carr et al. 2011). The awake state offline reactivation is believed to reflect trajectories through either the current environment or previously visited ones that are spatially remote (Davidson et al. 2009; Karlsson and Frank 2009; Carr et al. 2011). This repetition of acquired activity patterns on a compressed time scale is suggested to promote memory formation in distributed neural circuits.

Using electrophysiological recording, it is possible to characterize in detail the sequential activity of neural ensembles recruited during experience that are later reactivated in an offline period. However, the number of cells included in the analysis of these electrophysiological studies is around one hundred units, and the anatomical extent of the study is limited to two or three different brain regions. Thus, in order to extend the anatomical reach of the analysis, other methods have been developed. Such a method can be the detection of immediate early genes (IEGs) like *Arc*, which was used to develop catFISH (Guzowski et al. 1999). Using a modified version of it, we were interested in determining whether or not the translation of *Arc* was limiting the number of plastic cells; since the size of the *Arc*-expressing ensemble is quite large (~45 % of total neurons in CA1 and Cortex) and since *Arc* protein is known to be involved in long-term synaptic plasticity, some modulation in the size of the population in which synaptic plasticity is achieved would be expected. We found that *Arc* translation was not the limiting factor, since the proportion of *Arc* mRNA and *Arc* protein positive cells was very similar; however, 8 h after the original experience, a subpopulation of about 50 % of the neurons activated during acquisition, reactivated the expression of *Arc*. More than 80 % of the cells that show *Arc* protein expression at 8 and 24 h also respond to the second exploration by expressing *Arc* mRNA (Ramirez-Amaya et al. 2005). We interpret this finding as a highly specific, offline reactivation of *Arc* expression in a subset of the originally activated cells. Interestingly, we note that only about 50 % of the originally activated neurons underwent reactivation and, although 20 % of CA1 cells still represent a big population, we hypothesize that this could be a selection mechanism that promotes a sparse code for memory encoding. This evidence is also in line with the idea that a subpopulation of the originally activated neurons is likely to elicit synaptic plasticity and suggests that not all neurons recruited during the original acquisition of information undergo synaptic plasticity.

By visualizing the expression of *Arc*-GFP in a Tg mouse (*Arc* promoter linked to green fluorescent protein), using two-photon live imaging in the living mouse brain, it was possible to make the astonishing observation that, after repeated stimulation with a visual stimulus of one specific orientation, the size of the

Arc-expressing ensemble in the visual cortex gradually decreased over a series of daily exposures (Wang et al. 2006). The final proportion of cells activated by the repeated experience was again about 50 % of the originally activated ensemble. Moreover, they also found that the subset of cells that had kept firing together after several consecutive days had a higher likelihood of continuing to fire together, whereas the cells that had stopped firing were less likely to be part of the recruited ensemble. But remember that here they were identifying the active neurons by the use of Arc reporter (Wang et al. 2006). This decrease in the active neurons has not been observed with electrophysiology, possibly we may need more anatomical accuracy with this method; however it is also clear that for IEGs expression, in the hippocampus, after several daily exploration experiences, the number of neural units activated remain the same, which is not observed after massive exploration that occur in one day (Guzowski et al. 2006). So if the system manages to select the plastic neural units, the question is why and how it keeps recruiting neural populations of similar sizes after long-term experiences.

Taken together, IEG detection studies in which the neuroanatomical activity patterns, as described above, were characterized, suggest that during either offline or online reactivation, the decrease in the number of active neurons may be a mechanism through which the system “fine-tunes” the neural representation and selects the units that will undergo persistent types of synaptic plasticity and be stored in long-term memory (Ramírez-Amaya et al. 2005; Wang et al. 2006). This interpretation is gaining support from preliminary results from our lab showing that the neurons engaged in offline reactivation are more likely to coactivate CREB (Morales and Ramírez-Amaya 2010). An important idea behind this is that synergic activation of different signal transduction pathways may modulate or determine the plastic fate of a subset of the neural units that were originally activated. According to our current estimates, the size of this subset of “plastic” neurons may be of about 35–40 % of the originally activated network, and estimates match between studies (Ramírez-Amaya et al. 2005; Wang et al. 2006). Since the size of the ensemble during long-term retrieval is likely to remain the same, this suggest that we may have two populations of neurons that reactivate the activity pattern: 35 % of these are Hebbian neurons (those that achieved synaptic plasticity), and 65 % are nonHebbian neurons (the ones that did not achieve it). Since the size of the activated ensemble in each experience, acquisition, and retrieval, is the same, the question is, whether the 65 % nonHebbian, reactivated neurons were recruited stochastically or tend to be part of the originally activated population; the answer is more likely to be the latter, since electrophysiological studies tend to record the same neurons with the same place field over several days of recording (Davidson et al. 2009; Karlsson and Frank 2009; Carr et al. 2011). Obviously, accurate counts are needed and can be obtained with methods such as that of Reijmers, which allow us to perform experiments with long-term neural activity labels and determine with precision the number of units that were actually active in both experiences. But if their synaptic weights do not change, why and how do the neurons manage to keep firing together? is this is a feature of the attractor network? and how reliably, and for how long are the same neural units

selected? And again, we need to know the exact size of the Hebbian neuron population that undergoes long-term plastic changes underlying long-term memory.

Last but not least, an interesting story is currently unfolding in the hippocampus dentate gyrus; it has been observed that the dentate gyrus uses an impressively clear sparse code that appears instantly as the initial response to a spatial exploration experience (Chawla et al. 2005; Ramirez-Amaya et al. 2005), where the proportion of neural units activated is around 2 % (Chawla et al. 2005; Ramirez-Amaya et al. 2005). This is a remarkable example of a neural network using sparse coding to orthogonalize information that eventually reaches the pyramidal cell dendrites of CA3. However, it has been found that when exposing animals to five different environments in one long session, instead of activating 2 % of neurons multiplied by the number of explored environments, the proportion of activated cells is only about 3 % of the total population of neurons. With electrophysiological recordings, it was observed that the same cells expressing place fields in one environment, also express them in other environments (Alme et al. 2010). This suggests that instead of using different neural units to encode different information, the neural networks in the DG may use different activity pattern sequences in the same neurons. This contrasts with the clear independence of the ensembles recruited with two different environment experiences in the CAs of the hippocampal and pyramidal neocortical cells. The evidence then suggests that plasticity in DG neurons is highly likely to be achieved in the initially recruited ensemble during the acquisition of novel spatial information by a mechanism of sustained *Arc* transcription (Angulo et al. 2009; Ramírez-Amaya et al. in preparation).

In contrast to the CA regions, in the DG network, different elements of spatial information appear to be represented in different sequences of activity in the same cells, the size of the ensemble is smaller (about 2 % of the total population of neurons) and plastic cells are selected immediately upon initial recruitment, through a mechanism related to sustained transcription of *Arc* mRNA (Angulo et al. 2009). However, and possibly counter intuitively, the DG units that participate in a given representation may change gradually over time (Alme et al. 2010; Sandoval et al. 2011) and possibly with experiences. These results lead to the granular cell early retirement hypothesis. These interesting cellular features of the DG network suggest that neural networks may present at least two different ways to organize the acquired patterns of activity: (a) by using different activity pattern sequences with the same neural units or (b) by recruiting different neural units which, as a group, produce one particular activity pattern. This notion should be tested in computational models to determine whether or not it contributes to facilitate neural networks dynamics and to what extent it may translate into a revised description of the theory.

All in all, there is compelling evidence that plasticity in the communication between neurons is indeed involved in the neural mechanisms that lead to memory formation, but many details still need to be added or adjusted. For example, a precise characterization of the number and type of neural units involved in information processing and storage, i.e., those undergoing synaptic plasticity is

urgently needed. This will enable us to test the algorithms used in the neural network models. A detailed characterization of the cellular, synaptic, and molecular changes underlying long-term memory formation is also required to generate biologically realistic neural network models.

In the following pages, we will present a general review of the molecular events related to long-term synaptic plasticity, which is intended to provide a clearer understanding of the underlying cell signaling principles of long-term memory formation.

4 Triggering Signals

Synaptic plasticity underlying long-term memory formation may take several forms. Here, we will consider that the plastic changes related to long-term memory are those that persist over time, such as structural synaptic plasticity and homeostatic synaptic plasticity. These persistent forms of synaptic plasticity underlying ensemble stabilization can be driven by the activation of one or several neurotransmitter receptors.

The most important excitatory neurotransmitter in the central nervous system (CNS) is L-glutamate, and it is well accepted that changes in the efficacy of glutamatergic synapses depend on changes in the density and features of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate (AMPA) and NMDA receptors. Glutamatergic transmission plays an important role in the stabilization of synaptic contacts (Rebola et al. 2010; McKinney 2010). It is well established that LTP induction promotes changes in the synaptic structure (Desmond and Levy 1983; Escobar et al. 1991; Toni et al. 1999); for example, inhibition of LTP with an NMDA receptor antagonist (D(-)-2-amino-5 phosphonovaleric acid; AP5) prevents these structural changes (Toni et al. 1999). Likewise, we found that water maze overtraining induces changes in the distribution of mossy fiber boutons in the CA3 region of the hippocampus (Ramirez-Amaya et al. 1999), and these changes were blocked by pretreating animals with the NMDA receptor antagonist MK801 (Ramirez-Amaya et al. 2001). Other studies show increased spine density in the hippocampus which was observed 24 h after trace eyeblink conditioning, and again, this change was blocked by NMDA receptor antagonists (Leuner et al. 2003). Together, these data indicate that glutamatergic transmission is a very important first step in the mechanism(s) underlying structural synaptic plasticity.

Remarkably, AMPA receptors are responsible for the generation of excitatory post-synaptic potential (EPSP) and are the triggers of synapse efficacy changes, such as LTP and LTD. But of great relevance are the NMDA receptors, which regulate the changes in the efficacy of synaptic transmission and have long been known to be involved in learning and memory. These receptors participate in the fine tuning of neural networks by modulating the generation of synaptic contacts as well as strengthening, weakening, and pruning them (Malenka and Nicoll 1993; Huang and Pallas 2001; Lüthi et al. 2001; Adesnik et al. 2008).

NMDA receptors are tetramers composed of two different subunit types, NR1 and NR2. These subunits have an N-terminal extracellular domain, three transmembrane regions, and an intracellular C-terminal domain that interacts with several proteins and can be phosphorylated, regulating receptor trafficking and function (Salter and Kalia 2004; Lau and Zukin 2007; Groc et al. 2009). Different pharmacological and biophysical properties of the multiple NMDAR subtypes are determined by the type of NR2 subunit (NR2A to NR2D) incorporated into the heteromeric NR1/NR2 complex. The NR2 subunit is the crucial regulatory unit of NMDARs, since it contains the glutamate-binding site, the glycine-binding site, and affinity site for Mg^{2+} blocking of the channel (Traynelis et al. 2010). This subunit modulates the affinity for glutamate and mediates glycine binding, and it also determines the strength of Mg^{2+} binding, which blocks NMDA channel function and modulates Ca^{2+} conductance (Cull-Candy and Leszkiewicz 2004; Paoletti and Neyton 2007). The NR2 subtypes NR2A and NR2B have very similar amino acid sequences, but they differ in their C-terminal ends (Ishii et al. 1993). These NMDA receptor subtypes significantly influence synapse morphology; it has been demonstrated for example that the early expression of NR2A in organotypic, hippocampal slice cultures reduces the number of synapses and the volume and dynamics of dendritic spines (Gambrill and Barria 2011). In contrast, NR2B overexpression apparently does not affect the normal density of synapses (Gambrill and Barria 2011), but it does increase spine motility, adding and retracting spines at a higher rate (Gambrill and Barria 2011). Similarly, overexpression of NR2B increases the motility of filopodia (Gambrill and Barria 2011), whose role is to establish synaptic connections (Dailey and Smith 1996; Portera-Cailliau et al. 2003; Holtmaat et al. 2006). These results show that the balance of NR2A and NR2B in the synapse strongly affects the number of synapses formed, suggesting that NR2A prevents the process of synaptogenesis, while NR2B triggers spinogenesis and synaptogenesis by increasing the rate of structural plasticity, enabling the neuron to find and establish efficient synaptic contacts. The proposal that NMDARs are fundamental for synaptic and spine stabilization (Alvarez et al. 2007; Akashi et al. 2009) is supported by experimental evidence showing distinct roles for the C-termini of the two NR2 subunits in forming and stabilizing synapses. Congruently, NR2B-knockout mice exhibit a reduction in G-actin and in the density of dendritic spines (Gambrill and Barria 2011). The difference between NR2A and NR2B may be related to their ability to interact with Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase II (CaMKII) which, as we will see in the next section, is of great importance for structural synaptic plasticity. The ability of NR2B to bind CaMKII depends on its C-terminal sequence, which is considered to be critical for the regulation of synaptogenesis (Gambrill and Barria 2011); in contrast, the C-terminal sequence of NR2A does not bind CaMKII and when it replaces NR2B, CaMKII-mediated synaptic potentiation is reduced (Gambrill and Barria 2011). Clearly this shows how the NMDA receptor subunit composition is crucial for synaptogenesis and synapse stabilization.

Other interesting evidence shows that stimulation of AMPA and NMDA receptors reduces the motility of spines during development (Fischer et al. 2000), suggesting that the stabilization of contacts might be driven by glutamate receptor-mediated

activity. This may also be true for synapse formation in the adult brain during structural plasticity related to long-term memory (Ramírez-Amaya et al. 2001; Rekart 2003). Actin filaments are thought to be crucial for both the formation of dendritic spines during development and their structural plasticity at mature synapses (Fischer et al. 2000; Matus et al. 2000), and the activation of NMDA receptors is important for integrin-dependent actin reorganization (Shi and Ethell 2006), which is known to induce the elongation of existing dendritic spines and to promote the formation of new filopodia (Shi and Ethell 2006). Time-lapse imaging of fluorescent glutamate receptors, demonstrated that NMDA and AMPA receptors are present in motile filopodia before and during synaptogenesis (Washbourne et al. 2002), and it was demonstrated that the activation of these glutamatergic receptors modulates the motility of filopodia (Chang and De Camilli 2001), supporting the idea that the formation of new synapses may depend on glutamatergic activity.

Another feature of glutamatergic transmission is that the number of AMPA and NMDA receptors in the postsynaptic membrane depends on the activity history of the synapse (Lüscher et al. 1999; Shi et al. 1999; Lan et al. 2001; Crump et al. 2001). The regulation of glutamate receptor density in the postsynaptic membrane has also been implicated in a special form of synaptic plasticity known as synaptic scaling (Perez-Otano and Ehlers 2005; Wierenga et al. 2005; Andrasfalvy and Magee 2001). This is a homeostatic regulation of the synapse, in which the total synaptic strength is modulated in order to adjust to recent changes in the efficiency of the synapse, and it is required to stabilize the plastic changes in the neural network (Turrigiano et al. 1998; Abbott and Nelson 2000; London and Segev 2001; Perez-Otano and Ehlers 2005). Thus, the mechanisms that regulate the aggregation, endocytosis, and trafficking of glutamate receptors in the postsynaptic membrane may contribute to this persistent form of synaptic plasticity.

Although memory formation clearly requires the early involvement of NMDA, AMPA, and metabotropic glutamate receptors, it is also regulated by cholinergic and GABAergic transmission (Izquierdo et al. 1999). An interaction between cholinergic and glutamate receptors has been postulated, since their activity converges, as demonstrated by studies of the multiple signal transduction pathways mediated by these receptors (Ferreira et al. 2002; Woolf 1998). Possibly, different signal transduction cascades of fast (e.g., glutamatergic) and modulatory (e.g., cholinergic) neurotransmission are both necessary for long-term synaptic plasticity and may converge in a given neuron (Rosenblum et al. 2000). Moreover, it has been suggested that this convergent signaling may promote morphological changes in the neurons where it occurs (Woolf 1996). These ideas led to the hypothesis of a cholinergic regulation of long-term synaptic plasticity, which suggests that cholinergic cells may undergo changes in their dendritic structure as a result of Ach (acetylcholine) receptor activation, which is proposed to induce the degradation of MAP-2 structures (Woolf 1996). Such structural changes may occur during memory consolidation and may be responsible for long-term memory storage. It has been shown that cholinergic receptors mediate NGF-induced excitatory synaptogenesis (Woodin et al. 2002), lending support to the idea that ACh is one of the molecular signals leading to structural synaptic plasticity.

Further support comes from experiments in rats in which postnatal lesions of the nucleus basalis magnocellularis that produced a robust cholinergic deafferentation in the cortex, altered the differentiation of cortical neurons and synaptic connectivity that persists into maturity, and contributed to altered cognitive behavior (Hohmann 2003). In the honey bee brain, treatment with pilocarpine, a muscarinic agonist, induced an increase in the volume of the neuropil similar to that observed after foraging behavioral experience (Ismail et al. 2006). Recently, it has been demonstrated that the activation of muscarinic receptors in CA1 pyramidal neurons induced the emergence of fine filopodia from spine heads (Schätzle et al. 2011). This is one of the most direct pieces of evidence for ACh participation in structural synaptic plasticity.

Another neurotransmitter that may be involved in persistent forms of synaptic plasticity is dopamine; for example, it has been demonstrated that overexpression of D2 dopamine receptors decreases the complexity and length of the dendritic arbors of the neurons (Cazorla et al. 2012), and that these changes can be reversed by restoring D2 dopamine receptors to normal density (Cazorla et al. 2012).

Many other neurotransmitters may also trigger or modulate persistent forms of synaptic plasticity (Imai et al. 2004); possibly, a synergistic action between various different systems is required to induce long-lasting forms of synaptic plasticity. Nevertheless, these initial signals may converge in some common cellular events, such as the influx of calcium and the activation of the kinase-phosphatase system, among others. The increase in Ca^{2+} conductance mediated through NMDA receptors can trigger the activity of several kinases, such as CaMKII, PKA, PKC, and MAPK (Kerchner and Nicoll 2008; Newpher and Ehlers 2009).

5 Downstream Signals

Once the receptors are activated, several downstream signals modulate the final cellular events that persistently stabilize the synaptic connections. As we mentioned earlier, probably the most prominent signal associated with synaptic plasticity is calcium. In general terms, in dendritic spines, elevation of Ca^{2+} activates numerous signaling proteins including protein kinase C (PKC), Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase II (CaMKII), and small GTPase proteins such as Ras and Rho (Kennedy et al. 2005). All of these proteins are important regulators of long-term synaptic plasticity, and they promote different cellular processes including actin polymerization and depolymerization, trafficking of proteins, and exocytosis and endocytosis of glutamate receptors (Kennedy and Ehlers 2006; Hotulainen and Hoogenraad 2010).

Decidedly, the principal calcium signal transducer is CaMKII. After synaptic activation, the influx of Ca^{2+} into the cell, either through ligand- and voltage-gated calcium channels or from internal reservoirs, results in a complex set of transitory and oscillatory signals. These complex signals require a molecular device to transform them into a more stable and durable message; such a device should be

capable of activating the intracellular cascades involved in stabilizing synaptic plasticity. CaMKII is a ubiquitous Ser/Thr protein kinase with broad specificity, and it is very abundant in the CNS. This enzyme is highly concentrated in the postsynaptic density where it is considered to be an important Ca²⁺ “detector” (Lisman and McIntyre 2001).

The unique regulatory properties of CaMKII make it an ideal “interpreter” of the diversity of Ca²⁺ signals. Evidence has shown that CaMKII can interpret the message coded in the amplitude and duration of individual Ca²⁺ spikes and translate it into distinct amounts of long-lasting, Ca²⁺-independent kinase activity (DeKoninck and Schulman 1998). CaMKII is composed of subunits that combine into a dodecamer, in which each subunit work as a serine–threonine kinase (Rosenberg et al. 2005). In its nonactivated state, CaMKII is autoinhibited or blocked, but it becomes activated when it interacts with calcium/calmodulin (Ca²⁺/CaM) complexes (Lisman et al. 2002). Active CaMKII phosphorylates many proteins, and it also displays an important autophosphorylation activity. When phosphorylated, CaMKII remains active even after the dissociation of Ca²⁺/CaM. Thus, autophosphorylation generates a constitutive active form of CaMKII able to translate a transient Ca²⁺ signal into a persistent, Ca²⁺-independent signal (Cammarota et al. 2002). The ability of CaMKII to maintain its phosphorylating activity for a prolonged period of time through autophosphorylation (Lisman et al. 2002) represents an important way to sustain the effects of Ca²⁺ signaling. Since this is a mechanism that can persist for up to several minutes, it may be of great relevance for the consolidation of long-term synaptic plasticity and memory formation (Giese et al. 1998).

The active form of CaMKII is found in the postsynaptic density (Yoshimura et al. 1996), where it interacts with a variety of molecules important for the structure and function of the postsynapse. These include PSD-95 (Yoshimura et al. 2000), densin-180 (Strack et al. 2000; Walikonis et al. 2001), F-actin (Allison et al. 2000), and particularly the NMDA glutamate receptor (Gardoni et al. 1998). The interaction with the NMDA receptor is very important since it increases CaMKII autophosphorylation activity and its ability to become hyperphosphorylated (Bayer et al. 2001). Hyperphosphorylation of CaMKII also enhances AMPA receptor conductance by causing the phosphorylation of AMPA receptors (Derkach et al. 1999) and it can extend the period of CaMKII activation by saturating local phosphatases, preventing dephosphorylation (Lisman and Zhabotinsky 2001). Finally, hyperphosphorylation of CaMKII may increase the interaction between NMDA and AMPA receptors (Lisman and Zhabotinsky 2001). This interaction may in turn induce the insertion of AMPA receptors into ‘silent’ synaptic sites that already contain NMDA receptors (Hayachi et al. 2000). All these functional properties of CaMKII are crucial for its involvement in the persistent forms of synaptic plasticity.

It has been proposed that CaMKII works as a memory switch for Ca²⁺ signaling, alternating between a stable ‘on’ state and a transient ‘off’ state (Lisman and McIntyre 2001). Bayer and colleagues suggest that CaMKII presents an initially reversible state that is dependent on Ca²⁺/CaM-binding at the substrate-binding site (“S-site”); and later CaMKII assumes a more stable state in which a persistent

interaction with its T286-binding site (“T-site”) enables the Ca^{2+} /CaM-independent activity of the kinase. This may indeed be the most prominent feature of CaMKII (Bayer et al. 2006).

Various pharmacological inhibitors of CaMKII have been developed, and they consistently have been found to inhibit the induction of LTP (Malinow et al. 1989; Ito et al. 1991; Hvalby et al. 1994; Otmakhov et al. 1997; Buard et al. 2010; Hayashi et al. 2000; Watanabe et al. 1996; Link et al. 1995; Guzowski et al. 1999). On the other hand, when the constitutively active form of CaMKII is injected or overexpressed in neurons, synaptic strength is potentiated (Lledo et al. 1995; Hayashi et al. 2000). Also, CaMKII activity is required for the maintenance phase of LTP (Wang and Kelly 1995). Importantly, we know that both the induction of LTP and sensory stimulation promote a rapid growth of dendritic filopodia and the formation of dendritic spines and new synapses (Escobar et al. 1997; Toni et al. 1999; Engert and Bonhoeffer 1999). In a beautiful study using hippocampal slice cultures (Jourdain et al. 2003), the intracellular administration of the autophosphorylated form of CaMKII reproduced the effects of LTP, including filopodia growth and spine formation. The inhibition of phosphatases, thereby maintaining CaMKII activity, or the application of Ca^{2+} /CaM in neurons produced the same effect. Furthermore, blocking CaMKII activity prevented LTP, filopodia growth, and spine formation (Jourdain et al. 2003).

Other inhibitors of CaMKII such as KN62 and KN93 (Wayman et al. 2008) can also block structural synaptic plasticity induced by 2-photon glutamate uncaging (Matsuzaki et al. 2004; Harvey et al. 2008; Steiner et al. 2008; Lee et al. 2009). Interestingly, application of the CaMKII inhibitor KN62, or the NMDAR antagonist AP5, prevents the glutamate-induced, long-term enlargement of the dendritic spines, indicating that activity-dependent spine growth requires both CaMKII activity and NMDAR activation (O’Keefe and Nadel 1978).

Of the different CaMKII genes that have been described, only CaMKII- β , but not CaMKII- α , has strong morphogenic activity which regulates dendritic growth, filopodia extension, and synapse formation in cell cultures (Fink et al. 2003). For example, it has been shown that reducing the amount of the CaMKII- β subunit, but not CaMKII- α , clearly changes the shape of spines by turning them into filopodia-like structures (Okamoto et al. 2007). This suggests that CaMKII- β may regulate structural plasticity of spines by directly regulating actin dynamics (Cingolani and Goda 2008; Dillon and Goda 2005; Sekino et al. 2007). Two forms of actin, the monomeric globular form (G-actin) and the filamentous form (F-actin), coexist in a dynamic equilibrium that is modulated by proteins that either promote actin depolymerization (such as cofilin) or polymerization (such as profilin) (Okamoto et al. 2009). CaMKII heterooligomers may also bind to different actin filaments through multiple β -subunits, since F-actin forms thick-bundled structures in vitro in the presence of the CaMKII β (O’Leary et al. 2006; Okamoto et al. 2007; Sanabria et al. 2009). It was found that CaMKII- β stabilizes the actin cytoskeleton in spines and also that phosphorylation of CaMKII reduces the binding activity of β -subunits (Okamoto et al. 2007), which suggests that the ability of CaMKII to stabilize the actin cytoskeleton is regulated by synaptic activity.

However, it is important to note that the kinase activity of CaMKII is also essential for structural plasticity (Matsuzaki et al. 2004; Okamoto et al. 2004). CaMKII initiates multiple signaling pathways by phosphorylating proteins such as GluR1 or PSD-95 and by activating the Rho family of small GTPases that indirectly through downstream signals regulates the G-actin/F-actin equilibrium. However, the main target of its kinase activity may actually be CaMKII itself (Shen et al. 1998).

The phosphorylation status of CaMKII regulates its ability to bind directly to F-actin. In basal conditions, actin filaments are bundled by CaMKII through its β -subunit, thereby maintaining the stability of spine structure. The activation of NMDA receptors and the resultant Ca^{2+} influx trigger CaMKII kinase activity, inducing its autophosphorylation and detaching it from actin filaments. This mobilized CaMKII can now diffuse freely to phosphorylate other targets and, at the same time, the actin cytoskeleton is no longer stabilized and it can remodel and change the structure of its spines. When eventually, CaMKII returns to the unphosphorylated basal state, phosphatases prevail over the signaling cascades and dephosphorylate their target proteins, the nonphosphorylated CaMKII then reassociates with the actin filaments, promoting their aggregation and consolidating the spine remodeling. This structural remodeling has several important consequences for the efficiency of the synapse, since it provides a new structure that may increase the number of sites available to hold postsynaptic proteins, which may help sustain the increased synaptic efficiency after LTP.

As we can notice, the participation of CaMKII in structural synaptic plasticity is consistent with the idea that CaMKII has important roles in long-term memory. Congruently, training in the Morris water maze task induces the activation of CaMKII in the hippocampus and interestingly, retention performance in this spatial memory task shows a positive correlation with the levels of CaMKII activity (Tan and Liang 1996). Although animals with heterozygous mutations of CaMKII have normal memory retention for contextual fear and the water maze task 1–3 days after training, they are amnesic when tested 10–50 days later, suggesting that long-term memory, but not short-term memory, depends on CaMKII (Frankland et al. 2001).

In summary, CaMKII is an essential multifunctional macromolecule for maintaining, remodeling, and stabilizing the synaptic structure, and it can also modulate the activity of other plasticity-related proteins that contribute to the long-term changes of synaptic efficacy. Thus, CaMKII plays a dual role in activity-dependent synaptic plasticity: a signaling role during transient Ca^{2+} influx and a structural role during the following basal state, linking functional and structural plasticity. Another pathway implicated in the persistent forms of synaptic plasticity is the ERK1/2-MAPK cascade, which is also a major target of calcium signaling. It is activated by glutamate receptors such as the NMDA and AMPA receptors, trophic factors such as BDNF, and by the neuromodulators acetylcholine and dopamine, among others (Wiegert and Bading 2011). This pathway controls many signaling substrates in both the nucleus and the cytoplasm. Within the cytoplasm, calcium ions, PKA, PKC directly or indirectly activate small GTPases such as Rap-1 or Ras. Both of these

GTPases phosphorylate Raf proteins which, in turn, phosphorylate MEK1/2, which subsequently phosphorylates ERK1/2.

When phosphorylated, ERK1/2 also phosphorylates ribosomal protein S6 kinase 2 (RSK2) (Xing et al. 1996), and it modulates AMPA receptor trafficking (Derkach et al. 2007; Kim et al. 2005; Patterson et al. 2010) and consequently, the density of postsynaptic AMPA receptors, thereby triggering the outgrowth and stabilization of dendritic spines (Dinev et al. 2001; Huang et al. 2007; Westmark et al. 2010). Thus, this pathway participates in remodeling the postsynaptic cytoskeleton which, as mentioned before, is important for the persistent forms of synaptic plasticity and long-term memory formation.

Phosphorylated ERK 1/2 may also be important to explain synaptic tagging, which is how activity-dependent synaptic plasticity occurs at specific synaptic sites, since it is known to regulate activity-dependent local translation of mRNAs (Wiegert and Bading 2011) as well as their targeting to the activate spines.

Another way in which this system modulates plasticity is that phosphorylated ERK1 and ERK2 can enter the nucleus where they regulate gene transcription (Davis et al. 2000; Rosenblum et al. 2002; Guzowski et al. 2000; Ying et al. 2002; Waltereit et al. 2001). ERK1/2 also phosphorylates specific transcription factors like Elk-1, as well as mitogen- and stress-activated kinase 1 (MSK1), which is involved in CREB phosphorylation (Wiegert and Bading 2011); CREB, in turn, regulates long-lasting plasticity in several ways, as we will discuss below. ERK1/2 activity can also promote chromatin remodeling through the phosphorylation of histone H3 (Gille et al. 1995; Treisman 1992; Brami-Cherrier et al. 2007, 2009; Wiegert et al. 2007). This last mechanism regulates gene transcription by enabling specialized enzyme complexes to bind to uncondensed chromatin, making gene promoters accessible to the transcription machinery. Chromatin remodeling and structural plasticity of the nuclear envelope provide the neuron with large-scale mechanisms to adapt the gene expression programs to changes in its activity state. These forms of ERK1/2-dependent regulation of gene expression in response to neuronal stimulation occur in several physiological processes in the brain. In particular, the nucleosomal response is involved in LTP regulation as well as in stress-related memory (Chandramohan et al. 2008; Reul et al. 2009) and contextual fear conditioning (Reul et al. 2007). Other transcription factors important for synaptic plasticity that are regulated by ERK1/2 are Zif268, BDNF, Arc, c-Fos, and c-Jun (Davis et al. 2000; Rosenblum et al. 2002; Guzowski et al. 2000; Ying et al. 2002; Waltereit et al. 2001). The promoters of many of these genes contain regulatory elements controlled by kinases other than ERK1/2. In these cases, nuclear ERK1/2 signaling is necessary, but not sufficient, to elicit robust and long-lasting, CREB-dependent gene transcription (Chawla et al. 1998; Kornhauser et al. 2002).

Several routes exist by which calcium can modulate the transcription machinery. Thus, a variety of transcription factors are regulated by calcium signaling either inside or outside the nucleus. For example, the presence of nuclear calcium is required for the induction of activity-dependent, CREB-mediated gene transcription (Hardingham et al. 1997; Chawla et al. 1998; Kornhauser et al. 2002).

Additionally, activation and nuclear translocation of other regulators of transcription can be directly or indirectly induced by cytoplasmic calcium (Shibasaki et al. 1996; Meffert et al. 2003). The calcium-mediated activation of protein kinase cascades in the cytoplasm also activates CaMKs, PKA, MAPKs, and their subsequent translocation into the nucleus (Cohen and Greenberg 2008; Wayman et al. 2008; Xing et al. 1996; Impey et al. 1998).

As we can see, both nuclear calcium signaling and intermediate kinase activation are required to control the transcription of CREB, which is possibly the best-described transcription factor in neurons and plays a central role in activity-dependent synaptic plasticity. The convergence of multiple intracellular signaling cascades in neurons leads to the CREB activation, suggesting that this transcription factor is crucial for the integration of different inputs. CREB modulates the transcriptional response of the neuron, depending on the type and strength of the input and the current state of the neuron (Barco et al. 2007). The transcriptional regulation mediated by CREB has been implicated in persistent forms of synaptic plasticity like synaptic growth, as shown in *Aplysia* (Bailey and Kandel 1993). In this animal model, the addition of phosphorylated CREB-1 to cultured sensory neurons induces long-lasting synaptic rearrangements and the formation of new and stable synaptic contacts (Casadio et al. 1999).

Induction of LTP is associated with the generation of new synapses and with the enlargement of existing dendritic spines (Matsuzaki et al. 2004; Nagerl et al. 2004); this is very clear in brain slices from neonatal animals (Zhou et al. 2004), but it can also be observed in the adult brain in a more subtle way (Lang et al. 2004). However, when CREB-dependent gene expression is coupled to sub-threshold synaptic activation, silent synapses are converted into active ones (Marie et al. 2005). In general, the gene expression cascade triggered by CREB provides molecular signals that orchestrate the stabilization and strengthening of synaptic connections (Lang et al. 2004). This includes the formation of new synapses and the remodeling of preexisting ones, both of which play an important role in long-term memory formation (Lang et al. 2004).

6 Participating Genes

It is well accepted that long-term memory formation requires transcription of specific genes into mRNAs and their translation into proteins. Some of these genes are the so-called immediate early genes (IEGs) that are rapidly, but transiently, transcribed in response to a wide variety of cellular stimuli. IEGs are functionally defined as those genes that can be transcribed in the presence of protein synthesis inhibitors. Several IEGs have been identified, and they are of two types: the transcription factors, which regulate the transcription of other genes, such as c-fos, c-jun, zif268, and Egr-3; and the so-called “effector” IEGs, which act directly upon the cell to promote plastic changes, such as Arc, Narp, Homer, Cox-2, and Rheb (Lanahan and Worley 1998).

The transcription factor IEGs *c-fos*, *c-jun*, and *zif/268* have been considered good candidates for the initial steps of learning-induced, persistent forms of synaptic plasticity (Abraham et al. 1991), because they are believed to trigger cascades of activity-dependent neuronal gene expression that can lead to plastic events in neurons. These genes are considered critical for memory consolidation (Abraham et al. 1991). Importantly, the patterns of activity that induce LTP are the same as those that induce some, but not all, of the IEGs (Worley et al. 1993). For example, *zif268* expression in the hippocampus is triggered by the same pattern of activity that induces LTP (Worley et al. 1993), indicating that the thresholds for synaptic activation to induce the expression of specific transcription regulator genes in particular regions of the brain can be closely linked to synaptic plasticity. IEGs like *c-fos* are strongly induced in the hippocampus by experimental treatments used to produce models of epilepsy (Dragunow et al. 1992), and these manipulations are known to produce structural changes, such as mossy fiber sprouting in the hippocampus (Epsztein et al. 2005). It has also been found that the expression of *c-fos* precedes the morphological changes that occur in the cortex and are associated with motor skill learning. Consistent with this, in a mouse with a *c-fos* null mutation, mossy fiber sprouting cannot be induced as a result of kindling (Watanabe et al. 1996). These data suggest that *c-fos* might be able to trigger the expression of other genes related to structural synaptic plasticity, and it has been demonstrated that one such gene is BDNF (Dong et al. 2006).

