



## **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

### **IMPACTO DE LA SEÑALIZACIÓN NEURONA-MICROGLIA EN LA CONECTIVIDAD SINÁPTICA Y LAS PROPIEDADES DE RED DE LA FORMACIÓN HIPOCAMPAL**

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

PRESENTA:

**FELIPE ANTONIO MÉNDEZ SALCIDO**

DIRECTOR DE TESIS:

**DR. JOSÉ FERNANDO PEÑA ORTEGA**  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

COMITÉ TUTOR:

**DRA. CLAUDIA GÓMEZ ACEVEDO**  
FACULTAD DE MEDICINA

**DR. GERARDO ROJAS PILONI**  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

Santiago de Querétaro, Querétaro, octubre 2022



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.

El trabajo de esta tesis fue realizado en el Instituto de Neurobiología de la Universidad Autónoma de México, campus Juriquilla, en el laboratorio C-01 Circuitos Neuronales a cargo del Dr. Fernando Peña Ortega, parte del Departamento de Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología.

El desarrollo de esta tesis doctoral contó con el apoyo de una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con número de becario 570426.

Apoyo adicional fue proveído por el proyecto de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM PAPIIT: AG200521.

## **Agradecimientos Institucionales**

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Instituto de Neurobiología.

Al programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas.

A mi tutor principal Dr. Fernando Peña Ortega.

A los miembros de mi comité tutorial Dra. Claudia Gómez Acevedo y Dr. Gerardo Rojas Piloni.

A los integrantes del jurado: Dr. José Bargas Díaz, Dr. Víctor de Lafuente Flores, Dra. Claudia González Espinosa, Dra. Esther Olvera Cortes.

Al Dr. Hugo Merchant, Dra. Sofía Díaz Miranda.

Al Dr. Benito Ordaz y la Dra. Rebeca Corona.

A las Dra. Alejandra Castilla León y Dra. María Antonieta Carbajo Mata.

A Nydia Hernández Ríos, Dra. Ericka A. de los Rios Arellano y Dra. Deisy Gasca Martínez.

A la Dra. Pamela García Saldivar

# Dedicatoria Personal

A mi madre,  
a quien le debo todo.

A Mayra,  
a quien dedico todo lo que vendrá.

# Índice

<b>AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES</b> .....	<b>3</b>
<b>DEDICATORIA PERSONAL</b> .....	<b>4</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>8</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>10</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>11</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>12</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>13</b>
<b>LA MICROGLIA</b> .....	<b>15</b>
<i>La morfología de la microglía es indicativa de su estado funcional</i> .....	15
<i>La vía de la fractalquina (CX3CL1) - (CX3CR1)</i> .....	17
<i>La microglía en el establecimiento y refinamiento de los circuitos neuronales</i> .....	18
<b>LA FORMACIÓN HIPOCAMPAL</b> .....	<b>22</b>
<i>Funciones cognitivas asociadas a la formación hipocampal</i> .....	23
<i>Conectividad de la formación hipocampal</i> .....	25
<i>La región CA3 del hipocampo</i> .....	29
<b>RELEVANCIA E IMPACTO</b> .....	<b>32</b>
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	<b>33</b>
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>33</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>34</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>34</b>
<b>METODOLOGÍA</b> .....	<b>35</b>
<b>ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN</b> .....	<b>35</b>
<b>INMUNOHISTOQUÍMICA, HISTOLOGÍA Y TRAZADO NEURONAL</b> .....	<b>35</b>
<i>Inmunohistoquímica contra Iba-1</i> .....	35
<i>Tinción Neo-Timm</i> .....	37
<i>Trazado neuronal con Dil</i> .....	41
<b>REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS</b> .....	<b>43</b>
<i>Obtención de rebanadas transversales de hipocampo y corteza entorrinal (HEC)</i> .....	43
<i>Registro con matrices de multi-electrodos (MEAs)</i> .....	44
<i>Registros de patch-clamp</i> .....	49
<i>Registro de campo de potenciales despolarizantes gigantes (GDPs)</i> .....	51
.....	54
<b>FENOTIPIFICACIÓN CONDUCTUAL</b> .....	<b>55</b>
<i>Excavación (Burrowing)</i> .....	55
<i>Campo Abierto</i> .....	55
<i>Laberinto Elevado en Forma de Cruz</i> .....	56
<i>Interacción Social</i> .....	58
<i>Laberinto de Hebb-Williams</i> .....	59
<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	<b>61</b>

<b>RESULTADOS .....</b>	<b>63</b>
ALTERACIONES MORFOLÓGICAS DE LA MICROGLIA Y LAS ESTRUCTURAS SINÁPTICAS EN LA REGIÓN CA3 DEL HIPOCAMPO EN RATONES C3XCR1 <sup>-/-</sup> .....	63
<i>La depleción del receptor a fractalquina induce cambios en la densidad y morfología de la microglia..</i>	63
<i>Expansión del área de distribución de la Fibra Musgosa en el ratón Cx3cr1<sup>-/-</sup> .....</i>	65
<i>Alteraciones morfológicas de las estructuras sinápticas de CA3 en el ratón con depleción del receptor a fractalquina</i>	67
ALTERACIONES ELECTROFISIOLÓGICAS DEL MICROCIRCUITO DE LA REGIÓN CA3 .....	69
<i>La depleción del receptor a fractalquina induce una reconfiguración del circuito de CA3 en la etapa neonatal .....</i>	69
<i>La disfunción sináptica en CA3 afecta principalmente la Fibra Musgosa en el ratón con depleción del receptor a fractalquina .....</i>	71
<i>Impacto en la conectividad funcional del microcircuito de CA3 de la interrupción de la vía de la fractaquina .....</i>	74
IMPACTO EN LAS FUNCIONES COGNITIVAS ASOCIADAS A LA FORMACIÓN HIPOCAMPAL .....	78
<i>La depleción del receptor de fractalquina induce un fenotipo con rasgos de ansiedad .....</i>	78
<i>La depleción del receptor a fractalquina induce alteraciones de las conductas innatas, pero no sociales. ....</i>	80
<i>Los ratones Cx3cr1<sup>-/-</sup> muestran un déficit en la codificación de información espacial novedosa .....</i>	81
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>84</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>90</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>91</b>
<b>ANEXO 1 .....</b>	<b>141</b>
<b>EFFECTOS DIVERGENTES, DEPENDIENTES DE LA EDAD, DE LA DEPLECIÓN DEL CX3CR1 EN UN NOVEDOSO MODELO DE DOBLE “HIT” .....</b>	<b>141</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>141</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>143</b>
SUJETOS EXPERIMENTALES .....	143
ADMINISTRACIÓN NEONATAL DE MK-801 Y EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO.....	143
EVALUACIÓN DE LA APOPTOSIS NEURONAL (TINCIÓN DE NISSL) .....	144
FENOTIPIFICACIÓN CONDUCTUAL .....	145
<i>Anidación (Nesting).....</i>	145
<i>Excavación .....</i>	145
<i>Campo Abierto.....</i>	146
<i>Laberinto en Y (alternancia espontánea) .....</i>	146
<i>Prueba de Evitación Pasiva.....</i>	147
REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS .....	147
<i>Actividad Espontánea.....</i>	149
<i>Potenciales Auditivos Evocados.....</i>	149
SUSCEPTIBILIDAD Y SEVERIDAD DE LAS CRISIS EPILÉPTICAS INDUCIDAS POR PENTILENTETRAZOL (PTZ).....	151
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>152</b>
SINERGISMO EN LOS EFECTOS AGUDOS DE LA ADMINISTRACIÓN NEONATAL DE MK-801 EN EL RATÓN Cx3cr1 <sup>-/-</sup> .....	152

LAS CONDUCTAS INNATAS COMO POSIBLES INDICADORES DE LOS SÍNTOMAS NEGATIVOS EN EL MODELO NEONATAL DE MK-801 DE ESQUIZOFRENIA .....	156
EFFECTOS COGNITIVOS Y DE LA EMOTIVIDAD .....	159
.....	163
EFFECTOS DIVERGENTES EN EL POTENCIAL LOCAL DE CAMPO DEL HIPOCAMPO .....	163
.....	167
.....	168
EL FILTRADO SENSORIAL AUDITIVO DE CA3 SE ENCUENTRA PRESERVADO EN AMBAS CONDICIONES EXPERIMENTALES .....	168
LA DEPLECIÓN DEL <i>Cx3cr1</i> PROTEGE CONTRA EL EFECTO EPILEPTOGENICO DEL MK-801 .....	169
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>171</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>173</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>174</b>
<b>ANEXO 2 .....</b>	<b>229</b>
ABNORMAL INNATE AND LEARNED BEHAVIOR INDUCED BY NEURON-MICROGLIA MISCOMMUNICATION IS RELATED TO CA3 RECONFIGURATION.....	229



## Lista de abreviaturas

<b>AC</b>	Asociativa/Colateral
<b>AMPA</b>	Ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
<b>ATP</b>	Trifosfato de adenosina
<b>LCRA</b>	Líquido cefalorraquídeo artificial
<b>C</b>	Coefficiente de agrupamiento
<b>CA1</b>	<i>Cornu Ammonis</i> región 1
<b>CA2</b>	<i>Cornu Ammonis</i> región 2
<b>CA3</b>	<i>Cornu Ammonis</i> region 3
<b>CA4</b>	<i>Cornu Ammonis</i> región 4
<b>Cr</b>	Coefficiente de agrupamiento promedio de grafos aleatorios
<b>Cx3cr1</b>	Receptor 1 para la fractalquina o Cx3cl1, por sus siglas en inglés
<b>Cx3cl1</b>	Fractalquina o ligando para el receptor Cx3cr1
<b>Cx3cr1-KO</b>	Ratón con delección del gen para el receptor a la citocina Cx3 cl1, por sus siglas en inglés
<b>DG</b>	Giro dentado
<b>Dil</b>	1,1'-Dioctadecil-3,3,3'-Tetrametilindocarbocianina Perclorato
<b>fEPSPs</b>	Potenciales post-sinápticos excitadores de campo, por sus siglas en inglés
<b>fGDPs</b>	Potenciales despolarizantes gigantes de campo, por sus siglas en inglés
<b>GluN2A</b>	Subunidad $\epsilon$ -1 del receptor a glutamato
<b>HEC</b>	Rebanada aguda de hipocampo-corteza entorrinal, por sus siglas en inglés
<b>Iba-1</b>	Molécula adaptadora de unión a calcio ionizada 1, por sus siglas en inglés
<b>KO</b>	<i>Knock-out</i> ; delección
<b>L</b>	Longitud del camino más corto
<b>LEC</b>	Corteza entorrinal lateral, por sus siglas en inglés
<b>LTP</b>	Potenciación a largo plazo, por sus siglas en inglés
<b>Lr</b>	Longitud promedio del camino más corto de grafos aleatorios
<b>MAD</b>	Desviación absoluta de la mediana, por sus siglas en inglés
<b>MEAs</b>	Arreglos de multi-electrodos, por sus siglas en inglés
<b>MEC</b>	Corteza entorrinal medial, por sus siglas en inglés
<b>MF</b>	Fibra musgosa, por sus siglas en inglés
<b>MFT</b>	Terminal de la fibra musgosa, por sus siglas en inglés
<b>MUA</b>	Actividad multi-unitaria, por sus siglas en inglés
<b>NF-kB</b>	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa en las células B activadas, por sus siglas en inglés
<b>NMDA</b>	N-metil-D-aspartato

<b>P7</b>	Día post-natal 7
<b>P9</b>	Día post-natal 9
<b>P10</b>	Día post-natal 10
<b>PBS</b>	Solución salina amortiguada por fosfatos (buffer de fosfatos), por sus siglas en inglés
<b>PFA</b>	Paraformaldehído
<b>PPI</b>	Píxeles por pulgada
<b>sPSCs</b>	Corrientes post-sinápticas espontáneas, por sus siglas en inglés
<b>SD</b>	Desviación estándar, por sus siglas en inglés
<b>SL</b>	<i>Stratum Lucidum</i>
<b>SL-M</b>	<i>Stratum Lacunosum-Moleculare</i>
<b>SO</b>	<i>Stratum Oriens</i>
<b>SP</b>	<i>Stratum Pyramidale</i>
<b>SR</b>	<i>Stratum Radiatum</i>
<b>STTC</b>	<i>Spike time tiling coefficient</i>
<b>WT</b>	<i>Wild-type</i> ; Ceba silvestre

# Índice de Figuras

FIG. 1 LA FORMACIÓN HIPOCAMPAL.....	26
FIG. 2 LA REGIÓN CA3 DEL HIPOCAMPO.....	30
FIG. 3 RESULTADOS REPRESENTATIVOS DE LA TINCIÓN DE TIMM .....	40
FIG. 4 REGISTRO EN MEA DE LA REGIÓN CA3.....	45
FIG. 5 VERIFICACIÓN DE LA IDENTIDAD DE LA FIBRA MUSGOSA. ....	46
FIG. 6 DETERMINACIÓN DEL STTC .....	48
FIG. 7 VALIDACIÓN DEL STTC Y DETERMINACIÓN DEL UMBRAL .....	49
FIG. 8 ANÁLISIS DE LOS REGISTROS DE FGDPs.....	54
FIG. 9 CONFIGURACIÓN DEL PROBLEMA 4 DE RABINOVITCH & ROSVOLD .....	60
FIG. 10 DENSIDAD Y MORFOLOGÍA DE LA MICROGLIA EN NEONATOS Y ADULTOS .....	64
FIG. 11 EXPANSIÓN DEL ÁREA DE LA MF EN EL RATÓN Cx3CR1 <sup>-/-</sup> .....	66
FIG. 12 ANÁLISIS MORFOLÓGICO DE ESTRUCTURAS SINÁPTICAS DE CA3 EN LOS RATONES Cx3CR1 <sup>-/-</sup> .....	68
FIG. 13 REORGANIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD POBLACIONAL DE CA3 EN EL PERIODO NEONATAL .....	70
FIG. 14 CARACTERÍSTICAS INTRÍNECAS DE LAS NEURONAS PIRAMIDALES DE CA3 .....	71
FIG. 15 LA DISFUNCIÓN SINÁPTICA EN CA3 AFECTA PRINCIPALMENTE A LA MF .....	73
FIG. 16 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS REGISTROS EN MEAS.....	74
FIG. 17 CARACTERÍSTICAS GENERALES Y TOPOLOGÍA DE LA RED DE CA3.....	75
FIG. 18 LAS REDES KO PRESENTAN UNA CONECTIVIDAD DÉBIL Y DIFUSA .....	77
FIG. 19 LA DEPLECIÓN DEL Cx3CR1 INDUCE UN FENOTIPO CON RASGOS DE ANSIEDAD.....	79
FIG. 20 LA DEPLECIÓN DEL Cx3CR1 AFECTA LA EXCAVACIÓN, PERO NO LA INTERACCIÓN SOCIAL .....	80
FIG. 21 DÉFICIT EN LA CODIFICACIÓN DE INFORMACIÓN ESPACIAL NOVEDOSA EN EL GRUPO KO .....	83
FIG. AN. 1 EFECTOS SINÉRGICOS EN LA MORTALIDAD Y LA APOPTOSIS NEURONAL DE LA DEPLECIÓN DEL Cx3CR1 Y LA ADMINISTRACIÓN NEONATAL DE MK-801.....	155
FIG. AN. 2 TANTO EL GENOTIPO COMO EL TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO AFECTAN LAS CONDUCTAS INNATAS Y LA MEMORIA CONTEXTUAL.....	158
FIG. AN. 3 ALTERACIONES DE LA EMOTIVIDAD Y LA EXPLORACIÓN.....	163
FIG. AN. 4 TRAZOS REPRESENTATIVOS DE LA ACTIVIDAD DE CAMPO EN LAS DISTINTAS REGIONES DEL HIPOCAMPO. ....	164
FIG. AN. 5 LA DEPLECIÓN DEL Cx3CR1 INDUCE CAMBIOS OPUESTOS EN EL POTENCIAL DE CAMPO A LOS INDUCIDOS POR EL TRATAMIENTO NEONATAL CON MK-801. ....	168
FIG. AN. 6 LA DEPLECIÓN DEL Cx3CR1 PREVIENE EL EFECTO EPILEPTOGENICO DEL TRATAMIENTO NEONATAL CON MK-801.....	170

## Resumen

El desarrollo, refinamiento y plasticidad de los circuitos neuronales son procesos esenciales en la fisiología del sistema nervioso en el que participan no solamente las neuronas sino las células gliales. De particular importancia es el papel de la microglia, la cual regula la supervivencia neuronal durante el desarrollo, la consolidación y posterior eliminación de sinapsis y la excitabilidad de los circuitos neuronales. Esta amplia gama de funciones depende de vías de señalización entre las neuronas y la microglia para su correcta ejecución; entre estas vías se destaca la vía de la fractalquina. La fractalquina es una citosina quimiotáctica para la microglia que es producida principalmente por las neuronas en estados fisiológicos. Su único receptor conocido es expresado por la microglia en el sistema nervioso central, por lo que esta vía constituye un eje de comunicación particularmente selectivo entre neuronas y microglia. La interrupción de esta vía durante el desarrollo ha sido asociada con una fisiología alterada de la microglia, una disminución de la neurogénesis y un desarrollo anormal de los contactos sinápticos en diversas regiones corticales. Así mismo, se han descrito déficits en funciones motoras y cognitivas en roedores adultos con esta mutación.

En esta tesis se exploran los efectos del desarrollo de la formación hipocampal, con un especial énfasis en la región CA3, en ratones con delección del gen para el receptor a fractalquina. Mediante una aproximación multidisciplinaria, los resultados de esta tesis indican que la interrupción del eje de fractalquina esta asociada a un retraso en el establecimiento de la población de microglia en la región CA3 del hipocampo y a una morfología anormal de la misma en la adultez asociada a un estado pro-inflamatorio. Adicionalmente, dicha mutación se relaciona con una reconfiguración de la actividad poblacional de CA3 durante el período neonatal y alteraciones morfológicas en la aferencia de la fibra musgosa en la adultez que se acompañan de disfunción sináptica específica a esta aferencia, modificando la conectividad funcional de la red de CA3 en la adultez. Las alteraciones morfológicas y fisiológicas encontradas se relacionan con una amplia gama de déficits cognitivos incluyendo inhibición de conductas innatas, incremento en los rasgos de ansiedad y dificultad en la codificación de información espacial novedosa. En conjunto, los resultados obtenidos añaden información novedosa y valiosa al entendimiento de la interacción entre las neuronas y las células gliales en el establecimiento y mantenimiento de los circuitos neuronales y brindan nuevas perspectivas con valor translacional en el ámbito de los trastornos neuropsiquiátricos.

# Abstract

The development, refinement, and plasticity of neuronal circuits are essential physiologic processes of the nervous system in which not only neurons, but glial cells are involved. Of particular importance is the role of microglia, which regulate neuronal survival during development, synaptic consolidation and pruning, and neuronal excitability. This vast array of functions is dependent on signaling pathways between microglia and neurons; among these pathways the fractalkine axis is of major importance. Fractalkine is a cytosine produce mainly by neurons, in physiological conditions, with chemotactic effects on microglia. It's only known receptor is expressed by microglia in the brain, whereby the fractalkine pathway constitutes a particularly selective axis of communication between neurons and microglia. The interruption of this axis is associated with an altered microglia physiology, reduced neurogenesis and abnormal synaptic contacts in cortical regions, along with cognitive and motor abnormalities in the adult organism.

In this thesis, I explored the effects of the deletion of the gen for the fractalkine receptor on the development of the hippocampal formation with a special focus on the CA3 region. A multidisciplinary approach rendered results that support that the interruption of the fractalkine pathway is related to a delay in the formation of the normal microglial population in the CA3 and the expression of an abnormal morphology in adulthood associated with a pro-inflammatory state. Additionally, this mutation is related to the reconfiguration of the population activity of the CA3 region during the neonatal period that persists into adulthood at the network level, along with morphological abnormalities in the synaptic components of the mossy fiber pathway and diminished synaptic strength specific to this afference. Altogether, the morphological and physiological alterations are linked to diverse cognitive and behavioral deficits, including blunted innate behaviors, increased trait-anxiety and impaired encoding of novel spatial information.

Overall, these results add new insights into the complex interactions between neurons and glial cells in the development and refinement of neural circuits and open new perspectives into the pathophysiology of neuropsychiatric disorders.

# Introducción

Las propiedades cognitivas del sistema nervioso derivan de la interacción de redes neuronales capaces de la integración constante de información y su oportuna recuperación (Quiroga, 2012a; Smith et al., 2013). La estructura, composición y funcionamiento de estas redes o sub-circuitos determinan la generación de actividad cerebral tanto normal como patológica (Smith et al., 2013; Sporns, 2013; Suzuki & Bekkers, 2012).

El desarrollo, mantenimiento y adaptación de la apropiada conectividad funcional en las redes neuronales constituye un proceso complejo en el que interactúan activamente células neuronales y gliales (Belvindrah et al., 2014; Voronin & Cherubini, 2003; Wu et al., 2015a). Mientras que las neuronas son las células más estudiadas y emblemáticas del sistema nervioso, su correcto funcionamiento, organización y homeostasis es una tarea conjunta con las células gliales. Los elementos celulares gliales, antiguamente referidos como “pegamento cerebral” (Allen & Barres, 2009), incluyen principalmente a los astrocitos; células estrelladas con funciones metabólicas importantes y constituyentes de la barrera hematoencefálica (Koehler et al., 2009), los oligodendrocitos; células formadoras del recubrimiento de mielina que facilita la transmisión del potencial de acción neuronal y da sus características definitorias a la sustancia blanca cerebral (Bradl & Lassmann, 2010), y la microglia; la célula inmunológica residente del sistema nervioso central (Kettenmann et al., 2011), así como otras formas especializadas y/o precursoras de estas poblaciones gliales principales.

Las interacciones fisiológicas entre las neuronas y las células gliales son numerosas y complejas. Las diversas funciones de la microglia incluyen la producción y subsecuente eliminación de neuronas durante el desarrollo temprano del sistema nervioso (Bessis et al., 2007); el surgimiento, consolidación y eliminación de contactos sinápticos (Wu et al., 2015); la modulación de la neurotransmisión y su plasticidad (Ragozzino, et al., 2006; Wu et al., 2015); la identificación y remoción del debris celular (Ransohoff & Perry, 2009); la respuesta inflamatoria ante insultos traumáticos, infecciosos, tóxicos o degenerativos (Kettenmann et al., 2011; Ransohoff & Perry, 2009).

La microglia está involucrada en una amplia gama de procesos fisiológicos y patológicos. En esta tesis se exploran las consecuencias de la interrupción de la señalización entre las neuronas y la microglia con un enfoque multidisciplinario centrado en la región de CA3 de la formación hipocampal, una de las regiones centrales de integración de información en el cerebro mamífero, integrando hallazgos anatómicos, electrofisiológicos y conductuales.

En las siguientes secciones de la introducción se exponen los antecedentes más relevantes y las generalidades de los elementos centrales de este trabajo, concretamente: la fisiología, morfología y función principal de la microglia; la vía de la fractalquina y su asociación con alteraciones fisiológicas y conductuales; la anatomía, la fisiología y las funciones cognitivas de la formación hipocampal con un especial enfoque en la región de CA3.

En la sección de Metodología se presenta el diseño experimental y, en detalle, cada protocolo experimental realizado. Para cada elemento de la metodología se ha incluido una breve introducción del trasfondo teórico de cada técnica y el objetivo experimental de su empleo, seguido de la descripción detallada de su implementación.

En Resultados se recopilan las observaciones y hallazgos obtenidos de cada fase experimental acompañados de una breve discusión de su interpretación y contextualización.

Finalmente, se presenta una Discusión general donde se integran los resultados obtenidos, se contrastan con los antecedentes pertinentes y las limitaciones técnicas encontradas, y se sugieren avenidas adicionales de investigación futuras que complementarían los hallazgos aquí encontrados y extenderían la presente línea de investigación y los anexos incluidos.

Por último, se incluyen Anexos donde se exponen los resultados obtenidos de una línea de investigación derivada del proyecto principal, y sugerida durante el examen de candidatura, en la cual se retoman las preguntas principales de esta tesis en el contexto de alteraciones inducidas por un “hit” doble: predisposición genética y exposición ambiental.

## La Microglia

La microglia constituye la población celular inmunológicamente competente y fagocítica residente del sistema nervioso central (Augusto-Oliveira et al., 2022; Kettenmann et al., 2011; Wolf et al., 2017). Si bien, las propiedades y funciones de la microglia han sido estudiadas principalmente en el contexto de procesos inflamatorios y neurodegenerativos (Limatola & Ransohoff, 2014; Sheridan & Murphy, 2013; Wolf et al., 2017), recientemente diversos hallazgos han puesto de manifiesto el papel fundamental de la microglia en una gama amplia de funciones fisiológicas del sistema nervioso incluyendo: neurogénesis y soporte trófico neuronal durante el desarrollo y en el organismo maduro, regulación de la excitabilidad neuronal, consolidación y eliminación de contactos sinápticos (Kettenmann et al., 2013; Paolicelli et al., 2014; Ueno et al., 2013; Wu et al., 2015; Zhan et al., 2014).

El origen celular de la microglia es aún tema controversial de intensa investigación. Sin embargo, la noción más aceptada actualmente es que deriva de una población celular de origen mesodérmico en el saco vitelino desde donde migra y establece colonias auto-regenerativas en el sistema nervioso central sin subsecuente aportación de elementos celulares del sistema hematopoyético (Ginhoux et al., 2010; Utz et al., 2020; Zhan et al., 2019). En roedores, las colonias de microglia en el sistema nervioso central pueden detectarse desde el día embrionario ocho y continúan expandiéndose en densidad hasta aproximadamente el final de la segunda semana de vida post-natal, cuando alcanzan un pico transitorio de máxima densidad celular para posteriormente comenzar a disminuir hasta los niveles finales del organismo adulto (Kim et al., 2015; Nikodemova et al., 2015). La densidad de microglia en el adulto es sorprendentemente homogénea en diversas estructuras cerebrales y diversas especies, siendo aproximadamente el 6% de todas las células tanto en sustancia blanca como en la gris (Santos et al., 2020). En el ratón, esta densidad media muestra su mínima expresión en la corteza con un 5% y su máxima en la *substantia nigra* con 12% (Lawson et al., 1990).

### La morfología de la microglia es indicativa de su estado funcional

La morfología de la microglia es característicamente versátil y refleja tanto su estado de maduración como su estado funcional (Augusto-Oliveira et al., 2022; I. Kim et al., 2015). En efecto, la diversidad morfológica de la microglia fue uno de los primeros hallazgos en ser caracterizados sobre esta célula (Del Rio-Hortega, 1919). Pronto, el estudio sistemático de los cambios morfológicos de la microglia derivó en estados fisiológicos diferenciables.



La microglia vigilante, ramificada o en reposo, consiste en células de soma pequeño con numerosos procesos móviles delgados y alargados. Es la morfología más común en el cerebro maduro intacto y la motilidad de los procesos mantiene un escaneo continuo del ambiente circundante a la célula microglial; por otro lado la microglia ameboide o des-ramificada fue identificada en las inmediaciones de lesiones traumáticas, isquémicas u otros procesos patológicos y ha sido relacionada con cambios funcionales en la microglia asociados con la activación inmunológica (Augusto-Oliveira et al., 2022; Sierra et al., 2014). Nuevos métodos de análisis morfológico, incluyendo esqueletonización y análisis de fractalidad, identifican cuatro estados morfológicos elementales de la microglia: ramificada, ramificada/hipercompleja, des-ramificada y des-ramificada en bastón (Morrison et al., 2017), que complementan la clasificación binaria entre la microglia vigilante y la activada y provee una mejor conceptualización de la diversidad morfológica de esta célula y su especialización funcional.

En efecto, la microglia vigilante presenta variaciones dependientes a la zona en la que se encuentra; la microglia radial, el tipo más común de morfología es propia de la sustancia gris cerebral en condiciones fisiológicas, la microglia ramificada longitudinalmente es característica de la sustancia blanca y extiende sus prolongaciones en la dirección de las fibras nerviosas, la microglia compacta tiene pocas ramificaciones y se encuentra exclusivamente en regiones del cerebro carentes de barrera hematoencefálica (Lawson et al., 1990).

La microglia hipercompleja o hiperramificada refleja los primeros cambios de la “activación” microglial, incluyendo la expresión de CD11b, seguida de la microglia hipertrófica que ya muestra un soma agrandado y la retracción de los procesos (Ladeby et al., 2005). El fenotipo ameboide clásico con un soma agrandado, pocos procesos y filopodios numerosos, sigue a estos fenotipos transitorios y constituye el estado de mayor reactividad de la microglia, con una alta capacidad de movilidad y secreción de citocinas y factores inflamatorios (Davis et al., 1994; Ladeby et al., 2005; Ransohoff & Perry, 2009).

Como se mencionó previamente, el estado vigilante de la microglia es caracterizado por la movilidad de los procesos microgliales, los cuales responden a numerosos estímulos como neurotransmisores, neuromoduladores, citocinas, quimiocinas y diversos patrones moleculares asociados a daño celular, en especial el ATP (Cardona et al., 2006; Sierra et al., 2014), para los cuales la microglia expresa receptores, incluyendo receptores para la mayoría de los neurotransmisores y los neuromoduladores, una amplia variedad de receptores purinérgicos, y receptores y marcadores del complejo de histocompatibilidad tipo II (Izquierdo et al., 2019).

Este patrullaje del ambiente inmediato a la célula microglial involucra la interacción con procesos neuronales incluyendo contactos peri-somáticos, dendríticos, axonales y sinápticos (Eyo &

Wu, 2019). La interacción entre los procesos de la microglia y los elementos sinápticos, tanto espinas dendríticas como terminales axónicas, es abundante y dependiente de la actividad neuronal y puede resultar en la formación de nuevos contactos sinápticos, la consolidación de sinapsis en desarrollo o la eliminación de sinapsis mediante la trogocitosis parcial o total, por parte de la microglia (Miyamoto et al., 2016; Paolicelli et al., 2011; Tremblay et al., 2010; Wilton et al., 2019). La interacción de la microglia con las estructuras sinápticas, especialmente su consolidación o eliminación, depende de la señalización tanto de elementos del complemento como por la vía de la fractalquina (CX3CL1) (Paolicelli et al., 2014; Sheridan & Murphy, 2013; Sierra et al., 2014). La señalización entre las neuronas y la microglia a través de la vía de la fractalquina es preponderante en el establecimiento, remodelado y mantenimiento de los circuitos neuronales.

### **La vía de la fractalquina (CX3CL1) - (CX3CR1)**

Entre las vías de señalización mejor estudiadas que median la interacción entre las neuronas y la microglía se encuentran los elementos del sistema de complemento, el factor de necrosis tumoral alfa y la fractalquina (CX3CL1) (Cardona et al., 2006a; Kettenmann et al., 2011; Sierra et al., 2014).

La fractalquina (CX3CL1) es la única quimiocina de la familia CX3C y está caracterizada estructuralmente por la presencia de tres residuos de aminoácidos localizados entre dos residuos de cisteína que forman un enlace disulfuro (White & Greaves, 2012). Es un elemento de señalización ubicuo en el sistema inmunológico y su único receptor conocido (CX3CR1) es expresado en la periferia por elementos celulares del sistema monocítico/mononuclear (White & Greaves, 2012), donde es actualmente estudiado como un mediador de la respuesta inflamatoria en diversas patologías entre ellas el lupus sistémico, la aterosclerosis, la nefritis renal y la falla orgánica múltiple durante la sepsis (Chen et al., 2020; Guo et al., 2017; Inoue et al., 2005; Jones et al., 2010; White & Greaves, 2012). En el sistema nervioso central la fractalquina es expresada de manera constitutiva principalmente por las neuronas y su expresión es predominantemente alta en regiones del prosencéfalo como la corteza, el hipocampo, los ganglios basales y el tálamo (Limatola & Ransohoff, 2014; Nishiyori et al., 1998).

La fractalquina es una citocina que existe tanto en forma soluble como membranal (Arnoux & Audinat, 2015a; Garton et al., 2001; Paolicelli et al., 2014); su expresión en la membrana neuronal ha sido relacionada con una función de adhesión molecular y se ha identificado como un factor importante que media la interacción de los procesos microgliales y los elementos celulares neurales (Szepesi et al., 2018a), por otro lado, su forma soluble, la cual deriva de la escisión de la porción extracelular de la fractalquina membranal, principalmente por acción de las enzimas ADAM10,

ADAM17 y catepsina-S (Garton et al., 2001), actúa como un potente factor quimiotáctico extracelular que promueve la motilidad y la migración de la microglia (Arnoux & Audinat, 2015; Cardona et al., 2006; Pagani et al., 2015; White & Greaves, 2012).

En el sistema nervioso central el receptor a fractalquina (CX3CR1) es principalmente expresado por la microglia (Nishiyori et al., 1998), en condiciones fisiológicas, desde su origen en el saco vitelino en etapas tempranas de la gestación (Mizutani et al., 2012) y es indispensable para la activación y migración microglial, así como en la señalización de blancos fagocíticos (Arnoux & Audinat, 2015a; Bessis et al., 2007).

El receptor a fractalquina es un receptor con 7 dominios transmembranales, cuya porción amino terminal actúa como el sitio de reconocimiento y unión a la fractalquina y su extremo carboxilo terminal se encuentra acoplado a una proteína  $G_i$ , entre cuyos efectos se incluyen la inhibición de la adenilil ciclase y la activación de múltiples vías que reclutan a la fosfoinositol-3-cinasa, la proteína cinasa B y el factor NF- $\kappa$ B, que median las fases iniciales de activación en la microglia (Arnoux & Audinat, 2015a; White & Greaves, 2012). Hasta fechas recientes, la fractalquina era reconocida como el único ligando endógeno para el CX3CR1. Sin embargo, recientemente se ha demostrado la afinidad de la proteína tau por el receptor a fractalquina, aunque se desconoce la función de esta interacción (Bolós et al., 2017).

## **La microglia en el establecimiento y refinamiento de los circuitos neuronales**

Durante el desarrollo ocurren dos grandes procesos de remodelación y refinamiento en el sistema nervioso central; primeramente se genera un número excesivo de células neurales de las cuales cierta proporción sufrirá apoptosis incluso antes de llegar a convertirse en neuronas maduras (Pfisterer & Khodosevich, 2017). Posteriormente, aquellas que sobreviven establecen conexiones supranumerarias entre sí, principalmente en la forma de sinapsis silentes (Voronin & Cherubini, 2004), que son posteriormente consolidadas o eliminadas en un proceso de refinamiento de los circuitos cerebrales denominado poda sináptica (Bellingham et al., 1998a; Hong et al., 2016). En ambos procesos la señalización entre las neuronas y la microglia tiene un papel determinante en la estructura y funcionamiento de los circuitos neurales en el organismo adulto (Hong et al., 2016; Pfisterer & Khodosevich, 2017; Ueno et al., 2013a).

A pesar de que estos procesos son característicos del desarrollo embrionario y postnatal, en el cerebro adulto la conectividad neuronal es altamente dinámica (Kerchner & Nicoll, 2008). Trabajos recientes han revelado la participación activa de la microglia en el refinamiento constante de la conectividad sináptica (Paolicelli et al., 2014; Ragazzino et al., 2006; Wu et al., 2015) y la

supervivencia neuronal en situaciones de estrés celular (Cardona et al., 2006; Fuhrmann et al., 2010).

La microglia es un elemento central de los nichos neurogénicos en la adultez donde igualmente es clave en el mantenimiento de la neurogénesis en el adulto y, a la vez, determina la supervivencia o eliminación de las neuronas y los otros elementos celulares generados en estos nichos y su integración a los circuitos neuronales existentes (Bachstetter et al., 2011; Bolós et al., 2018; Kettenmann et al., 2013; Sellner et al., 2016). En el cerebro maduro la microglia participa en la remodelación dependiente de la experiencia de los circuitos neuronales mediante la trogocitosis de contactos sinápticos, la inducción de la formación de nuevas sinapsis y la liberación de factores de crecimiento (Hong et al., 2016; Miyamoto et al., 2016; Tremblay et al., 2010); además de modular la excitabilidad neuronal y la transmisión sináptica (Ragozzino, et al., 2006; Wu et al., 2015), procesos en los que la señalización mediada por la fractalquina es importante (Hong et al., 2016; Pocock & Kettenmann, 2007).

La alteración del sistema de comunicación fractalquina-CX3CR1 se asocia a anomalías en el desarrollo de la conectividad funcional de diversos circuitos cerebrales, la maduración de los contactos sinápticos, así como la consecuente alteración de funciones cognitivas y motoras en modelos animales (Hoshiko et al., 2012; Paolicelli et al., 2011; Rogers et al., 2011; Y. Zhan et al., 2014). En humanos, estudios epidemiológicos han relacionado ciertos polimorfismos en el gen del CX3CR1 con un incremento en el riesgo de desarrollar algún trastorno del espectro autista y esquizofrenia (Ishizuka et al., 2017a). Adicionalmente, se han reportado niveles reducidos de fractalquina en el cerebro de pacientes con esquizofrenia (Hill et al., 2020), así como elevación tanto de la fractalquina como su receptor (CX3CR1) en pacientes con manifestaciones psiquiátricas de lupus eritematoso sistémico (Guo et al., 2017).

Se ha reportado que ratones con supresión del gen para el CX3CR1 expresan un fenotipo conductual que comparte ciertas características con estas patologías como: conductas compulsivas (acicalamiento excesivo) (Rogers et al., 2011), alteración de la interacción social (Zhan, 2015; Zhan et al., 2014), aprendizaje deficiente de tareas motoras y reducción de la memoria espacial (Rogers et al., 2011).

Estas alteraciones se encuentran relacionadas con un proceso de poda sináptica deficiente y con la expresión prevalente de sinapsis con características electrofisiológicas y morfológicas de inmadurez en el hipocampo y otras estructuras cerebrales (Hoshiko et al., 2012; Paolicelli et al., 2011; Rogers et al., 2011; Y. Zhan et al., 2014). En la corteza de los barriles se ha reportado retraso en la maduración de las sinapsis tálamo-corticales asociado a una migración enlentecida de la población microglial, así como una transición retrasada en la expresión de receptores tipo NMDA

con subunidades GluN2A (Hoshiko et al., 2012). Estas alteraciones son consistentes con la observación de una disminución en las amplitudes de las corrientes postsinápticas (EPSC, por sus siglas en inglés) espontáneas en neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo (Rogers et al., 2011). Cabe resaltar que las alteraciones sinápticas reportadas sólo se han encontrado en sinapsis glutamatérgicas, con un impacto mucho menor en el sistema GABAérgico (Bertot et al., 2019), lo que sugiere que estos dos sistemas podrían tener mecanismos independientes de desarrollo y maduración.

Adicionalmente, la delección del receptor a fractalquina impacta la supervivencia de ciertos grupos neuronales durante el desarrollo, específicamente se ha reportado la apoptosis de una subpoblación de neuronas piramidales de la capa V en la corteza motora que proyectan a blancos subcorticales en ausencia de microglia o como consecuencia de la interrupción del eje de fractalkina (Ueno et al., 2013a).

Estas alteraciones en la supervivencia neuronal y su conectividad sináptica impactan la conectividad global del cerebro adulto. Por ejemplo, se ha documentado una disminución en la conectividad funcional entre estructuras cerebrales distantes (e.g. el hipocampo y la corteza prefrontal) (Zhan, 2015; Zhan et al., 2014).

La supresión del receptor a fractalquina también impacta el desarrollo normal de la microglia así como su fisiología en organismo adulto, impactando la expresión de corrientes de potasio y la capacidad de quimiotaxis ante la liberación de señales de daño celular, una función fundamental de la activación microglial (Miliot et al., 2016; Pagani et al., 2015).

Los hallazgos presentados indican que el impacto de la interrupción de este eje de señalización neurona-microglia se extiende más allá del desarrollo temprano y si bien los hallazgos conductuales, morfológicos y electrofisiológicos encontrados en modelos murinos juveniles podrían ser causados por las alteraciones en el desarrollo embrionario y post-natal temprano, otras líneas de evidencia ponen de manifiesto que la microglia y la señalización por fractalquina participan en diversos procesos de plasticidad y remodelación del sistema nervioso central adulto (Maggi et al., 2011; Szepesi et al., 2018a).

Por ejemplo, la aplicación de fractalquina exógena tiene un efecto depresor de la transmisión sináptica, particularmente del componente mediado por el receptor tipo AMPA en sinapsis hipocámpales, un efecto que requiere de la presencia del CX3CR1 (Ragozzino, et al., 2006). Además, la liberación de ATP/adenosina por parte de la microglia es un modulador más de los efectos agudos de la fractalquina sobre la transmisión sináptica; la administración exógena de fractalquina impide la inducción de potenciación a largo plazo de la transmisión sináptica (LTP, por

sus siglas en inglés) en un proceso que involucra la liberación de ATP por parte de la microglia y la activación de receptores a adenosina tipo 3 en la neurona post-sináptica (Maggi et al., 2009).

En la mayoría de estos antecedentes descritos la herramienta más útil para el estudio de la interacción entre la microglia y las neuronas han sido líneas transgénicas de ratones en los cuales se ha eliminado, total o parcialmente, el receptor a fractalquina. Esta manipulación genética, inicialmente motivada por el objetivo de inducir la expresión de marcadores fluorescentes para el estudio del origen, la migración y morfología de la microglia y otros macrófagos (Jung et al., 2000; Yona et al., 2013), ha tenido consecuencias insospechadas en el sistema nervioso y se ha convertido en una herramienta sumamente útil en la investigación de las alteraciones inducidas por la interrupción de la señalización por fractalquina y constituye el primer elemento central del trabajo de esta tesis (Yona et al., 2013).

El estudio de los efectos de la manipulación de la vía de la fractalquina y la microglia en la plasticidad sináptica es complejo, por lo que deben reconocerse controversias en varios frentes.

Los reportes sobre el estudio de la inducción y mantenimiento de la LTP en ratones con delección del CX3CR1 se han enfocado en la vía colateral de Schaffer, la sinapsis entre las regiones CA3 y CA1 del hipocampo, sin embargo los resultados han sido contradictorios; mientras que Rogers et al., (2011) reporta una total ausencia de LTP, Maggi et al., (2011) reportan que no hay diferencia en la magnitud de la LTP, pero sí una mayor duración en el mantenimiento de la misma en el genotipo *Cx3cr1<sup>-/-</sup>*, por último Paolicelli et al., (2011) no encontraron diferencias ni en la magnitud ni la duración de la LTP en esta sinapsis. A estos resultados contradictorios se añade la controversia entre los efectos de la administración exógena de fractalquina en la transmisión sináptica, que en general muestran un efecto inhibitorio que se acompaña con una reducción en la inducción y mantenimiento de la LTP (Maggi et al., 2009; Ragozzino, et al., 2006). Sin embargo, lo anterior se contradice con los resultados que indican un incremento en la concentración de fractalquina soluble en el hipocampo durante una tarea de aprendizaje y navegación espacial (Sheridan et al., 2014), tareas cognitivas generalmente asociadas a la inducción de LTP.

Las alteraciones morfológicas y fisiológicas en la microglia asociados a la interrupción de la señalización por fractalquina presentan también hallazgos contradictorios. Por un lado se ha reportado que estas manipulaciones inducen en la microglia una morfología menos ramificada y una actividad fagocítica incrementada en preparaciones *ex vivo* e *in vitro*, lo que ha sido interpretado como indicio de un estado activado (Cardona et al., 2006b). Sin embargo, otros reportan ausencia de cambios en la morfología asociados a este manipulación (Castro-Sánchez et al., 2019; Gyoneva et al., 2019). Adicionalmente, estudios electrofisiológicos indican que la microglia carente del receptor a fractalquina presenta una expresión disminuida de las corrientes iónicas características

del estado activado y una migración disminuida ante un estímulo quimiotáctico (e.g. ATP extracelular), lo que indica una seria deficiencia en la reactividad de la microglia carente del receptor a fractalquina (Pagani et al., 2015), lo que sugiere que otros mecanismos asociados a la activación de la microglia son regulados por la vía de la fractalquina.

Por último, los efectos de la interrupción de la vía de la fractalquina en modelos de patologías son extremadamente variables y dependientes del contexto. Los cambios en la fisiología de la microglia inducidos por la depleción del receptor a fractalquina parecen tener un efecto neuroprotector en modelos de neurodegeneración como el inducido por el depósito de amiloide beta y modelos de la enfermedad de Parkinson (Fuhrmann et al., 2010; Pabon et al., 2011), así como en modelos de lesión traumática espinal (Donnelly et al., 2011) e isquemia cerebral (Soriano et al., 2002). Así mismo, un efecto protector ha sido reportado en diversos modelos de patologías inflamatorias en la periferia, donde el antagonismo de la señalización por fractalquina se relacionó con la disminución del daño tisular en modelos de nefritis lúpica, de enfermedades cardiovasculares e infecciones virales (Inoue et al., 2005; B. A. Jones et al., 2010b; White & Greaves, 2012). Por el contrario, la vía de la fractalquina tiene efectos neuroprotectores en situaciones de excitotoxicidad (Limatola et al., 2005), además de los numerosos efectos deletéreos de su interrupción mencionados previamente.

## La formación hipocampal

En humanos, el hipocampo es una estructura de materia gris, pareada y elongada compuesta por dos regiones contiguas: el asta de Amón (*hippocampus proper*) y el giro dentado. El hipocampo se encuentra presente en ambos hemisferios cerebrales en la región interna del lóbulo temporal, inmediatamente ventral al piso del cuerno inferior del ventrículo lateral (Schultz & Engelhardt, 2014; Witter, 2009). La formación hipocampal hace referencia a las áreas corticales adyacentes al hipocampo y otras estructuras con estrecha relación anatómica y funcional. Generalmente son consideradas parte de la formación hipocampal: el hipocampo propiamente, el giro dentado, la corteza entorrinal, el subículo y las cortezas parahipocampal y perirrinal (Squire et al., 2004).

En los roedores el hipocampo cobra una mayor prominencia anatómica que en los humanos (Fig. 1). Las estructuras consideradas parte de la formación hipocampal en los roedores son el hipocampo propiamente, dividido en tres regiones contiguas CA3, CA2 y CA1, el hilus (o CA4), el giro dentado, el subículo y la corteza entorrinal (Witter & Amaral, 2004). Estas estructuras comparten las características propias de la allocorteza; una estructura cortical de tres capas (Amaral et al., 2007;

Witter & Amaral, 2004). El hipocampo en los roedores presenta una forma cilíndrica y curva, similar a una "C" a lo largo de su eje septo-temporal o longitudinal. Se extiende subcorticalmente desde su polo septal, posterior a los núcleos septales y dorsal al tercer ventrículo, primero caudal y luego ventralmente hasta su polo temporal en la región medial y ventral del lóbulo temporal; la región parahipocampal hace referencia a la corteza cerebral que cubre esta porción del hipocampo e incluye las cortezas entorrinal, perirrinal y postrinal, así como al pre y parasubiculum (Amaral & Witter, 1989; Witter & Amaral, 2004).

La formación hipocampal es una de las estructuras cerebrales más intensamente estudiadas en la historia de las neurociencias debido a su gran repertorio de peculiaridades anatómicas, fisiológicas y moleculares, la amplia variedad de funciones cognitivas a las que da soporte desde la navegación espacial a la memoria episódica, así como la plétora de entidades clínicas en las que se ha visto relacionado como la enfermedad de Alzheimer, la epilepsia, la amnesia o la esquizofrenia (Andersen et al., 2006b).

El hipocampo ha sido campo fértil en cada etapa de innovación en las neurociencias, una de las primeras regiones en ser cuidadosamente descrita por anatomistas, cuna del estudio de la plasticidad sináptica, estandarte de la actividad rítmica cerebral, fiel aliado en el alba del cultivo neuronal, caballo de batalla en el estudio de la memoria (Andersen et al., 2006a); la formación hipocampal parece guardar algo para todo aquel interesado en su estudio y la interacción entre la microglia y las neuronas no es la excepción, por lo que el hipocampo es el segundo elemento central de estudio de esta tesis. A continuación, se exponen brevemente las funciones cognitivas asociadas al hipocampo, así como la estructura y fisiología de los circuitos intrínsecos y extrínsecos al hipocampo con especial énfasis en la región CA3.

## **Funciones cognitivas asociadas a la formación hipocampal**

Como parte del sistema límbico, se hipotetizó por mucho tiempo que la función del hipocampo era principalmente la de regulación de las emociones y el control inhibitorio de impulsos conductuales (Andersen et al., 2006a). Esta noción de la función del hipocampo ha sido debatida durante décadas y ha palidecido en contraste con la evidencia clínica y experimental que relacionan al hipocampo más estrechamente con funciones mnemónicas y de navegación espacial (Eichenbaum, 2004; Leutgeb et al., 2005; Nadel et al., 1975).

El papel primordial de la formación hipocampal en la generación de la memoria episódica, el tipo de memoria que evoca la recolección de experiencias personales pasadas, quedó evidenciado en el estudio de pacientes con lesiones cerebrales focalizadas a esta región durante el siglo XX



(Scoville & Milner, 1957; Squire, 2009). Estudios posteriores han revelado que el déficit cognitivo de este tipo de lesiones no se restringe a un efecto meramente amnésico, sino además, impacta la planeación e ideación de eventos futuros (Buckner, 2010; Hassabis et al., 2007).

Los estudios en roedores han aportado nuevas dimensiones a las funciones cognitivas asociadas al hipocampo. Puntualmente, tanto los estudios de lesiones como las aproximaciones neurofisiológicas han revelado la amplia especialización de la formación hipocampal para el aprendizaje y la navegación espacial (Hartley et al., 2014; Moser et al., 1995; O'Keefe & Dostrovsky, 1971). Dicha especialización para la representación espacial en la formación hipocampal queda manifiesta en las descripciones de neuronas en esta región cuyo disparo se encuentra altamente modulado por la localización del sujeto en el espacio, las denominadas células de lugar del hipocampo (Eichenbaum et al., 1999; Leutgeb et al., 2005; O'Keefe & Dostrovsky, 1971), las diversas células en la corteza entorrinal de cuyo disparo emerge una representación distribuida del espacio, denominadas células de red (Fyhn et al., 2004; Moser et al., 2014), así como neuronas moduladas por la dirección de la cabeza del sujeto y aquellas que codifican los límites geométricos del espacio (Leutgeb et al., 2005).

La prominencia de la representación espacial en el hipocampo de roedores aunado a la dificultad inherente a la interrogación de la experiencia subjetiva en modelos animales, una de las propiedades inherentes de la memoria episódica (Dere et al., 2006), ha dado origen a una brecha importante entre los modelos cognitivos de la función hipocampal derivados de la investigación en humanos, centrada en la memoria declarativa, y aquellos derivados de organismos modelo, focalizados en la navegación espacial (Eichenbaum, 2000; Eichenbaum & Cohen, 2014).

Sin embargo, investigaciones recientes han revelado evidencia de una especialización en la representación neuronal de la región hipocampal en humanos similar a la ya descrita en roedores en la forma de neuronas "gnósticas" cuya actividad representara conceptos u objetos complejos pero invariables en respuesta a la percepción multisensorial de dicho objeto o concepto (Quiroga, 2013). Las denominadas células de concepto son neuronas de la formación hipocampal, registradas en pacientes humanos, con respuestas invariables y selectivas a personas, personajes u objetos específicos, a pesar de una amplia variabilidad en las representaciones sensoriales de éstas usadas para la evocación de la respuesta (imágenes, sonidos, etc.) e incluso respondiendo a representaciones más abstractas como el nombre, escrito o vocalizado (Quiroga et al., 2005).

El paralelismo en la especialización en la codificación de las neuronas de la formación hipocampal de los humanos (células de concepto) y los roedores (células de lugar, red, etc.) constituye la principal línea de evidencia en la reconciliación de los modelos cognitivos de la función hipocampal (Eichenbaum, 2004; Kesner, 1980, 2016; Quiroga, 2012).

Ahondando en el paralelismo, las funciones mnemónicas del hipocampo en modelos animales no se restringen a la navegación espacial. Si bien es controversial la noción de memoria episódica en roedores, existe amplia evidencia de memoria contextual en animales (Roberts, 2019). Generalmente un componente emocional (e.g. estrés) es clave en el estudio de la memoria contextual en animales y el hipocampo es necesario para la adquisición y expresión de este tipo de memoria (File et al., 2004; Gray, 1985; Kim & Fanselow, 1992).

Este rango de funciones cognitivas no se ve reflejado en una especialización en la conectividad intrínseca del hipocampo. Por el contrario, la homogeneidad anatómica del hipocampo en su eje longitudinal (septo-temporal) ha dado origen a la hipótesis lamelar del hipocampo que sugiere que el hipocampo podría funcionar de manera modular en su eje transversal proveyendo un circuito funcional equivalente en toda su extensión longitudinal (Andersen et al., 2000). En efecto, la especialización cognitiva del hipocampo parece originarse en su conectividad extrínseca, es decir en las aferencias y eferencias del hipocampo con otras estructuras cerebrales, la cual sí muestra una especialización equivalente en el eje longitudinal del hipocampo, tanto en roedores como en humanos, y presenta una organización consistente con el rango de funciones cognitivas en las que se encuentra involucrado el hipocampo (Strange et al., 2014).

## **Conectividad de la formación hipocampal**

### *El circuito trisináptico*

En un corte ortogonal al eje longitudinal del hipocampo, en su región temporal, pueden apreciarse las principales estructuras anatómicas que dieron origen al clásico “circuito trisináptico”. En este modelo temprano de la conectividad hipocampal, el motivo citoarquitectónico recurrente es la aparente unidireccionalidad de las proyecciones entre las estructuras que componen la región hipocampal (Amaral & Witter, 1989; Witter & Amaral, 2004), en el siguiente orden:

Corteza entorrinal → giro dentado → CA3 → CA1

De este modo, el circuito comienza con la proyección de la corteza entorrinal al giro dentado, constituyendo al vía perforante, el giro dentado proyecta a la región CA3 mediante la fibra musgosa, finalmente CA3 proyecta a CA1 mediante la vía denominada colateral de Schaffer (Amaral & Witter, 1989; Knierim, 2015; Witter et al., 2014) (Fig. 1).

Sin embargo, a este modelo debemos agregar importante información complementaria. Tanto de la conectividad intrínseca de la formación hipocampal como su relación con las estructuras

corticales más íntimamente asociadas presentan un amplio grado de interconectividad, paralelismo, convergencia y retroalimentación, así como un gradiente de especialización en su eje longitudinal.

La corteza entorrinal es el principio y el final del clásico circuito trisináptico; es el origen de la principal aferencia extra-hipocampal y el blanco de las principales eferencias extra-hipocampales (Fig. 1).

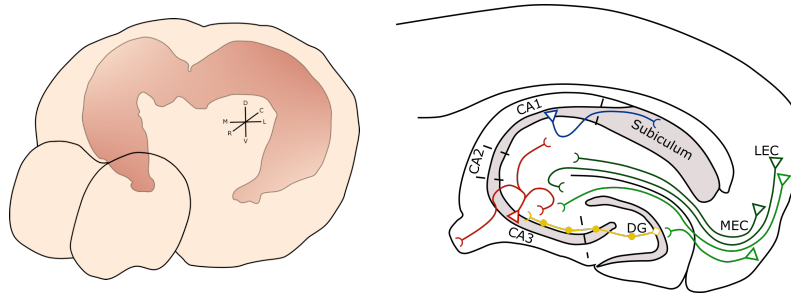


Fig. 1 La formación hipocampal.

El hipocampo ocupa gran parte de la masa encefálica sub-cortical en los roedores, se extiende de manera curva desde su polo dorsal justo caudal a los núcleos septales hasta su polo ventral justo medial a la corteza temporal (Izq.). El circuito fundamental de la formación hipocampal comienza en la corteza entorrinal la cual envía dos aferencias al hipocampo la vía perforante (verde) y la temporoamónica (Der.). La vía perforante inerva al giro dentado (DG) y a CA3, de ahí el siguiente relevo es la fibra musgosa (amarillo) que conecta el DG con CA3, la cual, a su vez, establece la red asociativa/colateral (AC), enviando colaterales a las mismas neuronas de CA3 ipsi y contra-lateralmente. Finalmente, CA3 da origen a la colateral de Schaffer que inerva CA1, que a su vez proyecta al subículo y a los blancos extra-hipocampales. MEC; corteza entorrinalmedial, por sus siglas en inglés, LEC, corteza entorrinal lateral, por sus siglas en inglés.

La eferencia de la corteza entorrinal al hipocampo constituye dos proyecciones; la denominada vía perforante corresponde a la clásica proyección al giro dentado que también inerva las dendritas distales de CA3 y CA2 y se origina en la capa II de la corteza entorrinal (Witter, 2007). En cambio, la vía temporoamónica se origina en la capa III y proyecta directamente a CA1, CA2 y al subículo (Witter et al., 2014). El paralelismo de esta vía es compartido tanto por la porción medial como la lateral de la corteza entorrinal (Nilssen et al., 2019).

El giro dentado es una estructura de tres capas principales: molecular, granular y polimórfica (hilio). La zona subgranular, una división de la capa polimórfica, es un nicho neurogénico (Amaral et al., 2007). La célula principal del giro dentado es la célula granular, una neurona bipolar cuya proyección recibe el nombre de fibra musgosa. La fibra musgosa es la proyección con la distribución más estrecha y ortogonal al eje longitudinal del hipocampo, siendo la única proyección que se conforma, en términos generales, a una organización laminar del hipocampo (Henze et al., 2000). En su recorrido hacia CA3 establece contactos tanto con interneuronas GABAérgicas del giro dentado como las células *mossy* del hilio hasta finalmente inervar interneuronas y neuronas principales de la región CA3 (Acsády et al., 1998).

Las células *mossy*, glutamatérgicas, a su vez proyectan de vuelta al giro dentado tanto de manera local como distante; la proyección distante se distribuye a lo largo del eje longitudinal del hipocampo, así como al hipocampo contralateral innervando interneuronas y células granulares, estableciendo así una de las proyecciones que más claramente desafía la hipótesis lamelar de la organización hipocámpal (Scharfman, 2016).

En la región CA3, la fibra musgosa establece contactos sinápticos con las neuronas piramidales mediante contactos especializados denominados botones gigantes y con un número mayor de interneuronas mediante sinapsis *en passant* (Acsády et al., 1998; Jaffe & Gutiérrez, 2007).

La eferencia de CA3 se divide en una proyección local que establece una red auto-asociativa entre las mismas piramidales de CA3 denominada red asociativa/colateral (AC) y la, ya mencionada, colateral de Schaffer que inerva CA1 (Le Duigou et al., 2014; Witter, 2007). Adicionalmente, una importante aferencia de CA3 es la denominada proyección colateral que conecta las regiones de CA3 de ambos hipocampos e incluye las proyecciones de CA3 a la región CA1 contralateral (Le Duigou et al., 2014; Witter, 2007). Así mismo, se ha reportado la existencia de una proyección retrógrada de CA3 al giro dentado, cuyas terminales se distribuyen tanto en la capa polimórfica como en la capa granular (Li et al., 1994).

CA3 recibe, además, una importante aferencia extra-hipocámpal proveniente del núcleo septal medial y la banda diagonal de Broca, y envía de manera recíproca una eferencia al núcleo septal lateral (Witter, 2007).

La región de CA1 es el principal blanco de CA3 y constituye la tradicionalmente definida salida del hipocampo (Amaral, 1993; Andersen et al., 2006b). Presenta una estructura compacta de neuronas piramidales con escasa inervación colateral. Como ya se mencionó, aquí converge la proyección de la vía perforante directa, temporoamónica, con la colateral de Schaffer, este arreglo ha llevado a la hipótesis de que en esta región se lleva a cabo una comparación entre la representación espacial proveniente de la corteza, con la información en vivo de la localización del sujeto, y la representación procesada por CA3, un patrón generado para la óptima ortogonalización de estímulos, con el fin de determinar la novedad de la información o la recuperación de información previamente codificada (Hunsaker et al., 2008; Kesner & Rolls, 2015; Rolls, 2013).

El principal blanco de salida de CA1 es el subículo, esta proyección presenta una organización distintiva en el sentido de llaves concéntricas; la porción más proximal de CA1 proyecta a la más distal del subículo, mientras que la región más distal de CA1 inerva la porción más proximal del subículo (Amaral et al., 1991; Amaral & Lavenex, 2006). Adicionalmente, CA1 proyecta a múltiples regiones cerebrales además de la corteza entorrinal, incluyendo: la corteza prefrontal y retrosplenial (Jay & Witter, 1991; Spellman et al., 2015), múltiples núcleos hipotalámicos (Cenquizca

& Swanson, 2006) y el complejo septal, en una manera similar a CA3 (Risold & Swanson, 1997; Witter & Amaral, 2004).

La principal aferencia de las capas superficiales de la corteza entorrinal de donde se origina la vía perforante proviene del pre-subículo y el para-subículo (Kerr et al., 2007). Finalmente, la corteza entorrinal recibe en sus capas profundas (V y VI) abundantes aferencias de las estructuras de salida del hipocampo: CA1 y el subículo, completando el circuito en su origen (Witter et al., 2014).

### *Conectividad extrínseca del hipocampo*

El hipocampo es una estructura involucrada en numerosos circuitos y sistemas en el cerebro. Esta multiplicidad de relaciones anatómicas ha derivado en una gama similar de hipótesis sobre su función que, a la fecha, continúa siendo revisada.

Como se comentó previamente, la corteza entorrinal es el origen de la aferencia más importante del hipocampo y, a la vez, el blanco más relevante de las proyecciones del mismo. Mediante esta conexión al información todas las áreas corticales sensoriales asociativas son integradas en la formación hipocampal (Amaral & Lavenex, 2006). Esta información sensorial está organizada en dos divisiones anatómicas y funcionales de la corteza entorrinal: por una parte la corteza entorrinal medial recibe y envía proyecciones de y hacia las cortezas occipital parietal, piriforme, post-rinal, retroesplenial y para-subicular y es la región más estrechamente relacionada con representación espacial y de navegación (Fyhn et al., 2004; Zhang et al., 2014); en cambio, la corteza entorrinal lateral mantiene estrecha relación con la corteza pre-límbica, infra-límbica peririnal y se considera que provee de información no espacial al hipocampo (Knierim et al., 2014).

Esta organización de la información hacia el hipocampo presenta un gradiente dorso-ventral. Las regiones de la corteza pre-frontal más asociadas a toma de decisión y procesamiento de información emocional proyectan favorablemente a porciones ventromediales de la corteza entorrinal que, a su vez, proyectan preferencialmente a las regiones ventrales del hipocampo, asociadas a procesamiento emocional (Jin & Maren, 2015; Strange et al., 2014). De manera recíproca, regiones corticales asociadas a navegación espacial como la corteza retroesplenial proyectan mayormente a regiones dorsolaterales de la corteza entorrinal que, a su vez, proyectan preferentemente al hipocampo dorsal, la región más especializada en la representación espacial (Buzsáki & Moser, 2013; Moser et al., 1995; Strange et al., 2014).

Una organización similar puede observarse en la proyección del hipocampo al septum lateral. Todo el hipocampo proyecta al septum lateral en toda la longitud de su eje dorso-temporal, sin

embargo, existe una topografía según la cual el origen dorso-temporal de las proyecciones hipocámpales se traduce en una gradiente dorso-ventral en sus blancos septales (Risold & Swanson, 1996, 1997). Esta topografía se conserva en el siguiente relevo de información, los núcleos hipotalámicos. El hipocampo dorsal proyecta a la región más dorsal del núcleo septal que, a su vez, proyecta principalmente a los cuerpos mamilares; todas estas estructuras han mostrado estar íntimamente involucradas en el procesamiento de la información espacial y la navegación (Strange et al., 2014). En cambio, el polo ventral del hipocampo envía eferencias al septum lateral medial que, a su vez, inerva al núcleo preóptico medial y la zona periventricular hipotalámica, núcleos relacionados con funciones autónomas como la termorregulación, la sed, la saciedad, y la producción y liberación de hormonas (Pop et al., 2018). Las regiones del tercio medio del hipocampo proyectan al septum rostral, el cual envía eferencias a los núcleos anterior y ventromedial del hipotálamo relacionados con funciones autonómicas como la termorregulación y la regulación del sueño, así como la regulación de conductas sexual y parental (Deschenes & McCurry, 2009; Pop et al., 2018).

La proyección hipocámpal a la amígdala y el núcleo accumbens mantiene una organización similar que traduce el origen dorso-ventral de la aferencia hipocámpal en una inervación latero-medial en ambos núcleos (Groenewegen et al., 1987; Kahn & Shohamy, 2013; Strange et al., 2014). Ambas regiones cerebrales participan en la regulación de la recompensa, la anticipación, el miedo, la respuesta de lucha o huida y la agresividad, así como los trazos de memoria que estos eventos y emociones producen (LeGates et al., 2018; Richardson et al., 2004).

## **La región CA3 del hipocampo**

El hipocampo es una estructura cerebral fundamental para la formación de memoria declarativa y la navegación espacial (Eichenbaum, 2004; Hartley et al., 2014). En el hipocampo, la región CA3 presenta una conectividad singular donde convergen tres aferencias excitadoras glutamatérgicas; la red asociativa/colateral (AC), constituida por una red auto-asociativa de neuronas piramidales de CA3, la inervación del giro dentado (DG) mediante la fibra musgosa (MF) y la vía perforante, aferencia directa desde la corteza entorrinal (Guzman et al., 2016; Rebola et al., 2017; Witter, 2007) (Fig. 2).

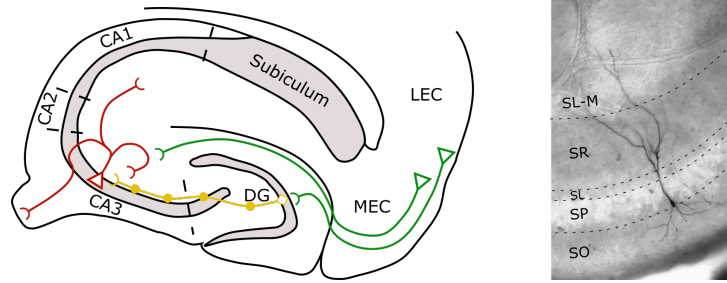


Fig. 2 La región CA3 del hipocampo

**Izq.** Esquema representativo de la conectividad de la región CA3 del hipocampo es inervada por tres aferencias glutamatérgicas (excitadoras) segregadas espacialmente; en el *stratum lucidum* (SL) se distribuye la fibra musgosa (MF) proveniente del giro dentado (DG), en el *stratum radiatum* (SR) y *stratum oriens* (SO) se distribuye la red asociativa/colateral (AC), mientras que en el distante *stratum lacunosum-moleculare* (SL-M) hacen contacto las proyecciones de la vía perforante provenientes de la corteza entorrinal. **Der.** Fotomicrografía (20X) de una neurona piramidal de CA3 marcada con biocitina y reacción de peroxidasa de rábano que demuestra su localización y extensión en la región CA3 con los estratos identificados.

La actividad de la región CA3 es necesaria para la correcta decodificación de la información proveniente de la corteza y la generación de actividad sincrónica en la formación hipocampal, incluyendo el ritmo theta (Buzsáki & Moser, 2013; Rebola et al., 2017).

La aferencia de la fibra musgosa sobre CA3 presenta características singulares que demuestra una alta especialización tanto morfológica como funcional (Gundlfinger, 2008); sus botones pre-sinápticos, denominados botones gigantes, contienen decenas sitios activos de liberación de neurotransmisor y establecen contacto con espinas dendríticas igualmente especializadas denominadas eminencias espinosas (Evstratova & Tóth, 2014; Gundlfinger, 2008; Henze et al., 2000). Los botones gigantes envuelven por completo a las eminencias espinosas estableciendo múltiples zonas activas en cada sinapsis, las cuales se encuentran en gran proximidad del soma; la aferencia de la fibra musgosa se distribuye en una estrecha banda en el límite superior del estrato piramidal, estableciendo sus contactos en las dendritas apicales principales de las neuronas piramidales de CA3 (Evstratova & Tóth, 2014; Rollenhagen & Lübke, 2010). Se estima que cada célula granular establece contacto únicamente con alrededor de quince células piramidales y, en cambio, con diez veces más interneuronas; lo que es interpretado como una vía de señalización excitadora altamente específica y rigurosamente controlada mediante inhibición colateral (Acsády et al., 1998; Lawrence & McBain, 2003).

Por el contrario, cada célula piramidal de CA3 recibe alrededor de veinte mil contactos sinápticos de la red auto-asociativa (Le Duigou et al., 2014), la cual, sin embargo, presenta una probabilidad de conectividad entre neuronas piramidales del 1%, mediante solo de uno a tres sitios de liberación por contacto sináptico (Guzman et al., 2016), que establecen motivos repetitivos de

conectividad como enlaces recíprocos, divergentes y convergentes y cadenas de enlaces que estudios de modelaje indican una alta capacidad de separación y almacenamiento de patrones (Guzman et al., 2016; Vyleta & Jonas, 2014).

Se hipotetiza que la vía perforante provee información espacial y no espacial desde la corteza entorrinal medial y lateral (Nilssen et al., 2019), respectivamente, necesaria para la formación de asociaciones arbitrarias (e.g. localización-olor, objeto-recompensa) y la recuperación y comparación entre trazos de memorias, (Kesner, 2007, 2013; Rolls, 2013).

Cabe resaltar que el giro dentado, la principal aferencia de CA3, es un nicho neurogénico prevalente en el cerebro maduro de muchas especies cuya plasticidad fisiológica y estructural se encuentra estrechamente relacionada con procesos de aprendizaje (Spalding et al., 2013). Para esta plasticidad es muy importante la neurogénesis y el remodelado estructural (*sprouting*) que, a su vez, están modulados por microglia y la comunicación entre la microglia y las neuronas mediante la vía de la fractalquina (Bachstetter et al., 2011).

Conceptualmente, la región CA3 es comúnmente descrita como una red de ensamblajes bien definidos que son reclutados de manera selectiva por las células granulares del giro dentado y cuya función es la ortogonalización de los patrones y la recuperación de patrones previamente codificados a partir de información degradada, incompleta o ligeramente alterada (i.e. separación y completamiento de patrones) (Guzman et al., 2016b; Le Duigou et al., 2014; Malvache et al., 2016; Rolls, 2013).

Estas características hacen de CA3 una región de gran interés fisiológico y anatómico. Sin embargo, podrían ser también la razón de su alta susceptibilidad al daño y la atrofia (McEwen, 1994), especialmente concerniente a la epileptogénesis (McAuliffe et al., 2011), la neurodegeneración (Zhang et al., 2013), la lesión traumática cerebral (Mao et al., 2013; Schumm et al., 2022), la isquemia (Medvedeva et al., 2017) y las alteraciones del neurodesarrollo (Belvindrah et al., 2014).



## Relevancia e Impacto

La actividad aberrante de núcleos y regiones cerebrales se relacionan con un amplio espectro de patologías del sistema nervioso; desde la epilepsia, el autismo y la esquizofrenia hasta trastornos del ánimo, mismas que causan un masivo impacto económico, especialmente para las economías emergentes, y producen un detrimento de la calidad de vida de millones de personas (Sahakian et al., 2015; World Health Organization, 2001). Las alteraciones funcionales en el hipocampo, particularmente la región CA3, están fuertemente relacionadas con múltiples patologías incluyendo desórdenes del espectro autista (Zhan, 2015), la esquizofrenia (Smith et al., 2007) y la epilepsia, (Belvindrah et al., 2014), entre otros, por lo que su estudio se espera nos brinde un mayor entendimiento sobre estas patologías ampliamente prevalentes.

El meticuloso estudio de la actividad neuronal ha llevado al reconocimiento de patrones de actividad neuronal (individual y poblacional) normales y patológicos que extienden nuestro entendimiento del funcionamiento del sistema nervioso y se traduce en el desarrollo de novedosas estrategias terapéuticas como la estimulación cerebral profunda (Miocinovic et al., 2013), la estimulación magnética transcraneal (O'Reardon et al., 2007) o nuevas terapias farmacológicas (Lemonnier et al., 2017).

A pesar de estas optimistas premisas, el desarrollo de recursos terapéuticos y descubrimientos sobre la fisiopatología en el amplio rango de desórdenes del sistema nervioso se ha mantenido históricamente en rezago en comparación con otras áreas de la medicina moderna como el combate a las enfermedades infecciosas, cardiovasculares o, incluso, oncológicas (Braff & Braff, 2013; Féger & Hirsch, 2015). Dicha falta de progreso es palpable en el escepticismo de la industria farmacéutica respecto a la inversión en investigación y desarrollo en el área neuropsiquiátrica (Hyman, 2014; Jarvis, 2012; Mullard, 2018).

Ante este panorama, es razonable cuestionar si el pensamiento neurocentrista prevalente en el área es en parte causante de este lento progreso. Si bien, la historia de las neurociencias ha sido negligente con los elementos no neurales del sistema nervioso, ignorando modestamente a la mitad de la población celular, la investigación de la interacción entre las neuronas y las células gliales y la manipulación directa de la glía está apenas en ciernes (Lai et al., 2009).

El proyecto de investigación que constituye esta tesis ahonda en las consecuencias y el impacto de la inapropiada comunicación entre las neuronas y la microglia desde una perspectiva global que interroga estas cuestiones con una aproximación multidisciplinaria y multi-escala; desde estructuras sub-celulares y celulares, pasando por la fisiología celular y del microcircuito, y culminando en el impacto funcional en el organismo.

## Planteamiento del Problema

Existe poca investigación al respecto de las posibles alteraciones en los procesos de establecimiento y remodelado de la conectividad neuronal que una comunicación entre las neuronas y la microglia deficiente podría ocasionar.

La microglia participa durante el desarrollo en la supervivencia neuronal, la consolidación de sinapsis y el remodelado de los circuitos neuronales (Basilico et al., 2019; Bessis et al., 2007; Ueno et al., 2013). Estas funciones dependen en parte de la comunicación entre neuronas y microglia a través de la vía de la fractalquina (Arnoux & Audinat, 2015).

La interrupción de esta vía genera alteraciones en sinapsis corticales en la adultez que se acompañan de ciertos déficits conductuales y fisiológicos (Paolicelli et al., 2011; Rogers et al., 2011; Zhan et al., 2014). Adicionalmente, la vía de la fractalquina es fundamental para el mantenimiento de la neurogénesis hipocampal en el roedor adulto (Bachstetter et al., 2011) y la integración apropiada de las neuronas generadas en la adultez en el circuito hipocámpal (Bolós et al., 2018).

Dadas las características morfológicas, citoarquitectónicas y fisiológicas de CA3, el microcircuito es especialmente vulnerable a las alteraciones presentadas. En cambio, la disfunción de CA3 compromete enteramente la función hipocámpal y en consecuencia los procesos cognitivos dependientes del hipocampo.

## Hipótesis

La interrupción de la señalización entre neuronas y microglia a través de la vía de la fractalquina, mediante la depleción del receptor a fractalquina (Cx3cr1) altera la fisiología normal de la microglia, de manera tal, que el circuitos de CA3 del hipocampo sufre un desarrollo anormal, incluyendo alteraciones morfológicas, citoarquitectónicas y sinápticas que genera una actividad poblacional aberrante, en detrimento de las funciones cognitivas que soportan en la adultez resultado, al menos parcialmente, de una neurotransmisión deficiente.

## Objetivo General

Realizar una caracterización de las alteraciones estructurales, fisiológicas y cognitivas asociadas a la depleción del receptor a fractalquina, y la consecuente falla de comunicación entre las neuronas y la microglia, incluyendo el período temprano post-natal y la adultez mediante una aproximación multidisciplinaria que provea indicios novedosos de posibles alteraciones fisiopatológicas en el estudio de desórdenes neuropsiquiátricos.

## Objetivos Específicos

1. Determinar la densidad celular y la morfología de la microglia en la región CA3 del hipocampo en el periodo neonatal y en la adultez en el ratón *Cx3cr1<sup>-/-</sup>*.
2. Caracterizar la actividad poblacional de la región CA3 durante el desarrollo perinatal del microcircuito en el hipocampo neonatal del ratón *Cx3cr1<sup>-/-</sup>*.
3. Determinar, *in vitro*, las características intrínsecas y sinápticas en las neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo en el ratón *Cx3cr1<sup>-/-</sup>* adulto.
4. Caracterizar la conectividad funcional y las propiedades de red de la región CA3 hipocampal *in vitro* en el ratón *Cx3cr1<sup>-/-</sup>*.
5. Evaluar conductualmente las funciones cognitivas dependientes del hipocampo en el ratón *Cx3cr1<sup>-/-</sup>* adulto incluyendo: conductas innatas, respuesta a estrés, interacción social y aprendizaje espacial.
6. Determinar las características citoarquitectónicas y morfológicas de las fibras musgosas, sus terminales y las espinas dendríticas de las neuronas piramidales de CA3 en el ratón *Cx3cr1<sup>-/-</sup>*.

# Metodología

## Animales de experimentación

Los protocolos experimentales y el uso y cuidado de todo animal experimental fueron evaluados y aprobados por el comité de bioética del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México en apego a la normal oficial mexicana para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio, NOM-062- ZOO-1999.

Los animales *Cx3cr1*<sup>-/-</sup> fueron adquiridos del laboratorio Jackson (cepa C57BL/6J, código 025524) (Yona et al., 2013) y los animales controles provienen de colonias “silvestres” de la cepa C57BL/6J cuyos pie de crías provienen igualmente del laboratorio Jackson. Los animales son criados en el Unidad de Transgénicos del Bioterio del Instituto de Neurobiología, con alimento estándar y agua *ad libitum*, en condiciones de temperatura controlada (24°C) y ciclo de luz/oscuridad de 12hr.

Animales adultos (10-14 semanas de edad) de ambos sexos utilizados para todas las pruebas conductuales, los registros de *patch-clamp*, MEAs y fEPSPs, tinción de Timm y trazado neuronal, así como en los ensayos de inmunohistoquímica contra Iba-1. Para registros electrofisiológicos de los potenciales gigantes despolarizantes (GDPs, por sus siglas en inglés) se utilizaron animales de ambos sexos de 7-9 días postnatales (P7-P9), así como en algunos ensayos de inmunohistoquímica.

## Inmunohistoquímica, histología y trazado neuronal

### Inmunohistoquímica contra Iba-1

Iba-1 es una proteína de unión a calcio de 17 kDa constituida por 147 aminoácidos, codificada por una región parte del complejo mayor de histocompatibilidad tipo III, entre las regiones codificantes para la transaminasa de aminoácidos de cadena ramificada (Bat2) y el factor de necrosis tumoral alfa (Augusto-Oliveira et al., 2022; Ito et al., 1998). Es expresada por macrófagos circulantes y microglia (Ito et al., 1998). En condiciones fisiológicas, Iba-1 es únicamente expresado por la microglia en el cerebro. Su expresión es basta y uniformemente distribuida en la membrana de la célula microglial, por lo que es un excelente marcador que permite la observación detallada de la morfología de la microglia (Augusto-Oliveira et al., 2022).

La visualización y caracterización de la morfología de la microglia con Iba-1 fue realizada de manera similar tanto en ratones neonatales como en adultos.

### *Procedimiento*

Ratones neonatos (P10) y adultos fueron anestesiados con sevoflurano al 2% (v/v) y pentobarbital (70 mg/kg), respectivamente. Mediante una toracotomía medial se les perfundió transcardialmente primero con PBS fría, hasta obtener un retorno limpio de sangre, seguida de una solución de PFA al 4% en PBS (m/v). Se diseccionaron y extrajeron los encéfalos y se procedió a su fijación en una solución de PFA al 4% en PBS durante 24hr.

La solución de PFA fue sustituida por una solución de sacarosa al 30% en PBS (m/v) y los cerebros fueron dejados en inmersión hasta su precipitación varios días después. Una vez precipitados, se procedió a la preparación de bloques para corte en criostato; se embebió cada cerebro en compuesto de temperatura óptima para corte (Tissue-Tek O.C.T., Sakura Finetek, EE.UU.), utilizando un pequeño molde de dimensiones apropiadas para la pieza y se congelaron mediante la técnica de "slush" (hielo seco diluido en metanol hasta conseguir una consistencia semi-sólida). Posteriormente, los cerebros fueron almacenados a -80C° hasta su uso. Con el uso del criostato (CM 350S, Leica, Alemania), se obtuvieron secciones coronales de 30µm de espesor conteniendo la formación hipocampal. Las secciones fueron recuperadas y almacenadas en flotación libre en PBS a 2-4C° hasta iniciar el protocolo de inmunohistoquímica.

Para la realización de la inmunohistoquímica contra Iba-1, las rebanadas fueron lavadas tres veces en agitación en PBS fresco durante 10 minutos. Posteriormente, fueron incubadas en la solución de bloqueo: 3% suero normal de burro, 0.3% Triton X-100 en PBS (v/v), durante una hora. A continuación, las secciones fueron incubadas con el anticuerpo primario (anticuerpo policlonal de conejo anti-Iba-1, FUJIFILM Wako Chemical, EE.UU.) diluido 1:2000 en una solución con 1% suero normal de burro y 0.1% Triton X-100 en PBS (v/v) durante la noche a 4C°, seguido de tres lavados con PBS fresco durante 15 minutos cada vez. Posteriormente, las secciones fueron incubadas con el anticuerpo secundario (anticuerpo anti-conejo Alexa-568, Molecular Probes, EE.UU.) diluido 1:500 en una solución con 1% suero normal de burro y 0.1% Triton X-100 en PBS (v/v) durante dos horas a temperatura ambiente.

Finalmente, las secciones fueron lavadas, de nuevo, tres veces en PBS fresco, durante 15 minutos cada vez, y montadas en portaobjetos gelatinizados con Fluoromount-G (Invitrogen, EE.UU.) como medio de montaje.

## *Microscopía*

Se obtuvieron imágenes de epifluorescencia utilizando un microscopio AxioImager (Zeiss, Alemania) equipado con el sistema Apotome I (Zeiss, Alemania), con objetivos de 10X para capturas de campo amplio y 63X para capturas de alta magnificación. Al menos tres animales por grupo, tres secciones por animal y tres campos de alta magnificación por sección (1388 x 1040 PPI, 1 $\mu$ m resolución en z) fueron utilizados para la cuantificación de densidad y análisis morfológico de la microglia (Young & Morrison, 2018).

## *Análisis*

La cuantificación de la densidad microglial y el procesamiento de las imágenes para el análisis morfológico fueron llevados a cabo en la distribución FIJI de ImageJ (Schindelin et al., 2012) con extenso uso de plugins incluyendo: Cell Counter, Bio-Formats (Linkert et al., 2010), SNT (Arshadi et al., 2021) y AnalyzeSkeleton (Arganda-Carreras et al., 2010).

La densidad de la microglia en CA3 fue calculada mediante la contabilización manual de células microgliales completas presentes en los campos de alta magnificación. La reconstrucción y análisis morfológico de la microglia fue llevada a cabo de manera semi-manual en la suite SNT y posterior análisis mediante el *plugin* AnalyzeSkeleton, incluyendo: número de ramificaciones, puntos finales, longitud promedio de las ramificaciones y longitud total de las ramificaciones (Young & Morrison, 2018).

## **Tinción Neo-Timm**

La tinción de Timm fue desarrollada a mediados del siglo pasado como un método de detección de metales pesados en tejidos biológicos (Holm & Geneser, 1991). Posteriormente, fue modificada y estandarizada para una sensible detección de zinc en el SNC mediante la precipitación con una solución de sulfuro de sodio y posterior revelado argéntico (Holm & Geneser, 1991).

Debido a que la MF es la región del SNC con mayor concentración de zinc (Holm & Geneser, 1991; Toscano-Silva et al., 2010a), el cual se localiza en la terminales axónicas de esta aferencia,

esta técnica histológica es un método práctico y ampliamente usado para determinar la distribución de la MF (Ramirez-Amaya et al., 2001a; Sunnen et al., 2011a; Toscano-Silva et al., 2010a).

### *Reactivos y Soluciones*

I. Solución de sulfuro para perfusión:

Sulfuro de sodio	2.9g
Fosfato de sodio (monohidratado)	3.0g
Agua des-ionizada	250ml

Agitar hasta disolver, una coloración amarillenta en la solución final es normal. La solución tiene un olor desagradable y es irritante.

II. Formalina al 10%:

Formaldehído al 10% en PBS (v/v)

III. Solución de post-fijación:

Glutaraldehído concentrado (25%)	10ml
Dextrosa	24g
Agua des-ionizada	70ml

La solución de revelado se compone de cuatro soluciones individuales (IV-VII):

IV. Solución de goma arábica:

Goma arábica	500g
Agua des-ionizada	1L

Esta solución tardará muchas horas en disolverse, incluso días, por lo que se recomienda preparar una gran cantidad, dejar en agitación constante y alicuotar en tubos de 50-100ml. La solución final puede conservarse en congelación hasta su uso.

V. Amortiguador de citrato:

Ácido cítrico	5.1g
Citrato de sodio	4.7g

Agua des-ionizada                      aforar a 20ml

VI. Solución de hidroquinona:

Hidroquinona                              3.4g  
Agua des-ionizada                      aforar a 60ml

Puede tardar en disolverse unos minutos. La solución es sensible a la luz.

VII. Solución de nitrato de plata:

Nitrato de plata                            0.17g  
Agua des-ionizada                      1ml

VIII. Solución final de revelado (Solución de Timm):

Solución de goma arábica              120ml  
Buffer de citrato                          20ml  
Solución de Hidroquinona              60ml  
Solución de nitrato de plata            1ml

### *Procedimiento*

Para la realización de esta tinción los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (70mg/kg) vía intraperitoneal, posteriormente fueron perfundidos con PBS frío hasta obtener signos de lividez en hígado y extremidades; a continuación, se perfundió con aprox. 25ml de la solución de sulfuro de sodio hasta que se desarrolla una coloración gris-verdosa en el hígado.

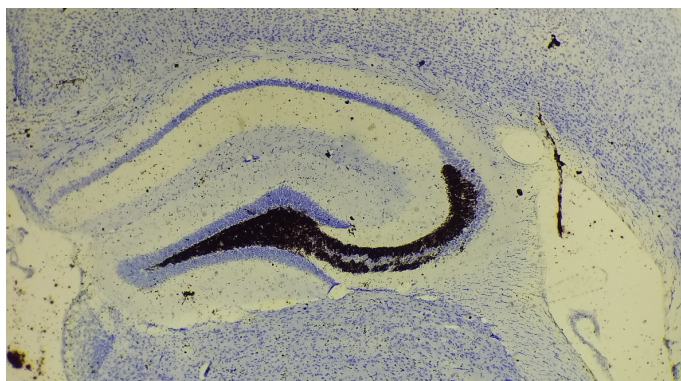
Después, fueron decapitados y los cerebros removidos del cráneo e incubados en esta misma solución por aprox. 1hr adicional y transferidos a la solución de formalina al 10% durante la noche. Al día siguiente, los cerebros fueron transferidos a la solución de post-fijación por 1.5hr y regresados a formalina 24hr más. Prolongar el período de post-fijación puede reducir el marcaje final.

Posteriormente, los cerebros fueron colocados en solución crio-protectora de sacarosa al 30% en PBS hasta su precipitación y encastrados en medio de inclusión para corte en congelación. Con el uso del criostato, se obtuvieron cortes seriados de 30µm de espesor representativos de cinco diferentes niveles de la porción dorsal del hipocampo, desde Bregma (mm): -1.3, -1.5, -1.7, -1.9, -2.1. Las secciones obtenidas fueron montadas en porta-objetos gelatinizados y se les dejó secar, sin cubreobjetos, a temperatura ambiente durante una noche.



El revelado de la marca se llevó a cabo, previa rehidratación del tejido, con un tren inverso de alcohol (95% etanol, 75% etanol, 50% etanol, 0% (v/v) en agua des-ionizada, tres minutos en cada solución), en la solución de Timm, preparada en fresco, a aprox. a 25°C, durante aprox. 1 hr en un recipiente al resguardo de la luz. La rapidez de la reacción es sensible a la luz y la temperatura, por lo que el control de estas variables puede afectar el resultado final. Se recomienda revisar el progreso del revelado con inspección visual al pasar 30-45 minutos y detener la reacción cuando se obtenga una marca negra bien desarrollada sobre el *stratum lucidum* del hipocampo y antes de que la marca inespecífica se extienda desde el estrato molecular (Fig. 3).

Para detener la reacción basta con enjuagar la solución de Timm con agua destilada o des-ionizada. Las secciones pueden ser teñidas posteriormente con violeta de cresilo (tinción de Nissl) de manera convencional o se puede proceder directamente a la deshidratación en tren de alcoholes finalizando con uno o dos pasos de xileno (Fig. 3). Una vez deshidratadas, las secciones fueron cubiertas con un medio de montaje no acuoso (DPX, Sigma, EE.UU.).



*Fig. 3 Resultados representativos de la tinción de Timm*

**Fotomicrografía (4X) representativa de una sección coronal de hipocampo dorsal de ratón teñida con la tinción de Timm (marca oscura), denotando la trayectoria y distribución de la fibra musgosa, y contra-teñida con violeta de cresilo (tinción de Nissl) que permite la visualización de los cuerpos neuronales.**

### *Microscopía*

Se obtuvieron fotomicrografías bilaterales de la región hipocampal de las secciones a los siguientes niveles desde Bregma: -1.3, -1.5, -1.7, -1.9 y -2.1mm, en las mismas condiciones de brillo y contraste con un microscopio de campo claro con sistema de adquisición de imágenes integrado (DMC5400, Leica, Alemania), con una resolución de 2048 X 1538 PPI.

## Análisis

Para el análisis cuantitativo del área de distribución de la MF se desarrolló una rutina en MATLAB (R2017b, MathWorks, EE.UU.) para la obtención del área de mayor densidad óptica (putativamente la MF) mediante la substracción de la densidad de un área de referencia (*stratum radiatum* de CA3) siguiendo protocolos previamente publicados (Ramirez-Amaya et al., 2001). Brevemente, las imágenes fueron cargadas a MATLAB, su formato fue convertido de RGB de 24 bits a escala de grises de 8 bits y el valor de los pixeles fue normalizado con el valor promedio de la intensidad del *stratum radiatum*. El área de distribución de la MF fue definida como el área de los pixeles en la región del *stratum lucidum* que tuvieran un valor inferior a 120.

## Trazado neuronal con Dil

El Dil (1,1'-Dioctadecil-3,3,3',3'-Tetrametilindocarbocianina Perclorato) es miembro de una familia de marcadores lipofílicos ampliamente usados para el rastreo de procesos celulares como axones, dendritas, etc. en cultivo e *in vivo*, tanto en tejido vivo como en aquel posteriormente fijado (Honig & Hume, 1989). El Dil es una molécula anfipática con una estructura semejante a la de los fosfolípidos de la membrana celular y que, de manera similar, se integra a la membrana y difunde en su espesor (Cheng et al., 2014). Al integrarse en la membrana incrementa sustancialmente su fluorescencia en el rango rojo-anaranjado.

Con esta técnica se procedió al marcaje de neuronas glomerulares del DG con el fin de visualizar la morfología fina de la proyección de la MF, en particular de los botones gigantes en CA3. Igualmente, se utilizó para el marcaje y visualización de las espinas dendríticas tanto proximales (excrecencias espinosas) como distales de las neuronas piramidales de CA3.

## Procedimiento

Se prepararon rebanadas agudas transversales de hipocampo y corteza entorrinal (HEC, por sus siglas en inglés), como se describe en el apartado correspondiente, de 100-150 $\mu$ m de espesor, a modo de maximizar la integridad de la MF (Xiong et al., 2017). Se dejaron recuperar al igual que en el protocolo de registro y fueron transferidas a una solución de PFA al 1.5% en PBS (m/v) a temperatura ambiente por 1hr (Cheng et al., 2014).

Se preparó una solución de Dil al 1% (m/v) en dimetil sulfóxido (Sigma, EE.UU.).

Se seleccionó una rebanada y se colocó sobre un portaobjetos dentro de un círculo delimitado por crayón hidrofóbico a modo de contener un pequeño volumen de PBS. El tejido no debe deshidratarse en ningún momento. Bajo guía microscópica, se tomó con la punta de una pipeta de *patch-clamp* varios cristales precipitados de Dil y se depositaron en las regiones de interés; se eligió el tercio externo de la capa molecular del DG para el marcaje de las células glomerulares y el tercio más distal del *stratum molecular* de CA3 para el marcaje de neuronas piramidales. Varios sitios de marcaje son necesarios para obtener una visualización adecuada, sin embargo, debe mantenerse en cuenta que la fluorescencia del depósito excesivo de Dil puede interferir en la adquisición de imágenes con suficiente contraste.

Al finalizar el marcaje, las rebanadas fueron transferidas a una solución de fijación con 4% PFA en PBS (w/v) e incubadas en la oscuridad a 30°C. Previo a la captura de imágenes de microscopía, las rebanadas fueron montadas en portaobjetos no gelatinizados con PBS o Fluoromount-G (Invitrogen, EE.UU.) como medios de montaje y cubiertos con cubreobjetos.

### *Microscopía*

Se capturaron imágenes de microscopía confocal dentro de las primeras 48hr al terminar el período de incubación. Se utilizó el microscopio invertido AxioVert 200 LSM 510 (Zeiss, Alemania), con un láser de excitación con una longitud de onda de 516nm y filtros de emisión de 575-615nm.

Se obtuvieron imágenes panorámicas con un objetivo de 20X en un solo plano. Para la adquisición de imágenes de alta magnificación se utilizó un objetivo de inmersión múltiple de 63X con una magnificación digital adicional (3X) y se obtuvieron pilas de imágenes en tres dimensiones con una resolución de 512 x 512 o 1024 X 1024 PPI y 0.5µm de resolución en z.

### *Análisis*

Para el análisis de las imágenes de alta magnificación se utilizó la distribución FIJI de ImageJ y plugins asociados, particularmente Bio-Formats y SNT.

Para la cuantificación de la densidad de espinas dendríticas en las excrescencias espinosas, se cuantificaron las cabezas de las mismas manualmente en toda la extensión dendrítica apical, donde fueron encontradas. La densidad es definida como el número de cabezas de espinas encontradas dividida por la longitud dendrítica donde fueron encontradas (expresada como número de espinas por cada 20µm de longitud dendrítica). Una cuantificación similar se llevó a cabo para las

espinas de dendritas secundarias y terciarias, eligiendo segmentos aleatoriamente de 20 $\mu$ m en longitud y cuantificando manualmente las espinas dendríticas encontradas.

Los axones de la MF con suficiente aislamiento de otras estructuras fueron reconstruidos semi-manualmente en la suite SNT. A aquellos axones exitosamente aislados y reconstruidos se les cuantificó la densidad de botones gigantes, el número de filopodios y el volumen de los mismos.

Los filopodios fueron cuantificados manualmente. El volumen de los botones gigantes fue estimado exportando las reconstrucciones obtenidas como máscaras binarias, aislando botones individuales mediante la definición de regiones de interés, interpolando esta región de interés a lo largo de la pila de imágenes en z y cuantificando el área cubierta por el botón en cada plano. La sumatoria de las áreas individuales fue multiplicada por la resolución en z de la pila (0.5 $\mu$ m) para obtener el volumen del botón.

## **Registros electrofisiológicos**

### **Obtención de rebanadas transversales de hipocampo y corteza entorrinal (HEC)**

Para la realización de los registro electrofisiológicos *in vitro* se obtuvieron rebanadas transversales de hipocampo y corteza entorrinal (Bischofberger et al., 2006c). Este plano de corte optimiza la preservación de las proyecciones axonales intrahipocampales, especialmente el de la MF, la cual tiene una trayectoria ortogonal al eje longitudinal (Bischofberger et al., 2006; Xiong et al., 2017). Esta preparación fue utilizada para los registros de *patch-clamp*, MEAs y fEPSPs.

#### *Procedimiento*

El ratón fue anestesiado con pentobarbital sódico (70mg/kg), se realizó una toracotomía con abordaje subdiafragmático incidiendo la parrilla costal bilateralmente y exponiendo los órganos del tórax. Se realizó una perfusión cardiaca con solución neuroprotectora (en mM: sacarosa 238, glucosa 30, NaHCO<sub>3</sub> 25, KCl 3, MgCl<sub>2</sub> 2.5) pH = 7.4, fría y gaseada con carbógeno al 95% de oxígeno. Se decapitó y se expuso el encéfalo realizando dos incisiones laterales en el agujero magno, una incisión coronal a nivel de los bulbos olfatorios y una incisión caudo-rostral a través de la sutura sagital hasta separar el cráneo en dos hojas laterales.

Se extrajo el encéfalo con un disector frío y húmedo en un sentido rostro-caudal seccionando los nervios pares craneales y se le coloca brevemente en la solución neuroprotectora a punto de congelación.

Posteriormente, se colocó el cerebro en una superficie plana, se disecó el cerebelo y se separaron los hemisferios cerebrales mediante una incisión por la cisura interhemisférica. Los hemisferios fueron colocados sobre su plano medial y se creó un plano artificial mediante una incisión rostro-caudal que retiró la porción más dorsal de la corteza en un ángulo que una las porciones más dorsales de los extremos rostral y caudal del hemisferio para crear un nuevo plano que será la superficie de fijación (Bischofberger et al., 2006).

Cada hemisferio fue adherido a la base del vibratomo con cianoacrilato sobre el nuevo plano creado y en dirección caudo-rostral con respecto al filo de la navaja y se les cubrió con solución neuroprotectora fría, gaseada continuamente con carbógeno al 95% y se procedió a obtener rebanadas de 350-400  $\mu\text{m}$  de espesor que contenían la formación hipocampal y corteza entorrinal circundante (HEC) (Xiong et al., 2017). Las rebanadas fueron posteriormente incubadas en solución neuroprotectora a 34°C por 30 min y, posteriormente, una hora a temperatura ambiente.

Para el registro de los GDPs se prepararon rebanadas hipocampales coronales de ratones de P7-P9 de edad de manera semejante a la descrita anteriormente. Brevemente, los animales neonatales fueron anestesiados con frío y rápidamente decapitados. Posteriormente, se disecciona el encéfalo y se retira el cerebelo y se deja incubar por unos minutos en solución neuroprotectora fría. El cerebro es montado para la obtención de rebanadas coronales de 450-500  $\mu\text{m}$ . Las rebanadas fueron luego incubadas en líquido cefaloraquídeo artificial estándar durante una hora a temperatura ambiente.

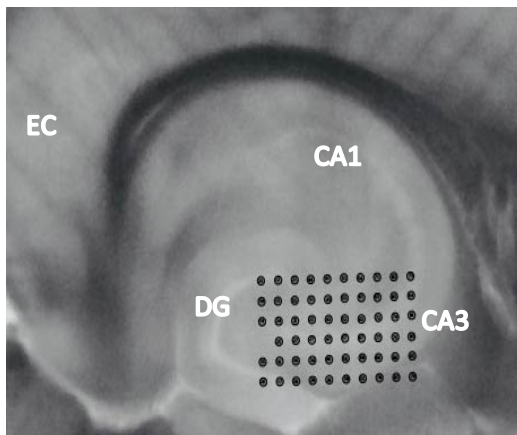
## **Registro con matrices de multi-electrodos (MEAs)**

El registro con matrices de multi-electrodos es una técnica versátil de registro de actividad electrofisiológica extracelular, incluyendo potenciales de acción y potencial local de campo, que permite el monitoreo y registro de múltiples canales distribuidos espacialmente, con lo cual puede mapearse la actividad de distintas regiones de un microcircuito cerebral simultáneamente, un desarrollo muy útil en el creciente campo de la electrofisiología de redes (Liu et al., 2012). Además, esta técnica hace también posible la implementación de protocolos clásicos de transmisión y plasticidad sináptica.

Ambas aplicaciones de los arreglos de multi-electrodos fueron utilizados; el registro simultáneo de actividad extracelular de la región CA3 fue usado para la caracterización de la conectividad funcional de la red, mientras que protocolos de evocación de fEPSP fueron utilizados para la identificación de efectos diferenciales en las aferencias principales de CA3.

### *Procedimiento*

Tras un periodo de incubación de al menos una hora, una rebanada, seleccionada por la integridad aparente de la formación hipocampal, fue transferida a la cámara de registro (MEA2100, MultichannelSystems, Alemania), perfundida con líquido cefaloraquídeo artificial (LCRA; en mM: glucosa 10, NaCl 125, KCl 2.5, NaHCO<sub>3</sub> 25, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.25, MgCl<sub>2</sub> 2, CaCl<sub>2</sub> 2) burbujeado constantemente con carbógeno al 95% a una temperatura de aprox. 34°C, donde fue colocada con precisión procurando que las primeras dos columnas del arreglo de 6x10 electrodos (60pMEA100/30iR-Ti, MultichannelSystems, Alemania) cubrieran la región del giro dentado (GD) y el hilio, mientras que el resto del arreglo ocupara la región CA3 (Fig. 4).



*Fig. 4 Registro en MEA de la región CA3*

**La rebanada es colocada de tal forma que maximiza la posibilidad de registrar el área de interés. EC, corteza entorrinal; DG, giro dentado; CA3, cornu ammonis 3; CA1, cornu ammonis 1.**

Tras un periodo de aproximadamente 30 min de estabilización, donde se vigiló el surgimiento paulatino de espigas extracelulares en numerosos canales, se registró la actividad espontánea basal con una frecuencia de adquisición de 25kHz, sin filtros, durante 15 min. Como método de verificación del origen biológico de la actividad registrada, se gaseó el LCRA con nitrógeno al 95%, induciendo un grado severo de hipoxia y verificando la desaparición de la actividad multi-unitaria (MUA).

A partir de estos registros se caracterizaron la topología y las propiedades de las redes construidas a partir de la estimación de la conectividad funcional entre las unidades

aisladas (e.g. densidad de enlaces, grado de conectividad, grado de agrupación, etc.) (Poli et al., 2015).

En otros registros, una vez obtenido un registro estable de actividad espontánea, se llevaron a cabo curvas de entrada/salida de fEPSP para la evaluación de las aferencias más importantes de CA3: la MF y la red AC (Hagena & Manahan-Vaughan, 2011). En ambos casos, los fEPSPs fueron registrados en la región CA3 del hipocampo y evocados con pulsos pareados cuadrados simétricos bifásicos de corriente directa de 200 $\mu$ s de duración y amplitud creciente de 0-75 $\mu$ A, con incrementos de 5 $\mu$ A y cuatro repeticiones por paso. Los pulsos fueron administrados con un solo canal del MEA con una frecuencia de 0.06Hz. Para la MF el fEPSP fue evocado invariablemente con un electrodo en la capa granular suprapiramidal del DG, mientras que para la AC se buscó estimulación en el *stratum radiatum* o *stratum oriens* de CA3 (Chattarji et al., 1989).

En todos los experimentos de transmisión sináptica el electrodo de registro elegido para análisis fue aquel con la respuesta de mayor amplitud con relación al ruido basal, estabilidad, consistente latencia (~2ms) y localización dentro de 300-400 $\mu$ m del electrodo de estimulación. Para algunos registros de la MF, la identidad de la aferencia fue verificada con la aplicación en el LCRA del agonista de los receptores metabotrópicos de glutamato tipo 2/3 DCG-IV ((2S,2'R,3'R)-2-(2',3'-Dicarboxiciclopropil) glicina, 2 $\mu$ M, Tocris, Reino Unido) (Fig. 5).

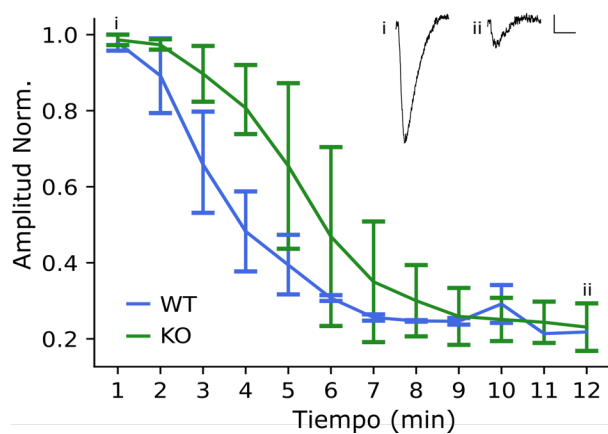


Fig. 5 Verificación de la identidad de la fibra musgosa.

El agonista de los receptores mGluR2/3 DCG-IV fue utilizado como verificación adicional del origen del evento sináptico evocado mediante estimulación del giro dentado. Como puede apreciarse, el DCG-IV tiene un potente y rápido efecto inhibitorio en la fibra musgosa independiente del genotipo. WT =3, KO =3, escala = 0.05mV y 10ms.

## Análisis

El registro elegido para el análisis de las curvas de fEPSPs fue exportado y analizado en Clampfit (v.10, Molecular Devices, EE.UU.) donde la magnitud del pico máximo de amplitud y la pendiente de ascenso del potencial fueron estimados gráficamente. El índice de pulso pareado (PPR, por sus siglas en inglés) fue calculado como el cociente de la amplitud del segundo potencial evocado entre el primero.

Los registros de actividad espontánea fueron exportados para su pre-procesamiento al software MC\_Rack (Multichannel Systems, Alemania) donde fueron inspeccionados visualmente y seleccionados los canales con claras espigas extracelulares y, posteriormente, filtrados en una banda de 350 a 7000Hz para ser exportados al software Plexon Offline Sorter (Plexon, EE.UU.) para el proceso de *spike sorting*.

Se detectaron como espigas los eventos que sobrepasaran un umbral de 2.6SD sobre la media del registro filtrado y, posteriormente, se identificaron unidades mediante un proceso de agrupamiento tomando como principales criterios la separación entre grupos en un plano tridimensional constituido por los tres primeros componentes principales, la forma promedio de la espiga identificada, el histograma de intervalos entre espigas y la inspección visual del registro (Martínez & Quiroga, 2013; Nieto-Posadas et al., 2014).

Una vez obtenidos los trenes de disparo de las neuronas putativas, la conectividad funcional del microcircuito de CA3 fue estimada mediante el cálculo del “Spike Time Tiling Coefficient” (STTC) (Cutts & Eglén, 2014) sobre cada par de trenes de disparo (Fig. 6). El STTC es una medida de correlación que presenta múltiples ventajas con respecto a otros métodos; robustez ante la elección de la ventana de coincidencia, insensibilidad a la tasa de disparo y los periodos de silencio, no asume una distribución particular de los intervalos inter-espigas, no es sensible al patrón de disparo (e.g. regular, en ráfaga, etc.), y es además una correlación simétrica (i.e.  $AB = BA$ ) (Cutts & Eglén, 2014)(Fig. 6) (Fig. 5). El STTC es sensible a correlaciones negativas, siendo su rango de -1 (perfecta correlación negativa), 0 (nula correlación), a 1 (perfecta correlación positiva) (Cutts & Eglén, 2014).

El método fue implementado en Python a partir del código original en C (Cutts & Eglén, 2014), fue validado por un grupo independiente y se encuentra disponible como parte del proyecto Elephant (*Electrophysiology Analysis Toolkit*) (<http://neuralensemble.org/elephant/>) (Yegenoglu et al., 2018).



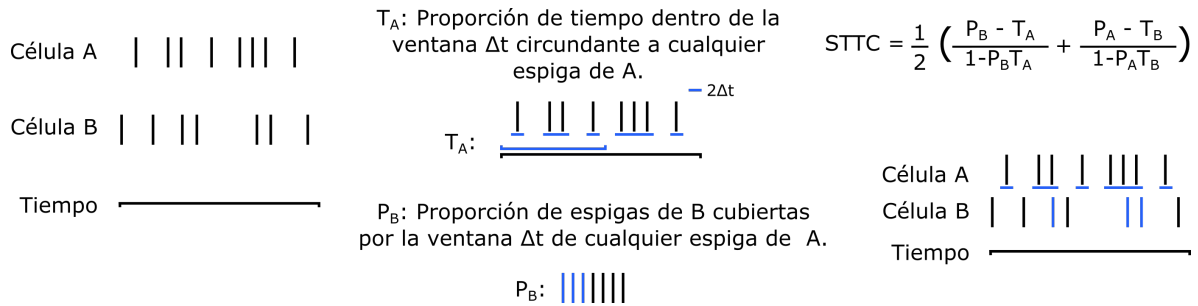


Fig. 6 Determinación del STTC

La determinación del STTC como métrica de correlación entre pares de trenes de disparo relaciona la proporción de tiempo de registro “cubierta” por las espigas de la neurona A con la proporción de espigas de la neurona B “cubierta” por las espigas de la neurona A y viceversa. El único parámetro determinado por el usuario es la duración de la ventana ( $\Delta t$ ), en este caso 5ms. Los parámetros  $T_B$  y  $P_A$  son calculados de manera similar a  $T_A$  y  $P_B$  invirtiendo la neurona de referencia. El STTC es, por lo tanto, una métrica de correlación simétrica.

A partir de la determinación de este coeficiente se construyó la matriz de adyacencia ponderada de cada registro a la cual se le aplicó un umbral de significancia de 3 desviaciones absolutas de la mediana (MAD, por sus siglas en inglés) a los valores crudos de correlación, este método fue elegido por su robustez en distribuciones ampliamente sesgadas y refinado hasta obtener una densidad de conectividad semejante a reportes previos (Fornito et al., 2016; Leys et al., 2013; X. Li et al., 2010) (Fig. 7).

Esta aproximación fue validada adicionalmente con su aplicación en trenes de disparo sustitutos construidos a partir de permutaciones aleatorias de los trenes originales mediante el método de *spike train dithering* (Grün et al., 2010) (Fig. 7). Este método (STTC) reveló prácticamente nula correlación entre los pares de trenes sustitutos.

Las matrices de adyacencia ponderadas fueron convertidas a grafos para la determinación de sus características topológicas (Bullmore & Sporns, 2009a) (Fig. 7). Este análisis fue implementado en Python con amplio uso de la biblioteca NetworkX (Hagberg et al., 2008).

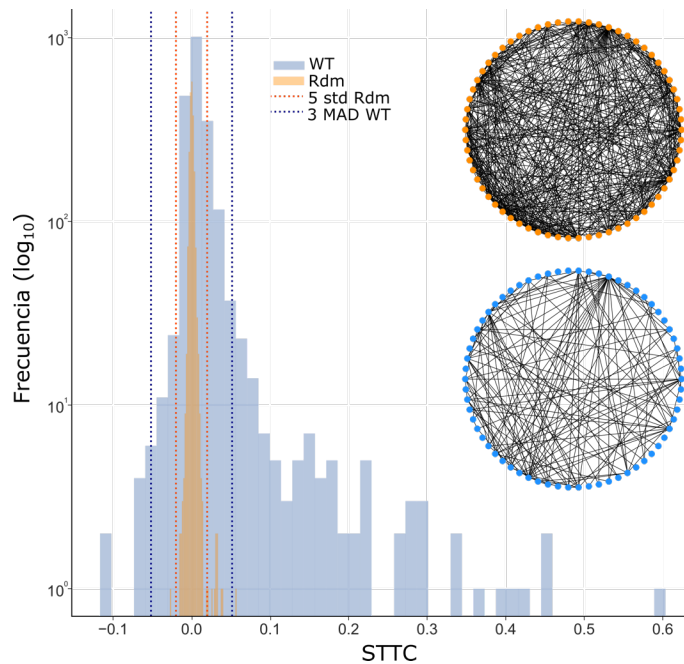


Fig. 7 Validación del STTC y determinación del umbral

Histogramas de los valores del STTC determinados en registros de rebanadas WT (azul) y determinados en trenes de disparo construidos a partir de permutaciones aleatorias de los trenes originales (naranja). Nótese la distribución alrededor de cero de las correlaciones de trenes aleatorizados (naranja). La diferencia entre los valores de STTC de trenes reales y los sustitutos es tan grande que usando un umbral de incluso 5 desviaciones estándar de la media de esta distribución (líneas punteadas naranjas) se obtienen grafos excesivamente densos (>90%; grafo superior). Por lo que se determinó un umbral de 3 MAD sobre la distribución de valores de STTC reales (líneas punteadas azules), con lo que se obtienen grafos con densidad similar a la reportada mediante otras técnicas (~20%; grafo inferior) (Guzman et al., 2016) .

## Registros de *patch-clamp*

Complementariamente a los registros extracelulares, se realizaron registros de *patch-clamp* en la modalidad de célula completa con el fin de caracterizar las propiedades intrínsecas de las neuronas piramidales de CA3, así como la actividad sináptica espontánea en estas células.

### *Procedimiento*

Se registró mediante la técnica de *patch-clamp*, en su configuración de célula completa, neuronas piramidales de CA3 en la preparación de la rebanada HEC, como se describió previamente (Bischofberger et al., 2006).

Bajo guía microscópica y visualización mediante contraste por interferencia diferencial (DIC, por sus siglas en inglés) se seleccionaron células piramidales de la región CA3b del hipocampo con signos visuales de viabilidad y localización del soma dentro del estrato piramidal. Para el registro de *patch-clamp* se utilizaron electrodos de borosilicato con un diámetro interno: 0.86mm, externo: 1.5mm y con filamento (Sutter Instruments, EE. UU.), con una resistencia en el baño (LCRA, descrito previamente) de 3-5MOhms con una solución intracelular compuesta por: en mM gluconato de potasio 120, KCl 10, HEPES 10, MgCl<sub>2</sub> 1, EGTA 0.05, Li-GTP 0.3, Na-ATP 2 (Debanne et al., 1996).

Las señales electrofisiológicas fueron amplificadas (Axopatch 200b, Molecular Devices, EE.UU.), filtradas (filtro pasa-bajas 10kHz) y digitalizadas a 30kHz (Digidata 1550, Molecular Devices, EE.UU.) dentro de la suite pClamp (v.10, Molecular Devices, EE.UU.).

El potencial de membrana en reposo se verificó inmediatamente después de obtener la configuración de célula completa y se descartó toda célula con un potencial de membrana superior a -50mV y/o una resistencia de acceso superior a 40MOhms.

A continuación, en la modalidad de fijación de corriente, se llevó a la célula a un potencial de membrana de aprox. -70 mV y se aplicó un protocolo de inyección de corriente con incrementos de 25 pA a partir -250 pA hasta la obtención del primer potencial de acción para la obtención de la curva corriente/voltaje (I/V). De manera similar, la curva de corriente/disparo se realizó con inyecciones de corriente a partir de 0 pA y con incrementos de 25 pA hasta la obtención de la frecuencia estable de disparo.

Para el registro de corrientes sinápticas espontáneas, una vez concluida la caracterización de la célula, se pasó al modo de fijación de voltaje, se llevó a la célula a un potencial de -70 mV y se registró en modo *gap-free* la actividad sináptica espontánea durante 5min.

## *Análisis*

Todos los registros fueron analizados en la suite Clampfit. Las características más típicas de las neuronas de CA3 como ausencia de sag (< 1mV) y baja frecuencia de disparo (3-5Hz) fueron usadas como criterios de verificación de la identidad celular (Hemond et al., 2008).

Los protocolos realizados en fijación de corriente fueron utilizados para calcular la resistencia de entrada, constante de tiempo de membrana y capacitancia celular. La resistencia de entrada fue calculada ajustando una regresión lineal a la porción de la I/V cercana al cero de corriente inyectada; la constante de tiempo fue tomada como el valor del primer parámetro de un ajuste de doble exponencial a un trazo de baja amplitud en la I/V; la capacitancia fue calculada como el cociente de

la constante de membrana dividida entre la resistencia de entrada y el sag fue calculado como la diferencia entre la porción más negativa de la deflexión del potencial de membrana ante la inyección de un pulso negativo de corriente y el potencial de membrana en estado estacionario a este mismo pulso de corriente (Johnston, 1981; Rall, 1969).

Las corrientes post-sinápticas espontáneas (sPSCs) fueron detectadas utilizando la función de comparación de plantillas (*template matching*) de Clampfit supervisada manualmente. Debido al amplio rango de amplitudes de las sPSCs registradas en CA3, dos plantillas fueron utilizadas; una para los eventos menores a 50pA y otra para los mayores a 50pA. Cada plantilla se construyó como la forma promedio de al menos 10 eventos manualmente seleccionados.

## **Registro de campo de potenciales despolarizantes gigantes (GDPs)**

Los potenciales gigantes despolarizantes (GDPs, por sus siglas en inglés) son considerados la primera forma de actividad neuronal organizada del hipocampo en desarrollo (Ben-Ari, 2001; Ben-Ari et al., 1989). Estos potenciales fueron descritos por primera vez como mesetas pronunciadas de despolarización membranal acompañadas de ráfagas de disparos en neuronas piramidales de CA3 en preparaciones de rebanadas de hipocampo neonatal que emergen de manera espontánea durante la primera semana de vida y desaparecen hacia el final de la segunda (Ben-Ari et al., 1989).

Sin embargo, pronto fue reconocido su origen como una forma de actividad poblacional iniciada por un disparo sincrónico de las neuronas GABAérgicas, que en este período producen una corriente despolarizante, que evocan la despolarización sincrónica de las neuronas de CA3 reduciendo el bloqueo de los receptores NMDA y culminando en ráfagas de disparo poblacional (Kasyanov et al., 2004; Khalilov et al., 2015; Leinekugel et al., 1998).

Se ha especulado que esta forma primordial de actividad rítmica del hipocampo juega un papel importante en la consolidación de sus sinapsis y podría ser un antecesor directo de otras formas de actividad sincrónica en el hipocampo adulto como las *sharp waves* (Ben-Ari, 2001; Leinekugel et al., 2002).

Los GDPs registrados extracelularmente se observan como una deflexión del potencial local de campo, generalmente bifásica (Fig. 8), de gran magnitud y cientos de milisegundos de duración (Leinekugel et al., 1998) que evoca una ráfaga sincrónica de potenciales de acción (Ben-Ari et al., 1989).

## *Procedimiento*

Al transcurrir al menos 1hr de recuperación en la solución de incubación, una rebanada coronal de hipocampo de ratón neonato (P7-P9) fue colocada en una cámara de inmersión con LCRA circulante y burbujeo continuo con carbógeno (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) a 32-33° C. Bajo guía microscópica, se colocó una pipeta de borosilicato de baja resistencia (aprox. 500 KOhms), llena de LCRA, en el estrato piramidal de la región CA3 del hipocampo y se observó de manera continua la actividad espontánea de banda amplia (0.3Hz-3kHz) hasta localizar una región en la que los fGDPs ocurrieran de manera periódica (Fig. 8).

Se dejó estabilizar el registro por 30 min y se registró 30-60 min de actividad espontánea. Finalizado este periodo se verificó la identidad de los fGDPs al aplicar 5 μM de bicuculina durante 10 min (Ben-Ari et al., 1989; Leinekugel et al., 1998; Zakharov et al., 2016). Finalmente, toda respuesta biológica fue inhibida con la aplicación de 1 mM de lidocaína (Peña-Ortega et al., 2010). Todos los fármacos fueron aplicados en el baño circulante.

## *Análisis*

Para la caracterización de los GDPs y la estimación de la actividad multiunitaria (MUA), los registros de campo fueron procesados mediante descomposición y reconstrucción con ondullillas (*wavelets*) (Quiroga et al., 2001). Este procesamiento permitió la separación de los elementos de baja (potencial de campo y GDPs) y alta frecuencias (MUA) de la señal original (Fig. 8a).

Posteriormente, se cuantificó la frecuencia, amplitud y duración media de los fGDPs en el componente de baja frecuencia y la MUA en el componente de alta frecuencia. La frecuencia de la MUA fue caracterizada de manera global (todo el registro) y, además, separada en períodos entre los fGDPs (inter-fGDP) y durante los fGDP (intra-fGDP). La detección de espigas se llevó a cabo con un umbral de amplitud de 5MAD (Martínez & Quiroga, 2013), con una duración mínima de 1ms y un intervalo mínimo de 2ms en el componente de alta frecuencia de la señal (Fig. 8b). La detección de fGDPs fue llevada a cabo con un umbral de 10MAD, una duración máxima a media amplitud de 400ms y un intervalo mínimo de 1s en el componente de baja frecuencia de la señal (Leinekugel et al., 1998) (Fig. 8c).

Las ráfagas de MUA fueron detectadas mediante un suavizado con una función gaussiana con una ventana de 50ms de la serie de tiempos de las espigas para detectar períodos de frecuencia incrementada de disparo. Una ráfaga fue definida como un pico en la función suavizada de disparo

de al menos 10MAD con un intervalo mínimo de 400ms. La coincidencia entre una ráfaga MUA y un fGDPs fue determinada como la diferencia en el tiempo del pico de la ráfaga con respecto al pico del fGDP menor a 100ms (Fig. 8c).

Un procedimiento adicional fue convertir la serie de tiempos de las espigas en una serie de frecuencia de disparo continua con una función de vagón con una ventana deslizante de 200ms la cual fue correlacionada con el componente de baja frecuencia que contiene a los fGDPs.

Este procesamiento y cuantificación se llevaron a cabo con código *ad hoc* desarrollado en MATLAB.

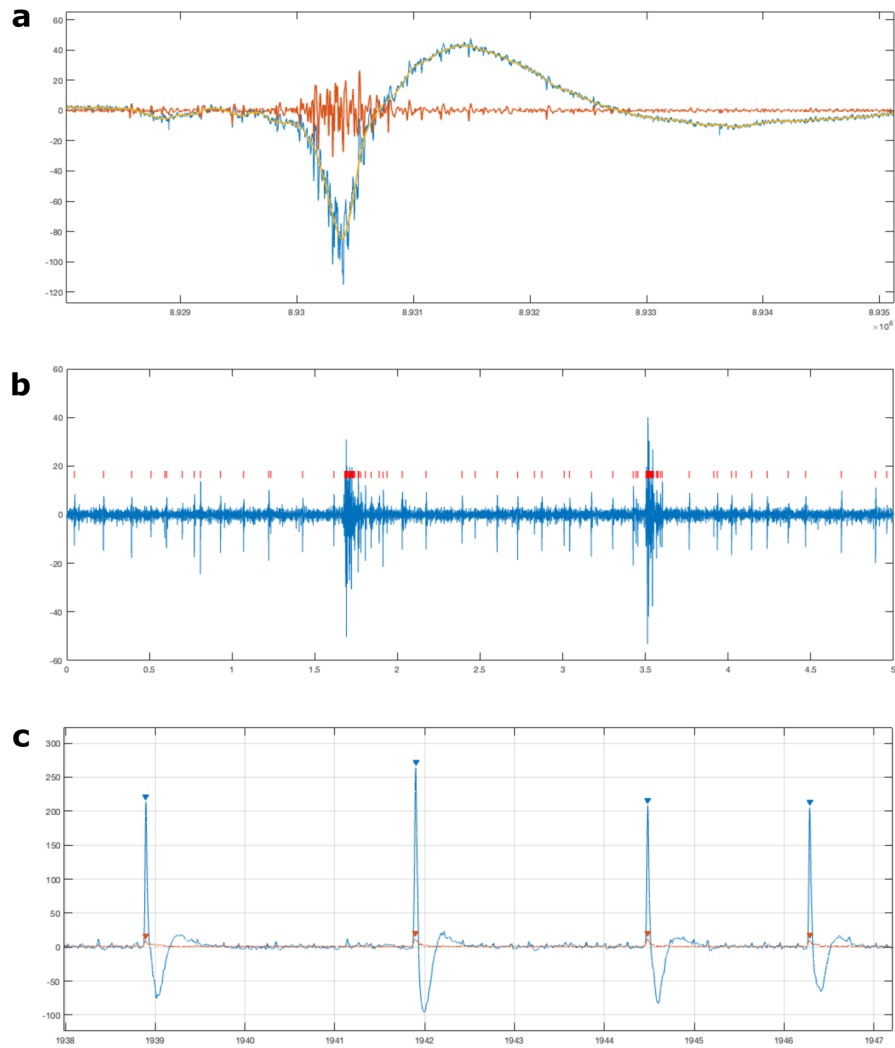


Fig. 8 Análisis de los registros de fGDPs

a) Descomposición y reconstrucción de la señal de campo mediante ondullas (*wavelets*) donde se muestra la señal original (azul), el componente de frecuencias bajas (amarillo) conteniendo los fGDPs y el componente de frecuencias altas (naranja) conteniendo las espigas extracelulares. b) Trazo representativo del componente de frecuencias altas mostrando el resultado de la detección de espigas, nótese el par de ráfagas inducidas por fGDPs. c) Trazos representativo mostrando el resultado de la detección de coincidencias entre los fGDPs (azul) y el incremento en la frecuencia de las espigas (naranja), indicados por puntas de flecha.

## **Fenotipificación Conductual**

### **Excavación (*Burrowing*)**

La conducta de excavación es una conducta innata en múltiples especies de roedores que tiene como objetivo la construcción de una madriguera y la consecuente protección contra los elementos (Deacon, 2006). Esta conducta innata es un parámetro sensible para la estimación del bienestar de los roedores experimentales (Jirkof, 2014) y varios reportes han relacionado alteraciones en esta conducta con diversos estados patológicos como infecciones por priones, estados inflamatorios y lesiones hipocampales (Deacon, 2012).

#### *Procedimiento*

La determinación de alteraciones en la conducta de excavación se llevó a cabo de acuerdo a protocolos publicados previamente (Deacon, 2012; Deacon, 2006). Utilizando cilindros plásticos de aproximadamente 20cm de largo y 7cm de diámetro, con un solo extremo abierto, se colocaron 400g de gravilla de río previamente desinfectada. Este aparato fue colocado primeramente en la caja de alojamiento de los sujetos experimentales durante 12hr en una primera sesión de habituación al aparato. Posteriormente, dos sesiones de excavación individual se llevaron a cabo con 48hr de separación. En esta sesión cada sujeto fue colocado individualmente en cajas de alojamiento con un cilindro de excavación con 400g de gravilla de río durante una noche (12hr).

La primer sesión de excavación tiene como objetivo familiarizar al sujeto con la tarea y disminuir la variabilidad en la respuesta (Deacon, 2012). Al terminar la sesión cada individuo fue regresado a su caja habitual de alojamiento. La segunda sesión se llevó a cabo, de manera similar, 48hr después. El peso de la gravilla remanente en el tubo al terminar las 12hr de la sesión es cuantificado y sustraído del total inicial para la estimación del peso excavado (Deacon, 2006).

### **Campo Abierto**

La prueba de campo abierto es uno de los paradigmas conductuales más utilizados tanto como una prueba de actividad locomotriz y exploración general, así como una prueba de conducta asociada a ansiedad no condicionada (Seibenhener & Wooten, 2015b). La tarea toma como referencia la conducta habitual de los roedores de evitar los espacios abiertos y la luz intensa en un



contexto ambiguo en el que se le presenta al sujeto un espacio novedoso que le estimula a la exploración; esta prueba cuenta con amplia validez farmacológica (Carola et al., 2002; Prut & Belzung, 2003).

### *Procedimiento*

La prueba se llevó a cabo en una arena de 60x60x30cm con piso blanco texturizado y paredes transparentes. El aparato fue rodeado de cortinas negras para evitar estímulos distractores e iluminado desde el techo con una intensidad lumínica de ~100 lux.

Los animales fueron llevados al cuarto de pruebas y habituados por un período mínimo de 1hr previo a las pruebas. Durante este período y durante las pruebas se reprodujo ruido blanco con el objetivo de bloquear estímulos auditivos externos.

Al terminar la habituación, cada sujeto experimental fue colocado en el centro de la arena y se le dejó explorar libremente por un período de 5min. Al finalizar este periodo los sujetos experimentales fueron regresado a su alojamiento habitual.

### *Análisis*

Las pruebas fueron videograbadas para su posterior análisis con el uso del programa SMART (Panlab, Harvard Instruments, EE.UU.), en el cual se cuantificó el tiempo transcurrido en el centro y en la periferia de la arena, así como las transiciones entre una y la otra zona, la velocidad promedio, la velocidad máxima de desplazamiento y el tiempo de inmovilidad (Seibenhener & Wooten, 2015).

## **Laberinto Elevado en Forma de Cruz**

Una prueba complementaria al campo abierto y considerada la prueba estándar para la evaluación de conducta tipo ansiedad es el laberinto en cruz elevado (Walf & Frye, 2007).

Tanto el laberinto en cruz elevado, como el campo abierto, explotan la preferencia de los roedores por los espacios confinados y poco iluminados y su aversión por la iluminación intensa (Walf & Frye, 2007). El aparato del laberinto en cruz elevado explota este principio al presentar al

sujeto con un ambiente que consiste en dos regiones expuestas, dos brazos sin paredes y elevados del piso, y dos regiones de refugio (Fig. 19K,I), dos brazos con paredes altas que disminuyen la exposición del sujeto experimental (Carola et al., 2002).

El protocolo más utilizado para esta prueba consiste en una sola exposición al laberinto tras una breve habituación al cuarto experimental (Walf & Frye, 2007a). Sin embargo, múltiples autores han cuestionado este acercamiento con el argumento de que la prueba presenta al sujeto un contexto ambiguo donde coexisten la preferencia de lugar (refugio vs exposición) con el estímulo atrayente de un ambiente novedoso que los roedores tienden a explorar (Ennaceur, 2014). Una solución cada vez más aceptada a este cuestionamiento es el protocolo de doble exposición al laberinto en cruz elevado. En efecto, diversos autores reportan resultados más consistentes y reproducibles cuando los animales son expuestos a dos sesiones de exploración del laberinto en cruz elevado (Ennaceur, 2014), estableciendo que la preferencia por uno de los compartimentos se revela con mayor claridad.

### *Procedimiento*

Todos los brazos del aparato son simétricos, 10x35cm, unidos por un área central los brazos cerrados cuentan con paredes laterales (30cm aprox. en altitud) que se extienden desde el centro del aparato hasta los extremos laterales. El aparato, que se encuentra elevado desde el piso aprox. 45cm, fue iluminado desde el techo con lámparas fluorescentes convencionales, logrando una intensidad lumínica en la superficie del laberinto de aprox. 100 lux.

Los animales fueron habituados al cuarto de experimentación, cubiertos por una manta negra, por un período de al menos 1hr previo al inicio de las pruebas. Posteriormente, cada sujeto fue individualmente colocado en el área central del laberinto y se les dejó explorar libremente por 5min. Este mismo protocolo fue repetido 24hr después, para la segunda sesión.

### *Análisis*

Las sesiones fueron videograbadas y analizadas posteriormente con el uso del programa SMART (Panlab, Harvard Instruments, EE.UU.), con el cual fue cuantificado el tiempo de permanencia en cada brazo del aparato, así como en la zona central, el tiempo transcurrido en deambulación y en inmovilidad, y la velocidad máxima y promedio de deambulación.

## **Interacción Social**

En especies gregarias como los roedores y los humanos la interacción social es un aspecto fundamental y característico del fenotipo conductual con claras ventajas evolutivas. La reciente evidencia de su correlato neurobiológico expone la interacción social como una conducta compleja que involucra y recluta la asociación de diversas áreas cerebrales, especialmente el hipocampo y la corteza prefrontal (Kingsbury et al., 2019; Zhan, 2015). El impedimento en el establecimiento de relaciones sociales es un signo claro en múltiples patologías neuropsiquiátricas y su estudio sistemático es objeto de creciente interés (Sankoorikal et al., 2006).

La prueba más utilizada para la evaluación de interacción social es la propuesta por el grupo de Crawley (Moy et al., 2004a; Yang et al., 2011), conocido como la prueba de tres cámaras para interacción social. La prueba consiste en una arena dividida en tres compartimentos de similares dimensiones y libre acceso entre ellas. El compartimento central permanece vacío mientras que en los compartimentos de los extremos se colocan jaulas que contendrán un objeto inanimado de un lado y un sujeto conespecífico desconocido para el sujeto de prueba en el otro lado (Moy et al., 2004).

### *Procedimiento*

El aparato fue colocado en un cuarto sonoamortiguado, rodeado de cortinas negras. Tanto durante la habituación como la fase de prueba, se reprodujo ruido blanco ambiental. La intensidad de la iluminación a nivel de la superficie de la arena se ajustó a 7-10 lux.

Primeramente, se habituaron a los sujetos experimentales a la arena con las jaulas vacías en los compartimentos de los extremos durante al menos 30min. Es importante realizar la habituación con las jaulas presentes en el aparato, pues constituyen una característica topológica mayor del contexto de la prueba. Cuando todos los sujetos experimentales fueron retirados, los sujetos que servirán de estímulo se habituaron a las jaulas dentro del aparato por un período similar. Si los sujetos de estimulación presentan conductas agresivas o no demuestran adaptación apropiada al confinamiento en las jaulas de interacción deben ser descartados y sustituidos.

En los compartimentos de los extremos se colocaron las jaulas; en una de ellas se colocó un conespecífico del mismo sexo que el sujeto experimental y de la misma edad o más juvenil, en la jaula contralateral se colocó un objeto inanimado. Posteriormente, se colocó a uno de los sujetos experimentales en el compartimento central y se le dejó explorar libremente la arena por 5 min.

## *Análisis*

Las sesiones de prueba fueron videograbadas y analizadas visualmente. Se contabilizaron el número de entradas y el tiempo de exploración en cada compartimento. Adicionalmente, en el análisis se compara la relación de tiempo de exploración entre compartimentos con respecto al tiempo total de exploración mediante el índice de sociabilidad:

$$\frac{\text{Tiempo de exploración del conespecífico} - \text{Tiempo de exploración del objeto}}{\text{Tiempo de exploración del conespecífico} + \text{Tiempo de exploración del objeto}}$$

## **Laberinto de Hebb-Williams**

El laberinto de Hebb-Williams constituye una tarea de navegación y aprendizaje espacial (Shore et al., 2001). Propuesto originalmente como una prueba de inteligencia para roedores, ha demostrado una gran utilidad para investigar el impacto de lesiones, manipulaciones farmacológicas y genéticas en una gran variedad de especies, incluyendo la humana (Boutet et al., 2018; Pritchett & Mulder, 2004; Shore et al., 2001).

La versatilidad del laberinto subyace en las diversas configuraciones que se pueden implementar mediante el uso de barreras que el usuario coloca dentro del laberinto. Las configuraciones utilizadas generalmente consisten en las 6 configuraciones de entrenamiento y 12 de prueba estandarizadas por Rabinovitch & Rosvold (1951), cada una de las configuraciones de prueba tienen zonas de error las cuales son utilizadas para cuantificar el desempeño de los animales.

Diversas modificaciones se han propuesto al protocolo original (Shore et al., 2001). De particular interés para nosotros es el protocolo propuesto por el grupo de Kesner (Lee & Kesner, 2004; Rogers & Kesner, 2003), en el cual el entrenamiento inicial se lleva a cabo en una configuración de corredor lineal en el cual se entrena al roedor para iniciar su recorrido en un extremo del laberinto y recibir una recompensa en el extremo opuesto. Posteriormente, el animal es expuesto a una sola de las configuraciones, generalmente el problema no. 4 de Rabinovitch & Rosvold (1951), durante varios días consecutivos. El desempeño del animal es cuantificado en cada ensayo como el número de errores cometidos (p.e. entradas en zonas de error) y, adicionalmente, puede cuantificarse el tiempo requerido para la resolución del laberinto (i.e. latencia) (Lee & Kesner, 2004; Rogers & Kesner, 2003).

## Procedimiento

El aparato fue construido en nuestro laboratorio y consiste en un campo abierto de 60x60x10cm con dos cajas adicionales de 20x10x10cm en esquinas opuestas que constituyen los sitios de inicio y final del laberinto (Pritchett & Mulder, 2004; Rabinovitch & Rosvold, 1951) (Fig. 9).

Los animales fueron previamente alojados en un cuarto de ciclo invertido de luz-oscuridad y se procede a una fase de habituación al cuarto donde se realizaron las pruebas (sonoamortiguado y con condiciones de luz y temperatura controladas) y al aparato (rodeado de cortinas negras sin pistas visuales) durante tres días consecutivos. Durante esta fase se inició simultáneamente la privación de alimento durante 22-23hr al día, durante una semana antes de las pruebas, para asegurar un adecuado nivel de motivación (Lee & Kesner, 2004). Posteriormente, se realizó el entrenamiento que consiste en 10 ensayos al día, en una configuración de corredor lineal, en la cual los animales reconocen el área de inicio y la zona donde recibirán la recompensa (aprox. 10mg de hojuela de maíz sin azúcar) durante 3 días consecutivos sin pistas visuales. La tarea fue videograbada con una cámara colocada directamente sobre el laberinto.

Posteriormente, los animales fueron expuestos a la configuración de prueba (problema no. 4, Fig. 9) (Lee & Kesner, 2004; Rabinovitch & Rosvold, 1951), la cual presenta un problema de navegación espacial novedoso y se colocaron 4 pistas visuales extra-laberínticas en las cortinas que rodean al aparato. Se realizaron 10 ensayos diarios durante 3 días consecutivos. Al terminar la sesión de cada día, se dejó a los sujetos alimentarse *ad libitum* durante dos horas y fueron regresados a su alojamiento habitual.

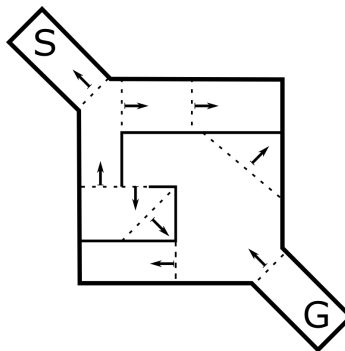


Fig. 9 Configuración del Problema 4 de Rabinovitch & Rosvold

**S** denota la casilla de salida, **G** la meta con la recompensa, las flechas indican el límite de una zona de error y la dirección del movimiento que lo define.

## Análisis

La cuantificación de errores y latencias se llevaron a cabo posteriormente en una revisión minuciosa de los videos. Un error fue definido como la intromisión de al menos las dos patas delanteras del roedor en una de las zonas de error, errores adicionales fueron cuantificados cuando el roedor presenta tigmotaxia o escalamiento de las paredes (Lee & Kesner, 2004). Simultáneamente, se cuantificó la latencia desde el momento de salida de la cámara de inicio hasta entrar en la cámara de recompensa (Fig. 9). Los errores y la latencia fueron agrupados en dos bloques de 5 ensayos, reflejando cada uno la primer y segunda mitad de cada día de pruebas.

## Análisis estadístico

El análisis computacional y estadístico se llevó a cabo con rutinas desarrolladas en Python (v3.7+) (Rossum & L. F., 1995) con el uso de bibliotecas de cómputo científico y estadístico bien estandarizadas y de amplio uso incluyendo: Numpy (van der Walt et al., 2011), Scipy (Oliphant, 2007; Virtanen et al., 2020), pandas (McKinney, 2010), Pingouin (Vallat, 2018), statsmodels (Seabold & Perktold, 2010). Las bibliotecas con una orientación y uso más particulares o el uso de otro lenguaje de programación son especificadas en cada caso particular.

Todo el código desarrollado para este trabajo se encuentra disponible en mi depósito de GitHub (<https://github.com/FMendezSlc/NeuroPy>) o a solicitud personal.

En los casos de comparación de dos muestras, las cuales cumplieron el criterio de normalidad (Shapiro), se utilizó la prueba t de Student. En los casos de no cumplirse la normalidad se realizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney-Wilcoxon.

Para la comparación de proporciones se utilizó la prueba exacta de Fisher.

Para comparaciones de más de dos grupos que cumplieron los criterios de normalidad (Shapiro) y homocedasticidad (Levene) se aplicó la prueba de ANOVA con la prueba *post-hoc* de Tukey. En los casos donde la prueba de Levene mostró significativa heterogeneidad de varianza se utilizó el ANOVA de Welch con la prueba *post hoc* de Games-Howell.

En los casos donde no se cumplió el criterio de normalidad, pero sí el de homocedasticidad, se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis con prueba *post hoc* de Dunn.

Para la comparación de observaciones repetidas se utilizó una ANOVA de modelo mixto con múltiples pruebas t de Student pareada con corrección de Holm como *post hoc*.

En los casos de comparaciones de distribuciones se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para muestras independientes.

En todos los casos se asumió un valor de  $p \leq 0.05$  como estadísticamente significativo. Para todas las figuras se representó la significancia con el siguiente código: \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ .

En todas las figuras, las gráficas de caja indican la mediana y los cuartiles de los datos, los bigotes denotan el valor mínimo y máximo dentro de 1.5 veces el rango intercuartil. En las gráficas de barra los datos son presentados como la media y el error estándar de la media como métrica de dispersión.

En todas las figuras y a lo largo del texto el grupo control es denominado como WT y el grupo *Cx3cr1*<sup>-/-</sup> como KO.

## Resultados

### Alteraciones morfológicas de la microglia y las estructuras sinápticas en la región CA3 del hipocampo en ratones $C3xcr1^{-/-}$

#### La depleción del receptor a fractalquina induce cambios en la densidad y morfología de la microglia

Reportes previos han documentado cambios, generalmente transitorios, en la densidad de células microgliales durante diferentes etapas del desarrollo temprano (Hoshiko et al., 2012; Zhan et al., 2014). Dado su importante función en la consolidación y eliminación de sinapsis y el soporte trófico neuronal (Ueno et al., 2013a), se realizó la determinación de la densidad de la microglia en la región CA3 del hipocampo en el ratón neonatal (P10) y adulto, en ambos grupos experimentales, previo a su caracterización morfológica, la cual se llevó a cabo mediante reconstrucciones de células individuales.

Mediante inmunodetección contra Iba-1, se encontró que los ratones KO cursan con una disminución en la densidad de células microgliales en la región CA3 del hipocampo durante la etapa neonatal en comparación con los ratones WT (Mann-Whitney-Wilcoxon;  $U = 670$ ,  $p < 0.001$ , WT = 27 campos/3 animales, KO = 27 campos/3 animales; Fig. 10a-b,g). Consistente con los reportes previos, esta disminución parece ser transitoria y no se encontraron diferencias significativas entre grupos en la etapa adulta (Fig. 10c-d, g).

El análisis de las reconstrucciones, por el contrario, mostró que los cambios en la morfología fueron prevalentes en la etapa adulta sin aparente afectación de la microglia en la etapa neonatal. En efecto, la microglia de ratones KO adultos mostró una morfología híper-ramificada caracterizada por un mayor número de ramificaciones (Mann-Whitney-Wilcoxon;  $U = 178$ ,  $p < 0.001$ , WT = 30, KO = 31; Fig. 10h) y, en consecuencia, un mayor número de puntos finales en el esqueleto (Mann-Whitney-Wilcoxon;  $U = 145$ ,  $p < 0.001$ ; Fig. 10i). Este gran incremento en el número de ramificaciones de la microglia KO determinó igualmente una mayor longitud total de los procesos (suma de todos los procesos) (T-Student;  $t_{58} = -3.8$ ,  $p < 0.001$ ; Fig. 10k), a pesar de que, en promedio, los procesos individuales de la microglia KO mostraron una longitud menor (T-Student;  $t_{58} = 3.18$ ,  $p = 0.002$ ; Fig. 10j).

A pesar de la diferencia en densidad, no se encontraron cambios morfológicos en la microglia en la etapa neonatal (Fig. 10h-k).



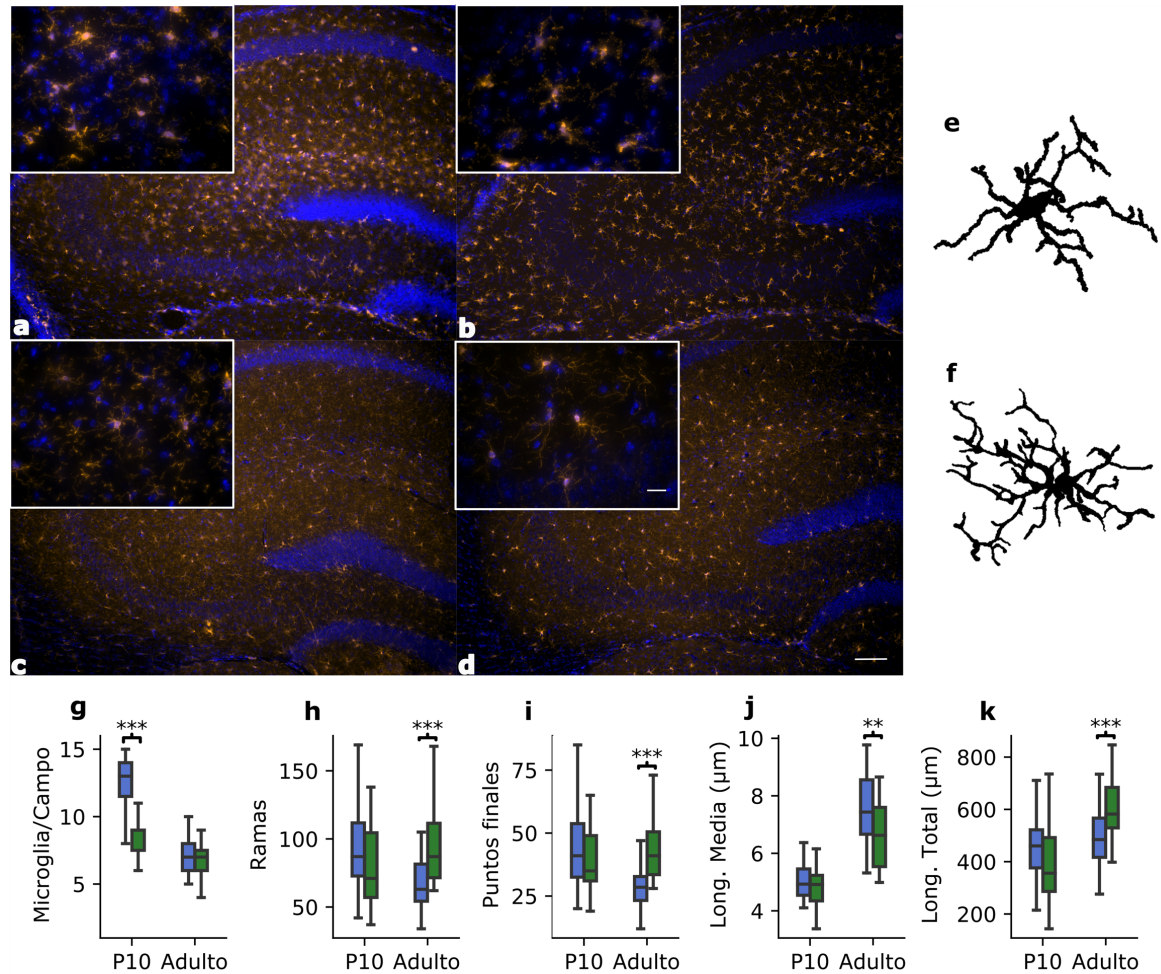


Fig. 10 Densidad y morfología de la microglia en neonatos y adultos

(a-d) Fotomicrografías de inmunohistoquímica para Iba-1 (naranja, microglia) y DAPI (azul, núcleos) en el hipocampo neonatal (*arriba*) y adulto (*abajo*) en ratones WT (*izq.*) y KO (*der.*) a baja magnificación (10X); los insertos corresponden a campos de gran aumento (63X) de cada fotomicrografía. (e-f) Reconstrucciones de microglia de secciones hipocámpales de ratones WT (e) y KO (f) adultos, nótese la profusión de ramificaciones en el KO. g) Comparación de la densidad de microglia por genotipo y edad; los ratones KO neonatos muestran una disminución transitoria de la densidad de microglia en el área CA3 (Mann-Whitney-Wilcoxon;  $U = 670$ ,  $p < 0.001$ , WT = 27 campos/3 animales, KO = 27 campos/3 animales), que revierte con la edad. h) Comparación del número de ramas por microglia; los ratones KO adultos muestran un incremento en la ramificación de la microglia (Mann-Whitney-Wilcoxon;  $U = 178$ ,  $p < 0.001$ , WT = 30, KO = 31; Fig. 1h). Comparación del número de puntos finales; consistente con el incremento en las ramificaciones, la microglia KO de ratones adultos muestra un mayor número de puntos finales (Mann-Whitney-Wilcoxon;  $U = 145$ ,  $p < 0.001$ ; Fig. 5i). j) Comparación de la longitud promedio de las ramificaciones en la microglia; los ratones KO adultos muestran una microglia con procesos más cortos que los WT (T-Student;  $t_{58} = 3.18$ ,  $p = 0.002$ ; Fig. 5j). Comparación de la longitud total de los procesos por microglia (suma total); a pesar de tener ramificaciones más cortas, el incremento en número se ve reflejado como un incremento de la longitud total de los procesos en la microglia KO de ratones adultos; (T-Student;  $t_{58} = -3.8$ ,  $p < 0.001$ ; Fig. 5k). Como puede observarse, salvo por la diferencia en densidad, la microglia en etapa neonatal no muestra ninguna otra modificación.

## Expansión del área de distribución de la Fibra Musgosa en el ratón *Cx3cr1*<sup>-/-</sup>

La conectividad entre el DG y la región CA3 depende enteramente de la MF, la cual es altamente susceptible a sufrir modificaciones tanto en su fisiología como en su estructura como consecuencia de procesos fisiológicos (Ramirez-Amaya et al., 2001; Toscano-Silva et al., 2010), al igual que patológicos (Buckmaster, 2012; Sunnen et al., 2011). Por lo que una primera aproximación para estimar el impacto de la interrupción de la señalización entre las neuronas y la microglia a través de la vía de la fractalquina en el desarrollo y el establecimiento de esta aferencia fue la determinación del área y patrón de distribución de la MF mediante la tinción de Timm en ratones adultos (Fig. 11).

Si bien, como se ilustra en la Fig. 11, ambos genotipos muestran un patrón de distribución de la MF de características generales normales constituyendo un haz compacto suprapiramidal de fibras en el *stratum lucidum* y un haz pequeño infrapiramidal que decusa rápidamente y se incorpora al haz suprapiramidal al entrar a la región de CA3b (D. G. Amaral & Lavenex, 2006). Un análisis más detallado demuestra una expansión del área total de distribución de la MF en los ratones KO (T de Student;  $t_{58} = -4.09$ ,  $p < 0.001$ ; WT = 60; KO = 60 secciones; Fig. 11a-d).

Esta expansión del área de la MF sin interrupción del patrón normal de distribución es similar al *sprouting* relacionado con procesos de aprendizaje espacial, ejercicio o LTP (Adams et al., 1997; Ramirez-Amaya et al., 2001; Toscano-Silva et al., 2010), y se diferencia del *sprouting* observado en procesos patológicos, como en los modelos de epilepsia, donde generalmente se observa una proyección retrógrada de la MF hacia el DG (Buckmaster, 2012; Sunnen et al., 2011). Lo que sugiere que el proceso detrás de la expansión aquí descrita es más consistente con un incremento moderado en el número de ramificaciones y botones de la MF en la región CA3, posiblemente secundario a un proceso de eliminación y refinamiento (*pruning*) deficiente, como se ha documentado en otras regiones (Paolicelli et al., 2011).

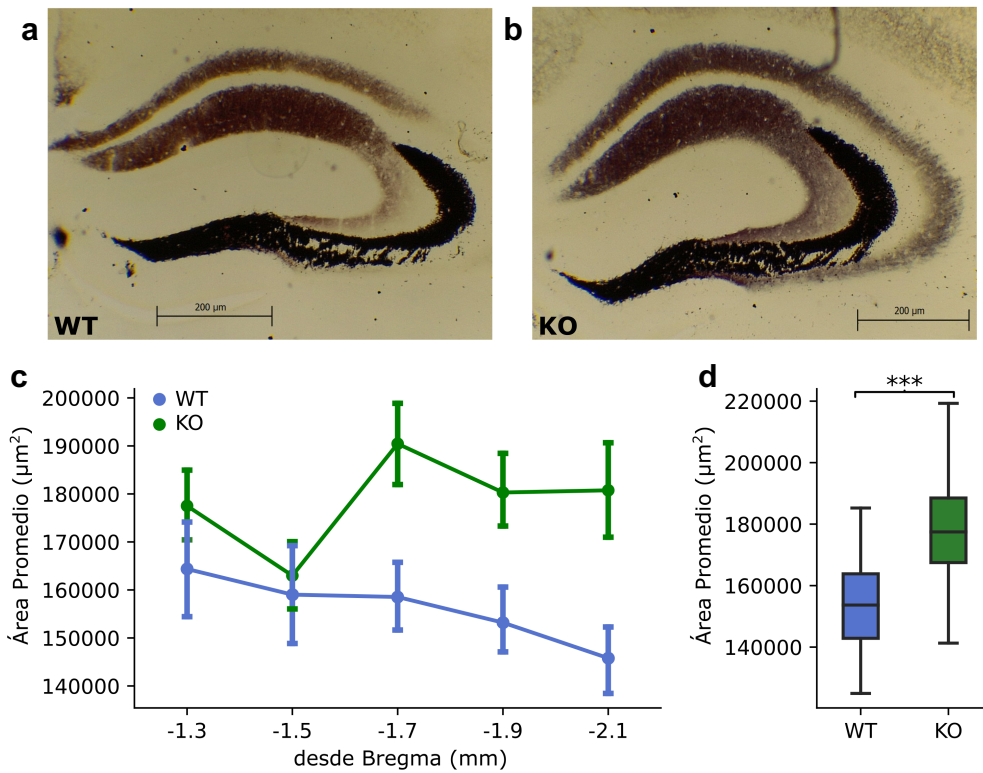


Fig. 11 Expansión del área de la MF en el ratón  $Cx3cr1^{-/-}$

(a-b) Fotomicrografías de secciones del hipocampo dorsal de ratones adultos WT (a) y KO (b) y comparación del área cubierta por la MF a cinco niveles rostro caudales desde Bregma (c) y promedio de todos los niveles (d). A pesar de un patrón de distribución normal en ambos grupos, un análisis detallado reveló un incremento del área total de distribución de la MF en los ratones KO (T de Student;  $t_{58} = -4.09$ ,  $p < 0.001$ ; WT = 60; KO = 60 secciones).

## Alteraciones morfológicas de las estructuras sinápticas de CA3 en el ratón con depleción del receptor a fractalquina

La expansión del área de la MF revelada mediante la tinción de Timm sugiere cambios en las estructuras sinápticas de esta vía. Para una exploración más detallada de estas posibles alteraciones se realizó el trazado y la reconstrucción de estructuras pre y post-sinápticas de CA3 con un enfoque especial en la MF (Fig. 12).

Utilizando el trazador lipofílico Dil, se marcaron selectivamente neuronas de la región CA3 (Fig. 12a) mediante el depósito de este trazador en el *stratum lacunosum-moleculare* con el objetivo de reconstruir y caracterizar las espinas dendríticas de estas neuronas, tanto las excrescencias espinosas de las dendritas proximales donde hacen sinapsis las terminales de la MF (Fig. 12b), como las espinas dendríticas de las dendritas distales (Fig. 12d).

La cuantificación no reveló diferencias entre grupos en el número de espinas en las excrescencias espinosas (Fig. 12c), ni en las espinas secundarias o terciarias (Fig. 12e).

Con una aproximación similar, pero depositando el Dil en la capa molecular del DG, se trazó la vía de la MF y sus botones (Fig. 12f-g). La reconstrucción de estas estructuras reveló indicios del origen de la expansión de la marca en la tinción de Timm y algunas diferencias entre grupos consistentes con reportes previos.

La reconstrucción de axones individuales muestra que de los 98 axones WT reconstruidos 49 (50%) tuvo un botón gigante, mientras que de los 60 axones KO reconstruidos 37 (61%) muestra al menos un botón gigante y, en algunas ocasiones, más botones incluyendo tres ocasiones en las que se encontraron botones gigantes acompañados de botones satelitales (Fig. 12g), las cuales solo fueron observadas en el grupo KO. La cuantificación y comparación del número de filopodios por botón no mostró ninguna diferencia (Mann-Whitney-Wilcoxon;  $U = 989$ ,  $p = 0.11$ , Fig. 12g-h). En cambio, la comparación del volumen de los botones gigantes reveló una disminución en el promedio del grupo KO respecto al WT (Mann-Whitney-Wilcoxon;  $U = 1056.5$ ,  $p = 0.036$ , Fig. 12i-k). Como puede apreciarse en la distribución acumulada (Fig. 12i) esta diferencia es notoria a la mitad inferior de las distribuciones. Además, la distribución de los volúmenes de los botones KO parece estar compuesta por dos sub-poblaciones (Fig. 12j), una con características similares a la WT y otra con un volumen promedio mucho menor. En efecto, la comparación de ambas distribuciones, WT y KO, restringida a los valores por debajo de la respectiva mediana reveló una drástica diferencia (Mann-Whitney-Wilcoxon;  $U = 398$ ,  $p < 0.001$ ; Fig. 12k).

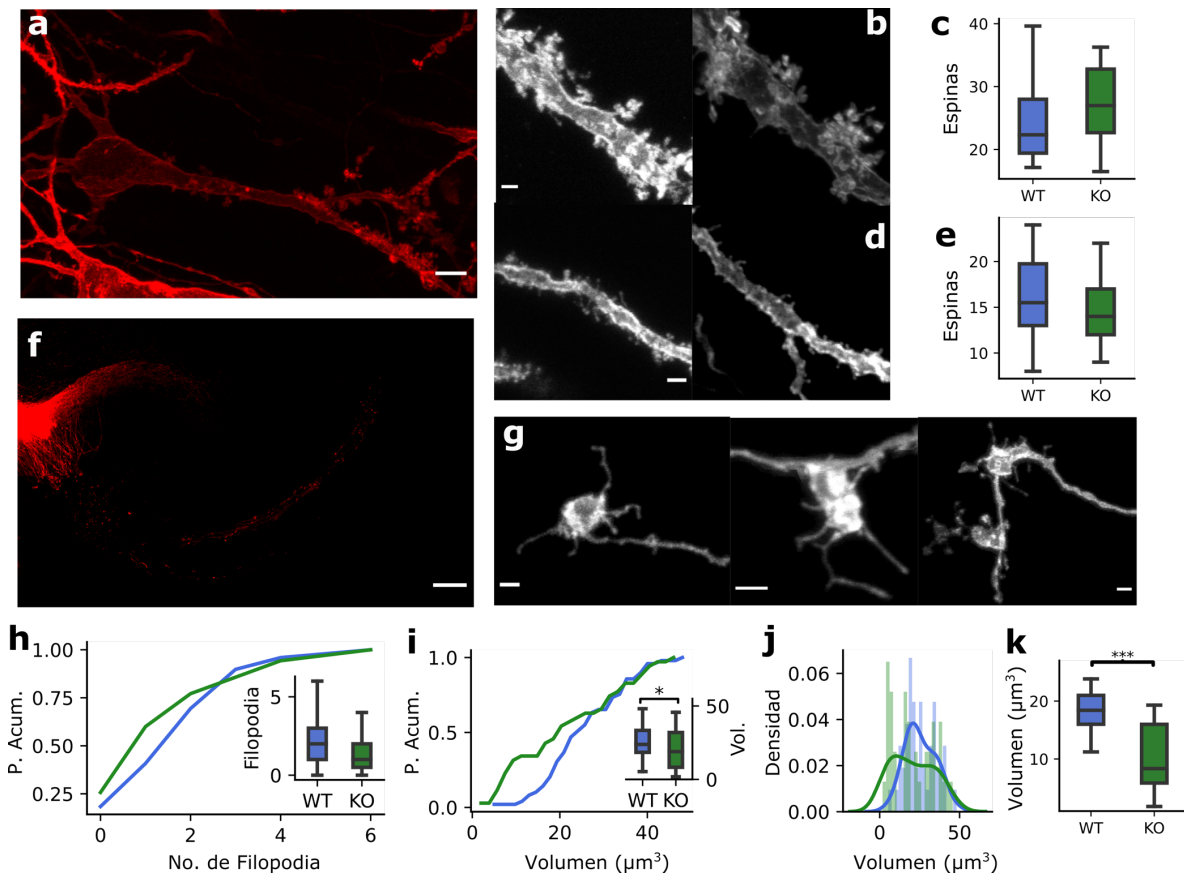


Fig. 12 Análisis morfológico de estructuras sinápticas de CA3 en los ratones *Cx3cr1*<sup>-/-</sup>

a) Fotomicrografía representativa de una neurona piramidal de CA3 teñida con Dil (escala = 20 $\mu$ m). b) Fotomicrografías representativas de dendritas proximales mostrando excrecencias espinosas en un ratón WT (*izq.*) y un ratón KO (*der.*), escala = 2 $\mu$ m. c) Comparación entre grupos de la densidad de espinas (expresada en número de espinas/20 $\mu$ m de dendritas) en las excrecencias espinosas, (Mann-Whitney-Wilcoxon;  $U = 68$ ,  $p = 0.147$ ; WT = 12, KO = 15 dendritas). d) Fotomicrografías representativas de dendritas distales en un ratón WT (*izq.*) y un ratón KO (*der.*), escala = 2 $\mu$ m. e) Comparación entre grupos de la densidad de espinas en las dendritas distales, (T-Student;  $t_{28} = 1.48$ ,  $p = 0.15$ ; WT = 18, KO = 21 dendritas). f) Mosaico de fotomicrografías representativas del trazado de células granulares del DG y sus proyecciones hasta CA3, escala = 100 $\mu$ m. g) Fotomicrografías representativas de botones gigantes normales de la MF en un ratón WT (*izq.*), un ratón KO (*en medio*) y una instancia de botones gigantes múltiples con botones satelitales en un animal KO (*der.*), escala = 2 $\mu$ m. h) Probabilidad acumulada y comparación del número de filopodios en los botones gigantes, (Mann-Whitney-Wilcoxon;  $U = 989$ ,  $p = 0.11$ , WT = 49, KO = 35 botones). i) Probabilidad acumulada y comparación entre grupos del volumen de los botones gigantes, (Mann-Whitney-Wilcoxon;  $U = 1056.5$ ,  $p = 0.036$ , WT = 49, KO = 35 botones), nótese la separación de las distribuciones restringida a la mitad inferior de ambas. j) Histogramas y densidad de frecuencia estimada para los volúmenes de ambos grupos, el grupo KO presenta una distribución bimodal, lo que sugiere que están compuestas por dos sub-poblaciones. k) Comparación de la mitad inferior de ambas distribuciones (valores por debajo de la mediana), donde se aprecia una gran diferencia entre grupos (Mann-Whitney-Wilcoxon;  $U = 398$ ,  $p < 0.001$ ). Una comparación similar de la mitad superior de las distribuciones no mostró diferencias entre grupos (datos no mostrados).

## **Alteraciones electrofisiológicas del microcircuito de la región CA3**

Los resultados hasta ahora presentados muestran que la depleción del receptor de fractalquina impacta la colonización del cerebro por la microglia durante el desarrollo, la cual ocurre de manera retrasada en un punto crítico para el establecimiento y consolidación de sinapsis en los nacientes circuitos cerebrales. En el organismo maduro, estos cambios se ven acompañados de alteraciones en las estructuras sinápticas de CA3, puntualmente en la MF (Fig. 12), y en la morfología de la microglia (Fig. 10).

Esto sugiere que las consecuencias de esta falta de comunicación entre las neuronas y la microglia podrían incluir una profunda reconfiguración de los circuitos cerebrales desde etapas tempranas del desarrollo y persistir en la adultez. Para ahondar en este cuestionamiento se realizaron registros electrofisiológicos que exploran la actividad poblacional del circuito de CA3, tanto en etapa neonatal como en la adultez, y las modificaciones sinápticas involucradas en los cambios encontrados.

### **La depleción del receptor a fractalquina induce una reconfiguración del circuito de CA3 en la etapa neonatal**

Los GDPs constituyen la primer forma de actividad poblacional organizada del hipocampo (Ben-Ari et al., 1989; Leinekugel et al., 2002). La activación sincrónica que evocan es capaz de cambiar las propiedades sinápticas de las neuronas de CA3 y, potencialmente, determinar sus características a largo plazo (Griguoli & Cherubini, 2017; Kasyanov et al., 2004), por lo que se realizaron registros en rebanadas de hipocampo de ratones neonatales (P7-P9) y se analizó tanto los GDPs como la MUA y su organización temporal (Fig. 13a-b).

Mientras que las características generales de los GDPs como frecuencia, amplitud o duración no mostraron cambios significativos entre los grupos (Fig. 13c-e), la actividad poblacional de las neuronas de CA3 reveló signos de reorganización en los ratones KO.

Primeramente, la frecuencia general de la MUA en los ratones KO se encontró ampliamente reducida (T-Student;  $t_{14} = 3.07$ ,  $p = 0.008$ , Fig. 13f). Sin embargo, este cambio no se debe a una disminución generalizada de la actividad de las neuronas de CA3 si no a una reorganización de la actividad poblacional con respecto a los GDPs. En efecto, la MUA de los ratones KO se encontró profundamente reducida solo en los intervalos entre GDP (inter-fGDP MUA; T-Student;  $t_{14} = 3.03$ ,  $p = 0.01$ ; Fig. 13g), en cambio durante los GDPs, las neuronas de CA3 de los ratones KO presentaron una mayor frecuencia de disparo (intra-fGDP MUA; Mann-Whitney-Wilcoxon;  $U = 5.0$ ,  $p = 0.01$ ; Fig. 13h).

Este cambio en la organización de la actividad poblacional se ve reflejado en una mayor correlación entre la MUA y los GDPs en los ratones KO (T-Student;  $t_{9.83} = -1.8$ ,  $p = 0.05$ ; Fig. 13i).

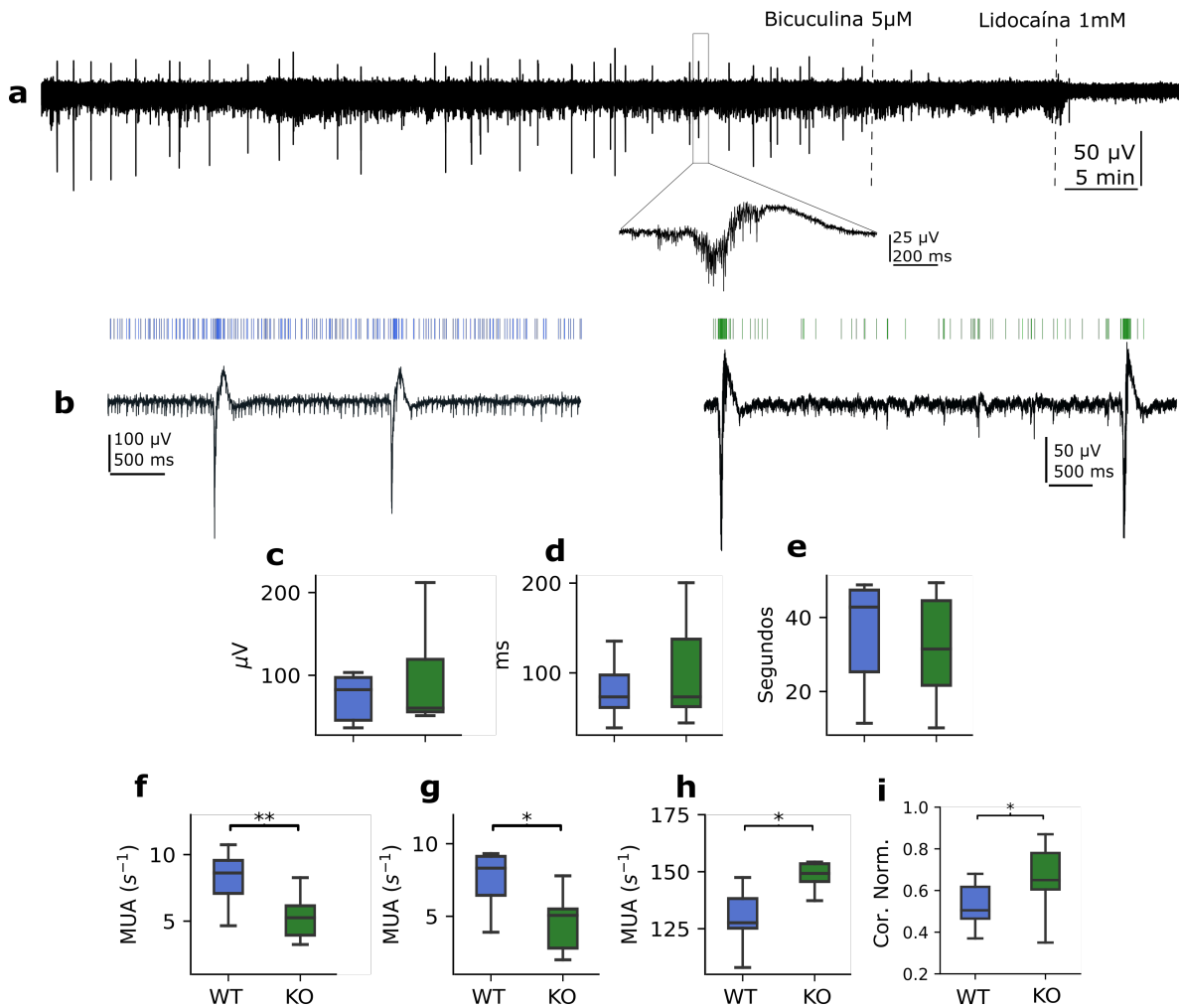


Fig. 13 Reorganización de la actividad poblacional de CA3 en el periodo neonatal

a) Trazo representativo de un registro de campo en rebanada de hipocampo neonatal donde se aprecian los fGDPs (espigas grandes) y la MUA (espigas pequeñas). Como es de esperarse los GDPs son inhibidos con la aplicación de un antagonista GABAérgico (bicuculina) y el resto de la actividad es abatida por la aplicación de lidocaína. *Inserto*, expansión de un fGDP que muestra el reclutamiento de la MUA y la forma de una ráfaga poblacional. b) Trazo representativo de la MUA y los GDPs en un ratón WT (*izq.*) y un ratón KO (*der.*), nótese la reorganización de la actividad en torno a los GDPs. c-e) Comparación de la frecuencia, duración e intervalo promedio (respectivamente) de los GDPs no muestra cambios significativos entre grupos. f) El grupo KO muestra un decremento general de la MUA (T-Student;  $t_{14} = 3.07$ ,  $p = 0.008$ ) que, sin embargo, se restringe a los períodos entre GDPs (inter-fGDP MUA; T-Student;  $t_{14} = 3.03$ ,  $p = 0.01$ ) mientras hay un reclutamiento aumentado de la MUA durante los GDPs (intra-fGDP MUA; Mann-Whitney-Wilcoxon;  $U = 5.0$ ,  $p = 0.01$ ), lo que resulta en una mayor correlación general entre la MUA y los GDPs en los ratones KO (T-Student;  $t_{9.83} = -1.8$ ,  $p = 0.05$ ).