Particularly interesting for the persistent forms of synaptic plasticity are the effector IEGs like *Arc*, *Homer*, and *Narp*. They all have been implicated in activity-dependent synaptic plasticity; however, the IEG *Arc* is of particular interest due to its exquisitely regulated, activity-dependent expression, and pivotal role in synaptic plasticity. *Arc* stands for activity-regulated, cytoskeleton-associated protein, but is also known as *Arg3.1*. It was originally identified in the hippocampus and cortex (Lyford et al. 1995; Link et al. 1995). Is an effector IEG, which means that *Arc* protein found in the cytoplasm exerts, by itself, a direct cellular function; unlike other IEGs, it is not a transcription factor. Transcription of *Arc* is induced after strong cellular activity and also by BDNF and NGF. It requires NMDA receptor activation and is regulated by acetylcholine (Lyford et al. 1995).

Another noteworthy feature of *Arc* is that its mRNA travels very rapidly to the dendritic tree (Wallace et al. 1998; Steward et al. 1998). In addition, *Arc* mRNA trafficking along the dendrites is seen selectively in the activated regions of the dendrite (Steward et al. 1998), and becomes enriched at the site of local synaptic activity, suggesting that *Arc* protein is locally synthesized. The activity-dependent induction of *Arc* mRNA and protein was an early clue that it had a role in memory consolidation, so it is not surprising that the first studies on *Arc* concentrated on its regulation and function in the hippocampus. *Arc* also is involved in maintaining synaptic plasticity. Administration into the hippocampus of antisense oligonucleotides against *Arc* mRNA impairs LTP maintenance and consequently memory consolidation (Guzowski et al. 2000), and it is known that BDNF-induced LTP depends on the translation of *Arc* protein (Bramham and Messaoudi 2005). The *Arc* knock-out appears to confirm these observations, given that these animals

show normal short-term memory and impaired long-term memory (Plath et al. 2001, 2006). Interestingly, *Arc* knock-outs also present impaired LTD maintenance, suggesting that *Arc* protein is important for stabilizing depressive changes in the efficacy of synapses. The infusion of *Arc* antisense oligodeoxynucleotides (ODNs) in the rat hippocampus blocked consolidation in a spatial memory task (Guzowski et al. 2000). Similarly, *Arc* antisense ODN infusion in the lateral amygdala blocked the consolidation of Pavlovian fear conditioning (Ploski et al. 2008). These findings suggest that *Arc* has a conserved role in information storage in limbic forebrain memory systems and is important for long-lasting synaptic plasticity and memory formation (Shepherd and Bear 2011).

Another interesting role of *Arc* in synaptic plasticity is related to its interaction with dynamin and endophilin, which are cytoskeletal proteins that regulate the endocytosis of AMPA receptors. By directly interacting with these proteins, *Arc* regulates the surface density of AMPA-type glutamate receptors (Chowdhury et al. 2006). One study shows that *Arc* overexpression in hippocampal cultures and slices results in downregulation and accelerated endocytosis of surface AMPARs (Shepherd and Bear 2011). In contrast, *Arc*^{-/-} neurons have slower receptor endocytosis and abnormally high basal levels of surface GluR1. These findings support the view that activity-dependent *Arc* induction is involved in synaptic scaling. This is a homeostatic type of synaptic plasticity, and it refers to the erasure of nonspecific synaptic changes that occurred in nonstimulated synapses along the dendritic tree during the induction of activity-dependent synaptic change. The nonspecific changes are eliminated in order to maintain the specificity of the activity-dependent synaptic change (Shepherd and Bear 2011).

A very important feature of *Arc* is that it interacts with CaMKII and this interaction may be of great relevance for persistent forms of synaptic plasticity. When we studied the cell types that were able to express *Arc*, we found that all the cells that expressed *Arc* were also CaMKII-positive in regions such as the hippocampus and the cortex (Vazdarjanova et al. 2006). This indicated a possible interaction between these two plasticity-related proteins, *Arc* and CaMKII. Results obtained using fluorescence resonance energy transfer in cultured neurons have shown that the *Arc* and CaMKII β proteins can indeed interact but only in the dendritic spines (Okuno et al. 2012). Interestingly this interaction between *Arc* and CaMKII- β occurs in the nonactivated synapses. The presence of *Arc* in these nonactivated spines regulates both AMPA endocytosis and the activity of CaMKII, promoting synaptic scaling of the nonactivated spines, while in the activated spines CaMKII may promote structural synaptic changes (Okuno et al. 2012). This is known as “inverse synaptic tagging” a mechanism underlying a persistent form of synaptic plasticity, known as synaptic scaling. This mechanism operates as a specific sensor for the inactive synapse-specific control of AMPA-R clearance at weaker synapses in plastic neurons, based on a local history of both activity and inactivity (Okuno et al. 2012). This is very significant evidence that contributes to a clear understanding of the mechanisms underlying synaptic tagging and the role of *Arc* in the stabilization of synaptic plasticity.

Regarding the possible role of Arc in remodeling the actin cytoskeleton of the spine, of particular interest is that Arc protein has high homology to alpha-spectrin, and it copurifies with F-actin (Steward and Worley 2001; Husi et al. 2000), both of which are important cytoskeletal proteins, which initially suggests a role in structural synaptic plasticity. In fact, Arc has clearly been implicated in remodeling the actin cytoskeleton in dendritic spines (Shepherd and Bear 2011). Thus, we can postulate that Arc expression may simultaneously reduce synaptic efficacy through AMPA receptor endocytosis, while increasing structural plasticity by favoring spine-type morphogenesis (Peebles et al. 2010).

Evidence has shown that LTP in the dentate gyrus is associated with a long-lasting increase in spine F-actin content, an increase in synapse diameter, and enhanced cofilin phosphorylation (Fukazawa et al. 2003), which promotes actin polymerization. Reversal of LTP after infusion of Arc antisense 2 h after high-frequency stimulation correlated with dephosphorylation of hyperphosphorylated cofilin and a loss of F-actin; however, Arc antisense infusion did not reverse LTP when the F-actin-stabilizing drug, jasplakinolide was present (Messaoudi et al. 2007).

Possible interactions of Arc with other actin-regulating proteins were investigated, and it was found that in neurons, Arc binds directly to Wave3, an actin-nucleating factor (Peebles 2009). Furthermore, it was demonstrated that reducing the expression of Wave3 leads to a decrease in dendritic length, a reduction in spine density, and an increase in the number of filopodia. The expression of Arc partially reversed these morphological effects supporting the idea that the opposing actions of Arc and Wave 3 interact to regulate synapse morphology. Together, these results suggest that Arc synthesis promotes F-actin polymerization and spine remodeling, although the details of the mechanism are still unknown.

As we previously noted, the transcription factor CREB regulates a variety of genes whose protein products control synaptic function, but the actual targets of CREB that participate in synaptic plasticity have not yet been fully identified. However, it has been recently demonstrated that expression of BDNF, a trophic factor known to be important for synaptic plasticity, is mediated by a CREB-family transcription factor-dependent mechanism (Tao et al. 1998). The neurotrophin family is a group of regulatory factors involved in cell development, survival, and repair, but one of the most interesting features of these proteins is their role in neural plasticity. The neurotrophin family includes nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophins 3 and 4 (NT3, NT4), and two other members were found in fish, NT6 and NT7 (McAllister 2002). Each neurotrophin has been shown to promote neurite outgrowth by responsive neurons in either *in vitro* or *in vivo* studies (Frade et al. 1999). BDNF is known to regulate the development of connections (Horch 2004) and the complexity and size of dendrites (McAllister et al. 1995) in the cerebral cortex. The involvement of BDNF in synaptic plasticity has long been suspected, and it is known to regulate glutamatergic activity by increasing NMDA receptor phosphorylation (Slack et al. 2004). During development BDNF regulates neuronal proliferation, neuronal migration, axon path finding, dendritic growth, synapse formation, and maintenance of the synaptic contact (Thomas and Davies 2005). Interestingly, BDNF can be another central player in learning-induced

structural plasticity, particularly since it is involved in spatial memory formation (Mizuno et al. 2000). Animals subjected to Morris Water maze training showed increased expression in the hippocampus of the mRNAs for BDNF (Mizuno et al. 2000; Kesslak et al. 1998) and also for its receptor TrkB (Gomez-Pinilla et al. 2001); this expression was observed only after a few days of training, but not before (Kesslak et al. 1998). This interesting result resembles our previous observations (Ramirez-Amaya et al. 1999, 2001) that when animals were overtrained for 4–5 days in the Morris water maze task, the number of mossy fiber buttons in the stratum oriens of the CA3 hippocampal region increased (Ramirez-Amaya et al. 2001). The striking similarity between BDNF expression after water maze training and our observation regarding mossy fiber sprouting suggests that BDNF is a component of the molecular mechanism that underlies spatial learning-induced structural plasticity in the hippocampus. Additional evidence for this is the demonstration that blockade of BDNF mRNA or its protein product (Mu et al. 1999) produced spatial memory impairments (Mizuno et al. 2000).

The properties of BDNF make it a prominent regulator of persistent forms of synaptic plasticity. However, BDNF does not act alone, but instead interacts with other molecules that we have reviewed above. For example, it has been observed that BDNF induces the synthesis of Arc in synaptoneurosome (Yin et al. 2002); also, BDNF induction of LTP depends on Arc protein translation (Bramham and Messaoudi 2005), suggesting an important role of Arc in BDNF-induced synaptic plasticity. An interaction between BDNF and CaMKII has also been observed. In cultured neurons using a GFP reporter of CaMKII, BDNF induces the translation of CaMKII in dendritic spines (Aakalu et al. 2001). With this data in hand, Braham and Messaoudi (Bramham and Messaoudi 2005) suggested that CaMKII, Arc, and BDNF may interact in dendrites to mediate long-term synaptic plasticity. They have even proposed that Arc should persist in some way in order to consolidate its plastic effect on dendrites. Here, we have presented evidence indicating that Arc may perform this function in two different ways: first, by the offline reactivation of Arc expression in an apparently progressively smaller ensemble of neurons, and second, by the sustained transcription of Arc that apparently occurs only in the hippocampal dentate gyrus. Both mechanisms may interact with CaMKII, Ca^{2+} influx, and other events triggered by NMDA receptor activation.

7 Conclusion

After stimulation, the activity evoked in the neural network may become reverberatory, and this will lead to activity-dependent synaptic plasticity of the participating units that will form a “neural ensemble”. According to the current theory, this is the main mechanism through which the neural network processes and stores information, resulting in what we call memory. Synaptic plasticity is a mechanism that is enabled in the physiological neural network; prominent examples are LTP and LTD, but more persistent types of plasticity such as

homeostatic plasticity and structural synaptic changes may underlie long-term memory. These persistent types of synaptic plasticity may require particular behavioral and environmental conditions. Structural synaptic changes observed after robust behavioral experience may be related to long-term memory, but also possibly to functional improvement of the neural network.

The concept of a population code is supported by measurements of multiple, single-unit recordings that can be analyzed in a way that allows us to predict the behavioral output of the animal by simply analyzing the electrophysiological signal, and the bigger the size of the ensemble, the more reliable the prediction. Moreover, when detecting the activity of neurons using IEG staining methods, it is observed that the neuronal populations that are recruited for information processing leading to memory storage, are the same as those later recruited by the same or similar stimuli. This indicates clearly that neuronal populations are the ones that encode and store information.

The notion of sparse coding implies that for efficient memory storage and retrieval, the neural network must use a small group of neurons that will ultimately undergo synaptic changes, suggesting that the cellular mechanisms that lead to persistent forms of synaptic plasticity may occur in a subset of the originally activated cells, because the initial recruitment is too large, particularly in regions such as the neocortex and CA regions in the hippocampus; the networks in these areas may select the plastic neurons through the synergic action of different signal transduction pathways working together during offline reactivation periods.

In other regions such as the hippocampal DG, the network initially recruits a sparse number of neurons, but those selected are more likely to achieve synaptic plasticity, since the transcription of some genes, such as *Arc*, is maintained for a prolonged period of time. It is not yet clear how many neurons ultimately undergo synaptic plasticity and become responsible for reproducing the acquired patterns of activity after long intervals, but it is possible that the system uses a sparse code for long-term memory to achieve efficient storage and retrieval. Accurate methods to count these units are required.

The different temporal fates of memory depend on the persistence of the synaptic changes. This idea assumes that short- and long-term memory share similar principles, but the mechanisms that lead to either transitory or persistent synaptic changes may differ. In both network systems, however, the persistent forms of synaptic plasticity might be driven by the synergic action of multiple signal transduction pathways that, in some networks cause molecular activity waves and in the others, sustain the activity of particular factors. Synaptic inputs that result from the reverberatory activity of the network trigger one or more of these neural transduction pathways that include NMDA, AMPA receptors that lack GluR2, metabotropic glutamate receptors, acetylcholine, and dopamine. These triggers synergistically give rise to and modulate different cellular events that culminate in a persistent form of synaptic plasticity.

Presynaptic glutamate release followed by depolarization of the postsynaptic neuron produces Ca^{2+} influx through voltage-dependent Ca^{2+} channels and NMDARs. Ca^{2+} signals are complex and fast, and they need to be translated into

graded and steady signals, such as the one provided by CaMKII. This remarkable Ca^{2+} signal transducer is a kinase that, through phosphorylation, regulates several proteins; among them, CaMKII directly regulates the stability of actin and other actin polymerization and depolymerization factors such as cofilin and profilin, inducing structural remodeling of the synapse. CaMKII also phosphorylates the AMPAR GluR1 subunit, increasing the number of functional AMPARs. Principally, CaMKII plays a central role in orchestrating the signals leading to synaptic plasticity, because it also regulates other signal transduction pathways, including the one associated with members of the Rho family of small GTPases and known to be involved in transcriptional regulation.

Other triggering signals leading to this pathway are dopamine D1 receptors (D1Rs), muscarinic acetylcholine receptors (M2R and M4R), and β -adrenergic receptors (β Rs). These receptors induce adenylate cyclase activity. The cyclic AMP produced by adenylyl cyclase activates protein kinase A (PKA), which subsequently phosphorylates Rap GTPases. On the other hand, muscarinic acetylcholine receptors M1 and M3 are coupled to the Gq protein, which activates phospholipase C (PLC) and promotes the formation of IP3 and DAG. IP3 triggers Ca^{2+} release from intracellular stores, and both Ca^{2+} and DAG activate protein kinase C. Once activated, PKC can activate Raf kinases, which are also members of the MAPK pathway.

We can see here that all these signal transduction pathways converge in the small GTPase pathway that includes Rap-1 or Ras which, in turn, induces Raf phosphorylation. The Raf isoforms then phosphorylate MEK1/2, which subsequently phosphorylates the mitogen-activated protein kinase 2–3, also known as ERK1/2. Phosphorylated ERK1 and ERK2 are released from MEK1/2 and either dimerize with a second ERK molecule or remain monomeric. Interestingly, in the cytoplasm this pathway also modulates protein translation and protein trafficking to the membrane. Also both forms of ERK1 and ERK2 can probably enter the nucleus, where they are important regulators of gene transcription. Another, indirect nuclear ERK1/2-target is CREB, which is phosphorylated by the ERK1/2 substrates RSK2 and MSK1. Phosphorylation of CREB at Ser133 promotes the recruitment of the coactivator CBP and initiates the transcription of target genes.

At the transcriptional level, the molecular events are no less complex. There are several activity-regulated genes that encode other transcription factors which, in turn, promote the transcription of plasticity-related genes, such as BDNF, glutamate receptors, and many other activity-regulated genes including Arc and Homer 1a which encode effector proteins that have specific roles in dendritic function or coordinate activity-dependent synaptic plasticity. Because this gene expression program is the molecular basis of the mechanisms underlying learning and memory, the signaling pathways that link the triggers, e.g., calcium influx, with the regulation of transcription, need to be extensively investigated in order to accomplish a detailed characterization of the cellular and molecular events that lead to long-term memory. Exquisitely detailed molecular modeling will be required to understand how these complex events are orchestrated and ultimately, to identify the molecular principles that shape the biological neural network.

References

- Aakalu G, Smith WB, Nguyen N, Jiang C, Schuman EM (2001) Dynamic visualization of local protein synthesis in hippocampal neurons. *Neuron* 30(2):489–502. doi:[10.1016/S0896-6273\(01\)00295-1](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00295-1)
- Abbott LF, Nelson SB (2000) Synaptic plasticity: taming the beast. *Nat Neurosci Suppl* 3:1178–1183
- Abraham WC, Williams JM (2003) Properties and mechanisms of LTP maintenance. *Neuroscientist* 9(6):463–474. doi:[10.1177/1073858403259119](https://doi.org/10.1177/1073858403259119)
- Abraham WC, Williams JM (2008) LTP maintenance and its protein synthesis-dependence. *Neurobiol Learn Mem* 89(3):260–268
- Abraham WC, Dragunow M, Tate WP (1991) The role of immediate early genes in the stabilization of long-term potentiation. *Mol Neurobiol* 5(2–4):297–314. doi:[10.1007/BF02935553](https://doi.org/10.1007/BF02935553)
- Adesnik H, Li G, During MJ, Pleasure SJ, Nicoll RA (2008) NMDA receptors inhibit synapse unsilencing during brain development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:5597–5602. doi:[10.1073/pnas.0800946105](https://doi.org/10.1073/pnas.0800946105)
- Akashi K, Kakizaki T, Kamiya H et al (2009) NMDA receptor GluN2B (GluR epsilon 2/NR2B) subunit is crucial for channel function, postsynaptic macromolecular organization, and actin cytoskeleton at hippocampal CA3 synapses. *J Neurosci* 29:10869–10882. doi:[10.1523/JNEUROSCI.5531-08.2009](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5531-08.2009)
- Allison D, Chervin A, Gelfand V, Craig A (2000) Postsynaptic scaffolds of excitatory and inhibitory synapses in hippocampal neurons: Maintenance of core components independent of actin filaments and microtubules. *J Neurosci* 20(4545):4554
- Alme CB, Buzzetti RA, Marrone DF et al (2010) Hippocampal granule cells opt for early retirement. *Hippocampus* 20(10):1109–1123. doi:[10.1002/hipo.20810](https://doi.org/10.1002/hipo.20810)
- Alvarez VA, Ridenour DA, Sabatini BL (2007) Distinct structural and ionotropic roles of NMDA receptors in controlling spine and synapse stability. *J Neurosci* 27:7365–7376. doi:[10.1523/JNEUROSCI.0956-07.2007](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0956-07.2007)
- Amemori K, Gibb LG, Graybiel AM (2011) Shifting responsibly: the importance of striatal modularity to reinforcement learning in uncertain environments. *Front Hum Neurosci* 5:47. doi:[10.3389/fnhum.2011.00047](https://doi.org/10.3389/fnhum.2011.00047)
- Andrasfalvy BK, Magee JC (2001) Distance-dependent increase in AMPA receptor number in the dendrites of adult hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* 21(23):9151–9159
- Angulo A, Chawla MK, Rosi S, Barnes CA, Ramírez-Amaya V (2009) Effect of actinomycin D on the sustained transcription of Arc in the rat hippocampal granule cells. *SFN 2009*
- Bailey CH, Kandel ER (1993) Structural changes accompanying memory storage. *Annu Rev Physiol* 55:397–426. doi:[10.1146/annurev.ph.55.030193.002145](https://doi.org/10.1146/annurev.ph.55.030193.002145)
- Bailey CH, Kandel ER (2008) Synaptic remodeling, synaptic growth and the storage of long-term memory in Aplysia. *Prog Brain Res* 169:179–198. [http://dx.doi.org/10.1016/S0079-6123\(07\)00010-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0079-6123(07)00010-6)
- Barak O, Tsodyks M, Romo R (2010) Neuronal population coding of parametric working memory. Neuronal population coding of parametric working memory. *J Neurosci* 30(28):9424–9430. doi:[10.1523/JNEUROSCI.1875-10.2010](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1875-10.2010)
- Barco A, Ganic D, Kandel ER (2007) Chapter 7 CREB-dependent transcription and synaptic plasticity. Springer, Heidelberg
- Barkai E (2005) Dynamics of learning-induced cellular modifications in the cortex. *Biol Cybern* 92(6):360–366. doi:[10.1007/s00422-005-0564-0](https://doi.org/10.1007/s00422-005-0564-0)
- Barlow HB (1972) Single units and sensation: a neuron doctrine for perceptual psychology? *Perception* 1(4):371–394
- Bayer KU, De Koninck P, Leonard AS, Hell JW, Schulman H (2001) Interaction with the NMDA receptor locks CaMKII in an active conformation. *Nature* 411:801–805. doi:[10.1038/35081080](https://doi.org/10.1038/35081080)

- Bayer KU, LeBel E, McDonald GL, O'Leary H, Schulman H, De Koninck P (2006) Transition from reversible to persistent binding of CaMKII to postsynaptic sites and NR2B. *J Neurosci* 26(4):1164–1174. doi:[10.1523/JNEUROSCI.3116-05.2006](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3116-05.2006)
- Becker CG, Artola A, Gerardy-Schahn R, Becker T, Welzl H, Schachner M (1996) The polysialic acid modification of the neural cell adhesion molecule is involved in spatial learning and hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci Res* 45(2):143–152. doi:[10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19960715\)45:2<143::AID-JNR6>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19960715)45:2<143::AID-JNR6>3.0.CO;2-A)
- Bliss T, Lømo T (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232(2):331–356
- Bramham CR, Messaoudi E (2005) BDNF function in adult synaptic plasticity: the synaptic consolidation hypothesis. *Prog Neurobiol* 76(2):99–125
- Brami-Cherrier K, Lavaur J, Pages C, Arthur JS, Caboche J (2007) Glutamate induces histone H3 phosphorylation but not acetylation in striatal neurons: role of mitogen- and stress-activated kinase-1. *J Neurochem* 101:697–708
- Brami-Cherrier K, Roze E, Girault JA, Betuing S, Caboche J (2009) Role of the ERK/MSK1 signaling pathway in chromatin remodelling and brain responses to drugs of abuse. *J Neurochem*. doi:[10.1111/j.1471-4159.2009.05879.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.05879.x)
- Brown KM, Calixto E, Card JP, Galván EJ, Perez-Rosello T, Barrionuevo G (2009) Quantitative morphometry of electrophysiologically identified CA3b interneurons reveals robust local geometry and distinct cell classes. *J Comp Neurol* 515(6):677–695. doi:[10.1002/cne.22082](https://doi.org/10.1002/cne.22082)
- Buard I, Coultrap SJ, Freund RK, Lee YS, Dell'Acqua ML, Silva AJ et al (2010) CaMKII 'autonomy' is required for initiating but not for maintaining neuronal long-term information storage. *J Neurosci* 30:8214–8220. doi:[10.1523/JNEUROSCI.1469-10.2010](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1469-10.2010)
- Cammarota M, Bevilacqua LR, Viola H, Kerr DS, Reichmann B, Teixeira V, Bulla M, Izquierdo I, Medina JH (2002) Participation of CaMKII in neuronal plasticity and memory formation. *Cell Mol Neurobiol* 22(3):259–267. doi:[10.1023/A:1020763716886](https://doi.org/10.1023/A:1020763716886)
- Carasatorre M, Ochoa A, Leon U, Diaz-Cintra SY, Ramírez Amaya V (2011) Hippocampal mossy fiber synaptogenesis induced by spatial overtraining, improves spatial information processing. Neuroscience Meeting Planner. Society for Neuroscience, Washington, DC
- Carr MF, Jadhav SP, Frank LM (2011) Hippocampal replay in the awake state: a potential substrate for memory consolidation and retrieval. *Nat Neurosci* 14(2):147–153. doi:[10.1038/nn.2732](https://doi.org/10.1038/nn.2732)
- Casadio A, Martin KC, Giustetto M, Zhu H, Chen M, Bartsch D, Bailey CH, Kandel ER (1999) A transient, neuron-wide form of CREB-mediated long-term facilitation can be stabilized at specific synapses by local protein synthesis. *Cell* 99:221–237. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81653-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81653-0)
- Cazorla M, Shegda M, Ramesh B, Harrison NL, Kellendonk C (2012) Striatal d2 receptors regulate dendritic morphology of medium spiny neurons via Kir2 channels. *J Neurosci* 32(7):2398–2409. doi:[10.1523/JNEUROSCI.6056-11.2012](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6056-11.2012)
- Chandramohan Y, Droste SK, Arthur JS, Reul JM (2008) The forced swimming induced behavioural immobility response involves histone H3 phosphoacetylation and c-Fos induction in dentate gyrus granule neurons via activation of the N-methyl-D-aspartate/extracellular signal-regulated kinase/mitogen- and stress-activated kinase signalling pathway. *Eur J Neurosci* 27:2701–2713. doi:[10.1111/j.1460-9568.2008.06230.x](https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06230.x)
- Chang S, De Camilli P (2001) Glutamate regulates actin-based motility in axonal filopodia. *Nat Neurosci* 4:787–793. doi:[10.1038/90489](https://doi.org/10.1038/90489)
- Chawla S, Hardingham GE, Quinn GR, Bading H (1998) CBP: a signal-regulated transcriptional coactivator controlled by nuclear calcium and CaM kinase IV. *Science* 281:1505–1509. doi:[10.1126/science.281.5382.1505](https://doi.org/10.1126/science.281.5382.1505)
- Chawla MK, Guzowski JF, Ramirez-Amaya V et al (2005) Sparse, environmentally selective expression of Arc RNA in the upper blade of the rodent fascia dentata by brief spatial experience. *Hippocampus* 15(5):579–586. doi:[10.1002/hipo.20091](https://doi.org/10.1002/hipo.20091)
- Chen G, Wang LP, Tsien JZ (2009) Neural population-level memory traces in the mouse hippocampus. *PLoS ONE* 4(12):e8256. doi:[10.1371/journal.pone.0008256](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008256)

- Chowdhury S, Shepherd JD, Okuno H et al (2006) Arc/Arg3.1 interacts with the endocytic machinery to regulate AMPA receptor trafficking. *Neuron* 52:445–459. doi:[10.1016/j.neuron.2006.08.033](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.08.033)
- Cingolani LA, Goda Y (2008) Actin in action: the interplay between the actin cytoskeleton and synaptic efficacy. *Nat Rev Neurosci* 9:344–356. doi:[10.1038/nrn2373](https://doi.org/10.1038/nrn2373)
- Cohen S, Greenberg ME (2008) Communication between the synapse and the nucleus in neuronal development, plasticity, and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 24:183–209. doi:[10.1146/annurev.cellbio.24.110707.175235](https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.24.110707.175235)
- Crump FT, Dillman KS, Craig AM (2001) cAMP-dependent protein kinase mediates activity-regulated synaptic targeting of NMDA receptors. *J Neurosci* 21:5079–5088
- Cull-Candy SG, Leszkiewicz DN (2004) Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Sci STKE* 255:re16. doi: [10.1126/stke.2552004re16](https://doi.org/10.1126/stke.2552004re16)
- Dailey ME, Smith SJ (1996) The dynamics of dendritic structure in developing hippocampal slices. *J Neurosci* 16:2983–2994
- Davidson TJ, Kloosterman F, Wilson MA (2009) Hippocampal replay of extended experience. *Neuron* 63(4):497–507. doi:[10.1016/j.neuron.2009.07.027](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.07.027)
- Davis S, Vanhoutte P, Pages C, Caboche J, Laroche S (2000) The MAPK/ERK cascade targets both Elk-1 and cAMP response element-binding protein to control long-term potentiation-dependent gene expression in the dentate gyrus in vivo. *J Neurosci* 20:4563–4572
- Daw NW, Stein PS, Fox K (1993) The role of NMDA receptors in information processing. *Annu Rev Neurosci* 16:207–222. doi:[10.1146/annurev.ne.16.030193.001231](https://doi.org/10.1146/annurev.ne.16.030193.001231)
- DeKoninck P, Schulman H (1998) Sensitivity of CaMkinase II to the frequency of Ca²⁺ oscillations. *Science* 279:227–230
- Derkach V, Barria A, Soderling TR (1999) Ca²⁺/calmodulin-kinase II enhances channel conductance of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate type glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:3269–3274. doi:[10.1073/pnas.96.6.3269](https://doi.org/10.1073/pnas.96.6.3269)
- Derkach VA, Oh MC, Guire ES, Soderling TR (2007) Regulatory mechanisms of AMPA receptors in synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 8:101–113. doi:[10.1038/nrn2055](https://doi.org/10.1038/nrn2055)
- Desmond NL, Levy WB (1983) Synaptic correlates of associative potentiation/depression: an ultrastructural study in the hippocampus. *Brain Res* 265(1):21–30
- Dillon C, Goda Y (2005) The actin cytoskeleton: integrating form and function at the synapse. *Annu Rev Neurosci* 28:25–555. doi:[10.1146/annurev.neuro.28.061604.135757](https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.28.061604.135757)
- Dinev D, Jordan BW, Neufeld B, Lee JD, Lindemann D, Rapp UR, Ludwig S (2001) Extracellular signal regulated kinase 5 (ERK5) is required for the differentiation of muscle cells. *EMBO Rep* 2:829–834. doi:[10.1093/embo-reports/kve177](https://doi.org/10.1093/embo-reports/kve177)
- Dong M, Wu Y, Fan Y, Xu M, Zhang J (2006) c-fos modulates brain-derived neurotrophic factor mRNA expression in mouse hippocampal CA3 and dentate gyrus neurons. *Neurosci Lett* 400(1–2):177–180. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2006.02.063>
- Dragunow M, Yamada N, Bilkey DK, Lawlor P (1992) Induction of immediate-early gene proteins in dentate granule cells and somatostatin interneurons after hippocampal seizures. *Brain Res Mol Brain Res* 13(1–2):119–126. [http://dx.doi.org/10.1016/0169-328X\(92\)90051-C](http://dx.doi.org/10.1016/0169-328X(92)90051-C)
- Dudai Y (2002) Molecular bases of long-term memories: a question of persistence. *Curr Opin Neurobiol* 12(2):211–216
- Engert F, Bonhoeffer T (1999) Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature* 399(6731):66–70. doi:[10.1038/19978](https://doi.org/10.1038/19978)
- Epsztein J, Represa A, Jorquera I, Ben-Ari Y, Crepel V (2005) Recurrent mossy fibers establish aberrant kainate receptor-operated synapses on granule cells from epileptic rats. *J Neurosci* 25(36):8229–8239. doi:[10.1523/JNEUROSCI.1469-05.2005](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1469-05.2005)
- Escobar ML, Barea-Rodriguez EJ, Derrick BE, Reyes JA, Martinez JL Jr (1997) Opioid receptor modulation of mossy fiber synaptogenesis: independence from long-term potentiation. *Brain Res* 751(2):330–335. [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-8993\(96\)01373-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-8993(96)01373-X)
- Ferreira G, Gutierrez R, De La Cruz V, Bermudez-Rattoni F (2002) Differential involvement of cortical muscarinic and NMDA receptors in short- and long-term taste aversion memory. *Eur J Neurosci* 16(6):1139–1145. doi:[10.1046/j.1460-9568.2002.02174.x](https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02174.x)

- Fink CC, Bayer KU, Myers JW, Ferrell JE Jr, Schulman H, Meyer T (2003) Selective regulation of neurite extension and synapse formation by the beta but not the alpha isoform of CaMKII. *Neuron* 39:283–297
- Finne J, Finne U, Deagostini-Bazin H, Goridis C (1983) Occurrence of alpha 2–8 linked polysialosyl units in a neural cell adhesion molecule. *Biochem Biophys Res Commun* 112(2):482–487
- Fischer M, Kaech S, Wagner U, Brinkhaus H, Matus A (2000) Glutamate receptors regulate actin-based plasticity in dendritic spines. *Nat Neurosci* 3:887–894. doi:10.1038/78791
- Frade JM, Bovolenta P, Rodriguez-Tebar A (1999) Neurotrophins and other growth factors in the generation of retinal neurons. *Microsc Res Tech* 45(4–5):243–251
- Frankland P, O'Brien C, Ohno M, Kirkwood A, Silva A (2001) Alpha-CaMKII-dependent plasticity in the cortex is required for permanent memory. *Nature* 411:309–313. doi:10.1038/35077089
- Fukazawa Y, Saitoh Y, Ozawa F et al (2003) Hippocampal LTP is accompanied by enhanced F-actin content within the dendritic spine that is essential for late LTP maintenance in vivo. *Neuron* 38:447–460. doi:10.1016/S0896-6273(03)00206-X
- Gambrill AC, Barria A (2011) NMDA receptor subunit composition controls synaptogenesis and synapse stabilization. *PNAS*. doi:10.1073/pnas.1012676108
- Gardoni F, Caputi A, Cimino M, Pastorino L, Cattabeni F, Di Luca M (1998) Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II is associated with NR2A/B subunits of NMDA receptor in postsynaptic densities. *J Neurochem* 71:1733–1741. doi:10.1046/j.1471-4159.1998.71041733.x
- Geinisman Y, deToledo-Morrell L, Morrell F, Persina IS, Rossi M (1992) Structural synaptic plasticity associated with the induction of long-term potentiation is preserved in the dentate gyrus of aged rats. *Hippocampus* 2(4):445–456. doi:10.1002/hipo.450020412
- Georgopoulos AP, Schwartz AB, Kettner RE (1986) Neuronal population coding of movement direction. *Science* 233(4771):1416–1419. doi:10.1126/science.3749885
- Giese KP, Fedorov NB, Filipkowski RK, Silva AJ (1998) Autophosphorylation at Thr286 of the alpha-Calcium-calmodulin kinase II in LTP and learning. *Science* 279:870–873
- Gilbert CD, Sigman M (2007) Brain states: top-down influences in sensory processing. *Neuron* 54(5):677–696. doi:10.1016/j.neuron.2007.05.019
- Gilbert CD, Sigman M, Crist RE (2001) The neural basis of perceptual learning. *Neuron* 31(5):681–697. doi:10.1016/S0896-6273(01)00424-X
- Gille H, Kortenjann M, Thomae O, Moomaw C, Slaughter C, Cobb MH, Shaw PE (1995) ERK phosphorylation potentiates Elk-1-mediated ternary complex formation and transactivation. *EMBO J* 14(1995):951–962
- Gomez-Pinilla F, So V, Kesslak JP (2001) Spatial learning induces neurotrophin receptor and synapsin I in the hippocampus. *Brain Res* 904(1):13–19. [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)02394-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-8993(01)02394-0)
- Greenough WT, Anderson BJ (1991) Cerebellar synaptic plasticity. Relation to learning versus neural activity. *Ann N Y Acad Sci* 627:231–247. doi:10.1111/j.1749-6632.1991.tb25927.x
- Groc L, Bard L, Choquet D (2009) Surface trafficking of N-methyl-D-aspartate receptors: physiological and pathological perspectives. *Neuroscience* 158(1):4–18. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.05.029>
- Guzowski JF, McNaughton BL, Barnes CA, Worley PF (1999) Environment-specific expression of the immediate-early gene Arc in hippocampal neuronal ensembles. *Nat Neurosci* 2(12):1120–1124
- Guzowski JF, Lyford GL, Stevenson GD, Houston FP, McGaugh JL, Worley PF, Barnes CA (2000) Inhibition of activity-dependent arc protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory. *J Neurosci* 20(11):3993–4001
- Guzowski JF, Miyashita T, Chawla MK, Sanderson J, Maes LI, Houston FP, Lipa P, McNaughton BL, Worley PF, Barnes CA (2006) Recent behavioral history modifies coupling between cell

- activity and Arc gene transcription in hippocampal CA1 neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(4):1077–1082
- Hardingham GE, Chawla S, Johnson CM, Bading H (1997) Distinct functions of nuclear and cytoplasmic calcium in the control of gene expression. *Nature* 385:260–265. doi:[10.1038/385260a0](https://doi.org/10.1038/385260a0)
- Harvey CD, Yasuda R, Zhong H, Svoboda K (2008) The spread of Ras activity triggered by activation of a single dendritic spine. *Science* 321:136–140. doi:[10.1126/science.1159675](https://doi.org/10.1126/science.1159675)
- Hayashi Y, Shi HH, Esteban JA, Piccini A, Poncer JC, Malinow R (2000) Driving AMPA receptors into synapses by LTP and CaMKII: requirement for GluR1 and PDZ domain interaction. *Science* 287:2262–2267. doi:[10.1126/science.287.5461.2262](https://doi.org/10.1126/science.287.5461.2262)
- Hebb DO (1949) *The organization of behavior; a neuropsychological theory*. Wiley, New York (reprinted by Lawrence Erlbaum Associates, 2002)
- Hohmann CF (2003) A morphogenetic role for acetylcholine in mouse cerebral neocortex. *Neurosci Biobehav Rev* 27(4):351–363. [http://dx.doi.org/10.1016/S0149-7634\(03\)00066-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0149-7634(03)00066-6)
- Holtmaat A, Wilbrecht L, Knott GW, Welker E, Svoboda K (2006) Experience dependent and cell-type-specific spine growth in the neocortex. *Nature* 441:979–983. doi:[10.1038/nature04783](https://doi.org/10.1038/nature04783)
- Holtmaat A, De Paola V, Wilbrecht L, Knott GW (2008) Imaging of experience-dependent structural plasticity in the mouse neocortex in vivo. *Behav Brain Res* 192(1):20–25. Epub 2008 Apr 18. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2008.04.005>
- Hopfield JJ (1982) Neural Networks and physical systems with emergent collective computational properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:3088–3092
- Horch HW (2004) Local effects of BDNF on dendritic growth. *Rev Neurosci* 15(2):117–129
- Hotulainen P, Hoogenraad CC (2010) Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function. *J Cell Biol* 189:619–629. doi:[10.1083/jcb.201003008](https://doi.org/10.1083/jcb.201003008)
- Huang L, Pallas SL (2001) NMDA antagonists in the superior colliculus prevent developmental plasticity but not visual transmission or map compression. *J Neurophysiol* 86:1179–1194
- Huang F, Chotiner JK, Steward O (2007) Actin polymerization and ERK phosphorylation are required for Arc/Arg3.1 mRNA targeting to activated synaptic sites on dendrites. *J Neurosci* 27:9054–9067. doi:[10.1523/JNEUROSCI.2410-07.2007](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2410-07.2007)
- Hubel DH, Wiesel TN (1959) Receptive fields of single neurones in the cat's striate cortex. *J Physiol* 148:574–591
- Hubel DH, Wiesel TN (1962) Receptive fields, binocular interaction and functional architecture in the cat's visual cortex. *J Physiol* 160:106–154
- Husi H, Ward MA, Choudhary JS, Blackstock WP, Grant SG (2000) Proteomic analysis of NMDA receptor–adhesion protein signaling complexes. *Nat Neurosci* 3:661–669. doi:[10.1038/76615](https://doi.org/10.1038/76615)
- Hvalby O, Hemmings HC Jr, Paulsen O, Czernik AJ et al (1994) Specificity of protein kinase inhibitor peptides and induction of long-term potentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:4761–4765
- Imai H, Matsukawa M, Okado N (2004) Lamina-selective changes in the density of synapses following perturbation of monoamines and acetylcholine in the rat medial prefrontal cortex. *Brain Res* 1012:138–145. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2004.03.039>
- Impey S, Obrietan K, Wong ST, Poser S, Yano S, Wayman G, Deloulme JC, Chan G, Storm DR (1998) Cross talk between ERK and PKA is required for Ca²⁺ stimulation of CREB-dependent transcription and ERK nuclear translocation. *Neuron* 21:869–883. doi:[10.1016/S0896-6273\(00\)80602-9](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80602-9)
- Ishii T, Moriyoshi K, Sugihara H et al (1993) Molecular characterization of the family of the N-methyl-D-aspartate receptor subunits. *J Biol Chem* 268:2836–2843
- Ismail N, Robinson GE, Fahrbach SE (2006) Stimulation of muscarinic receptors mimics experience-dependent plasticity in the honey bee brain. *PNAS* 103(1):207–211. doi:[10.1073/pnas.0508318102](https://doi.org/10.1073/pnas.0508318102)

- Ito I, Hidaka H, Sugiyama H (1991) Effects of KN-62, a specific inhibitor of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, on long-term potentiation in the rat hippocampus. *Neurosci Lett*.121:119–121. [http://dx.doi.org/10.1016/0304-3940\(91\)90663-E](http://dx.doi.org/10.1016/0304-3940(91)90663-E)
- Izquierdo I, Medina JH, Vianna MR, Izquierdo LA, Barros DM (1999) Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behav Brain Res* 103(1):1–11. [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-4328\(99\)00036-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-4328(99)00036-4)
- Jacobs J, Lega B, Anderson C (2012) Explaining how brain stimulation can evoke memories. *J Cogn Neurosci* 24(3):553–563. doi:10.1162/jocn_a_00170
- Jeffery KJ (2007) Integration of the sensory inputs to place cells: what, where, why, and how? *Hippocampus* 17(9):775–785
- Jourdain P, Fukunaga K, Muller D (2003) Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II contributes to activity-dependent filopodia growth and spine formation. *J Neurosci* 23(33):10645
- Karlsson MP, Frank LM (2009) Awake replay of remote experiences in the hippocampus. *Nat Neurosci* 12(7):913–918. doi:10.1038/nn.2344
- Kelly MP, Deadwyler SA (2003) Experience-dependent regulation of the immediate-early gene arc differs across brain regions. *J Neurosci* 23(16):6443–6451
- Kennedy MJ, Ehlers MD (2006) Organelles and trafficking machinery for postsynaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 29:325–362. doi:10.1146/annurev.neuro.29.051605.112808
- Kentros CG, Agnihotri NT, Streater S, Hawkins RD, Kandel ER (2004) Increased attention to spatial context increases both place field stability and spatial memory. *Neuron* 42(2):283–295. doi:10.1016/S0896-6273(04)00192-8
- Kerchner GA, Nicoll RA (2008) Silent synapses and the emergence of a postsynaptic mechanism for LTP. *Nat Rev*. doi:10.1038/nrn2595
- Kesslak JP, So V, Choi J, Cotman CW, Gomez-Pinilla F (1998) Learning upregulates brain-derived neurotrophic factor messenger ribonucleic acid: a mechanism to facilitate encoding and circuit maintenance? *Behav Neurosci* 112(4):1012–1019
- Kettner RE, Schwartz AB, Georgopoulos AP (1988) Primate motor cortex and free arm movements to visual targets in three-dimensional space. III. Positional gradients and population coding of movement direction from various movement origins. *J Neurosci* 8(8):2938–2947
- Kim MJ, Dunah AW, Wang YT, Sheng M (2005) Differential roles of NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors in Ras-ERK signaling and AMPA receptor trafficking. *Neuron* 46:745–760. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2005.04.031>
- Kornhauser JM, Cowan CW, Shaywitz AJ, Dolmetsch RE, Griffith EC, Hu LS, Haddad C, Xia Z, Greenberg ME (2002) CREB transcriptional activity in neurons is regulated by multiple, calcium-specific phosphorylation events. *Neuron* 34:221–233. doi:10.1016/S0896-6273(02)00655-4
- Lan JY, Skeberdis VA, Jover T, Zheng X, Bennett MVL, Zukin RS (2001) Activation of metabotropic glutamate receptor accelerates NMDA receptor trafficking. *J Neurosci* 21:6058–6068
- Lanahan A, Worley P (1998) Immediate-early genes and synaptic function. *Neurobiol Learn Mem* 70(1–2):37–43. <http://dx.doi.org/10.1006/nlme.1998.3836>
- Lang C, Barco A, Zablow L, Kandel ER, Siegelbaum SA, Zakharenko SS (2004) Transient expansion of synaptically connected dendritic spines upon induction of hippocampal long-term potentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:16665–16670. doi:10.1073/pnas.0407581101
- Lansner A (2009) Associative memory models: from the cell-assembly theory to biophysically detailed cortex simulations. *Trends Neurosci* 32(3):178–186. doi:10.1016/j.tins.2008.12.002
- Lansner A, Fransén E (1992) Modeling Hebbian cell assemblies comprised of cortical neurons. *Netw Comput Neural Syst* 3:105–119
- Lau CG, Zukin RS (2007) NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci* 8:413–426. doi:10.1038/nrn2153

- Lee S-JR, Escobedo-Lozoya Y, Szatmari EM, Yasuda R (2009) Activation of CaMKII in single dendritic spines during long-term potentiation. *Nature* 458:299–304
- Leitner S, Voigt C, Metzdorf R, Catchpole CK (2005) Immediate early gene (ZENK, Arc) expression in the auditory forebrain of female canaries varies in response to male song quality. *J Neurobiol* 64(3):275–284
- Lemus L, Hernández A, Luna R, Zainos A, Nácher V, Romo R (2007) Neural correlates of a postponed decision report. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(43):17174–17179. doi:[10.1073/pnas.0707961104](https://doi.org/10.1073/pnas.0707961104)
- Leuner B, Falduto J, Shors TJ (2003) Associative memory formation increases the observation of dendritic spines in the hippocampus. *J Neurosci* 23:659–665
- Link W, Konietzko U, Kauselmann G, Krug M, Schwanke B, Frey U, Kuhl D (1995) Somatodendritic expression of an immediate early gene is regulated by synaptic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:5734–5738
- Lisman JE, McIntyre CC (2001) Synaptic plasticity: a molecular memory switch. *Curr Biol* 11:R788–R791. [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00472-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00472-9)
- Lisman JE, Zhabotinsky AM (2001) A model of synaptic memory: a CaMKII/PP1 switch that potentiates transmission by organizing an AMPA-receptor anchoring assembly. *Neuron* 31:191–201. [http://dx.doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00364-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00364-6)
- Lisman J, Schulman H, Cline H (2002) The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioral memory. *Nat Rev Neurosci* 3:175–190. doi:[10.1038/nrn753](https://doi.org/10.1038/nrn753)
- Lledo PM, Hjelmstad GO, Mukherji S, Soderling TR, Malenka RC, Nicoll RA (1995) Calcium/calmodulin-dependent kinase II and long-term potentiation enhance synaptic transmission by the same mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:11175–11179
- Lømø T (1966) Frequency potentiation of excitatory synaptic activity in the dentate area of the hippocampal formation. *Acta Physiol Scand* 68(Suppl 277):128
- London M, Segev I (2001) Synaptic scaling in vitro and in vivo. *Nat Neurosci* 4:853–854
- Lonze BE, Ginty DD (2002) Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron* 35:605–623. doi:[10.1016/S0896-6273\(02\)00828-0](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00828-0)
- Lorente de Nó R (1933) Vestibulo-ocular reflex arc. *Arch Neurol Psychiatry Chicago* 30:245–291
- Lorente de Nó R (1938a) Analysis of the activity of the chains of internuncial neurons. *J Neurophysiol* 1:207–244
- Lorente de Nó R (1938b) Synaptic stimulation of motoneurons as a local process. *J Neurophysiol* 1:195–206
- Lüscher C, Xia HH, Beattie EC, Carroll RC, Von Zastrow M, Malenka RC, Nicoll RA (1999) Role of AMPA receptor cycling in synaptic transmission and plasticity. *Neuron* 24:649–658. doi:[10.1016/S0896-6273\(00\)81119-8](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)81119-8)
- Lüthi A, Schwyzler L, Mateos JM, Gähwiler BH, McKinney RA (2001) NMDA receptor activation limits the number of synaptic connections during hippocampal development. *Nat Neurosci* 11:1102–1107. doi:[10.1038/mn744](https://doi.org/10.1038/mn744)
- Lyford GL, Yamagata K, Kaufmann WE, Barnes CA, Sanders LK, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Lanahan AA, Worley PF (1995) Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. *Neuron* 14(2):433–445. doi:[10.1016/0896-6273\(95\)90299-6](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90299-6)
- Lynch MA (2004) Long-term potentiation and memory. *Physiol Rev* 84(1):87–136. doi:[10.1152/physrev.00014.2003](https://doi.org/10.1152/physrev.00014.2003)
- Lynch G, Baudry M (1987) Brain spectrin, calpain and long-term changes in synaptic efficacy. *Brain Res Bull* 18(6):809–815. [http://dx.doi.org/10.1016/0361-9230\(87\)90220-6](http://dx.doi.org/10.1016/0361-9230(87)90220-6)
- Lynch G, Muller D, Seubert P, Larson J (1988) Long-term potentiation: persisting problems and recent results. *Brain Res Bull* 21(3):363–372
- MacGregor RJ, McMullen T (1978) Computer simulations of diffusely connected neuronal populations. *Biol Cybern* 28:121–127. doi:[10.1007/BF00337133](https://doi.org/10.1007/BF00337133)
- Malenka RC (1991) The role of postsynaptic calcium in the induction of long-term potentiation. *Mol Neurobiol* 5(2–4):289–295. doi:[10.1007/BF02935552](https://doi.org/10.1007/BF02935552)

- Malenka RC (2003) Synaptic plasticity and AMPA receptor trafficking. *Ann N Y Acad Sci* 1003:1–11. doi:[10.1196/annals.1300.001](https://doi.org/10.1196/annals.1300.001)
- Malenka RC, Nicoll RA (1993) NMDA-receptor dependent synaptic plasticity: multiple forms and mechanism. *Trends Neurosci* 16:521–527. [http://dx.doi.org/10.1016/0166-2236\(93\)90197-T](http://dx.doi.org/10.1016/0166-2236(93)90197-T)
- Malinow R, Schulman H, Tsien RW (1989) Inhibition of postsynaptic PKC or CaMKII blocks induction but not expression of LTP. *Science* 245:862–866. doi:[10.1126/science.2549638](https://doi.org/10.1126/science.2549638)
- Marder E, Abbott LF, Turrigiano GG, Liu Z, Golowasch J (1996) Memory from the dynamics of intrinsic membrane currents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(24):13481–13486
- Mari CF (2004) Extremely dilute modular neuronal networks: neocortical memory retrieval dynamics. *J Comput Neurosci* 17(1):57–79. doi:[10.1023/B:JCNS.0000023871.60959.88](https://doi.org/10.1023/B:JCNS.0000023871.60959.88)
- Marie H, Morishita W, Yu X, Calakos N, Malenka RC (2005) Generation of silent synapses by acute in vivo expression of CaMKIV and CREB. *Neuron* 45:741–752. doi:[10.1016/j.neuron.2005.01.039](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.01.039)
- Mariño J, Schummers J, Lyon DC et al (2005) Invariant computations in local cortical networks with balanced excitation and inhibition. *Nat Neurosci* 8(2):194–201. doi:[10.1038/nn1391](https://doi.org/10.1038/nn1391)
- Marr D (1971) Simple memory: a theory for archicortex. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 262:23–81. doi:[10.1098/rstb.1971.0078](https://doi.org/10.1098/rstb.1971.0078)
- Marr D (1982) *Vision. A computational investigation into the human representation and processing of visual information.* W.H. Freeman and Company, New York
- Martinez JL Jr, Derrick BE (1996) Long-term potentiation and learning. *Annu Rev Psychol* 47:173–203. doi:[10.1146/annurev.psych.47.1.173](https://doi.org/10.1146/annurev.psych.47.1.173)
- Matsuzaki M, Ellis-Davies GC, Nemoto T, Miyashita Y, Iino M, Kasai H (2001) Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nat Neurosci* 4:1086–1092. doi:[10.1038/nn736](https://doi.org/10.1038/nn736)
- Matsuzaki M, Honkura N, Ellis-Davies GC, Kasai H (2004) Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature* 429:761–766. doi:[10.1038/nature02617](https://doi.org/10.1038/nature02617)
- McAllister AK (2002) Neurotrophins and cortical development. *Results Probl Cell Differ* 39:89–112. doi:[10.1101/SQB.1996.061.01.012](https://doi.org/10.1101/SQB.1996.061.01.012)
- McAllister AK, Lo DC, Katz LC (1995) Neurotrophins regulate dendritic growth in developing visual cortex. *Neuron* 15(4):791–803. doi:[10.1016/0896-6273\(95\)90171-X](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90171-X)
- McKinney RA (2010) Excitatory amino acid involvement in dendritic spine formation, maintenance and remodeling. *J Physiol* 588:107–116
- Meffert MK, Chang JM, Wiltgen BJ, Fanselow MS, Baltimore (2003) NFkappaB functions in synaptic signaling and behavior. *Nat Neurosci* 6:1072–1078. doi:[10.1038/nm1110](https://doi.org/10.1038/nm1110)
- Messaoudi E et al (2007) Sustained Arc/Arg3.1 synthesis controls long-term potentiation consolidation through regulation of local actin polymerization in the dentate gyrus in vivo. *J Neurosci* 27:10445–10455. doi:[10.1523/JNEUROSCI.2883-07.2007](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2883-07.2007)
- Mizuno M, Yamada K, Olariu A, Nawa H, Nabeshima T (2000) Involvement of brain-derived neurotrophic factor in spatial memory formation and maintenance in a radial arm maze test in rats. *J Neurosci* 20(18):7116–7121
- Morales EA, Ramirez-Amaya V (2010) Expression of Arc and phosphorylation of CREB in the same cortical neurons after reactivation of a spatial exploration task. *SFN 2010 Daily Books*, Coe-Truman Technologies, Washington, DC
- Morris RG, Anderson E, Lynch GS, Baudry M (1986) Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* 319(6056):774–776. doi:[10.1038/319774a0](https://doi.org/10.1038/319774a0)
- Moser EI, Moser MB (2008) A metric for space. *Hippocampus* 18(12):1142–1156. doi:[10.1002/hipo.20483](https://doi.org/10.1002/hipo.20483)
- Moser M-B, Trommald M, Andersen P (1994) An increase in dendritic spine density on hippocampal pyramidal cells following spatial learning in adult rats suggests the formation of new synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:12673–12675

- Moser MB, Trommald M, Egeland T, Andersen P (1997) Spatial training in a complex environment and isolation alter the spine distribution differently in rat CA1 pyramidal cells. *J Comp Neurol* 380(3):373–381. doi:[10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19970414\)380:3<373::AID-CNE6>3.0.CO;2-#](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19970414)380:3<373::AID-CNE6>3.0.CO;2-#)
- Mountcastle VB (1997) The columnar organization of the neocortex. *Brain* 120(Pt 4):701–722. doi:[10.1093/brain/120.4.701](https://doi.org/10.1093/brain/120.4.701)
- Mountcastle VB, Talbot WH, Darian-Smith I, Kornhuber HH (1967) Neural basis of the sense of flutter-vibration. *Science* 155(3762):597–600. doi:[10.1126/science.155.3762.597](https://doi.org/10.1126/science.155.3762.597)
- Mu JS, Li WP, Yao ZB, Zhou XF (1999) Deprivation of endogenous brain-derived neurotrophic factor results in impairment of spatial learning and memory in adult rats. *Brain Res* 835(2):259–265. [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-8993\(99\)01592-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-8993(99)01592-9)
- Nadel L, Eichenbaum H (1999) Introduction to the special issue on place cells. *Hippocampus* 9(4):341–345. doi:[10.1002/\(SICI\)1098-1063\(1999\)9:4<341::AID-HIPO1>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1063(1999)9:4<341::AID-HIPO1>3.0.CO;2-B)
- Narayanan R, Johnstn D (2007) Long-term potentiation in rat hippocampal neurons is accompanied by spatially widespread changes in intrinsic oscillatory dynamics and excitability. *Neuron* 56(6):1061–1075. doi:[10.1016/j.neuron.2007.10.033](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.10.033)
- Newpher TM, Ehlers MD (2009) Spine microdomains for postsynaptic signalling and plasticity. *Trends Cell Biol* 19:218–227. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2009.02.004>
- O'Keefe J (1976) Place units in the hippocampus of the freely moving rat. *Exp Neurol* 51:78–109. [http://dx.doi.org/10.1016/0014-4886\(76\)90055-8](http://dx.doi.org/10.1016/0014-4886(76)90055-8)
- O'Keefe J, Nadel L (1978) *The hippocampus as a cognitive map*. Oxford University Press, Oxford
- O'Leary H, Lasda E, Bayer KU (2006) CaMKII_α association with the actin cytoskeleton is regulated by alternative splicing. *Mol Biol Cell* 17:4656–4665. doi:[10.1091/mbc.E06-03-0252](https://doi.org/10.1091/mbc.E06-03-0252)
- Okamoto K, Bosch M (2009) Hayashi Y (2009) The roles of CaMKII and F-Actin in the structural plasticity of dendritic spines: a potential molecular identity of a synaptic tag? *Physiology* 24:357–366. doi:[10.1152/physiol.00029.2009](https://doi.org/10.1152/physiol.00029.2009)
- Okamoto K, Nagai T, Miyawaki A, Hayashi Y (2004) Rapid and persistent modulation of actin dynamics regulates postsynaptic reorganization underlying bidirectional plasticity. *Nat Neurosci* 7:1104–1112. doi:[10.1038/nn131](https://doi.org/10.1038/nn131)
- Okamoto K, Narayanan R, Lee SH, Murata K, Hayashi Y (2007) The role of CaMKII as an F-actin bundling protein crucial for maintenance of dendritic spine structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:6418–6423. doi:[10.1073/pnas.0701656104](https://doi.org/10.1073/pnas.0701656104)
- Okuno H, Akashi K, Ishii Y et al (2012) Inverse synaptic tagging of inactive synapses via dynamic interaction of Arc/Arg3.1 with CaMKII β . *Cell* (in Press)
- Ons S, Marti O, Armario A (2004) Stress-induced activation of the immediate early gene Arc (activity-regulated cytoskeleton-associated protein) is restricted to telencephalic areas in the rat brain: relationship to c-fos mRNA. *J Neurochem* 89(5):1111–1118. doi:[10.1111/j.1471-4159.2004.02396.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02396.x)
- Ostrander MM, Badiani A, Day HE, Norton CS, Watson SJ, Akil H, Robinson TE (2003) Environmental context and drug history modulate amphetamine-induced c-fos mRNA expression in the basal ganglia, central extended amygdala, and associated limbic forebrain. *Neuroscience* 20(2):551–571. [http://dx.doi.org/10.1016/S0306-4522\(03\)00247-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0306-4522(03)00247-1)
- Otmakhov N, Griffith LC, Lisman JE (1997) Postsynaptic inhibitors of calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II block induction but not maintenance of pairing-induced long-term potentiation. *J Neurosci* 17:5357–5365
- Otmakhov N, Tao-Cheng JH, Carpenter S, Asrican B, Dosemeci A, Reese TS, Lisman J (2004) Persistent accumulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in dendritic spines after induction of NMDA receptor-dependent chemical long-term. doi:[10.1523/JNEUROSCI.2350-04.2004](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2350-04.2004)
- Paoletti P, Neyton J (2007) NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Curr Opin Pharmacol* 7:39–47. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coph.2006.08.011>

- Patterson MA, Szatmari EM, Yasuda R (2010) AMPA receptors are exocytosed in stimulated spines and adjacent dendrites in a Ras-ERK-dependent manner during long-term potentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. doi:[10.1073/pnas.0913875107](https://doi.org/10.1073/pnas.0913875107)
- Peebles CL (2009) The role of arc in regulating spine morphology and neural network stability in vivo, p 107, AAT 3359559. University of California, San Francisco
- Peebles CL, Yoo J, Thwin MT, Palop JJ, Noebels JL, Finkbeiner S (2010) Arc regulates spine morphology and maintains network stability in vivo. *PNAS* 107(42):18173–18178. doi:[10.1073/pnas.1006546107](https://doi.org/10.1073/pnas.1006546107)
- Perez-Otano I, Ehlers MD (2005) Homeostatic plasticity and NMDA receptor trafficking. *Trends Neurosci* 28(5):229–238. doi:[10.1016/j.tins.2005.03.004](https://doi.org/10.1016/j.tins.2005.03.004)
- Piaget J (1954) *The construction of reality in the child* (International Library of Psychology) [Library Binding]. Routledge bs Kegan Paul Ltd., Great Britain
- Pittenger C, Kandel E (1998) A genetic switch for long-term memory. *C R Acad Sci III*. 321 (2-3):91-6. [http://dx.doi.org/10.1016/S0764-4469\(97\)89807-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0764-4469(97)89807-1)
- Plath N, Ohana O, Dammermann B et al (2001) Aberrant LTP in Arg3.1/Arc knockout animals. *Soc Neurosci Abstr* 27:611.12
- Plath N, Ohana O, Dammermann B et al (2006) Arc/Arg3.1 is essential for the consolidation of synaptic plasticity and memories. *Neuron* 52:437–444. doi:[10.1016/j.neuron.2006.08.024](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.08.024)
- Ploski Pierre VJ, Smucny J et al (2008) The activity-regulated cytoskeletal-associated protein (Arc/Arg3.1) is required for memory consolidation of Pavlovian fear conditioning in the lateral amygdala. *J Neurosci* 28:12383–12395. doi:[10.1523/JNEUROSCI.1662-08.2008](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1662-08.2008)
- Portera-Cailliau C, Pan DT, Yuste R (2003) Activity-regulated dynamic behavior of early dendritic protrusions: evidence for different types of dendritic filopodia. *J Neurosci* 23(18):7129–7142
- Rabinowitch I, Segev I (2008) Two opposing plasticity mechanisms pulling a single synapse. *Trends Neurosci* 31(8):377–383. doi:[10.1016/j.tins.2008.05.005](https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.05.005)
- Ramírez-Amaya V, Escobar ML, Chao V, Bermudez-Rattoni F(1999) Synaptogenesis of mossy fibers induced by spatial water maze overtraining. *Hippocampus* 9(6):631–636. doi: [10.1002/\(SICI\)1098-1063\(1999\)9:6<631::AID-HIPO3>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1063(1999)9:6<631::AID-HIPO3>3.0.CO;2-3)
- Ramírez-Amaya V, Balderas I, Sandoval J, Escobar ML, Bermudez-Rattoni F (2001) Spatial long-term memory is related to mossy fiber synaptogenesis. *J Neurosci* 21(18):7340–7348
- Rampon C, Tang YP, Goodhouse J, Shimizu E, Kiyin M, Tsien JZ (2000) Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. *Nat Neurosci* 3(3):238–244. doi:[10.1038/72945](https://doi.org/10.1038/72945)
- Rebola N, Srikumar BN, Mülle C (2010) Activity-dependent synaptic plasticity of NMDA receptors. *J Physiol* 588(1):93–99. doi:[10.1113/jphysiol.2009.179382](https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.179382)
- Redish AD, Battaglia FP, Chawla MK et al (2001) Independence of firing correlates of anatomically proximate hippocampal pyramidal cells. *J Neurosci* 21(5):RC134
- Regan CM, Fox GB (1995) Polysialylation as a regulator of neural plasticity in rodent learning and aging. *Neurochem Res* 20(5):593–598. doi:[10.1007/BF01694541](https://doi.org/10.1007/BF01694541)
- Reijmers LG, Perkins BL, Matsuo N, Mayford M (2007) Localization of a stable neural correlate of associative memory. *Science* 317:1230–1233. doi:[10.1126/science.1143839](https://doi.org/10.1126/science.1143839)
- Rekart JL, Sandoval CJ, Bermudez-Rattoni F, Routtenberg A (2007) Remodeling of hippocampal mossy fibers is selectively induced seven days after the acquisition of a spatial but not a cued reference memory task. *Learn Mem* 14(6):416–421. doi:[10.1101/lm.516507](https://doi.org/10.1101/lm.516507)
- Reul JM, Hesketh SA, Collins A, Mécinas MG (2009) Epigenetic mechanisms in the dentate gyrus act as a molecular switch in hippocampus-associated memory formation. *Epigenetics* 4:434–439
- Romo R, Salinas E (2003) Flutter discrimination: neural codes, perception, memory and decision making. *Nat Rev Neurosci* 4(3):203–218. doi:[10.1038/nrn1058](https://doi.org/10.1038/nrn1058)
- Rosenberg OS, Deindl S, Sung RJ, Nairn AC, Kuriyan J (2005) Structure of the autoinhibited kinase domain of CaMKII and SAXS analysis of the holoenzyme. *Cell* 123:849–860. doi:[10.1016/j.cell.2005.10.029](https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.10.029)

- Rosenblum K, Futter M, Jones M, Hulme EC, Bliss TV (2000) ERK1/II regulation by the muscarinic acetylcholine receptors in neurons. *J Neurosci* 20(3):977–985
- Rosenblum K, Futter M, Voss K et al (2002) The role of extracellular regulated kinases I/II in late-phase long-term potentiation. *J Neurosci* 22:5432–5441
- Routtenberg A (1985) Protein kinase C activation leading to protein F1 phosphorylation may regulate synaptic plasticity by presynaptic terminal growth. *Behav Neural Biol* 44(2):186–200
- Rudolph M, Pospischil M, Timofeev I, Destexhe A (2007) Inhibition determines membrane potential dynamics and controls action potential generation in awake and sleeping cat cortex. *J Neurosci* 27(20):5280–5290. doi:[10.1523/JNEUROSCI.4652-06.2007](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4652-06.2007)
- Rusakov DA, Davies HA, Harrison E, Diana G, Richter-Levin G, Bliss TV, Stewart MG (1997) Ultrastructural synaptic correlates of spatial learning in rat hippocampus. *Neuroscience* 80(1):69–77. [http://dx.doi.org/10.1016/S0306-4522\(97\)00125-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0306-4522(97)00125-5)
- Sajikumar S, Korte M (2011) Metaplasticity governs compartmentalization of synaptic tagging and capture through brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and protein kinase Mzeta (PKMzeta). *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(6):2551–2556. doi:[10.1073/pnas.1016849108](https://doi.org/10.1073/pnas.1016849108)
- Sakurai Y (1998) The search for cell assemblies in the working brain. *Behav Brain Res* 91(1–2):1–13. [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-4328\(97\)00106-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-4328(97)00106-X)
- Salter MW, Kalia LV (2004) Src kinases: a hub for NMDA receptor regulation. *Nat Rev Neurosci* 5:317–328. doi:[10.1038/nrn1368](https://doi.org/10.1038/nrn1368)
- Sanabria H, Swulius MT, Kolodziej SJ, Liu J, Waxham MN (2009) CaMKII regulates actin assembly and structure. *J Biol Chem* 284:9770–9780. doi:[10.1074/jbc.M809518200](https://doi.org/10.1074/jbc.M809518200)
- Schätzle P, Ster J, Verbich D, McKinney RA, Gerber U, Sonderegger P, Mateos JM (2011) Rapid and reversible formation of spine head filopodia in response to muscarinic receptor activation in CA1 pyramidal cells. *J Physiol* 589(Pt 17):4353–4364
- Sekino Y, Kojima N, Shirao T (2007) Role of actin cytoskeleton in dendritic spine morphogenesis. *Neurochem Int* 51:92–104. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2007.04.029>
- Shen K, Meyer T (1999) Dynamic control of CaMKII translocation and localization in hippocampal neurons by NMDA receptor stimulation. *Science* 284:162–166. doi:[10.1126/science.284.5411.162](https://doi.org/10.1126/science.284.5411.162)
- Shen K, Teruel MN, Subramanian K, Meyer T (1998) CaMKII β functions as an F-actin targeting module that localizes CaMKII α/β heterooligomers to dendritic spines. *Neuron* 21:593–606. doi:[10.1016/S0896-6273\(00\)80569-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80569-3)
- Shen K, Teruel MN, Connor JH, Shenolikar S, Meyer T (2000) Molecular memory by reversible translocation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Nat Neurosci* 3:881–886
- Shepherd JD, Bear MF (2011) New views of Arc, a master regulator of synaptic plasticity. *Nat Neurosci* 14:279–284. doi:[10.1038/nn.2708](https://doi.org/10.1038/nn.2708)
- Shepherd JD, Rumbaugh G, Wu J et al. (2006) Arc/Arg3.1 mediates homeostatic synaptic scaling of AMPA receptors. *Neuron* 52(3):475–484. doi:[10.1016/j.neuron.2006.08.034](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.08.034)
- Shi Y, Ethell IM (2006) Integrins control dendritic spine plasticity in hippocampal neurons through NMDA receptor and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II-mediated actin reorganization. *J Neurosci* 26(6):1813–1822
- Shi SH, Hayashi Y, Petralia RS, Zaman SH, Wenthold RJ, Svoboda K, Malinow R (1999) Rapid spine delivery and redistribution of AMPA receptors after synaptic NMDA receptor activation. *Science* 284:1811–1816. doi:[10.1126/science.284.5421.1811](https://doi.org/10.1126/science.284.5421.1811)
- Shibasaki F, Price ER, Milan D, McKeon F (1996) Role of kinases and the phosphatase calcineurin in the nuclear shuttling of transcription factor NF-AT4. *Nature* 382:370–373. doi:[10.1038/382370a0](https://doi.org/10.1038/382370a0)
- Sindreu CB, Scheiner ZS, Storm DR (2007) Ca²⁺-stimulated adenylyl cyclases regulate ERK-dependent activation of MSK1 during fear conditioning. *Neuron* 53:79–89. doi:[10.1016/j.neuron.2006.11.024](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.11.024)
- Slack SE, Pezet S, McMahon SB, Thompson SW, Malcangio M (2004) Brain-derived neurotrophic factor induces NMDA receptor subunit one phosphorylation via ERK and PKC in the rat spinal cord. *Eur J Neurosci* 20(7):1769–1778