## La disfunción sináptica en CA3 afecta principalmente la Fibra Musgosa en el ratón con depleción del receptor a fractalquina

La depleción del *Cx3cr1* produce procesos deletéreos en la consolidación y maduración de las sinapsis de varias regiones cerebrales (Hoshiko et al., 2012; Paolicelli et al., 2011; Zhan et al., 2014). En conjunto, con los resultados que indican profundos cambios en la actividad poblacional de CA3 en un período crítico de consolidación de contactos sinápticos, es probable que alteraciones similares sean prevalentes en la región de CA3 en el ratón *Cx3cr1*<sup>-/-</sup> adulto. Por ello, mediante registro de *patch-clamp* en la modalidad de célula completa de neuronas piramidales de CA3 se investigaron posibles alteraciones en las propiedades intrínsecas de estas neuronas y en las corrientes post-sinápticas (sPSCs).

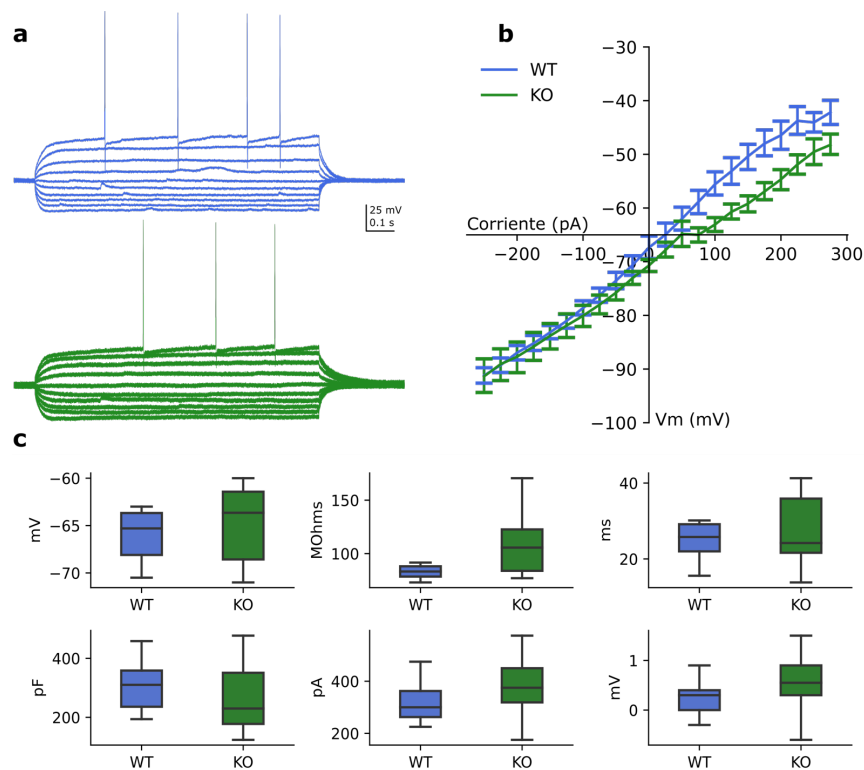


Fig. 14 Características intrínsecas de las neuronas piramidales de CA3

a) Trazos representativos de las respuestas en el potencial de membrana a pulsos crecientes de corriente de neuronas piramidales de CA3 en un ratón WT (*arriba*) y un ratón KO (*abajo*). b) Curva I/V (corriente/voltaje) de ambos grupos que muestra un perfil semejante de respuesta. c) Las neuronas piramidales de CA3 de ambos grupos no muestran diferencias en su potencial de membrana en reposo (*arriba izq.*), resistencia de entrada (*arriba centro*), constante de tiempo (*arriba der.*), capacitancia celular (*abajo izq.*), reobase (*abajo centro*) ni sag (*abajo der.*).



Como se aprecia en la Fig. 14a-c, no se encontraron cambios en las propiedades intrínsecas de las neuronas de CA3 incluyendo: potencial en reposo, resistencia de entrada, constante de membrana, capacitancia total, reobase y sag.

Sin embargo, las corrientes post-sinápticas mostraron una importante disminución en su amplitud en el grupo KO (Mann-Whitney test;  $U = 81$ ,  $p = 0.009$ , WT = 9 células/5858 sPSCs; KO = 11 células/5457 sPSCs, Fig. 15c), sin impacto en su frecuencia (T-Student;  $t_{16.74} = 0.75$ ,  $p = 0.46$ ; Fig. 15c). Igualmente, esta disminución en la amplitud no se acompaña de cambios en el tiempo de ascenso (T-Student;  $t_{43} = -1.75$ ,  $p = 0.10$ , Fig. 15d) o la constante de decaimiento de las sPSCs (T-Student;  $t_{43} = -1.58$ ,  $p = 0.13$ , Fig. 15d). Estos cambios son consistentes con los reportes previos en otras regiones (Hoshiko et al., 2012; Paolicelli et al., 2011; Zhan et al., 2014).

Debido a la heterogeneidad estructural y fisiológica entre las aferencias de CA3, se realizaron curvas de entrada/salida para la MF y la red AC y se encontró un impacto diferencial en estas sinapsis (Fig. 15).

Mientras que en la red AC no se determinaron diferencias entre los grupos a ninguna magnitud de corriente (ANOVA de modelo mixto, genotipo x corriente: [ $F(14,196) = 1.46$ ,  $p = 0.13$ ], WT = 7, KO = 8; Fig. 15e), la MF mostró una clara limitación en la amplitud del potencial evocado en el grupo KO (ANOVA de modelo mixto; genotipo x corriente: [ $F(15,195) = 3.23$ ,  $p < 0.001$ ], WT = 8, KO = 6, Fig. 15e). Esta disminución en la fuerza de la MF es evidente en la mitad superior del rango de estimulación (T-Student múltiple con corrección de Holm;  $50\mu\text{A}$ :  $t_{12} = -1.74$ ,  $p = 0.05$ ;  $55\mu\text{A}$ :  $t_{12} = -1.74$ ,  $p = 0.05$ ;  $60\mu\text{A}$ :  $t_{12} = -1.92$ ,  $p = 0.04$ ;  $65\mu\text{A}$ :  $t_{12} = -2.42$ ,  $p = 0.02$ ;  $70\mu\text{A}$ :  $t_{12} = -2.11$ ,  $p = 0.03$ ; WT = 9, KO = 6, Fig. 15e).

Para ninguna de las dos aferencias estudiadas se encontraron modificaciones en el índice de pulso pareado (PPR, por sus siglas en inglés) (AC: T-Student;  $t_{9.73} = 1.32$ ,  $p = 0.11$ , MF: T-Student;  $t_{7.21} = 0.87$ ,  $p = 0.21$ ; Fig. 15f).

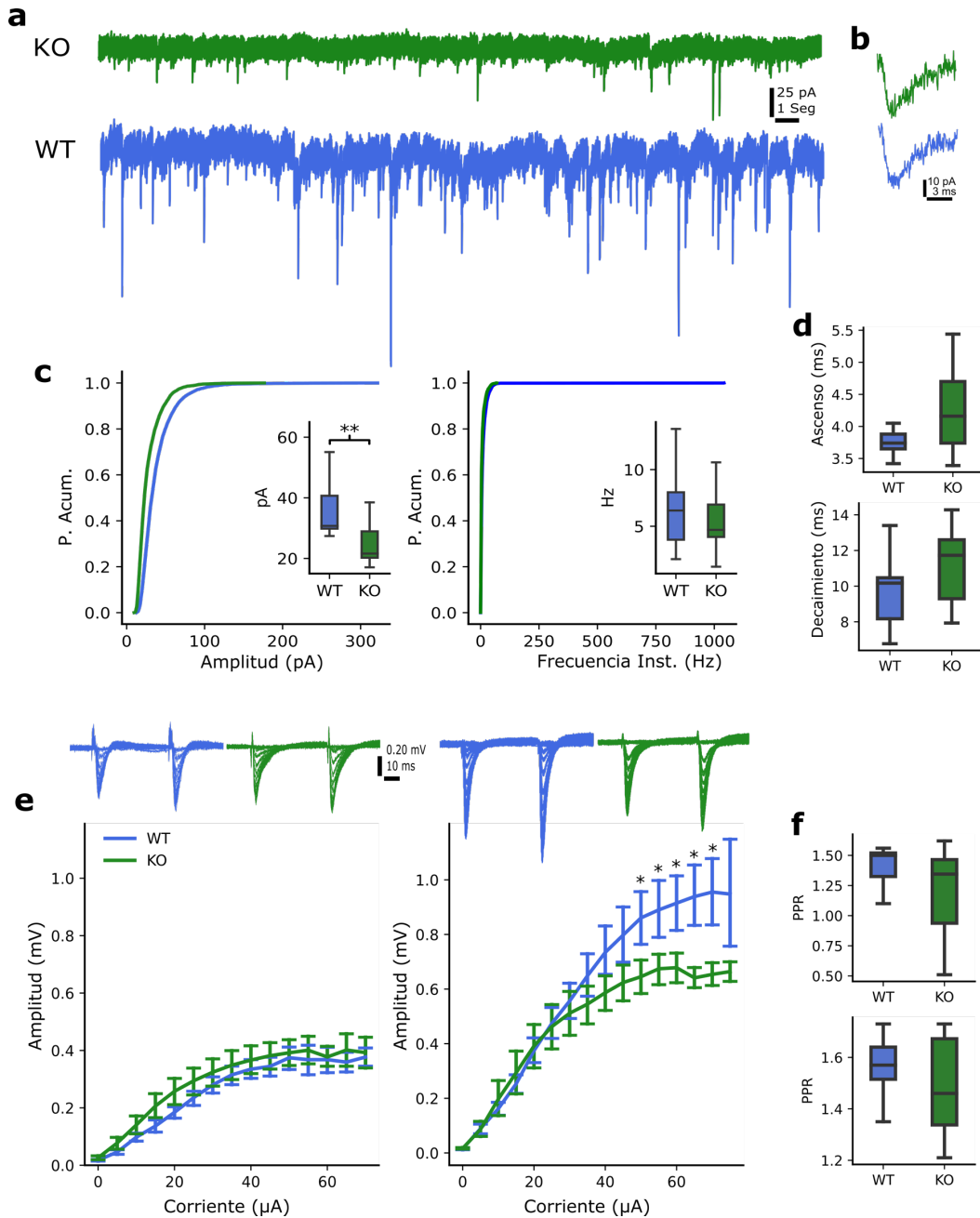


Fig. 15 La disfunción sináptica en CA3 afecta principalmente a la MF

a) Trazos representativos de corrientes post-sinápticas excitadoras espontáneas (sPSC) en una neurona KO (arriba) y una neurona WT (abajo). b) Trazos representativos de sPSC aislados de neuronas KO (arriba) y neuronas WT (abajo). c) *Izq.* Distribuciones de probabilidad acumulada y comparación entre grupos donde se encontró una amplitud disminuida en el grupo KO (Mann-Whitney test;  $U = 81$ ,  $p = 0.009$ , WT = 9 células/5858 sPSCs; KO = 11 células/5457 sPSCs). *Der.* Distribuciones de probabilidad acumulada y comparación entre grupos de la frecuencia instantánea de las sPSCs sin alteraciones. d) El cambio en amplitud no se acompaña de cambios en el tiempo de ascenso (arriba) ni en la constante de decaimiento de los sPSC (abajo). e) Trazos representativos (arriba) y curvas de entrada/salida (salida) de potenciales sinápticos evocados en las vías AC (*izq.*) y MF (*der.*). Mientras que la AC no mostró cambios en ninguna amplitud de estimulación, la MF de los animales KO presentó amplitudes disminuidas en el rango medio-alto de estimulación; (ANOVA de modelo mixto, genotipo x corriente: [ $F(15,195) = 3.23$ ,  $p < 0.001$ ], *t-Student*;  $50\mu\text{A}$ :  $t_{12} = -1.74$ ,  $p = 0.05$ ;  $55\mu\text{A}$ :  $t_{12} = -1.74$ ,  $p = 0.05$ ;  $60\mu\text{A}$ :  $t_{12} = -1.92$ ,  $p = 0.04$ ;  $65\mu\text{A}$ :  $t_{12} = -2.42$ ,  $p = 0.02$ ;  $70\mu\text{A}$ :  $t_{12} = -2.11$ ,  $p = 0.03$ ; WT = 9, KO = 6). f) Ninguna de las aferencias estudiadas mostró cambios en el índice de pulso pareado (AC arriba, MF abajo).

## Impacto en la conectividad funcional del microcircuito de CA3 de la interrupción de la vía de la fractaquina

Dada la reorganización de la actividad poblacional de CA3 observada en la etapa neonatal y las alteraciones en la neurotransmisión en el adulto carente del receptor a fractaquina, es posible que el microcircuito de CA3 del ratón KO adulto presente características fundamentalmente distintas a las del genotipo WT. Para esclarecer esto, se realizaron registros con matrices de multi-electrodos y se analizó la actividad coordinada de decenas de neuronas simultáneamente para estimar su conectividad funcional y potenciales modificaciones a la topología de la red (Feldt et al., 2011; Friston, 2011).

Siguiendo el pre-procesamiento para la identificación de espigas y el aislamiento de unidades detallado en la metodología se obtuvieron un total de 1333 unidades; 761 WT y 572 KO.

La estabilidad y reproducibilidad de los registros fue evaluada determinando el número de unidades por experimento, el número de canales activos, el número de unidades por canal y la frecuencia de disparo (Fig. 16a-c). En ninguno de estos parámetros se encontró diferencias significativas entre grupos, por el contrario, ambos genotipos presentan una estrecha semejanza en

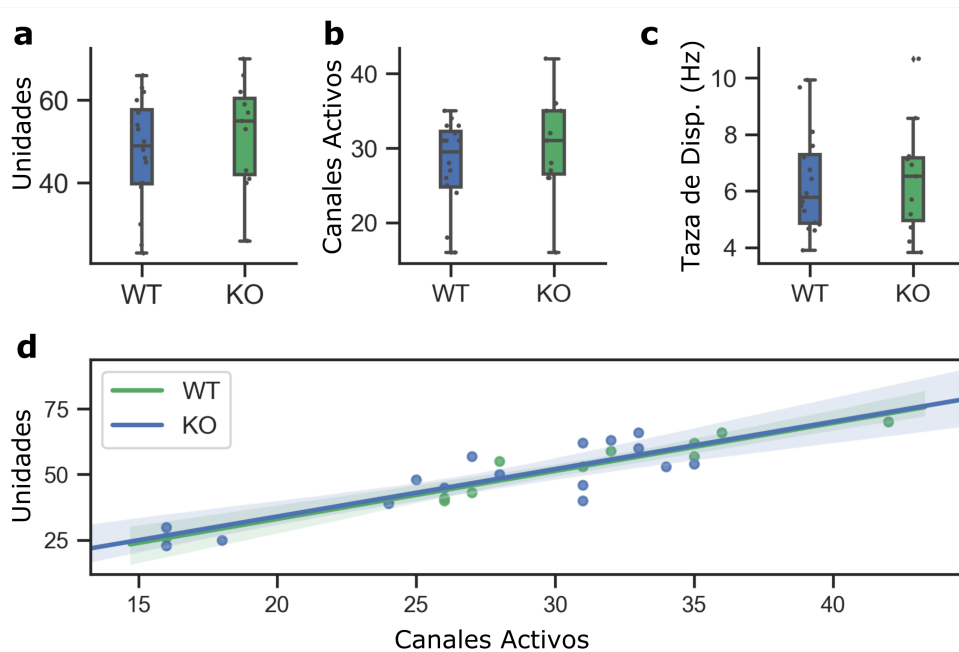


Fig. 16 Características generales de los registros en MEAs

Los registros de actividad espontánea en rebanadas HEC de ambos genotipos tiene características similares y de manera consistente se obtuvieron un número equivalente de unidades por registro (a), canales activos (b) y tasa de disparo (c). La relación de unidades aisladas por número de canales activos es lineal e idéntica para ambos grupos (d).

cuanto a los parámetros básicos de actividad, lo que se refleja en una tasa constante de unidades aisladas por canal activo (Fig. 16d).

La aproximación metodológica para la identificación y extracción de las correlaciones significativas entre las neuronas de CA3 descrita previamente capturó fielmente las principales características de la conectividad efectiva de estas neuronas (potencia sináptica) estimada mediante registros intracelulares de neuronas conectadas monosinápticamente (Ikegaya et al., 2013) (Fig. 17a-c), consistiendo en una distribución sesgada de cola larga donde la mayoría de las conexiones son débiles y a pesar de su gran número no aportan una fracción equivalente a la fuerza total de la

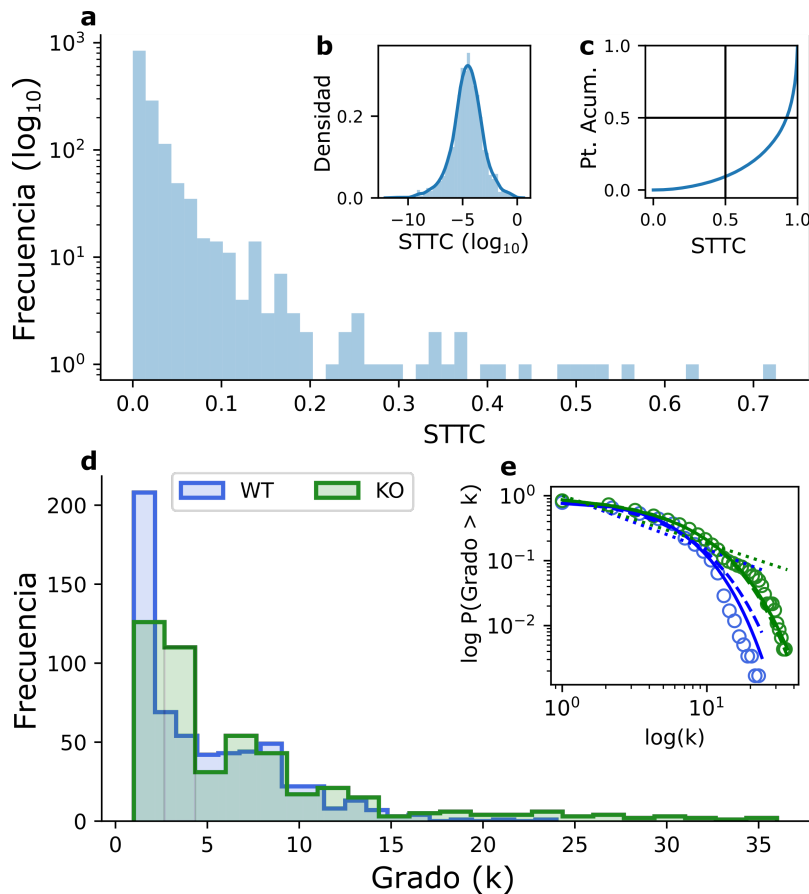


Fig. 17 Características generales y topología de la red de CA3

a) Distribución de los coeficientes de correlación (STTC) de un registro representativo de CA3. b) Los mismos valores en una escala semi-logarítmica aproxima una distribución normal, lo que sugiere a una distribución log-normal de los datos similar a la distribución reportada para los pesos sinápticos en registro pareados (Ikegaya et al., 2013). c) Curva de Lorenz que muestra la aportación de la fracción de valores de STTC (en orden creciente) a la potencia acumulada (Pt. Acum.) de conectividad en la red. Nótese la aportación dispar de los valores pequeños de la distribución a pesar su gran frecuencia y aportación (>50% de la fuerza total) de una minoría de conexiones (~20%). d) Distribución de los grados de los nodos en las redes WT y KO que muestra una larga cola indicando la presencia de nodos de gran conectividad. e) Mismas distribuciones en escala logarítmica con el mejor ajuste de una función de ley potencia (línea punteada), exponencial (línea discontinua) y ley potencia exponencialmente trunca (línea continua). El mejor ajuste para ambos grupos es una ley potencia exponencialmente trunca (ver Tabla 1).

red, al contrario, la mayoría de la fuerza en la red la aportan una minoría de las conexiones (~20%) (Fig. 17c).

A partir de estas correlaciones significativas se construyeron grafos para cada registro y se caracterizó la topología de cada red (Fig. 17).

El mejor ajuste para la distribución de grados de los nodos para ambos genotipos es una ley potencia truncada exponencialmente (Fig. 17d-e, Tabla 1). Esta distribución es consistente con una topología de escala amplia (Fornito et al., 2016) con características de mundo pequeño en ambos grupos (Coeficiente Sigma:  $1.61 \pm 0.12$  para WT y  $1.47 \pm 0.09$  para KO) (Humphries et al., 2006; Humphries & Gurney, 2008). Ambas características son consistentes con previos reportes sobre la topología de este circuito (Guzman et al., 2016; Li et al., 2010) y prevalecen en el grupo KO a pesar de los cambios encontrados en el desarrollo temprano del circuito y las alteraciones sinápticas, indicando que son características fundamentales y robustas del microcircuito de CA3.

**Tabla 1 Modelos ajustados a las distribuciones de grados**

<b>Genotipo</b>	<b>Modelo</b>	<b>S (Error estándar)</b>
<b>WT</b>	Ley Potencia	0.105
<b>WT</b>	Exponencial	0.029
<b>WT</b>	Ley potencia exp. trunca	0.018
<b>KO</b>	Ley Potencia	0.520
<b>KO</b>	Exponencial	0.012
<b>KO</b>	Ley potencia exp. trunca	0.011

La topología de escala amplia es, en general, similar a la de escala libre pues ambas son constituidas por nodos cuyo número de conexiones componen una distribución sesgada de cola larga, demostrando la presencia de nodos con una conectividad muy superior a la mayoría. Sin embargo, la topología de escala amplia también indica constricciones en el crecimiento o mantenimiento de la red (e.g. espacio, costo metabólico, filtrado de información) (Amaral et al., 2000; Fornito et al., 2016; Mossa et al., 2002).

A pesar de que la topología general de las redes está conservada, la fuerza de los enlaces entre las neuronas en los ratones KO se encontró disminuida (Mann-Whitney-Wilcoxon;  $U = 1191027$ ,  $p = 0.001$ , WT = 15, KO = 11; Fig. 18a-b), un hallazgo en concordancia con las alteraciones en la transmisión sináptica documentadas en los registros de *patch-clamp* y los potenciales de campo (Fig. 10). Adicionalmente, mientras que las redes WT están fragmentadas en varios componentes

conectados, las KO tienden a estar constituidas por un solo componente gigante que conecta todos o la mayoría de los nodos (Prueba exacta de Fisher,  $p = 0.03$ ; Fig. 18c-e).

En general, los cambios en la estructura de las redes KO junto a las alteraciones sinápticas y el remodelado estructural de la MF indican que el microcircuito de CA3 en los ratones KO sufre una reconfiguración consistente con falta de refinamiento, posiblemente secundaria a una poda sináptica deficiente (Paolicelli et al., 2011) en conjunto con una inapropiada maduración (Zhan et al., 2014) y escalamiento sináptico resultando en un acoplamiento débil y difuso entre las neuronas de CA3. Las consecuencias cognitivas de estas alteraciones probablemente involucren un amplio rango de funciones directamente asociadas con el procesamiento de información en CA3 e incluso la función global de la formación hipocampal.

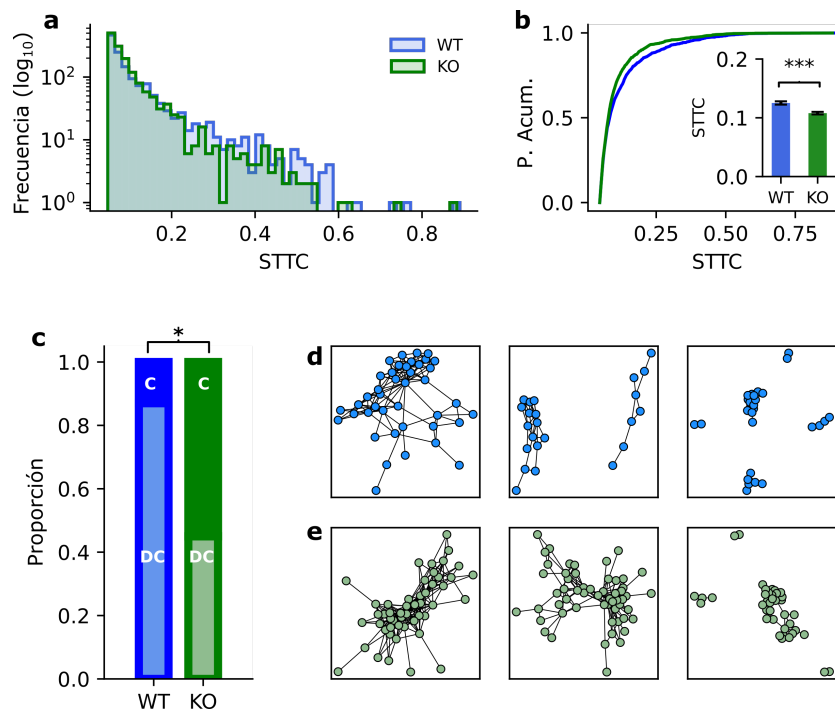


Fig. 18 Las redes KO presentan una conectividad débil y difusa

a) Distribución de los STTC en ambos grupos, nótese la separación entre distribuciones a partir de  $\sim 0.25$  STTC. b) Distribuciones de probabilidad acumulada y comparación entre grupos donde se aprecia la disminución en la fuerza general de las conexiones en el grupo KO (Mann-Whitney-Wilcoxon;  $U = 1191027$ ,  $p = 0.001$ , WT = 15, KO = 11). c) Comparación de la proporción de redes completamente conectadas (C) y desconectadas (DC) donde se observa el incremento en el grupo KO de redes de un solo componente gigante (Prueba exacta de Fisher,  $p = 0.03$ ). d-e) Grafos representativos de los grupos WT (d) y KO (e).

## **Impacto en las funciones cognitivas asociadas a la formación hipocampal**

Las alteraciones morfológicas y fisiológicas documentadas en el hipocampo de animales carentes del receptor a fractalquina, tanto en el desarrollo como en la adultez, involucran cambios en estructuras sub-celulares que comprometen la transmisión de información en aferencias principales del hipocampo, cambiando en última instancia la dinámica de la población neuronal del microcircuito y el procesamiento de información.

Esto sugiere un amplio impacto en las funciones cognitivas dependientes del hipocampo y en particular de la región CA3, por lo que se realizó una fenotipificación conductual exhaustiva con el objetivo de determinar el rango y el grado de afectación en estas funciones, incluyendo: conductas innatas (excavación), emotivas (i.e. respuesta al estrés: campo abierto y laberinto en cruz elevado), interacción social (prueba de tres cámaras) y navegación espacial (laberinto de Hebb-Williams modificado).

### **La depleción del receptor de fractalquina induce un fenotipo con rasgos de ansiedad**

Con el objetivo de evaluar potenciales cambios en la respuesta al estrés en el ratón KO, se realizaron dos pruebas de ansiedad no condicionada, el campo abierto y el laberinto en cruz elevado (Carola et al., 2002; File et al., 2004; Walf & Frye, 2007).

Primeramente, los resultados en el campo abierto mostraron un claro cambio en la exploración del grupo KO con una marcada reducción de la distancia total recorrida (T-Student;  $t_{31} = 2.87$ ,  $p = 0.007$ , WT = 16, KO = 16; Fig. 19a), secundaria tanto a un incremento en el tiempo total de inmovilidad (Mann-Whitney-Wilcoxon;  $U = 73$ ,  $p = 0.03$ ; Fig. 19c) como a una velocidad de deambulación más lenta en promedio (T-Student;  $t_{31} = 2.99$ ,  $p = 0.005$ , Fig. 19d) y velocidad máxima (T-Student;  $t_{31} = 3.17$ ,  $p = 0.003$ , Fig. 17e). Adicionalmente, el grupo KO mostró una tendencia a un número menor de transiciones entre la periferia y el centro de la arena (T-Student;  $t_{31} = 1.9$ ,  $p = 0.06$ ; Fig. 19b).

Cambios en el mismo sentido fueron encontrados en la prueba del laberinto elevado donde el grupo KO mostró la misma reducción en la distancia total explorada (Mann-Whitney test;  $U = 205$ ,  $p = 0.003$ ; Fig. 19h) acompañada de una clara evitación a los brazos abiertos comparado con el

grupo control (WT), (Mann-Whitney-Wilcoxon;  $U = 208$ ,  $p = 0.003$ ; Fig. 19j). En conjunto estos resultados sugieren cambios conductuales consistentes con una respuesta exacerbada al estrés.

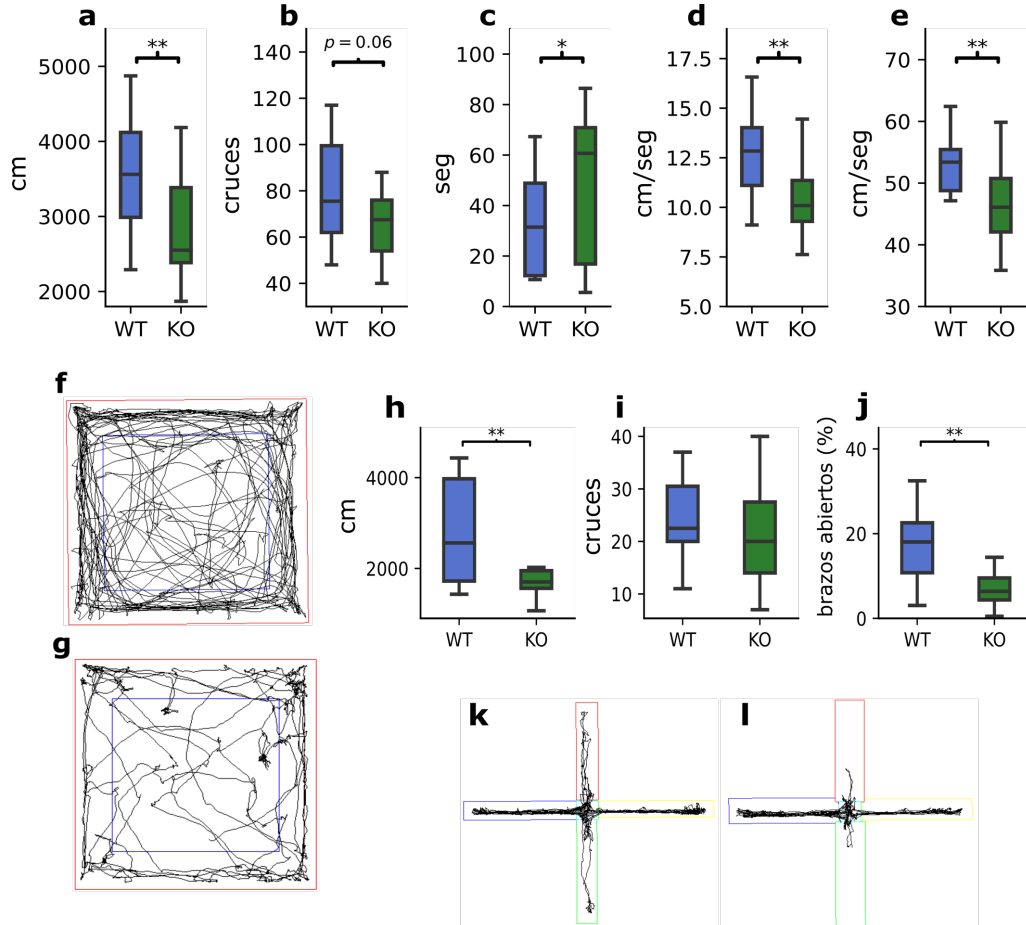


Fig. 19 La depleción del *Cx3cr1* induce un fenotipo con rasgos de ansiedad

a-g) Resultados y trayectorias representativas de la prueba de campo abierto indican un fenotipo ansioso en el grupo KO, evidenciado por (a) una disminución en la distancia total explorada (T-Student;  $t_{31} = 2.87$ ,  $p = 0.007$ , WT = 16, KO = 16), (b) una tendencia a menor número de cruces entre la periferia y el centro de la arena (T-Student;  $t_{31} = 1.9$ ,  $p = 0.06$ ), (c) un incremento en el tiempo de inmovilidad (Mann-Whitney-Wilcoxon;  $U = 73$ ,  $p = 0.03$ ), y una reducción en la velocidad promedio (d) (T-Student;  $t_{31} = 2.99$ ,  $p = 0.005$ ) y velocidad máxima de deambulación (e) (T-Student;  $t_{31} = 3.17$ ,  $p = 0.003$ ). f-g) Trayectorias representativas en el campo abierto de un animal WT y KO, respectivamente. h-l) Resultados y trayectorias representativas en la prueba del laberinto en cruz elevado son consistentes con los resultados del campo abierto y mostraron la misma reducción en la exploración y una marcada evitación de los brazos abiertos. h) Distancia total recorrida (Mann-Whitney-Wilcoxon;  $U = 205$ ,  $p = 0.003$ ), i) número de cruces por el centro del laberinto. j) Porcentaje de tiempo en los brazos abiertos (Mann-Whitney-Wilcoxon;  $U = 208$ ,  $p = 0.003$ ). k-l) Trayectorias representativas en el laberinto en cruz elevado de un animal WT y KO, respectivamente.



## La depleción del receptor a fractalquina induce alteraciones de las conductas innatas, pero no sociales.

La conducta de excavación (*burrowing*) es una conducta innata en muchas especies de roedores incluyendo al ratón (Deacon, 2012). La excavación tiene como objetivo proporcionar refugio, cubriendo una necesidad básica del organismo, y es fácilmente evocada en ratones (Jirkof, 2014). Se ha sugerido que esta clase de conductas puede ser considerada el equivalente a las “actividades de la vida cotidiana” en los humanos como el cuidado personal y en modelos animales es sensible a lesiones hipocampales y de la corteza prefrontal, así como a enfermedades infecciosas y neurodegenerativas (Deacon, 2006; Deacon et al., 2002, 2003).

Los resultados de esta prueba muestran que el grupo KO excavó significativamente menos que el grupo WT (Mann-Whitney-Wilcoxon;  $U = 1264$ ,  $p = 0.03$ , WT = 22, KO = 31; Fig. 20a). Esto puede ser interpretado como un signo de malestar general en el sujeto (Jirkof, 2014), secundario probablemente a un estado inflamatorio. Es también consistente con lesiones hipocampales y de la corteza prefrontal (Deacon, 2006), así como con una alteración en la comunicación entre estas estructuras (Paolicelli et al., 2011; Zhan et al., 2014).

Por otra parte, el trabajo de Zhan et al. 2014 reportó una disminución en la interacción social de ratones con una mutación similar a la estudiada aquí. Esta observación, hasta mi conocimiento, no ha sido replicada independientemente y es de gran importancia tanto en la evaluación de la función hipocampal como en el potencial translacional de este modelo. Por lo que se realizó la prueba

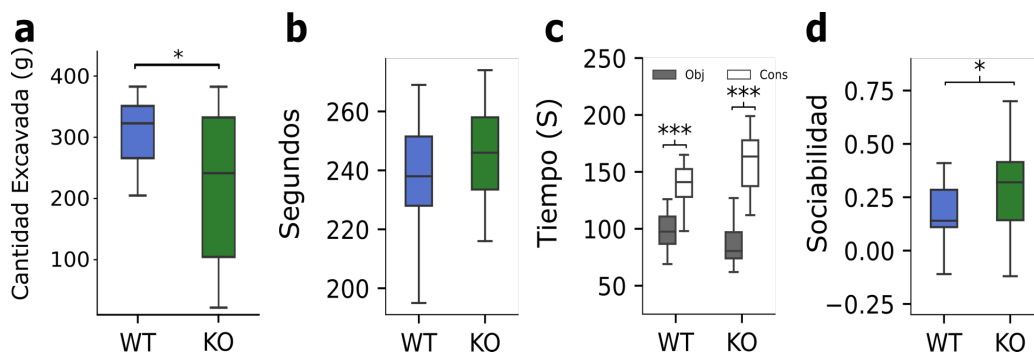


Fig. 20 La depleción del *Cx3cr1* afecta la excavación, pero no la interacción social

a) Cantidad de gravilla excavada en 12hrs, el grupo KO mostró una disminución significativa (Mann-Whitney-Wilcoxon;  $U = 1264$ ,  $p = 0.03$ , WT = 22, KO = 31). b-d) Resultados de la prueba de interacción social de tres cámaras. b) Ambos grupos mantuvieron similares tiempos totales de exploración. c) Ambos genotipos muestran una clara preferencia por explorar al sujeto congénere que al objeto inanimado (ANOVA, de dos vías; genotipo x lado,  $[F(1, 5545) = 13.62, p = 0.0004]$ , *post-hoc* congénere vs objeto: KO (T-Student;  $t_{42} = 11.05, p < 0.001$ ), WT (T-Student;  $t_{38} = 6.96, p < 0.001$ ). d) El grupo KO mostró un índice de sociabilidad aumentado (Mann-Whitney-Wilcoxon;  $U = 174.5, p = 0.02$ ).

de interacción social de tres cámaras con el objetivo de evaluar la reproducibilidad de este resultado (Moy et al., 2004).

Ambos grupos exploraron las cámaras con estímulo (objeto vs congénere) durante períodos similares de tiempo (tiempo total de exploración) (T-Student;  $t_{41} = -1.42$ ,  $p = 0.16$ , WT = 20, KO = 22, Fig. 20b). Sin embargo, y contrario a lo esperado, tanto el grupo KO (T-Student;  $t_{42} = 11.05$ ,  $p < 0.001$ , Fig. 20c) como el WT (T-Student;  $t_{38} = 6.96$ ,  $p < 0.001$ , Fig. 20c) mostraron una clara preferencia por explorar al sujeto congénere en comparación con el objeto inanimado. Esta diferencia en el tiempo de exploración de cada cámara expresada como un índice de sociabilidad (la diferencia entre el tiempo de exploración de cada cámara normalizada entre el tiempo total de exploración; ver metodología) reflejó un incremento en la sociabilidad del grupo KO en comparación con el WT (Mann-Whitney-Wilcoxon;  $U = 174.5$ ,  $p = 0.02$ , Fig. 20d), en contraste con el reporte mencionado (Y. Zhan et al., 2014b).

### **Los ratones *Cx3cr1*<sup>-/-</sup> muestran un déficit en la codificación de información espacial novedosa**

Reportes previos han encontrado deterioros en la recuperación de memoria contextual y espacial en animales carentes del receptor a fractalquina (Rogers et al., 2011).

Dado que los resultados histológicos y electrofisiológicos indican que la vía de la MF se encuentra especialmente impactada, la cual está más relacionada con la codificación temprana de información novedosa (Hagena & Manahan-Vaughan, 2011; Jerman et al., 2006; I. Lee & Kesner, 2004a), se evaluó el desempeño en el laberinto de Hebb-Williams modificado, en el cual el sujeto debe explorar y resolver un problema de navegación espacial y usar la información codificada para mejorar su desempeño posteriormente (Kesner & Rolls, 2015; I. Lee & Kesner, 2004a).

Utilizando el problema número 4 del laberinto de Hebb-Williams, se encontró que el grupo KO realizó un desempeño inferior al grupo WT, cometiendo un mayor número de errores (ANOVA de modelo mixto, genotipo:  $F(1, 44) = 65.32$ ,  $p = 0.001$ , WT = 24, KO = 22, Fig. 21a) y registrando latencias más prolongadas (ANOVA de modelo mixto, genotipo:  $F(1, 44) = 10.71$ ,  $p = 0.002$ , Fig. 21b) que el grupo WT. Cabe destacar que el incremento de errores del grupo KO se restringe al primer día de pruebas (D1\_1, T-Student;  $t_{208} = 2.73$ ,  $p = 0.04$ , Fig. 21a), al igual que para la latencia (D1\_1;  $t_{217} = 2.43$ ,  $p = 0.06$ , D1\_2;  $t_{157} = 2.77$ ,  $p = 0.03$ ; Fig. 21b). Adicionalmente, la latencia para resolver el laberinto y el número de errores muestran una relación lineal (Fig. 21c-d).

Estos resultados son consistentes con un déficit primario en la rápida codificación de información espacial novedosa, una función putativa de la MF y, por lo tanto, en concordancia con la evidencia histológica y electrofisiológica de daño en esta vía primaria del hipocampo (Hagena & Manahan-Vaughan, 2011; Kesner, 2007; Song et al., 2018).

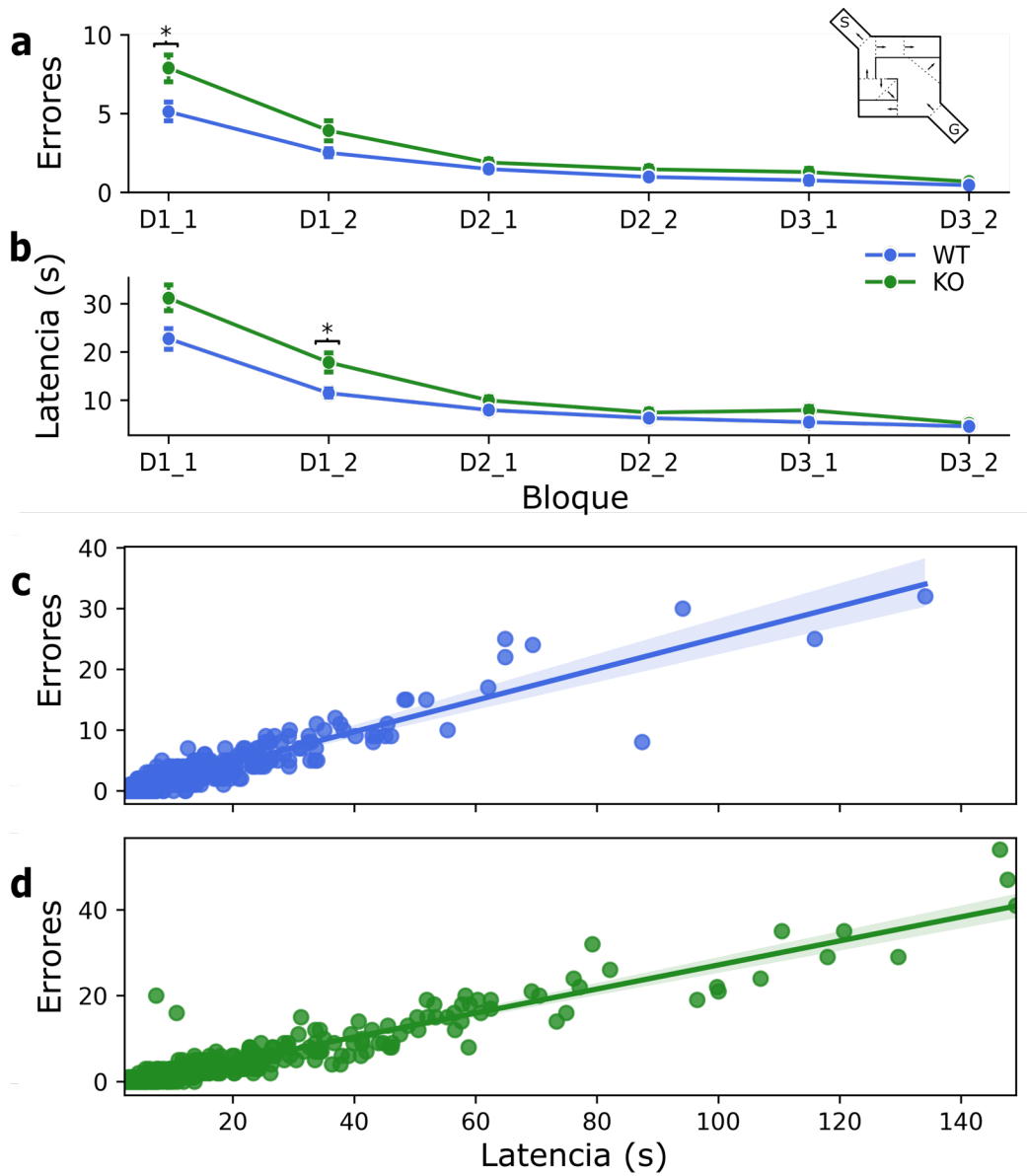


Fig. 21 Déficit en la codificación de información espacial novedosa en el grupo KO

a-b) Resultados de las sesiones de prueba en el laberinto de Hebb-Williams modificado. a) Errores promedio por bloque, el grupo KO cometió más errores durante el primer día de pruebas comparado con el WT (ANOVA de modelo mixto, genotipo:  $F(1, 44) = 65.32, p = 0.001$ , WT = 24, KO = 22, bloque [ $F(5, 220) = 80.30, p < 0.001$ ], genotipo x bloque [ $F(5, 220) = 3.75, p = 0.002$ ]. *Inserto*: Diseño del problema 4, las líneas punteadas indican una potencial zona de error y las flechas la dirección del movimiento. b) Cuantificación de la latencia de resolución del laberinto por bloque, al igual que en los errores el grupo KO, mostró latencias más prolongadas durante el primer día de pruebas (ANOVA de modelo mixto, genotipo: [ $F(1, 44) = 10.71, p = 0.002$ ], bloque: [ $F(5, 220) = 102.48, p < 0.001$ ], genotipo x bloque: [ $F(5, 220) = 3.62, p = 0.003$ ]. El déficit observado en el grupo KO, tanto en errores como en latencias se restringe al primer día de pruebas, lo que sugiere un problema primario de codificación temprana de información novedosa (errores: múltiples T-Students con corrección de Holm; D1\_1:  $t_{208} = 2.73, p = 0.04$ ; latencia: D1\_1:  $t_{208} = 2.43, p = 0.06$ , D1\_2:  $t_{208} = 2.77, p = 0.03$ ). c-d) Los errores cometidos y la latencia para resolver el laberinto muestran una correlación lineal positiva en ambos grupos.

## Discusión

La interacción entre las neuronas y la microglia a través del eje de la fractalquina ha sido implicado en diversos fenómenos del neurodesarrollo y la plasticidad cerebral dependiente de la experiencia (Arnoux & Audinat, 2015b; Sierra et al., 2014). La interrupción de esta vía, por ejemplo, con la depleción del receptor a fractalquina, produce un gran rango de alteraciones en el cerebro en desarrollo y en la adultez, como apoptosis neuronal (Ueno et al., 2013), maduración sináptica inapropiada y poda sináptica alterada (Hoshiko et al., 2012; Paolicelli et al., 2011; Zhan et al., 2014), así como deficiente capacidad migratoria de la microglia (Hoshiko et al., 2012; Paolicelli et al., 2011).

Las implicaciones fisiológicas de esta vía de comunicación no se restringen al desarrollo. En el cerebro adulto, la fractalquina continua siendo un factor regulador de la neurogénesis hipocampal (Bachstetter et al., 2011) y es determinante para la apropiada integración funcional de las neuronas generadas en la adultez (Bolós et al., 2018). Adicionalmente, la fractalquina modula la transmisión y la plasticidad sinápticas (Maggi et al., 2009; Ragozzino, et al., 2006).

En conjunto, estas alteraciones se han asociado a diversos déficits cognitivos y conductuales incluyendo memoria contextual y el desempeño en tareas motoras (Rogers et al., 2011), alteraciones en la interacción social (Zhan et al., 2014b) y trastornos del estado de ánimo (Bolós et al., 2018), que sugieren que este tipo de manipulaciones podrían proveer de modelos novedosos y útiles en la investigación de patologías neuropsiquiátricas. El proyecto que engloba esta tesis ha explorado nuevas facetas cognitivas y conductuales, mecanismos fisiológicos y sinápticos, y complementado el rango de análisis del fenotipo de este modelo.

Puntualmente, se provee una robusta caracterización conductual en una cohorte compuesta por sujetos de ambos sexos con delección del receptor a fractalquina (*Cx3cr1<sup>-/-</sup>*), una variable generalmente pasada por alto en la mayoría de los reportes previos (excepto por Bolós et al. 2018) y se extiende el rango de funciones cognitivas alteradas en este modelo con una aproximación con potencial traslacional; explorando su impacto en el equivalente a “actividades de la vida cotidiana” en el roedor (i.e. excavación), sugiriendo un impacto en el estado general del sujeto (Deacon, 2012; Deacon, 2006; Jirkof, 2014), que es consistente con hallazgos previos que indican que la excavación es afectada por condiciones inflamatorias y en cercana relación con el estado fisiológico de la microglia (Deacon, 2006; Hart et al., 2012; Püntener et al., 2012), y la codificación de información espacial novedosa asociada a la resolución de problemas en un modelo con alta replicación trans-especie: el laberinto de Hebb-Williams (Boutet et al., 2018; MacLeod et al., 2010; Shore et al., 2001).

El protocolo utilizado evidenció un claro impedimento de los ratones *Cx3cr1<sup>-/-</sup>* para la resolución de problemas de navegación espacial, como es el caso observado en otros modelos de

lesiones hipocampales o de las aferencias principales del hipocampo (Glasier et al., 1995; I. Lee & Kesner, 2004b; Traissard et al., 2007), así como en modelos de alteraciones gliales acompañados de estados inflamatorios (Boehm et al., 1996). Dado que el incremento en los errores cometidos y la latencia para la resolución del laberinto están ampliamente restringidos al primer día de pruebas, cuando el sujeto es presentado con un escenario espacial desconocido, es razonable intuir un déficit primario en la codificación temprana de información espacial novedosa, una función putativa de la región CA3 del hipocampo (Kesner, 2007, 2013; Kesner & Rolls, 2015). Es importante recalcar que los sujetos con depleción del *Cx3cr1* mejoran su desempeño con el entrenamiento y logran empatar a sus contrapartes silvestres en los días subsecuentes de la prueba, lo que indica una disfunción cognitiva moderada susceptible de mejorar con intervención apropiada (e.g. entrenamiento en una tarea apropiada), como es el caso de otras condiciones incluyendo autoinmunidad (Boehm et al., 1996), lesiones (Glasier et al., 1995; Traissard et al., 2007) y deficiencia mental de origen congénito (Seese et al., 2014). Dado que se ha reportado una disfunción sináptica en la región CA1 del hipocampo en ratones carentes del *Cx3cr1* (Zhan et al., 2014) así como un impedimento en la potenciación a largo plazo de la colateral de Schaffer, la principal aferencia de CA1, asociado a una carencia en la recuperación de memoria contextual y espacial (Rogers et al., 2011), podría esperarse un impacto en el desempeño en las fases posteriores de la tarea, lo cual no es apoyado por los datos. Sin embargo, en las fases posteriores de la tarea el sujeto no sólo se ha familiarizado con el espacio, sino además ha desarrollado una estrategia para la resolución del laberinto, por lo que el desempeño en esta etapa podría no depender exclusivamente de la recuperación de la memoria espacial dependiente de CA1 sino además estar apoyado por una estrategia procedimental (*praxic*) (Redish, 1999; Regier et al., 2015).

Así mismo, estos resultados apoyan la creciente evidencia de alteraciones conductuales en el adulto relacionadas a un fenotipo con rasgos de ansiedad, un factor de riesgo importante para el desarrollo de desórdenes de ansiedad y depresión, y estrechamente relacionado con el estado inflamatorio de la microglia (Rooney et al., 2020; Wang et al., 2018), y en correlación con la hiperreactividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal reportado previamente en el ratón *Cx3cr1<sup>-/-</sup>* (Winkler et al., 2017).

Sin embargo, no encontramos signos de alteraciones en la interacción social como previamente se ha reportado (Zhan et al., 2014). Esta discrepancia podría deberse principalmente a las cepas específicas de ratón utilizadas. Mientras que en Zhan et al. 2014 se utilizaron ratones resultado de cruzas entre ratones *Cx3cr1<sup>KO</sup>* (sin especificar cepa) y ratones *Thy1-GFP* donados por otros laboratorios, en el presente trabajo se utilizó exclusivamente con ratones *Cx3cr1-Cre* provenientes del laboratorio Jacskon y cruzados con ratones C57BL/6 de la colonia “silvestre” del bioterio del instituto de neurobiología. Otras diferencias en los protocolos específicos utilizados y las

condiciones experimentales, así como al manejo mismo de los animales y a la aplicación de múltiples tareas conductuales en los mismos sujetos podrían añadir a estos resultados divergentes (Ennaceur, 2014). En el presente trabajo, en gran medida se procuró el uso de distintos grupos de sujetos experimentales para la realización de las tareas conductuales. Especialmente, se cuidó que las tareas relacionadas a ansiedad (campo abierto y laberinto en cruz elevado) e interacción social fueran administradas en sujetos intactos, previa amplia habituación al experimentador.

Este repertorio de alteraciones conductuales tiene como posibles sustratos las alteraciones en la transmisión sináptica que el presente trabajo y otros han documentado (Hoshiko et al., 2012; Paolicelli et al., 2011; Zhan et al., 2014), y sus consecuencias en los circuitos involucrados. Específicamente, los resultados presentados muestran una disminución en las corrientes post-sinápticas de CA3, con un especial impacto en la aferencia de la fibra musgosa, que modifica la configuración global del circuito. Efectos que podrían ser rastreados hasta un defecto primario en el desarrollo temprano de los circuitos neuronales.

La escala y rango de la disfunción sináptica en CA3, así como las consecuencias cognitivas encontradas es consistente con previas observaciones en modelos animales diversos, incluyendo neurodegeneración y reparación proteica alterada (Ikegaya et al., 2001; Viana da Silva et al., 2019). Como se mencionó, esta disfunción afecta principalmente a la fibra musgosa, limitando su rango de eficacia (i.e. menor potencia máxima). Esta modificación se encuentra acompañada de un incremento en el área de distribución de la fibra musgosa que, sin embargo, no muestra un patrón aberrante como en otros modelos (Buckmaster, 2012) y es más sugestivo de una ramificación compensatoria a una falla en el establecimiento de contactos sinápticos con los blancos de la fibra musgosa a falta de la función de consolidación sináptica por medio de la microglia (Liu et al., 2018).

En este sentido, los resultados no muestran alteraciones en el número o distribución de las espinas dendríticas, ya sea distales o las excrecencias espinosas de las dendritas apicales proximales, pero sí se encuentran hallazgos en la morfología y número de los botones gigantes de la fibra musgosa. Específicamente, hay una tendencia a una mayor proporción de axones con botones gigantes en el grupo *Cx3cr1<sup>-/-</sup>* e incluso botones gigantes con botones satelitales lo que coincide con la expansión de la marca en la tinción de Timm. Por otro lado, hay una subpoblación de botones de la fibra musgosa en el ratón *Cx3cr1<sup>-/-</sup>* con un volumen significativamente menor que podría corresponder con los botones de neuronas granulares generadas en el desarrollo de esta cepa, las cuales se ha reportado tienen un desarrollo anormal incluyendo una proyección axónica de menor área y una deficiente integración al circuito hipocampal (Bolós et al., 2018).

Acompañando a las modificaciones morfológicas de la fibra musgosa, se encontró un fenotipo hiperramificado en la microglia de esta región, sin cambios en la densidad microglial. Como

se mencionó previamente, la hiperramificación es considerada un estado intermediario en la activación de la microglia y sugiere un fenotipo pro-inflamatorio o hiperreactivo (Augusto-Oliveira et al., 2022).

El impacto global en el microcircuito de CA3 de estas alteraciones sinápticas y estructurales es mejor capturado en el análisis de conectividad funcional que, de manera consistente con los resultados individuales de las diversas técnicas descritas previamente, muestra que las características fundamentales de la red como una densidad aprox. al 20% y una topología de escala amplia y mundo pequeño (Bullmore & Sporns, 2009; X. Li et al., 2010), se encuentran preservadas, mientras que simultáneamente muestran una conectividad más débil y difusa que podría afectar el procesamiento de información por parte de la red, como lo han sugerido estudios de simulación (Guzman et al., 2016; Sporns, 2013). Adicionalmente, los cambios observados son consistentes con una falta de refinamiento en la red e hiperconectividad asociadas con deterioro cognitivo y observadas en diversas manipulaciones experimentales y entidades clínicas por igual (Hillary et al., 2015).

A pesar de que los experimentos electrofisiológicos y morfológicos fueron enfocados en la región CA3 del hipocampo, esto no implica que las alteraciones conductuales sean únicamente debidas a la disfunción de este circuito en particular. Debe recordarse que alteraciones similares se han observado en otras regiones corticales y es posible que se extiendan a núcleos subcorticales. Adicionalmente, ni CA3 ni el hipocampo existen de manera aislada en el cerebro, por lo que es de esperarse que alteraciones similares en otras áreas tengan repercusiones sobre la actividad hipocampal y que, así mismo, la disfunción hipocampal tenga repercusiones en los sistemas y circuitos extra-hipocampales.

Los resultados de la actividad poblacional de las rebanadas hipocampales neonatales, sugieren que los cambios detallados en la adultez podrían originarse en una etapa temprana del desarrollo post-natal, un período crítico tanto de interacción neurona-microglia (Hoshiko et al., 2012; Paolicelli et al., 2011), como en el establecimiento de circuitos neuronales (Bellingham et al., 1998; Ben-Ari, 2001; Kim et al., 2015).

En el hipocampo, los potenciales gigantes despolarizantes constituyen el primer tipo de actividad organizada de la red, precediendo a otros ritmos oscilatorios como el ritmo theta o gamma (Ben-Ari et al., 1989; Ben-Ari, 2001). Estos complejos eventos involucran transmisión GABAérgica, despolarizante en este período, así como transmisión glutamatérgica (Khalilov et al., 2015), se originan en la región CA3 y se conducen tanto a través del eje transversal como longitudinal del hipocampo evocando ráfagas sincrónicas de potenciales de acción en las neuronas hipocampales (Leinekugel et al., 1998).



Estos eventos pueden actuar como detectores de coincidencia e inducir cambios plásticos similares a la potenciación a largo plazo en aferencias activadas sincrónicamente con el potencial gigante despolarizante (Kasyanov et al., 2004). Alteraciones en la generación de estos eventos y la subsecuente sincronización de neuronas se han observado en diversos modelos animales de patologías neuropsiquiátricas incluyendo el autismo y el síndrome alcohólico fetal (Griguoli & Cherubini, 2017; Zakharov et al., 2016).

En un reporte reciente, Bertot et al., 2019, reporta una disminución significativa de la frecuencia de potenciales gigantes registrados intracelularmente en células piramidales de CA3 del ratón *Cx3cr1<sup>-/-</sup>*. Al igual que en los resultados del presente proyecto, este incremento no se encontró asociado a cambios sustanciales de la transmisión GABAérgica ni de las características de excitabilidad intrínseca de las células piramidales de CA3. Los resultados aquí descritos no muestran una disminución en la frecuencia, amplitud o duración de los potenciales gigantes registrados extracelularmente. Sin embargo, la actividad poblacional muestra una frecuencia disminuida en estos animales, acompañada de un mayor reclutamiento durante los potenciales gigantes, lo que refleja una reorganización de la actividad poblacional. Dado que la activación coincidente de contactos sinápticos con los potenciales gigantes puede tener como consecuencia la potenciación sináptica, este aumento en el reclutamiento observado en los ratones *Cx3cr1<sup>-/-</sup>* podría reflejar un mecanismo de rescate sináptico.

No escapa la asociación entre estos cambios en la actividad poblacional neuronal con la concomitante disminución en la densidad de células microgliales en la región CA3 del hipocampo. Una asociación observada en todas las regiones del cerebro de esta cepa donde se ha encontrado disfunción sináptica (Hoshiko et al., 2012; Paolicelli et al., 2011; Zhan et al., 2014) y sugiere que la microglia tiene un papel importante en la generación de sinapsis en los circuitos emergentes.

Este incremento en la activación sincrónica, aunada a una actividad espontánea inhibida podría modificar el patrón de conectividad del emergente circuito y sugiere que las alteraciones en la transmisión sináptica y la conectividad funcional de las redes adultas podrían originarse en esta etapa temprana del desarrollo.

Por último, es necesario recalcar que el modelo transgénico estudiado en este trabajo es susceptible a presentar variaciones en la expresión de la mutación y diversos autores han reportado resultados variables en la especificidad y uniformidad con la que el gen para el *Cx3cr1* es sustituido por el gen de la recombinasa Cre (Haimon et al., 2018; Zhao et al., 2019). Así mismo, debe recordarse que esta mutación está presente en todos los monocitos del organismo, por lo que no puede descartarse la influencia de la depleción del receptor a fractalquina en monocitos perivasculares, meníngeos y los del plexo coroideo (Chinnery et al., 2012; Utz et al., 2020).

Una consideración adicional es la potencial expresión transitoria del receptor a fractalquina en otras células del cerebro como las propias neuronas u otras células gliales en algún momento del desarrollo. El ratón utilizado en los presentes experimentos no permite hacer una disección más precisa en este sentido ni en un sentido temporal. Sería interesante una exploración similar con una depleción del receptor a fractalquina con una temporalidad controlada, por ejemplo, utilizando una cepa con una depleción inducible como el *Cx3cr1<sup>CreER</sup>* (<https://www.jax.org/strain/020940>).

## Conclusiones

El trabajo que constituye esta tesis ha explorado ampliamente el rango de alteraciones asociadas a la comunicación deficiente entre las neuronas y la microglia desde el desarrollo temprano post-natal hasta la adultez con una aproximación exhaustiva.

Los resultados apoyan la hipótesis general de esta tesis. En particular puede concluirse que la depleción del receptor a fractalquina induce cambios morfológicos tanto en la microglia como en las estructuras sinápticas de CA3; modifica la temporalidad del establecimiento de la población microglial; altera la actividad poblacional emergente de CA3 durante el desarrollo; induce un déficit en la neurotransmisión diferencial entre las aferencias de CA3, afectando principalmente la fibra musgosa y modificando la conectividad funcional de la red.

Estos hallazgos estructurales y fisiológicos se acompañan de un amplio rango de alteraciones cognitivas y conductuales en funciones asociadas al hipocampo, consistente con una deficiencia cognitiva congénita moderada. Cabe resaltar que, al menos en lo que respecta al aprendizaje espacial, el déficit cognitivo presentó mejoría con el entrenamiento sostenido. Una observación relevante para el potencial traslacional de este modelo.

Si bien este modelo ha sido estudiado por su potencial benéfico en entidades clínicas relevantes como la isquemia, el traumatismo y padecimientos inflamatorios, el presente trabajo advierte de las consecuencias inadvertidas que la manipulación de la comunicación entre la microglia y las neuronas podría tener. Así mismo, un área importante de esclarecimiento futuro es la disociación entre los efectos en el desarrollo temprano y las consecuencias en la adultez de la interrupción de la vía de la fractalquina. Esta distinción es importante en tanto que la reversibilidad de los primeros podría prevenir algunas de las alteraciones observadas en la adultez y brindar un mayor entendimiento sobre la fisiopatología de padecimientos neuropsiquiátricos, así como la participación de la microglía en los mismos.

## Referencias

- Acsády, L., Kamondi, A., Sík, A., Freund, T., & Buzsáki, G. (1998). GABAergic cells are the major postsynaptic targets of mossy fibers in the rat hippocampus. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *18*(9), 3386–3403.
- Adams, B., Lee, M., Fahnstock, M., & Racine, R. J. (1997). Long-term potentiation trains induce mossy fiber sprouting. *Brain Research*, *775*(1), 193–197. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(97\)01061-5](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(97)01061-5)
- Adler, L. E., Olincy, A., Waldo, M., Harris, J. G., Griffith, J., Stevens, K., Flach, K., Nagamoto, H., Bickford, P., Leonard, S., & Freedman, R. (1998). Schizophrenia, Sensory Gating, and Nicotinic Receptors. *Schizophrenia Bulletin*, *24*(2), 189–202. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.schbul.a033320>
- Ali, I., Chugh, D., & Ekdahl, C. T. (2015). Role of fractalkine-CX3CR1 pathway in seizure-induced microglial activation, neurodegeneration, and neuroblast production in the adult rat brain. *Neurobiology of Disease*, *74*, 194–203. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.11.009>
- Allen, N. J., & Barres, B. A. (2009). Glia—More than just brain glue. *Nature*, *457*(7230), 675–677. <https://doi.org/10.1038/457675a>
- Amaral, D. G. (1993). Emerging principles of intrinsic hippocampal organization. In *Current Opinion in Neurobiology* (Vol. 3, Issue 2, pp. 225–229). [https://doi.org/10.1016/0959-4388\(93\)90214-J](https://doi.org/10.1016/0959-4388(93)90214-J)

- Amaral, D. G., Dolorfo, C., & Alvarez-Royo, P. (1991). Organization of CA1 projections to the subiculum: A PHA-L analysis in the rat. *Hippocampus*, 1(4), 415–435.  
<https://doi.org/10.1002/hipo.450010410>
- Amaral, D. G., & Lavenex, P. (2006). Hippocampal Neuroanatomy. In *The Hippocampus Book* (pp. 37–114). Oxford University Press.  
<https://oxford.universitypressscholarship.com/view/10.1093/acprof:oso/9780195100273.001.0001/acprof-9780195100273-chapter-3>
- Amaral, D. G., Scharfman, H. E., & Lavenex, P. (2007). The dentate gyrus: Fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Progress in Brain Research*, 163, 3–22. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(07\)63001-5](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(07)63001-5)
- Amaral, D. G., & Witter, M. P. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: A review of anatomical data. *Neuroscience*, 31(3), 571–591.  
[https://doi.org/10.1016/0306-4522\(89\)90424-7](https://doi.org/10.1016/0306-4522(89)90424-7)
- Amaral, L. a. N., Scala, A., Barthélémy, M., & Stanley, H. E. (2000). Classes of small-world networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(21), 11149–11152.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.200327197>
- Andersen, P., Morris, R., Amaral, D., Bliss, T., & O’Keefe, J. (2006). Historical Perspective: Proposed Functions, Biological Characteristics, and Neurobiological Models of the Hippocampus. In *The Hippocampus Book*. Oxford University Press.  
<https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780195100273.003.0002>
- Andersen, P., Soleng, A. F., & Raastad, M. (2000). The hippocampal lamella hypothesis revisited. *Brain Research*, 886(1–2), 165–171. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(00\)02991-7](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(00)02991-7)

- Arganda-Carreras, I., Fernández-González, R., Muñoz-Barrutia, A., & Ortiz-De-Solorzano, C. (2010). 3D reconstruction of histological sections: Application to mammary gland tissue. *Microscopy Research and Technique*, *73*(11), 1019–1029. <https://doi.org/10.1002/jemt.20829>
- Arnoux, I., & Audinat, E. (2015). Fractalkine signaling and microglia functions in the developing brain. *Neural Plasticity*, *2015*. <https://doi.org/10.1155/2015/689404>
- Arshadi, C., Günther, U., Eddison, M., Harrington, K. I. S., & Ferreira, T. A. (2021). SNT: A unifying toolbox for quantification of neuronal anatomy. *Nature Methods*, *18*(4), 374–377. <https://doi.org/10.1038/s41592-021-01105-7>
- Augusto-Oliveira, M., Arrifano, G. P., Delage, C. I., Tremblay, M.-È., Crespo-Lopez, M. E., & Verkhratsky, A. (2022). Plasticity of microglia. *Biological Reviews*, *97*(1), 217–250. <https://doi.org/10.1111/brv.12797>
- Bachstetter, A. D., Morganti, J. M., Jernberg, J., Schlunk, A., Mitchell, S. H., Brewster, K. W., Hudson, C. E., Cole, M. J., Harrison, J. K., Bickford, P. C., & Gemma, C. (2011). Fractalkine and CX3CR1 regulate hippocampal neurogenesis in adult and aged rats. *Neurobiology of Aging*, *32*(11), 2030–2044. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2009.11.022>
- Baier, P. C., Blume, A., Koch, J., Marx, A., Fritzer, G., Aldenhoff, J. B., & Schiffelholz, T. (2009). Early postnatal depletion of NMDA receptor development affects behaviour and NMDA receptor expression until later adulthood in rats—A possible model for schizophrenia. *Behavioural Brain Research*, *205*(1), 96–101. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.06.018>
- Basilico, B., Pagani, F., Grimaldi, A., Cortese, B., Di Angelantonio, S., Weinhard, L., Gross, C., Limatola, C., Maggi, L., & Ragozzino, D. (2019). Microglia shape presynaptic properties at developing glutamatergic synapses. *Glia*, *67*(1), 53–67. <https://doi.org/10.1002/glia.23508>

- Bayer, T. A., Falkai, P., & Maier, W. (1999). Genetic and non-genetic vulnerability factors in schizophrenia: The basis of the "Two hit hypothesis." *Journal of Psychiatric Research*, 33(6), 543–548. [https://doi.org/10.1016/S0022-3956\(99\)00039-4](https://doi.org/10.1016/S0022-3956(99)00039-4)
- Bellingham, M. C., Lim, R., & Walmsley, B. (1998). Developmental changes in EPSC quantal size and quantal content at a central glutamatergic synapse in rat. *Journal of Physiology*, 511(3), 861–869. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1998.861bg.x>
- Belvindrah, R., Nosten-Bertrand, M., & Francis, F. (2014). Neuronal migration and its disorders affecting the CA3 region. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8(March), 63. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00063>
- Ben-Ari, Y. (2001). Developing networks play a similar melody. *Trends in Neurosciences*, 24(6), 353–360. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(00\)01813-0](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(00)01813-0)
- Ben-Ari, Y., Cherubini, E., Corradetti, R., & Gaiarsa, J. L. (1989). Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. *The Journal of Physiology*, 416(1), 303–325. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1989.sp017762>
- Bergon, A., Belzeaux, R., Comte, M., Pelletier, F., Hervé, M., Gardiner, E. J., Beveridge, N. J., Liu, B., Carr, V., Scott, R. J., Kelly, B., Cairns, M. J., Kumarasinghe, N., Schall, U., Blin, O., Boucraut, J., Tooney, P. A., Fakra, E., & Ibrahim, E. C. (2015). CX3CR1 is dysregulated in blood and brain from schizophrenia patients. *Schizophrenia Research*, 168(1–2), 434–443. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2015.08.010>
- Bertot, C., Groc, L., & Avignone, E. (2019). Role of CX3CR1 Signaling on the Maturation of GABAergic Transmission and Neuronal Network Activity in the Neonate Hippocampus. *Neuroscience*, 406, 186–201. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.03.006>

- Bessis, A., Béchade, C., Bernard, D., & Roumier, A. (2007). Microglial control of neuronal death and synaptic properties. *Glia*, *55*(3), 233–238. <https://doi.org/10.1002/glia.20459>
- Bischofberger, J., Engel, D., Li, L., Geiger, J. R., & Jonas, P. (2006). Patch-clamp recording from mossy fiber terminals in hippocampal slices. *Nature Protocols*, *1*(4), 2075–2081. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.312>
- Blank, T., & Prinz, M. (2013). Microglia as modulators of cognition and neuropsychiatric disorders. *Glia*, *61*(1), 62–70. <https://doi.org/10.1002/glia.22372>
- Boehm, G. W., Sherman, G. F., Hoplight, B. J., Hyde, L. A., Waters, N. S., Bradway, D. M., Galaburda, A. M., & Denenberg, V. H. (1996). Learning and memory in the autoimmune BXSB mouse: Effects of neocortical ectopias and environmental enrichment. *Brain Research*, *726*(1), 11–22. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(96\)00299-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(96)00299-5)
- Bolós, M., Llorens-Martín, M., Perea, J. R., Jurado-Arjona, J., Rábano, A., Hernández, F., & Avila, J. (2017). Absence of CX3CR1 impairs the internalization of Tau by microglia. *Molecular Neurodegeneration*, *12*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0200-1>
- Bolós, M., Perea, J. R., Terreros-Roncal, J., Pallas-Bazarra, N., Jurado-Arjona, J., Ávila, J., & Llorens-Martín, M. (2018). Absence of microglial CX3CR1 impairs the synaptic integration of adult-born hippocampal granule neurons. *Brain, Behavior, and Immunity*, *68*, 76–89. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.10.002>
- Boutet, I., Collin, C. A., MacLeod, L. S., Messier, C., Holahan, M. R., Berry-Kravis, E., Gandhi, R. M., & Kogan, C. S. (2018). Utility of the Hebb–Williams Maze Paradigm for Translational Research in Fragile X Syndrome: A Direct Comparison of Mice and Humans. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *11*(March), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00099>



- Bradl, M., & Lassmann, H. (2010). Oligodendrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, *119*(1), 37–53. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0601-5>
- Braff, L., & Braff, D. L. (2013). The Neuropsychiatric Translational Revolution Still Very Early and Still Very Challenging. *JAMA Psychiatry*, *70*(8), 777–779. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2013.2184>
- Brainard, D. H. (1997). The Psychophysics Toolbox. *Spatial Vision*, *10*(4), 433–436.
- Brockhaus-Dumke, A., Schultze-Lutter, F., Mueller, R., Tendolkar, I., Bechdolf, A., Pukrop, R., Klosterkoetter, J., & Ruhrmann, S. (2008). Sensory Gating in Schizophrenia: P50 and N100 Gating in Antipsychotic-Free Subjects at Risk, First-Episode, and Chronic Patients. *Biological Psychiatry*, *64*(5), 376–384. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2008.02.006>
- Buckmaster, P. S. (2012). Mossy Fiber Sprouting in the Dentate Gyrus UNDER WHAT CIRCUMSTANCES DOES MOSSY FIBER SPROUTING OCCUR? *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies, Md*, 1–29.
- Buckner, R. L. (2010). The Role of the Hippocampus in Prediction and Imagination. *Annual Review of Psychology*, *61*(1), 27–48. <https://doi.org/10.1146/annurev.psych.60.110707.163508>
- Bullmore, E., & Sporns, O. (2009). Complex brain networks: Graph theoretical analysis of structural and functional systems. *Nature Reviews Neuroscience*, *10*(3), 186–198. <https://doi.org/10.1038/nrn2575>
- Buzsáki, G., & Moser, E. I. (2013). Memory, navigation and theta rhythm in the hippocampal-entorhinal system. *Nature Neuroscience*, *16*(2), 130–138. <https://doi.org/10.1038/nn.3304>
- Cardona, A. E., Piro, E. P., Sasse, M. E., Kostenko, V., Cardona, S. M., Dijkstra, I. M., Huang, D. R., Kidd, G., Dombrowski, S., Dutta, R., Lee, J. C., Cook, D. N., Jung, S., Lira, S. A., Littman, D. R.,

- & Ransohoff, R. M. (2006). Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nature Neuroscience*, *9*(7), 917–924. <https://doi.org/10.1038/nn1715>
- Carola, V., D'Olimpio, F., Brunamonti, E., Mangia, F., & Renzi, P. (2002). Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. *Behavioural Brain Research*, *134*(1), 49–57. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(01\)00452-1](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(01)00452-1)
- Castro-Sánchez, S., García-Yagüe, Á. J., Kügler, S., & Lastres-Becker, I. (2019). CX3CR1-deficient microglia shows impaired signalling of the transcription factor NRF2: Implications in tauopathies. *Redox Biology*, *22*, 101118. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101118>
- Cenquizca, L. A., & Swanson, L. W. (2006). An Analysis of Direct Hippocampal Cortical Field CA1 Axonal Projections to Diencephalon in the Rat. *The Journal of Comparative Neurology*, *497*(1), 101–114. <https://doi.org/10.1002/cne.20985>
- Chattarji, S., Stanton, P. K., & Sejnowski, T. J. (1989). Commissural synapses, but not mossy fiber synapses, in hippocampal field CA3 exhibit associative long-term potentiation and depression. *Brain Research*, *495*(1), 145–150. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(89\)91228-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(89)91228-6)
- Chen, X., Wei, Q., Hu, Y., & Wang, C. (2020). Role of Fractalkine in promoting inflammation in sepsis-induced multiple organ dysfunction. *Infection, Genetics and Evolution*, *85*, 104569. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104569>
- Cheng, C., Trzcinski, O., & Doering, L. C. (2014). Fluorescent labeling of dendritic spines in cell cultures with the carbocyanine dye “Dil.” *Frontiers in Neuroanatomy*, *8*, 30. <https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00030>

- Chinnery, H. R., McLenachan, S., Humphries, T., Kezic, J. M., Chen, X., Ruitenber, M. J., & McMenamin, P. G. (2012). Accumulation of murine subretinal macrophages: Effects of age, pigmentation and CX3CR1. *Neurobiology of Aging*, *33*(8), 1769–1776.  
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.03.010>
- Coleman, L. G., Jarskog, L. F., Moy, S. S., & Crews, F. T. (2009). Deficits in adult prefrontal cortex neurons and behavior following early post-natal NMDA antagonist treatment. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *93*(3), 322–330.  
<https://doi.org/10.1016/j.pbb.2009.04.017>
- Cutts, C. S., & Eglén, S. J. (2014). Detecting Pairwise Correlations in Spike Trains: An Objective Comparison of Methods and Application to the Study of Retinal Waves. *Journal of Neuroscience*, *34*(43), 14288–14303. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2767-14.2014>
- Davis, E. J., Foster, T. D., & Thomas, W. E. (1994). Cellular forms and functions of brain microglia. *Brain Research Bulletin*, *34*(1), 73–78. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(94\)90189-9](https://doi.org/10.1016/0361-9230(94)90189-9)
- Deacon, R. (2012). Assessing Burrowing, Nest Construction, and Hoarding in Mice. *J. Vis. Exp*, *59*, 2607. <https://doi.org/10.3791/2607>
- Deacon, R. M. J. (2006a). Assessing nest building in mice. *Nature Protocols*, *1*(3), 1117–1119.  
<https://doi.org/10.1038/nprot.2006.170>
- Deacon, R. M. J. (2006b). Burrowing in rodents: A sensitive method for detecting behavioral dysfunction. *Nature Protocols*, *1*(1), 118–121. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.19>
- Deacon, R. M. J., Croucher, A., & Rawlins, J. N. P. (2002). Hippocampal cytotoxic lesion effects on species-typical behaviours in mice. *Behavioural Brain Research*, *132*(2), 203–213.  
[https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(01\)00401-6](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(01)00401-6)

- Deacon, R. M. J., Penny, C., & Rawlins, J. N. P. (2003). Effects of medial prefrontal cortex cytotoxic lesions in mice. *Behavioural Brain Research*, *139*(1), 139–155.  
[https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(02\)00225-5](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(02)00225-5)
- Debanne, D., Guérineau, N. C., Gähwiler, B. H., & Thompson, S. M. (1996). Paired-pulse facilitation and depression at unitary synapses in rat hippocampus: Quantal fluctuation affects subsequent release. *The Journal of Physiology*, *491* ( Pt 1(1996), 163–176.  
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1996.sp021204>
- Del Rio-Hortega, P. (1919). El tercer elemento de los centros nerviosos. I. La microglia en estado normal. II. Intervención de la microglia en los procesos patológicos. III. Naturaleza probable de la microglia. *Boletín de La Sociedad Española de Biología*, *9*, 69–120.
- Dere, E., Kart-Teke, E., Huston, J. P., & De Souza Silva, M. A. (2006). The case for episodic memory in animals. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *30*(8), 1206–1224.  
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2006.09.005>
- Deschenes, C. L., & McCurry, S. M. (2009). Current treatments for sleep disturbances in individuals with dementia. *Current Psychiatry Reports*, *11*(1), 20–26. <https://doi.org/10.1007/s11920-009-0004-2>
- Dissanayake, D. W. N., Zachariou, M., Marsden, C. A., & Mason, R. (2008). Auditory gating in rat hippocampus and medial prefrontal cortex: Effect of the cannabinoid agonist WIN55,212-2. *Neuropharmacology*, *55*(8), 1397–1404.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.08.039>
- Donnelly, D. J., Longbrake, E. E., Shawler, T. M., Kigerl, K. A., Lai, W., Tovar, C. A., Ransohoff, R. M., & Popovich, P. G. (2011). Deficient CX3CR1 Signaling Promotes Recovery after Mouse Spinal Cord Injury by Limiting the Recruitment and Activation of Ly6Clo/iNOS+

Macrophages. *The Journal of Neuroscience*, 31(27), 9910–9922.

<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2114-11.2011>

Druart, M., Nosten-Bertrand, M., Poll, S., Crux, S., Nebeling, F., Delhay, C., Dubois, Y., Mittag, M., Leboyer, M., Tamouza, R., Fuhrmann, M., & Le Magueresse, C. (2021). Elevated expression of complement C4 in the mouse prefrontal cortex causes schizophrenia-associated phenotypes. *Molecular Psychiatry*, 26(7), 3489–3501. <https://doi.org/10.1038/s41380-021-01081-6>

Eichenbaum, H. (2000). Hippocampus: Mapping or memory? *Current Biology*, 10(21), 785–787.

[https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00763-6](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00763-6)

Eichenbaum, H. (2004). Hippocampus: Cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory. *Neuron*, 44(1), 109–120.

<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.08.028>

Eichenbaum, H., & Cohen, N. J. (2014). Can We Reconcile the Declarative Memory and Spatial Navigation Views on Hippocampal Function? *Neuron*, 83(4), 764–770.

<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.07.032>

Eichenbaum, H., Dudchenko, P., Wood, E., Shapiro, M., & Tanila, H. (1999). The hippocampus, memory, and place cells: Is it spatial memory or a memory space? *Neuron*, 23(2), 209–226.

[https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80773-4](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80773-4)

Eltokhi, A., Kurpiers, B., & Pitzer, C. (2020). Behavioral tests assessing neuropsychiatric phenotypes in adolescent mice reveal strain- and sex-specific effects. *Scientific Reports*, 10(1), 11263.