- Steiner P, Higley MJ, Xu W, Czervionke BL, Malenka RC, Sabatini BL (2008) Destabilization of the postsynaptic density by PSD-95 serine 73 phosphorylation inhibits spine growth and synaptic plasticity. *Neuron* 60:788–802. doi:[10.1016/j.neuron.2008.10.014](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.10.014)
- Steward O, Worley PF (2001) Selective targeting of newly synthesized Arc mRNA to active synapses requires NMDA receptor activation. *Neuron* 30:227–240. doi:[10.1016/S0896-6273\(01\)00275-6](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00275-6)
- Steward O, Wallace CS, Lyford GL, Worley PF (1998) Synaptic activation causes the mRNA for the IEG Arc to localize selectively near activated postsynaptic sites on dendrites. *Neuron* 21(4):741–751. doi:[10.1016/S0896-6273\(00\)80591-7](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80591-7)
- Strack S, Robison A, Bass M, Colbran R (2000) Association of calcium/calmodulin-dependent kinase II with developmentally regulated splice variants of the postsynaptic density protein densin-180. *J Biol Chem* 275:25061–25064. doi:[10.1074/jbc.C000319200](https://doi.org/10.1074/jbc.C000319200)
- Tan S, Liang K (1996) Spatial learning alters hippocampal calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activity in rats. *Brain Res* 711:234–240. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)01411-X](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(95)01411-X)
- Tao X, Finkbeiner S, Arnold DB, Shaywitz AJ, Greenberg ME (1998) Ca²⁺ influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Neuron* 20(4):709–726. doi:[10.1016/S0896-6273\(00\)81010-7](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)81010-7)
- Thomas K, Davies A (2005) Neurotrophins: a ticket to ride for BDNF. *Curr Biol* 15(7):R262–R264. doi:[10.1016/j.cub.2005.03.023](https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.03.023)
- Thompson LT, Best PJ (1990) Long-term stability of the place-field activity of single units recorded from the dorsal hippocampus of freely behaving rats. *Brain Res* 509(2):299–308. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)90555-P](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(90)90555-P)
- Toni N, Buchs PA, Nikonenko I, Bron CR, Muller D (1999) LTP promotes formation of multiple spine synapses between a single axon terminal and a dendrite. *Nature* 402:421–425. doi:[10.1038/46574](https://doi.org/10.1038/46574)
- Traub RD, Miles R, Buzsáki G (1992) Computer simulation of carbachol-driven rhythmic oscillations in the CA3 region of the in vitro rat hippocampus. *J Neurophysiol* 451:653–672
- Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ et al (2010) Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol Rev* 62:405–496. doi:[10.1124/pr.109.002451](https://doi.org/10.1124/pr.109.002451)
- Treisman R (1992) The serum response element. *Trends Biochem Sci* 17:423–426
- Tsien JZ (2007) Real-time neural coding of memory. *Prog Brain Res* 165:105–122. [http://dx.doi.org/10.1016/S0079-6123\(06\)65007-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0079-6123(06)65007-3)
- Turrigiano GG, Leslie KR, Desai NS, Rutherford LC, Nelson SB (1998) Activity-dependent scaling of quantal amplitude in neocortical neurons. *Nature* 391(6670):892–896
- Vazdarjanova A, Ramírez-Amaya V, Insel N et al (2006) Spatial exploration induces Arc, a plasticity-related immediate-early gene, only in calcium/calmodulin-dependent protein kinase II-positive principal excitatory and inhibitory neurons of the forebrain. *J Comp Neurol* 498(3):317–329
- Velliste M, Perel S, Spalding MC, Whitford AS, Schwartz AB (2008) Cortical control of a prosthetic arm for self-feeding. *Nature* 453(7198):1098–1101. doi:[10.1038/nature06996](https://doi.org/10.1038/nature06996)
- Walikonis R, Oguni A, Khorosheva E, Jeng C, Asuncion F, Kennedy M (2001) Densin-180 forms a ternary complex with the (alpha)-subunit of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II and (alpha)-actinin. *J Neurosci* 21:423–433
- Wallace CS, Lyford GL, Worley PF, Steward O (1998) Differential intracellular sorting of immediate early gene mRNAs depends on signals in the mRNA sequence. *J Neurosci* 18(1):26–35
- Waltereit R, Dammernann B, Wulff P et al (2001) Arg3.1/Arc mRNA induction by Ca²⁺ and cAMP requires protein kinase A and mitogen-activated protein kinase/extracellular regulated kinase activation. *J Neurosci* 21:5484–5493
- Wang JH, Kelly PT (1995) Postsynaptic injection of CA²⁺/CaM induces synaptic potentiation requiring CaMKII and PKC activity. *Neuron* 15(2):443–452. doi:[10.1016/0896-6273\(95\)90048-9](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90048-9)

- Wang KH, Majewska A, Schummers J, Farley B, Hu C, Sur M, Tonegawa S (2006) In vivo two-photon imaging reveals a role of arc in enhancing orientation specificity in visual cortex. *Cell* 126(2):389–402. doi:[10.1016/j.cell.2006.06.038](https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.038)
- Wang W, Collinger JL, Perez MA et al (2010) Neural interface technology for rehabilitation: exploiting and promoting neuroplasticity. *Phys Med Rehabil Clin N Am* 21(1):157–178. doi:[10.1016/j.pmr.2009.07.003](https://doi.org/10.1016/j.pmr.2009.07.003)
- Washbourne P, Bennett JE, McAllister AK (2002) Rapid recruitment of NMDA receptor transport packets to nascent synapses. *Nat Neurosci* 5:751–759. doi:[10.1038/mn883](https://doi.org/10.1038/mn883)
- Watanabe Y, Johnson RS, Butler LS et al (1996) Null mutation of c-fos impairs structural and functional plasticities in the kindling model of epilepsy. *J Neurosci* 16(12):3827–3836
- Wayman GA, Lee YS, Tokumitsu H, Silva AJ, Soderling TR (2008) Calmodulin-kinases: modulators of neuronal development and plasticity. *Neuron* 59:914–931. doi:[10.1016/j.neuron.2008.08.021](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.08.021)
- Westmark PR, Westmark CJ, Wang S et al (2010) Pin1 and PKMzeta sequentially control dendritic protein synthesis. *Sci Signal* 3:ra18
- Whitlock JR, Heynen AJ, Shuler MG, Bear MF (2006) Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science* 313(5790):1093–1097
- Wiegert JS, Bading H (2011) 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(5):296–305
- Wiegert JS, Bengtson CP, Bading H (2007) Diffusion and not active transport underlies and limits ERK1/2 synapse-to-nucleus signaling in hippocampal neurons. *J Biol Chem* 282:29621–29633
- Wierenga CJ, Ibata K, Turrigiano GG (2005) Postsynaptic expression of homeostatic plasticity at neocortical synapses. *J Neurosci* 25(11):2895–2905. doi: [10.1523/JNEUROSCI.5217-04.2005](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5217-04.2005)
- Wilson M, Bower JM (1992) Cortical oscillations and temporal interactions in a computer simulation of piriform cortex. *J Neurophysiol* 67:981–995
- Wilson MA, McNaughton BL (1993) Dynamics of the hippocampal ensemble code for space. *Science* 261(5124):1055–1058. doi:[10.1126/science.8351520](https://doi.org/10.1126/science.8351520)
- Wilson MA, McNaughton BL (1994) Reactivation of hippocampal ensemble memories during sleep. *Science* 265(5172):676–679. doi:[10.1126/science.8036517](https://doi.org/10.1126/science.8036517)
- Woodin MA, Munno DW, Syed NI (2002) Trophic factor-induced excitatory synaptogenesis involves postsynaptic modulation of nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurosci* 22(2):505–514
- Woolf NJ (1996) The critical role of cholinergic basal forebrain neurons in morphological change and memory encoding: a hypothesis. *Neurobiol Learn Mem* 66(3):258–266. <http://dx.doi.org/10.1006/nlme.1996.0068>
- Woolf NJ (1998) A structural basis for memory storage in mammals. *Prog Neurobiol* 55(1):59–77. doi:[10.1073/pnas.0709311104](https://doi.org/10.1073/pnas.0709311104)
- Worley PF, Bhat RV, Baraban JM, Erickson CA, McNaughton BL, Barnes CA (1993) Thresholds for synaptic activation of transcription factors in hippocampus: correlation with long-term enhancement. *J Neurosci* 13(11):4776–4786
- Xing J, Ginty DD, Greenberg ME (1996) Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase. *Science* 273:959–963. doi:[10.1126/science.273.5277.959](https://doi.org/10.1126/science.273.5277.959)
- Yin Y, Edelman GM, Vanderklisch PW (2002) The brain-derived neurotrophic factor enhances synthesis of Arc in synaptoneuroosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(4):2368–2373. doi:[10.1073/pnas.042693699](https://doi.org/10.1073/pnas.042693699)
- 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* 22:1532–1540

- Yoshimura Y, Nomura T, Yamauchi T (1996) Purification and characterization of active fragment of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II from the post-synaptic density in the rat forebrain. *J Biochem (Tokyo)* 119(2):268–273
- Yoshimura Y, Aoi C, Yamauchi T (2000) Investigation of protein substrates of Ca²⁺/calmodulin dependent protein kinase II translocated to the postsynaptic density. *Brain Res Mol Brain Res* 81:118–128
- Zhang YP, Holbro N, Oertner TG (2008) Optical induction of plasticity at single synapses reveals input specific accumulation of CaMKII. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:12039–12044. doi:[10.1073/pnas.0802940105](https://doi.org/10.1073/pnas.0802940105)
- Zhou Q, Homma KJ, Poo MM (2004) Shrinkage of dendritic spines associated with long-term depression of hippocampal synapses. *Neuron* 44:749–757. doi:[10.1016/j.neuron.2004.11.011](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.11.011)
- Zhu JJ, Qin Y, Zhao M, Van Aelst L, Malinow R (2002) Ras and Rap control AMPA receptor trafficking during synaptic plasticity. *Cell* 110:443–455. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00897-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00897-8)
- Zorumski CF, Izumi Y (1993) Nitric oxide and hippocampal synaptic plasticity. *Biochem Pharmacol* 46(5):777–785. doi:[10.1016/0006-2952\(93\)90484-E](https://doi.org/10.1016/0006-2952(93)90484-E)

Author Queries

Chapter No.: 229

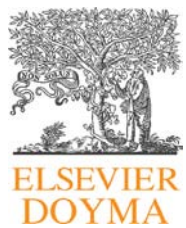
Query Refs.	Details Required	Author's Response
AQ1	Please provide index list for this chapter.	
AQ2	Reference Lorente de Nó (1938) has been changed to Lorente de Nó (1938a, b) so that this citation matches to the list. Please check and confirm.	
AQ3	Please check and confirm the inserted citation of Fig. 1 is correct. If not, please suggest an alternate citation.	
AQ4	References Lansner (2008), Akrami et al. (2012), Ascoli et al. (2009), Willshaw and Dayan (1990), Markus and Petit (1989), Ramirez-Amaya et al. (2005), Sandoval et al. (2011), Escobar et al. (1991), Rekart (2003), Matus et al. (2000), Reul et al. (2007), Nagerl et al. (2004) are cited in text but not provided in the reference list. Please provide references in the list or delete these citations.	
AQ5	Please provide publisher name, location for reference Angulo (2009).	
AQ6	References Brown et al. (2009), Gilbert and Sigman (2007), Kelly and Deadwyler (2003), Leitner et al (2005), Lonze and Ginty (2002), Matsuzaki et al. (2001), O'Keefe (1976), Ons et al. (2004), Ostrander et al. (2003), Otmakhov et al. (2004), Shen and Meyer (1999), Shen et al. (2000), Sindreu et al. (2007), Zhang et al. (2008), Zhu et al. (2002) are given in list but not cited in text. Please cite in text or delete from list.	

MARKED PROOF

Please correct and return this set

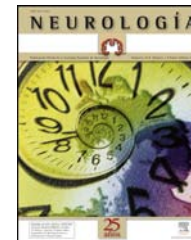
Please use the proof correction marks shown below for all alterations and corrections. If you wish to return your proof by fax you should ensure that all amendments are written clearly in dark ink and are made well within the page margins.

<i>Instruction to printer</i>	<i>Textual mark</i>	<i>Marginal mark</i>
Leave unchanged	... under matter to remain	Ⓟ
Insert in text the matter indicated in the margin	∧	New matter followed by ∧ or ∧ [Ⓢ]
Delete	/ through single character, rule or underline or ┌───┐ through all characters to be deleted	Ⓞ or Ⓞ [Ⓢ]
Substitute character or substitute part of one or more word(s)	/ through letter or ┌───┐ through characters	new character / or new characters /
Change to italics	— under matter to be changed	↙
Change to capitals	≡ under matter to be changed	≡
Change to small capitals	≡ under matter to be changed	≡
Change to bold type	~ under matter to be changed	~
Change to bold italic	≈ under matter to be changed	≈
Change to lower case	Encircle matter to be changed	≡
Change italic to upright type	(As above)	⊕
Change bold to non-bold type	(As above)	⊖
Insert 'superior' character	/ through character or ∧ where required	Υ or Υ under character e.g. Υ or Υ
Insert 'inferior' character	(As above)	∧ over character e.g. ∧
Insert full stop	(As above)	⊙
Insert comma	(As above)	,
Insert single quotation marks	(As above)	ʹ or ʸ and/or ʹ or ʸ
Insert double quotation marks	(As above)	“ or ” and/or “ or ”
Insert hyphen	(As above)	⊥
Start new paragraph	┌	┌
No new paragraph	┐	┐
Transpose	┌┐	┌┐
Close up	linking ○ characters	○
Insert or substitute space between characters or words	/ through character or ∧ where required	Υ
Reduce space between characters or words		↑



NEUROLOGÍA

www.elsevier.es/neurologia



REVISIÓN

Plasticidad sináptica estructural en el hipocampo inducida por la experiencia espacial y sus implicaciones en el procesamiento de información

M. Carasatorre^a, V. Ramírez-Amaya^a y S. Díaz Cintra^{b,*}

^a Departamento de Neurobiología Conductual y Cognitiva, Instituto de Neurobiología (INB), Campus UNAM-Juriquilla, Querétaro, México

^b Departamento de Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología, Instituto de Neurobiología (INB), Campus UNAM-Juriquilla, Querétaro, México

Recibido el 11 de diciembre de 2012; aceptado el 15 de diciembre de 2012

PALABRAS CLAVE

Plasticidad sináptica;
Hipocampo;
Experiencia espacial;
Memoria a largo
plazo;
Ensamblés
neuronales;
Fibras musgosas

Resumen

Introducción: Para formar memorias perdurables, es necesario que los grupos de neuronas encargados de procesar la información que adquirimos desarrollen la capacidad de reproducir los patrones de actividad que se forman a través de la experiencia.

Desarrollo: Los cambios en la eficiencia sináptica permiten que las neuronas se organicen en «ensambles» y reproduzcan una y otra vez estos patrones de actividad. Entre los cambios en la eficiencia sináptica están las modificaciones en la estructura, las cuales tienden a perdurar por mucho tiempo y por ello se les vincula con la memoria a largo plazo. En la literatura existe amplia evidencia de que la experiencia promueve modificaciones en la estructura sináptica, particularmente en regiones como el hipocampo.

Conclusión: Las implicaciones funcionales de estos cambios en el hipocampo incluyen un posible papel en la estabilización de los recuerdos adquiridos y en la codificación de nueva información.

© 2012 Sociedad Española de Neurología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

KEYWORDS

Synaptic plasticity;
Hippocampus;
Spatial experience;
Long-term memory;

Structural synaptic plasticity in the hippocampus induced by spatial experience and its implications in information processing

Abstract

Introduction: Long-lasting memory formation requires that groups of neurons processing new information develop the ability to reproduce the patterns of neural activity acquired by experience.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: yoldi@unam.mx (S. Díaz Cintra).

Neuronal ensembles;
Mossy fibres

Development: Changes in synaptic efficiency let neurons organise to form ensembles that repeat certain activity patterns again and again. Among other changes in synaptic plasticity, structural modifications tend to be long-lasting which suggests that they underlie long-term memory. There is a large body of evidence supporting that experience promotes changes in the synaptic structure, particularly in the hippocampus.

Conclusion: Structural changes to the hippocampus may be functionally implicated in stabilising acquired memories and encoding new information.

© 2012 Sociedad Española de Neurología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

La memoria y los mecanismos neuronales que subyacen a ella

Una de las características más destacadas del ser humano y otros animales es nuestra capacidad de aprender y recordar. Podemos reconocer estímulos que vimos mucho tiempo atrás, como la cara de una persona que conocimos hace años, o establecer asociaciones entre estímulos que perduren, tanto que sea usual que a lo largo de nuestra vida saltemos ante el sonido de un claxon o bien podemos reconocer el contexto espacial del barrio en donde crecimos y orientarnos a la pequeña tienda donde solíamos comprar golosinas.

La información que adquirimos y que mantenemos como memoria se representa en el sistema nervioso central mediante la actividad coordinada de grupos de neuronas que adquieren la capacidad de reproducir una y otra vez los patrones de actividad que se generan durante la experiencia. Esta idea muestra que en el sistema nervioso central la representación de información que subyace a los diferentes procesos cognoscitivos, entre los que se incluye a la memoria, se lleva a cabo en conjuntos de neuronas a los que llamamos «ensambles»¹. Esto es lo que se concibe como el código poblacional². Una manera gráfica en la que podemos plantear esta idea es haciendo una analogía entre las unidades neuronales y las letras del abecedario; no son las letras en sí mismas las que representan información, sino la combinación y el orden en que están dispuestas lo que da sentido a las palabras y frases.

La plasticidad y los ensambles neuronales

El célebre neuroanatomista Santiago Ramón y Cajal introdujo la idea de que las modificaciones en la conectividad sináptica en el SNC podía ser el sustrato de la memoria³. Sin embargo, no fue sino hasta mediados del siglo pasado que Donald Hebb (1945) planteó formalmente lo que hoy en día mucha gente denomina «el postulado de Hebb»: «Cuando el axón de una célula A está lo suficientemente cerca como para excitar a una célula B y repetidamente o persistentemente la activa, *ocurren procesos de crecimiento*, o cambios metabólicos, en una o ambas células, de manera que la eficiencia con la que la célula A hace disparar a la célula B, aumenta».

Hebb había encontrado en la idea de «los circuitos reverberantes» planteada por Lorente de Nó un argumento empírico para explicar que la reverberación de los «ensambles neuronales» era el mecanismo que promovía el fortalecimiento de las conexiones sinápticas en el ensamble

y, de esa manera, adquiriría la capacidad de reproducir los patrones de actividad que surgen durante la experiencia. Los ensambles pueden reproducir los patrones de actividad adquiridos tanto en ausencia de estímulos externos («off-line»), como ante la estimulación parcial con información relacionada al evento que dio lugar a la formación del recuerdo («on-line»).

Existen diferentes tipos de cambios en la eficiencia sináptica, algunos de los cuales tienden a perdurar más que otros. Particularmente, se considera que los cambios en la estructura de la comunicación sináptica son los que tienden a perdurar más y, por lo tanto, han de ser los que subyacen a la memoria a largo plazo⁴.

¿Dónde se estudian el código poblacional y la dinámica de los ensambles?

El hipocampo ha resultado ideal para estudiar e identificar a los ensambles neuronales, esto gracias a su disposición neuroanatómica, las características fisiológicas de sus neuronas, su conocida capacidad plástica y a su papel en la formación de la memoria.

Sabemos, desde hace más de 50 años, que el hipocampo es esencial para la formación de la memoria⁵. Posteriormente, aprendimos, con modelos animales, que el hipocampo está involucrado en el procesamiento de información episódica y que esta integra información espacial y temporal^{6,7}. También podemos estudiar en el hipocampo los mecanismos que subyacen a la plasticidad sináptica con modelos experimentales, como la potenciación a largo plazo (LTP). En este modelo de plasticidad, la respuesta post-sináptica a un pulso de baja frecuencia se incrementa a largo-plazo después de la aplicación de varios trenes de estimulación de alta frecuencia^{8,9}. Con este modelo experimental, se ha demostrado que la eficiencia sináptica varía como consecuencia de la historia de actividad de la vía, específicamente en las sinapsis de la vía estimulada^{9,10}. Este hallazgo dio sustento empírico al postulado de Hebb y se propuso como un mecanismo que subyace la consolidación de la memoria espacial en el hipocampo¹¹. Sin embargo, la idea original de Hebb consideraba que podían ocurrir «procesos de crecimiento», lo que puede interpretarse como cambios en la estructura de la comunicación sináptica.

¿Cambia la estructura sináptica después de la experiencia?

La evidencia empírica sobre cambios en la estructura neuronal como consecuencia de la experiencia comenzó a

aparecer a principios de los años sesenta, cuando el grupo de M. Rosenzweig introdujo el paradigma de los ambientes enriquecidos¹². Inicialmente, encontraron efectos de los ambientes enriquecidos en parámetros gruesos, como el peso cerebral, y el contenido de proteínas y nucleótidos¹², pero posteriormente se demostró que esta condición de estimulación ambiental induce incrementos en la arborización dendrítica y la generación de nuevas neuronas¹³. Lo interesante es que desde entonces se notó una relación entre los cambios estructurales y una mejoría en la capacidad de aprender.

Willian Greenough¹⁴ respaldó la idea de que la experiencia modifica la estructura neuroanatómica de la red neuronal, mediante estudios detallados con microscopía electrónica, con los que demostró que, al aprender habilidades motoras, la densidad de contactos sinápticos se incrementa en estructuras como el cerebelo y la corteza.

En los años noventa, Yuri Geinisman demostró que la inducción de la LTP en la vía perforante que proyecta al giro dentado (GD) del hipocampo incrementa la densidad de contactos sinápticos que arriban a las dendritas de las células granulares¹⁵. En 1997, Martha Escobar observó que la inducción de la LTP en las fibras musgosas incrementa la densidad de botones musgosos en el *stratum oriens* (SO) del CA3¹⁶, visualizando las fibras musgosas con la técnica de Timm. Estos trabajos pusieron de manifiesto la alta capacidad plástica estructural del hipocampo y la pregunta que estaba en el aire era si dichos cambios tan consistentes podían ocurrir también en respuesta a la conducta.

Plasticidad sináptica estructural en el hipocampo en respuesta a la experiencia

La primera evidencia de plasticidad sináptica estructural en el hipocampo en respuesta a una experiencia conductual es de Altschuler en 1979¹⁷. En este trabajo, animales que fueron sometidos tanto a un ambiente enriquecido como a una tarea de orientación espacial se compararon con controles sometidos a una rueda de actividad y con otros controles intactos. Con el uso de microscopía electrónica se observó un notable incremento en la densidad de contactos sinápticos en la región del CA3.

Moser et al., en 1994¹⁸, sometieron a animales a ambientes complejos que promueven el aprendizaje espacial y compararon la densidad de espinas dendríticas en estos animales con controles que habitaban en colonias y con otros que habitaban en cajas individuales. Mediante microscopía confocal visualizaron los árboles dendríticos de las neuronas piramidales del CA1 (inyectando por iontoforesis intracelular el fluoróforo amarillo lucifer) y observaron un incremento en la densidad de espinas en los animales sometidos al ambiente complejo. La ejecución de estos animales en la tarea de laberinto de agua de Morris (LAM) era mejor que la de los animales controles. Posteriormente, reportaron¹⁹ que el incremento en la densidad de espinas en los animales sometidos al ambiente complejo se observa solo en un subgrupo de segmentos dendríticos en el SO del CA1, no así en los animales crecidos en medioambientes aislados que presentaron una baja densidad de espinas en comparación con los animales que habitan en colonias.

En 1997, Ruzakov et al.²⁰, utilizando microscopía electrónica, encontraron que el entrenamiento en una tarea de LAM promovía un cambio en la distribución de los contactos sinápticos en CA1 sin que esto implicara un incremento neto en la densidad sináptica, probablemente debido a la sección dendrítica analizada¹⁹.

A finales de los años noventa, Ramírez-Amaya y Escobar²¹ emprendieron una serie de investigaciones con las que demostraron que después de sobreentrenar a ratas en la tarea de LAM se incrementa notablemente la densidad de botones musgosos en el SO del CA3 visualizados con Timm²¹. Un análisis con microscopía electrónica corroboró los resultados y se observó que los cambios estructurales no ocurren en respuesta al estrés o la actividad motora durante el nado²¹. Posteriormente, encontraron que el entrenamiento por 4 o 5 días en el LAM produce una mejor ejecución en la prueba de memoria realizada a los 7 y 30 días después de la adquisición, en contraste con animales entrenados durante 1 o 3 días²². Se correlacionó este dato de manera positiva con la densidad de botones musgosos en el SO del CA3 con la ejecución de la tarea de LAM, lo que indicaba que el incremento en la densidad de botones musgosos podría estar relacionado con la formación de la memoria espacial²².

Estos resultados provocaron gran interés en el grupo de Aryeh Routenberg, que convirtió el hallazgo en un modelo para estudiar plasticidad sináptica estructural en el hipocampo relacionada al aprendizaje espacial²³. Observaron lo que ellos llamaron expansión de las fibras musgosas al SO en el CA3, visualizadas con Timm y otros marcadores como sinaptofisina²⁴, en 2 cepas de ratas. En Wistar, que es la misma cepa utilizada previamente^{21,22}, y Long Evans²⁴, las que mostraron una mejor capacidad para aprender tareas espaciales que las ratas Wistar. Además, presentaron una mayor proyección de contactos musgosos al SO del CA3 aun antes de la experiencia espacial²⁴. También observaron que desde 24 h después del último día de entrenamiento en el LAM, las ratas Long Evans expandían sus contactos musgosos al SO del CA3, mientras que las Wistar presentaron esta expansión a partir de 7 días después de la última sesión de adquisición²⁵. Los autores de estos trabajos afirman que estas modificaciones estructurales podrían contribuir a la formación de la memoria y también facilitar la ejecución posterior de tareas de navegación espacial²⁴. También observaron que el incremento en la densidad de contactos musgosos en respuesta al entrenamiento en el LAM se observa en ratas²⁶. Otro grupo, sin embargo, encontró que el entrenamiento en una tarea de LAM en ratones c57, si inducía un incremento en la densidad de contactos musgosos en el SO de CA3, visualizado con Timm²⁷. En los procedimientos conductuales no se encuentran datos que permitan reconciliar el contraste entre estos resultados; sin embargo, una posible explicación es que las condiciones del hábitat pudieran explicar las diferencias. Se ha demostrado que durante el desarrollo del animal, las fibras musgosas se expanden a la región del SO en CA3 y posteriormente se retraen, de manera dependiente de actividad²⁸. Esto evidencia que cuando los animales son criados en condiciones de aislamiento las fibras musgosas que proyectan al SO se retraen, mientras que en condiciones de estimulación es probable que se mantengan.

El incremento en el área que ocupa la tinción de Timm en el SO en animales entrenados en el LAM se ha interpretado como sinaptogénesis^{21,22} y, congruentemente, se ha

observado con microscopia electrónica que el entrenamiento en el LAM aumenta el volumen y la complejidad de las excrescencias espinosas en las dendritas apicales de las células piramidales en el CA3²⁹, que es donde hacen sinapsis las fibras musgosas. Aunado a esto, con microscopia confocal de alta resolución y un sofisticado procedimiento de análisis de imágenes, el grupo de Pico Caroni demostró que la experiencia de un ambiente enriquecido incrementa el volumen y la complejidad de los botones musgosos que hacen contacto con las dendritas de CA3 en el hipocampo de ratones³⁰.

La evidencia experimental muestra que los cambios en la densidad de sinapsis musgosas se inducen solamente con tareas espaciales dependientes del hipocampo y no por tareas de navegación independientes de la función hipocampal^{24,31}.

No hay duda entonces de que la experiencia espacial, dependiente del hipocampo, promueve un incremento en la densidad y la complejidad de los botones musgosos que arriban a las células piramidales de CA3 en el hipocampo, y la pregunta que queda es:

¿Cuál es su significado funcional?

Las neuronas granulares que forman el GD dan origen a los axones de las fibras musgosas; algunas de sus terminales son enormes botones con características muy particulares que hacen contacto con las excrescencias espinosas en las dendritas de las células piramidales del CA3^{32,33}, mientras que las terminales de filopodios de las fibras musgosas hacen contacto con interneuronas inhibitorias³⁴. Las terminales musgosas coliberan glutamato, zinc y neuropéptidos³⁵, y su «input» es tan poderoso³⁶ que McNaughton y Morris, en 1987³⁷, lo consideraron como «detonante»³⁸ de la actividad de espigas de células piramidales de CA3.

Una vieja propuesta es que el GD tiene la función de ortogonalizar los patrones de información provenientes de la corteza entorrinal³⁹. En congruencia con esta idea, en el GD se reclutan del 2 al 3% de las unidades neuronales durante el procesamiento de información espacial⁴⁰⁻⁴², lo que refleja un código escaso, con el cual es más viable una óptima separación de patrones, ya que es menos probable reclutar al mismo ensamble en diferentes representaciones.

Por otra parte, en los axones del CA3, si bien proyectan aferencias a las células piramidales de CA1, una característica prominente es que también proyectan fibras colaterales recurrentes que hacen contacto con otras células piramidales en el CA3, en un fascinante gradiente próximo-distal y septo-temporal⁴³. Se ha propuesto que la red recurrente del CA3 opera como un sistema de memoria autoasociativa^{37,44} crucial para la formación de la memoria. La red CA3 puede exagerar las diferencias entre las representaciones, logrando una excelente separación de patrones al igual que el GD, pero lo que sobresale es su capacidad de completar patrones, habilidad distintiva de esta red⁴⁵. Por esta razón, es viable pensar que el CA3 es el principal almacén de información en el hipocampo⁴⁶.

El «input» que reciben las células piramidales de CA3 es diverso⁴⁷ y, si bien el que recibe del GD por medio de la vía de las fibras musgosas es extremadamente escaso⁴⁸, se sabe es determinante para la función de CA3³⁶. Solamente

entre 10 a 18 sinapsis musgosas hacen contacto con cada célula piramidal, mientras que el número de sinapsis por célula piramidal de vías más débiles, como las colaterales del CA3 o las vías provenientes del CA1, está en el orden de los miles⁴⁹.

Las neuronas piramidales del CA3 reciben información sobre la distancia del desplazamiento del animal directamente de la corteza entorrinal, por medio de la vía perforante, y esta misma información arriba también, a través del GD al CA3. De esta manera, las fibras musgosas duplican la información que las células del CA3 ya reciben de las células de la corteza entorrinal. Por lo tanto, se ha propuesto que las fibras musgosas dirigen el almacenamiento de nuevas representaciones, mientras que la vía perforante transmite la clave de información que inicia la recuperación de representaciones previamente almacenadas⁵⁰. Y gracias a sus conexiones recurrentes, el CA3 lleva a cabo la comparación estadística de patrones, completando los patrones de actividad para reconocer así lo familiar o separándolos cuando las representaciones son diferentes.

Los modelos computacionales proponen que las fibras musgosas inducen patrones de actividad con alto grado de separación en el CA3, tendiendo a promover que la nueva información prevalezca sobre los patrones de actividad que representan los trazos de memorias previamente adquiridas⁵¹. Así, cuando la actividad de las recurrentes es estadísticamente más fuerte, la vieja memoria prevalece, pero si un nuevo patrón de actividad tiene que ser almacenado, primero se recodifica y transforma en la red del GD y es transmitido por las fibras musgosas como un patrón aparentemente aleatorio que llega a la red del CA3⁵⁰.

Se considera así que la función de las fibras musgosas es la de dirigir la codificación de nueva información, y no así la de recuperar información previamente almacenada. Y aparentemente, esto se explica porque aun cuando las fibras musgosas están provistas de plasticidad asociativa, no son capaces de almacenar información porque su «input» es demasiado escaso⁵².

La evidencia experimental apoya esta idea, por ejemplo, la inactivación reversible de las terminales de CA3 mediante inyecciones de dietil ditiocarbamato durante la adquisición de la tarea de LAM afecta a la ejecución en la prueba de memoria⁵³, pero si se inactiva inmediatamente antes de la recuperación de la memoria no se afecta la ejecución^{54,55}. También la adquisición de una tarea de reconocimiento es alterada por la inactivación de las fibras musgosas⁵⁶. Esto apoya la idea de que el GD dirige el almacenamiento de información en el CA3, estableciendo no solamente patrones discretos de actividad nuevos⁵¹, sino nuevas representaciones completas⁵².

Por otra parte, la escasez del código en el GD y su escaso «input» al CA3 podrían ser variables fundamentales para el almacenamiento de nueva información en CA3. Recientemente, esto se evaluó⁵¹ mediante un modelo que consideró valores, obtenidos de manera experimental, de diferentes características funcionales del GD y CA3, asumiendo una fuerza fija del «input» de las fibras musgosas. La simulación del modelo computacional mostró que el sistema mnémico se beneficia de una conectividad con alto grado de escasez. Sin embargo, notaron también que un grado de escasez muy alto provoca la disipación de la entrada de información, lo que significa que si las proyecciones musgosas proveen de

un «input» en extremo escaso, el sistema deja de funcionar de manera óptima⁵². Es importante recordar que durante el desarrollo del hipocampo en roedores, el «input» de las fibras musgosas a CA3 tiende a proyectar de manera profusa a la región del SO, pero si las condiciones de estimulación del animal son pobres estas fibras se retraen²⁸. Esto puede implicar que si las condiciones ambientales en donde se desarrolla el animal estimulan la función hipocámpal, las proyecciones musgosas serán más abundantes, proveyendo un «input» óptimo que permita almacenar información en el CA3. En contraste, cuando las condiciones del ambiente son pobres, las proyecciones musgosas tenderán a ser muy escasas y en consecuencia su «input» será subóptimo, por lo que se verá afectada o disminuida la capacidad del hipocampo de codificar nueva información.

Esto es congruente con observaciones en las que animales de especies cercanas que ocupan hábitats diferentes presentan diferencias claras en la densidad de fibras musgosas infrapiramidales al CA3, la cuales correlacionan con una mejor ejecución en varias tareas espaciales⁵⁷⁻⁵⁹. De igual manera, diferentes densidades de botones musgosos en la vía infrapiridal en distintas cepas de roedores predicen una ejecución diferente en tareas dependientes del hipocampo⁶⁰. Los ratones de la cepa pigmentada —DBA la más antigua cepa endogámica— presentan una menor densidad de contactos musgosos en la vía infrapiridal en comparación con ratones de la cepa C57 (negros) y, consecuentemente, los ratones de esta última cepa ejecutan mejor tareas dependientes del hipocampo^{61,62}. Consistentemente, la densidad de proyecciones musgosas de la vía infrapiridal se correlaciona positivamente con la ejecución de una tarea de LAM^{62,63}, lo que también correlaciona con otras tareas dependientes del hipocampo⁶⁴.

Ante toda esta evidencia, podemos interpretar que la formación de nuevas sinapsis musgosas en el SO de CA3 en respuesta a la experiencia^{21,22} es un cambio plástico que mejora la codificación de nueva memoria espacial. Esto coincide con evidencia que muestra que la experiencia en tareas espaciales durante la adolescencia en ratas promueve un incremento en la densidad de fibras musgosas en el SO del CA3 y una mejor ejecución de nuevas tareas espaciales cuando el animal es adulto^{65,66}. En síntesis, la función de la sinaptogénesis de las fibras musgosas en respuesta a la experiencia espacial es mejorar la codificación de información en el hipocampo.