<https://doi.org/10.1038/s41598-020-67758-0>

- Ennaceur, A. (2014). Tests of unconditioned anxiety—Pitfalls and disappointments. In *Physiology and Behavior* (Vol. 135, pp. 55–71). Elsevier Inc.  
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.05.032>
- Evstratova, A., & Tóth, K. (2014). Information processing and synaptic plasticity at hippocampal mossy fiber terminals. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8(February), 28.  
<https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00028>
- Eyo, U. B., Peng, J., Murugan, M., Mo, M., Lalani, A., Xie, P., Xu, P., Margolis, D. J., & Wu, L.-J. (2016). Regulation of Physical Microglia–Neuron Interactions by Fractalkine Signaling after Status Epilepticus. *ENeuro*, 3(6). <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0209-16.2016>
- Eyo, U. B., & Wu, L.-J. (2019). Microglia: Lifelong Patrolling Immune Cells of the Brain. *Progress in Neurobiology*, April, 101614. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2019.04.003>
- Féger, J., & Hirsch, E. C. (2015). In search of innovative therapeutics for neuropsychiatric disorders: The case of neurodegenerative diseases. *Annales Pharmaceutiques Francaises*, 73(1), 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.pharma.2014.10.001>
- Feigenson, K. A., Kusnecov, A. W., & Silverstein, S. M. (2014). Inflammation and the Two-Hit Hypothesis of Schizophrenia. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 38, 72–93.  
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2013.11.006>
- Feinberg, I. (1982). Schizophrenia: Caused by a fault in programmed synaptic elimination during adolescence? *Journal of Psychiatric Research*, 17(4), 319–334.  
[https://doi.org/10.1016/0022-3956\(82\)90038-3](https://doi.org/10.1016/0022-3956(82)90038-3)
- Feldt, S., Bonifazi, P., & Cossart, R. (2011). Dissecting functional connectivity of neuronal microcircuits: Experimental and theoretical insights. *Trends in Neurosciences*, 34(5), 225–236. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2011.02.007>

- File, S. E., Lippa, A. S., Beer, B., & Lippa, M. T. (2004). Animal Tests of Anxiety. *Current Protocols in Neuroscience*, 26(1), 8.3.1-8.3.22. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0803s26>
- Finneran, D. J., Morgan, D., Gordon, M. N., & Nash, K. R. (2019). CNS-Wide over Expression of Fractalkine Improves Cognitive Functioning in a Tauopathy Model. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 14(2), 312–325. <https://doi.org/10.1007/s11481-018-9822-5>
- Fornito, A., Zalesky, A., & Bullmore, E. (2016a). Connectivity Matrices and Brain Graphs. In *Fundamentals of Brain Network Analysis* (First, pp. 89–113). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407908-3.00003-0>
- Fornito, A., Zalesky, A., & Bullmore, E. (2016b). Motifs, Small Worlds, and Network Economy. In *Fundamentals of Brain Network Analysis* (First, pp. 257–301). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-407908-3.00008-x>
- Fornito, A., Zalesky, A., & Bullmore, E. (2016c). Node Degree and Strength. In *Fundamentals of Brain Network Analysis* (pp. 115–136). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-407908-3.00004-2>
- Fredriksson, A., & Archer, T. (2004). Neurobehavioural deficits associated with apoptotic neurodegeneration and vulnerability for ADHD. *Neurotoxicity Research*, 6(6), 435–456. <https://doi.org/10.1007/BF03033280>
- Fries, G. R., Dimitrov, D. H., Lee, S., Braid, N., Yantis, J., Honaker, C., Cuellar, J., & Walss-Bass, C. (2018). Genome-wide expression in veterans with schizophrenia further validates the immune hypothesis for schizophrenia. *Schizophrenia Research*, 192, 255–261. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2017.06.016>

- Friston, K. J. (2011). Functional and Effective Connectivity: A Review. *Brain Connectivity*, *1*(1), 13–36. <https://doi.org/10.1089/brain.2011.0008>
- Fuhrmann, M., Bittner, T., Jung, C. K. E., Burgold, S., Page, R. M., Mitteregger, G., Haass, C., LaFerla, F. M., Kretschmar, H., & Herms, J. (2010). Microglial Cx3cr1 knockout prevents neuron loss in a mouse model of Alzheimer’s disease. *Nature Neuroscience*, *13*(4), 411–413. <https://doi.org/10.1038/nn.2511>
- Fyhn, M., Molden, S., Witter, M. P., Moser, E. I., & Moser, M.-B. (2004). Spatial Representation in the Entorhinal Cortex. *Science*, *305*(5688), 1258–1264. <https://doi.org/10.1126/science.1099901>
- Garcia, S., Guarino, D., Jaillet, F., Jennings, T., Pröpper, R., Rautenberg, P., Rodgers, C., Sobolev, A., Wachtler, T., Yger, P., & Davison, A. (2014). Neo: An object model for handling electrophysiology data in multiple formats. *Frontiers in Neuroinformatics*, *8*. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fninf.2014.00010>
- Garton, K. J., Gough, P. J., Blobel, C. P., Murphy, G., Greaves, D. R., Dempsey, P. J., & Raines, E. W. (2001). Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM17) mediates the cleavage and shedding of fractalkine (CX3CL1). *The Journal of Biological Chemistry*, *276*(41), 37993–38001. <https://doi.org/10.1074/jbc.M106434200>
- Gaskill, B. N., Karas, A. Z., Garner, J. P., & Pritchett-Corning, K. R. (2013). Nest building as an indicator of health and welfare in laboratory mice. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, *82*, 51012. <https://doi.org/10.3791/51012>
- Germann, M., Brederoo, S. G., & Sommer, I. E. C. (2021). Abnormal synaptic pruning during adolescence underlying the development of psychotic disorders. *Current Opinion in Psychiatry*, *34*(3), 222–227. <https://doi.org/10.1097/YCO.0000000000000696>



- Gill, S. S., & Pulido, O. M. (2001). Review Article: Glutamate Receptors in Peripheral Tissues: Current Knowledge, Future Research, and Implications for Toxicology. *Toxicologic Pathology*, 29(2), 208–223. <https://doi.org/10.1080/019262301317052486>
- Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M. F., Conway, S. J., Ng, L. G., Stanley, E. R., Samokhvalov, I. M., & Merad, M. (2010). Fate Mapping Analysis Reveals That Adult Microglia Derive from Primitive Macrophages. *Science*, 330(6005), 841–845. <https://doi.org/10.1126/science.1194637>
- Glazier, M. M., Sutton, R. L., & Stein, D. G. (1995). Effects of Unilateral Entorhinal Cortex Lesion and Ganglioside GM1 Treatment on Performance in a Novel Water Maze Task. *Neurobiology of Learning and Memory*, 64(3), 203–214. <https://doi.org/10.1006/nlme.1995.0003>
- Gorter, J. A., Titulaer, M., Bos, N. P. A., & Huisman, E. (1991). Chronic neonatal MK-801 administration leads to a long-lasting increase in seizure sensitivity during the early stages of hippocampal kindling. *Neuroscience Letters*, 134(1), 29–32. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(91\)90501-J](https://doi.org/10.1016/0304-3940(91)90501-J)
- Gray, J. A. (1985). The Neuropsychology of Anxiety. *Issues in Mental Health Nursing*, 7(1–4), 201–228. <https://doi.org/10.3109/01612848509009455>
- Griguoli, M., & Cherubini, E. (2017). Early correlated network activity in the hippocampus: Its putative role in shaping neuronal circuits. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00255>
- Groenewegen, H. J., Vermeulen-Van der Zee, E., te Kortschot, A., & Witter, M. P. (1987). Organization of the projections from the subiculum to the ventral striatum in the rat. A

- study using anterograde transport of Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *Neuroscience*, 23(1), 103–120. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(87\)90275-2](https://doi.org/10.1016/0306-4522(87)90275-2)
- Grün, S., Borgelt, C., Gerstein, G., Louis, S., & Diesmann, M. (2010). Selecting appropriate surrogate methods for spike correlation analysis. *BMC Neuroscience*, 11(Suppl 1), O15. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-11-S1-O15>
- Guerrin, C. G. J., Doorduyn, J., Sommer, I. E., & de Vries, E. F. J. (2021). The dual hit hypothesis of schizophrenia: Evidence from animal models. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 131, 1150–1168. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.10.025>
- Gundlfinger, A. (2008). The Hippocampal Mossy Fiber Synapse: Transmission , Modulation and Plasticity. In *Dissertation* (Issue April).
- Guo, L., Lu, X., Wang, Y., Bao, C., & Chen, S. (2017). Elevated levels of soluble fractalkine and increased expression of CX3CR1 in neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 14(4), 3153–3158. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.4862>
- Guzman, S. J., Schlögl, A., Frotscher, M., & Jonas, P. (2016). Synaptic mechanisms of pattern completion in the hippocampal CA3 network. *Science*, 353(6304), 1117–1123. <https://doi.org/10.1126/science.aaf1836>
- Gyoneva, S., Hosur, R., Gosselin, D., Zhang, B., Ouyang, Z., Cotleur, A. C., Peterson, M., Allaire, N., Challa, R., Cullen, P., Roberts, C., Miao, K., Reynolds, T. L., Glass, C. K., Burkly, L., & Ransohoff, R. M. (2019). Cx3cr1-deficient microglia exhibit a premature aging transcriptome. *Life Science Alliance*, 2(6), e201900453. <https://doi.org/10.26508/lsa.201900453>

- Hagberg, A. A., Schult, D. A., & Swart, P. J. (2008). Exploring network structure, dynamics, and function using NetworkX. *7th Python in Science Conference (SciPy 2008)*, *SciPy*, 11–15.
- Hagena, H., & Manahan-Vaughan, D. (2011). Learning-facilitated synaptic plasticity at CA3 mossy fiber and commissural-associational synapses reveals different roles in information processing. *Cerebral Cortex*, *21*(11), 2442–2449. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhq271>
- Haimon, Z., Volaski, A., Orthgiess, J., Boura-Halfon, S., Varol, D., Shemer, A., Yona, S., Zuckerman, B., David, E., Chappell-Maor, L., Bechmann, I., Gericke, M., Ulitsky, I., & Jung, S. (2018). Re-evaluating microglia expression profiles using RiboTag and cell isolation strategies. *Nature Immunology*, *19*(6), 636–644. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0110-6>
- Hansen, H. H., Briem, T., Dzierko, M., Sifringer, M., Voss, A., Rzeski, W., Zdzisinska, B., Thor, F., Heumann, R., Stepulak, A., Bittigau, P., & Ikonomidou, C. (2004). Mechanisms leading to disseminated apoptosis following NMDA receptor blockade in the developing rat brain. *Neurobiology of Disease*, *16*(2), 440–453. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2004.03.013>
- Hart, A. D., Wyttenbach, A., Hugh Perry, V., & Teeling, J. L. (2012). Age related changes in microglial phenotype vary between CNS regions: Grey versus white matter differences. *Brain, Behavior, and Immunity*, *26*(5), 754–765. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2011.11.006>
- Hartley, T., Lever, C., Burgess, N., & O'Keefe, J. (2014). Space in the brain: How the hippocampal formation supports spatial cognition. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *369*(1635). <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0510>
- Hassabis, D., Kumaran, D., Vann, S. D., & Maguire, E. A. (2007). Patients with hippocampal amnesia cannot imagine new experiences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(5), 1726–1731. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610561104>

- Heck, N., Golbs, A., Riedemann, T., Sun, J. J., Lessmann, V., & Luhmann, H. J. (2008). Activity-dependent regulation of neuronal apoptosis in neonatal mouse cerebral cortex. *Cerebral Cortex*, *18*(6), 1335–1349. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhm165>
- Hemond, P., Epstein, D., Boley, A., Migliore, M., Ascoli, G. A., & Jaffe, D. B. (2008). Distinct classes of pyramidal cells exhibit mutually exclusive firing patterns in hippocampal area CA3b. *Hippocampus*, *18*(4), 411–424. <https://doi.org/10.1002/hipo.20404>
- Henze, D. A., Urban, N. N., & Barrionuevo, G. (2000). The multifarious hippocampal mossy fiber pathway: A review. *Neuroscience*, *98*(3), 407–427. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(00\)00146-9](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(00)00146-9)
- Hernández-Frausto, M., López-Rubalcava, C., & Galván, E. J. (2019). Progressive Alterations in Synaptic Transmission and Plasticity of Area CA1 Precede the Cognitive Impairment Associated with Neonatal Administration of MK-801. *Neuroscience*, *404*, 205–217. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.01.036>
- Hill, S. L., Shao, L., & Beasley, C. L. (2020). Diminished levels of the chemokine fractalkine in post-mortem prefrontal cortex in schizophrenia but not bipolar disorder. *The World Journal of Biological Psychiatry*, *0*(0), 1–10. <https://doi.org/10.1080/15622975.2020.1755451>
- Hillary, F. G., Roman, C. A., Venkatesan, U., Rajtmajer, S. M., Bajo, R., & Castellanos, N. D. (2015). Hyperconnectivity is a fundamental response to neurological disruption. *Neuropsychology*, *29*(1), 59–75. <https://doi.org/10.1037/neu0000110>
- Holm, I. E., & Geneser, F. A. (1991). Histochemical-Demonstration of Zinc in the Hippocampal Region of the Domestic Pig .3. The Dentate Area. *Journal of Comparative Neurology*, *308*(3), 409–417.

- Hong, S., Dissing-olesen, L., & Stevens, B. (2016). New insights on the role of microglia in synaptic pruning in health and disease. *Current Opinion in Neurobiology*, *36*, 128–134.  
<https://doi.org/10.1016/j.conb.2015.12.004>
- Honig, M. G., & Hume, R. I. (1989). Dil and DiO: Versatile fluorescent dyes for neuronal labelling and pathway tracing. *Trends in Neurosciences*, *12*(9), 333–341.  
[https://doi.org/10.1016/0166-2236\(89\)90040-4](https://doi.org/10.1016/0166-2236(89)90040-4)
- Hoshiko, M., Arnoux, I., Avignone, E., Yamamoto, N., & Audinat, E. (2012). Deficiency of the Microglial Receptor CX3CR1 Impairs Postnatal Functional Development of Thalamocortical Synapses in the Barrel Cortex. *Journal of Neuroscience*, *32*(43), 15106–15111.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1167-12.2012>
- Humphries, M. D., & Gurney, K. (2008). Network ‘Small-World-Ness’: A Quantitative Method for Determining Canonical Network Equivalence. *PLOS ONE*, *3*(4), e0002051.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002051>
- Humphries, M. D., Gurney, K., & Prescott, T. J. (2006). The brainstem reticular formation is a small-world, not scale-free, network. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *273*(1585), 503–511. <https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3354>
- Hunsaker, M. R., Rosenberg, J. S., & Kesner, R. P. (2008). The role of the dentate gyrus, CA3a,b, and CA3c for detecting spatial and environmental novelty. *Hippocampus*, *18*(10), 1064–1073. <https://doi.org/10.1002/hipo.20464>
- Hyman, S. E. (2014). Revitalizing Psychiatric Therapeutics. *Neuropsychopharmacology*, *39*(1), 220–229. <https://doi.org/10.1038/npp.2013.181>

Ikegaya, Y., Sasaki, T., Ishikawa, D., Honma, N., Tao, K., Takahashi, N., Minamisawa, G., Ujita, S., & Matsuki, N. (2013). Interpyramid spike transmission stabilizes the sparseness of recurrent network activity. *Cerebral Cortex*, *23*(2), 293–304. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhs006>

Ikegaya, Y., Yamada, M., Fukuda, T., Kuroyanagi, H., Shirasawa, T., & Nishiyama, N. (2001). Aberrant synaptic transmission in the hippocampal CA3 region and cognitive deterioration in protein-repair enzyme-deficient mice. *Hippocampus*, *11*(3), 287–298. <https://doi.org/10.1002/hipo.1043>

Ikonomidou, C., Bosch, F., Miksa, M., Bittigau, P., Vöckler, J., Dikranian, K., Tenkova, T. I., Stefovskaja, V., Turski, L., & Olney, J. W. (1999). Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science*, *283*(5398), 70–74. <https://doi.org/10.1126/science.283.5398.70>

Inoue, A., Hasegawa, H., Kohno, M., Ito, M. R., Terada, M., Imai, T., Yoshie, O., Nose, M., & Fujita, S. (2005). Antagonist of fractalkine (CX3CL1) delays the initiation and ameliorates the progression of lupus nephritis in MRL/lpr mice. *Arthritis and Rheumatism*, *52*(5), 1522–1533. <https://doi.org/10.1002/art.21007>

Inta, D., Lang, U. E., Borgwardt, S., Meyer-Lindenberg, A., & Gass, P. (2017). Microglia Activation and Schizophrenia: Lessons From the Effects of Minocycline on Postnatal Neurogenesis, Neuronal Survival and Synaptic Pruning. *Schizophrenia Bulletin*, *43*(3), 493–496. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbw088>

Ishizuka, K., Fujita, Y., Kawabata, T., Kimura, H., Iwayama, Y., Inada, T., Okahisa, Y., Egawa, J., Usami, M., Kushima, I., Uno, Y., Okada, T., Ikeda, M., Aleksic, B., Mori, D., Someya, T., Yoshikawa, T., Iwata, N., Nakamura, H., ... Ozaki, N. (2017). Rare genetic variants in CX3CR1

- and their contribution to the increased risk of schizophrenia and autism spectrum disorders. *Translational Psychiatry*, 7(8), e1184. <https://doi.org/10.1038/tp.2017.173>
- Ito, D., Imai, Y., Ohsawa, K., Nakajima, K., Fukuuchi, Y., & Kohsaka, S. (1998). Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 57(1), 1–9. [https://doi.org/10.1016/s0169-328x\(98\)00040-0](https://doi.org/10.1016/s0169-328x(98)00040-0)
- Izquierdo, P., Attwell, D., & Madry, C. (2019). Ion Channels and Receptors as Determinants of Microglial Function. *Trends in Neurosciences*, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2018.12.007>
- Jaffe, D. B., & Gutiérrez, R. (2007). Mossy fiber synaptic transmission: Communication from the dentate gyrus to area CA3. *Progress in Brain Research*, 163. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(07\)63006-4](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(07)63006-4)
- Jarvis, L. M. (2012). *Tough Times For Neuroscience R&D*. Chemical & Engineering News. <https://cen.acs.org/articles/90/i12/Tough-Times-Neuroscience-RD.html>
- Jay, T. M., & Witter, M. P. (1991). Distribution of hippocampal CA1 and subicular efferents in the prefrontal cortex of the rat studied by means of anterograde transport of Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin. *The Journal of Comparative Neurology*, 313(4), 574–586. <https://doi.org/10.1002/cne.903130404>
- Jerman, T., Kesner, R. P., & Hunsaker, M. R. (2006). Disconnection analysis of CA3 and DG in mediating encoding but not retrieval in a spatial maze learning task. *Learning & Memory*, 13(4), 458–464. <https://doi.org/10.1101/lm.246906>
- Jin, J., & Maren, S. (2015). Prefrontal-Hippocampal Interactions in Memory and Emotion. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 9(December), 170. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2015.00170>

- Jirkof, P. (2014). Burrowing and nest building behavior as indicators of well-being in mice. *Journal of Neuroscience Methods*, 234, 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2014.02.001>
- Johnston, D. (1981). Passive cable properties of hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 1(1), 41–55. <https://doi.org/10.1007/BF00736038>
- Jones, B. A., Beamer, M., & Ahmed, S. (2010). Fractalkine/CX3CL1: A Potential New Target for Inflammatory Diseases. *Molecular Interventions*, 10(5), 263–270. <https://doi.org/10.1124/mi.10.5.3>
- Jones, K. S., Corbin, J. G., & Huntsman, M. M. (2014). Neonatal NMDA Receptor Blockade Disrupts Spike Timing and Glutamatergic Synapses in Fast Spiking Interneurons in a NMDA Receptor Hypofunction Model of Schizophrenia. *PLOS ONE*, 9(10), e109303. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109303>
- Jung, S., Aliberti, J., Graemmel, P., Sunshine, M. J., Kreutzberg, G. W., Sher, A., & Littman, D. R. (2000). Analysis of Fractalkine Receptor CX3CR1 Function by Targeted Deletion and Green Fluorescent Protein Reporter Gene Insertion. *Molecular and Cellular Biology*, 20(11), 4106–4114. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.11.4106-4114.2000>
- Kahn, I., & Shohamy, D. (2013). Intrinsic connectivity between the hippocampus, nucleus accumbens, and ventral tegmental area in humans. *Hippocampus*, 23(3), 187–192. <https://doi.org/10.1002/hipo.22077>
- Kasyanov, A. M., Safiulina, V. F., Voronin, L. L., & Cherubini, E. (2004). GABA-mediated giant depolarizing potentials as coincidence detectors for enhancing synaptic efficacy in the developing hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(11), 3967–3972. <https://doi.org/10.1073/pnas.0305974101>



- Kawabe, K., Iwasaki, T., & Ishitani, Y. (2007). Repeated treatment with N-methyl-d-aspartate antagonists in neonatal, but not adult, rats causes long-term deficits of radial-arm maze learning. *Brain Research*, *1169*, 77–86. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.06.062>
- Keefe, R. S. E., & Harvey, P. D. (2012). Cognitive impairment in schizophrenia. *Handbook of Experimental Pharmacology*, *213*, 11–37. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-25758-2\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-642-25758-2_2)
- Kerchner, G. a, & Nicoll, R. A. (2008). Silent synapses and the emergence of a postsynaptic mechanism for LTP. *Nature Reviews. Neuroscience*, *9*(11), 813–825.  
<https://doi.org/10.1038/nrn2501>
- Kerr, K. M., Agster, K. L., Furtak, S. C., & Burwell, R. D. (2007). Functional neuroanatomy of the parahippocampal region: The lateral and medial entorhinal areas. *Hippocampus*, *17*(9), 697–708. <https://doi.org/10.1002/hipo.20315>
- Keshavan, M., Lizano, P., & Prasad, K. (2020). The synaptic pruning hypothesis of schizophrenia: Promises and challenges. *World Psychiatry*, *19*(1), 110–111.  
<https://doi.org/10.1002/wps.20725>
- Kesner, R. P. (1980). An attribute analysis of memory: The role of the hippocampus. *Physiological Psychology*, *8*(2), 189–197. <https://doi.org/10.3758/BF03332850>
- Kesner, R. P. (2007). Behavioral functions of the CA3 subregion of the hippocampus. *Learning and Memory*, *14*(11), 771–781. <https://doi.org/10.1101/lm.688207>
- Kesner, R. P. (2013). A process analysis of the CA3 subregion of the hippocampus. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *7*(May), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00078>
- Kesner, R. P. (2016). Exploration of the Neurobiological Basis for a Three-System, Multi-attribute Model of Memory. In P. A. Jackson, A. A. Chiba, R. F. Berman, & M. E. Ragozzino (Eds.), *The*

- Neurobiological Basis of Memory: A System, Attribute, and Process Analysis* (pp. 1–35). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-15759-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-15759-7_1)
- Kesner, R. P., & Rolls, E. T. (2015). A computational theory of hippocampal function, and tests of the theory: New developments. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *48*, 92–147. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.11.009>
- Kettenmann, H., Hanisch, U.-K., Noda, M., & Verkhratsky, A. (2011). Physiology of Microglia. *Physiological Reviews*, *91*(2), 461–553. <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2010>
- Kettenmann, H., Kirchhoff, F., & Verkhratsky, A. (2013). Microglia: New Roles for the Synaptic Stripper. *Neuron*, *77*(1), 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.12.023>
- Khalilov, I., Minlebaev, M., Mukhtarov, M., & Khazipov, R. (2015). Dynamic changes from depolarizing to hyperpolarizing GABAergic actions during giant depolarizing potentials in the neonatal rat hippocampus. *Journal of Neuroscience*, *35*(37), 12635–12642. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1922-15.2015>
- Kim, I., Mlsna, L. M., Yoon, S., Le, B., Yu, S., Xu, D., & Koh, S. (2015). A postnatal peak in microglial development in the mouse hippocampus is correlated with heightened sensitivity to seizure triggers. *Brain and Behavior*, *5*(12), e00403. <https://doi.org/10.1002/brb3.403>
- Kim, J. J., & Fanselow, M. S. (1992). Modality-Specific Retrograde Amnesia of Fear. *Science*, *256*(5057), 675–677. <https://doi.org/10.1126/science.1585183>
- Kingsbury, L., Huang, S., Wang, J., Gu, K., Golshani, P., Wu, Y. E., & Hong, W. (2019). Correlated Neural Activity and Encoding of Behavior across Brains of Socially Interacting Animals. *Cell*, *178*(2), 429–446.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.05.022>
- Kjaerby, C., Hovelsø, N., Dalby, N. O., & Sotty, F. (2017). Phencyclidine administration during neurodevelopment alters network activity in prefrontal cortex and hippocampus in adult

- rats. *Journal of Neurophysiology*, 118(2), 1002–1011.  
<https://doi.org/10.1152/jn.00081.2017>
- Kleiner, M., Brainard, D., Pelli, D., Ingling, A., Murray, R., & Broussard, C. (2007). *What's new in Psychtoolbox-3?* 36, 1–16. <https://doi.org/10.1177/03010066070360S101>
- Knierim, J. J. (2015). The hippocampus. In *Current Biology* (Vol. 25). Cell Press.  
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.10.049>
- Knierim, J. J., Neunuebel, J. P., & Deshmukh, S. S. (2014). Functional correlates of the lateral and medial entorhinal cortex: Objects, path integration and local–global reference frames. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1635), 20130369. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0369>
- Koehler, R. C., Roman, R. J., & Harder, D. R. (2009). Astrocytes and the regulation of cerebral blood flow. *Trends in Neurosciences*, 32(3), 160–169. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.11.005>
- Kraeuter, A.-K., Guest, P. C., & Sarnyai, Z. (2019). The Y-Maze for Assessment of Spatial Working and Reference Memory in Mice. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1916, 105–111. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2_10)
- Kramer, M. A., & Eden, U. T. (2016). Analysis of Rhythmic Activity in an Invasive Electroencephalogram. In *Case Studies in Neural Data Analysis—A guide for the practicing neuroscientist* (p. 386). The MIT Press.
- Kramis, R., Vanderwolf, C. H., & Bland, B. H. (1975). Two types of hippocampal rhythmical slow activity in both the rabbit and the rat: Relations to behavior and effects of atropine, diethyl ether, urethane, and pentobarbital. *Experimental Neurology*, 49(1), 58–85.  
[https://doi.org/10.1016/0014-4886\(75\)90195-8](https://doi.org/10.1016/0014-4886(75)90195-8)

- Krause, M., Hoffmann, W. E., & Hajós, M. (2003). Auditory sensory gating in hippocampus and reticular thalamic neurons in anesthetized rats. *Biological Psychiatry*, *53*(3), 244–253.  
[https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(02\)01463-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(02)01463-4)
- Ladeby, R., Wirenfeldt, M., Garcia-Ovejero, D., Fenger, C., Dissing-Olesen, L., Dalmau, I., & Finsen, B. (2005). Microglial cell population dynamics in the injured adult central nervous system. *Brain Research. Brain Research Reviews*, *48*(2), 196–206.  
<https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2004.12.009>
- Lai, A. Y., Dhami, K. S., & Todd, K. G. (2009). Moving past the “neuroncentric” perspective: A role for glia in neuropsychiatric disorders. *Journal of Psychiatry & Neuroscience : JPN*, *34*(3), 173–174.
- Latysheva, N. V., & Rayevsky, K. S. (2003). Chronic neonatal N-methyl-D-aspartate receptor blockade induces learning deficits and transient hypoactivity in young rats. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, *27*(5), 787–794.  
[https://doi.org/10.1016/S0278-5846\(03\)00110-6](https://doi.org/10.1016/S0278-5846(03)00110-6)
- Lawrence, J. J., & McBain, C. J. (2003). Interneuron Diversity series: Containing the detonation—Feedforward inhibition in the CA3 hippocampus. In *Trends in Neurosciences* (Vol. 26, Issue 11, pp. 631–640). <https://doi.org/10.1016/j.tins.2003.09.007>
- Lawson, L. J., Perry, V. H., Dri, P., & Gordon, S. (1990). Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience*, *39*(1), 151–170.  
[https://doi.org/10.1016/0306-4522\(90\)90229-w](https://doi.org/10.1016/0306-4522(90)90229-w)
- Le Duigou, C., Simonnet, J., Teleńczuk, M. T., Fricker, D., & Miles, R. (2014). Recurrent synapses and circuits in the CA3 region of the hippocampus: An associative network. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *7*(January), 262. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00262>

- Lee, G., & Zhou, Y. (2019). NMDAR Hypofunction Animal Models of Schizophrenia. *Frontiers in Molecular Neuroscience, 12*. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00185>
- Lee, I., & Kesner, R. P. (2004). Encoding versus retrieval of spatial memory: Double dissociation between the dentate gyrus and the perforant path inputs into CA3 in the dorsal hippocampus. *Hippocampus, 14*(1), 66–76. <https://doi.org/10.1002/hipo.10167>
- LeGates, T. A., Kivarta, M. D., Tooley, J. R., Francis, T. C., Lobo, M. K., Creed, M. C., & Thompson, S. M. (2018). Reward behaviour is regulated by the strength of hippocampus–nucleus accumbens synapses. *Nature, 564*(7735), 258–262. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0740-8>
- Leinekugel, X., Khalilov, I., Ben-Ari, Y., & Khazipov, R. (1998). Giant Depolarizing Potentials: The Septal Pole of the Hippocampus Paces the Activity of the Developing Intact Septohippocampal Complex In Vitro. *Journal of Neuroscience, 18*(16). <https://www.jneurosci.org/content/18/16/6349>
- Leinekugel, X., Khazipov, R., Cannon, R., Hirase, H., Ben-Ari, Y., & Buzsáki, G. (2002). Correlated bursts of activity in the neonatal hippocampus in vivo. *Science (New York, N.Y.), 296*(5575), 2049–2052. <https://doi.org/10.1126/science.1071111>
- Lemonnier, E., Villeneuve, N., Sonie, S., Serret, S., Rosier, A., Roue, M., Brosset, P., Viellard, M., Ernoux, D. B., Rondeau, S., Thummler, S., Ravel, D., & Ben-Ari, Y. (2017). Effects of bumetanide on neurobehavioral function in children and adolescents with autism spectrum disorders. *Translational Psychiatry, 7*(3), e1056–e1056. <https://doi.org/10.1038/tp.2017.10>

- Leutgeb, S., Leutgeb, J. K., Moser, M. B., & Moser, E. I. (2005). Place cells, spatial maps and the population code for memory. *Current Opinion in Neurobiology*, *15*(6), 738–746.  
<https://doi.org/10.1016/j.conb.2005.10.002>
- Leys, C., Ley, C., Klein, O., Bernard, P., & Licata, L. (2013). Detecting outliers: Do not use standard deviation around the mean, use absolute deviation around the median. *Journal of Experimental Social Psychology*, *49*(4), 764–766.  
<https://doi.org/10.1016/j.jesp.2013.03.013>
- Li, J.-T., Zhao, Y.-Y., Wang, H.-L., Wang, X.-D., Su, Y.-A., & Si, T.-M. (2015). Long-term effects of neonatal exposure to MK-801 on recognition memory and excitatory–inhibitory balance in rat hippocampus. *Neuroscience*, *308*, 134–143.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.09.003>
- Li, W.-X., Dai, S.-X., Liu, J.-Q., Wang, Q., Li, G.-H., & Huang, J.-F. (2016). Integrated Analysis of Alzheimer’s Disease and Schizophrenia Dataset Revealed Different Expression Pattern in Learning and Memory. *Journal of Alzheimer’s Disease: JAD*, *51*(2), 417–425.  
<https://doi.org/10.3233/JAD-150807>
- Li, X. G., Somogyi, P., Ylinen, A., & Buzsáki, G. (1994). The hippocampal CA3 network: An in vivo intracellular labeling study. *The Journal of Comparative Neurology*, *339*(2), 181–208.  
<https://doi.org/10.1002/cne.903390204>
- Li, X., Ouyang, G., Usami, A., Ikegaya, Y., & Sik, A. (2010). Scale-free topology of the CA3 hippocampal network: A novel method to analyze functional neuronal assemblies. *Biophysical Journal*, *98*(9), 1733–1741. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.01.013>

- Lim, A. L., Taylor, D. A., & Malone, D. T. (2012). Consequences of early life MK-801 administration: Long-term behavioural effects and relevance to schizophrenia research. *Behavioural Brain Research*, 227, 276–286. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.10.052>
- Limatola, C., Lauro, C., Catalano, M., Ciotti, M. T., Bertollini, C., Angelantonio, S. D., Ragozzino, D., & Eusebi, F. (2005). Chemokine CX3CL1 protects rat hippocampal neurons against glutamate-mediated excitotoxicity. *Journal of Neuroimmunology*, 166(1), 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2005.03.023>
- Limatola, C., & Ransohoff, R. M. (2014). Modulating neurotoxicity through CX3CL1/CX3CR1 signaling. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8(August), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00229>
- Linkert, M., Rueden, C. T., Allan, C., Burel, J.-M., Moore, W., Patterson, A., Loranger, B., Moore, J., Neves, C., MacDonald, D., Tarkowska, A., Sticco, C., Hill, E., Rossner, M., Eliceiri, K. W., & Swedlow, J. R. (2010). Metadata matters: Access to image data in the real world. *Journal of Cell Biology*, 189(5), 777–782. <https://doi.org/10.1083/jcb.201004104>
- Liu, M. G., Chen, X. F., He, T., Li, Z., & Chen, J. (2012). Use of multi-electrode array recordings in studies of network synaptic plasticity in both time and space. *Neuroscience Bulletin*, 28(4), 409–422. <https://doi.org/10.1007/s12264-012-1251-5>
- Liu, X., Zhu, X., Halford, M., Xu, T., Henkemeyer, M., & Xu, N. (2018). Retrograde regulation of mossy fiber axon targeting and terminal maturation via postsynaptic Lnx1. *The Journal of Cell Biology*, 217(11), 4007–4024. <https://doi.org/10.1083/jcb.201803105>
- Lüttjohann, A., Fabene, P. F., & van Luijtelaar, G. (2009). A revised Racine's scale for PTZ-induced seizures in rats. *Physiology & Behavior*, 98(5), 579–586. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.09.005>

- MacLeod, L. S., Kogan, C. S., Collin, C. A., Berry-Kravis, E., Messier, C., & Gandhi, R. (2010). A comparative study of the performance of individuals with fragile X syndrome and Fmr1 knockout mice on Hebb-Williams mazes. *Genes, Brain and Behavior*, 9(1), 53–64.  
<https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2009.00534.x>
- Maggi, L., Scianni, M., Branchi, I., D'Andrea, I., Lauro, C., & Limatola, C. (2011). CX3CR1 deficiency alters hippocampal-dependent plasticity phenomena blunting the effects of enriched environment. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 5(October), 1–10.  
<https://doi.org/10.3389/fncel.2011.00022>
- Maggi, L., Trettel, F., Scianni, M., Bertollini, C., Eusebi, F., Fredholm, B. B., & Limatola, C. (2009). LTP impairment by fractalkine/CX3CL1 in mouse hippocampus is mediated through the activity of adenosine receptor type 3 (A3R). *Journal of Neuroimmunology*, 215(1–2), 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2009.07.016>
- Malvache, A., Reichinnek, S., Villette, V., & Haimerl, C. (2016). Awake hippocampal reactivations project onto orthogonal neuronal assemblies. *Science*, 353(6305).  
<https://doi.org/10.5061/dryad.5gk8j>
- Mao, H., Elkin, B. S., Genthikatti, V. V., Morrison, B., & Yang, K. H. (2013). Why Is CA3 More Vulnerable Than CA1 in Experimental Models of Controlled Cortical Impact-Induced Brain Injury? *Journal of Neurotrauma*, 30(17), 1521–1530.  
<https://doi.org/10.1089/neu.2012.2520>
- Marshall, G. A., Amariglio, R. E., Sperling, R. A., & Rentz, D. M. (2012). Activities of daily living: Where do they fit in the diagnosis of Alzheimer's disease? *Neurodegenerative Disease Management*, 2(5), 483–491. <https://doi.org/10.2217/nmt.12.55>
- Martínez, J., & Quiroga, R. Q. (2013). Spike Sorting. In *Principles of Neural Coding (First)*. CRC Press.



- Maynard, T. M., Sikich, L., Lieberman, J. A., & LaMantia, A.-S. (2001). Neural Development, Cell-Cell Signaling, and the “Two-Hit” Hypothesis of Schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*, 27(3), 457–476. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.schbul.a006887>
- McAuley, J. D., Stewart, A. L., Webber, E. S., Cromwell, H. C., Servatius, R. J., & Pang, K. C. H. (2009). Wistar–Kyoto rats as an animal model of anxiety vulnerability: Support for a hypervigilance hypothesis. *Behavioural Brain Research*, 204(1), 162–168. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.05.036>
- McAuliffe, J. J., Bronson, S. L., Hester, M. S., Murphy, B. L., Dahlquist-Topalá, R., Richards, D. A., & Danzer, S. C. (2011). Altered patterning of dentate granule cell mossy fiber inputs onto CA3 pyramidal cells in limbic epilepsy. *Hippocampus*, 21(1), 93–107. <https://doi.org/10.1002/hipo.20726>
- McEwen, B. S. (1994). The plasticity of the hippocampus is the reason for its vulnerability. *Seminars in Neuroscience*, 6(4), 239–246. <https://doi.org/10.1006/smns.1994.1031>
- McKinney, W. (2010). *Data Structures for Statistical Computing in Python*. 56–61. <https://doi.org/10.25080/Majora-92bf1922-00a>
- Medvedeva, Y. V., Ji, S. G., Yin, H. Z., & Weiss, J. H. (2017). Differential Vulnerability of CA1 versus CA3 Pyramidal Neurons After Ischemia: Possible Relationship to Sources of Zn<sup>2+</sup> Accumulation and Its Entry into and Prolonged Effects on Mitochondria. *The Journal of Neuroscience*, 37(3), 726–737. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3270-16.2016>
- Méndez-Salcido, F. A., Torres-Flores, M. I., Ordaz, B., & Peña-Ortega, F. (2022). Abnormal innate and learned behavior induced by neuron–microglia miscommunication is related to CA3 reconfiguration. *Glia*, 70(9), 1630–1651. <https://doi.org/10.1002/glia.24185>

- Milior, G., Lecours, C., Samson, L., Bisht, K., Poggini, S., Pagani, F., Deflorio, C., Lauro, C., Alboni, S., Limatola, C., Branchi, I., Tremblay, M.-E., & Maggi, L. (2016). Fractalkine receptor deficiency impairs microglial and neuronal responsiveness to chronic stress. *Brain, Behavior, and Immunity*, *55*, 114–125. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.07.024>
- Miller, C. L., & Freedman, R. (1995). The activity of hippocampal interneurons and pyramidal cells during the response of the hippocampus to repeated auditory stimuli. *Neuroscience*, *69*(2), 371–381. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(95\)00249-I](https://doi.org/10.1016/0306-4522(95)00249-I)
- Miocinovic, S., Somayajula, S., Chitnis, S., & Vitek, J. L. (2013). History, applications, and mechanisms of deep brain stimulation. *JAMA Neurology*, *70*(2), 163–171. <https://doi.org/10.1001/2013.jamaneurol.45>
- Miyamoto, A., Wake, H., Ishikawa, A. W., Eto, K., Shibata, K., Murakoshi, H., Koizumi, S., Moorhouse, A. J., Yoshimura, Y., & Nabekura, J. (2016). Microglia contact induces synapse formation in developing somatosensory cortex. *Nature Communications*, *7*(1), 12540. <https://doi.org/10.1038/ncomms12540>
- Miyamoto, S., Duncan, G. E., Marx, C. E., & Lieberman, J. A. (2005). Treatments for schizophrenia: A critical review of pharmacology and mechanisms of action of antipsychotic drugs. *Molecular Psychiatry*, *10*(1), 79–104. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001556>
- Mizutani, M., Pino, P. A., Saederup, N., Charo, I. F., Ransohoff, R. M., & Cardona, A. E. (2012). The Fractalkine Receptor but Not CCR2 Is Present on Microglia from Embryonic Development throughout Adulthood. *The Journal of Immunology*, *188*(1), 29–36. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100421>
- Modai, S., & Shomron, N. (2016). Molecular Risk Factors for Schizophrenia. *Trends in Molecular Medicine*, *22*(3), 242–253. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2016.01.006>

- Morrison, H., Young, K., Qureshi, M., Rowe, R. K., & Lifshitz, J. (2017). Quantitative microglia analyses reveal diverse morphologic responses in the rat cortex after diffuse brain injury. *Scientific Reports*, 7(1), 13211. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13581-z>
- Moser, E. I., Roudi, Y., Witter, M. P., Kentros, C., Bonhoeffer, T., & Moser, M. B. (2014). Grid cells and cortical representation. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(7), 466–481. <https://doi.org/10.1038/nrn3766>
- Moser, M. B., Moser, E. I., Forrest, E., Andersen, P., & Morris, R. G. (1995). Spatial learning with a minislab in the dorsal hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(21), 9697–9701. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.21.9697>
- Mossa, S., Barthélémy, M., Eugene Stanley, H., & Nunes Amaral, L. A. (2002). Truncation of Power Law Behavior in "Scale-Free" Network Models due to Information Filtering. *Physical Review Letters*, 88(13), 138701. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.88.138701>
- Moxon, K. A., Gerhardt, G. A., Bickford, P. C., Austin, K., Rose, G. M., Woodward, D. J., & Adler, L. E. (1999). Multiple single units and population responses during inhibitory gating of hippocampal auditory response in freely-moving rats. *Brain Research*, 825(1–2), 75–85. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(99\)01187-7](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(99)01187-7)
- Moy, S. S., Nadler, J. J., Perez, A., Barbaro, R. P., Johns, J. M., Magnuson, T. R., Piven, J., & Crawley, J. N. (2004). Sociability and preference for social novelty in five inbred strains: An approach to assess autistic-like behavior in mice. *Genes, Brain and Behavior*, 3(5), 287–302. <https://doi.org/10.1111/j.1601-1848.2004.00076.x>
- Mullard, A. (2018). Pfizer exits neuroscience. *Nature Reviews Drug Discovery*, 17(2), 86–86. <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.16>

- Multivariate Analysis of Variance (MANOVA). (2010). In N. Salkind, *Encyclopedia of Research Design*. SAGE Publications, Inc. <https://doi.org/10.4135/9781412961288.n257>
- Nadel, L., O'Keefe, J., & Black, A. (1975). Slam on the brakes: A critique of Altman, Brunner, and Bayer's response-inhibition model of hippocampal function. *Behavioral Biology*, *14*(2), 151–162. [https://doi.org/10.1016/S0091-6773\(75\)90148-0](https://doi.org/10.1016/S0091-6773(75)90148-0)
- Nieto-Posadas, A., Flores-Martínez, E., Lorea-Hernández, J. J., Rivera-Angulo, A. J., Pérez-Ortega, J., Bargas, J., & Peña-Ortega, F. (2014). Change in network connectivity during fictive-gasping generation in hypoxia: Prevention by a metabolic intermediate. *Frontiers in Physiology*, *5* JUL(July), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00265>
- Nikodemova, M., Kimyon, R. S., De, I., Small, A. L., Collier, L. S., & Watters, J. J. (2015). Microglial numbers attain adult levels after undergoing a rapid decrease in cell number in the third postnatal week. *Journal of Neuroimmunology*, *278*, 280–288. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2014.11.018>
- Nilssen, E. S., Doan, T. P., Nigro, M. J., Ohara, S., & Witter, M. P. (2019). Neurons and networks in the entorhinal cortex: A reappraisal of the lateral and medial entorhinal subdivisions mediating parallel cortical pathways. *Hippocampus*, *29*(12), 1238–1254. <https://doi.org/10.1002/hipo.23145>
- Nishiyori, A., Minami, M., Ohtani, Y., Takami, S., Yamamoto, J., Kawaguchi, N., Kume, T., Akaike, A., & Satoh, M. (1998). Localization of fractalkine and CX3CR1 mRNAs in rat brain: Does fractalkine play a role in signaling from neuron to microglia? *FEBS Letters*, *429*(2), 167–172. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)00583-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)00583-3)
- Ogren, S., & Stiedl, O. (2015). Passive avoidance. In *Encyclopedia of Psychopharmacology: Vol. Vol. 2* (Second, pp. 1220–1227). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-36172-2>

- O'Keefe, J., & Dostrovsky, J. (1971). The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Research*, *34*(1), 171–175.  
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(71\)90358-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(71)90358-1)
- Oliphant, T. E. (2007). Python for Scientific Computing. *Computing in Science and Engineering*, *9*(3).  
<https://doi.org/10.1109/MCSE.2007.58>
- O'Reardon, J. P., Solvason, H. B., Janicak, P. G., Sampson, S., Isenberg, K. E., Nahas, Z., McDonald, W. M., Avery, D., Fitzgerald, P. B., Loo, C., Demitrack, M. A., George, M. S., & Sackeim, H. A. (2007). Efficacy and Safety of Transcranial Magnetic Stimulation in the Acute Treatment of Major Depression: A Multisite Randomized Controlled Trial. *Biological Psychiatry*, *62*(11), 1208–1216. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2007.01.018>
- Pabon, M. M., Bachstetter, A. D., Hudson, C. E., Gemma, C., & Bickford, P. C. (2011). CX3CL1 reduces neurotoxicity and microglial activation in a rat model of Parkinson's disease. *Journal of Neuroinflammation*, *8*(1), 9. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-9>
- Pagani, F., Paolicelli, R. C., Murana, E., Cortese, B., Di Angelantonio, S., Zurolo, E., Guiducci, E., Ferreira, T. a, Garofalo, S., Catalano, M., D'Alessandro, G., Porzia, A., Peruzzi, G., Mainiero, F., Limatola, C., Gross, C. T., & Ragozzino, D. (2015). Defective microglial development in the hippocampus of Cx3cr1 deficient mice. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *9*(March), 111. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00111>
- Paolicelli, R. C., Bisht, K., & Tremblay, M.-Ã. (2014). Fractalkine regulation of microglial physiology and consequences on the brain and behavior. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *8*(May), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00129>
- Paolicelli, R. C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., Giustetto, M., Ferreira, T. A., Guiducci, E., Dumas, L., Ragozzino, D., & Gross, C. T. (2011). Synaptic pruning by

- microglia is necessary for normal brain development. *Science (New York, N.Y.)*, 333(6048), 1456–1458. <https://doi.org/10.1126/science.1202529>
- Peña-Ortega, F., Ordaz, B., Balleza-Tapia, H., Bernal-Pedraza, R., Márquez-Ramos, A., Carmona-Aparicio, L., & Giordano, M. (2010). Beta-amyloid protein (25-35) disrupts hippocampal network activity: Role of Fyn-kinase. *Hippocampus*, 20(1), 78–96. <https://doi.org/10.1002/hipo.20592>
- Pfisterer, U., & Khodosevich, K. (2017). Neuronal survival in the brain: Neuron type-specific mechanisms. *Cell Death & Disease* 2017 8:3, 8(3), e2643–e2643. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.64>
- Pierson, M., & Swann, J. (1991). Sensitization to noise-mediated induction of seizure susceptibility by MK-801 and phencyclidine. *Brain Research*, 560(1), 229–236. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)91237-U](https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)91237-U)
- Plataki, M. E., Diskos, K., Sougklakos, C., Velissariou, M., Georgilis, A., Stavroulaki, V., & Sidiropoulou, K. (2021). Effect of Neonatal Treatment With the NMDA Receptor Antagonist, MK-801, During Different Temporal Windows of Postnatal Period in Adult Prefrontal Cortical and Hippocampal Function. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 15. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnbeh.2021.689193>
- Pocock, J. M., & Kettenmann, H. (2007). Neurotransmitter receptors on microglia. *Trends in Neurosciences*, 30(10), 527–535. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.07.007>
- Poli, D., Pastore, V. P., & Massobrio, P. (2015). Functional connectivity in vitro neuronal assemblies. *Frontiers in Neural Circuits*, 9(October), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fncir.2015.00057>

- Pop, M. G., Crivii, C., & Opincariu, I. (2018). Anatomy and Function of the Hypothalamus. In *Hypothalamus in Health and Diseases*. IntechOpen.  
<https://doi.org/10.5772/intechopen.80728>
- Pritchett, K., & Mulder, G. U. Y. B. (2004). Hebb-Williams Mazes. *Contemporary Topics in Laboratory Animal Science*, June, 1–3.
- Prut, L., & Belzung, C. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: A review. *European Journal of Pharmacology*, 463(1), 3–33.  
[https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(03\)01272-X](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(03)01272-X)
- Püntener, U., Booth, S. G., Perry, V. H., & Teeling, J. L. (2012). Long-term impact of systemic bacterial infection on the cerebral vasculature and microglia. *Journal of Neuroinflammation*, 9(1), 146. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-146>
- Quiroga, R. Q. (2012). Concept cells: The building blocks of declarative memory functions. *Nature Reviews Neuroscience*, 13(8), 587–597. <https://doi.org/10.1038/nrn3251>
- Quiroga, R. Q. (2013). Gnostic cells in the 21st century. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 73(4), 463–471.
- Quiroga, R. Q., Reddy, L., Kreiman, G., Koch, C., & Fried, I. (2005). Invariant visual representation by single neurons in the human brain. *Nature*, 435(7045), 1102–1107.  
<https://doi.org/10.1038/nature03687>
- Quiroga, R. Q., Sakowitz, O. W., Basar, E., & Schürmann, M. (2001). Wavelet Transform in the analysis of the frequency composition of evoked potentials. *Brain Research Protocols*, 8(1), 16–24. [https://doi.org/10.1016/S1385-299X\(01\)00077-0](https://doi.org/10.1016/S1385-299X(01)00077-0)
- Rabinovitch, M. S., & Rosvold, H. E. (1951a). A closed-field intelligence test for rats. *Canadian Journal of Psychology*, 5(3), 122–128.

- Rabinovitch, M. S., & Rosvold, H. E. (1951b). A closed-field intelligence test for rats. *Canadian Journal of Psychology*, 5(3), 122–128.
- Ragozzino, D., Di Angelantonio, S., Trettel, F., Bertollini, C., Maggi, L., Gross, C., Charo, I. F., Limatola, C., & Eusebi, F. (2006). Chemokine fractalkine/CX3CL1 negatively modulates active glutamatergic synapses in rat hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience*, 26(41), 10488–10498. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3192-06.2006>
- Rall, W. (1969). Time constants and electrotonic length of membrane cylinders and neurons. *Biophysical Journal*, 9(12), 1483–1508. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(69\)86467-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(69)86467-2)
- Ramirez-Amaya, V., Balderas, I., Sandoval, J., Escobar, M. L., & Bermudez-Rattoni, F. (2001). Spatial long-term memory is related to mossy fiber synaptogenesis. *Journal of Neuroscience*, 21(18), 7340–7348. <https://doi.org/21/18/7340> [pii]
- Ransohoff, R. M., & Perry, V. H. (2009). Microglial Physiology: Unique Stimuli, Specialized Responses. *Annual Review of Immunology*, 27(1), 119–145. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132528>
- Rebola, N., Carta, M., & Mulle, C. (2017). Operation and plasticity of hippocampal CA3 circuits: Implications for memory encoding. *Nature Reviews Neuroscience*, 18(1), 208–220. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.10>
- Redish, A. D. (1999). *Beyond the cognitive map: From place cells to episodic memory*. MIT Press.
- Regier, P. S., Amemiya, S., & Redish, A. D. (2015). Hippocampus and subregions of the dorsal striatum respond differently to a behavioral strategy change on a spatial navigation task. *Journal of Neurophysiology*, 114(3), 1399–1416. <https://doi.org/10.1152/jn.00189.2015>



- Richardson, M. P., Strange, B. A., & Dolan, R. J. (2004). Encoding of emotional memories depends on amygdala and hippocampus and their interactions. *Nature Neuroscience*, 7(3), 278–285. <https://doi.org/10.1038/nn1190>
- Risold, P. Y., & Swanson, L. W. (1996). Structural evidence for functional domains in the rat hippocampus. *Science (New York, N.Y.)*, 272(5267), 1484–1486. <https://doi.org/10.1126/science.272.5267.1484>
- Risold, P. Y., & Swanson, L. W. (1997). Connections of the rat lateral septal complex. *Brain Research Reviews*, 24(2), 115–195. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(97\)00009-X](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(97)00009-X)
- Roberts, W. A. (2019). The role of context in animal memory. *Learning & Behavior*, 47(2), 117–130. <https://doi.org/10.3758/s13420-019-00380-x>
- Rogers, J. L., & Kesner, R. P. (2003). Cholinergic modulation of the hippocampus during encoding and retrieval. *Neurobiology of Learning and Memory*, 80(3), 332–342. [https://doi.org/10.1016/S1074-7427\(03\)00063-7](https://doi.org/10.1016/S1074-7427(03)00063-7)
- Rogers, J. T., Morganti, J. M., Bachstetter, A. D., Hudson, C. E., Peters, M. M., Grimmig, B. A., Weeber, E. J., Bickford, P. C., & Gemma, C. (2011a). CX3CR1 Deficiency Leads to Impairment of Hippocampal Cognitive Function and Synaptic Plasticity. *Journal of Neuroscience*, 31(45), 16241–16250. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3667-11.2011>
- Rollenhagen, A., & Lübke, J. H. R. (2010). The mossy fiber bouton: The “common” or the “unique” synapse? *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 2(MAR), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2010.00002>
- Rolls, E. (2013). The mechanisms for pattern completion and pattern separation in the hippocampus. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 7. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnsys.2013.00074>

- Rooney, S., Sah, A., Unger, M. S., Kharitonova, M., Sartori, S. B., Schwarzer, C., Aigner, L., Kettenmann, H., Wolf, S. A., & Singewald, N. (2020). Neuroinflammatory alterations in trait anxiety: Modulatory effects of minocycline. *Translational Psychiatry, 10*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41398-020-00942-y>
- Rossum, G. van, & L. F., D. Jr. (1995). *Python tutorial*.
- Sahakian, B. J., Bruhl, A. B., Cook, J., Killikelly, C., Savulich, G., Piercy, T., Hafizi, S., Perez, J., Fernandez-Egea, E., Suckling, J., & Jones, P. B. (2015). The impact of neuroscience on society: Cognitive enhancement in neuropsychiatric disorders and in healthy people. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 370*(1677), 20140214. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0214>
- Sankoorikal, G. M. V., Kaercher, K. A., Boon, C. J., Lee, J. K., & Brodtkin, E. S. (2006). A mouse model system for genetic analysis of sociability: C57BL/6J versus BALB/cJ inbred mouse strains. *Biological Psychiatry, 59*(5), 415–423. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.07.026>
- Santos, S. E. D., Medeiros, M., Porfirio, J., Tavares, W., Pessôa, L., Grinberg, L., Leite, R. E. P., Ferretti-Rebustini, R. E. L., Suemoto, C. K., Filho, W. J., Noctor, S. C., Sherwood, C. C., Kaas, J. H., Manger, P. R., & Herculano-Houzel, S. (2020). Similar Microglial Cell Densities across Brain Structures and Mammalian Species: Implications for Brain Tissue Function. *Journal of Neuroscience, 40*(24), 4622–4643. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2339-19.2020>
- Scharfman, H. E. (2016). The enigmatic mossy cell of the dentate gyrus. *Nat Rev Neurosci, 17*(9), 562–575. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.87>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K.,

- Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, *9*(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schuelert, N., Dorner-Ciossek, C., Brendel, M., & Rosenbrock, H. (2018). A comprehensive analysis of auditory event-related potentials and network oscillations in an NMDA receptor antagonist mouse model using a novel wireless recording technology. *Physiol Rep*, *6*(16). <https://doi.org/10.14814/phy2.13782>
- Schultz, C., & Engelhardt, M. (2014). Anatomy of the hippocampal formation. *Frontiers of Neurology and Neuroscience*, *34*, 6–17. <https://doi.org/10.1159/000360925>
- Schumm, S. N., Gabrieli, D., & Meaney, D. F. (2022). Plasticity impairment exposes CA3 vulnerability in a hippocampal network model of mild traumatic brain injury. *Hippocampus*, *32*(3), 231–250. <https://doi.org/10.1002/hipo.23402>
- Scoville, W. B., & Milner, B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, *20*(1), 11–21. <https://doi.org/10.1136/jnnp.20.1.11>
- Seabold, S., & Perktold, J. (2010). *Statsmodels: Econometric and Statistical Modeling with Python*. 92–96. <https://doi.org/10.25080/Majora-92bf1922-011>
- Seese, R. R., Wang, K., Yao, Y. Q., Lynch, G., & Gall, C. M. (2014). Spaced training rescues memory and ERK1/2 signaling in fragile X syndrome model mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(47), 16907–16912. <https://doi.org/10.1073/pnas.1413335111>
- Seibenhener, M. L., & Wooten, M. C. (2015). Use of the open field maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *Journal of Visualized Experiments*, *96*. <https://doi.org/10.3791/52434>

- Sellgren, C. M., Gracias, J., Watmuff, B., Biag, J. D., Thanos, J. M., Whittredge, P. B., Fu, T., Worringer, K., Brown, H. E., Wang, J., Kaykas, A., Karmacharya, R., Goold, C. P., Sheridan, S. D., & Perlis, R. H. (2019). Increased synapse elimination by microglia in schizophrenia patient-derived models of synaptic pruning. *Nature Neuroscience*, *22*(3), 374–385. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0334-7>
- Sellner, S., Paricio-Montesinos, R., Spieß, A., Masuch, A., Erny, D., Harsan, L. A., Elverfeldt, D. V., Schwabenland, M., Biber, K., Staszewski, O., Lira, S., Jung, S., Prinz, M., & Blank, T. (2016). Microglial CX3CR1 promotes adult neurogenesis by inhibiting Sirt 1/p65 signaling independent of CX3CL1. *Acta Neuropathologica Communications*, *4*(1), 102. <https://doi.org/10.1186/s40478-016-0374-8>
- Sheridan, G. K., & Murphy, K. J. (2013). Neuron-glia crosstalk in health and disease: Fractalkine and CX3CR1 take centre stage. *Open Biology*, *3*(1 DEC). <https://doi.org/10.1098/rsob.130181>
- Sheridan, G. K., Wdowicz, A., Pickering, M., Watters, O., Halley, P., O'Sullivan, N. C., Mooney, C., O'Connell, D. J., O'Connor, J. J., & Murphy, K. J. (2014). CX3CL1 is up-regulated in the rat hippocampus during memory-associated synaptic plasticity. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *8*(AUG). <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00233>
- Shimada, T., & Yamagata, K. (2018). Pentylentetrazole-Induced Kindling Mouse Model. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, *136*, e56573. <https://doi.org/10.3791/56573>
- Shore, D. I., Stanford, L., MacInnes, W. J., Klein, R. M., & Brown, R. E. (2001). Of mice and men: Virtual Hebb-Williams mazes permit comparison of spatial learning across species. *Cognitive, Affective and Behavioral Neuroscience*, *1*(1), 83–89. <https://doi.org/10.3758/CABN.1.1.83>

- Sierra, A., Tremblay, M.-Ã., & Wake, H. (2014). Never-resting microglia: Physiological roles in the healthy brain and pathological implications. *Frontiers in Cellular Neuroscience, 8*.  
<https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00240>
- Smith, J. C., Abdala, A. P. L., Borgmann, A., Rybak, I. A., & Paton, J. F. R. (2013). Brainstem respiratory networks: Building blocks and microcircuits. *Trends in Neurosciences, 36*(3), 152–162. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.11.004>
- Smith, S. E. P., Li, J., Garbett, K., Mirnics, K., & Patterson, P. H. (2007). Maternal Immune Activation Alters Fetal Brain Development through Interleukin-6. *Journal of Neuroscience, 27*(40), 10695–10702. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2178-07.2007>
- Smucny, J., Stevens, K. E., Olincy, A., & Tregellas, J. R. (2015). Translational utility of rodent hippocampal auditory gating in schizophrenia research: A review and evaluation. *Translational Psychiatry, 5*(6), e587–e587. <https://doi.org/10.1038/tp.2015.77>
- Song, D., Yang, Q., Lang, Y., Wen, Z., Xie, Z., Zheng, D., Yan, T., Deng, Y., Nakanishi, H., Quan, Z., & Qing, H. (2018). Manipulation of hippocampal CA3 firing via luminopsins modulates spatial and episodic short-term memory, especially working memory, but not long-term memory. *Neurobiology of Learning and Memory, 155*(February), 435–445.  
<https://doi.org/10.1016/j.nlm.2018.09.009>
- Soriano, S. G., Amaravadi, L. S., Wang, Y. F., Zhou, H., Yu, G. X., Tonra, J. R., Fairchild-Huntress, V., Fang, Q., Dunmore, J. H., Huszar, D., & Pan, Y. (2002). Mice deficient in fractalkine are less susceptible to cerebral ischemia-reperfusion injury. *Journal of Neuroimmunology, 125*(1), 59–65. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(02\)00033-4](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(02)00033-4)
- Spalding, K. L., Bergmann, O., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Huttner, H. B., Boström, E., Westerlund, I., Vial, C., Buchholz, B. A., Possnert, G., Mash, D. C., Druid, H., & Frisé, J.

- (2013). Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell*, 153(6), 1219–1227.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.002>
- Spellman, T., Rigotti, M., Ahmari, S. E., Fusi, S., Gogos, J. A., & Gordon, J. A. (2015). Hippocampal-prefrontal input supports spatial encoding in working memory. *Nature*, 522(7556), 309–314. <https://doi.org/10.1038/nature14445>
- Sporns, O. (2013). Structure and function of complex brain networks. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 15(3), 247–262. <https://doi.org/10.1137/S003614450342480>
- Squire, L. R. (2009). The Legacy of Patient H.M. for Neuroscience. *Neuron*, 18(9), 1199–1216.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.12.023>
- Squire, L. R., Stark, C. E. L., & Clark, R. E. (2004). The Medial Temporal Lobe. *Annual Review of Neuroscience*, 27(1), 279–306. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.27.070203.144130>
- Strange, B. A., Witter, M. P., Lein, E. S., & Moser, E. I. (2014). Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(10), 655–669.  
<https://doi.org/10.1038/nrn3785>
- Strauss, G. P., Bartolomeo, L. A., & Harvey, P. D. (2021). Avolition as the core negative symptom in schizophrenia: Relevance to pharmacological treatment development. *Npj Schizophrenia*, 7(1), 1–6. <https://doi.org/10.1038/s41537-021-00145-4>
- Strauss, G. P., Whearty, K. M., Morra, L. F., Sullivan, S. K., Ossenfort, K. L., & Frost, K. H. (2016). AVOLITION IN SCHIZOPHRENIA IS ASSOCIATED WITH REDUCED WILLINGNESS TO EXPEND EFFORT FOR REWARD ON A PROGRESSIVE RATIO TASK. *Schizophrenia Research*, 170(1), 198–204. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2015.12.006>

- Sturman, O., Germain, P.-L., & Bohacek, J. (2018). Exploratory rearing: A context- and stress-sensitive behavior recorded in the open-field test. *Stress, 21*(5), 443–452.  
<https://doi.org/10.1080/10253890.2018.1438405>
- Sunnen, C. N., Brewster, A. L., Lugo, J. N., Vanegas, F., Turcios, E., Mukhi, S., Parghi, D., D’Arcangelo, G., & Anderson, A. E. (2011). Inhibition of the mammalian target of rapamycin blocks epilepsy progression in NS-Pten conditional knockout mice. *Epilepsia, 52*(11), 2065–2075. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2011.03280.x>
- Suzuki, N., & Bekkers, J. M. (2012). Microcircuits Mediating Feedforward and Feedback Synaptic Inhibition in the Piriform Cortex. *Journal of Neuroscience, 32*(3), 919–931.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4112-11.2012>
- Szepesi, Z., Manouchehrian, O., Bachiller, S., & Deierborg, T. (2018). Bidirectional Microglia–Neuron Communication in Health and Disease. *Frontiers in Cellular Neuroscience, 12*(September), 1–26. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00323>
- Toscano-Silva, M., Gomes da Silva, S., Scorza, F. A., Bonvent, J. J., Cavalheiro, E. A., & Arida, R. M. (2010a). Hippocampal mossy fiber sprouting induced by forced and voluntary physical exercise. *Physiology and Behavior, 101*(2), 302–308.  
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2010.05.012>
- Toscano-Silva, M., Gomes da Silva, S., Scorza, F. A., Bonvent, J. J., Cavalheiro, E. A., & Arida, R. M. (2010b). Hippocampal mossy fiber sprouting induced by forced and voluntary physical exercise. *Physiology and Behavior, 101*(2), 302–308.  
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2010.05.012>
- Traissard, N., Herbeaux, K., Cosquer, B., Jeltsch, H., Ferry, B., Galani, R., Pernon, A., Majchrzak, M., & Cassel, J.-C. (2007). Combined Damage to Entorhinal Cortex and Cholinergic Basal

- Forebrain Neurons, Two Early Neurodegenerative Features Accompanying Alzheimer's Disease: Effects on Locomotor Activity and Memory Functions in Rats. *Neuropsychopharmacology*, 32(4), 851–871. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301116>
- Tremblay, M.-È., Lowery, R. L., & Majewska, A. K. (2010). Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience. *PLoS Biology*, 8(11), e1000527. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000527>
- Ueno, M., Fujita, Y., Tanaka, T., Nakamura, Y., Kikuta, J., Ishii, M., & Yamashita, T. (2013). Layer v cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development. *Nature Neuroscience*, 16(5), 543–551. <https://doi.org/10.1038/nn.3358>
- Utz, S. G., See, P., Mildenerger, W., Thion, M. S., Silvin, A., Lutz, M., Ingelfinger, F., Rayan, N. A., Lelios, I., Buttgereit, A., Asano, K., Prabhakar, S., Garel, S., Becher, B., Ginhoux, F., & Greter, M. (2020). Early Fate Defines Microglia and Non-parenchymal Brain Macrophage Development. *Cell*, 181(3), 557-573.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.03.021>
- Vallat, R. (2018). Pingouin: Statistics in Python. *Journal of Open Source Software*, 3(31), 1026. <https://doi.org/10.21105/joss.01026>
- van der Walt, S., Colbert, S. C., & Varoquaux, G. (2011). The NumPy Array: A Structure for Efficient Numerical Computation. *Computing in Science and Engineering*, 13.
- Van Erum, J., Van Dam, D., & De Deyn, P. P. (2019). PTZ-induced seizures in mice require a revised Racine scale. *Epilepsy & Behavior*, 95, 51–55. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2019.02.029>
- Vandecasteele, M., Varga, V., Berényi, A., Papp, E., Barthó, P., Venance, L., Freund, T. F., & Buzsáki, G. (2014). Optogenetic activation of septal cholinergic neurons suppresses sharp wave ripples and enhances theta oscillations in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(37), 13535–13540. <https://doi.org/10.1073/pnas.1411233111>



- Viana da Silva, S., Zhang, P., Haberl, M. G., Labrousse, V., Grosjean, N., Blanchet, C., Frick, A., & Mulle, C. (2019). Hippocampal Mossy Fibers Synapses in CA3 Pyramidal Cells Are Altered at an Early Stage in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Journal of Neuroscience*, *39*(21), 4193–4205. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2868-18.2019>
- Virtanen, P., Gommers, R., Oliphant, T. E., Haberland, M., Reddy, T., Cournapeau, D., Burovski, E., Peterson, P., Weckesser, W., Bright, J., van der Walt, S. J., Brett, M., Wilson, J., Millman, K. J., Mayorov, N., Nelson, A. R. J., Jones, E., Kern, R., Larson, E., ... van Mulbregt, P. (2020). SciPy 1.0: Fundamental algorithms for scientific computing in Python. *Nature Methods*, *17*(3), 261–272. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0686-2>
- Voronin, L. L., & Cherubini, E. (2003). “Presynaptic silence” may be golden. *Neuropharmacology*, *45*(4), 439–449. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(03\)00173-4](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(03)00173-4)
- Voronin, L. L., & Cherubini, E. (2004). “Deaf, mute and whispering” silent synapses: Their role in synaptic plasticity. *The Journal of Physiology*, *557*, 3–12. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.058966>
- Vyleta, N. P., & Jonas, P. (2014). Loose coupling between Ca<sup>2+</sup> channels and release sensors at a plastic hippocampal synapse. *Science (New York, N.Y.)*, *343*(6171), 665–670. <https://doi.org/10.1126/science.1244811>
- Wagner-Golbs, A., & Luhmann, H. J. (2012). Activity-dependent survival of developing neocortical neurons depends on PI3K signalling. *Journal of Neurochemistry*, *120*(4), 495–501. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07591.x>
- Walf, A. A., & Frye, C. A. (2007). The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature Protocols*, *2*(2), 322–328. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.44>

- Wang, Y.-L., Han, Q.-Q., Gong, W.-Q., Pan, D.-H., Wang, L.-Z., Hu, W., Yang, M., Li, B., Yu, J., & Liu, Q. (2018). Microglial activation mediates chronic mild stress-induced depressive- and anxiety-like behavior in adult rats. *Journal of Neuroinflammation*, *15*(1), 21.  
<https://doi.org/10.1186/s12974-018-1054-3>
- White, G. E., & Greaves, D. R. (2012). Fractalkine: A survivor's guide chemokines as antiapoptotic mediators. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *32*(3), 589–594.  
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.237412>
- Wilton, D. K., Dissing-Olesen, L., & Stevens, B. (2019). Neuron-Glia Signaling in Synapse Elimination. *Annual Review of Neuroscience*, *42*(1), 107–127.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-070918-050306>
- Winkler, Z., Kuti, D., Ferenczi, S., Gulyás, K., Polyák, Á., & Kovács, K. J. (2017). Impaired microglia fractalkine signaling affects stress reaction and coping style in mice. *Behavioural Brain Research*, *334*, 119–128. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.07.023>
- Witter, M. P. (2007). Intrinsic and extrinsic wiring of CA3: Indications for connectional heterogeneity. *Learning & Memory*, *14*(11), 705–713. <https://doi.org/10.1101/lm.725207>
- Witter, M. P. (2009). Hippocampal Formation. In M. D. Binder, N. Hirokawa, & U. Windhorst (Eds.), *Encyclopedia of Neuroscience* (pp. 1840–1845). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-29678-2\\_2212](https://doi.org/10.1007/978-3-540-29678-2_2212)
- Witter, M. P., & Amaral, D. G. (2004). Hippocampal Formation. In *The Rat Nervous System* (pp. 635–704). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-012547638-6/50022-5>
- Witter, M. P., Canto, C. B., Couey, J. J., Koganezawa, N., & O, K. C. (2014). *Architecture of spatial circuits in the hippocampal region*. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0515>

- Wolf, S. A., Boddeke, H. W. G. M., & Kettenmann, H. (2017). Microglia in Physiology and Disease. *Annual Review of Physiology*, 79(1), annurev-physiol-022516-034406.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034406>
- World Health Organization. (2001). *Mental and neurological disorders [Fact Sheet]*. World Health Organization.  
[https://www.who.int/whr/2001/media\\_centre/en/whr01\\_fact\\_sheet1\\_en.pdf](https://www.who.int/whr/2001/media_centre/en/whr01_fact_sheet1_en.pdf)
- Wu, Y., Dissing-Olesen, L., MacVicar, B. A., & Stevens, B. (2015). Microglia: Dynamic Mediators of Synapse Development and Plasticity. *Trends in Immunology*, 36(10), 605–613.  
<https://doi.org/10.1016/j.it.2015.08.008>
- Xiong, G., Metheny, H., Johnson, B. N., & Cohen, A. S. (2017). A Comparison of Different Slicing Planes in Preservation of Major Hippocampal Pathway Fibers in the Mouse. *Frontiers in Neuroanatomy*, 11(November), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fnana.2017.00107>
- Yang, M., Silverman, J. L., & Crawley, J. N. (2011). Automated three-chambered social approach task for mice. *Current Protocols in Neuroscience*, SUPPL. 56.  
<https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0826s56>
- Yegenoglu, A., Denker, M., & Grün, S. (2018). *Collaborative HPC-enabled workflows on the HBP Collaboratory using the Elephant framework*. INM-ICS Retreat 2018. <https://juser.fz-juelich.de/record/850028>
- Yona, S., Kim, K.-W., Wolf, Y., Mildner, A., Varol, D., Breker, M., Strauss-Ayali, D., Viukov, S., Guilliams, M., Misharin, A., Hume, D. A., Perlman, H., Malissen, B., Zelzer, E., & Jung, S. (2013). Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity*, 38(1), 79–91.  
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.12.001>

- Young, K., & Morrison, H. (2018). Quantifying Microglia Morphology from Photomicrographs of Immunohistochemistry Prepared Tissue Using ImageJ. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, 136, e57648. <https://doi.org/10.3791/57648>
- Zakharov, A., Lotfullina, N., & Khazipov, R. (2016). Impairments to the Giant Depolarizing Potentials After the Third Trimester Equivalent Ethanol Exposure in the Neonatal Rat. *BioNanoScience*, 6(4), 523–527. <https://doi.org/10.1007/s12668-016-0277-y>
- Zhan, L., Krabbe, G., Du, F., Jones, I., Reichert, M. C., Telpoukhovskaia, M., Kodama, L., Wang, C., Cho, S., Sayed, F., Li, Y., Le, D., Zhou, Y., Shen, Y., West, B., & Gan, L. (2019). Proximal recolonization by self-renewing microglia re-establishes microglial homeostasis in the adult mouse brain. *PLOS Biology*, 17(2), e3000134. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000134>
- Zhan, Y. (2015). Theta frequency prefrontal-hippocampal driving relationship during free exploration in mice. *Neuroscience*, 300, 554–565. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.05.063>
- Zhan, Y., Paolicelli, R. C., Sforzini, F., Weinhard, L., Bolasco, G., Pagani, F., Vyssotski, A. L., Bifone, A., Gozzi, A., Ragozzino, D., & Gross, C. T. (2014). Deficient neuron-microglia signaling results in impaired functional brain connectivity and social behavior. *Nature Neuroscience*, 17(3), 400–406. <https://doi.org/10.1038/nn.3641>
- Zhang, Q., Wang, R., Scott, E., Han, D., Dong, Y., Tu, J., Yang, F., Reddy Sareddy, G., Vadlamudi, R. K., & Brann, D. W. (2013). Hypersensitivity of the hippocampal CA3 region to stress-induced neurodegeneration and amyloidogenesis in a rat model of surgical menopause. *Brain*, 136(5), 1432–1445. <https://doi.org/10.1093/brain/awt046>

- Zhang, S.-J., Ye, J., Couey, J. J., Witter, M., Moser, E. I., & Moser, M.-B. (2014). Functional connectivity of the entorhinal–hippocampal space circuit. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1635), 20120516.  
<https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0516>
- Zhao, X.-F., Alam, M. M., Liao, Y., Huang, T., Mathur, R., Zhu, X., & Huang, Y. (2019). Targeting Microglia Using Cx3cr1-Cre Lines: Revisiting the Specificity. *ENeuro*, 6(4), ENEURO.0114-19.2019. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0114-19.2019>

## Anexo 1

# Efectos divergentes, dependientes de la edad, de la depleción del *Cx3cr1* en un novedoso modelo de doble “hit”

## Introducción

La esquizofrenia y otras patologías neuropsiquiátricas han presentado históricamente un desafío particular en la identificación de su etiología, fisiopatología y, en consecuencia, el desarrollo de tratamientos eficaces (Braff & Braff, 2013). Un obstáculo principal en el estudio de estas patologías es la escasez de modelos animales apropiados para la investigación preclínica que capturen fehacientemente los diversos aspectos fisiopatológicos y clínicos, y que permitan la identificación de procesos celulares, blancos moleculares y factores etiológicos que, finalmente, permitan el desarrollo de mejores opciones terapéuticas (Guerrin et al., 2021).

La esquizofrenia presenta un escenario clínico y fisiopatológico singularmente complejo que involucra alteraciones en varios sistemas de neurotransmisión, incluyendo el dopaminérgico, el glutamatérgico y el GABAérgico (S. Miyamoto et al., 2005; Modai & Shomron, 2016), que se traduce en una amplia gama de síntomas asociados a estos sistemas de neurotransmisión y clasificados como positivos (e.g. psicosis, alucinaciones, agresividad, agitación locomotriz), negativos (e.g. aplanamiento emocional, aislamiento social, anhedonia, hipervigilancia) y cognitivos (e.g. memoria, atención, procesamiento lógico) (S. Miyamoto et al., 2005). De esta miríada de síntomas sólo los positivos son controlados adecuadamente con la terapéutica disponible actualmente (Keefe & Harvey, 2012; S. Miyamoto et al., 2005).

Un creciente cuerpo de evidencia involucra al sistema inmune y los procesos de neuroinflamación como uno de los principales factores en la etiología de la esquizofrenia (Feigenson et al., 2014). Esta diversidad de factores ha dado origen a la denominada hipótesis del doble “hit” (Bayer et al., 1999), según la cual una predisposición genética o ambiental, primer “hit”, incrementa la susceptibilidad del individuo a los efectos de un insulto posterior, segundo “hit”, que desencadena el conjunto heterogéneo de síntomas que integran la esquizofrenia (Bayer et al., 1999; Maynard et al., 2001).

La búsqueda de un modelo de doble “hit” que capture los aspectos clínicos (conductuales en modelos animales) y neurobiológicos (i.e. anatómicos, moleculares, fisiológicos) ha combinado un gran número de factores genéticos (e.g. DISC1, Nurr1, Nrg1, reelina) y ambientales (e.g. separación materna, activación inmune materna, aislamiento, estrés agudo y crónico), como factores predisponentes, con una amplia variedad de manipulaciones farmacológicas (e.g. PCP, MK-801, corticosterona, metanfetamina, cannabis) y ambientales (e.g. aislamiento social, derrota social, estrés crónico impredecible), con resultados heterogéneos con respecto al sinergismo de estos factores en el desarrollo de alteraciones conductuales o neurobiológicas (Feigenson et al., 2014; Guerrin et al., 2021).

Recientemente, ha incrementado el interés por el papel de la microglia en el desarrollo y el mantenimiento de la estructura y función los circuitos neuronales en el contexto de enfermedades neuropsiquiátricas (Blank & Prinz, 2013; Inta et al., 2017). La manipulación de la microglia, a través de su señalización con el sistema del complemento (Druart et al., 2021; Sellgren et al., 2019) y la vía de la fractalquina (Méndez-Salcido et al., 2022; Paolicelli et al., 2011a; Y. Zhan et al., 2014b), producen alteraciones importantes en la consolidación y la poda de sinapsis y, consecuentemente, en la transmisión glutamatérgica, hallazgos clásicamente relacionados a la esquizofrenia (Feinberg, 1982; Germann et al., 2021; Keshavan et al., 2020). Adicionalmente, diversos reportes consistentemente han encontrado alteraciones en los niveles de expresión del *Cx3cr1* en pacientes con esquizofrenia (Bergon et al., 2015; Fries et al., 2018; W.-X. Li et al., 2016), así como la prevalencia de una variante de este receptor asociada a un mayor riesgo de padecer esta enfermedad (Ishizuka et al., 2017b).

La administración neonatal de antagonistas NMDA (e.g. MK-801, PCP) es un modelo ampliamente estudiado que induce apoptosis neuronal y retraso en el crecimiento de manera aguda y, subsecuentemente, alteraciones conductuales en la adultez similares a los síntomas cognitivos de la esquizofrenia incluyendo dificultades en tareas de memoria contextual, hiperlocomoción, disminución de la inhibición por pre-pulso, así como alteraciones en la navegación espacial y la memoria de trabajo (Baier et al., 2009; Coleman et al., 2009; Lim et al., 2012). Estos efectos cognitivos se han asociado a alteraciones en la plasticidad sináptica (Hernández-Frausto et al., 2019), la expresión de receptores NMDA (Baier et al., 2009; G. Lee & Zhou, 2019) y la fisiología de las neuronas GABAérgicas (K. S. Jones et al., 2014).

La similitud de los efectos cognitivos y sinápticos descritos hace intrigante la posibilidad de una interacción sinérgica entre estos factores en un novedoso modelo de doble “hit” en el cual hipotetizamos que el trasfondo genético del ratón *Cx3cr1*<sup>-/-</sup> incrementaría la susceptibilidad de los sujetos al bloqueo neonatal de los receptores NMDA.

## **Materiales y Métodos**

Los protocolos experimentales que integran este proyecto fueron aprobados por el comité de bioética del Instituto de Neurobiología de la UNAM, en apego a la norma oficial mexicana para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999).

### **Sujetos Experimentales**

Ratones hembras y machos de la cepa *Cx3cr1<sup>-/-</sup>* (KO) fueron adquiridos del laboratorio Jackson (cepa C57BL/6J, código 025524) (Yona et al., 2013) y cruzados con congéneres de la cepa “silvestre” C57BL/6J (WT) en la Unidad de Ratones Transgénicos. Se establecieron unidades de reproducción con parejas homocigotas *Cx3cr1<sup>-/-</sup>* o “silvestres” de cuyas camadas fueron utilizados crías de ambos sexos. Las unidades de reproducción y los animales de experimentación fueron alojados con alimento estándar y agua *ad libitum*, en condiciones de temperatura controlada (24°C) y ciclo de luz/oscuridad de 12hr.

### **Administración neonatal de MK-801 y evaluación del crecimiento**

Las dosis de MK-801 elegidas representan dosis dentro del rango utilizado en ratones previamente (Coleman et al., 2009; Fredriksson & Archer, 2004; Lim et al., 2012).

Al día cinco post-natal (P5), considerando el día de nacimiento como día cero (P0), las crías de las unidades reproductoras de ambos genotipos fueron asignadas aleatoriamente a uno de tres grupos experimentales, los cuales recibieron salina (NaCl 0.9%, Solución CS, PiSA Farmacéutica, México), 0.5mg/kg de MK-801 (Maletao de dizolcipina, Sigma) o 1mg/kg de MK-801 vía I.P. cada 24h durante cinco días consecutivos (P5-P9) (Coleman et al., 2009; Fredriksson & Archer, 2004). Los animales experimentales fueron pesados diariamente desde el día P5 hasta el día P35 y cada cinco días, subsecuentemente, hasta el día P90. En caso de defunción, se le atribuyó al tratamiento si el sujeto presentó previamente deterioro de su estado general y enlentecimiento significativo o arresto de su desarrollo en los días previos a la defunción, si ésta se presentó durante el tratamiento o hasta cinco días después.



## **Evaluación de la apoptosis neuronal (Tinción de Nissl)**

Para la estimación de apoptosis neuronal se interrumpió el esquema de administración del tratamiento al cuarto día (esto es 24h después de la tercera administración) y las crías fueron anestesiadas con sevoflurano al 2%, decapitadas y el cerebro fue removido y fijado en solución de paraformaldehído (PFA) al 4% en amortiguador de fosfatos (PBS, en mM: 10 fosfatos, 137 NaCl, 0.27 KCl, Sigma) durante una noche. Posteriormente, los encéfalos fueron sumergidos en solución neuroprotectora de sacarosa (sacarosa al 30% en PBS) hasta su precipitación y, subsecuentemente, congelados en bloques con compuesto de óptima temperatura para corte. (Tissue-Tek O.C.T., Sakura Finetek). Se obtuvieron rebanadas de 30 $\mu$ m de espesor en criostato (CM 350S, Leica) desde la corteza frontal hasta el hipocampo ventral, las cuales fueron montadas en portaobjetos gelatinizados para la realización de la tinción de Nissl.

### *Procedimiento*

La tinción de Nissl se llevó a cabo sometiendo las muestras a un tren de alcohol reverso comenzando con xileno (mezcla de isómeros de xileno, Sigma), seguido de concentraciones decrecientes de etanol (etanol anhidro, Sigma) (95%, 70%, 50%) y, finalmente, rehidratadas en agua destilada. Posteriormente, las muestras fueron sumergida en solución de violeta de cresilo (Merck) al 0.1% en amortiguador de acetato por 10-15min a ~50C°. Posteriormente, se enjuagó el exceso de tinción en agua destilada y las muestras fueron deshidratadas mediante la sucesiva inmersión en un tren de etanol (50%, 70%, 95%), finalizando con dos inmersiones en xileno. Al finalizar, las muestras se dejaron secar al aire y, posteriormente, fueron cubiertas con DPX (Sigma) y cuberobjetos.

### *Microscopía*

Se obtuvieron fotomicrografías en campo claro (DMC5400, Leica, Alemania) a 10X y 40X con una resolución de 2048 X 1538 PPI de regiones corticales y estriatales de al menos tres campos en tres cortes por sujeto y tres sujetos por grupo experimental.