Sin embargo, retomando el planteamiento de Hebb, y considerando que la plasticidad sináptica estructural es la que tiende a perdurar⁴, sigue siendo atractiva la idea de que estos cambios estructurales pudieran estar también implicados en el almacenamiento de la memoria adquirida, tal y como se propuso previamente basándose en la correlación positiva obtenida entre la densidad de botones musgosos en el SO del CA3 y la ejecución en la prueba de memoria en el LAM²². En apoyo a este planteamiento, un reciente estudio muestra evidencia de que la experiencia conductual promueve un incremento en la densidad de conexiones musgosas con células inhibitorias y esto hace más precisa la recuperación de la memoria adquirida⁶⁷. Es importante aclarar que el GD se comunica con sus objetivos postsinápticos mediante 3 tipos de terminales. Un tipo está conformado por las terminales musgosas grandes, las cuales hacen contacto con las excrescencias espinosas de las células piramidales

del CA3 y con las células musgosas del CA3 en el hilus; las otras son terminales finas de filopodio, que hacen contacto principalmente con interneuronas inhibitorias y, finalmente, existen varicosidades de paso que también hacen contacto con interneuronas³⁴. Curiosamente, la densidad de contactos con interneuronas mediante terminales de filopodio resulta ser 10 veces mayor que la densidad de contactos de las terminales musgosas grandes con neuronas piramidales³⁴.

En el trabajo del grupo de Pico Caroni⁶⁷, se observó que un solo ensayo de aprendizaje en una tarea de condicionamiento al miedo o varias sesiones de adquisición en una tarea de LAM, a lo largo de 8 días, induce un incremento en la densidad de terminales de filopodio en relación con las terminales musgosas grandes, lo que se interpretó como un aumento en la inhibición hacia adelante o «feed forward inhibition». En congruencia con esta idea, observaron también que el entrenamiento en el LAM provoca que el número de neuronas que responden ante la recuperación de información se reduzca notablemente, evaluando la actividad mediante la detección de la expresión de un gen de expresión inmediata. Estos cambios en la densidad de contactos musgosos con interneuronas inhibitorias correlacionan temporalmente con la precisión de la memoria previamente adquirida⁶⁷. Estos resultados apoyan la idea de que el incremento en la densidad de contactos musgosos podría estar relacionado con un almacenamiento más preciso de la información adquirida.

Si bien esta posición podría parecer contraria a la idea de que el incremento en la densidad de contactos musgosos mejora la codificación de nueva información, podemos argumentar que no son necesariamente excluyentes. Es posible que al mejorarse la codificación de nueva información gracias al aumento de fibras musgosas, las condiciones en las que la actividad fuera de línea de la red promueve²⁵ esta plasticidad podrían mejorar también la codificación de la información que se adquiere durante la adquisición de la tarea que promovió los cambios estructurales, sin que esto implique que la sinaptogénesis de las fibras musgosas afecte a la recuperación de memoria antiguas.

La evidencia experimental y los modelos propuestos nos inclinan a pensar que la sinaptogénesis de las fibras musgosas, en respuesta a la experiencia espacial, promueve un cambio general en la función hipocámpal. Dado esto, es probable que dicha sinaptogénesis pueda incidir también sobre otros mecanismos generales del funcionamiento de la red hipocámpal, como lo es el completamiento estadístico de patrones^{68,69}. Este incluye la separación y el completamiento de patrones, los que respectivamente permiten que la red hipocámpal pueda distinguir de manera óptima entre diferentes representaciones y que la recuperación de episodios previamente almacenados se realice de manera eficiente^{45,46,70}.

Finalmente, para determinar de manera concluyente si los cambios en la densidad de contactos musgosos participan en el almacenamiento de la información adquirida, es necesario determinar si dichos cambios ocurren o no en las neuronas responsables de procesar la información adquirida.

Determinar de manera concluyente el papel funcional de la sinaptogénesis de las fibras musgosas en respuesta a la experiencia requiere un arduo trabajo experimental y una mayor atención a los modelos de funcionamiento del

hipocampo. Pero tenemos en nuestras manos un modelo de plasticidad sináptica sobresaliente que nos permitirá esclarecer mecanismos trascendentales para entender el procesamiento de información en el SNC, y probablemente también nos ayude a identificar las unidades neuronales que subyacen a la memoria a largo plazo.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe ningún conflicto de interés.

Agradecimientos

Agradecemos el apoyo institucional del CONACyT (Proyectos P51028325 y 178871) y la Beca de Doctorado (130802); así como de la DGAPA UNAM PAPIIT (IN216510-23 y IN201613). Este trabajo fue realizado en cumplimiento parcial de los requerimientos para el obtener el grado de Doctor (Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM).

Bibliografía

1. Hebb DO. The organization of behavior: a neuropsychological theory. Nueva York: John Wiley y Sons; 1945.
2. Sakurai Y. How do cell assemblies encode information in the brain. *Neurosci Biobehav Rev*. 1999;23:785–96.
3. Ramón y Cajal S. *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés*. Paris: A. Meloine Editor; 1909. Traducción del doctor L. Azoulay, 2 volúmenes; 1911.
4. Bailey CH, Kandel ER. Structural changes accompanying memory storage. *Annu Rev Physiol*. 1993;55:397–426.
5. Scoville WB, Milner B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1957;20:11–21.
6. Moscovitch M, Nadel L, Winocur G, Gilboa A, Rosenbaum RS. The cognitive neuroscience of remote episodic, semantic and spatial memory. *Curr Opin Neurobiol*. 2006;16:179–90.
7. Eichenbaum H, Fortin NJ. The neurobiology of memory based predictions. *Philos Trans Roy Soc Lond*. 2009;364:1183–91.
8. Bliss TVP, Lømo T. Plasticity in a monosynaptic cortical pathway. *J Physiol (Lond)*. 1970;207:61.
9. Bliss TVP, Gardner-Medwin AR. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized hippocampus following stimulation of the perforant path. *J Physiol (Lond)*. 1973;232:357–437.
10. Watkins JC, Jane DE. The glutamate story. *Br J Pharmacol*. 2006;147:S100–8.
11. Morris RG, Anderson E, Lynch GS, Baudry M. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature*. 1986;319:774–6.
12. Rosenzweig MR, Krech D, Bennett EL, Diamond MC. Effects of environmental complexity and training on brain chemistry and anatomy: a replication and extension. *J Comp Physiol Psychol*. 1962;55:429–37.
13. Rosenzweig MR, Bennett EL. Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior. *Behav Brain Res*. 1996;78:57–65.
14. Greenough WT, Anderson BJ. Cerebellar synaptic plasticity. Relation to learning versus neural activity. *Ann N Y Acad Sci*. 1991;627:231–47.
15. Geinisman Y. Structural synaptic modifications associated with hippocampal LTP and behavioral learning. *Cereb Cortex*. 2000;10:952–62.
16. Escobar ML, Barea-Rodríguez EJ, Derrick BE, Reyes JA, Martínez Jr JL. Opioid receptor modulation of mossy fiber synaptogenesis: independence from long-term potentiation. *Brain Res*. 1997;751:330–5.
17. Altschuler RA. Morphometry of the effect of increased experience and training on synaptic density in area CA3 of the rat hippocampus. *J Histochem Cytochem*. 1979;27:1548–50.
18. Moser MB, Trommald M, Andersen P. An increase in dendritic spine density on hippocampal CA1 pyramidal cells following spatial learning in adult rats suggests the formation of new synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:12673–5.
19. Moser MB, Trommald M, Egeland T, Andersen P. Spatial training in a complex environment and isolation alter the spine distribution differently in rat CA1 pyramidal cells. *J Comp Neurol*. 1997;380:373–81.
20. Rusakov DA, Davies HA, Harrison E, Diana G, Richter-Levin G, Bliss TV, et al. Ultrastructural synaptic correlates of spatial learning in rat hippocampus. *Neuroscience*. 1997;80:69–77.
21. Ramírez-Amaya V, Escobar ML, Chao V, Bermúdez-Rattoni F. Synaptogenesis of mossy fibers induced by spatial water maze overtraining. *Hippocampus*. 1999;9:631–6.
22. Ramírez-Amaya V, Balderas I, Sandoval J, Escobar ML, Bermúdez-Rattoni F. Spatial long-term memory is related to mossy fiber synaptogenesis. *J Neurosci*. 2001;21:7340–8.
23. Rekart JL, Holahan MR, Routtenberg A. Presynaptic structural plasticity and long-lasting memory: focus on learning-induced redistribution of hippocampal mossy fibers. En: Bermúdez-Rattoni F, editor. *Neural plasticity and memory: from genes to brain imaging*. Boca Raton: CRC Press; 2007. Capítulo 5.
24. Holahan MR, Rekart JL, Sandoval J, Routtenberg A. Spatial learning induces presynaptic structural remodeling in the hippocampal mossy fiber system of two rat strains. *Hippocampus*. 2006;16:560–70.
25. Rekart JL, Sandoval CJ, Bermudez-Rattoni F, Routtenberg A. Remodeling of hippocampal mossy fibers is selectively induced seven days after the acquisition of a spatial but not a cued reference memory task. *Learn Mem*. 2007;14:416–21.
26. Rekart JL, Sandoval CJ, Routtenberg A. Learning-induced axonal remodeling: evolutionary divergence and conservation of two components of the mossy fiber system within Rodentia. *Neurobiol Learn Mem*. 2007;87:225–35.
27. Middei S, Vetere G, Sgobio C, Ammassari-Teule M. Landmark-based but not vestibular-based orientation elicits mossy fiber synaptogenesis in the mouse hippocampus. *Neurobiol Learn Mem*. 2007;87:174–80.
28. Holahan MR, Honegger KS, Routtenberg A. Expansion and retraction of hippocampal mossy fibers during postweaning development: strain-specific effects of NMDA receptor blockade. *Hippocampus*. 2007;17:58–67.
29. Stewart MG, Davies HA, Sandi C, Kraev IV, Rogachevsky VV, Peddie CJ, et al. Stress suppresses and learning induces plasticity in CA3 of rat hippocampus: a three-dimensional ultrastructural study of thorny excrescences and their postsynaptic densities. *Neuroscience*. 2005;131:43–54.
30. Galimberti I, Gogolla N, Alberi S, Santos AF, Müller D, Caroni P. Long-term rearrangements of hippocampal mossy fiber terminal connectivity in the adult regulated by experience. *Neuron*. 2006;50:749–63.
31. McGonigal R, Tabatadze N, Routtenberg A. Selective presynaptic terminal remodeling induced by spatial, but not cued, learning: a quantitative confocal study. *Hippocampus*. 2012;22:1242–55.
32. Amaral DG, Dent JA. Development of the mossy fibers of the dentate gyrus: I. A light and electron microscopic study

- of the mossy fibers and their expansions. *J Comp Neurol.* 1981;195:51–86.
33. Maccaferri G, Toth K, McBain CJ. Target-specific expression of presynaptic mossy fiber plasticity. *Science.* 1988;279:1368–70.
 34. Acsády L, Kamondi A, Sik A, Freund T, Buzsáki G. GABAergic cells are the major postsynaptic targets of mossy fibers in the rat hippocampus. *J Neurosci.* 1998;18:3386–403.
 35. Kobayashi K. Hippocampal mossy fiber synaptic transmission and its modulation. *Vitam Horm.* 2010;82:65–85.
 36. Blackstad TW, Kjaerheim A. Special axo-dendritic synapses in the hippocampal cortex: electron and light microscopic studies on the layer of mossy fibers. *J Comp Neurol.* 1961;117:133–59.
 37. McNaughton BL, Morris RGM. Hippocampal synaptic enhancement and information storage within a distributed memory system. *Trends Neurosci.* 1987;10:408–15.
 38. Eccles JC. Synaptic and neuro-muscular transmission. *Physiol Rev.* 1937;17:538–55.
 39. Sclabassi RJ, Eriksson JL, Port RL, Robinson GB, Berger TW. Nonlinear systems analysis of the hippocampal perforant path-dentate projection. I. Theoretical and interpretational considerations. *J Neurophysiol.* 1988;60:1066–76.
 40. Ramírez-Amaya V, Vazdarjanova A, Mikhael D, Rosi S, Worley PF, Barnes CA. Spatial exploration-induced Arc mRNA and protein expression: evidence for selective, network-specific reactivation. *J Neurosci.* 2005;25:1761–8.
 41. Chawla MK, Guzowski JF, Ramírez-Amaya V, Lipa P, Hoffman KL, Marriott LK, et al. Sparse environmentally selective expression of Arc RNA in the upper blade of the rodent fascia dentata by brief spatial experience. *Hippocampus.* 2005;15:579–86.
 42. Leutgeb JK, Leutgeb S, Moser MB, Moser EI. Pattern separation in the dentate gyrus and CA3 of the hippocampus. *Science.* 2007;315:961–6.
 43. Ishizuka N, Cowan WM, Amaral DG. A quantitative analysis of the dendritic organization of pyramidal cells in the rat hippocampus. *J Comp Neurol.* 1995;362:17–45.
 44. Rolls ET. Functions of neuronal networks in the hippocampus and neocortex in memory. En: Byrne JH, Berry WO, editores. *Neural models of plasticity: experimental and theoretical approaches.* San Diego: Academic Press; 1989. p. 240–65.
 45. Guzowski JF, Knierim JJ, Moser EI. Ensemble dynamics of hippocampal regions CA3 and CA1. *Neuron.* 2004;44:581–4.
 46. Leutgeb S, Leutgeb JK. Pattern separation, pattern completion, and new neuronal codes within a continuous CA3 map. *Learn Mem.* 2007;14:745–57.
 47. Witter MP. Intrinsic and extrinsic wiring of CA3: Indications for connectional heterogeneity. *Learn Mem.* 2007;14:705–13.
 48. Claiborne BJ, Amaral DG, Cowan WM. A light and electron microscopic analysis of the mossy fibers of the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol.* 1986;246:435–58.
 49. Amaral DG, Ishizuka N, Claiborne B. Neurons, numbers and the hippocampal network. *Progr Brain Res.* 1990;83:1–11.
 50. Treves A, Tashiro A, Witter ME, Moser EI. What is the mammalian dentate gyrus good for. *Neuroscience.* 2008;154:1155–72.
 51. Treves A, Rolls ET. Computational constraints suggest the need for two distinct input systems to the hippocampal CA3 network. *Hippocampus.* 1992;2:189–99.
 52. Cerasti E, Treves A. How informative are spatial CA3 representations established by the dentate gyrus? *PLoS Comput Biol.* 2010;6:e1000759.
 53. Lassalle JM, Bataille T, Halley H. Reversible inactivation of the hippocampal mossy fiber synapses in mice impairs spatial learning, but neither consolidation nor memory retrieval, in the Morris navigation task. *Neurobiol Learn Mem.* 2000;73:243–57.
 54. Lee I, Kesner RP. Encoding versus retrieval of spatial memory: Double dissociation between the dentate gyrus and the perforant path inputs into CA3 in the dorsal hippocampus. *Hippocampus.* 2004;14:66–76.
 55. Florian C, Roullet P. Hippocampal CA3-region is crucial for acquisition and memory consolidation in Morris water maze task in mice. *Behav Brain Res.* 2004;154:365–74.
 56. Stupien G, Florian C, Roullet P. Involvement of the hippocampal CA3-region in acquisition and in memory consolidation of spatial but not in object information in mice. *Neurobiol Learn Mem.* 2003;80:32–41.
 57. Schwegler H, Mueller GG, Crusio WE, Szemes L, Seress L. Hippocampal morphology and spatially related behavior in Long-Evans and CFY rats. *Hippocampus.* 1993;3:1–7.
 58. Bernasconi-Guastalla S, Wolfer DP, Lipp HP. Hippocampal mossy fibers and swimming navigation in mice: correlations with size and left-right asymmetries. *Hippocampus.* 1994;4:53–63.
 59. Pleskacheva MG, Wolfer DP, Kupriyanova IF, Nikolenko DL, Scheffrahn H, Dell’Omo G, et al. Hippocampal mossy fibers and swimming navigation learning in two vole species occupying different habitats. *Hippocampus.* 2000;10:17–30.
 60. Schwegler H, Crusio WE. Correlations between radial-maze learning and structural variations of septum and hippocampus in rodents. *Behav Brain Res.* 1995;67:29–41.
 61. Crusio WE, Schwegler H, Lipp HP. Radial-maze performance and structural variation of the hippocampus in mice: a correlation with mossy fiber distribution. *Brain Res.* 1987;425:182–5.
 62. Schöpke R, Wolfer DP, Lipp HP, Leisinger-Trigona MC. Swimming navigation and structural variations of the infrapyramidal mossy fibers in the hippocampus of the mouse. *Hippocampus.* 1991;1:315–28.
 63. Prior H, Schwegler H, Ducker G. Dissociation of spatial reference memory, spatial working memory, and hippocampal mossy fiber distribution in two rat strains differing in emotionality. *Behav Brain Res.* 1997;87:183–94.
 64. Lipp HP, Schwegler H, Heimrich B, Driscoll P. Infrapyramidal mossy fibers and two-way avoidance learning: developmental modification of hippocampal circuitry and adult behavior of rats and mice. *J Neurosci.* 1988;8:1905–21.
 65. Keeley RJ, Wartman BC, Häusler AN, Holahan MR. Effect of juvenile pretraining on adolescent structural hippocampal attributes as a substrate for enhanced spatial performance. *Learn Mem.* 2010;17:344–54.
 66. Wartman BC, Gervais NJ, Smith C, Comba R, Mumby DG, Holahan MR. Enhanced adolescent learning and hippocampal axonal projections following preadolescent spatial exposure to a water or dry maze. *Brain Res.* 2012;1475:37–48.
 67. Ruediger S, Vittori C, Bednarek E, Genoud C, Strata P, Sacchetti B, et al., Caroni P. Learning-related feedforward inhibitory connectivity growth required for memory precision. *Nature.* 2011;473:514–8.
 68. Marr D. A theory of cerebellar cortex. *J Physiol (Lond).* 1969;202:437–70.
 69. Marr D. Simple memory: a theory for archicortex. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1971;262:23–81.
 70. Leutgeb JK, Leutgeb S, Treves A, Meyer R, Barnes CA, McNaughton BL, et al. Progressive transformation of hippocampal neuronal representations in morphed environments. *Neuron.* 2005;48:345–58.

RESEARCH ARTICLE

Hippocampal Synaptic Expansion Induced by Spatial Experience in Rats Correlates with Improved Information Processing in the Hippocampus

Mariana Carasatorre¹, Adrian Ochoa-Alvarez¹, Giovanna Velázquez-Campos^{2,3}, Carlos Lozano-Flores¹, Sofía Y. Díaz-Cintra¹, Víctor Ramírez-Amaya^{3*}

1 Department of “Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología, Instituto de Neurobiología”, Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro, México, **2** Department of “Neurobiología Conductual y Cognitiva, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México”, Querétaro, México, **3** Department of “Microbiología, Maestría en Neurometabolismo & Maestría en Nutrición Humana, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México

* vramirez@unam.mx



OPEN ACCESS

Citation: Carasatorre M, Ochoa-Alvarez A, Velázquez-Campos G, Lozano-Flores C, Díaz-Cintra SY, Ramírez-Amaya V (2015) Hippocampal Synaptic Expansion Induced by Spatial Experience in Rats Correlates with Improved Information Processing in the Hippocampus. PLoS ONE 10(8): e0132676. doi:10.1371/journal.pone.0132676

Editor: Thierry Amédée, Centre national de la recherche scientifique, University of Bordeaux, FRANCE

Received: August 28, 2014

Accepted: June 18, 2015

Published: August 5, 2015

Copyright: © 2015 Carasatorre et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: Funding was provided by: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) P 51028325 and 130802 (VRA) and Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la Universidad Nacional Autónoma de México, Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN216510-23 (VRA). <http://www.conacyt.mx/> <http://dgapa.unam.mx/>.

Abstract

Spatial water maze (WM) overtraining induces hippocampal mossy fiber (MF) expansion, and it has been suggested that spatial pattern separation depends on the MF pathway. We hypothesized that WM experience inducing MF expansion in rats would improve spatial pattern separation in the hippocampal network. We first tested this by using the the delayed non-matching to place task (DNMP), in animals that had been previously trained on the water maze (WM) and found that these animals, as well as animals treated as swim controls (SC), performed better than home cage control animals the DNMP task. The “catFISH” imaging method provided neurophysiological evidence that hippocampal pattern separation improved in animals treated as SC, and this improvement was even clearer in animals that experienced the WM training. Moreover, these behavioral treatments also enhance network reliability and improve partial pattern separation in CA1 and pattern completion in CA3. By measuring the area occupied by synaptophysin staining in both the *stratum oriens* and the *stratum lucidum* of the distal CA3, we found evidence of structural synaptic plasticity that likely includes MF expansion. Finally, the measures of hippocampal network coding obtained with catFISH correlate significantly with the increased density of synaptophysin staining, strongly suggesting that structural synaptic plasticity in the hippocampus induced by the WM and SC experience is related to the improvement of spatial information processing in the hippocampus.

Additional funding was received from FOFI-UAQ-2014 [Fondos para el fomento de la investigación, Universidad Autónoma de Querétaro 2014]. M. Carasatorre also wants to gratefully acknowledge that she received a graduate scholarship from CONACyT-239669. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

Behavioral experience promotes structural synaptic plasticity [1]. One remarkable example is the observation that overtraining rats in the Morris water maze (WM) spatial task induces mossy fiber (MF) expansion in the hippocampal CA3 region [2, 3, 4]. This is observed across different rat strains with slightly different remodeling dynamics [4] and in mice [5] in response to environmental enrichment and fear conditioning [6, 7].

It has been proposed that these structural synaptic changes underlie long-term spatial memory formation [8, 9] of the acquired information [4]. However, even when the MF projection is endowed with synaptic plasticity, its sparse synapse density in CA3 pyramidal neurons [10] and the sparse activity of the dentate gyrus (DG, [11]) make it unlikely that the MF-CA3 synapses store information in long-term memory [12]. Conversely, it is possible that the function of the MFs is to direct the encoding of new information in the CA3-CA3 recurrent network, which operates as an auto-associative memory system capable of storing information [13, 14, 15]. For encoding, the MFs promote pattern separation in the CA3 network [13, 16]; this process transforms similar inputs into less-overlapping outputs, allowing us to discriminate between similar experiences and store them separately [17, 18]. Then later, during retrieval, even when a partial or distorted input is presented to the animal, the CA3 network is able to perform pattern completion [17, 18], but this process is thought to be directed by the perforant pathway [13].

Both pattern separation and pattern completion are information-processing functions of the hippocampal network, and they are fundamental features of episodic memory. These functions are also of great relevance for efficient information processing in the brain [18]; thus, any imbalance in these processes may underlie disease states [19] as well as neurocognitive aging [20]. The goal of the present work was to determine whether or not the behaviorally induced structural synaptic plasticity in the hippocampus affects spatial pattern separation.

In independent groups of rats we tested both a behavioral (DNMP) and a neurophysiological (catFISH) measure of spatial pattern separation. The DNMP task [21] revealed behavioural evidence of spatial pattern separation improvement after the animals experience both swimming exercise and particularly contextual learning (Fig 1).

The “catFISH” imaging method was done by detecting the immediate early gene *Arc* (or *Arg3.1*), and used as a neurophysiological measure of spatial pattern separation [22, 23]. *Arc* expression is used as a tag of neuronal activity [24], and we can distinguish its presence in the nuclei vs the cytoplasm, indicating recent or earlier neural activation, respectively. With this, we can distinguish the neural units activated by each of two spatial exploration experiences separated by a ~30-min interval, which we term epochs (Fig 2). With the similarity score from catFISH results we can determine, with one measurement, the extent of overlap between the ensembles recruited by each of the two independent behavioral epochs [23]. This provided a neurophysiological measure of spatial pattern separation [22, 23, 25 and 26] and support for the idea that a previous “spatial experience” improve it, as observed particularly in animals that underwent the WM, but also, the SC treatment.

Moreover, in the same animals used for catFISH, we also measured the area occupied by the synaptophysin staining in the hippocampal CA regions and found evidence of structural synaptic plasticity induced by the “spatial experience” (mainly in WM-treated and more subtly *in those treated as SC* animals). Interestingly, the increased area of synaptophysin staining correlated with the overlap measures obtained with catFISH, suggesting that this structural change may be related to some of the hippocampal information-processing improvements. Overall, the results indicate that a WM-training experience improves the behavioural and neurophysiological measures of spatial pattern separation, and suggest that the synaptic expansion induced

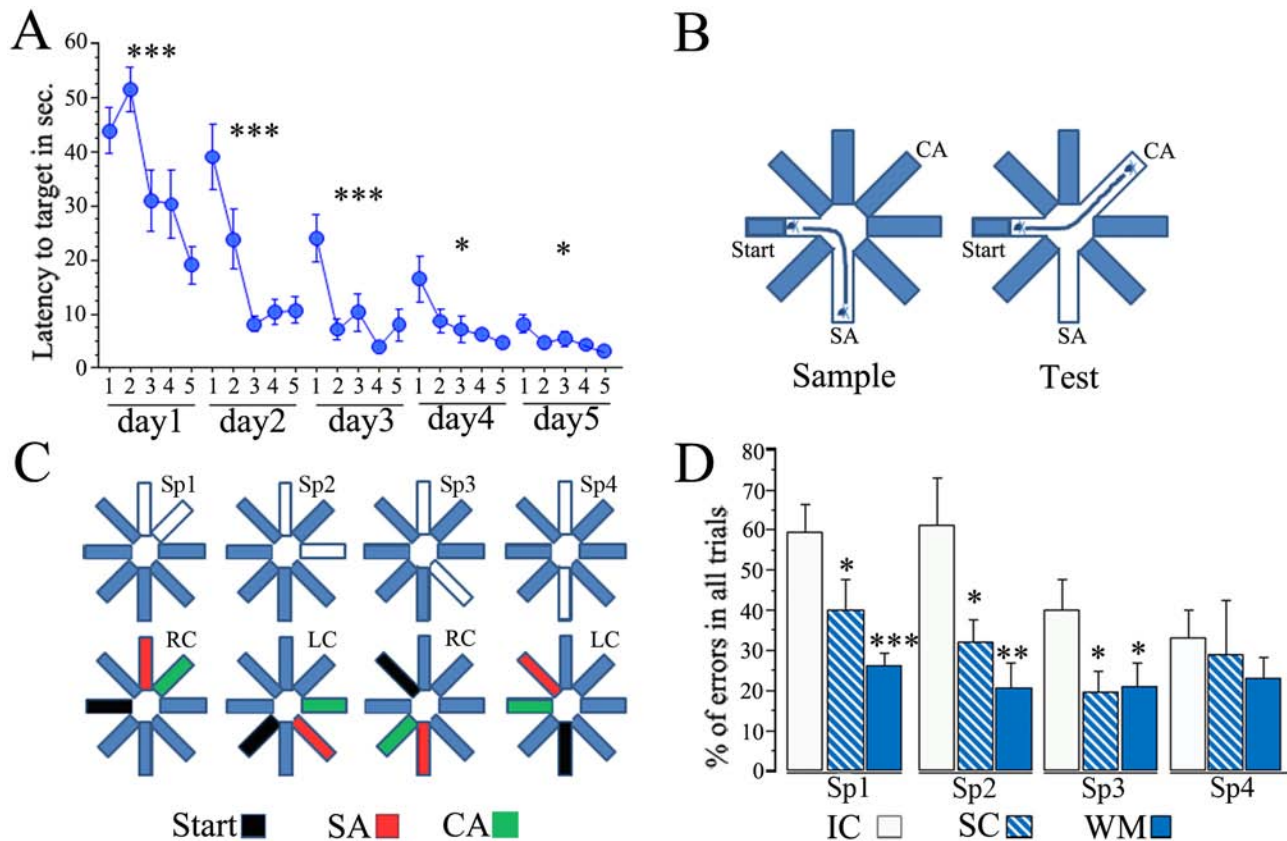


Fig 1. Spatial pattern separation in the DNMP task improves after water maze and swimming treatment. (A) Performance of animals during training in the Morris Water Maze task is expressed as the latency to reach the target platform; each point represents the average latency to reach the target from each pair of trials (5 pairs) from a total of 10 trials each animal underwent each daily session. The animals were trained during 5 sessions that occurred during 5 consecutive days. The trained animals showed a significant decrease in their latency to reach the target between trial pairs each day, particularly during the first 3 days (** $p < 0.001$, * $p < 0.05$, repeated measures ANOVA). (B) The DNMP task consists of placing the animal in the middle of the start arm and then allowing it to find food at the end of the sample arm (SA), this occurs during the sample phase; during the next phase the animal is released in the same place but it now needs to find the choice arm (CA), which is the only place where food is now available and is open only in this choice phase. To solve the task the animal needs to distinguish the location of the newly available corridor from that one visited in the previous trial and the difficulty comes with the proximity of the 2 arms. (C) Four different separations between the SA and CA were tested (upper diagram); in Sp1 the SA and CA were adjacent to each other; in Sp2 one arm separates the SA and CA; in Sp3 two arms separate the SA and CA; and finally in Sp4, the SA and CA were opposite from each other; note that the start arm (in black) was 90° from either the SA or the CA (lower diagram), and the position of these baited arms alternated between left choice (LC) and right choice (RC) throughout trials. (D) The DNMP results are expressed as the average percentage of errors in all trials for each group (\pm SEM); note that WM and SC animals present significantly fewer errors than the IC group (** $p < 0.001$, * $p < 0.01$, * $p < 0.05$) except in Sp4 where all groups perform well.

doi:10.1371/journal.pone.0132676.g001

by this behavioural experience may be related to the improvement of spatial information processing in the hippocampus.

Methods

Subjects

Four-month-old (± 2 weeks, ~ 380 grs ± 43 gr) male Wistar Rats obtained from the reproduction facilities at the Instituto de Neurobiología (UNAM) were housed individually in rat size acrylic boxes with rodents feeders cover, with wood shavings as bedding material, These boxes were located in the laboratory vivarium or animal room set to host up to 70 animals. The animal room is sound proof and water availability and disposal is in place. The animal room was kept on an inverted 12-h/12-h light/dark cycle with lights on at 9:00 p.m using an automated timer. The animal room also has a dim red light used for the experimenter's convenience to perform

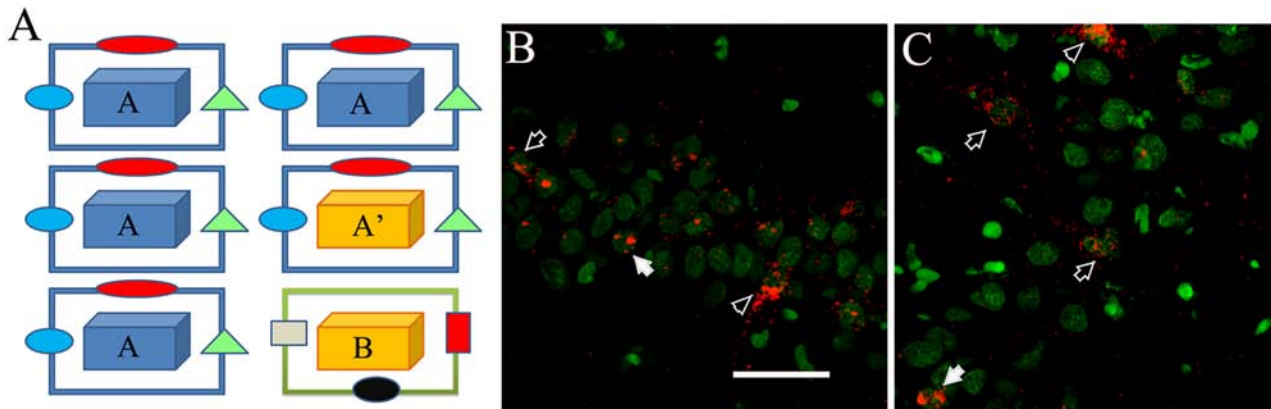


Fig 2. Exploration procedures and catFISH. (A) The animals explored the first environment for 5 min, and 25 min later they explored the second environment for 5 min in either the AA (same box same room), AA' (different box same room), or AB (different box different room) condition. Animals were sacrificed immediately after the second 5 min exploration and their brains extracted, frozen and later processed for FISH to detect Arc mRNA. Examples of CA1 (B) and CA3 (C) confocal images (1 filtered plane from the stack) stained for Arc mRNA detection and used to perform the catFISH analysis; in green is the nuclear counterstaining “Sytox” and in red is the Arc signal. Note that neuronal nuclei have texture, and their Sytox signal is dim, while glial cells look solid and bright. The Arc signal can be observed as 2 transcription foci inside the nuclei (solid arrows), or as cytoplasmic Arc staining surrounding the neuronal nuclei (open arrows), or as double Arc staining (arrowhead). The bar represents 50 μ m.

doi:10.1371/journal.pone.0132676.g002

the procedures carried out during the dark phase. Food (LabDiet) and water (filtered and UV treated) were provided *ad libitum* except during the delay non-matching to place (DNMP) task procedures, during which food consumption was restricted (see below). Animals were first habituated to the inverted light/dark cycle for 3 to 4 days, and then handled twice a day for 10 days prior to the behavioral procedures. The assignment of the animals to each group was done before all the experimental procedure began, in a semi random manner, deliberately equilibrating the groups to include animals with equivalent weight and age measures in each experimental group.

The Bioethics Committee from the “Instituto de Neurobiología, de la Universidad Nacional Autónoma de México”, which is ruled by Institutional Guidelines that establish that the academic committee will decide and respond upon bioethical requests, issues and rules, such as the approval of animals protocols to be performed in this institute). This committee approved all protocols used in the present study (headed by Dra. Magdalena Giordano Noyola INEU/SA/CB/034 2010; and by Dr. Carmen Aceves Velasco INEU/SA/CB/034 2013). All procedures were performed in accordance with international ethical guidelines (as those approved by the NIH) for animal care and handling. All efforts were made to minimize the animals’ suffering.

Behavioral Pre-treatments

Water maze overtraining (WM). The Morris water maze task consisted in placing the rat into a cylindrical tank of 1.5 m diameter that was filled to a height of 30 cm with water maintained at $23 \pm 1^\circ\text{C}$. The platform was submerged 1 cm below the water surface. The room where the tank was located was sound proof, and the walls were covered with white foamy liners with visual clues (big geometric colored figures and drawings); the room was illuminated only by 3 sources of dim light located in 3 of the corners. In each trial the animal was released facing the nearest wall at each starting point. The animal was retrieved from the water tank 30 sec after it reached the platform, and then placed into a waiting cage for 60 sec. After this 60-sec wait, the animal was released again into the tank at the next starting point. When the animal did not find the platform within 60 sec, the experimenter guided the subject to the platform by hand and waited 30 sec with the animal on the platform before retrieving it. Training

consisted of 5 identical daily sessions of 10 trials each. For each trial the animal was introduced into the pool at 1 of 10 different starting points (see [3] for more details). Each pair (i.e., 1–2; 3–4, etc.) had one starting point with a shorter distance to the target and the other with a longer distance to the target, but the average distance to the target was the same for each pair of starting points (i.e., 1–2; 3–4, etc.). The sequence designed for animals training was done in a semi random way that varied each day in which the experimenter that programmed such procedure only deliberately assigned an animal from each different group to the different time schedules throughout the duration of the procedure to spread all groups evenly across a time window of about 4 to 5 hours carried out between 10 hrs– 15 hrs. The rest of the behavioral procedures were done with the same rationale and time schedule.

Using a SmartSystem track recording device (San Diego Instruments, USA), we measured the latency to reach the target (in sec) as a measure of performance in the WM task. Since the average distance to the target is the same for each pair of trials, we used the average latency of each pair of trials (5 pair total) as a measure of WM performance for statistical analysis.

Swim control (SC). Animals in this condition were placed in the same tank, located in same room used for the WM-training task. Each animal was released 10 times at each of the 10 different starting locations, simulating the 10 trials used in the WM-training procedure, but the escape platform and the spatial cues were removed. Each animal was allowed to swim for the average time expended by the WM-trained animals in each trial for each daily session, and the swimming session was terminated by the experimenter who placed the animal in a box located in an adjacent room. This procedure is slightly different from that used previously [2, 3]. The current procedure promotes more swimming, because swimming activity is stimulated each time the animal is released (10 total). Also, some of the room conditions, such as light coming from the adjacent recording room computers, was a remarkable difference we experience here from those previous experiments [2, 3]. However, the lighting and water conditions temperature and cleanness conditions were kept the same as in the WM-training task.

Intact control (IC). Animals in this condition remained isolated in their home cages during the time the other animals underwent either the WM training or the SC procedure.

Delayed non-Matching to Place (DNMP)

This task was performed in an 8-arm radial maze (RAM) apparatus (Lafayette Inst., IN USA) following a previously reported procedure [21]. The apparatus had dark metal floors and translucent acrylic walls (for details see Lafayette Inst., IN USA). A circular hole at the end of each arm gave the animal access to a plastic box with one open side from which the animal could retrieve the piece of food (1/2 of a piece of Kellogg's Froot Loops); the other side was blocked by a metal grid, allowing the animal to smell the piece of food but not retrieve it. The day after the behavioral pre-treatment, all animals began a food-restriction schedule to maintain them at ~85% of their original body weight. A limited amount of food was provided once a day, and after a period of 5 to 6 days all animals reached this weight criterion. Seven days after the WM, SC, or IC pre-treatment, each animal was introduced into the RAM apparatus for one habituation session in which the animal was placed in the center octagon and allowed to retrieve a piece of food at the end of each arm; after retrieving all pieces of food the session ended. All behavioral testing occurred during the dark phase of the inverted light/dark cycle (lights on at 9:00 p.m). The experimenter who performed all the behavioural procedures was blind to all the previous experimental conditions.

The task began the day after habituation and consisted of two phases, the sample phase and the choice phase. The first arm through which the animal retrieved a piece of food is called the

sample arm (SA), where food was available only during the sample phase; in the choice phase the food was retrieved from the choice arm (CA).

During the sample phase the animal retrieved the piece of food from the sample arm (SA), and only the start arm and the SA were open. Rats were removed from the maze and placed into a waiting box after retrieving the piece of food from the SA. After a 30–45-sec intervening interval during which the arms were cleaned with 6% acetic acid, the choice phase began. During the choice phase (Fig 1B), the rat was placed again in the start arm; 5 sec later the door was opened, and the rat could retrieve the piece of food from the choice arm (CA). Food was placed in the SA but was no longer available (grid closed). In the choice phase, the start arm, the SA, and the CA were open, and all other doors closed.

The choice arm and the sample arm are separated by 4 different angles (Sp1-45°; Sp2-90°, Sp3-135°; Sp4-180°). Separation 1 can be considered the most difficult challenge since the separation between the SA and the CA is minimal, as they are adjacent to each other. The task becomes easier with more separation between arms; separation 4 is the easiest, since the SA and the CA are in opposite positions. In each trial the CA alternates between a left or right choice relative to the SA, and the spatial location of both the SA and CA varies across trials (Fig 1C).

During the choice phase the animal needed to remember the previously visited arm and distinguish its location from that of the newly opened arm. A correct choice was noted when the rat entered the baited CA when appropriate (choice phase), and entries into other arms were considered an error; we also considered as an error when the animal entered the correct arm but returned to the center octagon before reaching the end of the arm (This counts represent less than 10% of the errors). All errors were used to compute the final results for statistical analysis. Note that the spatial locations of the SA and CA varied across trials, and also that the left/right disposition of the CA relative to the SA varied across trials (Fig 1B and 1C).

Each daily session consisted of 4 trials, and each trial consisted of one sample and one test phase. The 4 trials on any given day were done with the same separation, using the 4 different configurations randomly for each separation with the start being 90° from either the sample or choice arm. Over a 4-day period the separation was chosen semi-randomly for each animal, such that the sequence in which each separation day occur (Sp1, Sp2, Sp3 or Sp4) is not consecutive and apparently is not present in a pattern. But is important to note that the sequence used in each animal was deliberately different, but the chosen days were selected with the same criteria. All animals experienced a total of 4 sessions with each separation, that is, 16 trials for each separation over a 16-day period for a total of 64 trials per animal. We used the percentage of errors for all trials as the dependent variable for statistical analysis and compared the IC, SC, and WM groups for their ability to distinguish between each separation.

Double Spatial Exploration for catFISH analysis

In an independent group of animals, this behavioral procedure was carried out in two different but adjacent rooms located 3.5 m from the animal colony room. Spatial exploration was carried out in an open field box (aprox 80 x 80) placed in a room, and the animals were handled for “forced exploration” for two “epocs”.

These two “epocs” occur in 3 different forms:

- (AA) same room, same box
- (AA') same room, different box
- (AB) different room, different box

We refer to these 3 conditions as the double exploration conditions. For details, each different box (A or B) was partitioned into 9 quadrants. The procedure consisted in placing the rat

into quadrant number 1; then every 15 sec the animal was “moved” to the center of the next quadrant “by the experimenter”, and after 5 min the animal had visited each of the 9 sectors of the box 2 or 3 times each, consistently. This procedure is considered forced exploration, and it is used to minimize the variability in the number of *Arc*-expressing cells among animals, but it induces *Arc* expression in the same proportion of neurons as free exploration [23]. Also, it minimizes the total exploration variability, since animal’s release stimulates exploration. Laboratory observations and previous work [23] suggest that the amount of actual exploration of the animals is similar among conditions (AA, AA’, AB).

After the first 5-min exploration, the rat was returned to its home cage for 25 min before beginning the second 5-min exploration, either in A again, or in A’, or in B. (Fig 2A).

Exploration A was done in an open, 70-cm square acrylic box with 20-cm-high walls that was located in room 1, which was 1.7 m x 2.3 m and had walls covered with sound-isolation materials and 2 posters as spatial cues.

Exploration A’ was done in a rectangular 65 cm x 75 cm open acrylic box with 20-cm-high walls located in room 1.

Exploration B was done in a 65-cm x 75-cm open acrylic box with 20-cm-high walls; it was located in room 2, which had dimensions of 2.17 m x 2.3 m; the walls were covered with sound-isolation materials and several colorful, foamy-paper figures as spatial cues.

Cage controls (CC): this condition was used to determine the basal levels of *Arc* expression, and the animals from this group remained undisturbed in their home cage and were sacrificed at times distributed throughout the time the rest of the animals underwent the double spatial exploration experience.

Compartmental Analysis of temporal activity using Fluorescence “In Situ” Hybridization (catFISH)

Brain extraction and cryosectioning. After the last spatial exploration (or CC condition) rats were sacrificed by live decapitation, and their brains were quickly extracted (< 3 min) and frozen (see [23]). Brain hemi-sections including the whole dorsal hippocampus were obtained; up to eight brain hemi-sections were placed into a mold, and a block was made using Tissue-Tek OCT compound (Miles, Elkhart, IN). Each block was cryo-sectioned into 20- μ M-thick coronal slice sections (Leica 1850, Leica Biosystems, Nussloch Germany) that were placed on a Superfrost Plus slides (VWR International).

Fluorescence In Situ hybridization (FISH). The slides on which the 20- μ m brain sections were mounted were immersed in 4% buffered paraformaldehyde for tissue fixation. The tissue was then washed in 2XSSC (Sigma, International) and treated with 0.5% acetic anhydride/1.5% triethanolamine (Sigma). After washing, the slides were immersed in 1:1 acetone/methanol solution, and then incubated in 1 \times pre-hybridization buffer (Sigma) for 30 min at room temperature. The *Arc* antisense riboprobe was synthesized in our laboratory, using digoxigenin-labeled nucleotides, from a plasmid kindly given by Dr. Paul Worley’s lab. The *Arc* riboprobe was diluted into 100 μ L of hybridization buffer (Amersham), denatured by heating at 95°C for 5 min, and then chilled on ice until it was added to each slide (100 ng riboprobe per slide section). Cover slips were placed on each slide, which was then placed in a plastic chamber and incubated in an oven (Binder, Tuttlingen Germany) at 56°C for 16 h. After the probe incubation period, the slides were washed several times in 2xSSC, then in 2 \times SSC with RNase A (10 μ g/mL) at 37°C to eliminate non-hybridized probe, and finally in 0.5 \times SSC at 56°C. Endogenous peroxidase activity was quenched with 2% H₂O₂ in Tris-buffered saline (TBS, Sigma), and then the slides were blocked (TSA Blocking Buffer, Perkin Elmer, MA USA) prior to an overnight incubation with anti-digoxigenin (HRP)-antibody conjugate (Roche, Hertfordshire,

UK. Cat# 11093274910, RRID: AB_514497) at 4°C. The specificity of this antibody was previously confirmed using appropriate control procedures, which are performed routinely by those performing the histological procedures in our laboratory. Slides were then washed in TBS containing 0.05% Tween-20, and the anti-digoxigenin antibody was revealed by using the Cy3 TSA system (Perkin Elmer, MA USA, diluted 1:75). Slides were then incubated with SYTOX green (Invitrogen, International) diluted 1:2000 in TBS to stain the cell nuclei. Finally, Vectashield anti-fade medium (Vector, Burlington, CA USA) was applied to each slide, and it was coverslipped and sealed with nail polish (for further details see [23]).

Image acquisition and analysis. Image stacks from 4–6 optimally *Arc*-FISH-stained slides were acquired using a Zeiss LSM 510 confocal microscope (Zeiss, Mexico) with a 40×/1.3 NA oil immersion objective, using the 543-nm helium/neon laser to excite the CY3 signal, and the 488-nm argon laser to excite the Sytox green signal. Routinely, the confocal settings for the CY3 *Arc* signal were optimized to detect only the intranuclear and cytoplasmic staining, minimizing the noise by adjusting the laser power, the amplifier, and offset accordingly. These parameters were established on a tissue section from a cage control animal and were kept constant for imaging all other brain sections on the same slide. The pinhole, Z-sectioning interval, and gain settings were kept constant for all the imaging. About 34–50 optical Z-sections of ~0.3-μm thickness were obtained from the 20-μm-thick tissue for each CA1 and CA3 image stack (Fig 2B and 2C; Fig 3). Four image stacks were obtained from each brain region (CA1

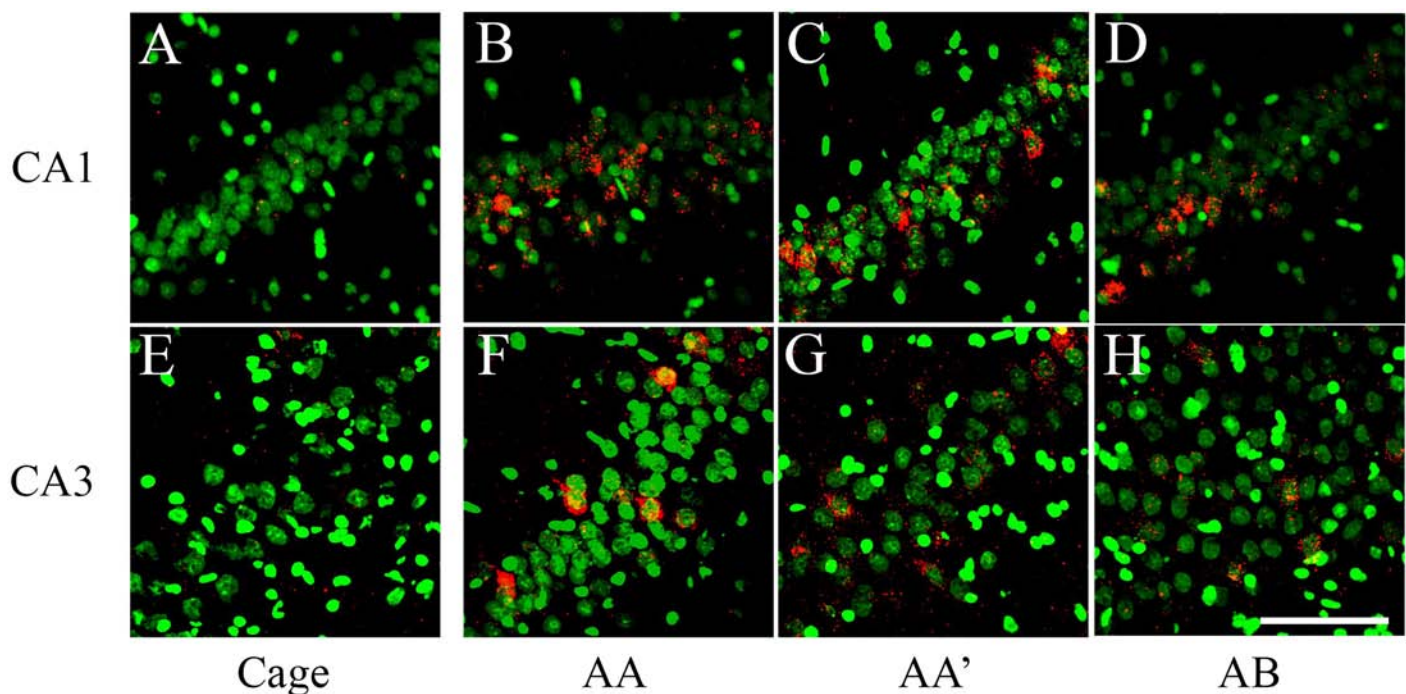


Fig 3. catFISH images from CA1 and CA3 from the different exploration procedures. Dorsal hippocampal tissue stained with fluorescent *in situ* hybridization (FISH) for *Arc* mRNA (in Red) revealed with Cy3 (Promega kit see [Methods](#)). Images were taken with the 40×/1.3 NA objective using a Zeiss LSM 510 or Zeiss LSM 710 confocal system with 2 different lasers either set to excite Cy3 (*Arc*) or SITOX-Green (Nuclear counterstaining in Green). All images were process with Image J and 40–55% of the stack was collapsed in 1 single image (using Z Project). Images then went through the median filter, using the exact same parameters for all (0.8 pixels). From A to D, the images were taken from the CA1 hippocampal network and from E to G, from the CA3 network. Images A and E were taken from a Cage control animal; B and F from an animal that underwent the AA double exploration; C and G from an animal that underwent the AA' double exploration condition; and D and H from an animal that underwent the AB double exploration condition. Calibration bar (lower right) represents 100 μm.

doi:10.1371/journal.pone.0132676.g003

and CA3) for a total of 8 images per section on the slide and, as mentioned before, a total of 4 to 6 optimally stained slides per block were imaged.

Confocal image stacks were analyzed using the Image J analysis software (Wayne Rasband, NIH). The experimenter who performed the analysis was blind to all the experimental conditions. All images were pre-processed with a median filter for noise reduction before manual-count analysis by human eye. The Sytox green nuclear counterstaining signal (which appears green in the images; Fig 2B and 2C; Fig 3) was used to identify the neuronal nuclei that were included in the analysis, while the glial nuclei were not included. This nuclear classification was previously validated using immunohistochemistry for neuronal and glial makers [27]. To minimize sampling errors and stereological concerns, an optical dissector technique was used, in which only neuron-like cells found in the middle 30% of the stacks were included in the analysis [23, 24]. This technique prevents the minor variations in cell volume from influencing sampling frequency and minimizes sampling errors and stereological concerns attributable to partial cells. An average of 1100 neurons per animal in CA1 and 920 neurons per animal in CA3 were included in the analysis.

Once neurons were identified, they were classified according to their cytoplasmic and nuclear *Arc* mRNA staining, detected with the CY3 signal (Fig 2B and 2C; Fig 3). Neurons whose nuclei were > 60% surrounded by CY3 signal in 4 or more Z-section planes were classified as cytoplasmic *Arc*-positive cells (Fig 2B and 2C; Fig 3). Neurons with two intense CY3 nuclear foci visible across 3 or more Z-section planes were classified as nuclear *Arc*-positive cells, and those that fulfilled both criteria were classified as double-activated cells. Cells that did not fulfil any of the previous criteria were considered *Arc* negative. The analysis yields the proportion of *Arc*-mRNA positive neurons (from each classification) out of the total population of neurons included in the analysis (Fig 4).

Similarity score calculation. This score takes into account the four possible cell-staining classifications: Negative (Neg), *Arc* intra-nuclear foci (*Arc*-Nuc), *Arc* cytoplasmic (*Arc*-Cyt), and *Arc* double (*Arc*-Dob) and reduces them to a single value according to the following procedure:

Arc-Nuc = Number of cells classified as: *Arc* nuclear

Arc-Cyt = Number of cells classified as: *Arc* cytoplasmic

Arc-Dob = Number of cells classified as: *Arc* double

Total-Cells = Number of cells classified as: Neg + Arc-Nuc + Arc-Cyt + Arc-Dob.

Epoch 1 = (Arc-Cyt+Arc-Dob)/Total-Cells

Epoch 2 = (Arc-Nuc+Arc-Dob)/Total-Cells

leastEpoch = Lowest value "Epoch 1 or Epoch 2"

p(E1E2) = Epoch 1 * Epoch 2

diff(E1E2) = (Arc-Dob/Total-Cells)-p(E1E2)

SiSc = diff(E1E2) / (leastEpoch - p(E1E2))

A value close to 1 represents a single neuronal population faithfully activated in both behavioral epochs, whereas a value close to 0 indicates that two, statistically independent cell populations were activated during the two epochs [Fig 5].

Synaptophysin/Map2 staining

Double immunohistochemistry for synaptophysin and Map2. Coronal brain sections (20 μ m) containing the dorsal hippocampus mounted on superfrost (VWR) slides adjacent to those used for catFISH were fixed with 2% buffered paraformaldehyde, quenched in 0.6% H₂O₂ in TBS for 15 min, and blocked with TSA blocking buffer (PerkinElmer, MA USA) at room temperature for 30 min. The sections were then incubated overnight at 4°C with

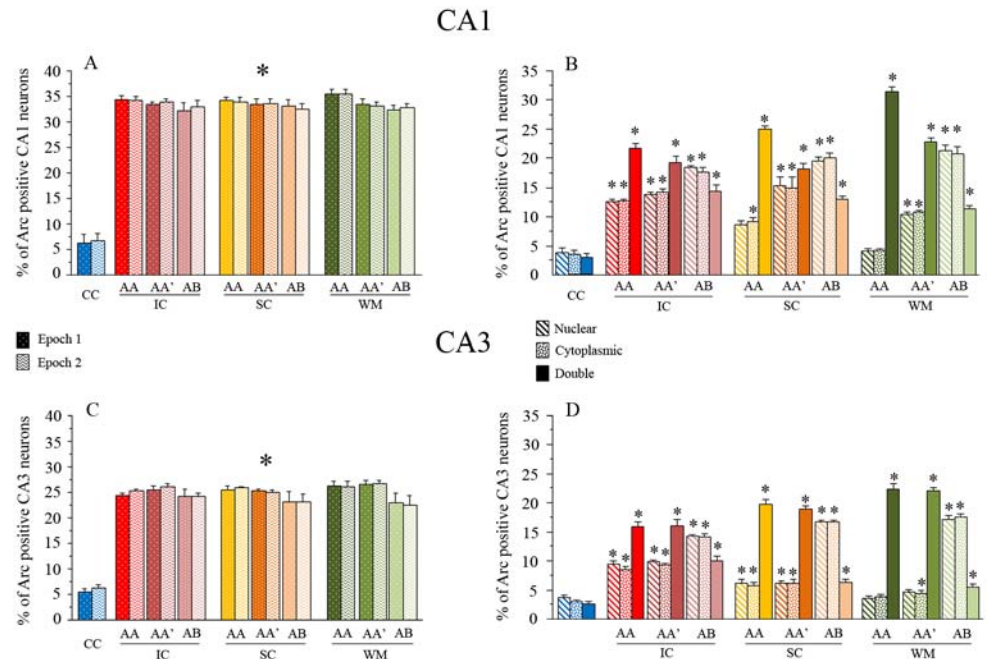


Fig 4. Raw catFISH results. The bar graphs (in A and C) show the percentage of Arc-expressing cells in the CA1 (A) and CA3 (C) networks in each epoch. The solid bars represent the proportion of active cells for epoch 1, and the lighter, textured bars represent the proportion of active cells for epoch 2 (* $p < 0.01$ Bonferroni posthoc analysis for all exploration groups vs. the cage control). The percentage of Arc-expressing cells for each classification is shown in B and D. Each bar represents the proportion of nuclear (Diagonal line pattern), cytoplasmic (Dots), or double (Solid) Arc mRNA staining. Note that the proportion of double activated cells in both CA1 and CA3 after the AA exploration condition is larger than other classifications (i.e., nuclear and cytoplasmic), which is particularly clear in the WM-treated animals (* $p < 0.01$ Bonferroni posthoc analysis vs. the cage control).

doi:10.1371/journal.pone.0132676.g004

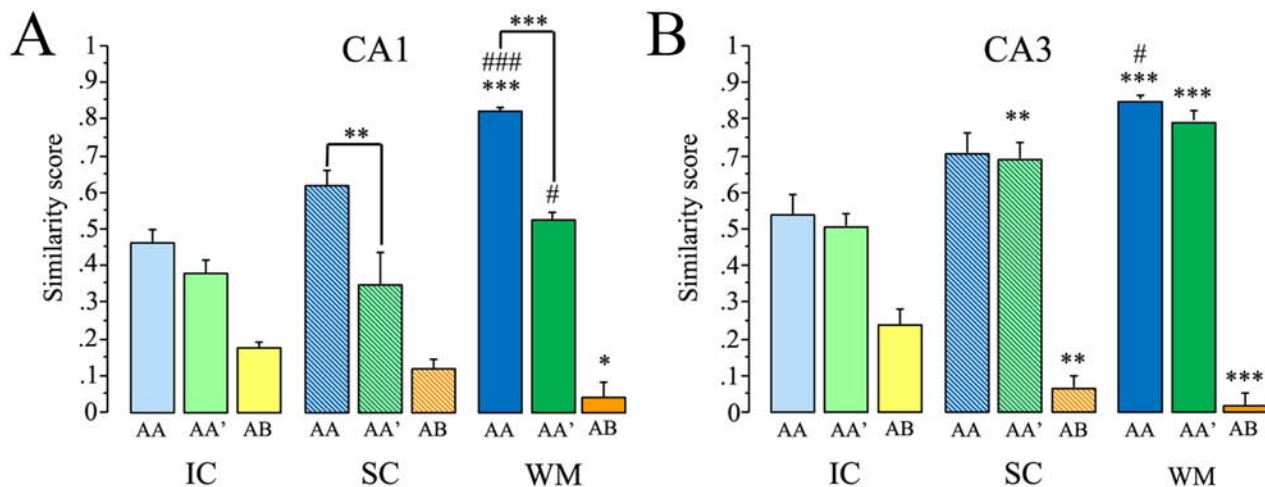


Fig 5. The similarity score (SiSc) results from catFISH. This measure takes into account the 3 Arc staining classifications and expresses it in a single value. This value (\pm SEM) represents the degree of overlap between the two recruited ensemble in the CA1 (A) and CA3 (B) networks from animals exposed to the AA, AA', and AB double exploration conditions after being pre-treated as either intact controls (IC), swimming controls (SC), or water maze trained (WM). Bonferroni *post hoc* analysis of the WM group vs. its respective IC *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$; or vs. its respective SC (### $p < 0.001$, # $p < 0.05$), and the important intragroup differences are shown with lines (*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$).

doi:10.1371/journal.pone.0132676.g005

monoclonal mouse anti-synaptophysin antibody (Sigma Cat# S5768, RRID: AB_477523) diluted 1:250 in TSA blocking buffer. The specificity of this and the other antibodies used here were previously verified using appropriate control procedures. After incubation, the slides were washed with TBS, pH 7.5, containing 0.05% Tween-20 and later with TBS alone. After washing, the slides were incubated in the secondary antibody (biotinylated goat-anti mouse, Vector Cat# BA-9200, RRID: NA, 1:500 in TSA blocking buffer) for 2 h at room temperature, washed, and then incubated in the Avidin-Biotin (AB) amplification reagent (Vector Labs, CA USA) for 45 min. After washing with TBS, the slides were incubated for 45 min with the CY3 fluorophore from the TSA system (diluted 1:75 in amplification buffer from the Perkin Elmer kit, MA USA). Slides were then treated with mouse-on-mouse (Vector Labs Cat# MKB-2213, CA USA) following the manufacturer's instructions for double detection with 2 antibodies raised in mouse. After this, the slides were washed and blocked with TSA blocking buffer for 20 min. We then incubated them overnight at 4°C with the monoclonal mouse anti-MAP-2 antibody (1:100, Millipore Cat# AB5622, RRID: AB_11213363, MA USA). After incubation, the sections were washed in TBS, incubated in the AB blocking kit (Vector Labs, CA USA), washed again, and then incubated with the secondary antibody (biotinylated goat-anti mouse, Vector Cat# BA-9200, RRID: NA, 1:500 in TSA blocking buffer) for 2 h at room temperature. After washing, the slides were incubated in the AB amplification kit (Vector Labs, CA USA) for 45 min, washed again, and finally incubated with 1:100 FITC fluorophore from the TSA system kit (Perkin Elmer). After this final detection, slides were counterstained with DAPI. VectaShield mounting medium was applied and cover slips were placed over the slides. All antibodies were validated for specificity, using appropriate controls such as incubation without the primary or secondary antibodies, performed by the experimenter(s) in charge of the histological procedures. Finally the slides were sealed with nail polish and stored in the dark at 4°C until used for image acquisition.

Image acquisition and analysis of synaptophysin- and Map2-stained sections. MosaiX images were obtained with the APOTOME system equipped with an oil-immersed 25X/0.80NA Plan-Apochromat objective. The MosaiX module (Carl Zeiss, International) was used to construct one image mosaic or montage containing a total of 30 images with which we captured the entire CA3 and CA1 hippocampal regions from each coronal brain section on the slide. A total of 7 to 8 montage images (from 7 to 8 slides) per animal were obtained. The imaging parameters were set in one IC animal from each slide, and were optimized to highlight both Map2 (FITC) and synaptophysin (Cy3) staining found in the CA3 *SL*, minimizing the background for these signals. Once these parameters were set, they remained constant for the rest of the slide.

Analysis of the immunofluorescence for synaptophysin/Map2 staining was performed using ImageJ software (Freeware NIH USA). All images were pre-processed with the median filter for noise reduction. Then, each image was segmented into 14 different regions of interest (ROIs). The ROIs were drawn to segment different portions of the CA3 and CA1 dendritic regions (Fig 6A). In CA3, we distinguished between the *stratum oriens* and *stratum lucidum*, and between proximal and distal portions of the *stratum radiatum* based on their proximity to the CA3 pyramidal cell soma. The CA3 region was also divided into 3 regions (distal, medial, and proximal) based on their proximity to the DG granular layer (12 ROIs total in CA3). Finally, we divided the CA1 region between the *stratum oriens* (CA1 SO) and *stratum radiatum* (CA1 SR). It is possible that the 2 ROIs selected in the CA1 region may contain a portion of CA2. These ROIs are shown in Fig 6A and listed in the legend. Once the ROIs were drawn, we established an optical density threshold for each signal (CY3 and FITC) using the hippocampus MosaiX image from the IC on the same slide. We then measured the area occupied by each signal in each ROI and performed the same procedure on each image of the slide, keeping the

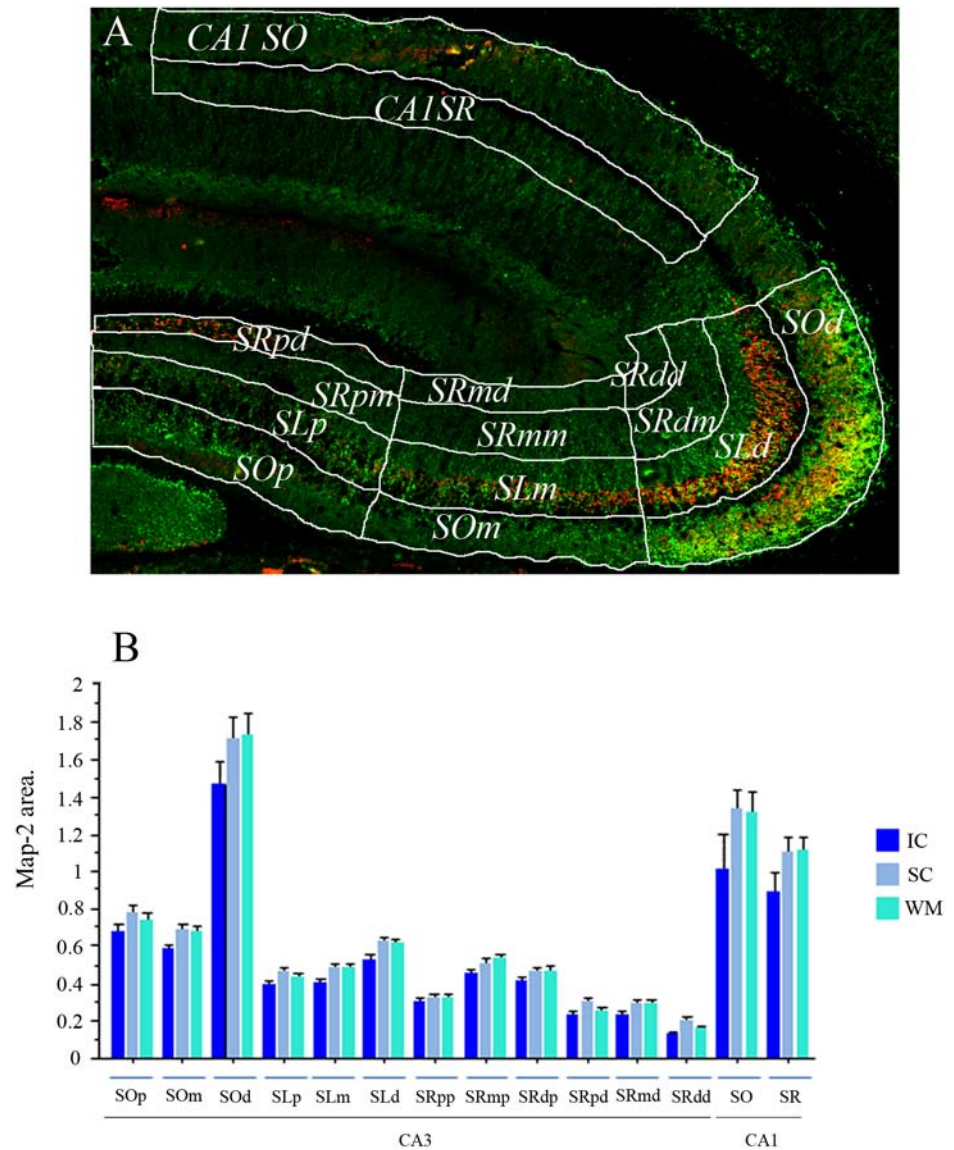


Fig 6. Synaptophysin/Map2 segmentation and Map2 staining area analysis. (A) A representative synaptophysin (Red) / Map2 (Green) stained image is shown with the drawings that defined the different hippocampal dendritic segments regions of interest (hippocampal segments ROIs). These hippocampal segments ROIs included the CA3 *stratum oriens*, divided into 3 regions based on their proximity to the dentate gyrus (DG): *stratum oriens distal* (SOd), *stratum oriens medial* (SOM), and *stratum oriens proximal* (SOp); the CA3 *stratum lucidum* was also divided into 3 regions, the *stratum lucidum distal* (SLd), *stratum lucidum medial* (SLm), and *stratum lucidum proximal* (SLp). The CA3 *stratum radiatum* was divided into 6 regions, depending on their proximity to the DG and to the pyramidal cell soma: *stratum radiatum distal medial* (SRdm), *stratum radiatum medial medial* (SRmm), *stratum radiatum proximal medial* (SRpm), *stratum radiatum distal distal* (SRdd), *stratum radiatum medial distal* (SRmd), and *stratum radiatum proximal distal* (SRpd). Finally, the last 2 ROIs correspond to the CA1 *stratum oriens* (CA1 SO) and the CA1 *stratum radiatum* (CA1 SR). In the bar graph (B) the Map2-stained area expressed in pixels is shown for each hippocampal segment ROI. It is important to emphasise that No significant differences were found among groups (IC, SC, and WM) in the Map2-stained area used for the synaptophysin analysis.

doi:10.1371/journal.pone.0132676.g006

same threshold parameters and following the same procedure. The data we obtained were the areas occupied by each signal expressed in pixels. It is important to clarify that Map2 signal was used as a guide to draw an ROI of the area surrounding the Map2 staining edges, defined with a threshold, and about a 10% enlargement to cover the possible area where the synaptophysin staining should be. For synaptophysin, the area measured was the actual staining area detected; the thresholds for both Map2 and Synaptophysin were systematically set in a cage control tissue from each slide and kept constant for the rest of the slide analysis. Then, the measures used for analysis was the area of synaptophysin staining divided by the ROI area defined by the Map2 staining x 100. And note that no differences were found in any ROI in the MAP2 defined area between groups (Fig 6B).