### *Análisis*

Se realizó cuantificación manual de células picnóticas y/o cuerpos apoptóticos en el programa Fiji (Schindelin et al., 2012) con ayuda del plugin Cell Counter.

## **Fenotipificación Conductual**

La fenotipificación conductual del presente modelo de doble “hit” se llevó a cabo con ratones de ambos sexos de cada grupo experimental al terminar el seguimiento del crecimiento (P90) y se realizaron entre el cuarto y el decimosegundo mes de vida comenzando por las conductas innatas (anidación y excavación), seguidas de pruebas de ansiedad no condicionada (campo abierto) y exploración espacial (laberinto en Y), para finalizar con la prueba de memoria contextual (evitación inhibitoria).

### **Anidación (Nesting)**

La anidación es una conducta ampliamente encontrada en diversas especies de animales y es expresada innatamente en roedores (Gaskill et al., 2013). Es una conducta importante para la conservación de calor, para actividades reproductivas, para la protección del ambiente y de los depredadores (Deacon, 2006).

#### *Procedimiento*

Para la evaluación de la conducta de anidación se siguió el protocolo y puntuación reportada por R.M.J. Deacon previamente (Deacon, 2012; Deacon, 2006), utilizando almohadillas de algodón de 5cm x 5cm como material de anidación. Los ratones fueron habituados al material en un ensayo de anidación en el cual una almohadilla fue colocada en su caja de alojamiento antes de la fase de oscuridad del ciclo diario y se dejó durante una noche. La puntuación de anidación no fue determinada para esta prueba grupal. Al contrario, 48h después, los sujetos fueron alojados individualmente en cajas limpias y se colocó una almohadilla en cada caja para determinar el puntaje de anidación la mañana siguiente según la escala de Deacon (Deacon, 2006).

### **Excavación**

#### *Procedimiento*

La conducta de excavación se realizó de manera similar en que se describió previamente en el cuerpo principal de la tesis.

## **Campo Abierto**

El campo abierto fue utilizado como una prueba de exploración y ansiedad no condicionada (Seibenhener & Wooten, 2015a; Sturman et al., 2018).

### *Procedimiento*

La prueba se realizó de manera automatizada en el sistema Superflex/Fussion (Digiscan Animal Activity Monitor, Onmitech Electronics), en una cámara de 40x40x30cm con paredes de acrílico transparente, uniformemente iluminada y colocada en una habitación con temperatura controlada. Cada sujeto fue colocado individualmente en una cámara limpia y se le dejó explorar libremente por 5min. La actividad exploratoria horizontal (desplazamiento) y vertical (levantamientos o *rearing*) fue detectada.

### *Análisis*

El desplazamiento horizontal y vertical de los sujetos fue registrado automáticamente por el sistema Superflex/Fussion. Las variables elegidas a evaluar fueron: la distancia total recorrida, el tiempo de inmovilidad, el porcentaje de tiempo en el centro de la arena y el número de episodios de actividad vertical (*rearing*) (Seibenhener & Wooten, 2015a; Sturman et al., 2018).

## **Laberinto en Y (alternancia espontánea)**

El laberinto en Y fue utilizado con un protocolo de alternancia espontánea con el objetivo de evaluar la memoria espacial a corto plazo (Kraeuter et al., 2019).

### *Procedimiento*

El aparato utilizado consiste en un laberinto en forma de Y de acrílico de 4mm de espesor color gris claro con todos los brazos son de medidas idénticas (21x15.5x7cm) colocado en el centro de un cuarto experimental e iluminado uniformemente desde el techo. Cada sujeto experimental fue colocado en uno de los brazos aleatoriamente elegido, mirando a la pared más distal del pasillo y se le dejó explorar libremente por 10min y, posteriormente, fue devuelto a su caja de alojamiento. Las sesiones de exploración fueron videograbadas para su posterior análisis.

### *Análisis*

Las grabaciones fueron analizadas en el programa SAMRT (v.3, Panlab, Harvard Apparatus) y el número de entradas en cada brazo, número de alternancias completas (visitas a los tres brazos

consecutivamente) y porcentaje de alternancias completas (fracción de alternancias completas realizadas de todas las posibles de acuerdo al número de entradas a los brazos del laberinto realizadas) fueron cuantificadas (Kraeuter et al., 2019).

## **Prueba de Evitación Pasiva**

La prueba de evitación pasiva se realizó como una evaluación de la función de memoria contextual de los sujetos experimentales (Ogren & Stiedl, 2015).

### *Procedimiento*

El aparato consiste en una caja de acrílico traslúcido dividida en dos cámaras por una puerta de guillotina, el primer compartimento cuyo piso consiste en una serie de bastones de metal fue iluminado con un foco incandescente de 10W, el segundo compartimento no se encuentra iluminado y sus paredes y piso son de acero inoxidable en continuidad eléctrica. Este segundo compartimento fue electrificado con el uso de un generador de pulsos (S-48 Square Pulse Generator, Grass Instruments) conectado a una unidad generadora de corriente (Constant Current Unit 1-A, Grass Instruments).

Primeramente, cada sujeto fue familiarizado con el aparato, colocándolo en el compartimento iluminado y se le dejó explorar ambas cámaras durante 5min. Al día siguiente, cada sujeto fue colocado en el compartimento iluminado, la puerta hacia el otro compartimento se abrió después de 30s y se cuantificó la latencia del sujeto en cruzar al otro compartimento. Al cruzar completamente, se cerró la puerta y 5s después se administró un choque eléctrico (0.1mA por 5s). Diez segundos después el sujeto fue retirado y devuelto a su caja de alojamiento. Dos horas después, se realizó la prueba de adquisición de la asociación entre el contexto (compartimento no iluminado) y el estímulo no condicionado (choque eléctrico) colocando al sujeto de nuevo en la cámara iluminada y abriendo la compuerta al compartimento no iluminado 30s después. Se cuantificó la latencia de cruce al compartimento contralateral con un límite máximo de 300s. Una prueba subsecuente de retención de esta asociación (memoria contextual) se llevó a cabo 24h después de manera similar.

## **Registros electrofisiológicos**

Se realizaron registros electrofisiológicos del hipocampo dorsal *in vivo*, bajo anestesia con uretano, utilizando arreglos de multielectrodos con el objetivo de evaluar cambios en la composición espectral del potencial de campo (LFP, por sus siglas en inglés) en las principales regiones del

hipocampo (giro dentado, DG; región 3 del *Cornu Ammonis*, CA3; región 1 del *Cornu Ammonis*) relacionadas con las manipulaciones experimentales. Adicionalmente, un segundo objetivo fue evaluar la integridad del filtrado sensorial (*sensory gating*); uno de los pocos correlatos neurobiológicos consistentemente encontrados en pacientes esquizofrénicos es la pérdida de la atenuación en la respuesta al segundo de un par de estímulos administrados con un intervalo corto entre ellos (Adler et al., 1998; Brockhaus-Dumke et al., 2008). La pérdida del filtrado sensorial es un fenómeno reproducible en modelos animales y ampliamente estudiado en el contexto de modelos traslacionales de esquizofrenia y en el estudio de los efectos de diversas manipulaciones farmacológicas o genéticas (Krause et al., 2003; Schuelert et al., 2018; Smucny et al., 2015).

### *Procedimiento*

Se preparó una solución fresca de uretano en solución salina (0.1g/ml) al inicio de cada sesión de registro. Se calculó la dosis total de uretano según el peso del sujeto (1.3-1.5g/kg, I.P.) y se administró la mitad del volumen inicialmente. El efecto del uretano es lento en establecerse, durante este período se procedió a la tricotomía total del cráneo del roedor y la asepsia y antisepsia del mismo (Microdacyn, Sanfer). Se administró la segunda mitad de anestésico 30min aprox. después de la primera administración y se verificó la pérdida del reflejo palpebral y de retracción ante un estímulo nocivo.

Posteriormente, se colocó al ratón en el marco estereotáxico (#51500U, Stoelting) y se realizó una incisión antero-posterior por la línea media para exponer el cráneo. Mediante disección roma se retiró el periostio de los huesos del cráneo expuesto y se localizaron Bregma y Lambda. También, se verificó la horizontalidad del plano antero-posterior. Se realizó una craneotomía cuadrada entre las coordenadas: -1.5 a -2.5mm antero-posterior (AP) y  $\pm 1$  a  $\pm 3$ mm medio-lateral (ML) con respecto a Bregma. Después de retirar el hueso se mantuvo la humedad de la superficie meníngea con solución salina. Se realizó una segunda craneotomía circular en el hemisferio contralateral en similares coordenadas, pero de menor tamaño para la colocación de un electrodo de referencia esférico de plata clorada sobre la superficie meníngea y, adicionalmente, se insertó un tornillo de acero inoxidable en el hueso occipital del cráneo como tierra.

Antes de su uso, se impregnó la sonda de multielectrodos con una solución de Dil (1,1'-Dioctadecil-3,3,3',3'-Tetrametilindocarbocianina Perclorato, Invitrogen) al 1% (p/v) en etanol y se dejó secar. Se colocó la sonda de multielectrodos de 32 canales (A4x8-5mm-200-400-177, NeuroNexus) conectada al amplificador/digitalizador (RHD2132, Intan technologies) de modo que la punta del *shank* más medial quedara en las coordenadas: -2mm AP y  $\pm 1.3$ mm ML y comenzó el descenso a una velocidad de 50 $\mu$ m/min con un continuo monitoreo de la actividad electrofisiológica en el sistema

de adquisición (RHD2000 Interface Board y RHX Data Acquisition Software, Intan Technologies). Al llegar al hipocampo se disminuyó la velocidad de descenso a 10 $\mu$ m/min hasta llegar a -2.3mm dorso-ventral (DV) con respecto a Bregma y se dejó estabilizar por 30min con una frecuencia de adquisición de 25KHz y filtrado de banda ancha (0.28Hz-7.6KHz).

### **Actividad Espontánea**

Las coordenadas descritas fueron seleccionadas de modo que la punta del *shank* más medial de la sonda quedara en el espesor de la hoja infrapiramidal del DG ( $\pm$  1.3mm ML, -2mm AP, -2.3mm DV) y la punta del *shank* más lateral en el espesor de CA3 en la región del origen de la fimbria ( $\pm$  2.5mm ML, -2mm AP, -2.3mm DV). La extensión del arreglo de electrodos cubrió de esta manera todos los campos y capas del hipocampo en su eje transversal. El electrodo interno de referencia en la sonda fue utilizado en las capas superficiales de la corteza.

Transcurrido el periodo de estabilización, se registró la actividad espontánea de todos los canales durante 30min con el sistema.

### **Potenciales Auditivos Evocados**

Al terminar el período de registro de actividad espontánea se realizaron registros episódicos (*sweeps*) con estimulación auditiva en un protocolo de estímulos pareados comandados desde una computadora adicional en el ambiente Matlab (MathWorks) con el uso del paquete Psychtoolbox-3 (Brainard, 1997; Kleiner et al., 2007): 140 ensayos de tonos de 3KHz y 20ms de duración pareados con 500ms de intervalo administrados cada 10s. La adquisición y el estímulo auditivo fueron sincronizados e iniciados con un generador de pulsos (Master-8, A.M.P.I.).

Finalmente, se administró una dosis letal de pentobarbital (70mg/kg, Pisabental, PiSA) y se monitorizó la actividad neuronal hasta su desaparición total. Posteriormente, se verificó la ausencia de signos vitales y se retiró la sonda de multielectrodos. Se disecó el cerebro y se realizaron cortes coronales para verificar el sitio de registro.

### **Análisis**

Para el análisis de los registros de actividad espontánea se eligió un canal representativo de cada región de interés en el hipocampo: CA1, CA3, y DG.

Los registros de LFP fueron preprocesados y analizados con código desarrollado en Python con el uso de bibliotecas ampliamente reconocidas incluyendo: *Scipy* (Virtanen et al., 2020), *Numpy* (van der Walt et al., 2011), *Elephant* (Yegenoglu et al., 2018) y *Neo* (Garcia et al., 2014).

El espectro de potencia de cada registro fue calculado en segmentos de 1min elegidos aleatoriamente, los cuales previamente fueron filtrados a 250Hz (filtro pasa bajas Butterworth de décimo orden) y se redujo la resolución de muestreo a 1KHz. El espectro se calculó con el periodograma de Welch en toda la longitud del segmento (1min) en ventanas de 2s (resolución de 0.5Hz) sin solapamiento, con ventana de Hanning y con corrección lineal de tendencia (Kramer & Eden, 2016).

El poder total y el poder absoluto de las bandas delta (0.5-2.5), theta (3-6) (“theta del uretano”, (Kramis et al., 1975; Vandecasteele et al., 2014)) y gamma lento (30-50) fueron calculados a partir del periodograma obtenido. El poder relativo de cada banda fue calculado como el cociente de su poder absoluto y el poder total del espectro.

Los cambios en el poder relativo del potencial de campo fueron analizados mediante un modelo multivariado de varianza en el cual una composición lineal del poder relativo de todas las bandas fue analizada en función de las variables independientes: sitio de registro (DG, CA3, CA1), tratamiento y genotipo (cuando fue apropiado) y las posibles combinaciones entre ellas. En caso de significancia estadística, cada variable dependiente (banda) fue analizada mediante ANOVA de múltiples vías con las mismas variables dependientes como factores. El umbral de significancia estadística en el análisis de cada variable dependiente fue ajustado según la fórmula:  $\alpha/k$ , donde  $k$  es el número de variables dependientes (“Multivariate Analysis of Variance (MANOVA),” 2010).

Los registros de estimulación auditiva fueron preprocesados de manera similar con un filtro pasa-bajas de 250Hz. La respuesta de todos los electrodos al primer estímulo (estímulo condicionado (CS, por sus siglas en inglés)) fue inspeccionada visualmente y se eligió el canal dentro de la región CA3 con mejor relación señal/ruido para el análisis. En este canal se buscaron computacionalmente los picos y valles de la señal dentro de una ventana de 100ms después de la señal de disparo del estímulo auditivo. Visualmente, se determinó el pico y el valle correspondientes a P20 y N40 (Smucny et al., 2015) y se determinó su amplitud, latencia (latencia de N40 del estímulo condicionado, LAMP, por sus siglas en inglés) y la diferencia en amplitud entre ellos (amplitud del estímulo condicionado, CAMP) (Dissanayake et al., 2008; Krause et al., 2003). De manera similar se buscaron los picos y valles de la respuesta al segundo estímulo (estímulo de prueba, TS, por sus siglas en inglés) y se determinaron los mismos parámetros (latencia, TLAT, y amplitud, TAMP, del estímulo de prueba). Finalmente, la atenuación fue expresada como el cociente de la amplitud del TS y la amplitud del CS; T/C (Dissanayake et al., 2008; Krause et al., 2003).

## **Susceptibilidad y severidad de las crisis epilépticas inducidas por pentilentetrazol (PTZ)**

Un efecto paradójico del tratamiento neonatal con PTZ es el incremento en la susceptibilidad o la severidad a crisis convulsivas en la adultez (Gorter et al., 1991; Pierson & Swann, 1991). Este fenómeno es sin embargo poco estudiado, especialmente en el ratón. Por otro lado, hay reportes contradictorios sobre los efectos de la interrupción de la vía de la fractalquina en modelos de crisis convulsivas con un reporte indicando que la depleción del Cx3cr1 aumenta la frecuencia de las crisis epilépticas y empeora el daño asociado a las mismas (Eyo et al., 2016) y otro encontrando efectos protectores de la interrupción aguda de esta vía (Ali et al., 2015).

Por lo tanto, se caracterizaron los efectos individuales de estos factores (i.e. tratamiento neonatal con MK-801 y la depleción del receptor a fractalquina) en la susceptibilidad y severidad de las crisis convulsivas producidas por crecientes dosis de PTZ.

### *Procedimiento*

Previo al inicio de cada sesión se preparó una solución fresca de PTZ (Pentilentetrazol, Sigma) (5mg/ml en solución salina).

Ratones de ambos sexos entre 6 y 12 meses de edad de cada grupo experimental fueron inyectados con dosis subsecuentes de PTZ (20mg/kg) cada 15min hasta una dosis máxima acumulada de 80mg/kg (Lüttjohann et al., 2009; Shimada & Yamagata, 2018). Cada sujeto fue observado durante 10min previo a la primer dosis de PTZ y durante todo el período de subsecuentes dosis y se determinó el puntaje de la severidad máxima de las crisis convulsivas de cada dosis según la escala modificada de Racine (Lüttjohann et al., 2009; Van Erum et al., 2019). Al terminar el período de evaluación, cada sujeto fue observado durante 20min adicionales antes de ser devuelto a su caja de alojamiento.

### *Análisis*

La severidad de las crisis convulsivas en cada dosis fue comparada en una curva de dosis/respuesta. Adicionalmente, la mortalidad de cada grupo experimental fue comparada contra la mortalidad del grupo control (WT-Salina).



## Resultados

### Sinergismo en los efectos agudos de la administración neonatal de MK-801 en el ratón *Cx3cr1*<sup>-/-</sup>

Ratones de ambos sexos y ambos genotipos (WT y KO) fueron tratados aleatoriamente con uno de los siguientes tratamientos: 0.5mg/kg MK-801, 1mg/kg MK-801 o un volumen equivalente de solución salina una vez al día durante 5 días (P5-P9; Fig. An. 1).

Como se aprecia en la Fig. 1a, las curvas de supervivencia no difieren entre los grupos administrados con salina, la dosis baja de MK-801 (0.5mg/kg), y el grupo WT con dosis alta de MK-801 (1mg/kg). Sin embargo, el grupo KO con dosis alta de MK-801 (1mg/kg) presenta un severo incremento en la mortalidad (~90%) (Tab. 1).

Todos los grupos presentan un retraso del crecimiento durante la administración del MK-801 (Fig. An. 1b), que es consistente con reportes anteriores de este modelo en rata (Lim et al., 2012).

En los ratones WT puede observarse un efecto dependiente de la dosis en todas las etapas del crecimiento, (ANOVA de modelo mixto; tratamiento x día: [ $F(6, 243) = 4.43, p = 0.0003$ ],  $n = 26-36$ , Fig. An. 1b-c). Al día P10, al terminar el tratamiento, ambos grupos tienen un alto impacto en el retraso del crecimiento que, sin embargo, es mucho más grande para el grupo de dosis alta (T-Student múltiple con corrección de Holm; P10 WT-Salina vs WT-0.5mg/kg:  $t_{59} = 3.75, p = 0.004$ ,  $g$  de Hedges = 0.92; P10 WT-Salina vs WT-1mg/kg:  $t_{55} = 10.00, p < 0.001$ ,  $g$  de Hedges = 2.44, Fig. An. 1b-c). Este retraso en el crecimiento continúa observándose al día postnatal 50 (P50) en el grupo tratado con la dosis alta de MK-801, pero no en el grupo de dosis baja (T-Student múltiple con corrección de Holm; P50 WT-Salina vs WT-0.5mg/kg:  $t_{55} = 1.34, p = 0.61$ ,  $g$  de Hedges = 0.33; P50 WT-Salina vs WT-1mg/kg:  $t_{43.23} = 4.42, p = 0.0006$ ,  $g$  de Hedges = 1.19, Fig. An. 1b-c). Finalmente, al día 90 postnatal (P90) no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, aunque prevalece un efecto moderado entre el grupo control y el de dosis alta ( $g$  de Hedges WT-Salina vs WT-1mg/kg: 0.58, Fig. An. 1b-c).

Comparando los grupos de dosis baja entre genotipos encontramos un fenómeno similar, aunque de menor magnitud (ANOVA de modelo mixto; grupo x día: [ $F(9, 570) = 3.90, p < 0.0001$ ],  $n = 26-68$ , Fig. 1b y 1d). Al décimo día postnatal, existen diferencias significativas entre los grupos tratados con MK-801 (0.5mg/kg) y los no tratados, sin interacción aparente con el genotipo (Fig. An. 1b y 1d) (T-Student múltiple con corrección de Holm; P10 WT-Salina vs WT-0.5mg/kg:  $t_{59} = 3.75, p = 0.008$ ,  $g$  de Hedges = 0.92; P10 WT-Salina vs KO-0.5mg/kg:  $t_{73.96} = 4.99, p < 0.0001$ ,  $g$  de Hedges

= 1.02; P10 KO-Salina vs WT-0.5mg/kg:  $t_{64.75} = 3.75$ ,  $p = 0.008$ , g de Hedges = 0.73; P10 KO-Salina vs KO-0.5mg/kg:  $t_{129.27} = 5.16$ ,  $p < 0.0001$ , g de Hedges = 0.89; Fig. An 1b y 1d).

Estas diferencias se ven en gran parte corregidas hacia el día 50 postnatal (50) donde solamente prevalece una diferencia entre los grupos KO (T-Student múltiple con corrección de Holm; P50 KO-Salina vs KO-0.5mg/kg:  $t_{123.26} = 3.12$ ,  $p = 0.045$ , g de Hedges = 0.54, Fig. An 1b y 1f). Finalmente, hacia el día 90 postnatal todos los grupos presentan pesos similares, indicando que el retraso en el crecimiento inducido por esta dosis de MK-801 es transitorio (Fig. An 1b y 1d).

Dado que es bien sabido que el antagonismo NMDA, al igual que el cese completo de la actividad eléctrica neuronal (Heck et al., 2008; Ikonomidou et al., 1999; Wagner-Golbs & Luhmann, 2012), en períodos tempranos del desarrollo induce apoptosis neuronal (Ikonomidou et al., 1999), se investigó si el exceso de muerte observado en el grupo KO que recibió la dosis alta de MK-801 (KO-1mg/kg) está acompañado de un incremento en la apoptosis neuronal (Fig. An 1b y 1d).

La interacción entre el genotipo KO y el tratamiento incrementa drásticamente la apoptosis neuronal tanto en la corteza como en el cuerpo estriado con grandes diferencias entre los grupos WT-1mg/kg y KO-1mg/kg en ambas regiones (Corteza: ANOVA de dos vías; genotipo x tratamiento:  $[F(1, 1) = 26.45, p < 0.0001]$ , Tukey HSD: WT-1mg/kg vs KO-1mg/kg,  $p = 0.001$ , g de Hedges = 2.13 Fig. An 1e-f) (Cuerpo estriado: ANOVA de dos vías; genotipo x tratamiento:  $[F(1, 1) = 7.19, p = 0.008]$ ,  $n = 23-27$  campos/3 animales por grupo, Tukey HSD: WT-1mg/kg vs KO-1mg/kg,  $p = 0.001$ , g de Hedges = 1.22, Fig. An 1e-f).

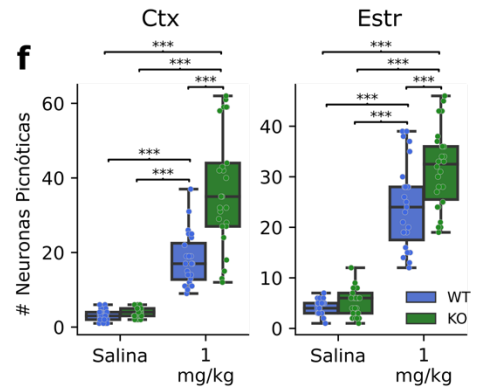
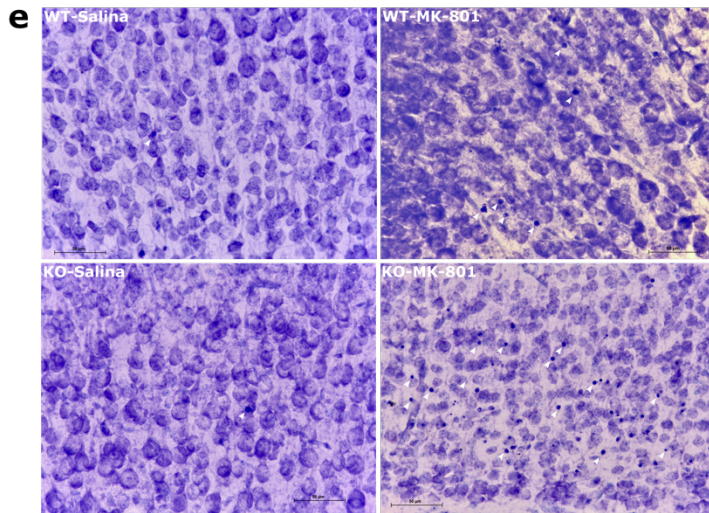
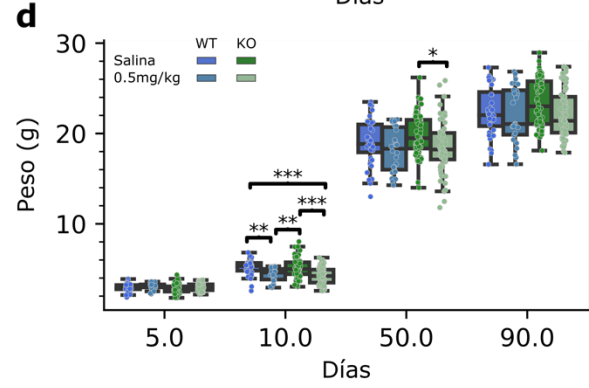
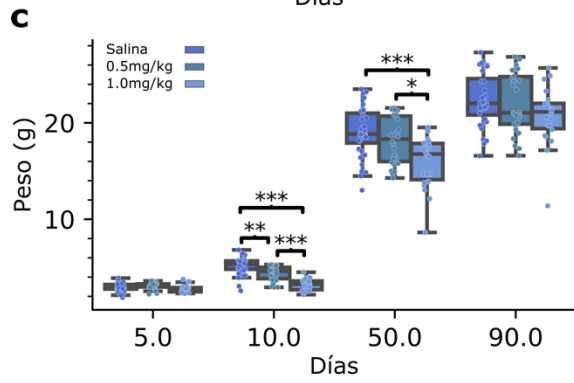
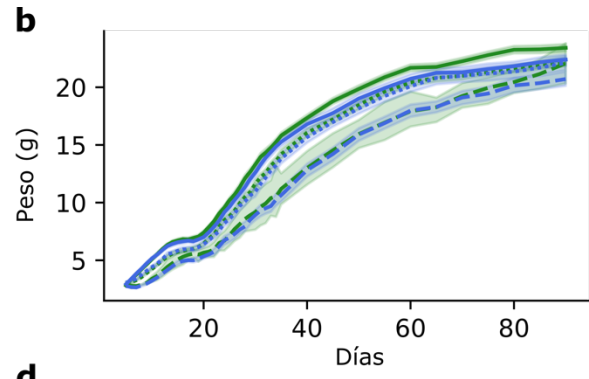
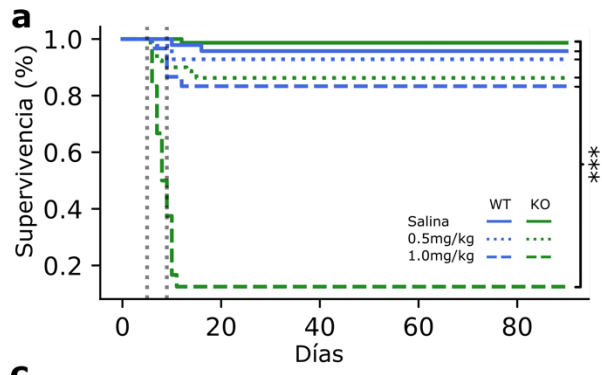


Fig. An. 22 Efectos sinérgicos en la mortalidad y la apoptosis neuronal de la depleción del *Cx3cr1* y la administración neonatal de MK-801.

a) La depleción del *Cx3cr1* incrementa drásticamente la mortalidad por la administración neonatal de MK-801 a dosis altas (1mg/kg), un efecto no observado en los animales WT (Tab. 1). b-c) El tratamiento neonatal con MK-801 retrasa el desarrollo de manera dependiente de la dosis en los animales WT que, sin embargo, alcanza a normalizarse en la adultez (ANOVA de modelo mixto; tratamiento x día:  $[F(6, 243) = 4.43, p = 0.0003]$ ,  $n = 26-36$ ; T-Student múltiple con corrección de Holm; P10 WT-Salina vs WT-0.5mg/kg:  $t_{59} = 3.75, p = 0.004$ , g de Hedges = 0.92; P10 WT-Salina vs WT-1mg/kg:  $t_{55} = 10.00, p < 0.001$ , g de Hedges = 2.44; P50 WT-Salina vs WT-0.5mg/kg:  $t_{55} = 1.34, p = 0.61$ , g de Hedges = 0.33; P50 WT-Salina vs WT-1mg/kg:  $t_{43.23} = 4.42, p = 0.0006$ , g de Hedges = 1.19). b-d) Un efecto similar ocurre en los animales KO: a dosis bajas el tratamiento con MK-801 no incrementa este efecto significativamente y todos los grupos alcanzan un desarrollo normal en la adultez (ANOVA de modelo mixto; grupo x día:  $[F(9, 570) = 3.90, p < 0.0001]$ ,  $n = 26-68$ ; T-Student múltiple con corrección de Holm; P10 WT-Salina vs WT-0.5mg/kg:  $t_{59} = 3.75, p = 0.008$ , g de Hedges = 0.92; P10 WT-Salina vs KO-0.5mg/kg:  $t_{73.96} = 4.99, p < 0.0001$ , g de Hedges = 1.02; P10 KO-Salina vs WT-0.5mg/kg:  $t_{64.75} = 3.75, p = 0.008$ , g de Hedges = 0.73; P10 KO-Salina vs KO-0.5mg/kg:  $t_{129.27} = 5.16, p < 0.0001$ , g de Hedges = 0.89; P50 KO-Salina vs KO-0.5mg/kg:  $t_{123.26} = 3.12, p = 0.04$ , g de Hedges = 0.54). e-f) El incremento en la mortalidad del genotipo KO con la dosis alta de MK-801 se acompaña de un efecto sinérgico en la apoptosis neuronal, Corteza: ANOVA de dos vías; genotipo x tratamiento:  $[F(1, 1) = 26.45, p < 0.0001]$ , Tukey HSD: WT-1mg/kg vs KO-1mg/kg,  $p = 0.001$ , g de Hedges = 2.13; Cuerpo estriado: ANOVA de dos vías; genotipo x tratamiento:  $[F(1, 1) = 7.19, p = 0.008]$ , Tukey HSD: WT-1mg/kg vs KO-1mg/kg,  $p = 0.001$ , g de Hedges = 1.22,  $n = 23-27$  campos/3 animales por grupo.

Tabla 2. Análisis estadístico de la supervivencia acumulada por grupo.

Grupo 1	Grupo 2	t	p	p corregida
KO-0.5mg/kg	KO-1mg/kg	61.65	$4.1 \times 10^{-15}$	<0.0001
	KO-Salina	8.47	$3.6 \times 10^{-3}$	0.054
	WT-0.5mg/kg	1.2	$2.7 \times 10^{-1}$	1.0
	WT-1mg/kg	0.13	$7.2 \times 10^{-1}$	1.0
	WT-Salina	2.95	$8.6 \times 10^{-2}$	1.0
KO-1mg/kg	KO-Salina	109.88	$1.04 \times 10^{-25}$	<0.0001
	WT-0.5mg/kg	52.44	$4.44 \times 10^{-13}$	<0.0001
	WT-1mg/kg	30.73	$2.96 \times 10^{-8}$	<0.0001
	WT-Salina	66.56	$3.39 \times 10^{-16}$	<0.0001
KO-Salina	WT-0.5mg/kg	2.84	$9.17 \times 10^{-2}$	1.0
	WT-1mg/kg	9.78	$1.76 \times 10^{-3}$	0.02
	WT-Salina	1.05	$3.06 \times 10^{-1}$	1.0
WT-0.5mg/kg	WT-1mg/kg	1.62	$2.02 \times 10^{-1}$	1.0
	WT-Salina	0.37	$5.44 \times 10^{-1}$	1.0
WT-1mg/kg	WT-Salina	3.55	$5.93 \times 10^{-2}$	0.89

## Las conductas innatas como posibles indicadores de los síntomas negativos en el modelo neonatal de MK-801 de esquizofrenia

Como se mencionó previamente, la investigación y terapéutica de la esquizofrenia se ha enfocado históricamente en el tratamiento de los síntomas positivos: alucinaciones, agresividad, agitación psicomotriz (Guerrin et al., 2021; S. Miyamoto et al., 2005). Mucha menor atención han recibido los síntomas negativos de los cuales la avoliación, definida como la incapacidad de realizar tareas intencionadas y autodirigidas, es un síntoma central y es generalmente observada como apatía y desinterés por actividades cotidianas como el cuidado personal incluyendo la higiene personal y la procuración de alimentos (Strauss et al., 2016, 2021). Es importante recalcar que este desinterés no se encuentra asociado a pensamientos o emociones negativas o depresivas, sino a una característica falta de motivación (Strauss et al., 2021).

A pesar de su prevalencia entre pacientes con esquizofrenia y otros trastorno mentales severos (Strauss et al., 2021), los síntomas como la avoliación han recibido poca atención en la investigación básica en gran medida a falta de un modelo conductual apropiado para su estudio (Guerrin et al., 2021).

Las conductas innatas como la anidación y la excavación han sido propuestas en otros modelos de enfermedades como pruebas sencillas, pero sensibles a alteraciones cognitivas, asociadas a impedimentos en las actividades de la vida cotidiana, como el cuidado personal (Deacon, 2012; Deacon, 2006b; Eltokhi et al., 2020). Los efectos del modelo de administración neonatal de MK-801 en estas conductas no se han explorado hasta ahora.

En la prueba de anidación se observa una deficiencia en los ratones WT en la construcción del nido dependiente de la dosis de MK-801 administrada (Kruskall-Wallis,  $H(2) = 8.56$ ,  $p = 0.01$ ,  $n=19-26$ , Fig. An 2a), con el grupo WT-0.5mg/kg solo presentando una tendencia no significativa comparada con el control, WT-Salina, (*post-hoc* prueba de Dunn,  $p = 0.1$ ) y el grupo WT-1mg/kg mostrando un mayor efecto contra el grupo control (*post-hoc* prueba de Dunn,  $p = 0.014$ , Fig. An 2a). Sin embargo, el genotipo *Cx3cr1*<sup>-/-</sup> no muestra un efecto sinérgico con el tratamiento a esta dosis y, por lo tanto, no hay una diferencia significativa entre los grupos control de ambos genotipos (WT-Salina y KO-Salina) y los grupos tratados con 0.5mg/kg de ambos genotipos (WT-0.5mg/kg y KO-0.5mg/kg (Kruskall.Wallis,  $H(3) = 4.04$ ,  $p = 0.26$ , 19-32, Fig. An 2a).

La prueba de excavación, en cambio, resulta más sensible y en la comparación de efectos de los distintos tratamientos en los ratones WT encontramos un efecto global significativo (ANOVA de Welch; tratamiento [ $F(2) = 13.17$ ,  $p < 0.0001$ ],  $n= 19-23$ , Fig. An. 2b), con un efecto similar tanto para la dosis baja (*post hoc* Games-Howell, WT-Salina vs WT-0.5mg/kg:  $p = 0.001$ ,  $g$  de Hedges =

1.29) como para la alta (*post hoc* Games-Howell, WT-Salina vs WT-1mg/kg:  $p = 0.001$ ,  $g$  de Hedges = 1.12, Fig. An. 2b), lo que podría deberse a un efecto de piso.

En cuanto a la comparación entre genotipos, y la posible interacción con el tratamiento farmacológico, se observa un efecto global significativo (ANOVA de Welch; grupo [ $F(3) = 12.43$ ,  $p < 0.0001$ ],  $n=19-32$ , Fig. An 2b), con claras diferencias entre el grupo control (WT-Salina) y todos los demás (*post hoc* Games-Howell, WT-Salina vs KO-Salina:  $p = 0.004$ ,  $g$  de Hedges = 0.97; WT-Salina vs WT-0.5mg/kg:  $p = 0.001$ ,  $g$  de Hedges = 1.30; WT-Salina vs KO-0.5mg/kg:  $p = 0.001$ ,  $g$  de Hedges = 1.40, Fig. An 2b). Sin embargo, no se observa sinergismo entre los factores (tratamiento y genotipo) y, dado que el tamaño del efecto es grande para todas las comparaciones, se sugiere de nuevo un efecto de piso en la prueba.

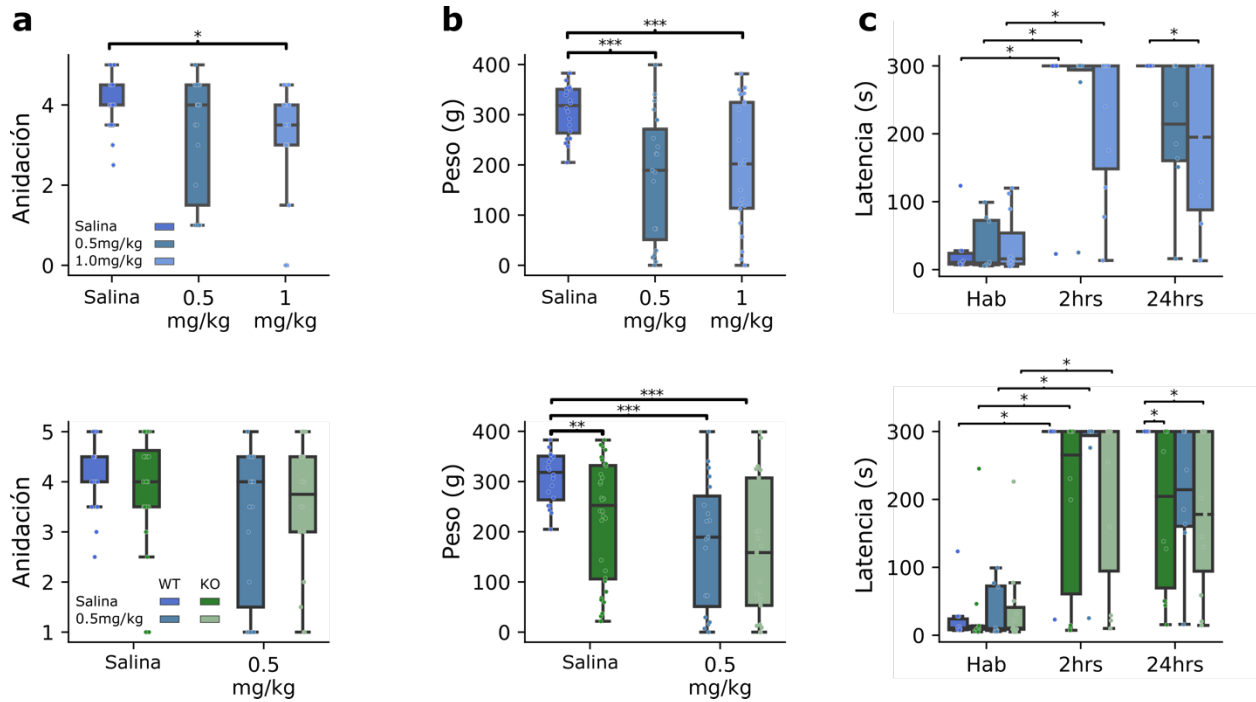


Fig. An. 23 Tanto el genotipo como el tratamiento farmacológico afectan las conductas innatas y la memoria contextual.

Las conductas innatas como la anidación y la excavación muestran diferente grado de sensibilidad ante los efectos de la depleción del *Cx3cr1* y el bloqueo neonatal de los receptores NMDA (a-b). a) La anidación muestra alteraciones dependientes de la dosis con cambios significativos solo en el grupo de dosis alta (Kruskall-Wallis,  $H(2) = 8.56$ ,  $p = 0.01$ ; *post-hoc* prueba de Dunn, WT-Salina vs WT-0.5mg/kg,  $p = 0.1$ , WT-Salina vs WT-1mg/kg,  $p = 0.014$ ,  $n=19-26$ , *arriba*). A dosis bajas no se detectan diferencias entre genotipos (Kruskall.Wallis,  $H(3) = 4.04$ ,  $p = 0.26$ ,  $n=19-32$ , *abajo*). b) La prueba de excavación es más sensible tanto para los cambios en el genotipo como en el tratamiento, pero con un probable efecto de piso en ambos casos; en el grupo WT los distintos tratamientos tienen un efecto similar, *arriba*, (ANOVA de Welch; tratamiento [ $F(2) = 13.17$ ,  $p < 0.0001$ ], *post hoc* Games-Howell, WT-Salina vs WT-0.5mg/kg:  $p = 0.001$ , g de Hedges = 1.29, WT-Salina vs WT-1mg/kg:  $p = 0.001$ , g de Hedges = 1.12,  $n = 19-23$ ). Entre genotipos se detectan efectos significativos de ambos factores sin interacción entre ellos, *abajo*; ANOVA de Welch; grupo [ $F(3) = 12.43$ ,  $p < 0.0001$ ], *post hoc* Games-Howell; WT-Salina vs KO-Salina:  $p = 0.004$ , g de Hedges = 0.97, WT-Salina vs WT-0.5mg/kg:  $p = 0.001$ , g de Hedges = 1.30; WT-Salina vs KO-0.5mg/kg:  $p = 0.001$ , g de Hedges = 1.40,  $n=19-32$ . c) Tanto el genotipo como el tratamiento afectan de manera independiente la memoria contextual en una prueba de evitación inhibitoria. Todos los grupos muestran una adquisición adecuada de la asociación entre el choque eléctrico y la cámara oscura (*arriba*, ANOVA de modelo mixto; Tratamiento: [ $F(2, 26) = 0.38$ ,  $p = 0.68$ ]; Fase: [ $F(1, 26) = 160.69$ ,  $p < 0.0001$ ],  $n = 8-12$ ; *abajo*, ANOVA de modelo mixto; Grupo: [ $F(3, 35) = 0.53$ ,  $p = 0.66$ ]; Fase: [ $F(1, 35) = 125.12$ ,  $p < 0.0001$ ],  $n = 8-12$ ). En la prueba 24h después, los animales WT muestran un deterioro de la memoria contextual dependiente de la dosis, (*arriba*, Kruskall-Wallis,  $H(2) = 8.39$ ,  $p = 0.015$ , *post hoc* prueba de Dunn, WT-Salina vs WT-0.5mg/kg,  $p = 0.06$ , WT-Salina vs WT-1mg/kg,  $p = 0.02$ ,  $n = 8-12$ ). Entre los grupos de dosis baja se observa un efecto mayor por parte del genotipo que del tratamiento, pero sin interacción entre ellos (*abajo*, Kruskall-Wallis,  $H(3) = 10.15$ ,  $p = 0.017$ , *post hoc* Dunn; WT-Salina vs KO-Salina,  $p = 0.04$ , WT-Salina vs KO-0.5mg/kg,  $p = 0.03$ ).

## Efectos Cognitivos y de la Emotividad

Previos reportes indican que tanto la depleción del receptor a fractalquina (Méndez-Salcido et al., 2022; J. T. Rogers et al., 2011b) como el tratamiento neonatal con MK-801 (Kawabe et al., 2007; Li et al., 2015; Lim et al., 2012) inducen déficits cognitivos en la adultez incluyendo memoria espacial y contextual. Por ello, se probaron los efectos de los tratamientos en una prueba de memoria contextual en los ratones WT. Los resultados muestran que los tres grupos tienen una adquisición adecuada de la asociación entre el contexto espacial (cámara oscura) y el estímulo no condicionado (choque eléctrico) dado el incremento en la latencia de cruce entre la sesión donde se les administró el choque eléctrico y la sesión dos horas después (ANOVA de modelo mixto; Tratamiento: [ $F(2, 26) = 0.38, p = 0.68$ ]; Fase: [ $F(1, 26) = 160.69, p < 0.0001$ ],  $n = 8-12$ , Fig. An 2c). Sin embargo, la memoria de esta asociación presenta un deterioro dependiente de la dosis en la prueba 24h después reflejado en la disminución de la latencia de cruce entre compartimentos de los grupos tratados con MK-801 en comparación con el grupo control (Kruskall-Wallis,  $H(2) = 8.39, p = 0.015$ , Fig. An 2c), con una tendencia no significativa en el grupo de dosis baja (WT-0.5mg/kg) (Dunn, WT-Salina vs WT-0.5mg/kg,  $p = 0.06$ ) y un mayor impacto en el grupo de dosis alta (WT-1mg/kg) (Dunn, WT-Salina vs WT-1mg/kg,  $p = 0.02$ , Fig. An 2c).

Un efecto similar se encuentra cuando se compran los grupos KO-Salina y KO-0.5mg/kg contra sus contrapartes WT. Todos los grupos presentan una adquisición satisfactoria de la asociación reflejado en el aumento de la latencia de cruce a las 2h (ANOVA de modelo mixto; Grupo: [ $F(3, 35) = 0.53, p = 0.66$ ]; Fase: [ $F(1, 35) = 125.12, p < 0.0001$ ],  $n = 8-12$ , Fig. An 2c). La prueba 24h después refleja un déficit significativo en la memoria contextual (Kruskall-Wallis,  $H(3) = 10.15, p = 0.017$ , Fig. An 2c). Sin embargo, la prueba *post hoc* (prueba de Dunn) indica que las diferencias solo existen entre los dos grupos KO y el grupo control (Dunn, WT-Salina vs KO-Salina,  $p = 0.04$ , WT-Salina vs KO-0.5mg/kg,  $p = 0.03$ ), lo que indica que el genotipo es el factor dominante en esta interacción y no hay un efecto sinérgico entre los factores en la memoria contextual.

Las pruebas de campo abierto y el laberinto en Y fueron utilizadas para evaluar los efectos sobre la emotividad (rasgos de ansiedad) y la actividad exploratoria. Previamente, se reportó el efecto de la depleción del receptor de fractalquina en la actividad exploratoria en el campo abierto encontrando alteraciones consistentes con un fenotipo ansioso (Méndez-Salcido et al., 2022). En el modelo de administración neonatal de MK-801 los efectos en la exploración en pruebas similares son altamente variables y frecuentemente contradictorios (Baier et al., 2009; Latysheva & Rayevsky, 2003; Lim et al., 2012).



En el presente estudio, ambas dosis del tratamiento neonatal con MK-801 disminuyeron la actividad exploratoria en el campo abierto de los ratones WT de una manera consistente con un fenotipo de mayor ansiedad (Fig. An 3a-c).

Ambas dosis disminuyeron la distancia total recorrida con respecto al grupo control (ANOVA de una vía: tratamiento,  $[F(2, 73) = 13.51, p < 0.0001]$ ,  $n = 20-36$ , Fig. An 3a), con un efecto de tamaño similar (*post hoc* Tukey-HSD: WT-Salina vs WT-0.5mg/kg,  $p = 0.001$ ,  $g$  de Hedges = 1.14; WT-Salina vs WT-1mg/kg,  $p = 0.001$ ,  $g$  de Hedges = 1.21). De manera similar, ambos tratamientos disminuyeron el tiempo de permanencia en el centro de la arena (ANOVA de una vía: tratamiento,  $[F(2, 70) = 7.05, p = 0.001]$ ,  $n = 20-36$ , Fig. An 3b), con un incremento moderado en el tamaño del efecto dependiente de la dosis (*post hoc* Tukey-HSD: WT-Salina vs WT-0.5mg/kg,  $p = 0.02$ ,  $g$  de Hedges = 0.75; WT-Salina vs WT-1mg/kg,  $p = 0.002$ ,  $g$  de Hedges = 0.95).

De manera interesante, ambas dosis del tratamiento abatieron la exploración vertical (*rearing*, Fig. 3c), un parámetro no explorado previamente (ANOVA de una vía: tratamiento,  $[F(2, 68) = 17.22, p < 0.0001]$ ,  $n = 20-36$ , Fig. An 3c). Ambos tratamientos tuvieron un efecto de tamaño similar (*post hoc* Tukey-HSD: WT-Salina vs WT-0.5mg/kg,  $p = 0.001$ ,  $g$  de Hedges = 1.22; WT-Salina vs WT-1mg/kg,  $p = 0.001$ ,  $g$  de Hedges = 1.47).

Efectos similares fueron encontrados en la comparación entre los grupos de ambos genotipos tratados con solución salina y los grupos tratados con la dosis baja de MK-801. En la distancia total recorrida el factor determinante en las diferencias entre grupos es el tratamiento (ANOVA de dos vías; tratamiento,  $[F(1,1) = 22.20, p < 0.0001]$ ,  $n = 20-46$ , Fig. 3a) con una tendencia a una interacción sinérgica entre los factores (genotipo x tratamiento:  $[F(1,1) = 3.57, p = 0.06]$ , Fig. An 3a).

La reducción en el tiempo en el centro de la arena es influenciado por ambos factores, el genotipo y el tratamiento pero sin una interacción significativa; (ANOVA de dos vías; genotipo,  $[F(1,1) = 6.42, p = 0.01]$ ; tratamiento,  $[F(1,1) = 10.14, p = 0.002]$ ; genotipo x tratamiento  $[F(1,1) = 0.96, p = 0.33]$ ,  $n = 20-46$ , Fig. An 3b). Por último, la exploración vertical es afectada de manera similar aunque con un mayor efecto por parte del tratamiento (ANOVA de dos vías; genotipo,  $[F(1,1) = 5.01, p = 0.02]$ ; tratamiento,  $[F(1,1) = 35.09, p < 0.0001]$ ; genotipo x tratamiento  $[F(1,1) = 1.72, p = 0.19]$ ,  $n = 20-46$ , Fig. An 3c). Sin embargo, en ninguno de estos efectos se aprecia una interacción aditiva entre el genotipo y el tratamiento a pesar de que ambos factores modifican la actividad exploratoria y la respuesta al estrés.

Las alteraciones en la actividad exploratoria afectaron el desempeño de los animales en el laberinto en forma de Y en un protocolo de alternancia espontánea dirigido a explorar la memoria de trabajo espacial de manera tal que la interpretación de esta prueba está comprometida. En términos

generales, no se observaron diferencias en el porcentaje de tripletes realizados (i.e. la fracción de tripletes realizadas del total de tripletes posibles de acuerdo al número total de transiciones entre los brazos realizadas), ni entre los grupos de ratones WT tratados con MK-801 (ANOVA de una vía, tratamiento [ $F(2) = 1.07, p = 0.35$ ], datos no mostrados), ni entre genotipos (controles y tratados con MK-801) (ANOVA de dos vías, genotipo [ $F(1) = 0.009, p = 0.92$ ]; tratamiento [ $F(1) = 0.36, p = 0.55$ ], datos no mostrados).

Sin embargo, la exploración espacial (distancia total) realizada por los grupos KO se vio reducida de manera importante, a pesar de que la prueba se realizó en condiciones menos estresantes que el campo abierto (~50 lux), y de manera interesante esta reducción en la actividad exploratoria fue incrementada con el tratamiento farmacológico, (ANOVA de dos vías, genotipo [ $F(1) = 53.88, p < 0.0001$ ]; tratamiento [ $F(1) = 6.46, p = 0.01$ ], genotipo x tratamiento [ $F(1,1) = 8.49, p = 0.004$ ], Fig. An 3d). En contraste, los grupos WT no presentan diferencias inducidas por el tratamiento en la distancia total (ANOVA de una vía: [ $F(2,51) = 0.56, p = 0.57$ ], Fig. An 3d).

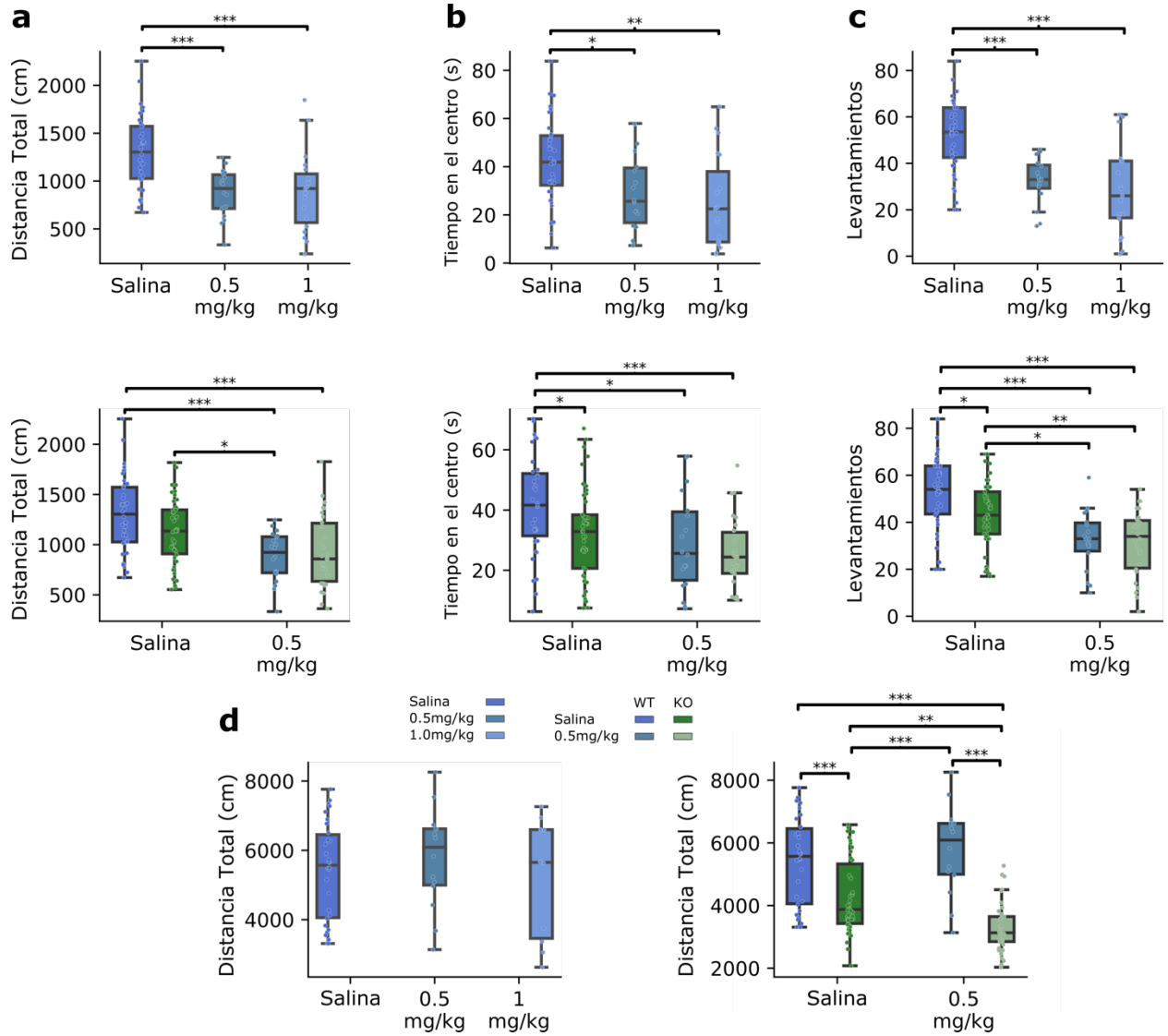


Fig. An. 24 Alteraciones de la emotividad y la exploración.

Los resultados de la prueba de campo abierto indican que tanto el tratamiento con MK-801 como el genotipo exacerbaban la respuesta al estrés e inhiben la exploración espontánea tanto horizontal como vertical (*rearing*). a) En los animales WT ambas dosis de MK-801 abatieron la distancia total recorrida con un efecto de tamaño similar, *arriba*, (ANOVA de una vía: tratamiento,  $[F(2, 73) = 13.51, p < 0.0001]$ , *post hoc* Tukey-HSD: WT-Salina vs WT-0.5mg/kg,  $p = 0.001$ , g de Hedges = 1.14; WT-Salina vs WT-1mg/kg,  $p = 0.001$ , g de Hedges = 1.21,  $n = 20-36$ ). En cuanto a los grupos KO, se observa un efecto similar por parte del tratamiento con una tendencia en la interacción entre factores, *abajo*, (ANOVA de dos vías; tratamiento,  $[F(1,1) = 22.20, p < 0.0001]$ , genotipo x tratamiento:  $[F(1,1) = 3.57, p = 0.06]$ ,  $n = 20-46$ ). b) Ambas dosis redujeron el tiempo de exploración en el centro de la arena de los animales WT con un moderado incremento en el efecto dependiente de la dosis, *arriba*, (ANOVA de una vía: tratamiento,  $[F(2, 70) = 7.05, p = 0.001]$ , *post hoc* Tukey-HSD: WT-Salina vs WT-0.5mg/kg,  $p = 0.02$ , g de Hedges = 0.75; WT-Salina vs WT-1mg/kg,  $p = 0.002$ , g de Hedges = 0.95,  $n = 20-36$ ). En la comparación con los grupos KO, tanto el genotipo como el tratamiento son factores significativos pero independientes en la reducción del tiempo en el centro de la arena, *abajo*, (ANOVA de dos vías; genotipo,  $[F(1,1) = 6.42, p = 0.01]$ ; tratamiento,  $[F(1,1) = 10.14, p = 0.002]$ ; genotipo x tratamiento  $[F(1,1) = 0.96, p = 0.33]$ ,  $n = 20-46$ ). c) La exploración vertical (*rearing*) fue igualmente afectada por ambos tratamientos en los animales WT con un efecto de tamaño similar, *arriba*, (ANOVA de una vía: tratamiento,  $[F(2, 68) = 17.22, p < 0.0001]$ , *post hoc* Tukey-HSD: WT-Salina vs WT-0.5mg/kg,  $p = 0.001$ , g de Hedges = 1.22; WT-Salina vs WT-1mg/kg,  $p = 0.001$ , g de Hedges = 1.47,  $n = 20-36$ ). De nuevo, tanto el tratamiento como el genotipo disminuyen la exploración vertical en los grupos KO, sin una interacción significativa, *abajo*, (ANOVA de dos vías; genotipo,  $[F(1,1) = 5.01, p = 0.02]$ ; tratamiento,  $[F(1,1) = 35.09, p < 0.0001]$ ; genotipo x tratamiento  $[F(1,1) = 1.72, p = 0.19]$ ,  $n = 20-46$ ). d) En el laberinto en forma de Y la exploración espacial se ve disminuida, aunque en los animales WT el tratamiento farmacológico no es suficiente para inducir diferencias significativas, *izq.*, (ANOVA de una vía:  $[F(2,51) = 0.56, p = 0.57]$ ,  $n = 10-30$ ), mientras que en los KO se observa un efecto sinérgico entre el tratamiento y el genotipo, *der.*, (ANOVA de dos vías, genotipo  $[F(1) = 53.88, p < 0.0001]$ ; tratamiento  $[F(1) = 6.46, p = 0.01]$ , genotipo x tratamiento  $[F(1,1) = 8.49, p = 0.004]$ ,  $n = 10-52$ ).

## Efectos divergentes en el potencial local de campo del hipocampo

A pesar de la gran variedad de estudios con el modelo de bloqueo neonatal de los receptores NMDA, poco se sabe de las potenciales consecuencias en la actividad de red de los circuitos cerebrales en la adultez o en el desarrollo (Guerrin et al., 2021; Lim et al., 2012). Previamente, Kjaerby et al. (2017) reportaron alteraciones en la potencia del ritmo theta en el hipocampo y el ritmo gamma en la corteza prefrontal en respuesta a la estimulación eléctrica en el tallo cerebral en un modelo de administración neonatal de fenciclidina. Recientemente, se ha reportado la alteración de la generación de estados funcionales en un modelo *in vitro* en la corteza prefrontal, aunado a un incremento en el poder de la banda gamma en un modelo de antagonismo NMDA en el desarrollo temprano (Plataki et al., 2021).

En el presente estudio, se realizaron registros electrofisiológicos *in vivo* de la actividad espontánea de los campos principales del hipocampo, (i.e. DG, CA3, CA1) simultáneamente bajo anestesia con uretano (Fig. An 4).

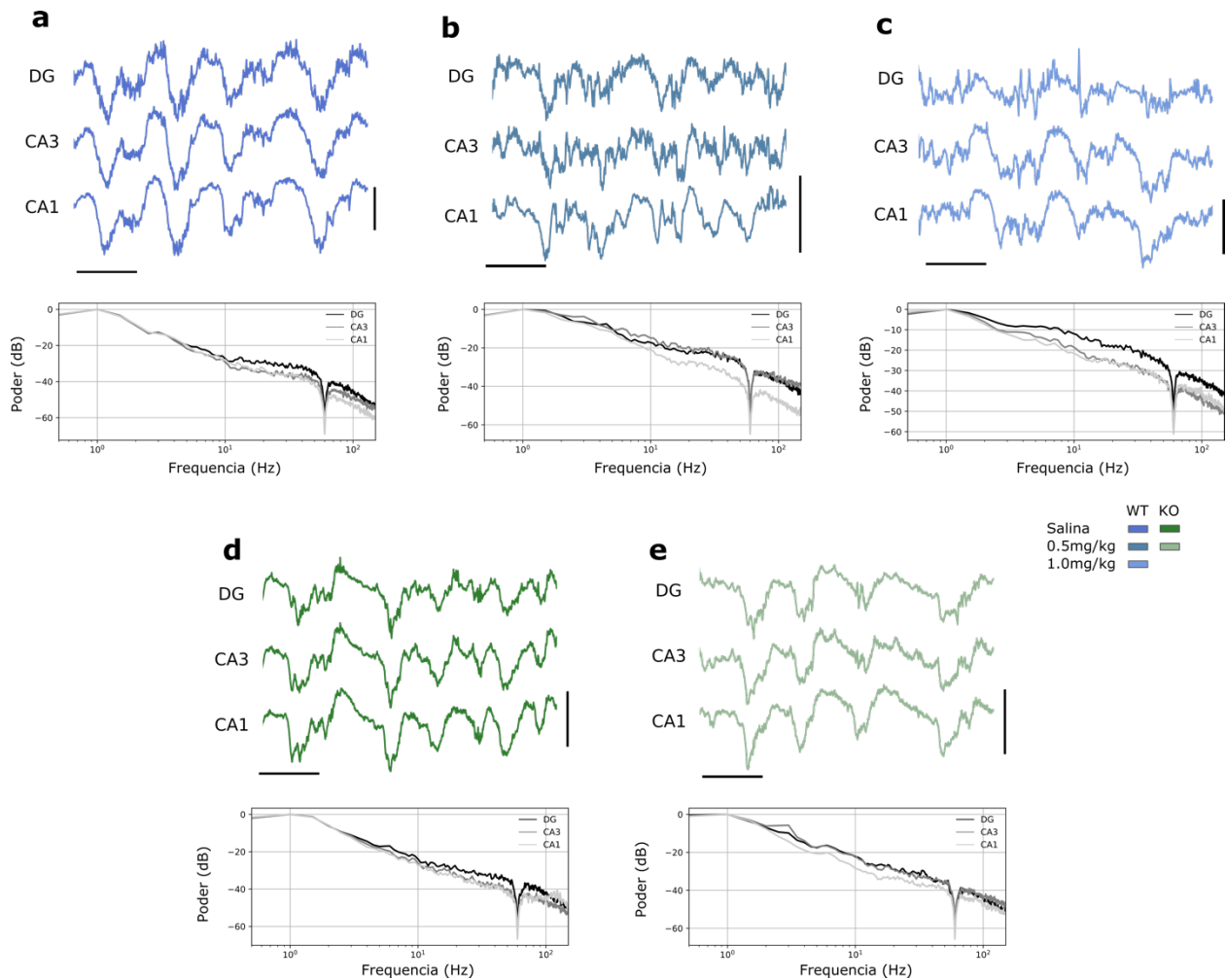


Fig. An. 25 Trazos representativos de la actividad de campo en las distintas regiones del hipocampo.

a-c) Trazos representativos de los electrodos elegidos para analizar la actividad poblacional en las distintas regiones del hipocampo, DG, CA3, CA1 en los animales WT. Debajo de lo trazos se muestra el periodograma de Welch para cada canal calculado sobre segmentos de 1min de registro en dB. Nótese el incremento en la actividad de alta frecuencia en los grupos tratados con MK-801. d-e) Trazos y análisis similares para los grupos KO. Escalas son iguales a 100 $\mu$ V y 1s.

Los resultados muestran una amplia reestructuración de la composición espectral del potencial de campo de las diferentes regiones del hipocampo inducidas tanto por el genotipo como por el tratamiento farmacológico. Como se aprecia en las figuras 4 y 5, la administración neonatal de MK-801 induce cambios robustos en el potencial de campo de todas las regiones hipocampales estudiadas (MANOVA delta + theta + gamma ~ Tratamiento + Sitio de registro; Lambda de Wilks = 0.0074,  $p < 0.0001$ , Fig. An 5a), con un efecto significativo tanto del tratamiento (Tratamiento: Lambda de Wilks = 0.63,  $p = 0.0003$ ) como del sitio de registro (Sitio: Lambda de Wilks = 0.55,  $p = 0.0001$ ).

Específicamente, el tratamiento farmacológico indujo una disminución en el poder relativo de la banda delta que es independiente del sitio de registro (ANOVA de dos vías; tratamiento:  $[F(2) = 9.02, p = 0.0004]$ , sitio:  $[F(2) = 6.56, p = 0.003]$ , tratamiento x sitio:  $[F(4) = 0.37, p = 0.85]$ , Fig. An 5a), cabe resaltar que este efecto es dosis dependiente pero no en una forma lineal y tiene su máximo en el grupo tratado con 0.5mg/kg (*post hoc* Tukey-HSD; WT-Salina vs WT-0.5mg/kg:  $p = 0.001$ , WT-Salina vs WT-1mg/kg:  $p = 0.36$ , Fig. An 5a). El efecto mediado por el sitio se restringe a una diferencia en el poder de delta entre CA1 y DG, independiente del tratamiento (*post hoc* Tukey-HSD; CA1 vs DG:  $p = 0.005$ ).

A diferencia de la disminución en el poder de la banda delta, el tratamiento farmacológico indujo un incremento en el poder de la banda theta independiente del sitio de registro (ANOVA de dos vías; tratamiento:  $[F(2) = 7.09, p = 0.002]$ , sitio:  $[F(2) = 1.17, p = 0.32]$ , tratamiento x sitio:  $[F(4) = 0.22, p = 0.92]$ , Fig. An 5a). Nuevamente, el grupo con mayor efecto es el tratado con 0.5mg/kg (*post hoc* Tukey-HSD; WT-Salina vs WT-0.5mg/kg:  $p = 0.0015$ , WT-Salina vs WT-1mg/kg:  $p = 0.70$ ).

Un cambio similar pero de menor tamaño ocurre en la banda gamma, donde se aprecian diferencias mediadas por el tratamiento y el sitio de registro de manera independiente, (ANOVA de dos vías; tratamiento:  $[F(2) = 7.27, p = 0.0015]$ , sitio:  $[F(2) = 21.93, p < 0.0001]$ , tratamiento x sitio:  $[F(4) = 0.92, p = 0.45]$ , Fig. An 5a). El efecto simple del tratamiento, sin embargo, solo aproxima la significancia estadística (*post hoc* Tukey-HSD; WT-Salina vs WT-0.5mg/kg:  $p = 0.03$ , WT-Salina vs WT-1mg/kg:  $p = 0.04, \alpha = 0.025$ ). El efecto del sitio de registro se debe al mayor poder de la banda gamma en el DG comparado con los otros sitios de registro (*post hoc* Tukey-HSD; CA1 vs DG:  $p = 0.001$ ; CA3 vs DG:  $p = 0.003$ ).

De esta manera, el efecto global del bloqueo NMDA durante el desarrollo temprano es un desplazamiento del poder de la banda delta en favor de bandas de más alta frecuencia: theta y gamma. Sorpresivamente, estos cambios son exactamente opuestos a los cambios inducidos por la depleción del receptor a fractalquina. Un análisis similar para los grupos tratados con la dosis baja (0.5mg/kg) de MK-801 o salina de ambos genotipos revela diferencias significativas en la composición espectral del potencial de campo hipocampal (MANOVA delta + theta + gamma ~ Tratamiento + Sitio de registro + Genotipo; Lambda de Wilks = 0.0071,  $p < 0.0001$ , Fig. An 5b), con un efecto significativo de cada variable independiente; Tratamiento: Lambda de Wilks = 0.62,  $p = 0.0001$ ; Sitio: Lambda de Wilks = 0.66,  $p = 0.0001$ ; Genotipo: Lambda de Wilks = 0.74,  $p = 0.0001$ .

Sin embargo, como se mencionó previamente, la interacción del genotipo y el tratamiento con MK-801 es antagónico. Sobre la banda delta tanto el genotipo como el tratamiento y el sitio de registro tienen efectos significativos sencillos sin ninguna interacción entre ellos, (ANOVA de tres vías; tratamiento:  $[F(1) = 34.26, p < 0.0001]$ , sitio:  $[F(2) = 10.50, p < 0.0001]$ , genotipo:  $[F(1) = 12.39,$

$p = 0.0001$ ], Fig. An 5b). Al igual que en los grupos WT, el tratamiento disminuyó la potencia de la banda delta independientemente del genotipo (*post hoc* Tukey-HSD; Salina vs 0.5mg/kg:  $p = 0.001$ ), pero el genotipo aumentó la potencia de delta independientemente del tratamiento (*post hoc* Tukey-HSD; KO vs WT:  $p = 0.0096$ ). Al igual que en el análisis anterior, el efecto del sitio se restringe a una diferencia entre CA1 y DG (*post hoc* Tukey-HSD; CA1 vs DG:  $p = 0.001$ ).

De manera similar, tanto el tratamiento como el genotipo y el sitio de registro tiene efectos significativos sobre el poder de la banda theta, (ANOVA de tres vías; tratamiento: [ $F(1) = 32.81$ ,  $p < 0.0001$ ], sitio: [ $F(2) = 5.35$ ,  $p = 0.0067$ ], genotipo: [ $F(1) = 15.86$ ,  $p = 0.0001$ ], Fig. An 5b). En esta ocasión, el tratamiento con MK-801 incrementa el poder de theta independientemente del sitio o el genotipo (*post hoc* Tukey-HSD; Salina vs 0.5mg/kg:  $p = 0.001$ ), mientras que el genotipo la disminuye de manera igualmente independiente (*post hoc* Tukey-HSD; KO vs WT:  $p = 0.0024$ ). El efecto del sitio se debe a una tendencia no significativa entre CA1 y las otras regiones, en efecto estas interacciones pueden ser observadas con mayor claridad en CA1.

Finalmente, la banda gamma se ve afectada de manera similar a theta con efectos significativos pero independientes del tratamiento, el genotipo y el sitio de registro, (ANOVA de tres vías; tratamiento: [ $F(1) = 29.43$ ,  $p < 0.0001$ ], sitio: [ $F(2) = 20.39$ ,  $p = 0.0001$ ], genotipo: [ $F(1) = 14.34$ ,  $p = 0.0003$ ], Fig. An 5b). Al igual que para la banda theta, el tratamiento con MK-801 incrementa el poder de la banda gamma independientemente del genotipo o el sitio de registro (*post hoc* Tukey-HSD; Salina vs 0.5mg/kg:  $p = 0.001$ , Fig. An 5b), mientras que el genotipo la disminuye independientemente del sitio o el tratamiento (*post hoc* Tukey-HSD; KO vs WT:  $p = 0.0087$ , Fig. An 5b). El efecto del sitio de registro se debe nuevamente a la prominencia de la banda gamma en DG, (*post hoc* Tukey-HSD; CA1 vs DG:  $p = 0.001$ ; CA3 vs DG:  $p = 0.0084$ , Fig. An 5b) y, consecuentemente, estas interacciones de efectos pueden ser observada con mayor claridad en DG.

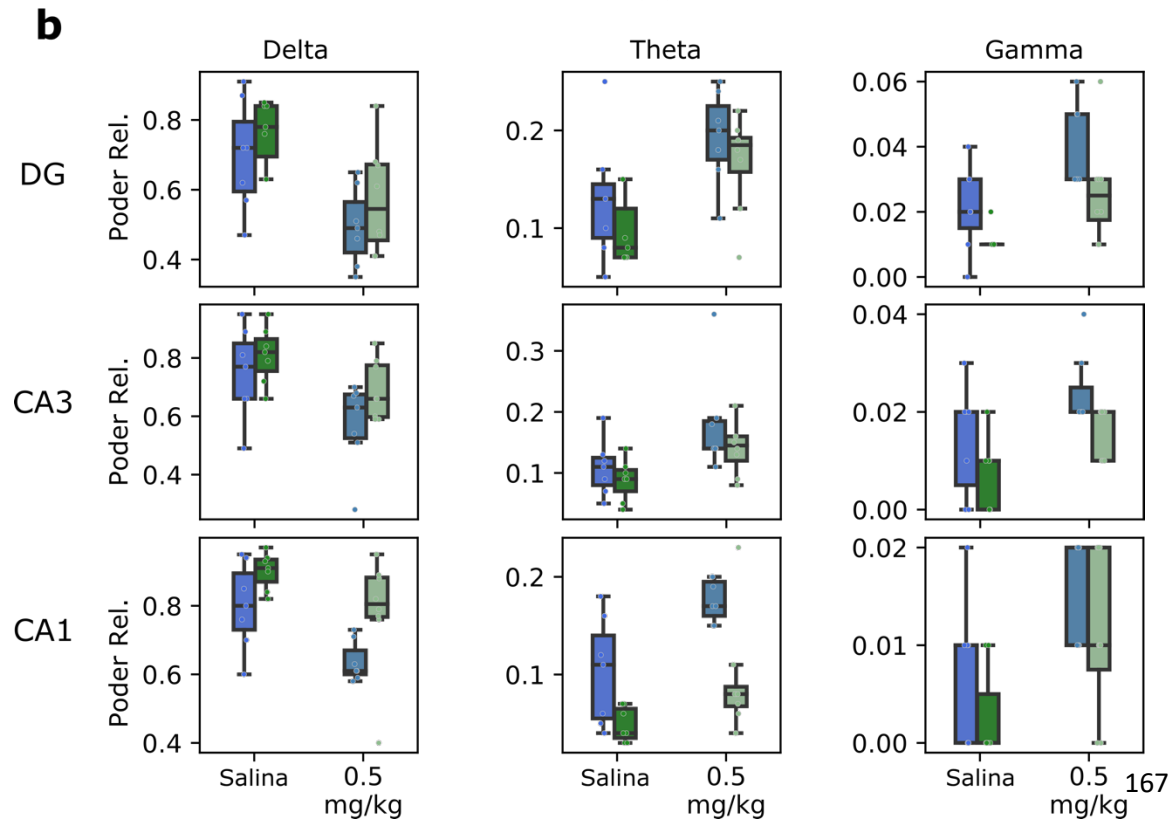
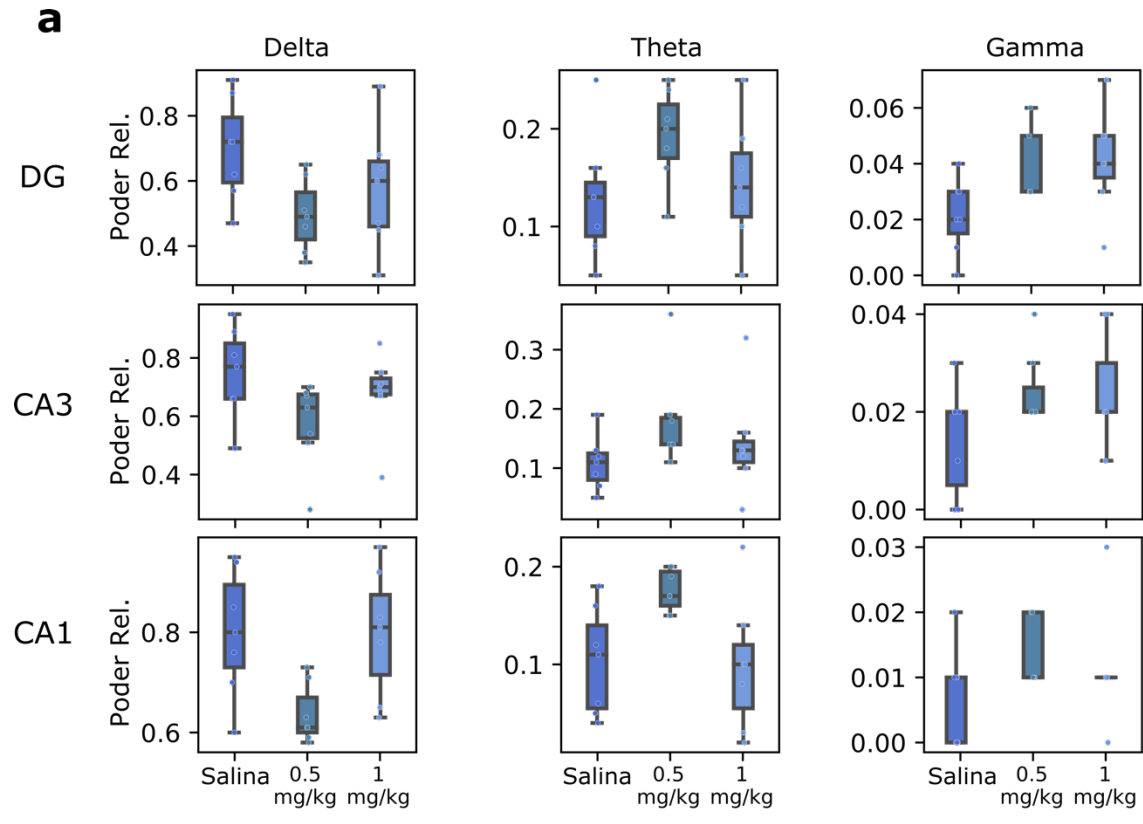




Fig. An. 26 La depleción del *Cx3cr1* induce cambios opuestos en el potencial de campo a los inducidos por el tratamiento neonatal con MK-801.

a) Un análisis multivariado de las bandas delta, theta y gamma, como variables dependientes, y tratamiento y el sitio de registro, como variables independientes, demuestra que para los grupos WT el tratamiento y el sitio de registro son factores significativos de diferencias entre los grupos, (MANOVA delta + theta + gamma ~ Tratamiento + Sitio de registro; Lambda de Wilks = 0.0074,  $p < 0.0001$ ; Tratamiento: Lambda de Wilks = 0.63,  $p = 0.0003$ ; Sitio: Lambda de Wilks = 0.55,  $p = 0.0001$ ,  $n = 7$ ). En general, el tratamiento indujo un decremento en la potencia de la banda delta con efecto máximo en la dosis baja (ANOVA de dos vías; tratamiento:  $[F(2) = 9.02, p = 0.0004]$ , sitio:  $[F(2) = 6.56, p = 0.003]$ , tratamiento x sitio:  $[F(4) = 0.37, p = 0.85]$ , *post hoc* Tukey-HSD; WT-Salina vs WT-0.5mg/kg:  $p = 0.001$ , WT-Salina vs WT-1mg/kg:  $p = 0.36$ ,  $n = 7$ ). En cambio, tanto la banda theta como gamma muestran un incremento en su poder inducido por el tratamiento y con un máximo efecto de nuevo en la dosis baja; theta: (ANOVA de dos vías; tratamiento:  $[F(2) = 7.09, p = 0.002]$ , sitio:  $[F(2) = 1.17, p = 0.32]$ , tratamiento x sitio:  $[F(4) = 0.22, p = 0.92]$ , *post hoc* Tukey-HSD; WT-Salina vs WT-0.5mg/kg:  $p = 0.0015$ , WT-Salina vs WT-1mg/kg:  $p = 0.70$ ); gamma: (ANOVA de dos vías; tratamiento:  $[F(2) = 7.27, p = 0.0015]$ , sitio:  $[F(2) = 21.93, p < 0.0001]$ , tratamiento x sitio:  $[F(4) = 0.92, p = 0.45]$ ).

b) La depleción del *Cx3cr1* por sí misma induce cambios en el potencial de campo de las distintas regiones del hipocampo. En los animales KO tratados con MK-801 ambos factores inducen cambios significativos. Inesperadamente, los cambios correspondientes al genotipo son exactamente opuestos a los inducidos por el tratamiento; MANOVA delta + theta + gamma ~ Tratamiento + Sitio de registro + Genotipo; Lambda de Wilks = 0.0071,  $p < 0.0001$ , Tratamiento: Lambda de Wilks = 0.62,  $p = 0.0001$ ; Sitio: Lambda de Wilks = 0.66,  $p = 0.0001$ ; Genotipo: Lambda de Wilks = 0.74,  $p = 0.0001$ ,  $n = 7-8$ . En la banda delta el tratamiento disminuyó el poder mientras que el genotipo lo aumentó: (ANOVA de tres vías; tratamiento:  $[F(1) = 34.26, p < 0.0001]$ , sitio:  $[F(2) = 10.50, p < 0.0001]$ , genotipo:  $[F(1) = 12.39, p = 0.0001]$ , *post hoc* Tukey-HSD; Salina vs 0.5mg/kg:  $p = 0.001$ , KO vs WT:  $p = 0.0096$ ,  $n = 7-8$ ). En la banda theta se observan cambios recíprocos para ambos factores con el tratamiento incrementando el poder de la banda y el genotipo disminuyéndolo (ANOVA de tres vías; tratamiento:  $[F(1) = 32.81, p < 0.0001]$ , sitio:  $[F(2) = 5.35, p = 0.0067]$ , genotipo:  $[F(1) = 15.86, p = 0.0001]$ , *post hoc* Tukey-HSD; Salina vs 0.5mg/kg:  $p = 0.001$ , KO vs WT:  $p = 0.0024$ . De manera similar ocurren cambios en la banda gamma, con el tratamiento incrementando el poder de gamma y el genotipo disminuyéndolo, ambos de manera independiente; ANOVA de tres vías; tratamiento:  $[F(1) = 29.43, p < 0.0001]$ , sitio:  $[F(2) = 20.39, p = 0.0001]$ , genotipo:  $[F(1) = 14.34, p = 0.0003]$ , *post hoc* Tukey-HSD; Salina vs 0.5mg/kg:  $p = 0.001$ , KO vs WT:  $p = 0.0087$ .

## El filtrado sensorial auditivo de CA3 se encuentra preservado en ambas condiciones experimentales

Uno de los pocos hallazgos clínicos en pacientes esquizofrénicos que ha sido exitosamente estudiado en modelos animales es la alteración del filtrado sensorial auditivo, un correlato neurobiológico del filtrado sensorimotor (Smucny et al., 2015). Esta función fue estudiada con registros del potencial evocado en CA3 ante la estimulación auditiva en un protocolo de estimulación pareada (Dissanayake et al., 2008; Krause et al., 2003).

Inesperadamente, dados los gruesos cambios en la actividad de red descritos previamente, el filtrado sensorial auditivo se encuentra preservado en todos los grupos y no se encuentran alteraciones en la amplitud del potencial evocado por el estímulo condicionante (CAMP; ANOVA  $[F(4,21) = 0.56, p = 0.69]$ ,  $n = 4-6$ ), su latencia (CLAT; ANOVA  $[F(4,21) = 0.43, p = 0.78]$ ), la amplitud del estímulo de prueba (TAMP; ANOVA  $[F(4,21) = 0.60, p = 0.66]$ ), su latencia (TLAT; ANOVA  $[F(4,21) = 0.59, p = 0.67]$ ), ni en el cociente de la amplitud del pulso de prueba y el pulso condicionante (T/C; ANOVA  $[F(4,21) = 0.11, p = 0.98]$ ), Fig. An 6a-b.

## La depleción del *Cx3cr1* protege contra el efecto epileptogénico del MK-801

La administración neonatal de MK-801 se ha asociado con un incremento en la susceptibilidad a crisis convulsivas en la adultez en rata (Gorter et al., 1991; Li et al., 2015; Pierson & Swann, 1991). Dados los cambios en la composición espectral del potencial de campo en los animales tratados con MK-801, su susceptibilidad a crisis epilépticas fue evaluada en un protocolo de crisis convulsivas inducidas con la administración aguda de PTZ.

En los ratones WT el tratamiento neonatal con MK-801 tiene un efecto significativo en la severidad de las crisis convulsivas en función de la dosis administrada, (ANOVA modelo mixto, tratamiento x dosis: [ $F(8,116) = 3.15, p = 0.0028$ ], Fig. An 6c). Concretamente, la dosis alta de MK-801 incrementó la severidad de las crisis inducidas por la dosis más baja de PTZ en comparación con el grupo control (T-Student múltiples con corrección de Holm; control vs 1mg/kg a 20mg/kg de PTZ:  $p = 0.001$ , Fig. An 6c). Lo cual indica que hay una disminución en el umbral para producir crisis convulsivas.