Synaptophysin staining is observed particularly clear in the hippocampal region CA3 but is also clear with the proper magnification in the CA1 region (Fig 7C and 7G), this may be because of the prominent size of the MF boutons. It is also ubiquitously observed throughout the brain and the rest of the hippocampus, with different signal qualities. Previous reports in our field used synaptophysin immunostaining to detect MF expansion after behavioural experience [4, 28]. We also used Map-2 staining since this protein is constitutively expressed in dendrites of hippocampal pyramidal cells and for that reason it can be used to reveal the dendritic shape in relation to the synaptophysin stained area. This procedure provides a correction parameter for anatomical variations concerns due to the histological procedures, such a

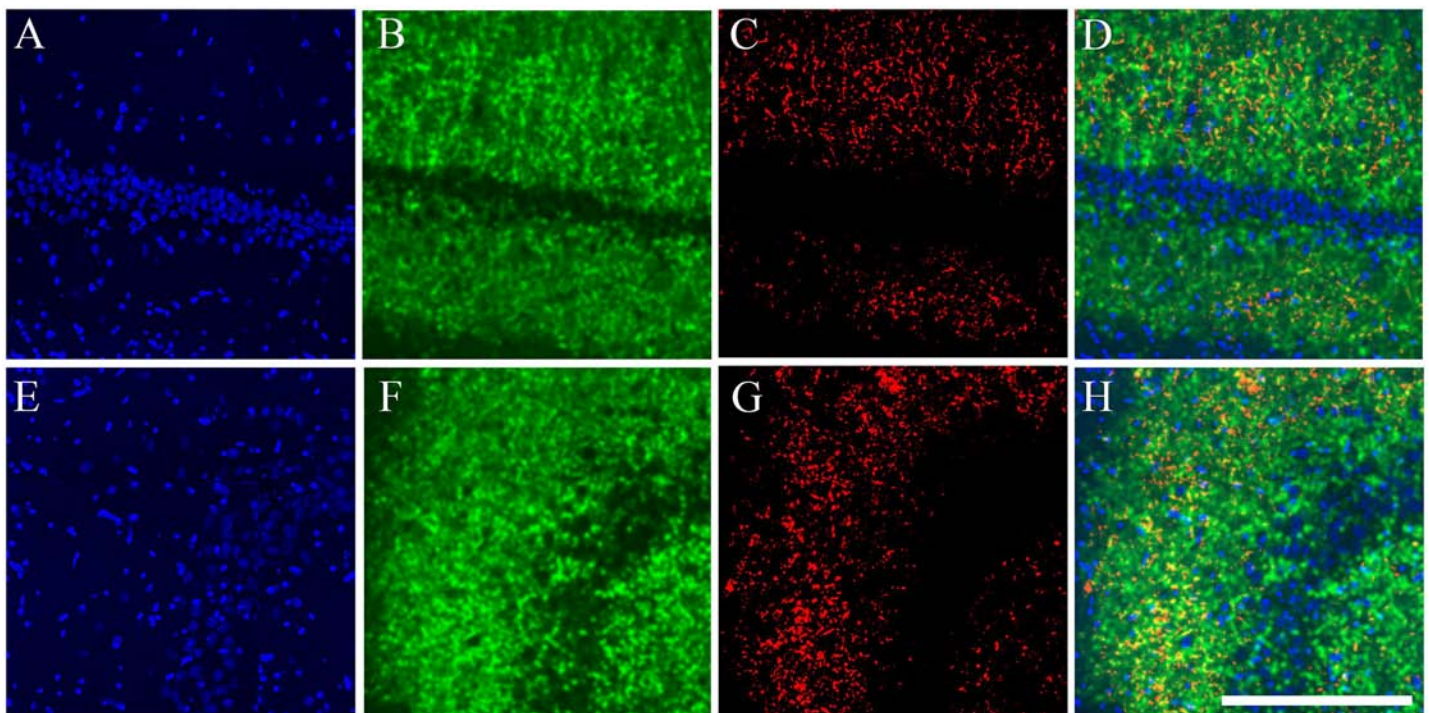


Fig 7. Synaptophysin/Map2 Split Channel and Higher Magnification Images. Immunostained tissue for synaptophysin and Map2 imaged with the Zeiss ApoTome™ system, equipped with a motorized stage which allows the acquisition of montage or mosaic images with the MosaiX software. Images were taken with the 25X/0.8 NA objective. One Zeiss LSM file containing the MosaiX montage was open using imageJ software and the color channels were separated (split channels). Then each channel went through the median filter and assigned its representative color. The nuclear counterstaining DAPI is shown in blue (A for CA1 and E for CA3). Map 2 is shown in Green (B for CA1 and F for CA3) and synaptophysin is shown in RED (C for CA1 and G for CA3). The merge colors image is shown in D for CA1 and H for CA3. The magnification shown here was done by only trimming the montage image and by applying a regular zoom-in using adobe photoshop. This is a proper example of the image resolution the experimenter had available for analysis (He can perform the same simple zoom-in magnification with the same results), and was obtained from a similar montage image as those shown in Figs 6 and 8. Calibration bar (lower right) represents 200 μ m.

doi:10.1371/journal.pone.0132676.g007

shrinkage or flattening of the tissue. For this reason it is more accurate to express a ration of synaptophysin stained area on the Map-2 selected ROI area.

It is important to acknowledge that synaptophysin is a protein present in synaptic vesicles. For this reason with this staining we can only detect part of a pre-synaptic structure, more detailed experiments should be done to visualize and measure the whole synaptic structure (i.e. pre and post synaptic).

Statistical analysis

Group differences were analyzed by a one-way ANOVA followed by a Fisher or Bonferroni *post hoc* test where appropriate, also a 2 way ANOVA was applied where appropriate. A repeated measure ANOVA was also performed for the behavioral results, and Pearson's correlation analysis was used on the SiSc and the synaptophysin/Map2 area. A paired T test was used to compare CA1 and CA3 Arc-positive neurons after exploration.

Results

Morris water maze overtraining improves the performance in a DNMP task

Since the DNMP task was previously used to measure spatial pattern separation and WM training induces mossy fiber expansion, we test the hypothesis that WM training inducing MF expansion could improve the performance of animals in the DNMP task.

Training in the WM consisted of 5 daily sessions of 10 trials each, and the latency to reach the target in each pair of trials (5 pairs) was used for statistical analysis (see [Methods](#)). The results revealed a significant learning curve on each day (Repeated measures ANOVA: day 1, $F_{8,4} = 6.61$ $p < 0.001$; day 2, $F_{8,4} = 12.679$ $p < 0.001$; day 3, $F_{8,4} = 7.481$ $p < 0.001$; day 4, $F_{8,4} = 3.799$ $p = 0.0123$; and day 5, $F_{8,4} = 3.028$ $p = 0.0317$), indicating that latency gradually decreased on subsequent trials each day. Note, however, that on the last two days (4th and 5th), the animals reached a performance plateau ([Fig 1A](#); [S1 File](#)); this kind of performance was previously considered as overtraining [3].

Seven days later, the WM animals (WM $n = 10$), animals treated as swimming controls (SC $n = 11$), and an intact control group (IC $n = 13$) were trained in a delay non-matching to place (DNMP) task designed to test spatial pattern separation [21]. The number of animals is similar to that used in a previous report [21]. In the present experiment, the DNMP task was carried out in two phases (with half the animal sample in each phase) separated by a 6 weeks interval, no clear behavioral differences in the animal's performance were detected between phases.

This task tests the ability of rats to choose between two arms with different spatial separations.

The results revealed significant differences between groups in the number of errors in Sp1 (one-way ANOVA: $F_{2,31} = 8.45$ $p < 0.01$), Sp2 ($F_{2,31} = 5.63$ $p < 0.01$), and Sp3 ($F_{2,31} = 3.36$ $p < 0.05$). The *post hoc* Fisher analysis revealed highly significant differences between WM and IC animals in both Sp1 and Sp2 ($p < 0.01$) and also significant differences in Sp3 ($p < 0.03$). The SC animals and also WM showed significantly fewer errors than IC animals in these 3 separations ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively). No differences were found between the SC and WM groups. Overall, the behavior of both SC and WM animals indicated improved spatial pattern separation ([Fig 1D](#); [S2 File](#)).

When the number of errors across the different separations were compared (repeated measures ANOVA), we found significant differences between groups ($F_{2,31} = 5.528$ $p < 0.01$) and between separations ($F_{3,6} = 4.754$ $p < 0.01$). The *post hoc* Fisher analysis revealed a significantly

higher number of errors in Sp1 and Sp2 when compared to both Sp3 and Sp4 ($p < 0.05$), indicating that errors were made mainly in the hardest challenges (Sp1 and Sp2). For the group comparisons the *post hoc* Fisher analysis revealed significant differences between the WM and SC groups compared to the IC group ($p < 0.01$ and $p < 0.01$, respectively), confirming that SC and particularly WM-treated animals perform better than the IC group.

When this analysis was done with the split by groups option, which allowed us to perform the repeated measures ANOVA in each individual group (WM, SC, and IC), significant differences between Sp1 and Sp2 vs Sp3 and Sp4 were found only in the IC group ($F_{3,12} = 6.37$, $p < 0.01$), indicating that this group did not distinguish well between closely spaced arms.

Cellular-compartment analysis of temporal activity using fluorescent in-situ hybridization (catFISH) for the immediate early gene *Arc*

Vazdarjanova and Guzowski [23] had previously shown results obtained with catFISH and the SiSc to measure the degree of overlap in the ensembles recruited by a double spatial exploration experience of different contexts (AB) that directly or indirectly [18] reflects spatial pattern separation. With that in mind we decided to measure with catFISH and the SiSc results, obtained after 3 different double spatial exploration conditions (AA, AA' and AB), the degree of overlap between the recruited ensembles as a measure that indicates, directly or indirectly, spatial pattern separation. A good bet given the DNMP evidence indicating that previous “*spatial experience*” improves spatial pattern separation. We then studied the neurophysiological correlates of this behavioral improvement by using the compartmental analysis of temporal activity with fluorescence in situ hybridization (catFISH) imaging method [24].

In an independent group of animals ($n = 42$), we performed catFISH in the CA1 and CA3 hippocampal networks. Here again, the animals were pre-treated in either the WM task ($n = 13$), the SC condition ($n = 13$), or as IC ($n = 16$). Seven days later, all the animals were exposed to a double spatial exploration experience for catFISH [24], which consists of two 5-min spatial-exploration epochs separated by an interval of 25 min, with 3 possible configurations: The AA groups ($n = 4$ per group, total $n = 12$) experienced a double spatial exploration in the same box and the same room; the AA' groups ($n = 4$ per group, total $n = 12$) experienced a double spatial exploration of two different boxes located in the *same room*; and the AB groups ($n = 4$ per group, total $n = 12$) underwent a double exploration of two different boxes located in different rooms (Fig 2A). The rest of the animals ($n = 6$) were used as cage controls (CC) for the catFISH analysis, providing a negative control for *Arc* mRNA expression (Fig 3A and 3E). The number of animals used in catFISH experiments [23, 24] can be low since the statistical validity of the catFISH analysis is based more upon the number of neural units included in the analysis, a similar rationale as that use in electrophysiological measure, with greater numbers (An average of 1100 neurons per animal in CA1 and 920 neurons per animal in CA3 were included in the analysis). In the present experiments, the catFISH study was also done in duplication with about 3 animals per double exploration condition and pre-treatment, the final N was reached after selecting the blocks from each catFISH run based in the assessment, performed by a experimenter blind to the experimental conditions, of optimal staining and preservation conditions of the tissue sections in the block.

Note that the two boxes used for the double exploration conditions (in AA' and in AB) differed only slightly in shape and that the most salient feature that distinguished the explorations was the room (see Methods).

The raw catFISH results (Fig 4) revealed that in the CA1 hippocampal network each spatial-exploration epoch induced *Arc* mRNA expression in ~33% of the pyramidal neuron population (Fig 4A; S3 File). A one-way ANOVA of the total *Arc*-expressing cells in each epoch revealed

significant differences among groups (Epoch 1: $F_{9, 32} = 66.42$ $p < 0.01$; Epoch 2: $F_{9, 32} = 83.56$ $p < 0.01$), and the respective Bonferroni *post hoc* analyses revealed that all groups showed a significantly higher percentage of neurons positive for *Arc* mRNA (all classifications) than the cage control group ($p < 0.001$) for all exploration groups, and no differences in the proportion of *Arc*-expressing cells were found among the groups of animals that underwent the double spatial exploration experience. In the CA3 network each behavioral epoch induced *Arc* mRNA expression in ~25% of the pyramidal neuron population (Fig 4C; S4 File); similarly, the one-way ANOVA performed on the percentage of CA3 neurons expressing *Arc* mRNA in each epoch revealed significant differences among groups (Epoch 1: $F_{9, 32} = 142.89$ $p < 0.01$; Epoch 2: $F_{9, 32} = 148.27$ $p < 0.01$), and the respective Bonferroni *post hoc* analyses revealed that all groups showed a significantly higher percentage of neurons positive for *Arc* mRNA (all classifications) than the cage control group ($p < 0.001$), while differences among the exploration groups were not detected. These results indicate that each spatial exploration epoch stimulates neural activity (significantly more *Arc*-expressing neurons above CC levels) in both the CA1 and CA3 hippocampal networks and that this activity results in *Arc* mRNA expression in a percentage of neurons that does not differ among exploration groups or between epochs. It is important to note, however, that the same exploration experiences recruit different proportions of neurons in CA1 than CA3 networks ($t = 35, -22.903, p < 0.05$).

By distinguishing between nuclear, cytoplasmic, and double *Arc* mRNA staining, we were able to distinguish between neurons activated only by the last exploration (Nuclear staining), neurons activated only by the first exploration (Cytoplasmic staining), and neurons activated by both explorations (Nuclear and Cytoplasmic staining).

We observed significant differences in the proportion of *Arc* positive neurons between the double exploration conditions in both the CA1 (Fig 2B) (Nuclear: $F_{9, 32} = 71.81$ $p < 0.01$; Cytoplasmic: $F_{9, 32} = 50.5$ $p < 0.01$; double: $F_{9, 32} = 106.313$ $p < 0.01$) and the CA3 (Fig 2D) (Nuclear: $F_{9, 32} = 112.19$ $p < 0.01$; Cytoplasmic: $F_{9, 32} = 157.05$ $p < 0.01$; double: $F_{9, 32} = 119.19$ $p < 0.01$) hippocampal networks.

These raw catFISH results appear to show that in both the CA1 and CA3 networks, the WM- and SC-pre-treated animals tend to use more overlapping ensembles after the AA double exploration condition and more independent (less overlapping) ensembles in the AB double exploration condition, in contrast to the intact control animals. But a more eloquent analysis required further data processing, so we used the similarity score (SiSc) measure, which is obtained by reducing the four cell-staining parameters (negative, *Arc*-nuclear [second epoch only], *Arc*-cytoplasmic [first epoch only], and *Arc*-double [both epochs]) into a single value; a SiSc value close to 0 represents the selection of two statistically independent ensembles of neurons in each epoch, while a value close to 1 represents the selection of the same ensemble of neurons in each epoch [23]. For the SiSc analysis we excluded the cage-control animals, since they were used only to determine the basal levels of *Arc* mRNA expression and to establish that the observed proportion of *Arc* mRNA-expressing cells resulted from the behavioral experience.

The SiSc in the CA1 network differed significantly among the different groups ($F_{8, 27} = 62.16$ $p < 0.01$). Bonferroni *post hoc* analysis revealed that when the animals were exposed to the AB condition, the SiSc of the CA1 network from WM-treated animals was significantly lower than that obtained in IC animals ($p < 0.05$); similarly, after this double exploration condition (AB) the SiSc obtained in the hippocampal region CA1 from SC animals did not differ from that of the IC group, indicating that only WM animals present the lowest degree of overlap after the AB condition. This can be interpreted as an improved spatial pattern separation in the CA1 network of WM-treated animals (Fig 5A; S3 File).

Interestingly, when WM animals were exposed to the AA' condition, their SiSc in CA1 was significantly lower than that obtained in the AA condition ($p < 0.001$), indicating that in response to gradual changes in the environment, the CA1 network of WM animals reacts by recruiting a slightly different ensemble, and this can be interpreted as partial pattern separation in the CA1 network of WM animals. It is important to point out that also in the CA1 region from SC animals the SiSc was significantly lower after the AA' double exploration than after the AA condition ($p < 0.001$). Importantly, these differences in the SiSc obtained in the CA1 between the AA and AA' conditions were not found in the IC group. These results indicate that the CA1 network reacts to the altered input pattern by creating a similarly altered output representation, and this may imply partial remapping [26] or partial spatial pattern separation in the CA1 network of SC and WM animals that is not present in the IC group.

When exposed to the AA condition, WM animals present a significantly higher SiSc than both the IC and SC groups ($p < 0.001$), indicating that in the CA1 network the most overlapping ensembles recruited by the (AA) double spatial exploration experience were found in WM animals (Fig 5A; S3 File); this suggests that a more reliable network coding was found in SC and particularly in WM-treated animals than in the IC group (Fig 5A).

We then performed a 2-way ANOVA to examine the influence of each independent variable (behavioral pre-treatment and double exploration condition before sacrifice) on the SiSc results obtained in CA1. The analysis revealed a significant effect of the pre-treatment ($F_{2,2} = 14.138$ $p < 0.001$), a significant effect of the double spatial exploration ($F_{2,2} = 201.33$ $p < 0.001$), and a significant interaction between these independent variables ($F_{4,27} = 16.585$ $p < 0.001$). The *post hoc* analysis for the pre-treatment variable revealed that the WM animals present significant differences when compared to the IC condition ($p < 0.001$), but the SC animals did not ($p = 0.79$); moreover, significant differences were found between WM and SC animals ($p < 0.001$). The *post hoc* analysis for the double exploration condition revealed significant differences among all double exploration conditions (p values < 0.001). These results showed that the most effective pre-treatment to modify CA1 network coding is the WM and confirmed that the degree of overlap between the recruited ensembles depends on the features of each double spatial exploration condition; the significant interaction suggested that pre-treatment history determines how the CA1 network reacts to the different double spatial exploration conditions.

In the CA3 network the SiSc values also differed among the different groups ($F_{8,27} = 138.26$ $p < 0.01$). After the AB condition the SiSc values obtained in the SC and WM-treated animals were significantly lower ($p < 0.001$ and $p < 0.01$, respectively) than those obtained in the IC group, indicating a lower degree of overlap, which can be interpreted as an improvement in spatial pattern separation in the CA3 network of both WM and SC animals (Fig 5B; S4 File).

Moreover, the CA3 network from the SC and WM-pre-treated animals exposed to the AA' exploration showed a significantly higher SiSc compared to that obtained in the same conditions in the IC group ($p < 0.01$ and $p < 0.001$ respectively). The SiSc values obtained in the AA and AA' exploration from SC and WM-pre-treatment animals were similar, indicating that unlike CA1, the CA3 network recruits highly overlapping ensembles in response to slightly different input patterns and that upon a partial input, the CA3 of SC and WM-treated animals performs pattern completion.

When the animals were exposed to the same double spatial exploration condition (AA), the most overlapping ensembles were recruited in the WM-treated animals ($p < 0.001$ vs. IC and $p < 0.05$ vs. SC), possibly indicating that CA3 network coding is also more reliable after WM pre-treatment (Fig 5B).

The 2-way ANOVA performed on the SiSc results obtained in CA3 revealed a significant effect of the pre-treatment condition ($F_{2,2} = 11.60$ $p < 0.001$), a significant effect of the double exploration condition ($F_{2,2} = 237.56$ $p < 0.001$), and a significant interaction between them

($F_{4,27} = 18.98$ $p < 0.001$). The *post hoc* analysis for the pre-treatment effect showed that the WM animals presented significant differences when compared to the IC group ($p < 0.001$), but the SC and IC animals did not differ significantly ($p = 0.063$). Also, significant differences were found between WM and SC animals ($p < 0.05$). The *post hoc* analysis for the double exploration condition revealed significant differences among all double exploration conditions (AA vs. AA', $p < 0.05$; all other p values < 0.001). This indicated that WM treatment significantly improves network coding reliability (higher overlap after AA), spatial pattern completion (higher overlap after AA'), and pattern separation (lower overlap after AB) in the CA3 network.

Although the 2-way ANOVA for the SiSc measure in both the CA1 and CA3 networks revealed that the main effect is observed in the WM-treated animals, the interaction indicates that both the SC and WM pre-treatments affect the way the network responds to the double exploration.

Synaptophysin/Map2 staining analysis

We had previously observed, using Timm staining, that WM training in rats promotes MF expansion in to their CA3 stratum oriens [2, 3]. This was confirmed with electron-microscopy [2], and later on with more elegant and powerful imaging tools [6, 7]. This has also been demonstrated with the immunostaining for synaptophysin [4], and since an immunostaining for synaptophysin is compatible with our fresh frozen tissue obtained for catFISH, we decided to evaluate the possible MF expansion using this histological approach, in order to do it in the same tissue from the animals used for catFISH.

Then, in order to confirm that the WM-training experience induces structural synaptic plasticity, such as MF expansion, in the hippocampus [2, 3, 4, 5], adjacent brain sections from the animals used for the catFISH analysis were double stained for synaptophysin and Map2. Synaptophysin is a protein present in synaptic vesicles, and its immunostaining reveals pre-synaptic boutons in both granular cells and pyramidal neurons [4, 28, 29], while the MAP2 staining was used to identify pyramidal cell dendrites [30, 31].

For this analysis the animals were separated into the 3 pre-treatment groups (IC $n = 16$; SC $n = 13$; and WM $n = 13$), each of which includes animals exposed to the 3 different spatial-exploration conditions and at least one cage control used in the catFISH analysis.

The analysis of the synaptophysin-stained area in the different ROIs revealed statistically significant differences between groups only in 3 regions (Fig 8; S5 File): the CA3 *stratum oriens* distal (*SOD*) relative to the DG ($F_{2,39} = 24.32$ $p < 0.001$), the CA3 *stratum lucidum* distal (*SLd*) relative to the DG ($F_{2,39} = 10.77$ $p < 0.001$), and in the CA1 *stratum oriens* (*SO*: $F_{2,39} = 6.05$ $p < 0.01$). In the CA3-*SOD*, the animals from the WM group presented a significantly larger synaptophysin-staining area than the IC group (Fisher $p < 0.001$); however, we also found significant differences between the SC and IC groups ($p < 0.01$). Importantly, here we also found significant differences between the WM and SC groups ($p < 0.01$), revealing that the WM treatment induced a more robust MF expansion. In the CA3-*SLd* we also found a significantly higher density of synaptophysin staining in WM animals than in the SC and IC groups ($p < 0.001$), and no significant differences were found here between these latter two groups. Since the CA3-*SOD* and particularly the CA3-*SLd* are targets of MF boutons, increased synaptophysin staining here strongly suggests MF expansion [4] in the SC- but more robustly in WM-treated animals (Fig 8).

Finally, the CA1-*SO* from animals that underwent either the WM or SC pre-treatment showed a significantly larger synaptophysin-stained area compared to that of IC animals ($p < 0.01$ and $p < 0.05$ respectively). No differences were found between the WM and SC animals. The CA1-*SO* is a target of Schaffer collaterals, and this result suggests that both the WM and SC experiences induced a greater density of Shaffer collaterals in the CA1-*SO* (Fig 8).

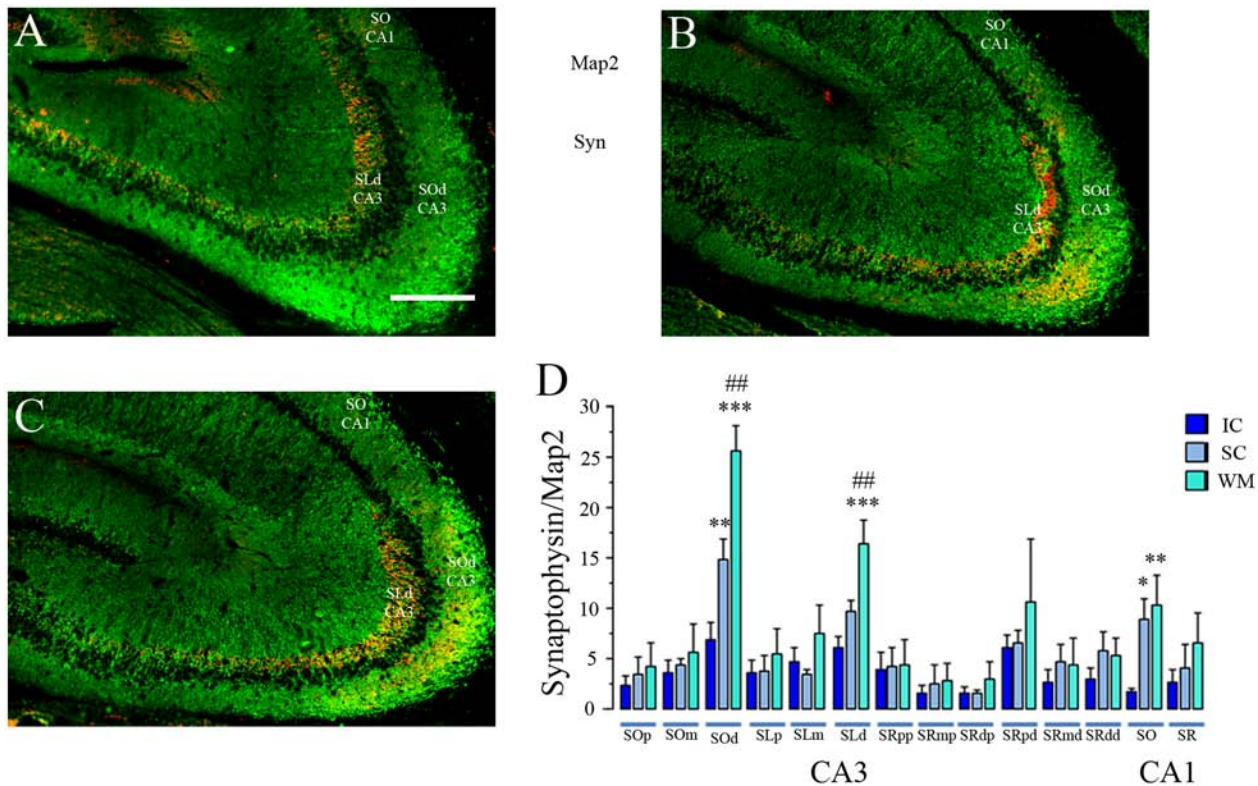


Fig 8. Synaptophysin-staining analysis in the hippocampus. Representative MosaicX montage images that covers all the CA3 and part (after trimming) of the CA1 hippocampal regions: in green is the Map-2 immunostaining and in red the synaptophysin staining in animals from the IC (A), SC (B), and WM (C) groups; the white bar represents 500 μ m. (D) The bars represent the average synaptophysin/Map2 staining (\pm SEM) in each group (IC, SC, and WM) for each ROI (see [Methods](#)). Note that only in the CA3 SOd (*stratum oriens distal*), the CA3 SLd (*stratum lucidum distal*), and the CA1 SO (*stratum oriens*) were significant differences found between groups. Fisher *post hoc* analysis of the WM vs. the IC *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$; WM vs. the SC ## $p < 0.01$.

doi:10.1371/journal.pone.0132676.g008

The synaptophysin-stained area in CA3 significantly correlates with measures of pattern separation and pattern completion

Since the SiSc depends on the double exploration condition used for the catFISH analysis, the correlation analysis was done between the synaptophysin-stained area and the SiSc obtained in each of the 3 different conditions (AA, AA', and AB). This analysis included all animals from all pre-treatment groups (WM, SC, and IC).

The SiSc obtained in the CA3 network showed significant, positive correlations with the synaptophysin-stained area in the CA3-SOd ([Fig 9; S6 File](#)) after both the AA ($r(40) = 0.907$ $p < 0.001$) and AA' double exploration ($r(40) = 0.870$ $p < 0.001$), indicating that what may be primarily MF in the CA3-SOd correlates with a higher neural ensemble overlap in CA3, which suggests a more reliable network coding in CA3 and improved proper pattern completion.

Conversely, in the AB condition, the density of synaptophysin in the CA3-SOd negatively correlates with the SiSc ($r(40) = -0.884$ $p < 0.001$), indicating that a high connectivity in a target region for MFs positively correlates with a lower degree of ensemble overlap and the recruitment of more independent ensembles, suggesting that the improved spatial pattern separation in the CA3 network is related to CA3-SOd structural plasticity, likely to be MF expansion.

Interestingly, the SiSc obtained after the AA double exploration in the CA1 network also shows a significant, positive correlation with the synaptophysin-stained area in the CA3-SOd ($r(40) = 0.870$ $p < 0.001$), indicating that more overlapping ensembles are recruited in CA1

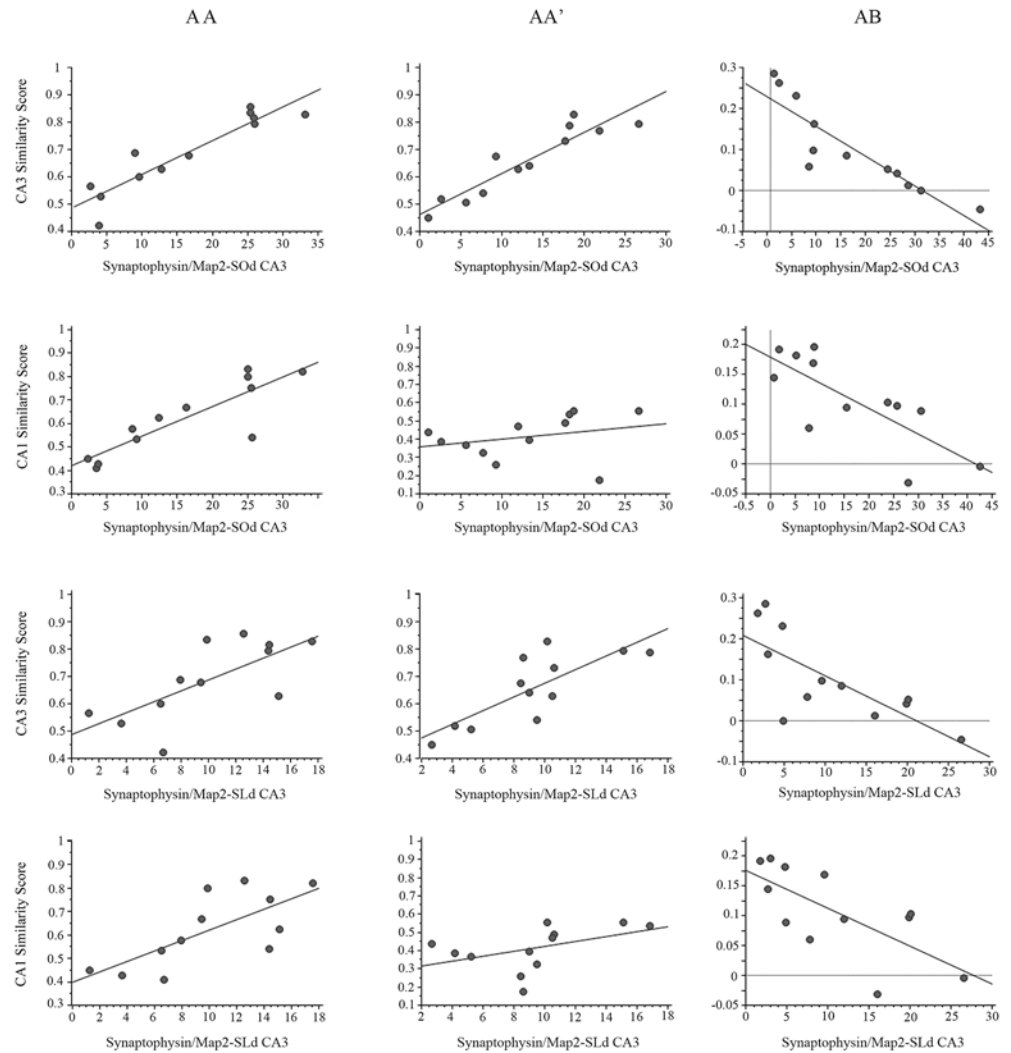


Fig 9. Synaptophysin/Map2 area and Similarity score correlation analysis. Correlation graphs between: the area of synaptophysin staining in the CA3 *SOd* and the similarity scores (SiSc) obtained in the CA3 network (first row); the area of synaptophysin staining in the CA3 *SOd* and the SiSc obtained in the CA1 network (second row); the area of synaptophysin staining in the CA3 *SLd* and the SiSc obtained in the CA3 network (Third row); and the area of synaptophysin staining in the CA3 *SLd* and the SiSc obtained in the CA1 network (Fourth row). The first column presents the correlation graphs for the AA double exploration condition, where pattern completion is observed in both the CA3 and CA1 networks; the second column presents the correlation graphs for the AA' condition, where pattern completion occurred in the CA3 network, and partial pattern separation occurred in CA1; and the third column presents the graphs for the AB condition where pattern separation occurred in both CA1 and CA3. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

doi:10.1371/journal.pone.0132676.g009

after the AA condition, in a network with increased density of synapses in the CA3-*SOd*. This suggests that a more reliable network coding in CA1 may also be related to MF expansion that occurred in the CA3-*SOd*. Similarly, the SiSc in the CA1 network obtained after the AB double exploration negatively correlates with the area of synaptophysin staining in the CA3-*SOd* ($r(40) = -.767$ $p < 0.01$), indicating that less overlap or more independent ensembles are recruited in CA1 after the AB condition when the density of CA3-*SOd* synapses is higher. This agrees with the idea that pattern-separation efficacy in the CA1 network is also related to what may largely be MF expansion in the CA3-*SOd*.

When comparing the synaptophysin-stained area in the CA3-*SLd* and the SiSc obtained in the CA3 network, a significant positive correlation was found in the AA ($r(40) = 0.639$, $p < 0.05$) but barely not in the AA' condition ($r(40) = 0.556$, $p = 0.06$). In the AB condition a significant negative correlation was also found between measures ($r(40) = -0.747$, $p < 0.01$), which indicates that as the CA3-*SLd* acquires more synapses, mostly MFs, a higher overlap is detected after the AA condition, and conversely in the AB condition when synapse density is higher in the CA3-*SLd* less overlapping ensembles or more independent ensembles are recruited. This suggests that pattern separation and coding reliability improvement in CA3 may partly result from MF expansion or increase connectivity in the CA3-*SLd*.

The correlation between the synaptophysin-stained area in the distal CA3-*SLd* and the SiSc obtained in the CA1 network was significant in the AA condition ($r(40) = 0.623$, $p < 0.05$), and was highly significant and negative in the AB condition ($r(40) = -0.722$, $p < 0.01$). This indicates that the higher the density of synapses in the CA3-*SLd*, the higher the overlap detected after the AA condition in CA1, while after the AB condition the higher density of synapses in CA3-*SLd* predicts a lower overlap or a more independent ensemble recruitment in CA1. This result may imply a network mechanism in which the reliability of CA1 network coding and especially pattern separation in CA1 benefit from the MF expansion in the CA3-*SLd*.

Finally, the synaptophysin staining in the CA1-SO showed a significant negative correlation with the SiSc in the CA3 network after the AB condition ($r(40) = -0.710$, $p < 0.05$). This suggests that what might likely be an increase density of Schaffer collaterals in the CA1-SO correlates with a lower overlapping in CA3 after the AB condition. This is an intriguing result suggesting that the improved pattern separation in CA3 may also be related to a higher density of Schaffer collaterals in the CA1-SO.