Este efecto no fue encontrado en la comparación de grupos WT con los KO controles y los KO tratados con la dosis baja de MK-801 (ANOVA modelo mixto, grupo x dosis: [ $F(12,168) = 1.35, p = 0.19$ ], Fig. An 6d).

Sin embargo, puede apreciarse una tendencia a un incremento en la severidad máxima alcanzada por el grupo WT-0.5mg/kg, (Fig. An 6e). Este incremento se debe a una exacerbada mortalidad en el grupo WT-0.5mg/kg del cual cerca del 60% de sujetos desarrolló paro respiratorio o *status epilepticus*. Una proporción mucho mayor que la del grupo control (16%) o a la de cualquier otro grupo (16-25%) (prueba binomial con corrección de Holm; WT-Salina vs WT-0.5mg/kg,  $p = 0.005$ , Fig. An 6e). Este incremento en la mortalidad está ausente en el grupo KO tratado con MK-801 y sugiere un efecto protector específico del genotipo.

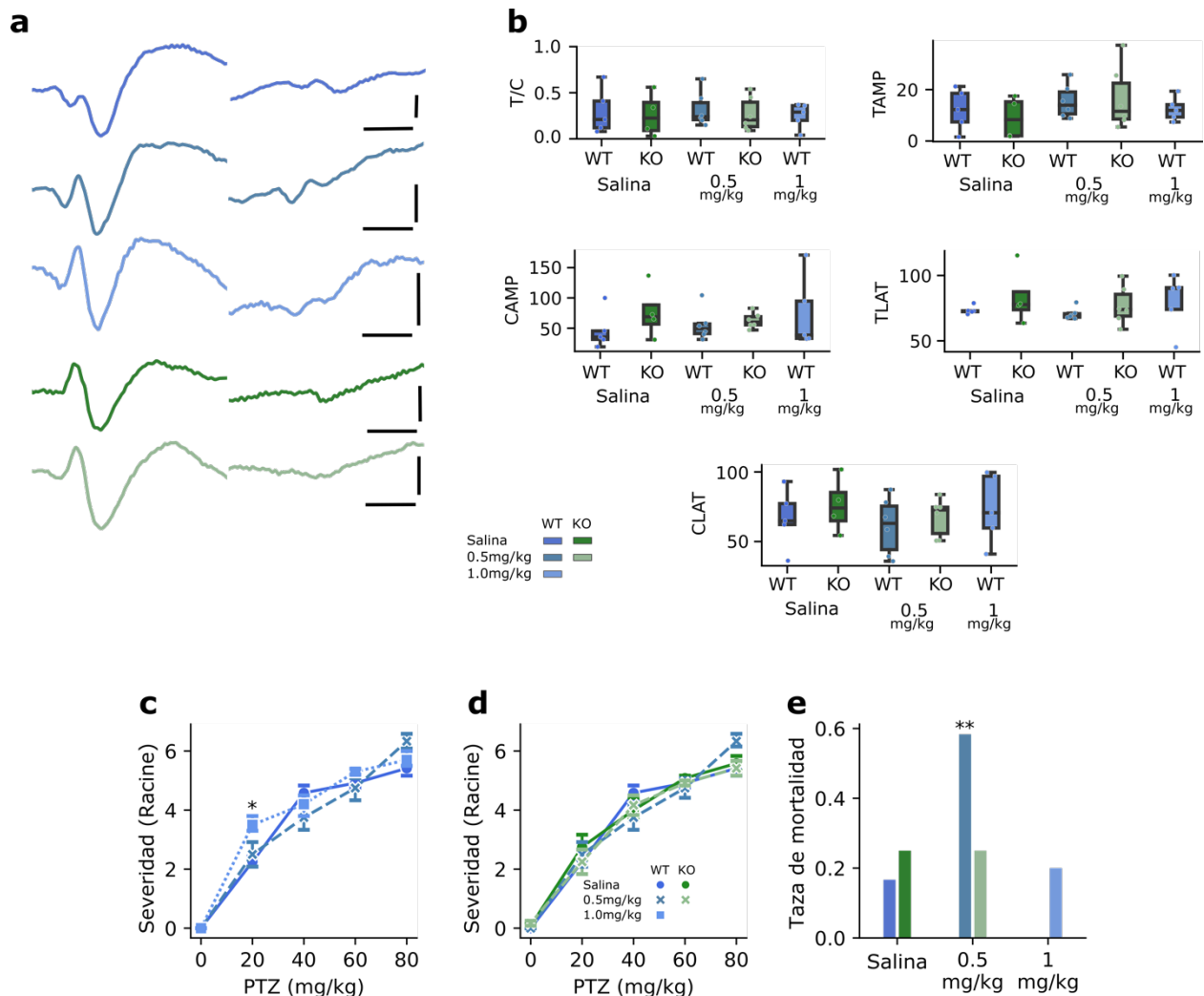


Fig.An. 27 La depleción del *Cx3cr1* previene el efecto epileptogénico del tratamiento neonatal con MK-801

a) Potenciales evocados promedio representativos para cada grupo y estímulo (condicionante *izq.*, prueba *der.*) muestran una función de atenuación adecuada en todos los grupos. b) Ninguno de los parámetros evaluados en la estimulación auditiva pareada muestra cambios significativos; T/C: ANOVA de una vía,  $[F(4,21) = 0.11, p = 0.98]$ ,  $n = 4-6$ , CAMP: ANOVA  $[F(4,21) = 0.56, p = 0.69]$ , TAMP: ANOVA  $[F(4,21) = 0.60, p = 0.66]$ , TLAT: ANOVA  $[F(4,21) = 0.59, p = 0.67]$ , CLAT: ANOVA  $[F(4,21) = 0.43, p = 0.78]$ . c) El tratamiento con la dosis alta de MK-801 incrementa la susceptibilidad a las crisis convulsivas inducidas por PTZ a 20mg/kg en comparación con el grupo control, (ANOVA modelo mixto, tratamiento x dosis:  $[F(8,116) = 3.15, p = 0.0028]$ , T-Student múltiples con corrección de Holm; control vs 1mg/kg a 20mg/kg de PTZ:  $p = 0.001$ ,  $n = 10-12$ ). d) La dosis baja del tratamiento con MK-801 no modifica significativamente la severidad en la escala modificada de Racine de ningún grupo, ANOVA modelo mixto, grupo x dosis:  $[F(12,168) = 1.35, p = 0.19]$ ,  $n = 12$ . e) La mortalidad del protocolo con PTZ, sin embargo, es drásticamente incrementada en el grupo WT tratado con MK-801 a dosis baja, un efecto que se encuentra ausente en el grupo KO con tratamiento similar, (prueba binomial con corrección de holm; WT-Salina vs WT-0.5mg/kg,  $p = 0.005$ ).

## Discusión

El presente estudio parte de la hipótesis primaria de que la depleción del *Cx3cr1*, como factor predisponente, tendría un efecto sinérgico en las alteraciones inducidas por el modelo de administración neonatal de MK-801, como factor detonante, en el contexto de la hipótesis del doble “hit” de la esquizofrenia (Bayer et al., 1999; Guerrin et al., 2021).

Los resultados muestran una interacción compleja entre los factores estudiados en una gama amplia de efectos desde las consecuencias agudas de la administración de MK-801 en neonatos de ambos sexos, su impacto en el desarrollo posterior hasta la adultez, las alteraciones cognitivas que afectan conductas innatas, exploratorias y mnemónicas, los cambios en la actividad de red en el hipocampo potencialmente asociados a las alteraciones cognitivas y, finalmente, la susceptibilidad a las crisis convulsivas.

Inesperadamente, las interacciones encontradas varían enormemente desde un sinergismo agudo, hasta el antagonismo, además de una serie de efectos mediados de manera independiente por cada factor.

El efecto sinérgico más importante es el severo incremento de la toxicidad del tratamiento neonatal con MK-801 en los animales con depleción del *Cx3cr1*, que se ve reflejado en un drástico aumento en la mortalidad de este grupo acompañado de un aumento similar en la apoptosis neuronal aguda durante el tratamiento farmacológico. Previamente, se ha documentado la inducción de apoptosis neuronal en el período neonatal ante el antagonismo de receptores NMDA (Hansen et al., 2004; Ikonomidou et al., 1999) y otras formas de bloqueo de la actividad eléctrica neuronal (Heck et al., 2008; Wagner-Golbs & Luhmann, 2012). Este fenómeno está asociado a una súbita caída en la expresión de factores tróficos neuronales, incluyendo el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), la neurotrofina-3 (NT-3) y el factor neurotrófico derivado de la glia (GDNF), cuya síntesis está ligada a la activación de los receptores NMDA (Heck et al., 2008; Wagner-Golbs & Luhmann, 2012). La microglia tiene un papel preponderante en el soporte metabólico de las neuronas en el desarrollo y la adultez (Davis et al., 1994; Szepesi et al., 2018b), especialmente la vía de la fractalquina es necesaria para la producción del factor de crecimiento parecido a la insulina-1 (IGF-1) (Ueno et al., 2013b), y el factor de crecimiento derivado del endotelio (VEGF) (Finneran et al., 2019). La interrupción de esta vía de comunicación es suficiente para reducir la producción de IGF-1 y causar la apoptosis neuronal de una subpoblación de neuronas corticales (Ueno et al., 2013b).

Es posible que el incremento en la apoptosis neuronal y, subsecuentemente, la mortalidad del modelo se deba a una incapacidad de la microglia de responder con la producción de factores

tróficos necesarios para la supervivencia neuronal en condiciones de estrés inducidas por la aplicación del NMDA.

El severo incremento en la apoptosis neuronal en el presente modelo recalca la importancia de la comunicación entre neuronas y microglia y las consecuencias de una reactividad inapropiada por parte de la microglia, lo que podría tener importantes repercusiones clínicas en el contexto del uso de sedantes o anestésicos en personas con una variante de este receptor o en pacientes neonatales (Heck et al., 2008; Ishizuka et al., 2017b).

A pesar de la clara asociación entre la mortalidad y el incremento en la apoptosis neuronal, un factor no controlado en este estudio es la disminución en el cese temporal de la alimentación durante el período de acción del MK-801, el cual podría añadir al efecto neurotóxico y al retraso en el desarrollo, así como el impacto del MK-801 en otros órganos o sistemas fisiológicos como el corazón, los riñones y el sistema gastrointestinal donde los receptores NMDA son abundantemente expresados (Gill & Pulido, 2001).

Un obstáculo prevalente en la investigación básica de trastornos multifactoriales y complejos como la esquizofrenia es la falta de modelos apropiados y pruebas para la gran diversidad de síntomas que comprende la patología. En el caso de la esquizofrenia, a pesar de su alta prevalencia, los síntomas negativos son particularmente difíciles de estudiar (Guerrin et al., 2021). Síntomas como la avolición comprometen la capacidad del paciente de cuidar de sí mismo aún en ausencia de alucinaciones, delirio u otros síntomas positivos (Strauss et al., 2021).

En este sentido, la incapacidad es semejante al compromiso de las actividades de la vida diaria observadas en otras patologías como la enfermedad de Alzheimer (Marshall et al., 2012). En modelos animales, se han propuesto a las conductas innatas (e.g. anidación y excavación) como correlatos de las actividades de la vida diaria en humanos, ya que son conductas cuyo objetivo es cubrir necesidades primarias (Deacon, 2012; Gaskill et al., 2013; Jirkof, 2014). Los resultados muestran que tanto la anidación como la excavación son pruebas útiles y con diferente sensibilidad para la detección de problemas cognitivos asociados a las manipulaciones experimentales aquí estudiadas. Mientras que la anidación sólo presentó un efecto significativo en el grupo de la más alta dosis de MK-801 (Fig. An 1a), la excavación se vio alterada tanto por todos los tratamientos farmacológicos como por la depleción del *Cx3cr1* (Fig. An 1b). En ninguna de estas pruebas se detecta una interacción sinérgica entre el genotipo y el tratamiento farmacológico. Sin embargo, es posible que la excavación presente un efecto de piso en la modalidad aquí implementada y variaciones en el material utilizado o el peso total podrían proveer más información (Deacon, 2006b).

Las pruebas del campo abierto y el laberinto en Y presentan resultados consistentes con una exacerbada respuesta al estrés (Fig. An 2), caracterizada por una marcada disminución de la

actividad exploratoria tanto horizontal como vertical. En los animales WT, estos efectos son dependientes de la dosis, mientras que en los KO son afectados por ambos factores: el genotipo y el tratamiento farmacológico (Fig. An 3). Cabe resaltar que incluso en condiciones de menor estrés como un laberinto menos intensamente iluminado y con pasillos angostos, la actividad exploratoria se ve disminuida de manera importante en el grupo KO con un efecto aditivo en el grupo KO-0.5mg/kg, (Fig. 3d). Esta importante disminución de la exploración podría ser interpretado como rasgos de ansiedad e hipervigilancia (McAuley et al., 2009).

Sorprendentemente, tanto el tratamiento neonatal con MK-801 como la depleción del *Cx3cr1* tienen efectos profundos sobre la composición espectral del potencial de campo en todas las regiones estudiadas del hipocampo. Sin embargo, estos efectos son opuestos entre sí y su interacción revierte parcialmente los efectos de cada uno (Fig. An 4 y 5). En concreto, el tratamiento neonatal con MK-801 desplaza el poder de las frecuencias bajas (i.e. delta) en favor de las frecuencias más rápidas (i.e. theta y gamma), mientras que la depleción del *Cx3cr1* incrementa el poder de las frecuencias lentas a expensas de las rápidas. Esta divergencia en los efectos en el potencial de campo indica que las manipulaciones experimentales estudiadas modifican la actividad neuronal a largo plazo a través de mecanismos fundamentalmente distintos. En este mismo sentido, las modificaciones inducidas por el genotipo KO previenen los cambios provocados por el tratamiento farmacológico y, en última instancia, protegen contra el efecto epileptogénico del tratamiento con MK-801 (Fig. An 6).

Considerando los robustos cambios en la actividad neuronal presentados, es inesperada la conservación del filtrado sensorial, (Fig. An 6), lo que es indicativo de que el sistema GABAérgico conserva su función en el circuito local (Miller & Freedman, 1995; Moxon et al., 1999) ante la presencia de ambas condiciones experimentales.

## Conclusiones

La depleción del *Cx3cr1* interactúa de manera compleja con la administración del antagonista NMDA MK-801 durante el periodo neonatal. De manera aguda, la interrupción de la señalización a través de la vía de la fractalquina incrementa la toxicidad del MK-801, induciendo mayor apoptosis neuronal y en última instancia una mayor tasa de mortalidad en los animales KO, posiblemente a consecuencia de un insuficiente aporte trófico por parte de la microglia (Finneran et al., 2019; Ueno et al., 2013b).

En la adultez, el genotipo y el tratamiento farmacológico alteran una amplia gama de conductas incluyendo conductas innatas similares a las actividades de la vida diaria, la respuesta al estrés, la exploración espacial, y la memoria contextual. Sin embargo, hay nula o mínima interacción de estos factores y los resultados indican que las alteraciones son mediadas de manera independiente por cada uno de los factores, abriendo la posibilidad de mecanismos paralelos de acción.

Finalmente, ambos factores inducen cambios robustos en la actividad de red del circuito hipocampal modificando la potencia relativa de distintas bandas de interés. Sin embargo, estos efectos son antagonistas entre sí y el resultado final es una reversión parcial de estas alteraciones en el grupo con ambos factores, (i.e. KO-0.5mg/kg), sugiriendo nuevamente mecanismos paralelos de acción. En el contexto de la susceptibilidad a las crisis convulsivas, los cambios inducidos por la depleción del *Cx3cr1* previenen el incremento en la severidad de las crisis y la consiguiente mayor tasa de mortalidad provocados por el tratamiento con MK-801.

Las conductas innatas muestran ser pruebas sencillas y económicas pero sensibles a los efectos de ambos factores y se sugiere su adaptación para el estudio de los síntomas negativos de la esquizofrenia.

## Referencias

- Acsády, L., Kamondi, A., Sík, A., Freund, T., & Buzsáki, G. (1998). GABAergic cells are the major postsynaptic targets of mossy fibers in the rat hippocampus. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *18*(9), 3386–3403.
- Adams, B., Lee, M., Fahnstock, M., & Racine, R. J. (1997). Long-term potentiation trains induce mossy fiber sprouting. *Brain Research*, *775*(1), 193–197. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(97\)01061-5](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(97)01061-5)
- Adler, L. E., Olincy, A., Waldo, M., Harris, J. G., Griffith, J., Stevens, K., Flach, K., Nagamoto, H., Bickford, P., Leonard, S., & Freedman, R. (1998). Schizophrenia, Sensory Gating, and

- Nicotinic Receptors. *Schizophrenia Bulletin*, 24(2), 189–202.  
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.schbul.a033320>
- Ali, I., Chugh, D., & Ekdahl, C. T. (2015). Role of fractalkine-CX3CR1 pathway in seizure-induced microglial activation, neurodegeneration, and neuroblast production in the adult rat brain. *Neurobiology of Disease*, 74, 194–203. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.11.009>
- Allen, N. J., & Barres, B. A. (2009). Glia—More than just brain glue. *Nature*, 457(7230), 675–677.  
<https://doi.org/10.1038/457675a>
- Amaral, D. G. (1993). Emerging principles of intrinsic hippocampal organization. In *Current Opinion in Neurobiology* (Vol. 3, Issue 2, pp. 225–229). [https://doi.org/10.1016/0959-4388\(93\)90214-J](https://doi.org/10.1016/0959-4388(93)90214-J)
- Amaral, D. G., Dolorfo, C., & Alvarez-Royo, P. (1991). Organization of CA1 projections to the subiculum: A PHA-L analysis in the rat. *Hippocampus*, 1(4), 415–435.  
<https://doi.org/10.1002/hipo.450010410>
- Amaral, D. G., & Lavenex, P. (2006). Hippocampal Neuroanatomy. In *The Hippocampus Book* (pp. 37–114). Oxford University Press.  
<https://oxford.universitypressscholarship.com/view/10.1093/acprof:oso/9780195100273.001.0001/acprof-9780195100273-chapter-3>
- Amaral, D. G., Scharfman, H. E., & Lavenex, P. (2007). The dentate gyrus: Fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Progress in Brain Research*, 163, 3–22. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(07\)63001-5](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(07)63001-5)
- Amaral, D. G., & Witter, M. P. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: A review of anatomical data. *Neuroscience*, 31(3), 571–591.  
[https://doi.org/10.1016/0306-4522\(89\)90424-7](https://doi.org/10.1016/0306-4522(89)90424-7)



- Amaral, L. a. N., Scala, A., Barthélémy, M., & Stanley, H. E. (2000). Classes of small-world networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(21), 11149–11152.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.200327197>
- Andersen, P., Morris, R., Amaral, D., Bliss, T., & O’Keefe, J. (2006a). Historical Perspective: Proposed Functions, Biological Characteristics, and Neurobiological Models of the Hippocampus. In *The Hippocampus Book*. Oxford University Press.  
<https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780195100273.003.0002>
- Andersen, P., Morris, R., Amaral, D., Bliss, T., & O’Keefe, J. (2006b). The Hippocampal Formation. In *The Hippocampus Book*. Oxford University Press.  
<https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780195100273.003.0001>
- Andersen, P., Soleng, A. F., & Raastad, M. (2000). The hippocampal lamella hypothesis revisited. *Brain Research*, *886*(1–2), 165–171. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(00\)02991-7](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(00)02991-7)
- Arganda-Carreras, I., Fernández-González, R., Muñoz-Barrutia, A., & Ortiz-De-Solorzano, C. (2010). 3D reconstruction of histological sections: Application to mammary gland tissue. *Microscopy Research and Technique*, *73*(11), 1019–1029.  
<https://doi.org/10.1002/jemt.20829>
- Arnoux, I., & Audinat, E. (2015a). Fractalkine signaling and microglia functions in the developing brain. *Neural Plasticity*, *2015*. <https://doi.org/10.1155/2015/689404>
- Arnoux, I., & Audinat, E. (2015b). Fractalkine signaling and microglia functions in the developing brain. *Neural Plasticity*, *2015*. <https://doi.org/10.1155/2015/689404>
- Arshadi, C., Günther, U., Eddison, M., Harrington, K. I. S., & Ferreira, T. A. (2021). SNT: A unifying toolbox for quantification of neuronal anatomy. *Nature Methods*, *18*(4), 374–377.  
<https://doi.org/10.1038/s41592-021-01105-7>

- Augusto-Oliveira, M., Arrifano, G. P., Delage, C. I., Tremblay, M.-È., Crespo-Lopez, M. E., & Verkhatsky, A. (2022). Plasticity of microglia. *Biological Reviews*, *97*(1), 217–250. <https://doi.org/10.1111/brv.12797>
- Bachstetter, A. D., Morganti, J. M., Jernberg, J., Schlunk, A., Mitchell, S. H., Brewster, K. W., Hudson, C. E., Cole, M. J., Harrison, J. K., Bickford, P. C., & Gemma, C. (2011). Fractalkine and CX3CR1 regulate hippocampal neurogenesis in adult and aged rats. *Neurobiology of Aging*, *32*(11), 2030–2044. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2009.11.022>
- Baier, P. C., Blume, A., Koch, J., Marx, A., Fritzer, G., Aldenhoff, J. B., & Schiffelholz, T. (2009). Early postnatal depletion of NMDA receptor development affects behaviour and NMDA receptor expression until later adulthood in rats—A possible model for schizophrenia. *Behavioural Brain Research*, *205*(1), 96–101. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.06.018>
- Basilico, B., Pagani, F., Grimaldi, A., Cortese, B., Di Angelantonio, S., Weinhard, L., Gross, C., Limatola, C., Maggi, L., & Ragozzino, D. (2019). Microglia shape presynaptic properties at developing glutamatergic synapses. *Glia*, *67*(1), 53–67. <https://doi.org/10.1002/glia.23508>
- Bayer, T. A., Falkai, P., & Maier, W. (1999). Genetic and non-genetic vulnerability factors in schizophrenia: The basis of the “Two hit hypothesis.” *Journal of Psychiatric Research*, *33*(6), 543–548. [https://doi.org/10.1016/S0022-3956\(99\)00039-4](https://doi.org/10.1016/S0022-3956(99)00039-4)
- Bellingham, M. C., Lim, R., & Walmsley, B. (1998a). Developmental changes in EPSC quantal size and quantal content at a central glutamatergic synapse in rat. *Journal of Physiology*, *511*(3), 861–869. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1998.861bg.x>
- Bellingham, M. C., Lim, R., & Walmsley, B. (1998b). Developmental changes in EPSC quantal size and quantal content at a central glutamatergic synapse in rat. *Journal of Physiology*, *511*(3), 861–869. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1998.861bg.x>

- Belvindrah, R., Nosten-Bertrand, M., & Francis, F. (2014). Neuronal migration and its disorders affecting the CA3 region. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *8*(March), 63.  
<https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00063>
- Ben-Ari, Y. (2001). Developing networks play a similar melody. *Trends in Neurosciences*, *24*(6), 353–360. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(00\)01813-0](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(00)01813-0)
- Ben-Ari, Y., Cherubini, E., Corradetti, R., & Gaiarsa, J. L. (1989). Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. *The Journal of Physiology*, *416*(1), 303–325.  
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1989.sp017762>
- Bergon, A., Belzeaux, R., Comte, M., Pelletier, F., Hervé, M., Gardiner, E. J., Beveridge, N. J., Liu, B., Carr, V., Scott, R. J., Kelly, B., Cairns, M. J., Kumarasinghe, N., Schall, U., Blin, O., Boucraut, J., Tooney, P. A., Fakra, E., & Ibrahim, E. C. (2015). CX3CR1 is dysregulated in blood and brain from schizophrenia patients. *Schizophrenia Research*, *168*(1–2), 434–443.  
<https://doi.org/10.1016/j.schres.2015.08.010>
- Bertot, C., Groc, L., & Avignone, E. (2019). Role of CX3CR1 Signaling on the Maturation of GABAergic Transmission and Neuronal Network Activity in the Neonate Hippocampus. *Neuroscience*, *406*, 186–201. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.03.006>
- Bessis, A., Béchade, C., Bernard, D., & Roumier, A. (2007). Microglial control of neuronal death and synaptic properties. *Glia*, *55*(3), 233–238. <https://doi.org/10.1002/glia.20459>
- Bischofberger, J., Engel, D., Li, L., Geiger, J. R., & Jonas, P. (2006a). Patch-clamp recording from mossy fiber terminals in hippocampal slices. *Nature Protocols*, *1*(4), 2075–2081.  
<https://doi.org/10.1038/nprot.2006.312>

- Bischofberger, J., Engel, D., Li, L., Geiger, J. R. P., & Jonas, P. (2006b). Patch-clamp recording from mossy fiber terminals in hippocampal slices. *Nature Protocols*, *1*(4), 2075–2081.  
<https://doi.org/10.1038/nprot.2006.312>
- Bischofberger, J., Engel, D., Li, L., Geiger, J. R. P., & Jonas, P. (2006c). Patch-clamp recording from mossy fiber terminals in hippocampal slices. *Nature Protocols*, *1*(4), 2075–2081.  
<https://doi.org/10.1038/nprot.2006.312>
- Blank, T., & Prinz, M. (2013). Microglia as modulators of cognition and neuropsychiatric disorders. *Glia*, *61*(1), 62–70. <https://doi.org/10.1002/glia.22372>
- Boehm, G. W., Sherman, G. F., Hoplight, B. J., Hyde, L. A., Waters, N. S., Bradway, D. M., Galaburda, A. M., & Denenberg, V. H. (1996). Learning and memory in the autoimmune BXSB mouse: Effects of neocortical ectopias and environmental enrichment. *Brain Research*, *726*(1), 11–22. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(96\)00299-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(96)00299-5)
- Bolós, M., Llorens-Martín, M., Perea, J. R., Jurado-Arjona, J., Rábano, A., Hernández, F., & Avila, J. (2017). Absence of CX3CR1 impairs the internalization of Tau by microglia. *Molecular Neurodegeneration*, *12*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0200-1>
- Bolós, M., Perea, J. R., Terreros-Roncal, J., Pallas-Bazarra, N., Jurado-Arjona, J., Ávila, J., & Llorens-Martín, M. (2018). Absence of microglial CX3CR1 impairs the synaptic integration of adult-born hippocampal granule neurons. *Brain, Behavior, and Immunity*, *68*, 76–89.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.10.002>
- Boutet, I., Collin, C. A., MacLeod, L. S., Messier, C., Holahan, M. R., Berry-Kravis, E., Gandhi, R. M., & Kogan, C. S. (2018). Utility of the Hebb–Williams Maze Paradigm for Translational Research in Fragile X Syndrome: A Direct Comparison of Mice and Humans. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *11*(March), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00099>

- Bradl, M., & Lassmann, H. (2010). Oligodendrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, *119*(1), 37–53. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0601-5>
- Braff, L., & Braff, D. L. (2013). The Neuropsychiatric Translational Revolution Still Very Early and Still Very Challenging. *JAMA Psychiatry*, *70*(8), 777–779. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2013.2184>
- Brainard, D. H. (1997). The Psychophysics Toolbox. *Spatial Vision*, *10*(4), 433–436.
- Brockhaus-Dumke, A., Schultze-Lutter, F., Mueller, R., Tendolkar, I., Bechdolf, A., Pukrop, R., Klosterkoetter, J., & Ruhrmann, S. (2008). Sensory Gating in Schizophrenia: P50 and N100 Gating in Antipsychotic-Free Subjects at Risk, First-Episode, and Chronic Patients. *Biological Psychiatry*, *64*(5), 376–384. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2008.02.006>
- Buckmaster, P. S. (2012). Mossy Fiber Sprouting in the Dentate Gyrus UNDER WHAT CIRCUMSTANCES DOES MOSSY FIBER SPROUTING OCCUR? *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies, Md*, 1–29.
- Buckner, R. L. (2010). The Role of the Hippocampus in Prediction and Imagination. *Annual Review of Psychology*, *61*(1), 27–48. <https://doi.org/10.1146/annurev.psych.60.110707.163508>
- Bullmore, E., & Sporns, O. (2009a). Complex brain networks: Graph theoretical analysis of structural and functional systems. *Nature Reviews Neuroscience*, *10*(3), 186–198. <https://doi.org/10.1038/nrn2575>
- Bullmore, E., & Sporns, O. (2009b). Complex brain networks: Graph theoretical analysis of structural and functional systems. *Nature Reviews Neuroscience*, *10*(3), 186–198. <https://doi.org/10.1038/nrn2575>
- Buzsáki, G., & Moser, E. I. (2013). Memory, navigation and theta rhythm in the hippocampal-entorhinal system. *Nature Neuroscience*, *16*(2), 130–138. <https://doi.org/10.1038/nn.3304>

- Cardona, A. E., Pioro, E. P., Sasse, M. E., Kostenko, V., Cardona, S. M., Dijkstra, I. M., Huang, D. R., Kidd, G., Dombrowski, S., Dutta, R., Lee, J. C., Cook, D. N., Jung, S., Lira, S. A., Littman, D. R., & Ransohoff, R. M. (2006a). Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nature Neuroscience*, *9*(7), 917–924. <https://doi.org/10.1038/nn1715>
- Cardona, A. E., Pioro, E. P., Sasse, M. E., Kostenko, V., Cardona, S. M., Dijkstra, I. M., Huang, D. R., Kidd, G., Dombrowski, S., Dutta, R., Lee, J. C., Cook, D. N., Jung, S., Lira, S. A., Littman, D. R., & Ransohoff, R. M. (2006b). Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nature Neuroscience*, *9*(7), 917–924. <https://doi.org/10.1038/nn1715>
- Carola, V., D'Olimpio, F., Brunamonti, E., Mangia, F., & Renzi, P. (2002). Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. *Behavioural Brain Research*, *134*(1), 49–57. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(01\)00452-1](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(01)00452-1)
- Castro-Sánchez, S., García-Yagüe, Á. J., Kügler, S., & Lastres-Becker, I. (2019). CX3CR1-deficient microglia shows impaired signalling of the transcription factor NRF2: Implications in tauopathies. *Redox Biology*, *22*, 101118. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101118>
- Cenquizca, L. A., & Swanson, L. W. (2006). An Analysis of Direct Hippocampal Cortical Field CA1 Axonal Projections to Diencephalon in the Rat. *The Journal of Comparative Neurology*, *497*(1), 101–114. <https://doi.org/10.1002/cne.20985>
- Chattarji, S., Stanton, P. K., & Sejnowski, T. J. (1989). Commissural synapses, but not mossy fiber synapses, in hippocampal field CA3 exhibit associative long-term potentiation and depression. *Brain Research*, *495*(1), 145–150. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(89\)91228-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(89)91228-6)

- Chen, X., Wei, Q., Hu, Y., & Wang, C. (2020). Role of Fractalkine in promoting inflammation in sepsis-induced multiple organ dysfunction. *Infection, Genetics and Evolution*, *85*, 104569. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104569>
- Cheng, C., Trzcinski, O., & Doering, L. C. (2014). Fluorescent labeling of dendritic spines in cell cultures with the carbocyanine dye "DiI." *Frontiers in Neuroanatomy*, *8*, 30. <https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00030>
- Chinnery, H. R., McLenachan, S., Humphries, T., Kezic, J. M., Chen, X., Ruitenbergh, M. J., & McMenamin, P. G. (2012). Accumulation of murine subretinal macrophages: Effects of age, pigmentation and CX3CR1. *Neurobiology of Aging*, *33*(8), 1769–1776. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.03.010>
- Coleman, L. G., Jarskog, L. F., Moy, S. S., & Crews, F. T. (2009). Deficits in adult prefrontal cortex neurons and behavior following early post-natal NMDA antagonist treatment. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *93*(3), 322–330. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2009.04.017>
- Cutts, C. S., & Eglén, S. J. (2014). Detecting Pairwise Correlations in Spike Trains: An Objective Comparison of Methods and Application to the Study of Retinal Waves. *Journal of Neuroscience*, *34*(43), 14288–14303. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2767-14.2014>
- Davis, E. J., Foster, T. D., & Thomas, W. E. (1994). Cellular forms and functions of brain microglia. *Brain Research Bulletin*, *34*(1), 73–78. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(94\)90189-9](https://doi.org/10.1016/0361-9230(94)90189-9)
- Deacon, R. (2012). Assessing Burrowing, Nest Construction, and Hoarding in Mice. *J. Vis. Exp*, *59*, 2607. <https://doi.org/10.3791/2607>
- Deacon, R. M. J. (2006a). Assessing nest building in mice. *Nature Protocols*, *1*(3), 1117–1119. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.170>

- Deacon, R. M. J. (2006b). Burrowing in rodents: A sensitive method for detecting behavioral dysfunction. *Nature Protocols*, *1*(1), 118–121. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.19>
- Deacon, R. M. J., Croucher, A., & Rawlins, J. N. P. (2002). Hippocampal cytotoxic lesion effects on species-typical behaviours in mice. *Behavioural Brain Research*, *132*(2), 203–213. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(01\)00401-6](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(01)00401-6)
- Deacon, R. M. J., Penny, C., & Rawlins, J. N. P. (2003). Effects of medial prefrontal cortex cytotoxic lesions in mice. *Behavioural Brain Research*, *139*(1), 139–155. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(02\)00225-5](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(02)00225-5)
- Debanne, D., Guérineau, N. C., Gähwiler, B. H., & Thompson, S. M. (1996). Paired-pulse facilitation and depression at unitary synapses in rat hippocampus: Quantal fluctuation affects subsequent release. *The Journal of Physiology*, *491* ( Pt 1(1996)), 163–176. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1996.sp021204>
- Del Rio-Hortega, P. (1919). El tercer elemento de los centros nerviosos. I. La microglia en estado normal. II. Intervención de la microglia en los procesos patológicos. III. Naturaleza probable de la microglia. *Boletín de La Sociedad Española de Biología*, *9*, 69–120.
- Dere, E., Kart-Teke, E., Huston, J. P., & De Souza Silva, M. A. (2006). The case for episodic memory in animals. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *30*(8), 1206–1224. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2006.09.005>
- Deschenes, C. L., & McCurry, S. M. (2009). Current treatments for sleep disturbances in individuals with dementia. *Current Psychiatry Reports*, *11*(1), 20–26. <https://doi.org/10.1007/s11920-009-0004-2>
- Dissanayake, D. W. N., Zachariou, M., Marsden, C. A., & Mason, R. (2008). Auditory gating in rat hippocampus and medial prefrontal cortex: Effect of the cannabinoid agonist WIN55,212-



2. *Neuropharmacology*, 55(8), 1397–1404.

<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.08.039>

Donnelly, D. J., Longbrake, E. E., Shawler, T. M., Kigerl, K. A., Lai, W., Tovar, C. A., Ransohoff, R. M., & Popovich, P. G. (2011). Deficient CX3CR1 Signaling Promotes Recovery after Mouse Spinal Cord Injury by Limiting the Recruitment and Activation of Ly6Clo/iNOS+ Macrophages. *The Journal of Neuroscience*, 31(27), 9910–9922.

<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2114-11.2011>

Druart, M., Nosten-Bertrand, M., Poll, S., Crux, S., Nebeling, F., Delhay, C., Dubois, Y., Mittag, M., Leboyer, M., Tamouza, R., Fuhrmann, M., & Le Magueresse, C. (2021). Elevated expression of complement C4 in the mouse prefrontal cortex causes schizophrenia-associated phenotypes. *Molecular Psychiatry*, 26(7), 3489–3501. <https://doi.org/10.1038/s41380-021-01081-6>

Eichenbaum, H. (2000). Hippocampus: Mapping or memory? *Current Biology*, 10(21), 785–787.

[https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00763-6](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00763-6)

Eichenbaum, H. (2004). Hippocampus: Cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory. *Neuron*, 44(1), 109–120.

<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.08.028>

Eichenbaum, H., & Cohen, N. J. (2014). Can We Reconcile the Declarative Memory and Spatial Navigation Views on Hippocampal Function? *Neuron*, 83(4), 764–770.

<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.07.032>

Eichenbaum, H., Dudchenko, P., Wood, E., Shapiro, M., & Tanila, H. (1999). The hippocampus, memory, and place cells: Is it spatial memory or a memory space? *Neuron*, 23(2), 209–226.

[https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80773-4](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80773-4)

- Eltokhi, A., Kurpiers, B., & Pitzer, C. (2020). Behavioral tests assessing neuropsychiatric phenotypes in adolescent mice reveal strain- and sex-specific effects. *Scientific Reports*, *10*(1), 11263. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67758-0>
- Ennaceur, A. (2014a). Tests of unconditioned anxiety—Pitfalls and disappointments. In *Physiology and Behavior* (Vol. 135). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.05.032>
- Ennaceur, A. (2014b). Tests of unconditioned anxiety—Pitfalls and disappointments. In *Physiology and Behavior* (Vol. 135, pp. 55–71). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.05.032>
- Evstratova, A., & Tóth, K. (2014). Information processing and synaptic plasticity at hippocampal mossy fiber terminals. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *8*(February), 28. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00028>
- Eyo, U. B., Peng, J., Murugan, M., Mo, M., Lalani, A., Xie, P., Xu, P., Margolis, D. J., & Wu, L.-J. (2016). Regulation of Physical Microglia–Neuron Interactions by Fractalkine Signaling after Status Epilepticus. *ENeuro*, *3*(6). <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0209-16.2016>
- Eyo, U. B., & Wu, L.-J. (2019). Microglia: Lifelong Patrolling Immune Cells of the Brain. *Progress in Neurobiology*, *April*, 101614. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2019.04.003>
- Féger, J., & Hirsch, E. C. (2015). In search of innovative therapeutics for neuropsychiatric disorders: The case of neurodegenerative diseases. *Annales Pharmaceutiques Francaises*, *73*(1), 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.pharma.2014.10.001>
- Feigenson, K. A., Kusnecov, A. W., & Silverstein, S. M. (2014). Inflammation and the Two-Hit Hypothesis of Schizophrenia. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *38*, 72–93. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2013.11.006>

- Feinberg, I. (1982). Schizophrenia: Caused by a fault in programmed synaptic elimination during adolescence? *Journal of Psychiatric Research*, *17*(4), 319–334.  
[https://doi.org/10.1016/0022-3956\(82\)90038-3](https://doi.org/10.1016/0022-3956(82)90038-3)
- Feldt, S., Bonifazi, P., & Cossart, R. (2011). Dissecting functional connectivity of neuronal microcircuits: Experimental and theoretical insights. *Trends in Neurosciences*, *34*(5), 225–236. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2011.02.007>
- File, S. E., Lippa, A. S., Beer, B., & Lippa, M. T. (2004). Animal Tests of Anxiety. *Current Protocols in Neuroscience*, *26*(1), 8.3.1-8.3.22. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0803s26>
- Finneran, D. J., Morgan, D., Gordon, M. N., & Nash, K. R. (2019). CNS-Wide over Expression of Fractalkine Improves Cognitive Functioning in a Tauopathy Model. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, *14*(2), 312–325. <https://doi.org/10.1007/s11481-018-9822-5>
- Fornito, A., Zalesky, A., & Bullmore, E. (2016a). Connectivity Matrices and Brain Graphs. In *Fundamentals of Brain Network Analysis* (First, pp. 89–113). Academic Press.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407908-3.00003-0>
- Fornito, A., Zalesky, A., & Bullmore, E. (2016b). Motifs, Small Worlds, and Network Economy. In *Fundamentals of Brain Network Analysis* (First, pp. 257–301). Academic Press.  
<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-407908-3.00008-x>
- Fornito, A., Zalesky, A., & Bullmore, E. (2016c). Node Degree and Strength. In *Fundamentals of Brain Network Analysis* (pp. 115–136). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-407908-3.00004-2>

- Fredriksson, A., & Archer, T. (2004). Neurobehavioural deficits associated with apoptotic neurodegeneration and vulnerability for ADHD. *Neurotoxicity Research*, *6*(6), 435–456.  
<https://doi.org/10.1007/BF03033280>
- Fries, G. R., Dimitrov, D. H., Lee, S., Braida, N., Yantis, J., Honaker, C., Cuellar, J., & Walss-Bass, C. (2018). Genome-wide expression in veterans with schizophrenia further validates the immune hypothesis for schizophrenia. *Schizophrenia Research*, *192*, 255–261.  
<https://doi.org/10.1016/j.schres.2017.06.016>
- Friston, K. J. (2011). Functional and Effective Connectivity: A Review. *Brain Connectivity*, *1*(1), 13–36. <https://doi.org/10.1089/brain.2011.0008>
- Fuhrmann, M., Bittner, T., Jung, C. K. E., Burgold, S., Page, R. M., Mitteregger, G., Haass, C., LaFerla, F. M., Kretschmar, H., & Herms, J. (2010). Microglial Cx3cr1 knockout prevents neuron loss in a mouse model of Alzheimer’s disease. *Nature Neuroscience*, *13*(4), 411–413.  
<https://doi.org/10.1038/nn.2511>
- Fyhn, M., Molden, S., Witter, M. P., Moser, E. I., & Moser, M.-B. (2004). Spatial Representation in the Entorhinal Cortex. *Science*, *305*(5688), 1258–1264.  
<https://doi.org/10.1126/science.1099901>
- Garcia, S., Guarino, D., Jaillet, F., Jennings, T., Pröpper, R., Rautenberg, P., Rodgers, C., Sobolev, A., Wachtler, T., Yger, P., & Davison, A. (2014). Neo: An object model for handling electrophysiology data in multiple formats. *Frontiers in Neuroinformatics*, *8*.  
<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fninf.2014.00010>
- Garton, K. J., Gough, P. J., Blobel, C. P., Murphy, G., Greaves, D. R., Dempsey, P. J., & Raines, E. W. (2001). Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM17) mediates the cleavage

- and shedding of fractalkine (CX3CL1). *The Journal of Biological Chemistry*, 276(41), 37993–38001. <https://doi.org/10.1074/jbc.M106434200>
- Gaskill, B. N., Karas, A. Z., Garner, J. P., & Pritchett-Corning, K. R. (2013). Nest building as an indicator of health and welfare in laboratory mice. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 82, 51012. <https://doi.org/10.3791/51012>
- Germann, M., Brederoo, S. G., & Sommer, I. E. C. (2021). Abnormal synaptic pruning during adolescence underlying the development of psychotic disorders. *Current Opinion in Psychiatry*, 34(3), 222–227. <https://doi.org/10.1097/YCO.0000000000000696>
- Gill, S. S., & Pulido, O. M. (2001). Review Article: Glutamate Receptors in Peripheral Tissues: Current Knowledge, Future Research, and Implications for Toxicology. *Toxicologic Pathology*, 29(2), 208–223. <https://doi.org/10.1080/019262301317052486>
- Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M. F., Conway, S. J., Ng, L. G., Stanley, E. R., Samokhvalov, I. M., & Merad, M. (2010). Fate Mapping Analysis Reveals That Adult Microglia Derive from Primitive Macrophages. *Science*, 330(6005), 841–845. <https://doi.org/10.1126/science.1194637>
- Glasier, M. M., Sutton, R. L., & Stein, D. G. (1995). Effects of Unilateral Entorhinal Cortex Lesion and Ganglioside GM1 Treatment on Performance in a Novel Water Maze Task. *Neurobiology of Learning and Memory*, 64(3), 203–214. <https://doi.org/10.1006/nlme.1995.0003>
- Gorter, J. A., Titulaer, M., Bos, N. P. A., & Huisman, E. (1991). Chronic neonatal MK-801 administration leads to a long-lasting increase in seizure sensitivity during the early stages of hippocampal kindling. *Neuroscience Letters*, 134(1), 29–32. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(91\)90501-J](https://doi.org/10.1016/0304-3940(91)90501-J)

- Gray, J. A. (1985). The Neuropsychology of Anxiety. *Issues in Mental Health Nursing*, 7(1–4), 201–228. <https://doi.org/10.3109/01612848509009455>
- Griguoli, M., & Cherubini, E. (2017). Early correlated network activity in the hippocampus: Its putative role in shaping neuronal circuits. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00255>
- Groenewegen, H. J., Vermeulen-Van der Zee, E., te Kortschot, A., & Witter, M. P. (1987). Organization of the projections from the subiculum to the ventral striatum in the rat. A study using anterograde transport of Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *Neuroscience*, 23(1), 103–120. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(87\)90275-2](https://doi.org/10.1016/0306-4522(87)90275-2)
- Grün, S., Borgelt, C., Gerstein, G., Louis, S., & Diesmann, M. (2010). Selecting appropriate surrogate methods for spike correlation analysis. *BMC Neuroscience*, 11(Suppl 1), O15. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-11-S1-O15>
- Guerrin, C. G. J., Doorduyn, J., Sommer, I. E., & de Vries, E. F. J. (2021). The dual hit hypothesis of schizophrenia: Evidence from animal models. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 131, 1150–1168. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.10.025>
- Gundlfinger, A. (2008). The Hippocampal Mossy Fiber Synapse: Transmission , Modulation and Plasticity. In *Dissertation* (Issue April).
- Guo, L., Lu, X., Wang, Y., Bao, C., & Chen, S. (2017). Elevated levels of soluble fractalkine and increased expression of CX3CR1 in neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 14(4), 3153–3158. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.4862>

- Guzman, S. J., Schlögl, A., Frotscher, M., & Jonas, P. (2016a). Synaptic mechanisms of pattern completion in the hippocampal CA3 network. *Science*, 353(6304), 1117–1123.  
<https://doi.org/10.1126/science.aaf1836>
- Guzman, S. J., Schlögl, A., Frotscher, M., & Jonas, P. (2016b). Synaptic mechanisms of pattern completion in the hippocampal CA3 network. *Science*, 353(6304), 1117–1123.  
<https://doi.org/10.1126/science.aaf1836>
- Gyoneva, S., Hosur, R., Gosselin, D., Zhang, B., Ouyang, Z., Cotleur, A. C., Peterson, M., Allaire, N., Challa, R., Cullen, P., Roberts, C., Miao, K., Reynolds, T. L., Glass, C. K., Burkly, L., & Ransohoff, R. M. (2019). Cx3cr1-deficient microglia exhibit a premature aging transcriptome. *Life Science Alliance*, 2(6), e201900453.  
<https://doi.org/10.26508/lsa.201900453>
- Hagberg, A. A., Schult, D. A., & Swart, P. J. (2008). Exploring network structure, dynamics, and function using NetworkX. *7th Python in Science Conference (SciPy 2008)*, *SciPy*, 11–15.
- Hagena, H., & Manahan-Vaughan, D. (2011). Learning-facilitated synaptic plasticity at CA3 mossy fiber and commissural-associational synapses reveals different roles in information processing. *Cerebral Cortex*, 21(11), 2442–2449. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhq271>
- Haimon, Z., Volaski, A., Orthgiess, J., Boura-Halfon, S., Varol, D., Shemer, A., Yona, S., Zuckerman, B., David, E., Chappell-Maor, L., Bechmann, I., Gericke, M., Ulitsky, I., & Jung, S. (2018). Re-evaluating microglia expression profiles using RiboTag and cell isolation strategies. *Nature Immunology*, 19(6), 636–644. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0110-6>
- Hansen, H. H., Briem, T., Dzierko, M., Sifringer, M., Voss, A., Rzeski, W., Zdzisinska, B., Thor, F., Heumann, R., Stepulak, A., Bittigau, P., & Ikonomidou, C. (2004). Mechanisms leading to

- disseminated apoptosis following NMDA receptor blockade in the developing rat brain. *Neurobiology of Disease*, 16(2), 440–453. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2004.03.013>
- Hart, A. D., Wyttenbach, A., Hugh Perry, V., & Teeling, J. L. (2012). Age related changes in microglial phenotype vary between CNS regions: Grey versus white matter differences. *Brain, Behavior, and Immunity*, 26(5), 754–765. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2011.11.006>
- Hartley, T., Lever, C., Burgess, N., & O’Keefe, J. (2014). Space in the brain: How the hippocampal formation supports spatial cognition. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1635). <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0510>
- Hassabis, D., Kumaran, D., Vann, S. D., & Maguire, E. A. (2007). Patients with hippocampal amnesia cannot imagine new experiences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(5), 1726–1731. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610561104>
- Heck, N., Golbs, A., Riedemann, T., Sun, J. J., Lessmann, V., & Luhmann, H. J. (2008). Activity-dependent regulation of neuronal apoptosis in neonatal mouse cerebral cortex. *Cerebral Cortex*, 18(6), 1335–1349. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhm165>
- Hemond, P., Epstein, D., Boley, A., Migliore, M., Ascoli, G. A., & Jaffe, D. B. (2008). Distinct classes of pyramidal cells exhibit mutually exclusive firing patterns in hippocampal area CA3b. *Hippocampus*, 18(4), 411–424. <https://doi.org/10.1002/hipo.20404>
- Henze, D. A., Urban, N. N., & Barrionuevo, G. (2000). The multifarious hippocampal mossy fiber pathway: A review. *Neuroscience*, 98(3), 407–427. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(00\)00146-9](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(00)00146-9)
- Hernández-Frausto, M., López-Rubalcava, C., & Galván, E. J. (2019). Progressive Alterations in Synaptic Transmission and Plasticity of Area CA1 Precede the Cognitive Impairment



Associated with Neonatal Administration of MK-801. *Neuroscience*, 404, 205–217.

<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.01.036>

Hill, S. L., Shao, L., & Beasley, C. L. (2020). Diminished levels of the chemokine fractalkine in post-mortem prefrontal cortex in schizophrenia but not bipolar disorder. *The World Journal of Biological Psychiatry*, 0(0), 1–10. <https://doi.org/10.1080/15622975.2020.1755451>

Hillary, F. G., Roman, C. A., Venkatesan, U., Rajtmajer, S. M., Bajo, R., & Castellanos, N. D. (2015). Hyperconnectivity is a fundamental response to neurological disruption. *Neuropsychology*, 29(1), 59–75. <https://doi.org/10.1037/neu0000110>

Holm, I. E., & Geneser, F. A. (1991). Histochemical-Demonstration of Zinc in the Hippocampal Region of the Domestic Pig .3. The Dentate Area. *Journal of Comparative Neurology*, 308(3), 409–417.

Hong, S., Dissing-olesen, L., & Stevens, B. (2016). New insights on the role of microglia in synaptic pruning in health and disease. *Current Opinion in Neurobiology*, 36, 128–134. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2015.12.004>

Honig, M. G., & Hume, R. I. (1989). Dil and DiO: Versatile fluorescent dyes for neuronal labelling and pathway tracing. *Trends in Neurosciences*, 12(9), 333–341. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(89\)90040-4](https://doi.org/10.1016/0166-2236(89)90040-4)

Hoshiko, M., Arnoux, I., Avignone, E., Yamamoto, N., & Audinat, E. (2012). Deficiency of the Microglial Receptor CX3CR1 Impairs Postnatal Functional Development of Thalamocortical Synapses in the Barrel Cortex. *Journal of Neuroscience*, 32(43), 15106–15111. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1167-12.2012>

- Humphries, M. D., & Gurney, K. (2008). Network 'Small-World-Ness': A Quantitative Method for Determining Canonical Network Equivalence. *PLOS ONE*, *3*(4), e0002051.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002051>
- Humphries, M. D., Gurney, K., & Prescott, T. J. (2006). The brainstem reticular formation is a small-world, not scale-free, network. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *273*(1585), 503–511. <https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3354>
- Hunsaker, M. R., Rosenberg, J. S., & Kesner, R. P. (2008). The role of the dentate gyrus, CA3a,b, and CA3c for detecting spatial and environmental novelty. *Hippocampus*, *18*(10), 1064–1073. <https://doi.org/10.1002/hipo.20464>
- Hyman, S. E. (2014). Revitalizing Psychiatric Therapeutics. *Neuropsychopharmacology*, *39*(1), 220–229. <https://doi.org/10.1038/npp.2013.181>
- Ikegaya, Y., Sasaki, T., Ishikawa, D., Honma, N., Tao, K., Takahashi, N., Minamisawa, G., Ujita, S., & Matsuki, N. (2013). Interpyramid spike transmission stabilizes the sparseness of recurrent network activity. *Cerebral Cortex*, *23*(2), 293–304. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhs006>
- Ikegaya, Y., Yamada, M., Fukuda, T., Kuroyanagi, H., Shirasawa, T., & Nishiyama, N. (2001). Aberrant synaptic transmission in the hippocampal CA3 region and cognitive deterioration in protein-repair enzyme-deficient mice. *Hippocampus*, *11*(3), 287–298.  
<https://doi.org/10.1002/hipo.1043>
- Ikonomidou, C., Bosch, F., Miksa, M., Bittigau, P., Vöckler, J., Dikranian, K., Tenkova, T. I., Stefovskaja, V., Turski, L., & Olney, J. W. (1999). Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science*, *283*(5398), 70–74.  
<https://doi.org/10.1126/science.283.5398.70>

- Inoue, A., Hasegawa, H., Kohno, M., Ito, M. R., Terada, M., Imai, T., Yoshie, O., Nose, M., & Fujita, S. (2005). Antagonist of fractalkine (CX3CL1) delays the initiation and ameliorates the progression of lupus nephritis in MRL/lpr mice. *Arthritis and Rheumatism*, 52(5), 1522–1533. <https://doi.org/10.1002/art.21007>
- Inta, D., Lang, U. E., Borgwardt, S., Meyer-Lindenberg, A., & Gass, P. (2017). Microglia Activation and Schizophrenia: Lessons From the Effects of Minocycline on Postnatal Neurogenesis, Neuronal Survival and Synaptic Pruning. *Schizophrenia Bulletin*, 43(3), 493–496. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbw088>
- Ishizuka, K., Fujita, Y., Kawabata, T., Kimura, H., Iwayama, Y., Inada, T., Okahisa, Y., Egawa, J., Usami, M., Kushima, I., Uno, Y., Okada, T., Ikeda, M., Aleksic, B., Mori, D., Someya, T., Yoshikawa, T., Iwata, N., Nakamura, H., ... Ozaki, N. (2017a). Rare genetic variants in CX3CR1 and their contribution to the increased risk of schizophrenia and autism spectrum disorders. *Translational Psychiatry*, 7(8), e1184. <https://doi.org/10.1038/tp.2017.173>
- Ishizuka, K., Fujita, Y., Kawabata, T., Kimura, H., Iwayama, Y., Inada, T., Okahisa, Y., Egawa, J., Usami, M., Kushima, I., Uno, Y., Okada, T., Ikeda, M., Aleksic, B., Mori, D., Someya, T., Yoshikawa, T., Iwata, N., Nakamura, H., ... Ozaki, N. (2017b). Rare genetic variants in CX3CR1 and their contribution to the increased risk of schizophrenia and autism spectrum disorders. *Translational Psychiatry*, 7(8), e1184. <https://doi.org/10.1038/tp.2017.173>
- Ito, D., Imai, Y., Ohsawa, K., Nakajima, K., Fukuuchi, Y., & Kohsaka, S. (1998). Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 57(1), 1–9. [https://doi.org/10.1016/s0169-328x\(98\)00040-0](https://doi.org/10.1016/s0169-328x(98)00040-0)

- Izquierdo, P., Attwell, D., & Madry, C. (2019). Ion Channels and Receptors as Determinants of Microglial Function. *Trends in Neurosciences*, 1–15.  
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2018.12.007>
- Jaffe, D. B., & Gutiérrez, R. (2007). Mossy fiber synaptic transmission: Communication from the dentate gyrus to area CA3. *Progress in Brain Research*, 163.  
[https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(07\)63006-4](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(07)63006-4)
- Jarvis, L. M. (2012). *Tough Times For Neuroscience R&D*. Chemical & Engineering News.  
<https://cen.acs.org/articles/90/i12/Tough-Times-Neuroscience-RD.html>
- Jay, T. M., & Witter, M. P. (1991). Distribution of hippocampal CA1 and subicular efferents in the prefrontal cortex of the rat studied by means of anterograde transport of Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin. *The Journal of Comparative Neurology*, 313(4), 574–586.  
<https://doi.org/10.1002/cne.903130404>
- Jerman, T., Kesner, R. P., & Hunsaker, M. R. (2006). Disconnection analysis of CA3 and DG in mediating encoding but not retrieval in a spatial maze learning task. *Learning & Memory*, 13(4), 458–464. <https://doi.org/10.1101/lm.246906>
- Jin, J., & Maren, S. (2015). Prefrontal-Hippocampal Interactions in Memory and Emotion. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 9(December), 170. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2015.00170>
- Jirkof, P. (2014). Burrowing and nest building behavior as indicators of well-being in mice. *Journal of Neuroscience Methods*, 234, 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2014.02.001>
- Johnston, D. (1981). Passive cable properties of hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 1(1), 41–55. <https://doi.org/10.1007/BF00736038>

- Jones, B. A., Beamer, M., & Ahmed, S. (2010a). Fractalkine/CX3CL1: A Potential New Target for Inflammatory Diseases. *Molecular Interventions*, *10*(5), 263–270.  
<https://doi.org/10.1124/mi.10.5.3>
- Jones, B. A., Beamer, M., & Ahmed, S. (2010b). Fractalkine/CX3CL1: A Potential New Target for Inflammatory Diseases. *Molecular Interventions*, *10*(5), 263–270.  
<https://doi.org/10.1124/mi.10.5.3>
- Jones, K. S., Corbin, J. G., & Huntsman, M. M. (2014). Neonatal NMDA Receptor Blockade Disrupts Spike Timing and Glutamatergic Synapses in Fast Spiking Interneurons in a NMDA Receptor Hypofunction Model of Schizophrenia. *PLOS ONE*, *9*(10), e109303.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109303>
- Jung, S., Aliberti, J., Graemmel, P., Sunshine, M. J., Kreutzberg, G. W., Sher, A., & Littman, D. R. (2000). Analysis of Fractalkine Receptor CX3CR1 Function by Targeted Deletion and Green Fluorescent Protein Reporter Gene Insertion. *Molecular and Cellular Biology*, *20*(11), 4106–4114. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.11.4106-4114.2000>
- Kahn, I., & Shohamy, D. (2013). Intrinsic connectivity between the hippocampus, nucleus accumbens, and ventral tegmental area in humans. *Hippocampus*, *23*(3), 187–192.  
<https://doi.org/10.1002/hipo.22077>
- Kasyanov, A. M., Safiulina, V. F., Voronin, L. L., & Cherubini, E. (2004). GABA-mediated giant depolarizing potentials as coincidence detectors for enhancing synaptic efficacy in the developing hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(11), 3967–3972. <https://doi.org/10.1073/pnas.0305974101>

- Kawabe, K., Iwasaki, T., & Ishitani, Y. (2007). Repeated treatment with N-methyl-d-aspartate antagonists in neonatal, but not adult, rats causes long-term deficits of radial-arm maze learning. *Brain Research, 1169*, 77–86. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.06.062>
- Keefe, R. S. E., & Harvey, P. D. (2012). Cognitive impairment in schizophrenia. *Handbook of Experimental Pharmacology, 213*, 11–37. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-25758-2\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-642-25758-2_2)
- Kerchner, G. a, & Nicoll, R. A. (2008). Silent synapses and the emergence of a postsynaptic mechanism for LTP. *Nature Reviews. Neuroscience, 9*(11), 813–825. <https://doi.org/10.1038/nrn2501>
- Kerr, K. M., Agster, K. L., Furtak, S. C., & Burwell, R. D. (2007). Functional neuroanatomy of the parahippocampal region: The lateral and medial entorhinal areas. *Hippocampus, 17*(9), 697–708. <https://doi.org/10.1002/hipo.20315>
- Keshavan, M., Lizano, P., & Prasad, K. (2020). The synaptic pruning hypothesis of schizophrenia: Promises and challenges. *World Psychiatry, 19*(1), 110–111. <https://doi.org/10.1002/wps.20725>
- Kesner, R. P. (1980). An attribute analysis of memory: The role of the hippocampus. *Physiological Psychology, 8*(2), 189–197. <https://doi.org/10.3758/BF03332850>
- Kesner, R. P. (2007a). Behavioral functions of the CA3 subregion of the hippocampus. *Learning and Memory, 14*(11), 771–781. <https://doi.org/10.1101/lm.688207>
- Kesner, R. P. (2007b). Behavioral functions of the CA3 subregion of the hippocampus. *Learning and Memory, 14*(11), 771–781. <https://doi.org/10.1101/lm.688207>
- Kesner, R. P. (2013a). A process analysis of the CA3 subregion of the hippocampus. *Frontiers in Cellular Neuroscience, 7*(May), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00078>

- Kesner, R. P. (2013b). A process analysis of the CA3 subregion of the hippocampus. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7(May), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00078>
- Kesner, R. P. (2016). Exploration of the Neurobiological Basis for a Three-System, Multi-attribute Model of Memory. In P. A. Jackson, A. A. Chiba, R. F. Berman, & M. E. Ragozzino (Eds.), *The Neurobiological Basis of Memory: A System, Attribute, and Process Analysis* (pp. 1–35). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-15759-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-15759-7_1)
- Kesner, R. P., & Rolls, E. T. (2015). A computational theory of hippocampal function, and tests of the theory: New developments. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 48, 92–147. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.11.009>
- Kettenmann, H., Hanisch, U.-K., Noda, M., & Verkhratsky, A. (2011). Physiology of Microglia. *Physiological Reviews*, 91(2), 461–553. <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2010>
- Kettenmann, H., Kirchhoff, F., & Verkhratsky, A. (2013). Microglia: New Roles for the Synaptic Stripper. *Neuron*, 77(1), 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.12.023>
- Khalilov, I., Minlebaev, M., Mukhtarov, M., & Khazipov, R. (2015). Dynamic changes from depolarizing to hyperpolarizing GABAergic actions during giant depolarizing potentials in the neonatal rat hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 35(37), 12635–12642. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1922-15.2015>
- Kim, I., Mlsna, L. M., Yoon, S., Le, B., Yu, S., Xu, D., & Koh, S. (2015). A postnatal peak in microglial development in the mouse hippocampus is correlated with heightened sensitivity to seizure triggers. *Brain and Behavior*, 5(12), e00403. <https://doi.org/10.1002/brb3.403>
- Kim, J. J., & Fanselow, M. S. (1992). Modality-Specific Retrograde Amnesia of Fear. *Science*, 256(5057), 675–677. <https://doi.org/10.1126/science.1585183>

- Kingsbury, L., Huang, S., Wang, J., Gu, K., Golshani, P., Wu, Y. E., & Hong, W. (2019). Correlated Neural Activity and Encoding of Behavior across Brains of Socially Interacting Animals. *Cell*, *178*(2), 429-446.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.05.022>
- Kjaerby, C., Hovelsø, N., Dalby, N. O., & Sotty, F. (2017). Phencyclidine administration during neurodevelopment alters network activity in prefrontal cortex and hippocampus in adult rats. *Journal of Neurophysiology*, *118*(2), 1002–1011. <https://doi.org/10.1152/jn.00081.2017>
- Kleiner, M., Brainard, D., Pelli, D., Ingling, A., Murray, R., & Broussard, C. (2007). *What's new in Psychtoolbox-3?* *36*, 1–16. <https://doi.org/10.1177/030100660703605101>
- Knierim, J. J. (2015). The hippocampus. In *Current Biology* (Vol. 25). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.10.049>
- Knierim, J. J., Neunuebel, J. P., & Deshmukh, S. S. (2014). Functional correlates of the lateral and medial entorhinal cortex: Objects, path integration and local–global reference frames. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *369*(1635), 20130369. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0369>
- Koehler, R. C., Roman, R. J., & Harder, D. R. (2009). Astrocytes and the regulation of cerebral blood flow. *Trends in Neurosciences*, *32*(3), 160–169. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.11.005>
- Kraeuter, A.-K., Guest, P. C., & Sarnyai, Z. (2019). The Y-Maze for Assessment of Spatial Working and Reference Memory in Mice. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *1916*, 105–111. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2_10)
- Kramer, M. A., & Eden, U. T. (2016). Analysis of Rhythmic Activity in an Invasive Electrocorticogram. In *Case Studies in Neural Data Analysis—A guide for the practicing neuroscientist* (p. 386). The MIT Press.



- Kramis, R., Vanderwolf, C. H., & Bland, B. H. (1975). Two types of hippocampal rhythmical slow activity in both the rabbit and the rat: Relations to behavior and effects of atropine, diethyl ether, urethane, and pentobarbital. *Experimental Neurology*, *49*(1), 58–85.  
[https://doi.org/10.1016/0014-4886\(75\)90195-8](https://doi.org/10.1016/0014-4886(75)90195-8)
- Krause, M., Hoffmann, W. E., & Hajós, M. (2003). Auditory sensory gating in hippocampus and reticular thalamic neurons in anesthetized rats. *Biological Psychiatry*, *53*(3), 244–253.  
[https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(02\)01463-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(02)01463-4)
- Ladeby, R., Wirenfeltdt, M., Garcia-Ovejero, D., Fenger, C., Dissing-Olesen, L., Dalmau, I., & Finsen, B. (2005). Microglial cell population dynamics in the injured adult central nervous system. *Brain Research. Brain Research Reviews*, *48*(2), 196–206.  
<https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2004.12.009>
- Lai, A. Y., Dhami, K. S., & Todd, K. G. (2009). Moving past the “neuroncentric” perspective: A role for glia in neuropsychiatric disorders. *Journal of Psychiatry & Neuroscience : JPN*, *34*(3), 173–174.
- Latysheva, N. V., & Rayevsky, K. S. (2003). Chronic neonatal N-methyl-D-aspartate receptor blockade induces learning deficits and transient hypoactivity in young rats. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, *27*(5), 787–794.  
[https://doi.org/10.1016/S0278-5846\(03\)00110-6](https://doi.org/10.1016/S0278-5846(03)00110-6)
- Lawrence, J. J., & McBain, C. J. (2003). Interneuron Diversity series: Containing the detonation—Feedforward inhibition in the CA3 hippocampus. In *Trends in Neurosciences* (Vol. 26, Issue 11, pp. 631–640). <https://doi.org/10.1016/j.tins.2003.09.007>

- Lawson, L. J., Perry, V. H., Dri, P., & Gordon, S. (1990). Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience*, *39*(1), 151–170. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(90\)90229-w](https://doi.org/10.1016/0306-4522(90)90229-w)
- Le Duigou, C., Simonnet, J., Teleńczuk, M. T., Fricker, D., & Miles, R. (2014). Recurrent synapses and circuits in the CA3 region of the hippocampus: An associative network. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *7*(January), 262. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00262>
- Lee, G., & Zhou, Y. (2019). NMDAR Hypofunction Animal Models of Schizophrenia. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00185>
- Lee, I., & Kesner, R. P. (2004a). Encoding versus retrieval of spatial memory: Double dissociation between the dentate gyrus and the perforant path inputs into CA3 in the dorsal hippocampus. *Hippocampus*, *14*(1), 66–76. <https://doi.org/10.1002/hipo.10167>
- Lee, I., & Kesner, R. P. (2004b). Encoding versus retrieval of spatial memory: Double dissociation between the dentate gyrus and the perforant path inputs into CA3 in the dorsal hippocampus. *Hippocampus*, *14*(1), 66–76. <https://doi.org/10.1002/hipo.10167>
- LeGates, T. A., Kvarta, M. D., Tooley, J. R., Francis, T. C., Lobo, M. K., Creed, M. C., & Thompson, S. M. (2018). Reward behaviour is regulated by the strength of hippocampus–nucleus accumbens synapses. *Nature*, *564*(7735), 258–262. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0740-8>
- Leinekugel, X., Khalilov, I., Ben-Ari, Y., & Khazipov, R. (1998). Giant Depolarizing Potentials: The Septal Pole of the Hippocampus Paces the Activity of the Developing Intact Septohippocampal Complex In Vitro. *Journal of Neuroscience*, *18*(16). <https://www.jneurosci.org/content/18/16/6349>

- Leinekugel, X., Khazipov, R., Cannon, R., Hirase, H., Ben-Ari, Y., & Buzsáki, G. (2002). Correlated bursts of activity in the neonatal hippocampus in vivo. *Science (New York, N.Y.)*, *296*(5575), 2049–2052. <https://doi.org/10.1126/science.1071111>
- Lemonnier, E., Villeneuve, N., Sonie, S., Serret, S., Rosier, A., Roue, M., Brosset, P., Viellard, M., Ernoux, D. B., Rondeau, S., Thummler, S., Ravel, D., & Ben-Ari, Y. (2017). Effects of bumetanide on neurobehavioral function in children and adolescents with autism spectrum disorders. *Translational Psychiatry*, *7*(3), e1056–e1056. <https://doi.org/10.1038/tp.2017.10>
- Leutgeb, S., Leutgeb, J. K., Moser, M. B., & Moser, E. I. (2005). Place cells, spatial maps and the population code for memory. *Current Opinion in Neurobiology*, *15*(6), 738–746. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2005.10.002>
- Leys, C., Ley, C., Klein, O., Bernard, P., & Licata, L. (2013). Detecting outliers: Do not use standard deviation around the mean, use absolute deviation around the median. *Journal of Experimental Social Psychology*, *49*(4), 764–766. <https://doi.org/10.1016/j.jesp.2013.03.013>
- Li, J.-T., Zhao, Y.-Y., Wang, H.-L., Wang, X.-D., Su, Y.-A., & Si, T.-M. (2015). Long-term effects of neonatal exposure to MK-801 on recognition memory and excitatory–inhibitory balance in rat hippocampus. *Neuroscience*, *308*, 134–143. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.09.003>
- Li, W.-X., Dai, S.-X., Liu, J.-Q., Wang, Q., Li, G.-H., & Huang, J.-F. (2016). Integrated Analysis of Alzheimer’s Disease and Schizophrenia Dataset Revealed Different Expression Pattern in Learning and Memory. *Journal of Alzheimer’s Disease: JAD*, *51*(2), 417–425. <https://doi.org/10.3233/JAD-150807>

- Li, X. G., Somogyi, P., Ylinen, A., & Buzsáki, G. (1994). The hippocampal CA3 network: An in vivo intracellular labeling study. *The Journal of Comparative Neurology*, *339*(2), 181–208.  
<https://doi.org/10.1002/cne.903390204>
- Li, X., Ouyang, G., Usami, A., Ikegaya, Y., & Sik, A. (2010). Scale-free topology of the CA3 hippocampal network: A novel method to analyze functional neuronal assemblies. *Biophysical Journal*, *98*(9), 1733–1741. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.01.013>
- Lim, A. L., Taylor, D. A., & Malone, D. T. (2012). Consequences of early life MK-801 administration: Long-term behavioural effects and relevance to schizophrenia research. *Behavioural Brain Research*, *227*, 276–286. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.10.052>
- Limatola, C., Lauro, C., Catalano, M., Ciotti, M. T., Bertollini, C., Angelantonio, S. D., Ragozzino, D., & Eusebi, F. (2005). Chemokine CX3CL1 protects rat hippocampal neurons against glutamate-mediated excitotoxicity. *Journal of Neuroimmunology*, *166*(1), 19–28.  
<https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2005.03.023>
- Limatola, C., & Ransohoff, R. M. (2014). Modulating neurotoxicity through CX3CL1/CX3CR1 signaling. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *8*(August), 1–8.  
<https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00229>
- Linkert, M., Rueden, C. T., Allan, C., Burel, J.-M., Moore, W., Patterson, A., Loranger, B., Moore, J., Neves, C., MacDonald, D., Tarkowska, A., Sticco, C., Hill, E., Rossner, M., Eliceiri, K. W., & Swedlow, J. R. (2010). Metadata matters: Access to image data in the real world. *Journal of Cell Biology*, *189*(5), 777–782. <https://doi.org/10.1083/jcb.201004104>
- Liu, M. G., Chen, X. F., He, T., Li, Z., & Chen, J. (2012). Use of multi-electrode array recordings in studies of network synaptic plasticity in both time and space. *Neuroscience Bulletin*, *28*(4), 409–422. <https://doi.org/10.1007/s12264-012-1251-5>

- Liu, X., Zhu, X., Halford, M., Xu, T., Henkemeyer, M., & Xu, N. (2018). Retrograde regulation of mossy fiber axon targeting and terminal maturation via postsynaptic Lnx1. *The Journal of Cell Biology*, 217(11), 4007–4024. <https://doi.org/10.1083/jcb.201803105>
- Lüttjohann, A., Fabene, P. F., & van Luijtelaar, G. (2009). A revised Racine's scale for PTZ-induced seizures in rats. *Physiology & Behavior*, 98(5), 579–586. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.09.005>
- MacLeod, L. S., Kogan, C. S., Collin, C. A., Berry-Kravis, E., Messier, C., & Gandhi, R. (2010). A comparative study of the performance of individuals with fragile X syndrome and Fmr1 knockout mice on Hebb-Williams mazes. *Genes, Brain and Behavior*, 9(1), 53–64. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2009.00534.x>
- Maggi, L., Scianni, M., Branchi, I., D'Andrea, I., Lauro, C., & Limatola, C. (2011). CX3CR1 deficiency alters hippocampal-dependent plasticity phenomena blunting the effects of enriched environment. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 5(October), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fncel.2011.00022>
- Maggi, L., Trettel, F., Scianni, M., Bertollini, C., Eusebi, F., Fredholm, B. B., & Limatola, C. (2009). LTP impairment by fractalkine/CX3CL1 in mouse hippocampus is mediated through the activity of adenosine receptor type 3 (A3R). *Journal of Neuroimmunology*, 215(1–2), 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2009.07.016>
- Malvache, A., Reichinnek, S., Villette, V., & Haimerl, C. (2016). Awake hippocampal reactivations project onto orthogonal neuronal assemblies. *Science*, 353(6305). <https://doi.org/10.5061/dryad.5gk8j>
- Mao, H., Elkin, B. S., Genthikatti, V. V., Morrison, B., & Yang, K. H. (2013). Why Is CA3 More Vulnerable Than CA1 in Experimental Models of Controlled Cortical Impact-Induced Brain

Injury? *Journal of Neurotrauma*, 30(17), 1521–1530.

<https://doi.org/10.1089/neu.2012.2520>

Marshall, G. A., Amariglio, R. E., Sperling, R. A., & Rentz, D. M. (2012). Activities of daily living: Where do they fit in the diagnosis of Alzheimer's disease? *Neurodegenerative Disease Management*, 2(5), 483–491. <https://doi.org/10.2217/nmt.12.55>

Martínez, J., & Quiroga, R. Q. (2013). Spike Sorting. In *Principles of Neural Coding* (First). CRC Press.

Maynard, T. M., Sikich, L., Lieberman, J. A., & LaMantia, A.-S. (2001). Neural Development, Cell-Cell Signaling, and the “Two-Hit” Hypothesis of Schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*, 27(3), 457–476. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.schbul.a006887>

McAuley, J. D., Stewart, A. L., Webber, E. S., Cromwell, H. C., Servatius, R. J., & Pang, K. C. H.

(2009). Wistar–Kyoto rats as an animal model of anxiety vulnerability: Support for a hypervigilance hypothesis. *Behavioural Brain Research*, 204(1), 162–168.

<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.05.036>

McAuliffe, J. J., Bronson, S. L., Hester, M. S., Murphy, B. L., Dahlquist-Topalá, R., Richards, D. A., &

Danzer, S. C. (2011). Altered patterning of dentate granule cell mossy fiber inputs onto CA3 pyramidal cells in limbic epilepsy. *Hippocampus*, 21(1), 93–107.

<https://doi.org/10.1002/hipo.20726>

McEwen, B. S. (1994). The plasticity of the hippocampus is the reason for its vulnerability.

*Seminars in Neuroscience*, 6(4), 239–246. <https://doi.org/10.1006/smns.1994.1031>

McKinney, W. (2010). *Data Structures for Statistical Computing in Python*. 56–61.

<https://doi.org/10.25080/Majora-92bf1922-00a>

Medvedeva, Y. V., Ji, S. G., Yin, H. Z., & Weiss, J. H. (2017). Differential Vulnerability of CA1 versus

CA3 Pyramidal Neurons After Ischemia: Possible Relationship to Sources of Zn<sup>2+</sup>

- Accumulation and Its Entry into and Prolonged Effects on Mitochondria. *The Journal of Neuroscience*, 37(3), 726–737. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3270-16.2016>
- Méndez-Salcido, F. A., Torres-Flores, M. I., Ordaz, B., & Peña-Ortega, F. (2022). Abnormal innate and learned behavior induced by neuron–microglia miscommunication is related to CA3 reconfiguration. *Glia*, 70(9), 1630–1651. <https://doi.org/10.1002/glia.24185>
- Milior, G., Lecours, C., Samson, L., Bisht, K., Poggini, S., Pagani, F., Deflorio, C., Lauro, C., Alboni, S., Limatola, C., Branchi, I., Tremblay, M.-E., & Maggi, L. (2016). Fractalkine receptor deficiency impairs microglial and neuronal responsiveness to chronic stress. *Brain, Behavior, and Immunity*, 55, 114–125. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.07.024>
- Miller, C. L., & Freedman, R. (1995). The activity of hippocampal interneurons and pyramidal cells during the response of the hippocampus to repeated auditory stimuli. *Neuroscience*, 69(2), 371–381. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(95\)00249-I](https://doi.org/10.1016/0306-4522(95)00249-I)
- Miocinovic, S., Somayajula, S., Chitnis, S., & Vitek, J. L. (2013). History, applications, and mechanisms of deep brain stimulation. *JAMA Neurology*, 70(2), 163–171. <https://doi.org/10.1001/2013.jamaneurol.45>
- Miyamoto, A., Wake, H., Ishikawa, A. W., Eto, K., Shibata, K., Murakoshi, H., Koizumi, S., Moorhouse, A. J., Yoshimura, Y., & Nabekura, J. (2016). Microglia contact induces synapse formation in developing somatosensory cortex. *Nature Communications*, 7(1), 12540. <https://doi.org/10.1038/ncomms12540>
- Miyamoto, S., Duncan, G. E., Marx, C. E., & Lieberman, J. A. (2005). Treatments for schizophrenia: A critical review of pharmacology and mechanisms of action of antipsychotic drugs. *Molecular Psychiatry*, 10(1), 79–104. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001556>

- Mizutani, M., Pino, P. A., Saederup, N., Charo, I. F., Ransohoff, R. M., & Cardona, A. E. (2012). The Fractalkine Receptor but Not CCR2 Is Present on Microglia from Embryonic Development throughout Adulthood. *The Journal of Immunology*, *188*(1), 29–36.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100421>
- Modai, S., & Shomron, N. (2016). Molecular Risk Factors for Schizophrenia. *Trends in Molecular Medicine*, *22*(3), 242–253. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2016.01.006>
- Morrison, H., Young, K., Qureshi, M., Rowe, R. K., & Lifshitz, J. (2017). Quantitative microglia analyses reveal diverse morphologic responses in the rat cortex after diffuse brain injury. *Scientific Reports*, *7*(1), 13211. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13581-z>
- Moser, E. I., Roudi, Y., Witter, M. P., Kentros, C., Bonhoeffer, T., & Moser, M. B. (2014). Grid cells and cortical representation. *Nature Reviews Neuroscience*, *15*(7), 466–481.  
<https://doi.org/10.1038/nrn3766>
- Moser, M. B., Moser, E. I., Forrest, E., Andersen, P., & Morris, R. G. (1995). Spatial learning with a minislab in the dorsal hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *92*(21), 9697–9701. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.21.9697>
- Mossa, S., Barthélémy, M., Eugene Stanley, H., & Nunes Amaral, L. A. (2002). Truncation of Power Law Behavior in "Scale-Free" Network Models due to Information Filtering. *Physical Review Letters*, *88*(13), 138701. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.88.138701>
- Moxon, K. A., Gerhardt, G. A., Bickford, P. C., Austin, K., Rose, G. M., Woodward, D. J., & Adler, L. E. (1999). Multiple single units and population responses during inhibitory gating of hippocampal auditory response in freely-moving rats. *Brain Research*, *825*(1–2), 75–85.  
[https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(99\)01187-7](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(99)01187-7)



- Moy, S. S., Nadler, J. J., Perez, A., Barbaro, R. P., Johns, J. M., Magnuson, T. R., Piven, J., & Crawley, J. N. (2004a). Sociability and preference for social novelty in five inbred strains: An approach to assess autistic-like behavior in mice. *Genes, Brain and Behavior*, 3(5), 287–302. <https://doi.org/10.1111/j.1601-1848.2004.00076.x>
- Moy, S. S., Nadler, J. J., Perez, A., Barbaro, R. P., Johns, J. M., Magnuson, T. R., Piven, J., & Crawley, J. N. (2004b). Sociability and preference for social novelty in five inbred strains: An approach to assess autistic-like behavior in mice. *Genes, Brain and Behavior*, 3(5), 287–302. <https://doi.org/10.1111/j.1601-1848.2004.00076.x>
- Mullard, A. (2018). Pfizer exits neuroscience. *Nature Reviews Drug Discovery*, 17(2), 86–86. <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.16>
- Multivariate Analysis of Variance (MANOVA). (2010). In N. Salkind, *Encyclopedia of Research Design*. SAGE Publications, Inc. <https://doi.org/10.4135/9781412961288.n257>
- Nadel, L., O'Keefe, J., & Black, A. (1975). Slam on the brakes: A critique of Altman, Brunner, and Bayer's response-inhibition model of hippocampal function. *Behavioral Biology*, 14(2), 151–162. [https://doi.org/10.1016/S0091-6773\(75\)90148-0](https://doi.org/10.1016/S0091-6773(75)90148-0)
- Nieto-Posadas, A., Flores-Martínez, E., Lorea-Hernández, J. J., Rivera-Angulo, A. J., Pérez-Ortega, J., Bargas, J., & Peña-Ortega, F. (2014). Change in network connectivity during fictive-gasping generation in hypoxia: Prevention by a metabolic intermediate. *Frontiers in Physiology*, 5 JUL(July), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00265>
- Nikodemova, M., Kimyon, R. S., De, I., Small, A. L., Collier, L. S., & Watters, J. J. (2015). Microglial numbers attain adult levels after undergoing a rapid decrease in cell number in the third postnatal week. *Journal of Neuroimmunology*, 278, 280–288. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2014.11.018>

- Nilssen, E. S., Doan, T. P., Nigro, M. J., Ohara, S., & Witter, M. P. (2019). Neurons and networks in the entorhinal cortex: A reappraisal of the lateral and medial entorhinal subdivisions mediating parallel cortical pathways. *Hippocampus*, *29*(12), 1238–1254.  
<https://doi.org/10.1002/hipo.23145>
- Nishiyori, A., Minami, M., Ohtani, Y., Takami, S., Yamamoto, J., Kawaguchi, N., Kume, T., Akaike, A., & Satoh, M. (1998). Localization of fractalkine and CX3CR1 mRNAs in rat brain: Does fractalkine play a role in signaling from neuron to microglia? *FEBS Letters*, *429*(2), 167–172. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)00583-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)00583-3)
- Ogren, S., & Stiedl, O. (2015). Passive avoidance. In *Encyclopedia of Psychopharmacology: Vol. Vol. 2* (Second, pp. 1220–1227). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-36172-2>
- O’Keefe, J., & Dostrovsky, J. (1971). The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Research*, *34*(1), 171–175.  
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(71\)90358-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(71)90358-1)
- Oliphant, T. E. (2007). Python for Scientific Computing. *Computing in Science and Engineering*, *9*(3).  
<https://doi.org/10.1109/MCSE.2007.58>
- O’Reardon, J. P., Solvason, H. B., Janicak, P. G., Sampson, S., Isenberg, K. E., Nahas, Z., McDonald, W. M., Avery, D., Fitzgerald, P. B., Loo, C., Demitrack, M. A., George, M. S., & Sackeim, H. A. (2007). Efficacy and Safety of Transcranial Magnetic Stimulation in the Acute Treatment of Major Depression: A Multisite Randomized Controlled Trial. *Biological Psychiatry*, *62*(11), 1208–1216. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2007.01.018>
- Pabon, M. M., Bachstetter, A. D., Hudson, C. E., Gemma, C., & Bickford, P. C. (2011). CX3CL1 reduces neurotoxicity and microglial activation in a rat model of Parkinson’s disease. *Journal of Neuroinflammation*, *8*(1), 9. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-9>

- Pagani, F., Paolicelli, R. C., Murana, E., Cortese, B., Di Angelantonio, S., Zurolo, E., Guiducci, E., Ferreira, T. a, Garofalo, S., Catalano, M., D'Alessandro, G., Porzia, A., Peruzzi, G., Mainiero, F., Limatola, C., Gross, C. T., & Ragozzino, D. (2015a). Defective microglial development in the hippocampus of Cx3cr1 deficient mice. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *9*(March), 111. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00111>
- Pagani, F., Paolicelli, R. C., Murana, E., Cortese, B., Di Angelantonio, S., Zurolo, E., Guiducci, E., Ferreira, T. a, Garofalo, S., Catalano, M., D'Alessandro, G., Porzia, A., Peruzzi, G., Mainiero, F., Limatola, C., Gross, C. T., & Ragozzino, D. (2015b). Defective microglial development in the hippocampus of Cx3cr1 deficient mice. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *9*(March), 111. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00111>
- Paolicelli, R. C., Bisht, K., & Tremblay, M.-Ã. (2014). Fractalkine regulation of microglial physiology and consequences on the brain and behavior. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *8*(May), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00129>
- Paolicelli, R. C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., Giustetto, M., Ferreira, T. A., Guiducci, E., Dumas, L., Ragozzino, D., & Gross, C. T. (2011a). Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science (New York, N.Y.)*, *333*(6048), 1456–1458. <https://doi.org/10.1126/science.1202529>
- Paolicelli, R. C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., Giustetto, M., Ferreira, T. A., Guiducci, E., Dumas, L., Ragozzino, D., & Gross, C. T. (2011b). Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science (New York, N.Y.)*, *333*(6048), 1456–1458. <https://doi.org/10.1126/science.1202529>
- Peña-Ortega, F., Ordaz, B., Balleza-Tapia, H., Bernal-Pedraza, R., Márquez-Ramos, A., Carmona-Aparicio, L., & Giordano, M. (2010). Beta-amyloid protein (25-35) disrupts hippocampal

- network activity: Role of Fyn-kinase. *Hippocampus*, 20(1), 78–96.  
<https://doi.org/10.1002/hipo.20592>
- Pfisterer, U., & Khodosevich, K. (2017). Neuronal survival in the brain: Neuron type-specific mechanisms. *Cell Death & Disease* 2017 8:3, 8(3), e2643–e2643.  
<https://doi.org/10.1038/cddis.2017.64>
- Pierson, M., & Swann, J. (1991). Sensitization to noise-mediated induction of seizure susceptibility by MK-801 and phencyclidine. *Brain Research*, 560(1), 229–236.  
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)91237-U](https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)91237-U)
- Plataki, M. E., Diskos, K., Sougklakos, C., Velissariou, M., Georgilis, A., Stavroulaki, V., & Sidiropoulou, K. (2021). Effect of Neonatal Treatment With the NMDA Receptor Antagonist, MK-801, During Different Temporal Windows of Postnatal Period in Adult Prefrontal Cortical and Hippocampal Function. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 15.  
<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnbeh.2021.689193>
- Pocock, J. M., & Kettenmann, H. (2007). Neurotransmitter receptors on microglia. *Trends in Neurosciences*, 30(10), 527–535. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.07.007>
- Poli, D., Pastore, V. P., & Massobrio, P. (2015). Functional connectivity in vitro neuronal assemblies. *Frontiers in Neural Circuits*, 9(October), 1–14.  
<https://doi.org/10.3389/fncir.2015.00057>
- Pop, M. G., Crivii, C., & Opincariu, I. (2018). Anatomy and Function of the Hypothalamus. In *Hypothalamus in Health and Diseases*. IntechOpen.  
<https://doi.org/10.5772/intechopen.80728>
- Pritchett, K., & Mulder, G. U. Y. B. (2004). Hebb-Williams Mazes. *Contemporary Topics in Laboratory Animal Science*, June, 1–3.