Discussion

The results from the DNMP task revealed that “*spatial experience*” provided by the WM and SC treatments improve the behavioral expression of spatial pattern separation (Fig 1). The SiSc values obtained with catFISH in the CA hippocampal regions revealed that after the animal experiences two different environments (AB), these networks recruit ensembles with a low degree of overlap. This is interpreted as a neurophysiological correlate (direct or indirect, see below) of spatial pattern separation in CA1 and CA3 that occurs particularly well in animals previously exposed to the WM treatment, but also after the SC treatment, which mostly influences the CA3 network. Interestingly the catFISH results also revealed that the SC and particularly the WM treatment improved partial pattern separation in CA1, i.e., the recruitment of gradually different ensembles after two gradually different exploration experiences (AA' vs AA). After the AA' double exploration condition the CA3 network from WM-treated animals showed the highest degree of overlap, suggesting an improvement in proper pattern completion. Moreover, the present results also provided evidence suggesting that a more reliable coding was promoted in both the CA1 and CA3 networks from WM-treated animals, since neuronal recruitment in these networks presented a high degree of overlap after the AA condition. The image analysis of synaptophysin/Map2 staining suggested that the WM treatment was an important factor inducing structural synaptic plasticity in the hippocampus. Moreover, we found highly significant correlations between the SiSc measures and the synaptophysin-stained areas, further suggesting that structural plasticity and possibly MF expansion underlies the improvements in hippocampal information processing functions.

The DNMP task revealed that both the SC and WM-treated animals adequately discriminate even difficult separations (Sp1 and Sp2), while the IC animals struggle already in S3 File and perform very similarly to the SC and WM groups in S4 File. Using a behavioral paradigm

that evaluates short-term memory for spatial location information as a function of spatial similarity between spatial locations, Gilbert, and colleagues [32] found that the performance of animals with dentate gyrus lesions improved as a function of greater spatial separation between the objects. A similar effect was observed by Cleland [21] in mice with reduced neurogenesis that showed deficits in the DNMP task in the closer separations (Sp2, Sp3), but not in the large separation (Sp4); dentate gyrus lesions in rats produced a similar effect [33].

Gilbert and colleagues [32] concluded that the DG function is related to the efficacy of spatial pattern separation, while Morris and colleagues [33] further suggested that the role of the hippocampus, and more specifically the dentate gyrus, in spatial pattern separation is to overcome spatial interference in order to discriminate between spatial locations that share a large amount of overlap, and the system overcomes such spatial interference giving rise to pattern separation.

In a context where the issue is: How are pattern completion and pattern separation to be evaluated? it has been noted that if one can generate a clear gradient in the behavioral output that scales with the degree of “interference of the DG system, in this case”, then the differences found in the behavioural performance can be more easily inferred based on the overall pattern of deficits [34]. In the present experiments we can consider the interference of the DG system a function of the amount of previous “spatial experience” (IC vs WM, or IC vs SC, SC vs WM) which in turn, is related to incremental differences of hippocampal distal CA3 network connectivity (Figs 1, 5 and 8). It is important to note that the contextual experience in the WM condition is more complex or rich, follow by that obtained by SC animals and it is clearly less in the IC animals. Performance in the DNMP task shows gradual differences between the WM, SC and IC groups; the WM animals are the best performers and the IC are the worst, with the SC in an intermediate but clearly improved range. It is important to note that the SC animals experienced primarily swimming exercise and more subtly contextual learning.

The catFISH SiSc measure reveals a strikingly similar gradient between the WM, SC and IC treatments: less overlap or more independent ensembles after the AB double exploration, particularly in the WM pre-treated animals, in both the CA3 and CA1 networks; the SC group also present less overlap than the IC group, but only in CA1. Low overlap or ensemble independence after the AB condition in both networks indicates place cell remapping and can be interpreted as pattern separation [22, 23].

It is important to acknowledge that the catFISH method may not provide a direct read out of spatial pattern separation since, as stated by Hunsaker and Kesner [18], it is possible that the SiSc data may represent a different measure altogether of some higher-level mnemonic process that relies on pattern separation function [35, 36], although it is not clear what such a mnemonic process might actually be. Nevertheless, we should clarify that the SiSc measures that we observed after the different experiences (AB, AA, AA') may either be a direct or indirect read-out of pattern separation, and other information processing functions such as proper pattern completion, partial pattern separation and coding reliability and/or pattern completion.

Importantly, this neurophysiological readout of pattern separation (SiSc after AB) presented an important correlation with the anatomical measure of synapse density we used here (Fig 9). This strongly suggests that increase synapse density in the distal CA3 may contribute to pattern separation efficacy in CA3, supporting the idea that the DG is related to pattern separation efficacy and suggesting that greater connectivity in distal CA3 helps to improve the spatial pattern separation function.

The DNMP task revealed that the IC animals perform the worst spatial pattern separation, and it is important to note that a high number of errors in the DNMP task in Cleland's study [21] was previously interpreted as impaired spatial pattern separation. The SiSc results obtained by catFISH further support this idea. After the AB double exploration, IC animals

present the highest degree of overlap, indicating poor spatial pattern separation. The SiSc results obtained after AA' revealed that in both WM and SC animals, CA1 ensemble recruitment changes in response to partial variations in the environment, that is, CA1 reacts to altered input patterns by recruiting gradually different ensembles, creating an altered output representation which can be considered as partial remapping [26] or partial pattern separation. Note that this does not occur in IC animals, whose CA1 network fails to show a clear partial pattern separation upon partial variations in the input (AA'). Meanwhile, the CA3 of IC animals show the lowest degree of overlap after the AA' condition, suggesting poor proper-pattern completion.

Along this line of thinking, our catFISH results obtained in both WM and SC animals are more similar to those obtained in previous reports using either electrophysiology or catFISH [23, 25, 37] in animals that had been previously trained or habituated to spatial exploration. In contrast, the SiSc results obtained in our IC animals resemble those obtained in impaired conditions [38]. This hippocampal dysfunction in IC animals may result from their isolation [39], which is known to produce deficits in hippocampus-dependent tasks and to decrease hippocampal BDNF expression [40], an important factor for circuit rewiring [41]. Computational modeling showed that the sparse MF connectivity benefits CA3 function, but a vanishingly sparse connectivity may lead to network dysfunction [12].

The hippocampal network architecture provides a competitive neural network in the dentate gyrus that precedes the CA3 auto-association system. This is a critical feature, since without the orthogonalization provided via pattern separation by the DG, the CA3 auto-associative network is presented with a mixture of inputs (instead of separated) that could produce a mixed output state which would lead to “catastrophic interference” [18]. The network would therefore be incapable of storing separate memories due to insurmountable levels of interference among stimuli, and subjects would fail at the learning task.

During development, the MF projections into the CA3-SO are abundant, but in individually caged Wistar Rats the MFs retract approximately 24 days after birth, and both retraction and growth are input dependent [28]. When rats that had experienced a spatial learning task during puberty, MF expansion into the CA3-SO_d was detected in the adult, and these adult animals showed that further spatial learning was improved [42]. Different rat strains and closely related vole species occupying different habitats present different densities of MFs in the CA3-SO, which correlate with their spatial abilities [43, 44]. These features of the MF projection suggest that poor environmental conditions may lead to MF atrophy and consequently, to poor hippocampal information processing and behavioral impairment.

These features of the MF projection suggest that poor environmental conditions may lead to MF atrophy and consequently, to poor hippocampal information processing and behavioral impairment. Remarkably, our results suggest that in the adult rat this impairment may be reversed by proper hippocampal stimulation that improves hippocampal connectivity and information processing. This idea may well lead to suitable treatments for various cognitive pathologies [18, 19], as well as for neurocognitive impairments in aging [20]. Here and elsewhere [38] we have found that pattern completion improvement is accompanied by good pattern separation. One possible explanation is that the anatomical remodeling, detected here in the CA3 and CA1 regions, may simultaneously impact several hippocampal information-processing mechanisms, as suggested by our SiSc measures. It is also possible that a good pattern separation during encoding facilitates further decoding during retrieval, i.e., “a high efficacy of pattern separation enhances encoding and improves the ability of temporarily remembering one spatial location as separate from another” [18].

We need to clarify the meaning of the SiSc measures obtained after the AA double exploration condition (same room, same box). One possible interpretation is that it measures “coding

reliability". After a double spatial exploration in the same room and box conditions (AA) the animals recruit highly overlapping ensembles in both the CA3 and CA1 networks, particularly those pre-treated as WM, which are likely to have a high synapse density in the distal CA3 dendrites. Congruently, less overlap is seen in the IC, which presented the lowest synapse density. Importantly, this ensemble overlap after the AA condition correlates with the synaptophysin staining area in the distal CA3 region (Fig 9). This suggests that the anatomical conditions that appear to improve spatial pattern separation in the hippocampal network (as discussed above) also improved spatial pattern completion. We also found that the network is recruiting, with high fidelity, the same neurons twice after having experienced the same environment twice (AA). The SiSc measures the degree of overlap or similarity between the ensembles recruited by the first and second exploration, and trial-to-trial neuronal activity variability in response to repeated presentation of the same stimulus is often quantified in terms of reliability [45]. If the same number of spikes is emitted from one trial to the next, the neuron is said to be reliable [46]. Similarly, in hippocampal neurons a strong pattern of activity must be reinstated in order to drive *Arc* mRNA expression for a second time in the CA1 and CA3 networks [24, 47]. The SiSc measure obtained after the AA condition provides some information on the reliability of both encoding and decoding. The network achieves higher coding reliability because its neurons communicate shared information with each other, whereas the independent neurons do not [48], suggesting that the reliability may reflect the strength or efficiency of ensemble formation. Nevertheless this interpretation needs to be supported by conclusive evidence revealing the patterns of neural activity that drives *Arc* expression over and over again, which is not clear yet. For this reason, it is important to consider that the mechanism through which the hippocampus facilitates memory retrieval is pattern completion [49, 50]. However, the current definition of pattern completion states that this mechanism is triggered when the animal is exposed to a partial or degraded retrieval cue [18]. This is what previous studies had shown to occur in the CA3 hippocampal network, which recruits highly overlapping ensembles after the animal experiences minor variations in the environment [16, 23, 25], and this was interpreted here as proper pattern completion. It is an important advantage for a memory system to be able to recall a previously stored pattern upon a partial or degraded input, but in real life, animals are exposed to stimuli presented in a graded manner. As more similarities are detected between the new input and the already stored representation, the more likely it is that the system will retrieve the previously stored pattern. With this rationale, it is possible that the system evaluation of the input patterns may bring a result that falls below the similarity threshold for ensemble recruitment; but in other situations, the threshold may be surpassed far beyond its limit, with an input pattern of 90% or more similarity, promoting pattern completion. In the AA condition the same pattern completion mechanism must be triggered, possibly with a higher fidelity.

The synaptophysin-staining results revealed that structural synaptic plasticity occurs as a consequence of "spatial experience", particularly after WM training. The increased density of synaptophysin in the CA3-SOd may reveal the increased connectivity of several inputs, such as septal fibers, commissural fibers from the contralateral hippocampus, and particularly CA3 recurrent connections which target the CA3-SOd region. However, the size of MFs and the fact that it has been previously demonstrated that MF expand in this region [2, 3, 4, 5] suggest that the increase in synaptophysin staining likely represents MF expansion. Moreover, the increased density of synaptophysin observed in the CA3-SLd of WM-treated animals can be considered more compelling evidence of MF expansion [6]. In this regard, increase density of synaptophysin in the CA3-SOd was also evident in the SC animals. This contrasts with previous findings [2, 3], but in the present experiment we used a different behavioral room with different conditions (i.e., lighting) that may have promoted uncontrolled contextual learning [51]. In both

treatments (WM and SC) the animals underwent a spatial behavioral experience that included exercise (swimming) and context representation, and it has been observed that extended exercise (see [Methods](#)) improves hippocampal function through a BDNF-dependent mechanism [[52](#), [53](#)] and induces MF expansion [[54](#)]. Swimming exercise alone (without a memory task) can stimulate CA3 pyramidal cell activity patterns [[55](#)] and this in turn may induce the MF structural plasticity observed here in the SC animals, as reported previously [[56](#), [57](#)]. This may suggest that swimming exercise itself may be able to improve spatial pattern recognition. Note however that the MF expansion was significantly smaller in SC than in the WM-overtrained animals; this strongly suggests that a cognitive component that is more salient or present exclusively in the WM condition, such as motivated spatial learning, may be required to promote a robust structural plasticity in the CA3 hippocampal region.

A significant increase in the synaptophysin-stained area was also found in the CA1-SO region of WM and SC animals. Similarly, increased density of spines in the CA1-SO was observed after rats experienced a complex environment [[58](#)] or exercise [[59](#)]. These results suggest that both MF expansion and the increased density of Schaffer collaterals are induced by “*spatial experience*”.

It is important to acknowledge the fact that many other plastic changes may occur in the rat’s brain; however, the highly significant correlation between the SiScs obtained in both CA networks and the synaptophysin area in the CA3-SO suggest that is likely that the MF projections may play a prominent role in spatial pattern recognition and suggests that optimization of the CA3 network modulates CA1 function [[60](#)].

Our evidence points to a possible role for MFs not only in pattern separation but also in pattern completion in CA3. The CA3 network operates as an auto-associative memory system storing spatial information. This network receives information from the entorhinal cortex (EC-L2) through the perforant path (PP) projection, which provides ~4000 synapses/neuron, and indirectly through the DG network, which receives the same *en passant* projections from the PP but provides a sparse input, with only ~50 synapses/neuron to the CA3 [[10](#), [61](#)]. Thus, duplicate information is conveyed from the EC to the CA3 [[13](#)]. Moreover, each CA3 pyramidal cell receives ~12,000 recurrent collateral synapses [[61](#)]. Based on two prominent features, their size and their target location on the pyramidal cell dendrite, MFs can be considered reliable triggers, or “detonators”, of pyramidal CA3 cell activity [[62](#)]. This notion has led computational models to suggest a role of MFs in promoting spatial pattern separation to encode information in CA3 [[13](#)] and is supported by evidence showing that inactivation of the MF pathway blocks encoding, but not retrieval [[14](#)]. Abundant evidence supports the relevance of the MFs in spatial and non-spatial hippocampal pattern separation [[15](#), [16](#)].

The role of MFs in pattern completion was previously proposed theoretically [[10](#), [63](#)], and the present results may represent experimental evidence supporting it. Other features of the MF projection, in addition to those considered in defining them as “detonators”, can help to understand its role in pattern completion. For example, the number of MF synapses reaching the dendritic shaft of GABAergic interneurons in the CA3-SL greatly exceeds the number of MF synapses reaching pyramidal neurons [[64](#)]; the MFs have multiple release sites, and they carry several neurotransmitters and neuromodulators that regulate NMDA receptor function [[65](#)]. Therefore, when computing the average synaptic currents of each of the 3 inputs reaching CA3 pyramidal cells, the recurrent collaterals can be those providing the most information [[63](#)], but this condition varies across the different input areas and depends on the activity state of the network. This is compatible with the idea that the MFs are not only a reliable transmitter device, but may also be information-processing units [[10](#)], switching between a minimal-impact “off” phase when inhibition dominates and an “on” phase when MFs reliably trigger spikes in CA3 pyramidal neurons. Thus, the MF can be considered “a conditional

detonator” or “a discriminator” [63]. This way, upon experiencing a set of stimuli, either fully or partially associated with a familiar episode, our CA3 neuronal ensemble storing this information will be recruited by the PP synapses when the MF input is switched “off”, allowing the CA3-CA3-potentiated synapses to prevail and complete the original pattern. Likewise, inhibiting the output of “old granule cells” impairs spatial pattern completion [66]. Additionally, pattern completion requires synaptic plasticity in the CA3-CA3 network [49, 67], and burst stimulation of the MF induces heterosynaptic LTP in CA3-CA3 synapses [68]. Pattern separation, on the other hand, is achieved through a “winner-take-all” mechanism [10] during the “on” phase, when MFs are “detonators”, driving information storage in CA3 [12].

Finally, MF expansion on terminals reaching CA3 interneurons improves memory precision [7]; this can perhaps be explained by our evidence suggesting that hippocampal information processing depends on an optimal MF projection.

Supporting Information

S1 File. Water Maze data set.

(SVD)

S2 File. Delay Non-Matching to Place Data Set.

(SVD)

S3 File. Compartmental analysis of temporal activity using FISH forArc in the CA1 region.

(SVD)

S4 File. Compartmental analysis of temporal activity using FISH forArc in the CA1 region.

(SVD)

S5 File. Map2andSynaptophysin staining analysis.

(SVD)

S6 File. Map2andSynaptophysin vs CA1 and CA3 similarity score correlation analysis.

(SVD)

Acknowledgments

This work is part of Mariana Carasatorre’s Ph.D. thesis, and it was done to comply with the “Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas” of the “Universidad Nacional Autónoma de México”. M. Carasatorre also wants to gratefully acknowledge that she received a graduate scholarship from CONACyT-239669. We thank very much Dr. Dorothy Pless for her patience and the numerous proofreading of this manuscript, thanks for your patience, Nidia Hernández Rios from the INB microscope core unit who provided technical assistance, MVZ Martín García Servín for all the animal care assistance, and Cutberto Dorado Mendieta for all the efforts beyond he’s laboratory duties. The authors declare no competing financial interests.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MC VRA. Performed the experiments: MC AOA GVC CLF VRA. Analyzed the data: MC AOA VRA. Contributed reagents/materials/analysis tools: VRA SDC. Wrote the paper: VRA MC SDC.

References

1. Caroni P, Donato F, Muller D. Structural plasticity upon learning: regulation and functions. *Nat Rev Neurosci*. 2012; 13: 478–90. doi: [10.1038/nrn3258](https://doi.org/10.1038/nrn3258) PMID: [22714019](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22714019/)
2. Ramírez-Amaya V, Escobar ML, Chao V, Bermúdez-Rattoni F. Synaptogenesis of mossy fibers induced by spatial water maze overtraining. *Hippocampus*. 1999; 9: 631–6. PMID: [10641755](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10641755/)
3. Ramírez-Amaya V, Balderas I, Sandoval J, Escobar ML, Bermúdez-Rattoni F. Spatial long-term memory is related to mossy fiber synaptogenesis. *J Neurosci*. 2001; 21: 7340–8. PMID: [11549744](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11549744/)
4. Holahan MR, Rekart JL, Sandoval J, Routtenberg A. Spatial learning induces presynaptic structural remodeling in the hippocampal mossy fiber system of two rat strains. *Hippocampus*. 2006; 16: 560–70. PMID: [16685708](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16685708/)
5. Middei S, Vetere G, Sgobio C, Ammassari-Teule M. Landmark-based but not vestibular-based orientation elicits mossy fiber synaptogenesis in the mouse hippocampus. *Neurobiol Learn Mem*. 2007; 87: 174–80. PMID: [16990035](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16990035/)
6. Galimberti I, Gogolla N, Alberi S, Santos AF, Muller D, Caroni P. Long-term rearrangements of hippocampal mossy fiber terminal connectivity in the adult regulated by experience. *Neuron*. 2006; 50: 749–63. PMID: [16731513](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16731513/)
7. Ruediger S, Vittori C, Bednarek E, Genoud C, Strata P, Sacchetti B, Caroni P. Learning-related feedforward inhibitory connectivity growth required for memory precision. *Nature*. 2011; 473: 514–8. doi: [10.1038/nature09946](https://doi.org/10.1038/nature09946) PMID: [21532590](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21532590/)
8. Hebb DO. *The Organization of Behavior: A Neuropsychological Theory*. John Wiley & Sons. New York, USA press. 1945.
9. Bailey CH, Kandel ER. Synaptic remodeling, synaptic growth and the storage of long-term memory in *Aplysia*. *Prog Brain Res*. 2008; 169: 179–98. doi: [10.1016/S0079-6123\(07\)00010-6](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(07)00010-6) PMID: [18394474](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18394474/)
10. Bischofberger J, Engel D, Frotscher M, Jonas P. Timing and efficacy of transmitter release at mossy fiber synapses in the hippocampal network. *Pflugers Arch*. 2006; 453: 361–72. PMID: [16802161](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16802161/)
11. Chawla MK, Guzowski JF, Ramirez-Amaya V, Lipa P, Hoffman KL, Marriott LK, Worley PF, McNaughton BL, Barnes CA. Sparse, environmentally selective expression of Arc RNA in the upper blade of the rodent fascia dentata by brief spatial experience. *Hippocampus*. 2005; 15: 579–86. PMID: [15920719](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15920719/)
12. Cerasti E, Treves A. How informative are spatial CA3 representations established by the dentate gyrus? *PLoS Comput Biol*. 2010; 6: e1000759. doi: [10.1371/journal.pcbi.1000759](https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000759) PMID: [20454678](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20454678/)
13. Treves A, Rolls ET. Computational constraints suggest the need for two distinct input systems to the hippocampal CA3 network. *Hippocampus*. 1992; 2: 189–99. PMID: [1308182](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1308182/)
14. Lassalle JM, Bataille T, Halley H. Reversible inactivation of the hippocampal mossy fiber synapses in mice impairs spatial learning, but neither consolidation nor memory retrieval, in the Morris navigation task. *Neurobiol Learn Mem*. 2000; 73: 243–57. PMID: [10775494](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10775494/)
15. Lee I, Kesner RP. Encoding versus retrieval of spatial memory: double dissociation between the dentate gyrus and the perforant path inputs into CA3 in the dorsal hippocampus. *Hippocampus*. 2004; 14: 66–76. PMID: [15058484](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15058484/)
16. Kesner RP. An analysis of the dentate gyrus function. *Behav Brain Res*. 2013; 254: 1–7. doi: [10.1016/j.bbr.2013.01.012](https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.01.012) PMID: [23348108](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23348108/)
17. Yassa MA, Stark CE. Pattern separation in the hippocampus. *Trends Neurosci*. 2011; 34: 515–25. doi: [10.1016/j.tins.2011.06.006](https://doi.org/10.1016/j.tins.2011.06.006) PMID: [21788086](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21788086/)
18. Hunsaker MR, Kesner RP. The operation of pattern separation and pattern completion processes associated with different attributes or domains of memory. *Neurosci Biobehav Rev*. 2013; 37: 36–58. doi: [10.1016/j.neubiorev.2012.09.014](https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2012.09.014) PMID: [23043857](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23043857/)
19. Hanson JE, Madison DV. Imbalanced pattern completion vs. separation in cognitive disease: network simulations of synaptic pathologies predict a personalized therapeutics strategy. *BMC Neurosci*. 2010; 11, 96. doi: [10.1186/1471-2202-11-96](https://doi.org/10.1186/1471-2202-11-96) PMID: [20704756](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20704756/)
20. Burke SN, Wallace JL, Nematollahi S, Uprety AR, Barnes CA. Pattern separation deficits may contribute to age-associated recognition impairments. *Behav Neurosci*. 2010; 124: 559–73. doi: [10.1037/a0020893](https://doi.org/10.1037/a0020893) PMID: [20939657](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20939657/)
21. Clelland CD, Choi M, Romberg C, Clemenson GD Jr, Fragniere A, Tyers P, et al. A functional role for adult hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation. *Science*. 2009; 325: 210–3. doi: [10.1126/science.1173215](https://doi.org/10.1126/science.1173215) PMID: [19590004](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19590004/)
22. Guzowski JF, Knierim JJ, Moser EI. Ensemble dynamics of hippocampal regions CA3 and CA1. *Neuron*. 2004; 44: 581–4. PMID: [15541306](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15541306/)

23. Vazdarjanova A, Guzowski JF. Differences in hippocampal neuronal population responses to modifications of an environmental context: evidence for distinct, yet complementary, functions of CA3 and CA1 ensembles. *J Neurosci*. 2004; 24, 6489–96. PMID: [15269259](#)
24. Guzowski JF, McNaughton BL, Barnes CA, Worley PF. Environment-specific expression of the immediate-early gene *Arc* in hippocampal neuronal ensembles. *Nat Neurosci*. 1999; 2: 1120–4. PMID: [10570490](#)
25. Leutgeb S, Leutgeb JK, Treves A, Moser MB, Moser EI. Distinct ensemble codes in hippocampal areas CA3 and CA1. *Science*. 2004; 305:1295–8. PMID: [15272123](#)
26. Hayman RM, Jeffery KJ. How heterogeneous place cell responding arises from homogeneous grids—a contextual gating hypothesis. *Hippocampus*. 2008; 18: 1301–13. doi: [10.1002/hipo.20513](#) PMID: [19021264](#)
27. Vazdarjanova A, Ramirez-Amaya V, Insel N, Plummer TK, Rosi S, Chowdhury S, et al. Spatial exploration induces *ARC*, a plasticity-related immediate-early gene, only in calcium/calmodulin-dependent protein kinase II-positive principal excitatory and inhibitory neurons of the rat forebrain. *J Comp Neurol*. 2006; 498:317–29. PMID: [16871537](#)
28. Holahan MR, Honegger KS, Routtenberg A. Expansion and retraction of hippocampal mossy fibers during postweaning development: strain-specific effects of NMDA receptor blockade. *Hippocampus*. 2007; 17: 58–67. PMID: [17143904](#)
29. Pozzo-Miller LD, Inoue T, Murphy DD. Estradiol increases spine density and NMDA-dependent Ca²⁺ transients in spines of CA1 pyramidal neurons from hippocampal slices. *J Neurophysiol*. 1999; 81: 1404–11. PMID: [10085365](#)
30. Cáceres A, Banker G, Steward O, Binder L, Payne M. MAP2 is localized to the dendrites of hippocampal neurons which develop in culture. *Brain Res*. 1984; 315: 314–8. PMID: [6722593](#)
31. Di Stefano G, Casoli T, Fattoretti P, Baliotti M, Grossi Y, Giorgetti B, et al. Level and distribution of microtubule-associated protein-2 (MAP2) as an index of dendritic structural dynamics. *Rejuvenation Res*. 2006; 9: 94–8. PMID: [16608403](#)
32. Gilbert P.E., Kesner R.P., Lee I. Dissociating hippocampal subregions: double dissociation between dentate gyrus and CA1. *Hippocampus*. 2001; 11: 626–636. PMID: [11811656](#)
33. Morris A.M., Churchwell J.C., Kesner R.P., Gilbert P.E. Selective lesions of the dentate gyrus produce disruptions in place learning for adjacent spatial locations. *Neurobiology of Learning and Memory*. 2012; 97: 326–331. doi: [10.1016/j.nlm.2012.02.005](#) PMID: [22390856](#)
34. Lacy J.W., Yassa M.A., Stark S.M., Muftuler L.T., Stark C.E. Distinct pattern separation related transfer functions in human CA3/dentate and CA1 revealed using high-resolution fMRI and variable mnemonic similarity. *Learning and Memory*. 2011; 18: 15–18. doi: [10.1101/lm.1971111](#) PMID: [21164173](#)
35. Aimone J.B., Deng W., Gage F.H. Resolving new memories: A critical look at the dentate gyrus, adult neurogenesis, and pattern separation. *Neuron*. 2011; 70: 589–596. doi: [10.1016/j.neuron.2011.05.010](#) PMID: [21609818](#)
36. Yassa M.A., Stark C.E. Pattern separation in the hippocampus. *Trends in Neurosciences*. 2011; 34: 515–525. doi: [10.1016/j.tins.2011.06.006](#) PMID: [21788086](#)
37. Lee I, Yoganarasimha D, Rao G, Knierim JJ. Comparison of population coherence of place cells in hippocampal subfields CA1 and CA3. *Nature*. 2004; 430:456–9. PMID: [15229614](#)
38. Rosi S, Ramirez-Amaya V, Vazdarjanova A, Esparza EE, Larkin PB, Fike JR, Wenk GL, Barnes CA. Accuracy of hippocampal network activity is disrupted by neuroinflammation: rescue by memantine. *Brain*. 2009; 132: 2464–77. doi: [10.1093/brain/awp148](#) PMID: [19531533](#)
39. Fone KC, Porkess MV. Behavioural and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents—relevance to developmental neuropsychiatric disorders. *Neurosci Biobehav Rev*. 2008; 32: 1087–102. doi: [10.1016/j.neubiorev.2008.03.003](#) PMID: [18423591](#)
40. Han X, Wang W, Xue X, Shao F, Li N. Brief social isolation in early adolescence affects reversal learning and forebrain BDNF expression in adult rats. *Brain Res Bull*. 2011; 86: 173–8. doi: [10.1016/j.brainresbull.2011.07.008](#) PMID: [21801814](#)
41. Park H, Poo MM. Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nat Rev Neurosci*. 2013; 14: 7–23. doi: [10.1038/nrn3379](#) PMID: [23254191](#)
42. Keeley RJ, Wartman BC, Häusler AN, Holahan MR. Effect of juvenile pretraining on adolescent structural hippocampal attributes as a substrate for enhanced spatial performance. *Learn Mem*. 2010; 17: 344–54. doi: [10.1101/lm.1849910](#) PMID: [20592053](#)
43. Schwegler H, Mueller GG, Crusio WE, Szemes L, Seress L. Hippocampal morphology and spatially related behavior in Long-Evans and CFY rats. *Hippocampus*. 1993; 3: 1–7.

44. Pleskacheva MG, Wolfer DP, Kupriyanova IF, Nikolenko DL, Scheffrahn H, Dell'Omo G, Lipp HP. Hippocampal mossy fibers and swimming navigation learning in two vole species occupying different habitats. *Hippocampus*. 2000; 10: 17–30. PMID: [10706213](#)
45. Masquelier T. Neural variability, or lack thereof *Front. Comput. Neurosci.* 2013; 7:7. doi: [10.3389/fncom.2013.00007](#)
46. Tiesinga P., Fellous J.M., and Sejnowski T.J. Regulation of spike timing in visual cortical circuits. *Nat. Rev. Neurosci.* 2008; 9: 97–107. doi: [10.1038/nrn2315](#) PMID: [18200026](#)
47. Kawashima T, Okuno H, Nonaka M, Adachi-Morishima A, Kyo N, Okamura M, Takemoto-Kimura S, Worley PF, Bito H. Synaptic activity-responsive element in the Arc/Arg3.1 promoter essential for synapse-to-nucleus signaling in activated neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106:316–21. doi: [10.1073/pnas.0806518106](#) PMID: [19116276](#)
48. Boerlin M, Machens CK, Denève S. Predictive coding of dynamical variables in balanced spiking networks. *PLoS Comput Biol.* 2013; 9: e1003258. doi: [10.1371/journal.pcbi.1003258](#) PMID: [24244113](#)
49. Marr D. Simple memory: a theory for archicortex. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1971; 262: 23–81. PMID: [4399412](#)
50. Willshaw D.J., Buckingham J.T. An assessment of Marr's theory of the hippocampus as a temporary memory store. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences.* 1990; 329: 205–215.
51. Tolman EC. Cognitive maps in rats and men. *The Psychological Review.* 1948; 55: 189–208. PMID: [18870876](#)
52. Bekinschtein P, Oomen CA, Saksida LM, Bussey TJ. Effects of environmental enrichment and voluntary exercise on neurogenesis, learning and memory, and pattern separation: BDNF as a critical variable? *Semin Cell Dev Biol.* 2011; 22: 536–42. doi: [10.1016/j.semcdb.2011.07.002](#) PMID: [21767656](#)
53. Khabour OF, Alzoubi KH, Alomari MA, Alzubi MA. Changes in spatial memory and BDNF expression to simultaneous dietary restriction and forced exercise. *Brain Res Bull.* 2013; 90: 19–24. doi: [10.1016/j.brainresbull.2012.08.005](#) PMID: [23000024](#)
54. Toscano-Silva M, Gomes da Silva S, Scorza FA, Bonvent JJ, Cavalheiro EA, Arida RM. Hippocampal mossy fiber sprouting induced by forced and voluntary physical exercise. *Physiol Behav.* 2010; 101: 302–8. doi: [10.1016/j.physbeh.2010.05.012](#) PMID: [20515703](#)
55. Badowska-Szalewska E, Klejbor I, Cecot T, Spodnik JH, Moryś J. Changes in NGF/c-Fos double staining in the structures of the limbic system in juvenile and aged rats exposed to forced swim test. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 2009; 69: 448–58.
56. Toscano-Silva M, Gomes da Silva S, Scorza FA, Bonvent JJ, Cavalheiro EA, Arida RM. Hippocampal mossy fiber sprouting induced by forced and voluntary physical exercise. *Physiol Behav.* 2010; 101:302–8. doi: [10.1016/j.physbeh.2010.05.012](#) PMID: [20515703](#)
57. Ni H, Li C, Tao LY, Cen JN. Physical exercise improves learning by modulating hippocampal mossy fiber sprouting and related gene expression in a developmental rat model of penicillin-induced recurrent epilepticus. *Toxicol Lett.* 2009; 191:26–32. doi: [10.1016/j.toxlet.2009.07.028](#) PMID: [19666089](#)
58. Moser MB, Trommald M, Andersen P. An increase in dendritic spine density on hippocampal pyramidal cells following spatial learning in adult rats suggests the formation of new synapses. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; 91: 12673–12675. PMID: [7809099](#)
59. Stranahan AM, Khalil D, Gould E. Running induces widespread structural alterations in the hippocampus and entorhinal cortex. *Hippocampus.* 2007; 17: 1017–22. PMID: [17636549](#)
60. Hoang LT, Kesner RP. Dorsal hippocampus, CA3, and CA1 lesions disrupt temporal sequence completion. *Behav Neurosci.* 2008; 122: 9–15. doi: [10.1037/0735-7044.122.1.9](#) PMID: [18298244](#)
61. Amaral DG, Ishizuka N, Claiborne B. Neurons, numbers and the hippocampal network. *Prog Brain Res.* 1990; 83: 1–11.
62. McNaughton BL, Morris RG. Hippocampal synaptic enhancement and information-storage within a distributed memory system. *Trends Neurosci.* 1987; 10: 408–415.
63. Urban NN, Henze DA, Barrionuevo G. Revisiting the role of the hippocampal mossy fiber synapse. *Hippocampus.* 2001; 11: 408–17. PMID: [11530845](#)
64. Acsády L, Kamondi A, Sik A, Freund T, Buzsáki G. GABAergic cells are the major postsynaptic targets of mossy fibers in the rat hippocampus. *J Neurosci.* 1998; 18: 3386–403. PMID: [9547246](#)
65. Jaffe DB, Gutiérrez R. Mossy fiber synaptic transmission: communication from the dentate gyrus to area CA3. *Prog Brain Res.* 2007; 163: 109–32. PMID: [17765714](#)
66. Nakashiba T, Cushman JD, Pelkey KA, Renaudineau S, Buhl DL, McHugh TJ, et al. Young dentate granule cells mediate pattern separation, whereas old granule cells facilitate pattern completion. *Cell.* 2012; 149: 188–201. doi: [10.1016/j.cell.2012.01.046](#) PMID: [22365813](#)

67. Hasselmo ME, Schnell E, and Barkai E. Dynamics of learning and recall at excitatory recurrent synapses and cholinergic modulation in rat hippocampal region CA3. *J Neurosci*. 1995; 15: 5249–5262. PMID: [7623149](#)
68. Kobayashi K, Poo MM. Spike train timing-dependent associative modification of hippocampal CA3 recurrent synapses by mossy fibers. *Neuron*. 2004; 41: 445–54. PMID: [14766182](#)