- Prut, L., & Belzung, C. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: A review. *European Journal of Pharmacology*, *463*(1), 3–33.  
[https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(03\)01272-X](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(03)01272-X)
- Püntener, U., Booth, S. G., Perry, V. H., & Teeling, J. L. (2012). Long-term impact of systemic bacterial infection on the cerebral vasculature and microglia. *Journal of Neuroinflammation*, *9*(1), 146. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-146>
- Quiroga, R. Q. (2012a). Concept cells: The building blocks of declarative memory functions. *Nature Reviews Neuroscience*, *13*(8), 587–597. <https://doi.org/10.1038/nrn3251>
- Quiroga, R. Q. (2012b). Concept cells: The building blocks of declarative memory functions. *Nature Reviews Neuroscience*, *13*(8), 587–597. <https://doi.org/10.1038/nrn3251>
- Quiroga, R. Q. (2013). Gnostic cells in the 21st century. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, *73*(4), 463–471.
- Quiroga, R. Q., Reddy, L., Kreiman, G., Koch, C., & Fried, I. (2005). Invariant visual representation by single neurons in the human brain. *Nature*, *435*(7045), 1102–1107.  
<https://doi.org/10.1038/nature03687>
- Quiroga, R. Q., Sakowitz, O. W., Basar, E., & Schürmann, M. (2001). Wavelet Transform in the analysis of the frequency composition of evoked potentials. *Brain Research Protocols*, *8*(1), 16–24. [https://doi.org/10.1016/S1385-299X\(01\)00077-0](https://doi.org/10.1016/S1385-299X(01)00077-0)
- Rabinovitch, M. S., & Rosvold, H. E. (1951a). A closed-field intelligence test for rats. *Canadian Journal of Psychology*, *5*(3), 122–128.
- Rabinovitch, M. S., & Rosvold, H. E. (1951b). A closed-field intelligence test for rats. *Canadian Journal of Psychology*, *5*(3), 122–128.

- Ragozzino, D., Angelantonio, S. Di, Trettel, F., Bertollini, C., Maggi, L., Gross, C., Charo, I. F., Limatola, C., & Eusebi, F. (2006). *Chemokine Fractalkine/CX3CL1 Negatively Modulates Active Glutamatergic Synapses in Rat Hippocampal Neurons*.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3192-06.2006>
- Ragozzino, D., Di Angelantonio, S., Trettel, F., Bertollini, C., Maggi, L., Gross, C., Charo, I. F., Limatola, C., & Eusebi, F. (2006a). Chemokine fractalkine/CX3CL1 negatively modulates active glutamatergic synapses in rat hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience*, 26(41), 10488–10498. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3192-06.2006>
- Ragozzino, D., Di Angelantonio, S., Trettel, F., Bertollini, C., Maggi, L., Gross, C., Charo, I. F., Limatola, C., & Eusebi, F. (2006b). Chemokine fractalkine/CX3CL1 negatively modulates active glutamatergic synapses in rat hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience*, 26(41), 10488–10498. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3192-06.2006>
- Rall, W. (1969). Time constants and electrotonic length of membrane cylinders and neurons. *Biophysical Journal*, 9(12), 1483–1508. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(69\)86467-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(69)86467-2)
- Ramirez-Amaya, V., Balderas, I., Sandoval, J., Escobar, M. L., & Bermudez-Rattoni, F. (2001a). Spatial long-term memory is related to mossy fiber synaptogenesis. *Journal of Neuroscience*, 21(18), 7340–7348. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3192-06.2006> [pii]
- Ramirez-Amaya, V., Balderas, I., Sandoval, J., Escobar, M. L., & Bermudez-Rattoni, F. (2001b). Spatial long-term memory is related to mossy fiber synaptogenesis. *Journal of Neuroscience*, 21(18), 7340–7348. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3192-06.2006> [pii]
- Ransohoff, R. M., & Perry, V. H. (2009a). Microglial Physiology: Unique Stimuli, Specialized Responses. *Annual Review of Immunology*, 27(1), 119–145.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132528>

- Ransohoff, R. M., & Perry, V. H. (2009b). Microglial Physiology: Unique Stimuli, Specialized Responses. *Annual Review of Immunology*, 27(1), 119–145.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132528>
- Rebola, N., Carta, M., & Mulle, C. (2017). Operation and plasticity of hippocampal CA3 circuits: Implications for memory encoding. *Nature Reviews Neuroscience*, 18(1), 208–220.  
<https://doi.org/10.1038/nrn.2017.10>
- Redish, A. D. (1999). *Beyond the cognitive map: From place cells to episodic memory*. MIT Press.
- Regier, P. S., Amemiya, S., & Redish, A. D. (2015). Hippocampus and subregions of the dorsal striatum respond differently to a behavioral strategy change on a spatial navigation task. *Journal of Neurophysiology*, 114(3), 1399–1416. <https://doi.org/10.1152/jn.00189.2015>
- Richardson, M. P., Strange, B. A., & Dolan, R. J. (2004). Encoding of emotional memories depends on amygdala and hippocampus and their interactions. *Nature Neuroscience*, 7(3), 278–285. <https://doi.org/10.1038/nn1190>
- Risold, P. Y., & Swanson, L. W. (1996). Structural evidence for functional domains in the rat hippocampus. *Science (New York, N.Y.)*, 272(5267), 1484–1486.  
<https://doi.org/10.1126/science.272.5267.1484>
- Risold, P. Y., & Swanson, L. W. (1997). Connections of the rat lateral septal complex. *Brain Research Reviews*, 24(2), 115–195. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(97\)00009-X](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(97)00009-X)
- Roberts, W. A. (2019). The role of context in animal memory. *Learning & Behavior*, 47(2), 117–130.  
<https://doi.org/10.3758/s13420-019-00380-x>
- Rogers, J. L., & Kesner, R. P. (2003). Cholinergic modulation of the hippocampus during encoding and retrieval. *Neurobiology of Learning and Memory*, 80(3), 332–342.  
[https://doi.org/10.1016/S1074-7427\(03\)00063-7](https://doi.org/10.1016/S1074-7427(03)00063-7)

- Rogers, J. T., Morganti, J. M., Bachstetter, A. D., Hudson, C. E., Peters, M. M., Grimmig, B. A., Weeber, E. J., Bickford, P. C., & Gemma, C. (2011a). CX3CR1 Deficiency Leads to Impairment of Hippocampal Cognitive Function and Synaptic Plasticity. *Journal of Neuroscience*, 31(45), 16241–16250. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3667-11.2011>
- Rogers, J. T., Morganti, J. M., Bachstetter, A. D., Hudson, C. E., Peters, M. M., Grimmig, B. A., Weeber, E. J., Bickford, P. C., & Gemma, C. (2011b). CX3CR1 Deficiency Leads to Impairment of Hippocampal Cognitive Function and Synaptic Plasticity. *Journal of Neuroscience*, 31(45), 16241–16250. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3667-11.2011>
- Rollenhagen, A., & Lübke, J. H. R. (2010). The mossy fiber bouton: The “common” or the “unique” synapse? *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 2(MAR), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2010.00002>
- Rolls, E. (2013). The mechanisms for pattern completion and pattern separation in the hippocampus. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 7. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnsys.2013.00074>
- Rooney, S., Sah, A., Unger, M. S., Kharitonova, M., Sartori, S. B., Schwarzer, C., Aigner, L., Kettenmann, H., Wolf, S. A., & Singewald, N. (2020). Neuroinflammatory alterations in trait anxiety: Modulatory effects of minocycline. *Translational Psychiatry*, 10(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41398-020-00942-y>
- Rossum, G. van, & L. F., D. Jr. (1995). *Python tutorial*.
- Sahakian, B. J., Bruhl, A. B., Cook, J., Killikelly, C., Savulich, G., Piercy, T., Hafizi, S., Perez, J., Fernandez-Egea, E., Suckling, J., & Jones, P. B. (2015). The impact of neuroscience on society: Cognitive enhancement in neuropsychiatric disorders and in healthy people.



- Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1677), 20140214. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0214>
- Sankoorikal, G. M. V., Kaercher, K. A., Boon, C. J., Lee, J. K., & Brodtkin, E. S. (2006). A mouse model system for genetic analysis of sociability: C57BL/6J versus BALB/cJ inbred mouse strains. *Biological Psychiatry*, 59(5), 415–423. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.07.026>
- Santos, S. E. D., Medeiros, M., Porfirio, J., Tavares, W., Pessôa, L., Grinberg, L., Leite, R. E. P., Ferretti-Rebustini, R. E. L., Suemoto, C. K., Filho, W. J., Noctor, S. C., Sherwood, C. C., Kaas, J. H., Manger, P. R., & Herculano-Houzel, S. (2020). Similar Microglial Cell Densities across Brain Structures and Mammalian Species: Implications for Brain Tissue Function. *Journal of Neuroscience*, 40(24), 4622–4643. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2339-19.2020>
- Scharfman, H. E. (2016). The enigmatic mossy cell of the dentate gyrus. *Nat Rev Neurosci*, 17(9), 562–575. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.87>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schuelert, N., Dorner-Ciossek, C., Brendel, M., & Rosenbrock, H. (2018). A comprehensive analysis of auditory event-related potentials and network oscillations in an NMDA receptor antagonist mouse model using a novel wireless recording technology. *Physiol Rep*, 6(16). <https://doi.org/10.14814/phy2.13782>
- Schultz, C., & Engelhardt, M. (2014). Anatomy of the hippocampal formation. *Frontiers of Neurology and Neuroscience*, 34, 6–17. <https://doi.org/10.1159/000360925>

- Schumm, S. N., Gabrieli, D., & Meaney, D. F. (2022). Plasticity impairment exposes CA3 vulnerability in a hippocampal network model of mild traumatic brain injury. *Hippocampus*, 32(3), 231–250. <https://doi.org/10.1002/hipo.23402>
- Scoville, W. B., & Milner, B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 20(1), 11–21. <https://doi.org/10.1136/jnnp.20.1.11>
- Seabold, S., & Perktold, J. (2010). *Statsmodels: Econometric and Statistical Modeling with Python*. 92–96. <https://doi.org/10.25080/Majora-92bf1922-011>
- Seese, R. R., Wang, K., Yao, Y. Q., Lynch, G., & Gall, C. M. (2014). Spaced training rescues memory and ERK1/2 signaling in fragile X syndrome model mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(47), 16907–16912. <https://doi.org/10.1073/pnas.1413335111>
- Seibenhener, M. L., & Wooten, M. C. (2015a). Use of the open field maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *Journal of Visualized Experiments*, 96. <https://doi.org/10.3791/52434>
- Seibenhener, M. L., & Wooten, M. C. (2015b). Use of the open field maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *Journal of Visualized Experiments*, 96. <https://doi.org/10.3791/52434>
- Sellgren, C. M., Gracias, J., Watmuff, B., Biag, J. D., Thanos, J. M., Whittredge, P. B., Fu, T., Worringer, K., Brown, H. E., Wang, J., Kaykas, A., Karmacharya, R., Goold, C. P., Sheridan, S. D., & Perlis, R. H. (2019). Increased synapse elimination by microglia in schizophrenia patient-derived models of synaptic pruning. *Nature Neuroscience*, 22(3), 374–385. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0334-7>

- Sellner, S., Paricio-Montesinos, R., Spieß, A., Masuch, A., Erny, D., Harsan, L. A., Elverfeldt, D. V., Schwabenland, M., Biber, K., Staszewski, O., Lira, S., Jung, S., Prinz, M., & Blank, T. (2016). Microglial CX3CR1 promotes adult neurogenesis by inhibiting Sirt 1/p65 signaling independent of CX3CL1. *Acta Neuropathologica Communications*, 4(1), 102. <https://doi.org/10.1186/s40478-016-0374-8>
- Sheridan, G. K., & Murphy, K. J. (2013). Neuron-glia crosstalk in health and disease: Fractalkine and CX3CR1 take centre stage. *Open Biology*, 3(1 DEC). <https://doi.org/10.1098/rsob.130181>
- Sheridan, G. K., Wdowicz, A., Pickering, M., Watters, O., Halley, P., O'Sullivan, N. C., Mooney, C., O'Connell, D. J., O'Connor, J. J., & Murphy, K. J. (2014). CX3CL1 is up-regulated in the rat hippocampus during memory-associated synaptic plasticity. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8(AUG). <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00233>
- Shimada, T., & Yamagata, K. (2018). Pentylentetrazole-Induced Kindling Mouse Model. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, 136, e56573. <https://doi.org/10.3791/56573>
- Shore, D. I., Stanford, L., MacInnes, W. J., Klein, R. M., & Brown, R. E. (2001). Of mice and men: Virtual Hebb-Williams mazes permit comparison of spatial learning across species. *Cognitive, Affective and Behavioral Neuroscience*, 1(1), 83–89. <https://doi.org/10.3758/CABN.1.1.83>
- Sierra, A., Tremblay, M.-Ã., & Wake, H. (2014a). Never-resting microglia: Physiological roles in the healthy brain and pathological implications. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00240>
- Sierra, A., Tremblay, M.-Ã., & Wake, H. (2014b). Never-resting microglia: Physiological roles in the healthy brain and pathological implications. In *Frontiers in Cellular Neuroscience* (Vol. 8). <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00240>

- Smith, J. C., Abdala, A. P. L., Borgmann, A., Rybak, I. A., & Paton, J. F. R. (2013). Brainstem respiratory networks: Building blocks and microcircuits. *Trends in Neurosciences*, *36*(3), 152–162. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.11.004>
- Smith, S. E. P., Li, J., Garbett, K., Mirnics, K., & Patterson, P. H. (2007). Maternal Immune Activation Alters Fetal Brain Development through Interleukin-6. *Journal of Neuroscience*, *27*(40), 10695–10702. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2178-07.2007>
- Smucny, J., Stevens, K. E., Olincy, A., & Tregellas, J. R. (2015). Translational utility of rodent hippocampal auditory gating in schizophrenia research: A review and evaluation. *Translational Psychiatry*, *5*(6), e587–e587. <https://doi.org/10.1038/tp.2015.77>
- Song, D., Yang, Q., Lang, Y., Wen, Z., Xie, Z., Zheng, D., Yan, T., Deng, Y., Nakanishi, H., Quan, Z., & Qing, H. (2018). Manipulation of hippocampal CA3 firing via luminopsins modulates spatial and episodic short-term memory, especially working memory, but not long-term memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, *155*(February), 435–445. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2018.09.009>
- Soriano, S. G., Amaravadi, L. S., Wang, Y. F., Zhou, H., Yu, G. X., Tonra, J. R., Fairchild-Huntress, V., Fang, Q., Dunmore, J. H., Huszar, D., & Pan, Y. (2002). Mice deficient in fractalkine are less susceptible to cerebral ischemia-reperfusion injury. *Journal of Neuroimmunology*, *125*(1), 59–65. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(02\)00033-4](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(02)00033-4)
- Spalding, K. L., Bergmann, O., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Huttner, H. B., Boström, E., Westerlund, I., Vial, C., Buchholz, B. A., Possnert, G., Mash, D. C., Druid, H., & Frisén, J. (2013). X-Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell*, *153*(6), 1219–1227. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.002>

- Spellman, T., Rigotti, M., Ahmari, S. E., Fusi, S., Gogos, J. A., & Gordon, J. A. (2015). Hippocampal-prefrontal input supports spatial encoding in working memory. *Nature*, *522*(7556), 309–314. <https://doi.org/10.1038/nature14445>
- Sporns, O. (2013). Structure and function of complex brain networks. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, *15*(3), 247–262. <https://doi.org/10.1137/S003614450342480>
- Squire, L. R. (2009). The Legacy of Patient H.M. for Neuroscience. *Neuron*, *18*(9), 1199–1216. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.12.023>.The
- Squire, L. R., Stark, C. E. L., & Clark, R. E. (2004). The Medial Temporal Lobe. *Annual Review of Neuroscience*, *27*(1), 279–306. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.27.070203.144130>
- Strange, B. A., Witter, M. P., Lein, E. S., & Moser, E. I. (2014). Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. *Nature Reviews Neuroscience*, *15*(10), 655–669. <https://doi.org/10.1038/nrn3785>
- Strauss, G. P., Bartolomeo, L. A., & Harvey, P. D. (2021). Avolition as the core negative symptom in schizophrenia: Relevance to pharmacological treatment development. *Npj Schizophrenia*, *7*(1), 1–6. <https://doi.org/10.1038/s41537-021-00145-4>
- Strauss, G. P., Whearty, K. M., Morra, L. F., Sullivan, S. K., Ossenfort, K. L., & Frost, K. H. (2016). AVOLITION IN SCHIZOPHRENIA IS ASSOCIATED WITH REDUCED WILLINGNESS TO EXPEND EFFORT FOR REWARD ON A PROGRESSIVE RATIO TASK. *Schizophrenia Research*, *170*(1), 198–204. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2015.12.006>
- Sturman, O., Germain, P.-L., & Bohacek, J. (2018). Exploratory rearing: A context- and stress-sensitive behavior recorded in the open-field test. *Stress*, *21*(5), 443–452. <https://doi.org/10.1080/10253890.2018.1438405>

- Sunnen, C. N., Brewster, A. L., Lugo, J. N., Vanegas, F., Turcios, E., Mukhi, S., Parghi, D., D’Arcangelo, G., & Anderson, A. E. (2011a). Inhibition of the mammalian target of rapamycin blocks epilepsy progression in NS-Pten conditional knockout mice. *Epilepsia*, *52*(11), 2065–2075. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2011.03280.x>
- Sunnen, C. N., Brewster, A. L., Lugo, J. N., Vanegas, F., Turcios, E., Mukhi, S., Parghi, D., D’Arcangelo, G., & Anderson, A. E. (2011b). Inhibition of the mammalian target of rapamycin blocks epilepsy progression in NS-Pten conditional knockout mice. *Epilepsia*, *52*(11), 2065–2075. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2011.03280.x>
- Suzuki, N., & Bekkers, J. M. (2012). Microcircuits Mediating Feedforward and Feedback Synaptic Inhibition in the Piriform Cortex. *Journal of Neuroscience*, *32*(3), 919–931. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4112-11.2012>
- Szepesi, Z., Manouchehrian, O., Bachiller, S., & Deierborg, T. (2018a). Bidirectional Microglia–Neuron Communication in Health and Disease. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *12*(September), 1–26. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00323>
- Szepesi, Z., Manouchehrian, O., Bachiller, S., & Deierborg, T. (2018b). Bidirectional Microglia–Neuron Communication in Health and Disease. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *12*(September), 1–26. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00323>
- Toscano-Silva, M., Gomes da Silva, S., Scorza, F. A., Bonvent, J. J., Cavalheiro, E. A., & Arida, R. M. (2010a). Hippocampal mossy fiber sprouting induced by forced and voluntary physical exercise. *Physiology and Behavior*, *101*(2), 302–308. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2010.05.012>
- Toscano-Silva, M., Gomes da Silva, S., Scorza, F. A., Bonvent, J. J., Cavalheiro, E. A., & Arida, R. M. (2010b). Hippocampal mossy fiber sprouting induced by forced and voluntary physical

exercise. *Physiology and Behavior*, 101(2), 302–308.

<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2010.05.012>

Traissard, N., Herbeaux, K., Cosquer, B., Jeltsch, H., Ferry, B., Galani, R., Pernon, A., Majchrzak, M., & Cassel, J.-C. (2007). Combined Damage to Entorhinal Cortex and Cholinergic Basal Forebrain Neurons, Two Early Neurodegenerative Features Accompanying Alzheimer's Disease: Effects on Locomotor Activity and Memory Functions in Rats.

*Neuropsychopharmacology*, 32(4), 851–871. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301116>

Tremblay, M.-È., Lowery, R. L., & Majewska, A. K. (2010). Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience. *PLoS Biology*, 8(11), e1000527.

<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000527>

Ueno, M., Fujita, Y., Tanaka, T., Nakamura, Y., Kikuta, J., Ishii, M., & Yamashita, T. (2013a). Layer v cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development.

*Nature Neuroscience*, 16(5), 543–551. <https://doi.org/10.1038/nn.3358>

Ueno, M., Fujita, Y., Tanaka, T., Nakamura, Y., Kikuta, J., Ishii, M., & Yamashita, T. (2013b). Layer v cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development.

*Nature Neuroscience*, 16(5), 543–551. <https://doi.org/10.1038/nn.3358>

Utz, S. G., See, P., Mildenerger, W., Thion, M. S., Silvin, A., Lutz, M., Ingelfinger, F., Rayan, N. A., Lelios, I., Buttgereit, A., Asano, K., Prabhakar, S., Garel, S., Becher, B., Ginhoux, F., & Greter, M. (2020). Early Fate Defines Microglia and Non-parenchymal Brain Macrophage

Development. *Cell*, 181(3), 557–573.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.03.021>

Vallat, R. (2018). Pingouin: Statistics in Python. *Journal of Open Source Software*, 3(31), 1026.

<https://doi.org/10.21105/joss.01026>

- van der Walt, S., Colbert, S. C., & Varoquaux, G. (2011). The NumPy Array: A Structure for Efficient Numerical Computation. *Computing in Science and Engineering*, 13.
- Van Erum, J., Van Dam, D., & De Deyn, P. P. (2019). PTZ-induced seizures in mice require a revised Racine scale. *Epilepsy & Behavior*, 95, 51–55. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2019.02.029>
- Vandecasteele, M., Varga, V., Berényi, A., Papp, E., Barthó, P., Venance, L., Freund, T. F., & Buzsáki, G. (2014). Optogenetic activation of septal cholinergic neurons suppresses sharp wave ripples and enhances theta oscillations in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(37), 13535–13540. <https://doi.org/10.1073/pnas.1411233111>
- Viana da Silva, S., Zhang, P., Haberl, M. G., Labrousse, V., Grosjean, N., Blanchet, C., Frick, A., & Mulle, C. (2019). Hippocampal Mossy Fibers Synapses in CA3 Pyramidal Cells Are Altered at an Early Stage in a Mouse Model of Alzheimer’s Disease. *Journal of Neuroscience*, 39(21), 4193–4205. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2868-18.2019>
- Virtanen, P., Gommers, R., Oliphant, T. E., Haberland, M., Reddy, T., Cournapeau, D., Burovski, E., Peterson, P., Weckesser, W., Bright, J., van der Walt, S. J., Brett, M., Wilson, J., Millman, K. J., Mayorov, N., Nelson, A. R. J., Jones, E., Kern, R., Larson, E., ... van Mulbregt, P. (2020). SciPy 1.0: Fundamental algorithms for scientific computing in Python. *Nature Methods*, 17(3), 261–272. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0686-2>
- Voronin, L. L., & Cherubini, E. (2003). “Presynaptic silence” may be golden. *Neuropharmacology*, 45(4), 439–449. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(03\)00173-4](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(03)00173-4)
- Voronin, L. L., & Cherubini, E. (2004). “Deaf, mute and whispering” silent synapses: Their role in synaptic plasticity. *The Journal of Physiology*, 557, 3–12. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.058966>



- Vyleta, N. P., & Jonas, P. (2014). Loose coupling between Ca<sup>2+</sup> channels and release sensors at a plastic hippocampal synapse. *Science (New York, N.Y.)*, *343*(6171), 665–670.  
<https://doi.org/10.1126/science.1244811>
- Wagner-Golbs, A., & Luhmann, H. J. (2012). Activity-dependent survival of developing neocortical neurons depends on PI3K signalling. *Journal of Neurochemistry*, *120*(4), 495–501.  
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07591.x>
- Walf, A. A., & Frye, C. A. (2007a). The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature Protocols*, *2*(2), 322–328.  
<https://doi.org/10.1038/nprot.2007.44>
- Walf, A. A., & Frye, C. A. (2007b). The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature Protocols*, *2*(2), 322–328.  
<https://doi.org/10.1038/nprot.2007.44>
- Wang, Y.-L., Han, Q.-Q., Gong, W.-Q., Pan, D.-H., Wang, L.-Z., Hu, W., Yang, M., Li, B., Yu, J., & Liu, Q. (2018). Microglial activation mediates chronic mild stress-induced depressive- and anxiety-like behavior in adult rats. *Journal of Neuroinflammation*, *15*(1), 21.  
<https://doi.org/10.1186/s12974-018-1054-3>
- White, G. E., & Greaves, D. R. (2012). Fractalkine: A survivor's guide chemokines as antiapoptotic mediators. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *32*(3), 589–594.  
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.237412>
- Wilton, D. K., Dissing-Olesen, L., & Stevens, B. (2019). Neuron-Glia Signaling in Synapse Elimination. *Annual Review of Neuroscience*, *42*(1), 107–127.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-070918-050306>

- Winkler, Z., Kuti, D., Ferenczi, S., Gulyás, K., Polyák, Á., & Kovács, K. J. (2017). Impaired microglia fractalkine signaling affects stress reaction and coping style in mice. *Behavioural Brain Research*, 334, 119–128. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.07.023>
- Witter, M. P. (2007). Intrinsic and extrinsic wiring of CA3: Indications for connectional heterogeneity. *Learning & Memory*, 14(11), 705–713. <https://doi.org/10.1101/lm.725207>
- Witter, M. P. (2009). Hippocampal Formation. In M. D. Binder, N. Hirokawa, & U. Windhorst (Eds.), *Encyclopedia of Neuroscience* (pp. 1840–1845). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-29678-2\\_2212](https://doi.org/10.1007/978-3-540-29678-2_2212)
- Witter, M. P., & Amaral, D. G. (2004). Hippocampal Formation. In *The Rat Nervous System* (pp. 635–704). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-012547638-6/50022-5>
- Witter, M. P., Canto, C. B., Couey, J. J., Koganezawa, N., & O, K. C. (2014). *Architecture of spatial circuits in the hippocampal region*. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0515>
- Wolf, S. A., Boddeke, H. W. G. M., & Kettenmann, H. (2017). Microglia in Physiology and Disease. *Annual Review of Physiology*, 79(1), annurev-physiol-022516-034406. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034406>
- World Health Organization. (2001). *Mental and neurological disorders [Fact Sheet]*. World Health Organization. [https://www.who.int/whr/2001/media\\_centre/en/whr01\\_fact\\_sheet1\\_en.pdf](https://www.who.int/whr/2001/media_centre/en/whr01_fact_sheet1_en.pdf)
- Wu, Y., Dissing-Olesen, L., MacVicar, B. A., & Stevens, B. (2015a). Microglia: Dynamic Mediators of Synapse Development and Plasticity. *Trends in Immunology*, 36(10), 605–613. <https://doi.org/10.1016/j.it.2015.08.008>

- Wu, Y., Dissing-Olesen, L., MacVicar, B. A., & Stevens, B. (2015b). Microglia: Dynamic Mediators of Synapse Development and Plasticity. *Trends in Immunology*, *36*(10), 605–613.  
<https://doi.org/10.1016/j.it.2015.08.008>
- Xiong, G., Metheny, H., Johnson, B. N., & Cohen, A. S. (2017). A Comparison of Different Slicing Planes in Preservation of Major Hippocampal Pathway Fibers in the Mouse. *Frontiers in Neuroanatomy*, *11*(November), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fnana.2017.00107>
- Yang, M., Silverman, J. L., & Crawley, J. N. (2011). Automated three-chambered social approach task for mice. *Current Protocols in Neuroscience*, *SUPPL. 56*.  
<https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0826s56>
- Yegenoglu, A., Denker, M., & Grün, S. (2018). *Collaborative HPC-enabled workflows on the HBP Collaboratory using the Elephant framework*. INM-ICS Retreat 2018. <https://juser.fz-juelich.de/record/850028>
- Yona, S., Kim, K.-W., Wolf, Y., Mildner, A., Varol, D., Breker, M., Strauss-Ayali, D., Viukov, S., Guilliams, M., Misharin, A., Hume, D. A., Perlman, H., Malissen, B., Zelzer, E., & Jung, S. (2013). Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity*, *38*(1), 79–91.  
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.12.001>
- Young, K., & Morrison, H. (2018). Quantifying Microglia Morphology from Photomicrographs of Immunohistochemistry Prepared Tissue Using ImageJ. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, *136*, e57648. <https://doi.org/10.3791/57648>
- Zakharov, A., Lotfullina, N., & Khazipov, R. (2016). Impairments to the Giant Depolarizing Potentials After the Third Trimester Equivalent Ethanol Exposure in the Neonatal Rat. *BioNanoScience*, *6*(4), 523–527. <https://doi.org/10.1007/s12668-016-0277-y>

- Zhan, L., Krabbe, G., Du, F., Jones, I., Reichert, M. C., Telpoukhovskaia, M., Kodama, L., Wang, C., Cho, S., Sayed, F., Li, Y., Le, D., Zhou, Y., Shen, Y., West, B., & Gan, L. (2019). Proximal recolonization by self-renewing microglia re-establishes microglial homeostasis in the adult mouse brain. *PLOS Biology*, *17*(2), e3000134. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000134>
- Zhan, Y. (2015). Theta frequency prefrontal-hippocampal driving relationship during free exploration in mice. *Neuroscience*, *300*, 554–565. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.05.063>
- Zhan, Y., Paolicelli, R. C., Sforzini, F., Weinhard, L., Bolasco, G., Pagani, F., Vyssotski, A. L., Bifone, A., Gozzi, A., Ragozzino, D., & Gross, C. T. (2014a). Deficient neuron-microglia signaling results in impaired functional brain connectivity and social behavior. *Nature Neuroscience*, *17*(3), 400–406. <https://doi.org/10.1038/nn.3641>
- Zhan, Y., Paolicelli, R. C., Sforzini, F., Weinhard, L., Bolasco, G., Pagani, F., Vyssotski, A. L., Bifone, A., Gozzi, A., Ragozzino, D., & Gross, C. T. (2014b). Deficient neuron-microglia signaling results in impaired functional brain connectivity and social behavior. *Nature Neuroscience*, *17*(3), 400–406. <https://doi.org/10.1038/nn.3641>
- Zhang, Q., Wang, R., Scott, E., Han, D., Dong, Y., Tu, J., Yang, F., Reddy Sareddy, G., Vadlamudi, R. K., & Brann, D. W. (2013). Hypersensitivity of the hippocampal CA3 region to stress-induced neurodegeneration and amyloidogenesis in a rat model of surgical menopause. *Brain*, *136*(5), 1432–1445. <https://doi.org/10.1093/brain/awt046>
- Zhang, S.-J., Ye, J., Couey, J. J., Witter, M., Moser, E. I., & Moser, M.-B. (2014). Functional connectivity of the entorhinal–hippocampal space circuit. *Philosophical Transactions of the*

*Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1635), 20120516.

<https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0516>

Zhao, X.-F., Alam, M. M., Liao, Y., Huang, T., Mathur, R., Zhu, X., & Huang, Y. (2019). Targeting Microglia Using Cx3cr1-Cre Lines: Revisiting the Specificity. *ENeuro*, 6(4), ENEURO.0114-19.2019. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0114-19.2019>

## **Anexo 2**

**Abnormal innate and learned behavior induced by neuron-microglia miscommunication is related to CA3 reconfiguration**

## RESEARCH ARTICLE

# Abnormal innate and learned behavior induced by neuron–microglia miscommunication is related to CA3 reconfiguration

Felipe Antonio Méndez-Salcido  | Mayra Itzel Torres-Flores | Benito Ordaz | Fernando Peña-Ortega 

Departamento de Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Juriquilla, Querétaro, México

**Correspondence**

Fernando Peña-Ortega, Departamento de Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Boulevard Juriquilla 3001, Juriquilla 76230 QE, México. Email: [jfpena@unam.mx](mailto:jfpena@unam.mx)

**Funding information**

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Grant/Award Number: A1-S-7540; Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México, Grant/Award Number: IG200521; Universidad Nacional Autónoma de México

**Abstract**

Neuron–microglia communication through the Cx3cr1–Cx3cl1 axis is essential for the development and refinement of neural circuits, which determine their function into adulthood. In the present work we set out to extend the behavioral characterization of Cx3cr1<sup>−/−</sup> mice evaluating innate behaviors and spatial navigation, both dependent on hippocampal function. Our results show that Cx3cr1-deficient mice, which show some changes in microglial and synaptic terminals morphology and density, exhibit alterations in activities of daily living and in the rapid encoding of novel spatial information that, nonetheless, improves with training. A neural substrate for these cognitive deficiencies was found in the form of synaptic dysfunction in the CA3 region of the hippocampus, with a marked impact on the mossy fiber (MF) pathway. A network analysis of the CA3 microcircuit reveals the effect of these synaptic alterations on the functional connectivity among CA3 neurons with diminished strength and topological reorganization in Cx3cr1-deficient mice. Neonatal population activity of the CA3 region in Cx3cr1-deficient mice shows a marked reorganization around the giant depolarizing potentials, the first form of network-driven activity of the hippocampus, suggesting that alterations found in adult subjects arise early on in postnatal development, a critical period of microglia-dependent neural circuit refinement. Our results show that interruption of the Cx3cr1–Cx3cl1/neuron–microglia axis leads to changes in CA3 configuration that affect innate and learned behaviors.

**KEYWORDS**

CA3, Cx3cr1, fractalkine, functional connectivity, hippocampus, microglia, mossy fiber

**Abbreviations:** AC, associational-commissural; ACSF, artificial cerebrospinal fluid; C, clustering coefficient; CA1, cornu amonis 1; CA3, cornu amonis 3; Cr, clustering coefficient of random graph; cx3cr1, Cx3C chemokine receptor 1; Cx3cl1, Cx3C ligand 1; Cx3cr1-KO, Cx3C chemokine receptor 1 knock-out mouse; DG, dentate gyrus; Dil, 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate; DMSO, dimethyl sulfoxide; fEPSPs, field excitatory postsynaptic potentials; fGDPs, field giant depolarizing potentials; Iba-1, ionized calcium-binding adapter molecule-1; KO, knock-out; L, shortest path length; Lr, shortest path length of random graph; MAD, median absolute deviation; MEAs, multi-electrode arrays; MF, mossy fiber; MFT, mossy fiber terminal; MUA, multi-unit activity; NDS, normal donkey serum; P7, postnatal day 7; P9, postnatal day 9; P10, postnatal day 10; PPR, paired-pulse ratio; PBS, phosphate buffered saline; PFA, paraformaldehyde; sPSCs, spontaneous postsynaptic currents; SD, standard deviation; STTC, spike time tiling coefficient; WT, wild-type.

## 1 | INTRODUCTION

Microglia are the resident phagocytic and immunocompetent cells of the nervous system that have been mostly associated with pathological conditions (Eyo & Wu, 2019). However, normal functional communication between neurons and microglia is involved in a plethora of physiological processes during development and adulthood (Bessis

et al., 2007; Kettenmann et al., 2013; Szepesi et al., 2018), including the regulation of neural network excitability (Camacho-Hernández et al., 2019; Lorea-Hernández et al., 2016). Microglia maintain close bidirectional interaction with neighboring neurons through a myriad of mediators including chemokines, neurotrophic factors, neurotransmitters and neuromodulators (Kettenmann et al., 2011; Pocock & Kettenmann, 2007; Szepesi et al., 2018). Neuron–microglia communication can be studied by eliminating either the mediator or its receptor; indeed some studies have interfered with neuron–microglia communication through the elimination of the CX3C chemokine receptor 1 (*Cx3cr1*; Arnoux & Audinat, 2015; Jung et al., 2000; Paolicelli et al., 2014; Sheridan & Murphy, 2013).

The coupling between *Cx3cr1* and its ligand Cx3C ligand 1 (*Cx3cl1*) is a specific neuron–microglia communication axis (Arnoux & Audinat, 2015; Nishiyori et al., 1998), with *Cx3cr1* being the only known receptor for the chemokine *Cx3cl1* (fractalkine). *Cx3cr1* is constitutively, and almost exclusively, expressed by microglia in the healthy brain (Arnoux & Audinat, 2015; Nishiyori et al., 1998) whereas neurons are the main source of fractalkine in the brain (Arnoux & Audinat, 2015; Nishiyori et al., 1998). Thus, the elimination of *Cx3cr1* impedes the normal interaction of neurons with microglia leading to alterations in the developing brain including: late microglia migration to cortical targets (Hoshiko et al., 2012; Paolicelli et al., 2011), abnormal regulation of neuronal apoptosis and survival (Arnoux et al., 2014; Ueno et al., 2013), deficient synaptic pruning (Paolicelli et al., 2011) and dysfunctional synaptic maturation (Hoshiko et al., 2012; Zhan et al., 2014). Although most of these alterations are transient (Hoshiko et al., 2012; Paolicelli et al., 2011; Zhan et al., 2014), some synaptic dysfunctions prevail in the CA1 hippocampal region along with the disruption of brain connectivity at the mesoscopic level during adulthood (Zhan et al., 2014). Furthermore, disruption of the *Cx3cr1*–fractalkine axis affects neurogenesis in the adult dentate gyrus (DG) (Bachstetter et al., 2011; Rogers et al., 2011) and the functional integration of these newborn cells into the hippocampal circuitry (Bolós et al., 2018), which would in turn impact CA3 function in adulthood.

The prevailing developmental and adult alterations in *Cx3cr1*-deficient mice are associated with poor acquisition of motor tasks and impaired contextual memory (Rogers et al., 2011), reduced social interaction and increased repetitive behavior in juvenile subjects (Zhan et al., 2014), as well as increased anxiety and depressive-like behaviors (Bolós et al., 2018). Based on this behavioral phenotype, *Cx3CR1*-deficient mice have been proposed as a model of autism spectrum disorder and related neuropsychiatric disorders (Zhan et al., 2014), and have become a potential model to understand the physiological and behavioral consequences of neuron–microglia miscommunication. Thus, in the present report we extended the behavioral phenotyping of *Cx3cr1*-deficient mice, including tasks to assess the impact of neuron–microglia miscommunication on innate behaviors and the encoding of novel spatial information, both dependent on hippocampal function (Deacon, 2012; 2006; Lee & Kesner, 2004; Moser et al., 1995) and, more specifically, on the CA3 region (Hunsaker et al., 2008; Jerman et al., 2006; Lee & Kesner, 2004), which undergoes constant rewiring and experience-dependent plasticity (Bachstetter et al., 2011; Bolós

et al., 2018; Rogers et al., 2011). We complemented this behavioral characterization with the evaluation of the synaptic drive of the CA3 microcircuit, along with a morphologic characterization of pre and post-synaptic structures, and CA3 functional connectivity and network topology during adulthood. We also provide evidence of very early hippocampal network activity alterations in this model, which might precede the functional and behavioral changes found later in life. In addition, we described aged-dependent changes in microglial density and morphology. Our results support the proposal that *Cx3cr1*-deficient mice are a model of moderate congenital cognitive impairment based on long-term neuron–microglia miscommunication, which is relevant to neuropsychiatric research, and they broaden our understanding of the physiological importance of the interaction between neurons and microglia in brain function.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Animals

All experimental procedures were revised and approved by the Local Research Ethics Committee (INB-UNAM). Homozygous *Cx3cr1<sup>Cre/Cre</sup>* mice (*Cx3cr1*-KO) (Yona et al., 2013), in which the *Cx3cr1* coding sequence was interrupted by the coding sequence for Cre-recombinase (Yona et al., 2013), were acquired from Jackson Laboratory and backcrossed with C57BL/6 mice (WT). Routine genotyping was performed to ascertain the genotype of mice used. For all behavioral testing, electrophysiological recordings, and histological experiments, KO and WT male and female mice, between 10 and 12 weeks of age, were used. Alternatively, field recordings of giant depolarizing potentials (fGDPs) and simultaneous multiunit activity (MUA) were performed in slices obtained from P7–P9 mice of both sexes (Ben-Ari et al., 2007; Peña & Alavez-Pérez, 2006). Microglia morphology and density were assessed in both age groups.

### 2.2 | Histology, immunofluorescence, and tracing

#### 2.2.1 | Timm stain

To assess the distribution of the mossy fiber (MF) afferents, Timm staining was carried out following previously published protocols (Ramirez-Amaya et al., 2001; Sunnen et al., 2011). Briefly, mice were anesthetized with pentobarbital (70 mg/kg), transcardially perfused with cold phosphate buffered saline (PBS) and subsequently perfused with a 1% sodium sulfide solution (1% sodium sulfide, 1% sodium phosphate w/v in de-ionized water) until the liver underwent a gray discoloration. Following decapitation, the brain was dissected and incubated in the sulfide solution for 1 h, fixed overnight in 10% neutral buffered formalin, and post-fixed with a solution containing 15% glutaraldehyde v/v and 30% glucose v/v for 1.5 h. The brains were then incubated in a 30% sucrose solution until sinking to the bottom of the flasks. Cryosections (30  $\mu$ m thick) (CM350S, Leica) containing



the dorsal hippocampal formation were obtained at five stereotaxic levels from Bregma:  $-1.3$ ,  $-1.5$ ,  $-1.7$ ,  $-1.9$ ,  $-2.1$  mm, and mounted on gelatin-covered slides. Sections were rehydrated and stained with the Timm solution (120 ml of 50% gum arabic, 60 ml of hydroquinone, 20 ml of 2 M citrate buffer, and 1 ml of 20% silver nitrate) in a tin foil-covered container for approximately 1 h at room temperature (Ramirez-Amaya et al., 2001; Sunnen et al., 2011). Slides were rinsed with distilled water, dehydrated in increasing concentrations of ethanol finalizing in xylene, and sealed with DPX medium. All chemical reagents were acquired from Sigma-Aldrich.

## 2.2.2 | Iba-1 immunofluorescence

Neonatal (postnatal day 10, P10) and adult WT and KO mice were anesthetized with sevoflurane (2%) and pentobarbital (70 mg/kg), respectively, transcardially perfused with cold PBS, followed by 4% paraformaldehyde (PFA; in PBS). Then, brains were dissected and fixed in 4% PFA overnight to later be incubated in 30% sucrose, in PBS, until they sank, for cryoprotection. Brains were embedded in optimum cutting temperature compound (Tissue-Tek O.C.T., Sakura Finetek) and frozen. Coronal cryosections, 30  $\mu$ m thick, containing the hippocampal formation were obtained with a cryostat (CM350S, Leica). Free floating slices were rinsed three times for 10 min with PBS, incubated in blocking solution (3% normal donkey serum (NDS), 0.3% Triton X-100, v/v in PBS), followed by incubation with the primary antibody (anti-Ionized calcium binding adaptor molecule 1 (Iba-1) rabbit polyclonal antibody at 1:2000 dilution, FUJIFILM Wako Chemical) in 1% NDS, 0.1% Triton X-100 v/v in PBS overnight at 4°C. Then, sections were washed three times, for 15 min, with PBS and incubated with the secondary antibody (anti-rabbit Alexa 568, 1:500 dilution, Molecular Probes) in 1% NDS, 0.1% Triton X-100 v/v in PBS for 2 h. at room temperature. Sections were rinsed again three times with PBS and mounted in gelatin covered microscope slides and sealed with Fluormount-G mounting medium (Invitrogen).

Epifluorescence microscopy images were obtained with an AxioImager microscope with the Apotome system (Zeiss) with 10 $\times$  objective for widefield images and 63 $\times$  objective for detailed morphology images. At least three mice per group, with three sections per individual and three high magnification z-stacks (63 $\times$  magnification, 1388  $\times$  1040 pixel resolution, 1  $\mu$ m z-spacing) per section, were used for evaluating microglia density and for single cell morphological analysis (Morrison et al., 2017; Young & Morrison, 2018).

## 2.2.3 | Dil tracing

1,1'-Diocadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (Dil) (Invitrogen) was dissolved at a 1% concentration (w/v) in DMSO (dimethyl sulfoxide) (Sigma-Aldrich) and deposited on transversal (150  $\mu$ m thick) hippocampal-entorhinal cortex slices that were prepared as described for patch-clamp and MEAs recordings (Bischofberger et al., 2006). After recovering, slices were fixed in 1.5% PFA (Sigma-Aldrich), dissolved in PBS (w/v), at room temperature for

1 h (Cheng et al., 2014). Following fixation, a single slice was transferred to a microscope slide and enclosed within a circular area, delimited by hydrophobic crayon, to contain a small volume of PBS and prevent the tissue from drying. Under a microscope guide, Dil crystals were collected with the tip of a patch-clamp pipette and, with the use of a micromanipulator (MP-225, Sutter Instrument) multiple Dil insertions were made into the tissue targeting either granule cells in the DG or CA3 pyramidal cells (Figure 1c,h). For granule cell tracing, three to four insertions of Dil crystals were carried out in the outer third of the molecular layer of the DG, whereas CA3 pyramidal neurons were stained by inserting Dil crystals in the lacunosum-moleculare layer of the hippocampal CA3 region. After Dil insertion, slices were transferred to cell culture well plates containing 4% PFA, in PBS, and incubated in the dark at 30°C for 48 h. Confocal microscopy was carried out within 48 h after the incubation period ended. Slices were mounted on microscopy slides with PBS or Fluoromount-G (Invitrogen) as mounting mediums. Confocal fluorescence images were obtained with an inverted microscope (Axiovert 200 LSM 510, Zeiss, excitation wavelength: 516 nm, emission filters: 575–615 nm) with a 63 $\times$  objective for axonal projections and neurons, and an additional 3 $\times$  digital zoom for MF buttons and dendritic spines, with 512  $\times$  512 or 1024  $\times$  1024 pixel resolution and 0.5  $\mu$ m spacing in the Z plane. Panoramic mosaics were obtained with a 20 $\times$  objective.

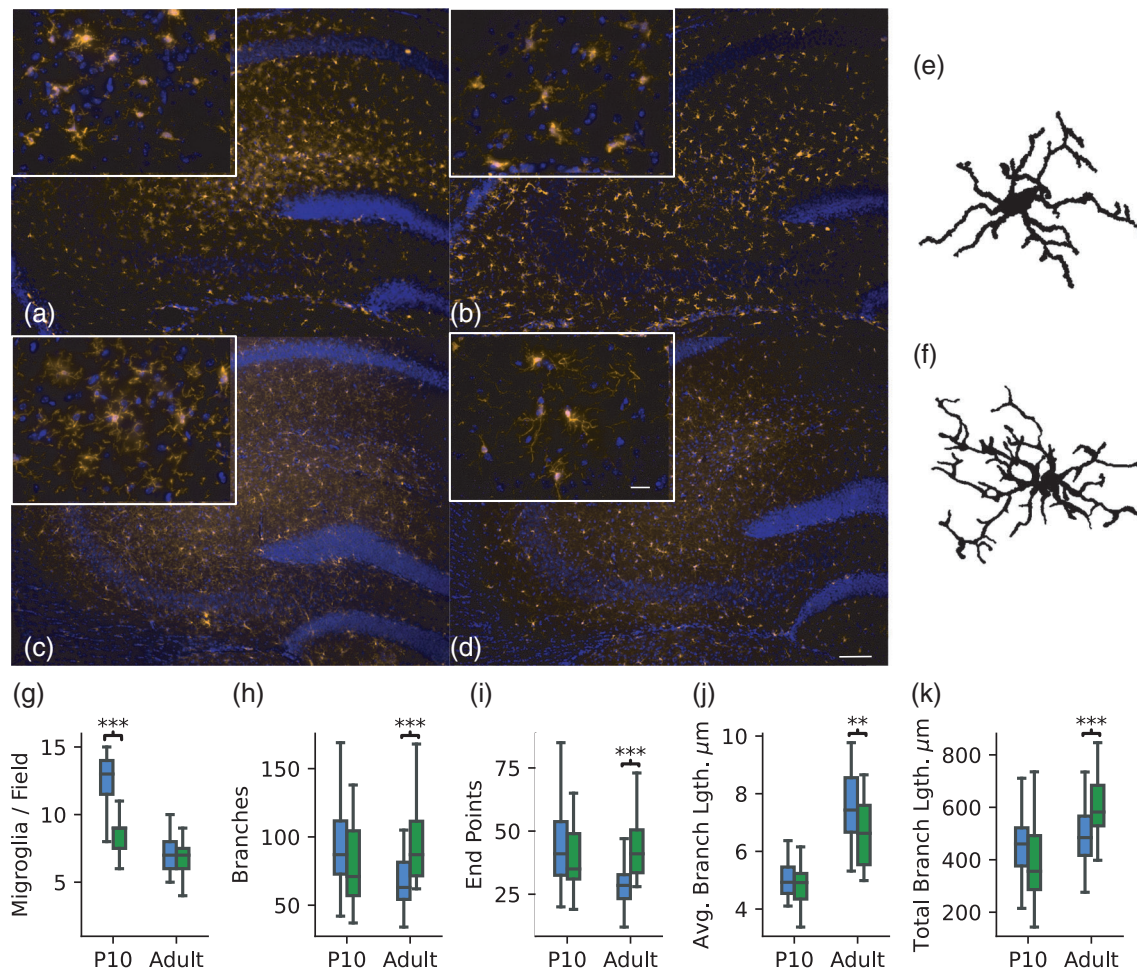
## 2.3 | Behavioral tests

### 2.3.1 | Burrowing

Assessment of burrowing activity was performed following previously published protocols (Deacon, 2006; Deacon, 2012; Salgado-Puga et al., 2015). Briefly, burrows were built from 20 cm long and 7.6 cm wide segments of plastic cylinders with one end closed with plastic plug, leaving the other end open and elevated ~3 cm from the surface. The burrows were filled with 400 g of river gravel with sizes ranging from 0.5–2 cm in diameter. Before the actual burrowing tests, a filled burrow was placed in the home cage overnight for habituation to the apparatus. Then, a preliminary burrowing assay was performed 48 h after habituation, in order to reduce the variability in the final assay, used for quantification, which was performed 48 h afterwards (Deacon, 2012). For testing, mice were individually housed overnight in standard cages with clean bedding, food and water *ad libitum*, and a new filled burrow. Remaining gravel in the burrow was weighted the next morning. This weight was subtracted from the total material initially placed in the cylinder to account for the amount of gravel burrowed.

### 2.3.2 | Open field

Completely naive mice (Ennaceur, 2014) were evaluated in the open field test (Salgado-Puga et al., 2015). To do so, mice were placed individually in a 60  $\times$  60  $\times$  30 cm white acrylic box, uniformly illuminated with bright fluorescent light (100 lux), and their free exploration was



**FIGURE 1** Abnormal microglia density during early development and hyperramification in adulthood in the *Cx3cr1* depleted mice. (a,b) Photomicrographies of anti-Iba-1 immunofluorescence (orange) and DAPI stain (blue) in neonatal hippocampal sections of wild-type (WT; left) and knock-out (KO; right) mice at 10 $\times$  magnification, inserts are 63 $\times$  magnification photomicrographies. (c,d) Photomicrographies of similar immunofluorescence experiments in adult hippocampal sections; WT (left) and KO (right). (e,f) Microglia reconstructions from adult hippocampal sections; WT (top), KO (bottom). Note the excessive ramification of the KO microglia. (g) Comparison of microglia densities per genotype and age groups. KO mice show a reduced microglia density in the neonatal stage (Mann-Whitney test;  $U = 670$ ,  $p < .001$ , WT = 27, KO = 27 fields, (3 animals/27 fields) which normalizes in adulthood. (h) Comparison of the number of branches. While no difference was found in the neonatal stage, KO adult microglia show an increased number of branches compared to adult WT microglia (Mann-Whitney test;  $U = 178$ ,  $p < .001$ , WT = 30, KO = 31 cells). (i) Comparison of the number of end-points. In accordance with a greater number of branches, KO adult microglia show an increased number of end-points (Mann-Whitney test;  $U = 145$ ,  $p < .001$ ). (j) Comparison of the number of the average branch length (Avg. Branch Lgth.). KO adult microglia show a diminished average branch length (T-test;  $t_{58} = 3.18$ ,  $p = .002$ ) in accordance with an increased branching of their processes. (k) Comparison of the number of the total branch length (Total Branch Lgth., sum of all branches). KO adult microglia show an increased total branch length (T-test;  $t_{58} = -3.8$ ,  $p < .001$ ) due to their increased number of branches. None of the morphological changes observed in the adult microglia is observed in the neonatal microglia.

video recorded. Total distance, mean speed, immobility time, crosses between periphery and center of the arena, and time spent in the center were quantified using SMART v.3 software (Panlab, Harvard Apparatus).

### 2.3.3 | Elevated plus maze

Individual mice were placed in a standard elevated plus maze, consisting of four 40 cm  $\times$  10 cm arms, elevated 45 cm from the floor

and uniformly illuminated with bright fluorescent lights (100 lux). Free exploration of the maze was video recorded. Total distance traveled, crosses through the center, and time spent in the arms were quantified using SMART v.3 software (Panlab, Harvard Apparatus).

### 2.3.4 | Social interaction

The three-chamber test for social interaction was used to assess sociability (Moy et al., 2004; Yang et al., 2011). The apparatus consists of

an acrylic rectangular box divided into three identical compartments connected by entrances. The apparatus was illuminated uniformly with dim warm light (5–15 lux). The floor of the apparatus was cleaned and covered with new sawdust before every test. The sample subject was habituated to the apparatus 1–2 days before the beginning of tests. Invariably, 1 day before testing, each test subject was placed in the apparatus and allowed to explore and habituate to it freely for 30 min. For sociability testing an inanimate object was placed in one of the lateral chambers inside a transparent acrylic box with perforations on the walls, to allow visual and olfactory exploration. Simultaneously, in the contralateral chamber, a juvenile (4 weeks old) conspecific (sample subject), matching the sex of the tested subject, was placed inside a perforated acrylic box. The test subject was placed in the central chamber and allowed to explore all compartments freely. The time exploring each of the lateral chambers was manually quantified. The total time spent in both lateral chambers was considered the total exploration time. Social choice was determined as the time spent exploring the conspecific against time exploring the inanimate novel object. A sociability index was calculated as the ratio of the subtraction of the time spent exploring the inorganic object from the time spent exploring the conspecific and the total exploration time (Chiang et al., 2018).

### 2.3.5 | Modified Hebb-Williams maze

The Hebb-Williams maze (Hebb & Williams, 1946; Rabinovitch & Rosvold, 1951) consisted of an acrylic plastic central arena (60 cm × 60 cm × 10 cm) with annexed start and goal boxes (20 cm × 20 cm × 10 cm) attached to diagonally opposed corners (Figure 7e, inset). The maze was surrounded by dark curtains and illuminated uniformly with dim incandescent light (30 lux). The modified protocol developed by the Kesner group was used in this study (Lee & Kesner, 2004; Rogers & Kesner, 2003). Briefly, each subject was habituated for 30 min to the empty apparatus. Afterwards, each mouse performed 10 training trials a day for three consecutive days in a linear alley configuration of the maze, only connecting the start and goal boxes with extramaze cues placed on the curtains. A small piece of unsweetened maize flake was placed in the goal box as a reward. Next, mice performed 10 testing trials a day for three consecutive days with Problem No. 4 of the standardized configurations (Lee & Kesner, 2004; Rabinovitch & Rosvold, 1951; Rogers & Kesner, 2003; Figure 7e, inset). All testing trials were video recorded and manually analyzed for errors and latency to reach the goal. Errors were defined as the intromission of at least both forepaws into dead-end alleys of the maze or backtracking to previously visited zones (Rabinovitch & Rosvold, 1951; Rogers & Kesner, 2003; Figure 7e, inset). Errors and latency for each day of testing were grouped into two blocks per day for analysis (Lee & Kesner, 2004; Rogers & Kesner, 2003). All animals were kept in a 22 h food deprivation schedule the week before and during testing. After each training and testing session, animals were fed for 2 h.

## 2.4 | Electrophysiological recordings

### 2.4.1 | Slice preparation

For patch-clamp and multielectrode array (MEA) recordings, acute transversal hippocampal slices were obtained from mice at 10–12 weeks of age, following previously published protocols (Bischofberger et al., 2006). Briefly, mice were anesthetized with pentobarbital (70 mg/kg) and transcardially perfused with cold sucrose-based neuroprotective solution containing (in mM): (75 sucrose, 25 glucose, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 2.5 KCl, 78 NaCl, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 CaCl<sub>2</sub>, 7 MgCl<sub>2</sub>) (Bischofberger et al., 2006). Subsequently, mice were decapitated; their brain was dissected and submerged in ice-cold neuroprotective solution continuously bubbled with carbogen (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) for 1–2 min. On a flat surface, the cerebellum was dissected and the hemispheres separated with an incision through the midline. Each hemisphere was placed with the midline plane facing down, and the ‘magic cut’ was performed with a scalpel through the cortex (Bischofberger et al., 2006). Each hemisphere was then glued onto a vibratome plate with cyanoacrylate, with the new plane facing the surface. Hippocampal-entorhinal cortex slices, 380–400 μm thick, were obtained using a vibratome (HM-650-V, Thermo Fisher, or VT1000S, Leica), while tissue was submerged in ice-cold neuroprotective solution bubbled with carbogen. Only slices containing the whole hippocampal formation were kept and transferred to a recovery chamber containing neuroprotective solution at 34°C for 30 min and then allowed to reach room temperature. For fGDP recordings, coronal hippocampal slices (400–500 μm thick) were obtained from P7-P9 mice in a similar fashion (Ben-Ari et al., 1989; Leinekugel et al., 1998).

### 2.4.2 | Patch-clamp recordings

After recovery, a transversal slice was transferred to a submerged chamber with circulating artificial cerebrospinal fluid (ACSF) containing (in mM): (10 glucose, 125 NaCl, 2.5 KCl, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>), kept at 33°C and continuously bubbled with carbogen. All salts and reagents were acquired from Sigma-Aldrich. Whole cell patch-clamp recordings from CA3 pyramidal cells were performed with borosilicate pipettes filled with intracellular solution containing (in mM): 120 potassium gluconate, 10 KCl, 10 HEPES, 1 MgCl<sub>2</sub>, 0.05 EGTA, 0.3 GTP, 2 ATP (Debanne et al., 1996). Recording pipettes had a series resistance of 3–5 MΩ when submerged in the bath solution that was compensated before attempting to form the seal. Signals were amplified, low-passed at 10 kHz (Axopatch 200b, Molecular Devices) and digitalized at 30 kHz (Digidata 1550, Molecular Devices) with pClamp v.10 (Molecular Devices). Before switching to voltage clamp mode, the pyramidal electrophysiological phenotype of the recorded neuron and the characterization of its passive properties were assessed by performing standard current/voltage (I/V) and current/frequency curves (I/F) with increasing current steps (25 pA) from –250 pA until obtaining a stable firing frequency (Figure S1; Peña-Ortega et al., 2010). Typical CA3 pyramidal neuron

characteristics were assessed including a small sag (<1 mV) and low firing frequency of 3–5 spikes/second (Hemond et al., 2008; Zucca et al., 2017) (Figure S1). Spontaneous postsynaptic currents (sPSCs) were recorded in voltage-clamp mode for at least 5 min with a holding potential of –70 mV.

### 2.4.3 | MEA recordings

After recovery, a transversal slice was placed on a perforated 60-electrode MEA (6 × 10 grid) (60pMEA100/30iR-Ti, Multichannel Systems) perfused from above and below the chamber with circulating ACSF, kept at 34°C and bubbled with carbogen. The electrodes covered most of the CA3 region. Negative pressure was applied, transiently, to the bottom perfusion system to secure the slice's attachment to the electrodes (Juárez-Vidales et al., 2021; Nieto-Posadas et al., 2014). Electrophysiological signals were left to stabilize for 30 min. The raw extracellular signal was recorded at 25 kHz using the MEA2100 system and MC-Rack software (Multichannel Systems). In separate recordings, input/output curves of field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) were performed in order to assess the two main CA3 synaptic inputs: the MF and associational/commissural (AC) inputs. In both cases fEPSPs were recorded in the CA3 region and evoked with 200  $\mu$ s-long square symmetrical biphasic current pulses (of increasing amplitude between 0 and 75  $\mu$ A, four times each) delivered with a single electrode of the MEA at 0.06 Hz. For MF-fEPSPs the chosen stimulating electrode was located in the granule layer of the suprapyramidal blade of the DG, while for AC-fEPSPs the chosen stimulating electrode was located in the CA3 stratum radiatum or stratum oriens. In some experiments, the MF origin of fEPSP was verified by revealing its sensibility to the activation of the group II metabotropic glutamate receptors with DCG-IV (2  $\mu$ M, Tocris; Figure S2). For all experiments, the electrode with higher amplitude fEPSP and consistent latency (~2 ms), within a distance of 300–400  $\mu$ m from the stimulus electrode, was selected for analysis.

### 2.4.4 | fGDP recordings

Extracellular MUA and fGDPs were recorded from the neonatal coronal hippocampal slices placed in a submerged chamber perfused with ACSF, kept at 34°C and bubbled with carbogen. Spontaneous fGDPs were identified by placing a borosilicate pipette filled with ACSF (~500 k $\Omega$ ) over the CA3 stratum pyramidale. Electrophysiological signals were filtered (0.3 Hz–3 kHz), amplified using a wide-band amplifier (Grass Instruments) and digitalized at 10 kHz with Axotape software (Axon). After 30 min of stabilization, population activity was recorded for 30–60 min under basal conditions. Then, (+)-bicuculline (5  $\mu$ M) (Sigma-Aldrich) was added to the bath to verify the GABAergic origin of fGDPs (Ben-Ari et al., 1989; Leinekugel et al., 1998). Finally, lidocaine was added to the bath to verify the neuronal origin of the recorded signal (Nieto-Posadas et al., 2014; Peña & Alavez-Pérez, 2006).

## 2.5 | Analysis and statistics

### 2.5.1 | Image processing and analysis

Timm-stained sections were color microphotographed with a digital camera (DMC5400, Leica) coupled to a bright field microscope (Leica). Images were loaded into MATLAB (MathWorks) and analyzed with custom-made code following published procedures (Ramirez-Amaya et al., 2001). Briefly, 24-bit color images were converted to 8-bit grayscale, and pixel values were normalized with the average intensity of the CA3 stratum radiatum in each image. MF area was determined as the area of pixels with an intensity lower than 120 (in the 8-bit grayscale) and converted to  $\mu$ m<sup>2</sup>.

### 2.5.2 | Neuronal reconstruction

High magnification images of large MF buttons and CA3 neuronal dendritic spines were used for reconstruction and quantification with FIJI (Schindelin et al., 2012), and associated plug-ins such as Bio-Formats (Linkert et al., 2010) and SNT (Arshadi et al., 2021). For CA3 thorny excrescences, their spine heads were counted over the entire dendritic surface of the thorny excrescences, wherever they were found. Spine density was quantified as the count of spine heads divided by the longitude of the dendritic shaft (expressed as number of spines per 20  $\mu$ m of dendrite). Secondary or tertiary dendritic segments, 20  $\mu$ m long, were randomly selected for spine counting.

MF axons were reconstructed along with their large buttons semi-manually with use of the SNT suite with the purpose of isolating single axons and quantifying button density, number of filopodia and volume. Filopodia were counted manually. Volume estimation was carried out by isolating single large button reconstructions as binary masks, interpolating the region of interest along the full length of the z-stack, obtaining the area covered by the button in each optical slice, adding up all individual areas and multiplying for the z-spacing resolution (0.5  $\mu$ m).

### 2.5.3 | Microglial characterization

Microglia density, reconstruction and morphological analysis were carried out with FIJI and associated plug-ins, namely, SNT, Cell Counter, Bio-Formats and AnalyzeSkeleton (Arganda-Carreras et al., 2010). Microglia cell density was calculated by manually counting all complete microglial cells in the 63 $\times$  magnification fields. Microglia reconstructions were performed semi-manually with the use of the SNT suite. Microglia reconstructions were skeletonized for further analysis, including number of branches, mean branch length and total length of processes (sum of branches) (Young & Morrison, 2018).

### 2.5.4 | Electrophysiological recordings

All patch-clamp recordings were analyzed using Clampfit v.10 (Molecular Devices). sPSCs were identified with the manually

supervised template matching function. Two templates were built: one for smaller events (<50 pA) and one for larger ones (>50 pA) with at least 10 representative traces for each class. For fEPSP experiments, the channel of interest was exported and analyzed in Clampfit. fGDP recordings were loaded into MATLAB and analyzed with a custom-made code. Briefly, wide-band (0.3–3000 Hz) signals were decomposed via discrete wavelet transform (Quián Quiroga et al., 2001) and reconstructed to obtain a low-frequency component containing the field potential oscillations produced by fGDPs and a high-frequency component containing MUA (Figure S3). Frequency of spikes was determined for MUA during the whole recording, in periods between fGDPs (inter-fGDP MUA) and during fGDPs (intra-fGDP MUA). Spike detection was performed by thresholding the high-frequency component of the signal with five median absolute deviations (MAD; Martínez & Quián Quiroga, 2013), with a minimal interval of 2 ms and a minimal width of 1 ms. fGDPs were detected with a threshold of 10 MADs, maximal half-width of 400 ms, and minimal interval of 1 s in the low-frequency component signal. Furthermore, detected fGDPs were validated by their coincidence with burst activity in the MUA. fGDP amplitude, frequency and half-width were determined. MUA burst detection was carried out by Gaussian smoothing function with a 50 ms sliding window over the vector of spike timestamps to identify periods of increased MUA frequency. A burst was defined as a peak in the smoothed MUA signal higher than 10 MAD with a minimal interval of 400 ms. Coincidence between a given fGDP and a MUA burst was determined as a difference in the time of each peak of less than 100 ms. Population firing rate was calculated over the whole recording with a boxcar sliding window of 200 ms, and the normalized correlation with the low-frequency signal containing fGDPs was calculated (data not shown).

### 2.5.5 | Functional connectivity

MEA raw recordings were band-pass filtered at 300–7000 Hz using MC\_Rack software (Multichannel Systems). Channels containing clear neural spikes were exported to the Offline Sorter software (Plexon), and spikes were identified by thresholding (2.6 standard deviations [SD] of the whole signal). Spike sorting was carried out by performing principal component analysis over the identified spike waveforms followed by clustering using a supervised expectation–maximization algorithm (Juárez-Vidales et al., 2021; Nieto-Posadas et al., 2014). This approach showed no significant differences in the number of units isolated from KO and WT recordings, or in their firing rate, while a linear relationship in the number of units isolated as a function of the number of active channels was observed in both cases (Figure S4).

Functional connectivity of the hippocampal CA3 microcircuit was determined estimating the Spike Time Tiling Coefficient (STTC; Figure 5a; Cutts & Eglén, 2014) for each pair of single unit spike trains. STTC is a robust method of pairwise spike train correlation, it is insensitive to firing rate, does not assume any underlying distribution in the spike times, and requires minimal user-defined parameters, namely the coincidence window (10 ms for this work; Cutts & Eglén, 2014). Our Python implementation of the original algorithm was validated by an independent group and made available as part of the Electrophysiology Analysis

Toolkit (Elephant; Rostami et al., 2017; Stella et al., 2019; Yegenoglu et al., 2018). STTCs were further validated by assessing their performance on surrogates of the original spike trains. Surrogates were obtained by performing random permutations with the spike train dithering method over the original spike trains, thus destroying the temporal correlation of spike times while preserving the structure and spike content of the original trains (Grün et al., 2010). This approach retrieved almost null STTCs for the surrogate data (Figure S5).

Undirected weighted graphs were constructed with the significant positive STTCs to further characterize the functional connectivity of the CA3 microcircuit (Bullmore & Sporns, 2009; Fornito et al., 2016; Nieto-Posadas et al., 2014). Since the surrogate STTC distribution is so close to zero, even a high threshold of 5 SD applied to the original STTCs returned networks of very high density (~90%; Figure S4). Therefore, an alternative method was used. A threshold of three MADs of the original positive STTCs returned networks with a density similar to those previously reported (~15%; Figure S5; Bullmore & Sporns, 2009; Feldt et al., 2011; Guzman et al., 2016; Ikegaya et al., 2013). The topological characteristics of these graphs was further analyzed with custom-made code in Python and extensive use of the NetworkX library (Hagberg et al., 2008). The typical scale of the networks was characterized by fitting three models (exponential, power law and exponentially truncated power law) to their node degree distributions. Small-worldness was determined with the Sigma coefficient:  $(C/C_r)/(L/L_r)$ , where C and L are the clustering coefficient and shortest path length of a given graph and  $C_r$  and  $L_r$  are the average clustering coefficient and shortest path length, respectively, of 100 equivalent random graphs. A sigma coefficient >1 suggests a small-world topology (Humphries et al., 2006; Humphries & Gurney, 2008).

### 2.5.6 | Statistics

For all comparisons between two groups, Student's t-test was performed after assessment of normality in distribution (Shapiro–Wilk test); the Mann–Whitney U test was used otherwise. Data from the modified Hebb–Williams maze was analyzed with a mixed model ANOVA, with block as the within factor and genotype as the between factor, followed by a multiple t-test comparison with Holm correction as a post hoc test. For analysis of proportions, Fisher's exact test was used. Any other analysis will be described when appropriate. For all figures and data significance is denoted as follows: \* $p \leq .05$ , \*\* $p \leq .01$ , \*\*\* $p \leq .001$ . Boxplots in figures denote first quartile, median and third quartile. Whiskers indicate minimum and maximum data points within 1.5 interquartile range.

Data is available upon request.

## 3 | RESULTS

### 3.1 | Changes in microglial and synaptic elements in the Cx3cr1-deficient mice

The absence of the *Cx3cr1* receptor leads to a variety of changes in microglial density and morphology (Castro-Sánchez et al., 2019;



Hoshiko et al., 2012; Pagani et al., 2015; Xin et al., 2022), which were evaluated here, before the physiological and behavioral assessments, both in neonatal and adult hippocampus. By identifying microglia with anti-Iba-1 immunofluorescence and performing single-cell reconstruction (Figure 1), focusing on CA3 area, we found that KO mice show a transitory reduction in hippocampal microglia density, compared to WT, in the neonatal stage (P10; Mann-Whitney test;  $U = 670$ ,  $p < .001$ , WT = 27 fields/3 animals, KO = 27 fields/three animals; Figure 1a,b,g), which was no longer observed in adulthood (Figure 1c,d,g) and was not accompanied by any change in microglial morphology (Figure 1h-k) in the neonatal period. In contrast, adult microglia in the KO exhibit a hyperramified phenotype, which is characterized by microglia with higher number of branches (Mann-Whitney test;  $U = 178$ ,  $p < .001$ , WT = 30, KO = 31; Figure 1h) and, accordingly, an increased number of end-points (Mann-Whitney test;  $U = 145$ ,  $p < .001$ ; Figure 1i). Despite having a shorter averaged branch length (T-test;  $t_{58} = 3.18$ ,  $p = .002$ ; Figure 1j), the increased ramification of KO microglia is reflected as an enlarged total branch length (sum of all branches) (T-test;  $t_{58} = -3.8$ ,  $p < .001$ ; Figure 1k). As mentioned, all these morphological differences were not observed in neonatal microglia (Figure 1h-k).

To characterize the impact of *Cx3cr1* deficiency on CA3 synaptic connectivity, we first evaluated the total extension and distribution of the MF afferent to CA3 with Timm staining (Ramirez-Amaya et al., 2001) and found that the general characteristics of MF distribution, in both groups, from its origin in the DG to its targets in the CA3 stratum lucidum, follow a normal pattern with a main suprapyramidal bundle and short infrapyramidal branches that integrate into the suprapyramidal bundle early on upon reaching the CA3 region (Amaral & Lavenex, 2006; Figure 2a). However, the total area covered by the MF is greater in the KO subjects (T-test;  $t_{58} = -4.09$ ,  $p < .001$ ; WT = 60; KO = 60 sections; Figure 2b).

To further explore the anatomical connectivity between the DG and CA3 with more detail we used 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine (Dil), deposited on hippocampal slices, to label MF afferents to CA3 and the dendritic specialization that received them (Zavala-Tecuapetla et al., 2014) (Figure 2c,h). When Dil was deposited in CA3 stratum lacunosum-moleculare (see methods) it labeled pyramidal neurons (Figure 2c) allowing us to evaluate their specialized postsynaptic structures which were identical in both groups (Figure 2d,f). Quantification of spines in the thorny excrescences (Figure 2e) and in secondary dendrites (Figure 2g) did not show any significant difference between KO and WT groups (Mann-Whitney test;  $U = 68$ ,  $p = .147$ ).

When Dil was deposited in the DG molecular layer (Figure 2h) it labeled the mossy fibers and their boutons in CA3 (Figure 2h,i), allowing us to evaluate these presynaptic structures and revealing some differences between groups (Figure 2i-m). We were able to isolate and reconstruct 98 WT axons of which 49 presented a mossy fiber bouton (50%), while from the 60 KO axons 37 (61%) presented at least one mossy fiber bouton and sometimes more. Quantification of filipodia (Figure 2j) did not show any significant difference between KO and WT groups (Mann-Whitney test;  $U = 989$ ,  $p = .11$ ). In

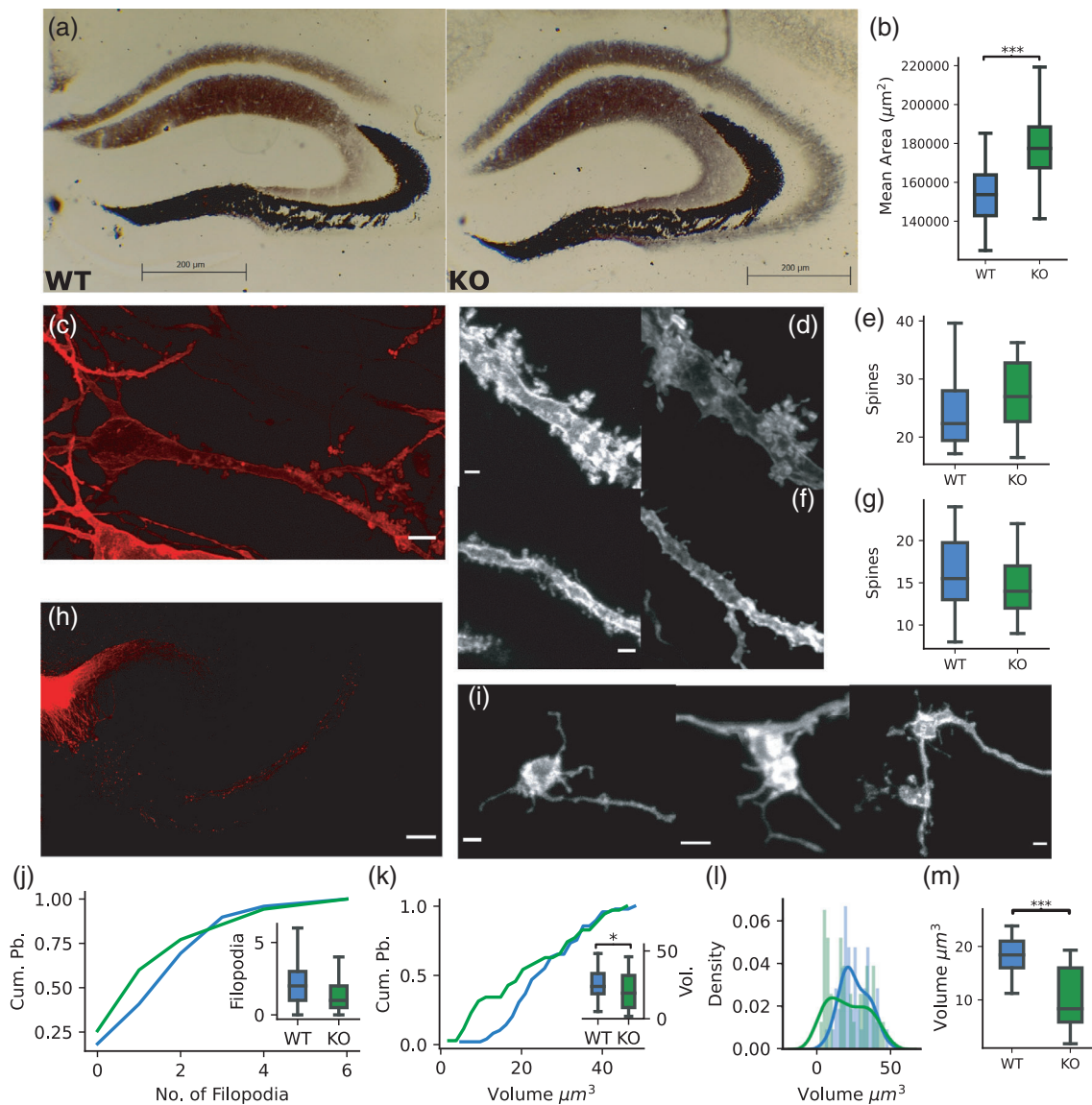
contrast, quantification of large mossy fiber terminals showed several differences between groups (Figure 2i-m). For instance, we occasionally found (three cases) some satellite mossy fiber terminals emanating from other large mossy fiber buttons only in KO samples (Figure 2i), which was never seen in WT samples. We also found that the mossy fiber terminals exhibit a significantly smaller volume in the KO mice (Mann-Whitney test;  $U = 1056.5$ ,  $p = .036$ , Figure 2k-m), which is mainly due to the presence of a sub-population of smaller mossy fiber terminals that constitutes the lower half of the mossy fiber terminal volume distribution in KO mice (Figure 2l,m). Evaluation of the lower half (below the median) of the mossy fiber terminals distribution of KO and WT mice showed a drastic difference (Mann-Whitney test;  $U = 398$ ,  $p < .001$ ; Figure 2m).

### 3.2 | CA3 reconfiguration in early in postnatal development

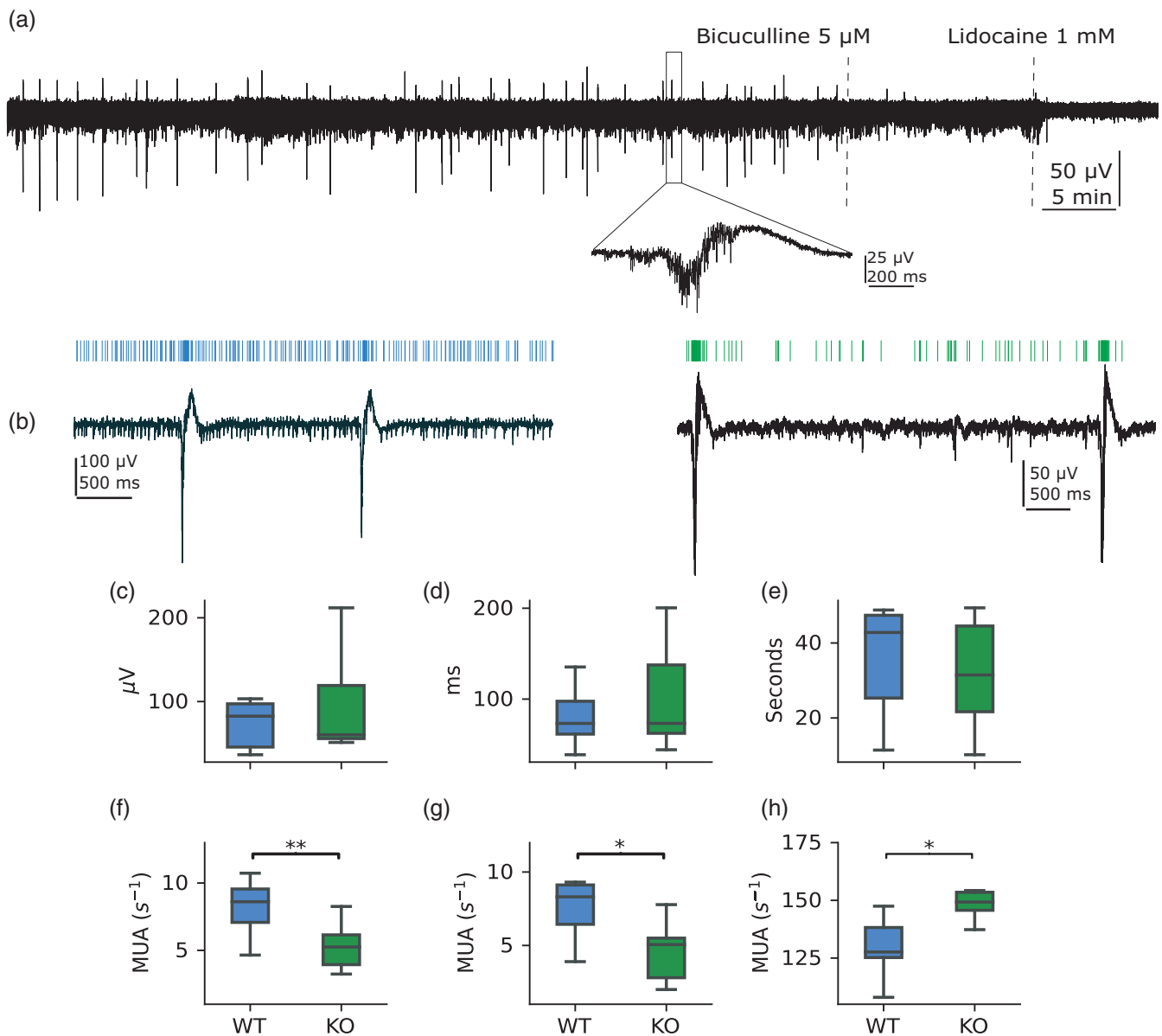
Considering that microglial changes are already observed early in life of *Cx3cr1*-deficient mice, we addressed whether physiological alterations could be found at early stages of postnatal development in CA3. Since fGDPs are considered the first network-driven activity of the hippocampal formation (Ben-Ari, 2001, p.; Ben-Ari et al., 1989; Leinekugel et al., 1998) that can modify the efficacy of synapses activated coincidentally and, thus, determine its later properties (Griguoli & Cherubini, 2017; Kasyanov et al., 2004), we recorded fGDPs and MUA in the CA3 region of neonatal (P7-P9) hippocampal slices and analyzed their characteristics and organization. While our results show no change in the frequency, amplitude or duration of fGDPs (Figure 3a-e), we found that MUA is markedly diminished in the KO group (T-test;  $t_{14} = 3.07$ ,  $p = .008$ , Figure 3f). Interestingly, this decrease is restricted to the periods between fGDPs (inter-fGDP MUA; T-test;  $t_{14} = 3.03$ ,  $p = .01$ ; Figure 3g), in contrast to an increase in MUA during fGDP (intra-fGDP MUA; Mann-Whitney test;  $U = 5.0$ ,  $p = .01$ ; Figure 3h). Accordingly, the population firing rate of KO mice shows a higher correlation with the low-frequency signal containing fGDPs than that of WT mice (T-test;  $t_{14} = 1.8$ ,  $p = .05$ ) (data not shown). This CA3 reconfiguration in a critical period of circuit integration may induce long-lasting alterations in CA3 connectivity and ultimately affect hippocampus dependent functions, as will be shown next.

### 3.3 | CA3 synaptic dysfunction in adult *Cx3cr1*-deficient mice

Since *Cx3cr1* depletion alters synaptic transmission in several regions of the adult brain (Hoshiko et al., 2012; Paolicelli et al., 2011; Zhan et al., 2014), we assessed this possibility in the CA3 area following our morphological and histological characterization of the MF afferent in the adult hippocampus and network activity in the neonatal stage. While we did not find differences in the intrinsic characteristics of CA3 pyramidal neurons (Figure S1) and recordings of sPSCs reveal no



**FIGURE 2** Mossy fiber area expansion in the *Cx3cr1* deficient mice is accompanied by immature mossy fiber buttons. (a) Representative microphotographs of Timm stained sections of dorsal hippocampus of wild-type (WT) and knock-out (KO) mice. (b) Mean comparison of area of distribution of mossy fiber afferents (T-test;  $t_{58} = -4.09$ ,  $p < .001$ ; WT = 6 animals/60 sections; KO = 6 animals/60 sections). (c) Representative confocal photomicrography of CA3 pyramidal neurons stained with Dil, placed in the distal stratum lacunosum-moleculare. Scale = 20  $\mu\text{m}$ . (d) Representative confocal photomicrography of proximal dendrites of CA3 neurons showing thorny excrescences of WT (left) and KO (right) mice. Scale bar = 2  $\mu\text{m}$ . (e) Comparison of spine densities in thorny excrescences show no difference between groups (Mann-Whitney test;  $U = 68$ ,  $p = .147$ ; WT = 12, KO = 15 dendritic segments). Spine density is expressed as number of spines/20  $\mu\text{m}$ . (f) Representative confocal photomicrography of distal dendrites of CA3 neurons showing normal dendritic spines of WT (left) and KO (right) mice. Scale bar represents 2  $\mu\text{m}$ . (g) Comparison of spine densities in distal dendrites show no difference between groups (T-test;  $t_{28} = 1.48$ ,  $p = .15$ ; WT = 18, KO = 21 dendritic segments). (h) Representative mosaic of confocal photomicrography showing Dil placement in the molecular layer of the DG in order to stain MF axons over the CA3b region of the hippocampus, scale bar = 100  $\mu\text{m}$ . (i) Representative confocal photomicrography of normal mossy fiber buttons of WT (left), KO (center), and an abnormal satellite terminal arborization (right) in KO mice, scale bars = 2  $\mu\text{m}$ . (j) Cumulative probability distribution and group comparison of the number of filopodia per mossy fiber button show no significant changes between groups (Mann-Whitney test;  $U = 989$ ,  $p = .11$ , WT = 49, KO = 35 buttons). (k) Cumulative probability and group comparison of mossy fiber buttons volume show a reduction in the volume of KO buttons (Mann-Whitney test;  $U = 1056.5$ ,  $p = .036$ , WT = 49, KO = 35 buttons), note the separation of the cumulative probabilities is restricted to the bottom half of the distribution. (l) Histograms and kernel density estimation of mossy fiber buttons volumes show a bimodal distribution for the KO group suggesting two populations of buttons in this group. (m) Comparison of the bottom half (values below the median) of both distributions of button volumes show a great difference between groups (Mann-Whitney test;  $U = 398$ ,  $p < .001$ , WT = 49, KO = 35 buttons). A similar analysis for the upper half of both distributions showed no difference between groups (data not shown).

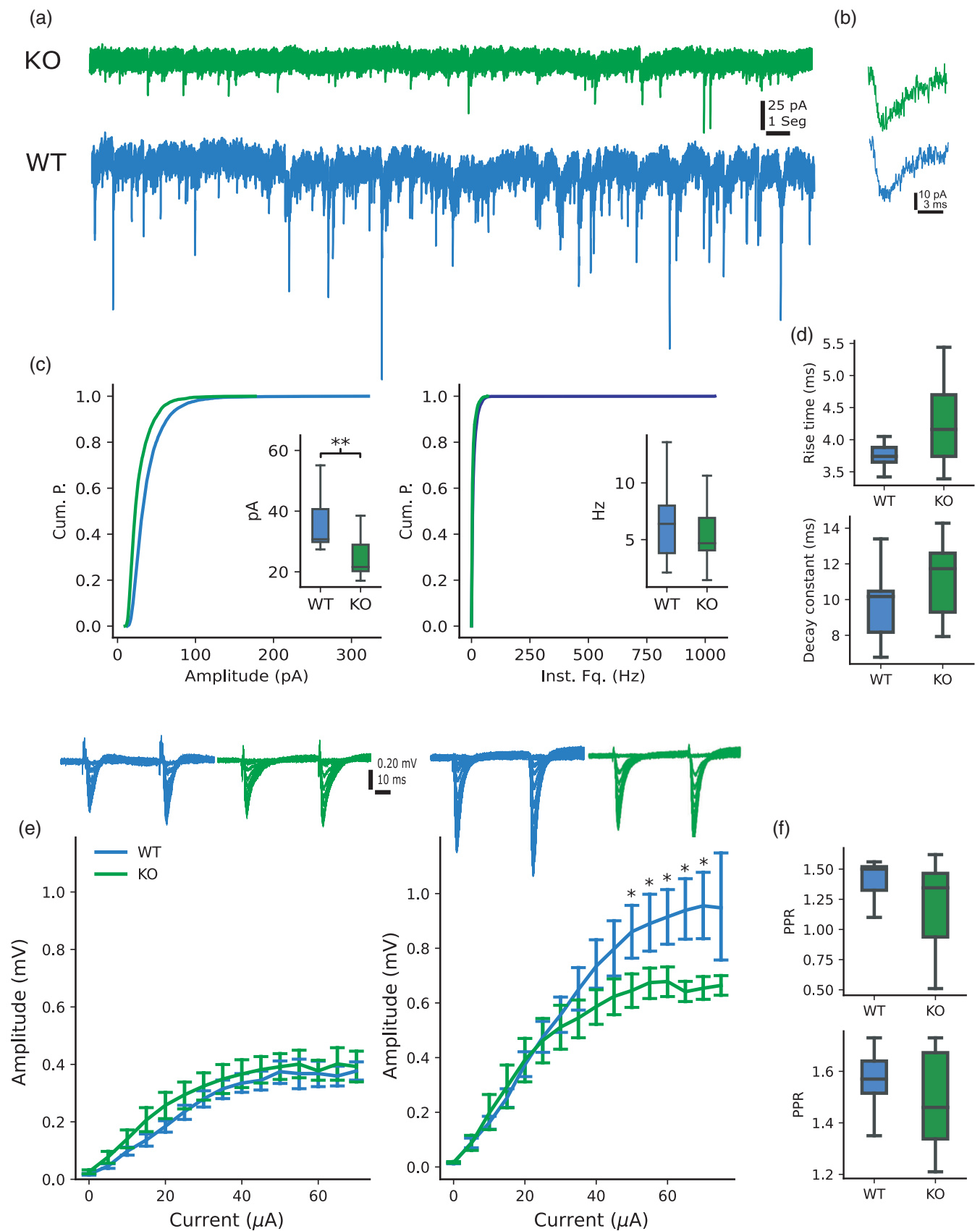


**FIGURE 3** Reduced multiunit activity (MUA) and stronger recruitment by field giant depolarizing potentials (fGDPs) in the neonatal hippocampus of *Cx3cr1* mice precedes alterations in adulthood. (a) Representative continuous trace of a field recording in a neonatal hippocampal slice showing fGDPs (larger peaks) and MUA (smaller peaks). fGDPs are inhibited by bath application of bicuculline (5  $\mu$ M), as expected, the remaining MUA is abolished by bath application of lidocaine (1 mM). Example of a fGDP associated with a burst of MUA is also shown (insert). (b) Representative traces showing modulation of MUA (raster plots) by fGDP (larger peaks in raw traces); wild-type (WT; left) mice show a higher frequency of spontaneous MUA but weaker coupling of it to fGDP, while knock-out (KO; right) mice show a reduced spontaneous MUA with stronger recruitment by fGDP. (c–e) fGDPs have similar amplitude (c), half-duration (d) and interval (e) in both groups. (f–h) KO mice have decreased MUA frequency (f) (T-test;  $t_{14} = 3.07$ ,  $p = .008$ , WT = 8, KO = 7) that is at expense of spontaneous activity (g) (inter fGDP MUA, T-test;  $t_{14} = 3.03$ ,  $p = .01$ ) while showing higher recruitment by fGDPs (h) (intra fGDP MUA; Mann–Whitney test;  $U = 5.0$ ,  $p = .01$ ).

change in rise time (T-test;  $t_{43} = -1.75$ ,  $p = .10$ , WT = 9 cells/5858 sPSCs; KO = 11 cells/5457 sPSCs, Figure 4d), decay constant (T-test;  $t_{43} = -1.58$ ,  $p = .13$ , Figure 4d) or the frequency of sPSCs (T-test;  $t_{16.74} = 0.75$ ,  $p = .46$ ; Figure 4c), we found a reduction in their amplitudes (Mann–Whitney test;  $U = 81$ ,  $p = .009$ ) (Figure 4c), which is consistent with findings in other regions of the brain of *Cx3cr1*-deficient mice (Hoshiko et al., 2012; Paolicelli et al., 2011; Zhan et al., 2014). Furthermore, fEPSP input/output curves show a

differential impact on the MF and AC inputs to CA3 (Figure 4e). We found a reduced maximal amplitude of MF responses in the KO mice (Mixed model ANOVA; genotype  $\times$  current: [ $F(15,195) = 3.23$ ,  $p < .001$ ], WT = 8, KO = 6) with no change in AC responses (Mixed model ANOVA, genotype  $\times$  current: [ $F(14,196) = 1.46$ ,  $p = .13$ ], WT = 7, KO = 8; Figure 4e). No changes in paired-pulse ratio were observed in either of those CA3 inputs between genotypes (AC: T-test;  $t_{9.73} = 1.32$ ,  $p = .11$ , MF: T-test;  $t_{7.21} = 0.87$ ,  $p = .21$ ;





**FIGURE 4** Legend on next page.



Figure 4f). The differential impact in the main synaptic pathways of CA3 and the aforementioned alterations in early development could affect the fundamental characteristics of the microcircuit as a network at the meso-scale.

### 3.4 | Functional connectivity of the CA3 microcircuit

Given the changes in CA3 synaptic inputs, we addressed whether these changes would correlate with modifications in the functional connectivity and topology of the CA3 microcircuit, which was assessed by analyzing the coordinated activity of CA3 neurons in acute hippocampal slices (see Section 2; Bastos & Schoffelen, 2016; Feldt et al., 2011; Friston, 2011; Juárez-Vidales et al., 2021). Our methodological approach to extract the significant connections among CA3 neurons (Figure 5a) reliably captured the main characteristics of the distribution of synaptic weights previously recorded in monosynaptically connected pairs of CA3 neurons (Ikegaya et al., 2013), consisting in a long-tailed lognormal distribution where most of the strength of connectivity is supported by a small percentage of connections (~20%) (Figure 5b-d). Graphs were built for each recording using these connections to further characterize the topology of the CA3 network.

The node degree distributions of the graphs of both animal groups are better approximated by an exponentially truncated power law for both groups (Table S1; Figure 5e,f) consistent with a broad-scale (Fornito et al., 2016; Figure 5e,f) and small-world topology in both groups (Small-worldness sigma coefficients:  $1.61 \pm 0.12$  in WT and  $1.47 \pm 0.09$  in KO) (Humphries et al., 2006; Humphries & Gurney, 2008), which is a topology previously described in this circuit (Guzman et al., 2016; Li et al., 2010) and prevails in the KO group despite the synaptic alterations found, suggesting this is a fundamental and robust characteristic of the circuit. The broad-scale topology shares many characteristics with the scale-free topology, such as a degree distribution with a long tail that reveals the presence of highly connected nodes, but also indicates the network might face real-world constraints that limit its growth such as space, cost of maintaining its elements and connections, or a preferential mode of information

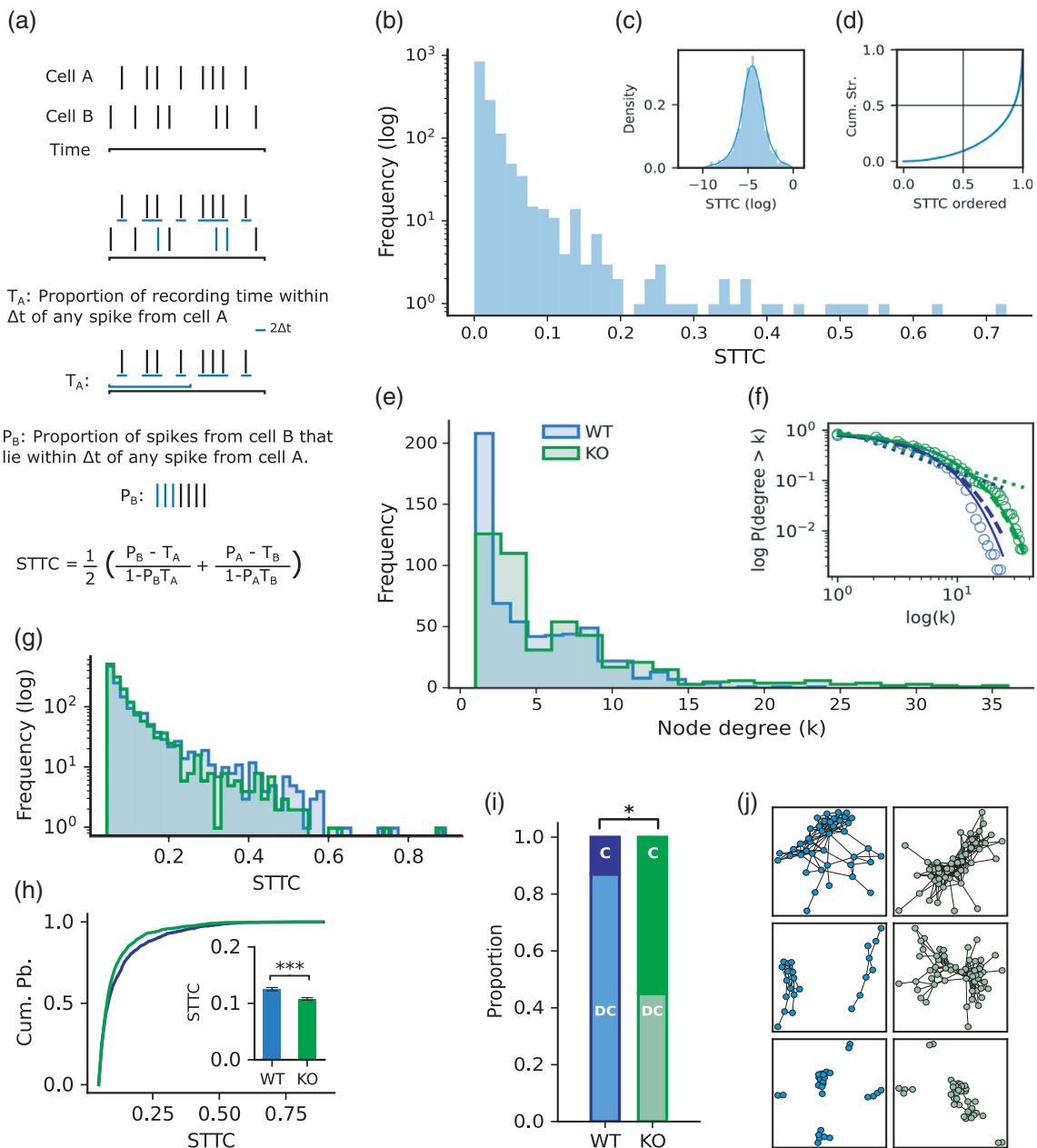
processing (Amaral et al., 2000; Fornito et al., 2016; Mossa et al., 2002).

The comparison of connection strengths show that those from the KO group are significantly weaker (Mann-Whitney test;  $U = 1,191,027$ ,  $p = .001$ , WT = 15, KO = 11; Figure 5g,h), in accordance with the synaptic dysfunction observed in patch-clamp and field recordings (Figure 4). Furthermore, while most WT graphs are fragmented into several components, a higher proportion of KO graphs are characterized by a single giant component that connects either the full graph or most of its nodes (Fisher's exact test,  $p = .03$ ; Figure 5i,j). Overall, the changes in the KO graphs, along with the compromised synaptic transmission and MF sprouting, indicate that the CA3 circuit in *Cx3cr1*-deficient mice undergoes a reconfiguration consistent with a lack of refinement, possibly due to deficient synaptic pruning (Paolicelli et al., 2011) and halted synapse maturation, that leads to weaker and diffuse coupling among its constituent neurons, which would impact CA3-dependent cognitive function.

### 3.5 | *Cx3cr1* deficiency leads to an anxious-like phenotype

After characterizing the morphological and physiological consequences of disrupting the fractalkine pathway, we proceeded to evaluate its behavioral effects. Thus, in order to assess the emotionality state of the *Cx3cr1*-deficient mice, we performed two tests of unconditioned anxiety: the open field test and the elevated plus maze (Carola et al., 2002; Prut & Belzung, 2003; Walf & Frye, 2007). Our results in the open field test show a reduction in the total distance traveled by the KO mice while exploring the arena (T-test;  $t_{31} = 2.87$ ,  $p = .007$ , WT = 16, KO = 16; Figure 6a). This reduction is due to an increase in immobility (Mann-Whitney test;  $U = 73$ ,  $p = .03$ ; Figure 6c), as well as a decreased average (T-test;  $t_{31} = 2.99$ ,  $p = .005$ ) and maximal (T-test;  $t_{31} = 3.17$ ,  $p = .003$ ) speed of ambulation in the KO mice (Figure 6d,e). This decrease in ambulation is also reflected in a tendency to fewer crosses between the center and periphery of the arena (T-test;  $t_{31} = 1.9$ ,  $p = .06$ ; Figure 6b). The elevated plus

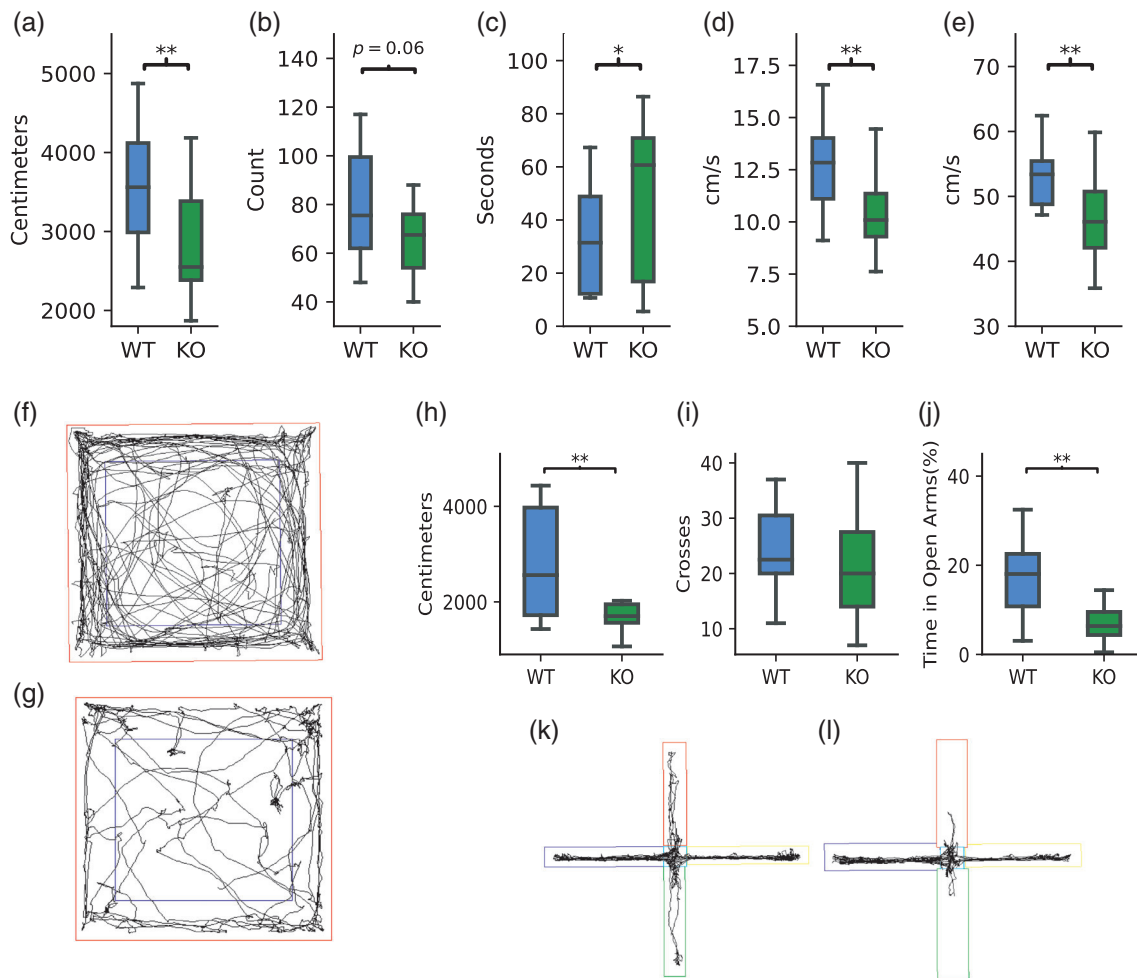
**FIGURE 4** Synaptic dysfunction in the CA3 hippocampal region in *Cx3cr1* deficient mice primarily affects the mossy fiber (MF) afferent. (a) Representative traces of spontaneous postsynaptic currents (sPSCs) in CA3 pyramidal cells of knock-out (KO) and wild-type (WT) mice, respectively. (b) Representative traces of single sPSCs from KO and WT recordings, respectively. (c) Left: Cumulative probability distribution and comparison of mean sPSCs amplitudes show a diminished synaptic drive in KO mice (Mann-Whitney test;  $U = 81$ ,  $p = .009$ , WT = 9 cells, 5858 sPSCs; KO = 11 cells, 5457 sPSCs). Right: Cumulative distribution and comparison of mean instantaneous frequency of sPSCs show no significant differences between genotypes. (d) Top: Rise time analysis of sPSC shows a non-significant tendency towards a slower rise time in KO cells (T-test;  $t_{17,43} = -1.75$ ,  $p = .10$ ). Bottom: Decay time analysis show a similar non-significant tendency for slower decay time in KO cells (T-test;  $t_{17,43} = -1.58$ ,  $p = .13$ ). (e) Representative traces (top) and input/output curves (bottom) of fEPSPs for the associational/commissural pathway (A/C; left) and mossy fiber pathway (MF; right). While A/C pathway remains unaffected, a deficiency in the strength of the MF afference (bottom right) is observed in the KO group (mixed model ANOVA, genotype:  $[F(1,13) = 1.40, p = .2]$ , current:  $[F(15,195) = 69.62, p < .001]$ , genotype  $\times$  current:  $[F(15,195) = 3.23, p < .001]$ , pairwise *t*-test: 50  $\mu$ A:  $t_{12} = -1.74$ ,  $p = .05$ ; 55  $\mu$ A:  $t_{12} = -1.74$ ,  $p = .05$ ; 60  $\mu$ A:  $t_{12} = -1.92$ ,  $p = .04$ ; 65  $\mu$ A:  $t_{12} = -2.42$ ,  $p = .02$ ; 70  $\mu$ A:  $t_{12} = -2.11$ ,  $p = .03$ ; WT = 9, KO = 6). (f) Paired-pulse ratio (PPR) analysis of fEPSPs show no significant changes for either A/C (top) (T-test;  $t_{9,73} = 1.32$ ,  $p = .11$ , WT = 7, KO = 8) or MF (bottom) (T-test;  $t_{7,21} = 0.87$ ,  $p = .21$ , WT = 8, KO = 6) afferent.



**FIGURE 5** Network analysis of CA3 neurons reveals a diminished strength in connectivity along a lack of refinement in knock-out (KO) mice. (a) Schematic representation of spike time tiling coefficient (STTC) calculation for two hypothetical spike trains (represented as rasters);  $T_B$  and  $P_B$  are calculated similarly by changing the spike-train of reference. (b) Representative STTC distribution from a hippocampal CA3 multielectrode array recording show a long tail distribution. (c) Same distribution in a semi-logarithmic scale approximates a normal distribution suggesting a log-normal process. (d) Lorenz-curve for the same distribution indicates highly uneven contribution to the strength of the network where ~20% of connections are responsible for ~50% of the strength in connectivity. (e) Node degree distributions of wild-type (WT) and KO graphs constructed with STTC values reveal a typical long-tail skewed distribution. (f) Log-log distributions of node degrees (open circles) and best fit for power law (dotted line), exponential (discontinuous line) and exponentially truncated power law (continuous line) models. The best model for both groups is an exponentially truncated power law (Table S1) suggesting a broad-scale topology for both groups. (g) STTC distribution of KO and WT networks, note the separation of both distributions in the region beyond STTC > 0.25. (h) Cumulative probability of STTC connections and mean comparison show a reduced connectivity strength in KO networks (Mann-Whitney test;  $U = 1,191,027$ ,  $p = .001$ , WT = 15, KO = 11). (i) Comparison of proportion of connected (C) and disconnected (DC) networks (Fisher's exact test,  $p = .03$ ) showing that despite a lower mean strength, KO networks have signs of hyperconnectivity. (j) Representative graphs for WT (left) and KO (right) networks.

maze results show marked avoidance of open arms (Mann-Whitney test;  $U = 208$ ,  $p = .003$ ; Figure 6j), and comparable decrease in distance traveled by the KO mice (Mann-Whitney

test;  $U = 205$ ,  $p = .003$ ; Figure 6h). Altogether, the results in both tasks indicate that the *Cx3cr1*-deficient mice exhibit an anxious-like phenotype.

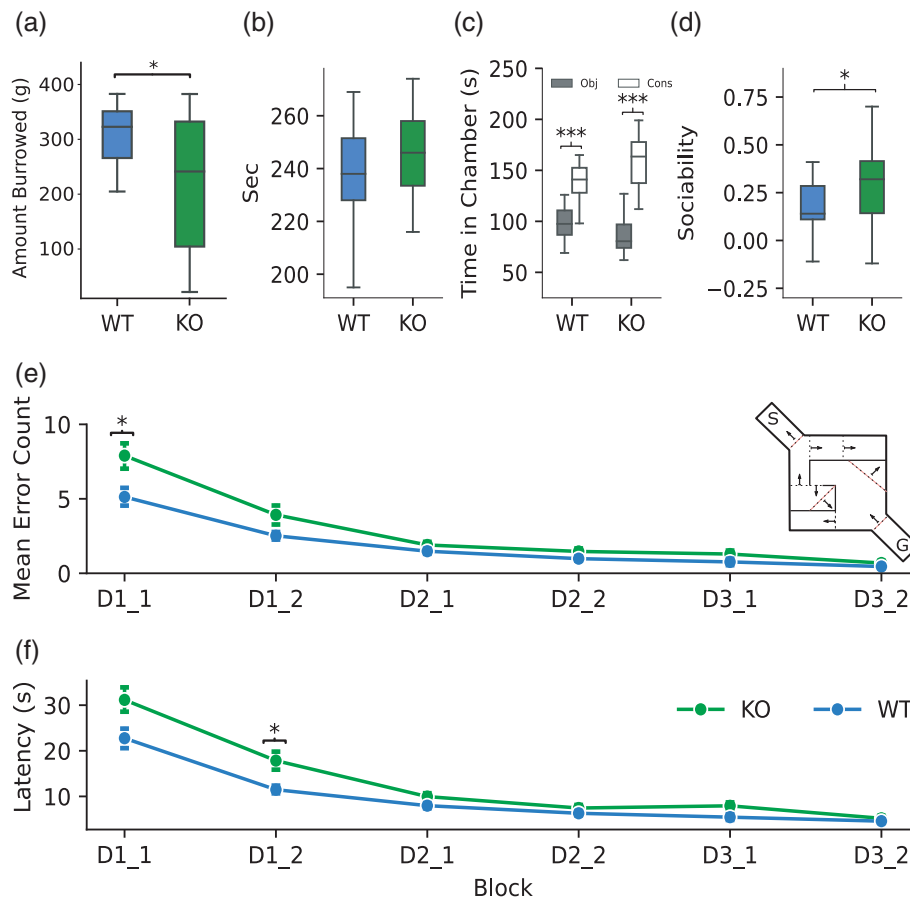


**FIGURE 6** *Cx3cr1* deficient mice display an anxious-like phenotype. (a–g) Results and representative trajectories of the open field test indicate an anxious like phenotype as revealed by diminished distance traveled, increased immobility time, and slower ambulatory speed by knock-out (KO) mice. (a) Total distance traveled (T-test;  $t_{31} = 2.87$ ,  $p = .007$ , wild-type (WT) = 16, KO = 16). (b) Crosses between center and periphery (T-test;  $t_{31} = 1.9$ ,  $p = .06$ ). (c) Immobility time (Mann–Whitney test;  $U = 73$ ,  $p = .03$ ). (d) Mean speed of ambulation (T-test;  $t_{31} = 2.99$ ,  $p = .005$ ). (e) Maximal ambulation speed (T-test;  $t_{31} = 3.17$ ,  $p = .003$ ). (f,g) Representative tracks for WT and KO subjects, respectively. (h–l) Results and representative trajectories for the elevated plus maze show a similar phenotype characterize by diminished distance traveled and a lower amount of time in the in the open arms. (h) Total distance traveled (Mann–Whitney test;  $U = 205$ ,  $p = .003$ , WT = 16, KO = 16). (i) Crosses through center. (j) Percentage of time spent in the open arms (Mann–Whitney test;  $U = 208$ ,  $p = .003$ ). (k,l) Representative trajectories for WT and KO subjects, respectively.

### 3.6 | Adult *Cx3cr1*-deficiency impairs innate behavior but not social interaction

The burrowing task showed a significant decrease in the weight burrowed by KO mice (Mann–Whitney test;  $U = 1264$ ,  $p = .03$ , WT = 22, KO = 31; Figure 7a). Burrowing is an innate behavior in most rodents that responds to the primary need for shelter and relates to the equivalent “activities of daily living” in humans (Deacon, 2006; Jirkof, 2014). Previous reports showed that this species-typical behavior is affected by lesion to the hippocampal formation and medial prefrontal cortex (Deacon et al., 2002, 2003). In accordance with reports of decreased coherence between the hippocampus and prefrontal cortex in *Cx3cr1*-deficient mice (Zhan et al., 2014), our results support an impact of this deficient communication on burrowing.

Since a previous report showed reduced social interaction in young *Cx3cr1*-deficient mice (Zhan et al., 2014), we tested the reproducibility of this result with the three chamber social interaction test (Moy et al., 2004), with one of the lateral chambers containing a novel object and the opposite chamber containing a novel juvenile conspecific (Moy et al., 2004). Both mice groups show similar time exploring both stimuli chambers (total exploration time) (T-test;  $t_{41} = -1.42$ ,  $p = .16$ , WT = 20, KO = 22) (Figure 7b). In contrast with the previous report, our results show that both KO (T-test;  $t_{42} = 11.05$ ,  $p < .001$ ) and WT (T-test;  $t_{38} = 6.96$ ,  $p < .001$ ) mice prefer exploring the conspecific subject (Figure 7c). In fact, contrasting the previous report (Zhan et al., 2014), this preference expressed as a sociability index (difference in time spent at each side normalized by the total time exploring both sides) reveals a higher score in the KO group (Mann–Whitney



**FIGURE 7** Innate, social and cognitive alterations in the *Cx3cr1* depleted mice. (a) Amount of material burrowed after 12 h is diminished in knock-out (KO) mice (Mann–Whitney test;  $U = 1264$ ,  $p = .03$ , wild-type (WT) = 22, KO = 31). (b–d) Sociability is increased in the KO mice as assessed by the three chambers social interaction test. (b) Total exploration time (time spent in either of the lateral chambers) is similar for both groups (T-test;  $t_{41} = -1.42$ ,  $p = .16$ , WT = 20, KO = 22). (c) Both groups present a preference for exploring a conspecific subject rather than a novel object (two-way ANOVA, genotype  $\times$  side, [ $F(1, 5545) = 13.62$ ,  $p = .0004$ ]), comparison by group (object vs conspecific: KO (T-test;  $t_{42} = 11.05$ ,  $p < .001$ ), WT (T-test;  $t_{38} = 6.96$ ,  $p < .001$ )). (d) KO mice show stronger preference to remain near a conspecific subject than WT mice as revealed by the social index (Mann–Whitney test;  $U = 174.5$ ,  $p = .02$ ). (e, f) Deficient encoding of novel spatial information by KO mice. (e) Errors before reaching the goal. KO mice make more errors in the modified Hebb–Williams maze (mixed model ANOVA, genotype:  $F(1, 44) = 65.32$ ,  $p = .001$ , WT = 24, KO = 22, block [ $F(5, 220) = 80.30$ ,  $p < .001$ ], genotype  $\times$  block [ $F(5, 220) = 3.75$ ,  $p = .002$ ]). Inset: Diagram of the problem 4 of the Hebb–Williams maze, discontinuous lines represent error zones and arrows show the direction of the error. (f) Latency to reach the goal. KO mice take longer to solve the maze (mixed model ANOVA, genotype: [ $F(1, 44) = 10.71$ ,  $p = .002$ ], block: [ $F(5, 220) = 102.48$ ,  $p < .001$ ], genotype  $\times$  block: [ $F(5, 220) = 3.62$ ,  $p = .003$ ]). The deficit exhibited by *Cx3cr1* deficient mice in the number of errors as well as latency is limited to the first day of testing, suggesting an impaired encoding of novel spatial information (errors: Pairwise t-test with holm correction; D1\_1:  $t_{208} = 2.73$ ,  $p = .04$ ), latency: (pairwise T-test with holm correction; D1\_1:  $t_{217} = 2.43$ ,  $p = .06$ , D1\_2;  $t_{157} = 2.77$ ,  $p = .03$ ).

test;  $U = 174.5$ ,  $p = .02$ ) (Figure 7d), reflecting an increased preference for the side containing a juvenile conspecific.

### 3.7 | *Cx3cr1*-deficient mice show a deficit in encoding of novel spatial information

Previous reports found a deficiency in hippocampal-dependent contextual and spatial memory in the *Cx3cr1* mouse, both tasks regarding memory retrieval (Rogers et al., 2011). However, our results show a particular impact on the mossy fiber pathway, which is better associated with the early encoding of novel information (Hagena &

Manahan-Vaughan, 2011; Jerman et al., 2006; Lee & Kesner, 2004). Therefore, we set out to assess the performance of these subjects in the Hebb–Williams maze to evaluate the encoding of the novel space and the use of this information to improve subject performance in subsequent trials (Lee & Kesner, 2004; Rogers & Kesner, 2003). Using problem 4 of the Hebb–Williams maze (Figure 7e, inset), we found a significant difference in the mean number of errors made by each group (Mixed model ANOVA, genotype:  $F(1, 44) = 65.32$ ,  $p = .001$ , WT = 24, KO = 22). KO mice made more errors in the first block of trials in the first day of testing (T-test;  $t_{208} = 2.73$ ,  $p = .04$ ; Figure 7e), indicating an impairment in the fast encoding of novel spatial information (Figure 7e). A similar analysis for latency to reach the goal shows



consistent results with a significant difference between genotypes (Mixed model ANOVA, genotype:  $F(1,44) = 10.71, p = .002$ ), KO mice took longer to reach the goal during both sessions of the first day of testing (D1\_1;  $t_{217} = 2.43, p = .06$ , D1\_2;  $t_{157} = 2.77, p = .03$ ; Figure 7f). For both groups the mean number of errors and latency per block have a linear relationship (Figure S6). Overall, our results indicate that *Cx3cr1*-KO mice exhibit a deficit in the rapid encoding of spatial information, further added to the CA3-dependent cognitive alterations related to microglia–neuron miscommunication (Hagena & Manahan-Vaughan, 2011; Kesner, 2007; Lee & Kesner, 2004; Song et al., 2018).

## 4 | DISCUSSION

Appropriate communication between neurons and microglia is essential during development and experience-dependent brain remodeling (Arnoux & Audinat, 2015; Maggi et al., 2011; Paolicelli et al., 2014; Sierra et al., 2014). Thus, interrupting the *Cx3cr1*-fractalkine pathway produces a range of brain alterations including neuronal apoptosis (Ueno et al., 2013), deficient synaptic maturation and pruning (Paolicelli et al., 2011; Zhan et al., 2014) and reduced adult neurogenesis (Bachstetter et al., 2011). These alterations correlate with behavioral and cognitive shortfalls that place *Cx3cr1*-deficient mice as a model for neuropsychiatric research. In the present work, we provided new evidence that complements the behavioral and neurophysiological phenotype of this mouse model. Particularly, we showed that the cognitive deficit extends to innate behaviors such as burrowing, suggesting an impact on activities of daily living and general well-being (Deacon, 2012; Jirkof, 2014), which agrees with findings that burrowing is highly affected by proinflammatory conditions and closely relates to the microglial state (Hart et al., 2012; Püntener et al., 2012; Vichaya et al., 2017). Furthermore, our results suggest an anxious-like response to stressful circumstances, an observation that is in line with a previous report of hypothalamic–pituitary–adrenal axis hyperreactivity in *Cx3cr1*-deficient mice (Winkler et al., 2017) and is similar to the anxiety induced by chronic microglial activation (Wang et al., 2018). It must be acknowledged that the transgenic animal used in our study, developed by Yona et al., 2013, has significant leakage of its Cre-activity (thus, *Cx3cr1* absence) in neurons (Haimon et al., 2018; Zhao et al., 2019), indicating that *Cx3cr1* could be expressed in non-microglial cells, including neurons and astrocytes during early development (Zhao et al., 2019). In fact, *Cx3cr1* was reported to be expressed in cultured neurons and induced in neurons and astrocytes following ischemia or seizures (Dworzak et al., 2015; Meucci et al., 2000; Wang et al., 2018; Yeo et al., 2011; Zhao et al., 2019). Moreover, *Cx3cr1* is also expressed in other macrophages located in the brain; namely perivascular macrophages (Chinnery et al., 2012; Utz et al., 2020; Yona et al., 2013; Zhao et al., 2019), meningeal macrophages (Chinnery et al., 2012; Utz et al., 2020) and choroid plexus macrophages (Chinnery et al., 2012; Utz et al., 2020), which should be taken into consideration since cells located in brain vessels could impact neural function (Garré et al., 2017; Valle-Dorado et al., 2015). Thus,

the absence of *Cx3cr1* in all these cell types, not just microglia, could contribute to some of the phenotypes observed in this study.

Since the absence of the *Cx3cr1* receptors leads to varying changes in microglial and neuronal density and morphology (Castro-Sánchez et al., 2019; Hoshiko et al., 2012; Pagani et al., 2015; Xin et al., 2022), we characterized these cellular characteristics in the strain used in this study (Yona et al., 2013) and found that *Cx3cr1* absence induced a transitory reduction in hippocampal microglia density early in life that, is similar to the transient reduction in microglial density, that resolves by P40, in mice lacking *Cx3cr1* in CA1 region (Paolicelli et al., 2011) and the barrel cortex (Hoshiko et al., 2012). Similarly, while we found that adult *Cx3cr1*-lacking microglia exhibit an hyperarborized phenotype characterized by higher number of branches, end-points and increased total branch length, which contrast with previous reports of smaller arborization area of microglial processes (Basilico et al., 2019; Gyoneva et al., 2019; Pagani et al., 2015) or with no differences in microglia morphology in *Cx3cr1*-KO mice (Castro-Sánchez et al., 2019; Gyoneva et al., 2019; Hellwig et al., 2016; Hoshiko et al., 2012; Liang et al., 2009; Sellner et al., 2016). However, our findings are similar to those of Millior et al., 2016 who reported larger arborization areas in *Cx3cr1*-KO mice. The discrepancies just described in microglial density and morphology may be explained by the different approaches for analyzing microglial morphology, but also by differences intrinsic to the brain areas analyzed (Ayata et al., 2018; Gyoneva et al., 2019). In fact, the absence of *Cx3cr1* differentially affects microglial characteristics, when analyzed with the same methodology, in a brain area-dependent manner (Gyoneva et al., 2019), indicating that microglia functions are determined not just by their intrinsic characteristics but by its local environment (Ayata et al., 2018; Gyoneva et al., 2019). Interestingly, as found in this study and several others (Hoshiko et al., 2012; Kim et al., 2015; Paolicelli et al., 2011; Zhan et al., 2014), morphological and density changes induced by *Cx3cr1* absence correlate with changes in neural circuit function.

We also characterized the impact of *Cx3cr1* deficiency on pre- and postsynaptic CA3 components and found no change in spine density of CA3 pyramidal cells in the adult mice, which is consistent with previous reports that found a normalization of spine density in adulthood despite a transitory reduction during development in CA1 (Paolicelli et al., 2011; Zhan et al., 2014), but also contrasts with the decrease in spine density in this genotype found in the DG (Bolós et al., 2018; Xin et al., 2022). Similar explanations, as those offer for microglial characteristics, could account for the discrepancies observed in dendritic spines upon *Cx3cr1* absence. In contrast, we also found that a subpopulation of mossy fiber terminals exhibit a drastically smaller volume in *Cx3cr1*-KO mice which is similar to the reduction in the area of mossy fiber terminals of adult-born granule cells reported by Bolós et al., 2018. Interestingly, we also found that absence of *Cx3cr1* coincides with the presence of satellite mossy fiber terminals (Galimberti et al., 2006; Gogolla et al., 2009), which are associated with activity-dependent modulation of hippocampal structural plasticity (Galimberti et al., 2006; Gogolla et al., 2009).

Since previous reports indicate impairments in contextual memory (Rogers et al., 2011), we tested if a similar deficit could affect the performance of the *Cx3cr1*-deficient mice in hippocampal-dependent spatial navigation tasks, using a modified version of the Hebb-Williams maze (Lee & Kesner, 2004). Our results show that *Cx3cr1* mice perform significantly worse than their WT counterparts, as observed in animals under various pathological conditions or experimental manipulations including: life-long autoimmunity, glial alterations (Boehm et al., 1996) and lesions to the hippocampus (Rogers & Kesner, 2003) or to the main hippocampal inputs (Glasier et al., 1995; Lee & Kesner, 2004; Traissard et al., 2007). Since the increment in the number of errors is largely restricted to the first day of testing, when the subjects encounter a novel spatial configuration, it indicates a difficulty in rapid encoding of new spatial information, which is a putative function of the CA3 hippocampal region (Hunsaker et al., 2008; Jerman et al., 2006; Lee & Kesner, 2004). Notably, the performance of *Cx3cr1*-deficient mice improves with sustained training and matches the performance of WT mice in subsequent days, as animals under other pathological conditions or manipulations do (Boehm et al., 1996; Glasier et al., 1995; Lee & Kesner, 2004; Traissard et al., 2007). In fact, prior test experience improves Hebb-Williams performance in animals with autoimmunity (Boehm et al., 1996). This late phase of the task is related to memory retrieval of a now familiar space and more closely relies on the perforant path afferent to the hippocampus and CA1 region (Hunsaker et al., 2008; Lee & Kesner, 2004) and may suggest that *Cx3cr1*-deficient mice exhibit a mild hippocampal dysfunction that is only revealed when the task is novel but improves with experience and training, as previously found in other conditions (Boehm et al., 1996; Glasier et al., 1995; Rogers & Kesner, 2003; Traissard et al., 2007). However, a decrease in synaptic transmission, similar to our results in CA3, has been reported for CA1 (Zhan et al., 2014), along with impairment of long-term potentiation (Rogers et al., 2011), which would predict late impairment in Hebb-Williams performance (Lee & Kesner, 2004) that was not found. Thus, an alternative explanation is that this late phase of the task may be supported by a procedural (*praxic*) strategy and not entirely rely on memory retrieval (Redish, 1999; Regier et al., 2015) as has been shown in hippocampal lesion studies (Pouzet et al., 2002). Here we also found that the initial information encoding deficit observed in *Cx3cr1*-deficient mice and in other pathological conditions (Boehm et al., 1996; Glasier et al., 1995; Rogers & Kesner, 2003; Traissard et al., 2007), possibly due to alterations in the CA3 hippocampal region, is overcome by trial repetition, which could be used as a therapeutic approach to improve cognitive performance under neuron-microglia miscommunication (Boehm et al., 1996; Seese et al., 2014).

Here, we found that a possible substrate for this encoding delay is a decreased amplitude in the postsynaptic currents recorded in CA3 that is in line with reports of impaired synaptic maturation in several regions of the brain of *Cx3cr1*-deficient mice (Hoshiko et al., 2012; Paolicelli et al., 2011; Zhan et al., 2014) and with alterations in CA3 input associated with cognitive impairment (Ikegaya et al., 2001; Viana da Silva et al., 2019). Interestingly, the compromised synaptic transmission is accompanied by a reduction in MF-CA3 coupling and an expansion of MF area of distribution. Since this MF expansion does

not show aberrant projections, such as those seen in other models (Buckmaster, 2012), it suggests a compensatory sprouting secondary to failure of MF terminals to establish connection with their targets in CA3 (Liu et al., 2018), as the one observed in conditions of impaired contextual discrimination, anxiety and hippocampal network reconfiguration (Jinde et al., 2012).

The global impact of these alterations in CA3 function is better captured by our functional connectivity analysis showing that while networks of *Cx3cr1*-deficient mice retain their complex broad-scale and small-world topology, indicating that the most prominent characteristics of brain networks persist with this gene disruption (Bullmore & Sporns, 2009; Li et al., 2010), they also show signs of a more diffuse and weak connectivity that could affect the processing of information (Mossa et al., 2002), as has been proposed in CA3 *in silico* realistic models (Guzman et al., 2016; Mishra & Chan, 2016), and indicates an incomplete refinement of the circuit which also correlates with cognitive impairment (Park et al., 2016).

As our results in the population activity of neonatal hippocampal slices show, these modifications in the organization of the CA3 circuit may arise in the early stages of postnatal development, a critical period for microglia-neuron interaction through the fractalkine pathway (Arnoux & Audinat, 2015; Hoshiko et al., 2012; Paolicelli et al., 2011; Zhan et al., 2014). In this sense, the sparseness of the population activity during periods of spontaneous activity highly contrasts with the disproportionate recruitment by fGDPs in the *Cx3cr1*-KO mice and indicates early changes in the arrangement of emergent connections. Since fGDPs can act as coincidence detectors and modify the synaptic strength of the co-activated synapses (Griguoli & Cherubini, 2017; Kasyanov et al., 2004), this increased recruitment of MUA by fGDPs could act as a rescue mechanism for the developing synapses. How microglia participate in the homeostatic scaling of synaptic transmission in the developing brain remains an interesting subject for further research.

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualisation, F.A.M.S. and F.P.O.; Methodology, F.A.M.S., M.I.T.F. and B.O.; Data Analysis, F.A.M.S.; Writing-OriginalDraft, F.A.M.S. and F.P.O., Writing - Review & Editing, F.A.M.S., M.I.T.F. B.O. and F. P.O.; Supervision, F.P.O., Project Administration, B.O. and F.P.O.; Funding Acquisition, F.P.O.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Nydia Hernández Ríos and Ericka de los Ríos Arellano for their help in the preparation of histological samples and image acquisition, Jessica González Norris for editorial comments, as well as Victor de Lafuente for his advice in data analysis, Deisy Gasca Martínez for her advice with the behavioral tasks and Alejandra Castilla León for her support with animal care and handling. Felipe A. Méndez-Salcido and Mayra Itzel Torres-Flores are doctoral students from the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received CONACyT fellowships (ID 570426 and 629550, respectively). This work was supported by Dirección General de Asuntos del Personal Académico UNAM (Grant IG200521) and CONACyT (A1-S-7540).



## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

Data is available upon request.

## ORCID

Felipe Antonio Méndez-Salcido  <https://orcid.org/0000-0002-1697-5203>

Fernando Peña-Ortega  <https://orcid.org/0000-0002-0348-4392>

## REFERENCES

- Amaral, D. G., & Lavenex, P. (2006). Hippocampal neuroanatomy. In *The Hippocampus Book* (pp. 37–114). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780195100273.001.0001/acprof-9780195100273-chapter-3>
- Amaral, L. a. N., Scala, A., Barthélémy, M., & Stanley, H. E. (2000). Classes of small-world networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(21), 11149–11152. <https://doi.org/10.1073/pnas.200327197>
- Arganda-Carreras, I., Fernández-González, R., Muñoz-Barrutia, A., & Ortiz-De-Solorzano, C. (2010). 3D reconstruction of histological sections: Application to mammary gland tissue. *Microscopy Research and Technique*, 73(11), 1019–1029. <https://doi.org/10.1002/jemt.20829>
- Arnoux, I., & Audinat, E. (2015). Fractalkine signaling and microglia functions in the developing brain. *Neural Plasticity*, 2015, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2015/689404>
- Arnoux, I., Hoshiko, M., Sanz Diez, A., & Audinat, E. (2014). Paradoxical effects of minocycline in the developing mouse somatosensory cortex: Effects of minocycline in the developing cortex. *Glia*, 62(3), 399–410. <https://doi.org/10.1002/glia.22612>
- Arshadi, C., Günther, U., Eddison, M., Harrington, K. I. S., & Ferreira, T. A. (2021). SNT: A unifying toolbox for quantification of neuronal anatomy. *Nature Methods*, 18(4), 374–377. <https://doi.org/10.1038/s41592-021-01105-7>
- Ayata, P., Badimon, A., Strasburger, H. J., Duff, M. K., Montgomery, S. E., Loh, Y.-H. E., Ebert, A., Pimenova, A. A., Ramirez, B. R., Chan, A. T., Sullivan, J. M., Purushothaman, I., Scarpa, J. R., Goate, A. M., Busslinger, M., Shen, L., Losic, B., & Schaefer, A. (2018). Epigenetic regulation of brain region-specific microglia clearance activity. *Nature Neuroscience*, 21(8), 1049–1060. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0192-3>
- Bachstetter, A. D., Morganti, J. M., Jernberg, J., Schlunk, A., Mitchell, S. H., Brewster, K. W., Hudson, C. E., Cole, M. J., Harrison, J. K., Bickford, P. C., & Gemma, C. (2011). Fractalkine and CX3CR1 regulate hippocampal neurogenesis in adult and aged rats. *Neurobiology of Aging*, 32(11), 2030–2044. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2009.11.022>
- Basilico, B., Pagani, F., Grimaldi, A., Cortese, B., Di Angelantonio, S., Weinhard, L., Gross, C., Limatola, C., Maggi, L., & Ragozzino, D. (2019). Microglia shape presynaptic properties at developing glutamatergic synapses. *Glia*, 67(1), 53–67. <https://doi.org/10.1002/glia.23508>
- Bastos, A. M., & Schoffelen, J.-M. (2016). A tutorial review of functional connectivity analysis methods and their interpretational pitfalls. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 9, 1–23. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2015.00175>
- Ben-Ari, Y. (2001). Developing networks play a similar melody. *Trends in Neurosciences*, 24(6), 353–360. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(00\)01813-0](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(00)01813-0)
- Ben-Ari, Y., Cherubini, E., Corradetti, R., & Gaiarsa, J. L. (1989). Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. *The Journal of Physiology*, 416(1), 303–325. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1989.sp017762>
- Ben-Ari, Y., Gaiarsa, J.-L., Tyzio, R., & Khazipov, R. (2007). GABA: A pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations. *Physiological Reviews*, 87(4), 1215–1284. <https://doi.org/10.1152/physrev.00017.2006>
- Bessis, A., Béchade, C., Bernard, D., & Roumier, A. (2007). Microglial control of neuronal death and synaptic properties. *Glia*, 55(3), 233–238. <https://doi.org/10.1002/glia.20459>
- Bischofberger, J., Engel, D., Li, L., Geiger, J. R. P., & Jonas, P. (2006). Patch-clamp recording from mossy fiber terminals in hippocampal slices. *Nature Protocols*, 1(4), 2075–2081. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.312>
- Boehm, G. W., Sherman, G. F., Hoplight, B. J., Hyde, L. A., Waters, N. S., Bradway, D. M., Galaburda, A. M., & Denenberg, V. H. (1996). Learning and memory in the autoimmune BXSB mouse: Effects of neocortical ectopias and environmental enrichment. *Brain Research*, 726(1), 11–22. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(96\)00299-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(96)00299-5)
- Bolós, M., Perea, J. R., Terreros-Roncal, J., Pallas-Bazarra, N., Jurado-Arjona, J., Ávila, J., & Llorens-Martín, M. (2018). Absence of microglial CX3CR1 impairs the synaptic integration of adult-born hippocampal granule neurons. *Brain, Behavior, and Immunity*, 68, 76–89. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.10.002>
- Buckmaster, P. S. (2012). Mossy fiber sprouting in the dentate gyrus. In *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies* (4th ed., pp. 1–29). National Centre for Biotechnological Information.
- Bullmore, E., & Sporns, O. (2009). Complex brain networks: Graph theoretical analysis of structural and functional systems. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(3), 186–198. <https://doi.org/10.1038/nrn2575>
- Camacho-Hernández, N. P., Lorea-Hernández, J. J., & Peña-Ortega, F. (2019). Microglial modulators reduce respiratory rhythm long-term facilitation in vitro. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 265, 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2018.07.012>
- Carola, V., D'Olimpio, F., Brunamonti, E., Mangia, F., & Renzi, P. (2002). Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. *Behavioural Brain Research*, 134(1), 49–57. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(01\)00452-1](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(01)00452-1)
- Castro-Sánchez, S., García-Yagüe, Á. J., Kügler, S., & Lastres-Becker, I. (2019). CX3CR1-deficient microglia shows impaired signalling of the transcription factor NRF2: Implications in tauopathies. *Redox Biology*, 22, 101118. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101118>
- Cheng, C., Trzcinski, O., & Doering, L. C. (2014). Fluorescent labeling of dendritic spines in cell cultures with the carbocyanine dye “DiI”. *Frontiers in Neuroanatomy*, 8, 30. <https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00030>
- Chiang, M. C., Huang, A. J. Y., Wintzer, M. E., Ohshima, T., & McHugh, T. J. (2018). A role for CA3 in social recognition memory. *Behavioural Brain Research*, 354, 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.01.019>
- Chinnery, H. R., McLenachan, S., Humphries, T., Kezic, J. M., Chen, X., Ruitenber, M. J., & McMennamin, P. G. (2012). Accumulation of murine subretinal macrophages: Effects of age, pigmentation and CX3CR1. *Neurobiology of Aging*, 33(8), 1769–1776. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.03.010>
- Cutts, C. S., & Eglén, S. J. (2014). Detecting pairwise correlations in spike trains: An objective comparison of methods and application to the study of retinal waves. *Journal of Neuroscience*, 34(43), 14288–14303. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2767-14.2014>
- Deacon, R. (2012). Assessing burrowing, nest construction, and hoarding in mice. *Journal of Visualized Experiments*, 59, 2607. <https://doi.org/10.3791/2607>
- Deacon, R. M. J. (2006). Burrowing in rodents: A sensitive method for detecting behavioral dysfunction. *Nature Protocols*, 1(1), 118–121. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.19>



- Deacon, R. M. J., Croucher, A., & Rawlins, J. N. P. (2002). Hippocampal cytotoxic lesion effects on species-typical behaviours in mice. *Behavioural Brain Research*, 132(2), 203–213. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(01\)00401-6](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(01)00401-6)
- Deacon, R. M. J., Penny, C., & Rawlins, J. N. P. (2003). Effects of medial prefrontal cortex cytotoxic lesions in mice. *Behavioural Brain Research*, 139(1), 139–155. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(02\)00225-5](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(02)00225-5)
- Debanne, D., Guérineau, N. C., Gähwiler, B. H., & Thompson, S. M. (1996). Paired-pulse facilitation and depression at unitary synapses in rat hippocampus: Quantal fluctuation affects subsequent release. *The Journal of Physiology*, 491(Pt 1), 163–176. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1996.sp021204>
- Denker, M., Yegenoglu, A., & Grün, S. (2018). Collaborative HPC-enabled workflows on the HBP Collaboratory using the Elephant framework. *Neuroinformatics 2018*, 19. doi:10.12751/incf.ni2018.0019
- Dworzak, J., Renvoisé, B., Habchi, J., Yates, E. V., Combadière, C., Knowles, T. P., Dobson, C. M., Blackstone, C., Paulsen, O., & Murphy, P. M. (2015). Neuronal Cx3cr1 deficiency protects against amyloid  $\beta$ -induced neurotoxicity. *PLoS One*, 10(6), e0127730. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127730>
- Ennaceur, A. (2014). Tests of unconditioned anxiety—Pitfalls and disappointments. In *Physiology and behavior* (Vol. 135, pp. 55–71). Elsevier Inc.. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.05.032>
- Eyo, U. B., & Wu, L.-J. (2019). Microglia: Lifelong patrolling immune cells of the brain. *Progress in Neurobiology*, 179, 101614. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2019.04.003>
- Feldt, S., Bonifazi, P., & Cossart, R. (2011). Dissecting functional connectivity of neuronal microcircuits: Experimental and theoretical insights. *Trends in Neurosciences*, 34(5), 225–236. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2011.02.007>
- Fornito, A., Zalesky, A., & Bullmore, E. (2016). Connectivity matrices and brain graphs. *Fundamentals of Brain Network Analysis*, 89–113. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407908-3.00003-0>
- Friston, K. J. (2011). Functional and effective connectivity: A review. *Brain Connectivity*, 1(1), 13–36. <https://doi.org/10.1089/brain.2011.0008>
- Galimberti, I., Gogolla, N., Alberi, S., Santos, A. F., Muller, D., & Caroni, P. (2006). Long-term rearrangements of hippocampal mossy fiber terminal connectivity in the adult regulated by experience. *Neuron*, 50(5), 749–763. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.04.026>
- Garré, J. M., Silva, H. M., Lafaille, J. J., & Yang, G. (2017). CX3CR1+ monocytes modulate learning and learning-dependent dendritic spine remodeling via TNF- $\alpha$ . *Nature Medicine*, 23(6), 714–722. <https://doi.org/10.1038/nm.4340>
- Glasier, M. M., Sutton, R. L., & Stein, D. G. (1995). Effects of unilateral entorhinal cortex lesion and ganglioside GM1 treatment on performance in a novel water maze task. *Neurobiology of Learning and Memory*, 64(3), 203–214. <https://doi.org/10.1006/nlme.1995.0003>
- Gogolla, N., Galimberti, I., Deguchi, Y., & Caroni, P. (2009). Wnt signaling mediates experience-related regulation of synapse numbers and mossy fiber connectivities in the adult hippocampus. *Neuron*, 62(4), 510–525. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.04.022>
- Griguoli, M., & Cherubini, E. (2017). Early correlated network activity in the hippocampus: Its putative role in shaping neuronal circuits. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11, 255. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00255>
- Grün, S., Borgelt, C., Gerstein, G., Louis, S., & Diesmann, M. (2010). Selecting appropriate surrogate methods for spike correlation analysis. *BMC Neuroscience*, 11(Suppl 1), O15. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-11-S1-O15>
- Guzman, S. J., Schlögl, A., Frotscher, M., & Jonas, P. (2016). Synaptic mechanisms of pattern completion in the hippocampal CA3 network. *Science*, 353(6304), 1117–1123. <https://doi.org/10.1126/science.aaf1836>
- Gyoneva, S., Hosur, R., Gosselin, D., Zhang, B., Ouyang, Z., Cotleur, A. C., Peterson, M., Allaire, N., Challa, R., Cullen, P., Roberts, C., Miao, K., Reynolds, T. L., Glass, C. K., Burkly, L., & Ransohoff, R. M. (2019). Cx3cr1-deficient microglia exhibit a premature aging transcriptome. *Life Science Alliance*, 2(6), e201900453. <https://doi.org/10.26508/lsa.201900453>
- Hagberg, A. A., Schult, D. A., & Swart, P. J. (2008). Exploring network structure, dynamics, and function using NetworkX. *Proceedings of the 7th Python in Science Conference (SciPy 2008)*, SciPy, pp. 11–15.
- Hagena, H., & Manahan-Vaughan, D. (2011). Learning-facilitated synaptic plasticity at CA3 mossy fiber and commissural-associational synapses reveals different roles in information processing. *Cerebral Cortex*, 21(11), 2442–2449. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhq271>
- Haimon, Z., Volaski, A., Orthgiess, J., Boura-Halfon, S., Varol, D., Shemer, A., Yona, S., Zuckerman, B., David, E., Chappell-Maor, L., Bechmann, I., Gericke, M., Ulitsky, I., & Jung, S. (2018). Re-evaluating microglia expression profiles using RiboTag and cell isolation strategies. *Nature Immunology*, 19(6), 636–644. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0110-6>
- Hart, A. D., Wyttenbach, A., Hugh Perry, V., & Teeling, J. L. (2012). Age related changes in microglial phenotype vary between CNS regions: Grey versus white matter differences. *Brain, Behavior, and Immunity*, 26(5), 754–765. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2011.11.006>
- Hebb, D., & Williams, K. (1946). A method of rating animal intelligence. *Journal of General Psychology*, 34(1), 59–65. <https://doi.org/10.1080/00221309.1946.10544520>
- Hellwig, S., Brioschi, S., Dieni, S., Frings, L., Masuch, A., Blank, T., & Biber, K. (2016). Altered microglia morphology and higher resilience to stress-induced depression-like behavior in CX3CR1-deficient mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 55, 126–137. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.11.008>
- Hemond, P., Epstein, D., Boley, A., Migliore, M., Ascoli, G. A., & Jaffe, D. B. (2008). Distinct classes of pyramidal cells exhibit mutually exclusive firing patterns in hippocampal area CA3b. *Hippocampus*, 18(4), 411–424. <https://doi.org/10.1002/hipo.20404>
- Hoshiko, M., Arnoux, I., Avignone, E., Yamamoto, N., & Audinat, E. (2012). Deficiency of the microglial receptor CX3CR1 impairs postnatal functional development of thalamocortical synapses in the barrel cortex. *Journal of Neuroscience*, 32(43), 15106–15111. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1167-12.2012>
- Humphries, M. D., & Gurney, K. (2008). Network ‘small-world-ness’: A quantitative method for determining canonical network equivalence. *PLoS One*, 3(4), e0002051. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002051>
- Humphries, M. D., Gurney, K., & Prescott, T. J. (2006). The brainstem reticular formation is a small-world, not scale-free, network. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273(1585), 503–511. <https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3354>
- Hunsaker, M. R., Tran, G. T., & Kesner, R. P. (2008). A double dissociation of subcortical hippocampal efferents for encoding and consolidation/retrieval of spatial information. *Hippocampus*, 18(7), 699–709. <https://doi.org/10.1002/hipo.20429>
- Ikegaya, Y., Sasaki, T., Ishikawa, D., Honma, N., Tao, K., Takahashi, N., Minamisawa, G., Ujita, S., & Matsuki, N. (2013). Interpyramid spike transmission stabilizes the sparseness of recurrent network activity. *Cerebral Cortex*, 23(2), 293–304. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhs006>
- Ikegaya, Y., Yamada, M., Fukuda, T., Kuroyanagi, H., Shirasawa, T., & Nishiyama, N. (2001). Aberrant synaptic transmission in the hippocampal CA3 region and cognitive deterioration in protein-repair enzyme-deficient mice. *Hippocampus*, 11(3), 287–298. <https://doi.org/10.1002/hipo.1043>
- Jerman, T., Kesner, R. P., & Hunsaker, M. R. (2006). Disconnection analysis of CA3 and DG in mediating encoding but not retrieval in a spatial maze learning task. *Learning & Memory*, 13(4), 458–464. <https://doi.org/10.1101/lm.246906>
- Jinde, S., Zsiros, V., Jiang, Z., Nakao, K., Pickel, J., Kohno, K., Belforte, J. E., & Nakazawa, K. (2012). Hilary mossy cell degeneration



- causes transient dentate granule cell hyperexcitability and impaired pattern separation. *Neuron*, 76(6), 1189–1200. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.10.036>
- Jirkof, P. (2014). Burrowing and nest building behavior as indicators of well-being in mice. *Journal of Neuroscience Methods*, 234, 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2014.02.001>
- Juárez-Vidales, J. d. J., Pérez-Ortega, J. E., Lorea-Hernández, J. J. I., Méndez-Salcido, F. A., & Pena-Ortega, F. (2021). Configuration and dynamics of dominant inspiratory multineuronal activity patterns during eupnea and gasping generation in vitro. *Journal of Neurophysiology*, 125, 1289–1306. <https://doi.org/10.1152/jn.00563.2020>
- Jung, S., Aliberti, J., Graemmel, P., Sunshine, M. J., Kreutzberg, G. W., Sher, A., & Littman, D. R. (2000). Analysis of fractalkine receptor CX3CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Molecular and Cellular Biology*, 20(11), 4106–4114. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.11.4106-4114.2000>
- Kasyanov, A. M., Safiulina, V. F., Voronin, L. L., & Cherubini, E. (2004). GABA-mediated giant depolarizing potentials as coincidence detectors for enhancing synaptic efficacy in the developing hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(11), 3967–3972. <https://doi.org/10.1073/pnas.0305974101>
- Kesner, R. P. (2007). Behavioral functions of the CA3 subregion of the hippocampus. *Learning and Memory*, 14(11), 771–781. <https://doi.org/10.1101/lm.688207>
- Kettenmann, H., Hanisch, U.-K., Noda, M., & Verkhratsky, A. (2011). Physiology of microglia. *Physiological Reviews*, 91(2), 461–553. <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2010>
- Kettenmann, H., Kirchhoff, F., & Verkhratsky, A. (2013). Microglia: New roles for the synaptic stripper. *Neuron*, 77(1), 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.12.023>
- Kim, I., Mlsna, L. M., Yoon, S., Le, B., Yu, S., Xu, D., & Koh, S. (2015). A postnatal peak in microglial development in the mouse hippocampus is correlated with heightened sensitivity to seizure triggers. *Brain and Behavior*, 5(12), e00403. <https://doi.org/10.1002/brb3.403>
- Lee, I., & Kesner, R. P. (2004). Encoding versus retrieval of spatial memory: Double dissociation between the dentate gyrus and the perforant path inputs into CA3 in the dorsal hippocampus. *Hippocampus*, 14(1), 66–76. <https://doi.org/10.1002/hipo.10167>
- Leinekugel, X., Khalilov, I., Ben-Ari, Y., & Khazipov, R. (1998). Giant depolarizing potentials: The septal pole of the hippocampus paces the activity of the developing intact septohippocampal complex in vitro. *Journal of Neuroscience*, 18(16), 6349–6357. <https://www.jneurosci.org/content/18/16/6349>
- Li, X., Ouyang, G., Usami, A., Ikegaya, Y., & Sik, A. (2010). Scale-free topology of the CA3 hippocampal network: A novel method to analyze functional neuronal assemblies. *Biophysical Journal*, 98(9), 1733–1741. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.01.013>
- Liang, K. J., Lee, J. E., Wang, Y. D., Ma, W., Fontainhas, A. M., Fariss, R. N., & Wong, W. T. (2009). Regulation of dynamic behavior of retinal microglia by CX3CR1 signaling. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 50(9), 4444–4451. <https://doi.org/10.1167/iovs.08-3357>
- Linkert, M., Rueden, C. T., Allan, C., Burel, J.-M., Moore, W., Patterson, A., Loranger, B., Moore, J., Neves, C., MacDonald, D., Tarkowska, A., Sticco, C., Hill, E., Rossner, M., Eliceiri, K. W., & Swedlow, J. R. (2010). Metadata matters: Access to image data in the real world. *Journal of Cell Biology*, 189(5), 777–782. <https://doi.org/10.1083/jcb.201004104>
- Liu, X., Zhu, X., Halford, M., Xu, T., Henkemeyer, M., & Xu, N. (2018). Retrograde regulation of mossy fiber axon targeting and terminal maturation via postsynaptic Lnx1. *The Journal of Cell Biology*, 217(11), 4007–4024. <https://doi.org/10.1083/jcb.201803105>
- Lorea-Hernández, J.-J., Morales, T., Rivera-Angulo, A.-J., Alcántara-González, D., & Peña-Ortega, F. (2016). Microglia modulate respiratory rhythm generation and autoresuscitation. *Glia*, 64(4), 603–619. <https://doi.org/10.1002/glia.22951>
- Maggi, L., Scianni, M., Branchi, I., D'Andrea, I., Lauro, C., & Limatola, C. (2011). CX3CR1 deficiency alters hippocampal-dependent plasticity phenomena blunting the effects of enriched environment. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 5(October), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fncel.2011.00022>
- Martínez, J., & Quian Quiroga, R. (2013). Spike Sorting. In *Principles of neural coding* (1st ed.). CRC Press.
- Meucci, O., Fatatis, A., Simen, A. A., & Miller, R. J. (2000). Expression of CX3CR1 chemokine receptors on neurons and their role in neuronal survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(14), 8075–8080. <https://doi.org/10.1073/pnas.090017497>
- Milior, G., Lecours, C., Samson, L., Bisht, K., Poggini, S., Pagani, F., Deflorio, C., Lauro, C., Alboni, S., Limatola, C., Branchi, I., Tremblay, M.-E., & Maggi, L. (2016). Fractalkine receptor deficiency impairs microglial and neuronal responsiveness to chronic stress. *Brain, Behavior, and Immunity*, 55, 114–125. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.07.024>
- Mishra, P., & Chan, D. C. (2016). Metabolic regulation of mitochondrial dynamics. *Journal of Cell Biology*, 212(4), 379–387. <https://doi.org/10.1083/jcb.201511036>
- Morrison, H., Young, K., Qureshi, M., Rowe, R. K., & Lifshitz, J. (2017). Quantitative microglia analyses reveal diverse morphologic responses in the rat cortex after diffuse brain injury. *Scientific Reports*, 7(1), 13211. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13581-z>
- Moser, M. B., Moser, E. I., Forrest, E., Andersen, P., & Morris, R. G. (1995). Spatial learning with a minislab in the dorsal hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(21), 9697–9701. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.21.9697>
- Mossa, S., Barthélémy, M., Eugene Stanley, H., & Nunes Amaral, L. A. (2002). Truncation of power law behavior in “scale-free” network models due to information filtering. *Physical Review Letters*, 88(13), 138701. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.88.138701>
- Moy, S. S., Nadler, J. J., Perez, A., Barbaro, R. P., Johns, J. M., Magnuson, T. R., Piven, J., & Crawley, J. N. (2004). Sociability and preference for social novelty in five inbred strains: An approach to assess autistic-like behavior in mice. *Genes, Brain and Behavior*, 3(5), 287–302. <https://doi.org/10.1111/j.1601-1848.2004.00076.x>
- Nieto-Posadas, A., Flores-Martínez, E., Lorea-Hernández, J. J., Rivera-Angulo, A. J., Pérez-Ortega, J., Vargas, J., & Peña-Ortega, F. (2014). Change in network connectivity during fictive-gasping generation in hypoxia: Prevention by a metabolic intermediate. *Frontiers in Physiology*, 5, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00265>
- Nishiyori, A., Minami, M., Ohtani, Y., Takami, S., Yamamoto, J., Kawaguchi, N., Kume, T., Akaike, A., & Satoh, M. (1998). Localization of fractalkine and CX3CR1 mRNAs in rat brain: Does fractalkine play a role in signaling from neuron to microglia? *FEBS Letters*, 429(2), 167–172. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)00583-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)00583-3)
- Pagani, F., Paolicelli, R. C., Murana, E., Cortese, B., Di Angelantonio, S., Zurolo, E., Guiducci, E., Ferreira, T. A., Garofalo, S., Catalano, M., D'Alessandro, G., Porzia, A., Peruzzi, G., Mainiero, F., Limatola, C., Gross, C. T., & Ragozzino, D. (2015). Defective microglial development in the hippocampus of Cx3cr1 deficient mice. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9, 111. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00111>
- Paolicelli, R. C., Bisht, K., & Tremblay, M. (2014). Fractalkine regulation of microglial physiology and consequences on the brain and behavior. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00129>
- Paolicelli, R. C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., Giustetto, M., Ferreira, T. A., Guiducci, E., Dumas, L., Ragozzino, D., & Gross, C. T. (2011). Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science (New York, N.Y.)*, 333(6048), 1456–1458. <https://doi.org/10.1126/science.1202529>
- Park, K. A., Ribic, A., Gaupp, F. M. L., Coman, D., Huang, Y., Dulla, C. G., Hyder, F., & Biederer, T. (2016). Excitatory synaptic drive and

- feedforward inhibition in the hippocampal CA3 circuit are regulated by SynCAM 1. *Journal of Neuroscience*, 36(28), 7464–7475. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0189-16.2016>
- Peña, F., & Alavez-Pérez, N. (2006). Epileptiform activity induced by pharmacologic reduction of M-current in the developing hippocampus in vitro. *Epilepsia*, 47(1), 47–54. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2006.00369.x>
- Peña-Ortega, F., Ordaz, B., Balleza-Tapia, H., Bernal-Pedraza, R., Márquez-Ramos, A., Carmona-Aparicio, L., & Giordano, M. (2010). Beta-amyloid protein (25–35) disrupts hippocampal network activity: Role of Fyn-kinase. *Hippocampus*, 20(1), 78–96. <https://doi.org/10.1002/hipo.20592>
- Pocock, J. M., & Kettenmann, H. (2007). Neurotransmitter receptors on microglia. *Trends in Neurosciences*, 30(10), 527–535. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.07.007>
- Pouzet, B., Zhang, W.-N., Feldon, J., & Rawlins, J. N. P. (2002). Hippocampal lesioned rats are able to learn a spatial position using non-spatial strategies. *Behavioural Brain Research*, 133(2), 279–291. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(02\)00007-4](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(02)00007-4)
- Prut, L., & Belzung, C. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: A review. *European Journal of Pharmacology*, 463(1), 3–33. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(03\)01272-X](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(03)01272-X)
- Püntener, U., Booth, S. G., Perry, V. H., & Teeling, J. L. (2012). Long-term impact of systemic bacterial infection on the cerebral vasculature and microglia. *Journal of Neuroinflammation*, 9(1), 146. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-146>
- Quiñero, R., Sakowitz, O. W., Basar, E., & Schürmann, M. (2001). Wavelet transform in the analysis of the frequency composition of evoked potentials. *Brain Research Protocols*, 8(1), 16–24. [https://doi.org/10.1016/S1385-299X\(01\)00077-0](https://doi.org/10.1016/S1385-299X(01)00077-0)
- Rabinovitch, M. S., & Rosvold, H. E. (1951). A closed-field intelligence test for rats. *Canadian Journal of Psychology*, 5(3), 122–128.
- Ramirez-Amaya, V., Balderas, I., Sandoval, J., Escobar, M. L., & Bermudez-Rattoni, F. (2001). Spatial long-term memory is related to mossy fiber synaptogenesis. *Journal of Neuroscience*, 21(18), 7340–7348.
- Redish, A. D. (1999). *Beyond the cognitive map: From place cells to episodic memory*. (p. 420, 420). The MIT Press.
- Regier, P. S., Amemiya, S., & Redish, A. D. (2015). Hippocampus and subregions of the dorsal striatum respond differently to a behavioral strategy change on a spatial navigation task. *Journal of Neurophysiology*, 114(3), 1399–1416. <https://doi.org/10.1152/jn.00189.2015>
- Rogers, J. L., & Kesner, R. P. (2003). Cholinergic modulation of the hippocampus during encoding and retrieval. *Neurobiology of Learning and Memory*, 80(3), 332–342. [https://doi.org/10.1016/S1074-7427\(03\)00063-7](https://doi.org/10.1016/S1074-7427(03)00063-7)
- Rogers, J. T., Morganti, J. M., Bachstetter, A. D., Hudson, C. E., Peters, M. M., Grimmig, B. A., Weeber, E. J., Bickford, P. C., & Gemma, C. (2011). CX3CR1 deficiency leads to impairment of hippocampal cognitive function and synaptic plasticity. *Journal of Neuroscience*, 31(45), 16241–16250. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3667-11.2011>
- Rostami, V., Ito, J., Denker, M., & Grün, S. (2017). [Re] Spike synchronization and rate modulation differentially involved in motor cortical function. *Zenodo*, 3, 1–7. <https://doi.org/10.5281/ZENODO.583814>
- Salgado-Puga, K., Prado-Alcalá, R. A., & Peña-Ortega, F. (2015). Amyloid  $\beta$  enhances typical rodent behavior while it impairs contextual memory consolidation. *Behavioural Neurology*, 2015, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2015/526912>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Seese, R. R., Wang, K., Yao, Y. Q., Lynch, G., & Gall, C. M. (2014). Spaced training rescues memory and ERK1/2 signaling in fragile X syndrome model mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(47), 16907–16912. <https://doi.org/10.1073/pnas.1413335111>
- Sellner, S., Paricio-Montesinos, R., Spieß, A., Masuch, A., Erny, D., Harsan, L. A., Elverfeldt, D. V., Schwabenland, M., Biber, K., Staszewski, O., Lira, S., Jung, S., Prinz, M., & Blank, T. (2016). Microglial CX3CR1 promotes adult neurogenesis by inhibiting Sirt 1/p65 signaling independent of CX3CL1. *Acta Neuropathologica Communications*, 4(1), 102. <https://doi.org/10.1186/s40478-016-0374-8>
- Sheridan, G. K., & Murphy, K. J. (2013). Neuron-glia crosstalk in health and disease: Fractalkine and CX3CR1 take Centre stage. *Open Biology*, 3, 130181. <https://doi.org/10.1098/rsob.130181>
- Sierra, A., Tremblay, M.-Å., & Wake, H. (2014). Never-resting microglia: Physiological roles in the healthy brain and pathological implications. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8, 240. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00240>
- Song, D., Yang, Q., Lang, Y., Wen, Z., Xie, Z., Zheng, D., Yan, T., Deng, Y., Nakanishi, H., Quan, Z., & Qing, H. (2018). Manipulation of hippocampal CA3 firing via luminopsins modulates spatial and episodic short-term memory, especially working memory, but not long-term memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 155, 435–445. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2018.09.009>
- Stella, A., Quaglio, P., Torre, E., & Grün, S. (2019). 3d-SPADE: Significance evaluation of spatio-temporal patterns of various temporal extents. *Biosystems*, 185, 104022. <https://doi.org/10.1016/j.biosystems.2019.104022>
- Sunnen, C. N., Brewster, A. L., Lugo, J. N., Vanegas, F., Turcios, E., Mukhi, S., Parghi, D., D'Arcangelo, G., & Anderson, A. E. (2011). Inhibition of the mammalian target of rapamycin blocks epilepsy progression in NS-Pten conditional knockout mice. *Epilepsia*, 52(11), 2065–2075. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2011.03280.x>
- Szepesi, Z., Manouchehrian, O., Bachiller, S., & Deierborg, T. (2018). Bidirectional microglia–neuron communication in health and disease. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12, 1–26. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00323>
- Traissard, N., Herbeaux, K., Cosquer, B., Jeltsch, H., Ferry, B., Galani, R., Pernon, A., Majchrzak, M., & Cassel, J.-C. (2007). Combined damage to entorhinal cortex and cholinergic basal forebrain neurons, two early neurodegenerative features accompanying Alzheimer's disease: Effects on locomotor activity and memory functions in rats. *Neuropsychopharmacology*, 32(4), 851–871. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301116>
- Ueno, M., Fujita, Y., Tanaka, T., Nakamura, Y., Kikuta, J., Ishii, M., & Yamashita, T. (2013). Layer v cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development. *Nature Neuroscience*, 16(5), 543–551. <https://doi.org/10.1038/nn.3358>
- Utz, S. G., See, P., Mildenerger, W., Thion, M. S., Silvín, A., Lutz, M., Ingelfinger, F., Rayan, N. A., Lelios, I., Buttgerit, A., Asano, K., Prabhakar, S., Garel, S., Becher, B., Ginhoux, F., & Greter, M. (2020). Early fate defines microglia and non-parenchymal brain macrophage development. *Cell*, 181(3), 557–573. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.03.021>
- Valle-Dorado, M. G., Santana-Gómez, C. E., Orozco-Suárez, S. A., & Rocha, L. (2015). The mast cell stabilizer sodium cromoglycate reduces histamine release and status epilepticus-induced neuronal damage in the rat hippocampus. *Neuropharmacology*, 92, 49–55. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.12.032>
- Viana da Silva, S., Zhang, P., Haberl, M. G., Labrousse, V., Grosjean, N., Blanchet, C., Frick, A., & Mülle, C. (2019). Hippocampal mossy fibers synapses in CA3 pyramidal cells are altered at an early stage in a mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*, 39(21), 4193–4205. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2868-18.2019>
- Vichaya, E. G., Vermeer, D. W., Christian, D. L., Molkentine, J. M., Mason, K. A., Lee, J. H., & Dantzer, R. (2017). Neuroimmune mechanisms of behavioral alterations in a syngeneic murine model of human



- papilloma virus-related head and neck cancer. *Psychoneuroendocrinology*, 79, 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2017.02.006>
- Walf, A. A., & Frye, C. A. (2007). The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature Protocols*, 2(2), 322–328. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.44>
- Wang, Y.-L., Han, Q.-Q., Gong, W.-Q., Pan, D.-H., Wang, L.-Z., Hu, W., Yang, M., Li, B., Yu, J., & Liu, Q. (2018). Microglial activation mediates chronic mild stress-induced depressive- and anxiety-like behavior in adult rats. *Journal of Neuroinflammation*, 15(1), 21. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1054-3>
- Winkler, Z., Kuti, D., Ferenczi, S., Gulyás, K., Polyák, Á., & Kovács, K. J. (2017). Impaired microglia fractalkine signaling affects stress reaction and coping style in mice. *Behavioural Brain Research*, 334, 119–128. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.07.023>
- Xin, J., Wang, C., Cheng, X., Xie, C., Zhang, Q., Ke, Y., Huang, X., Chen, X., & Pan, X. (2022). CX3C-chemokine receptor 1 modulates cognitive dysfunction induced by sleep deprivation. *Chinese Medical Journal*, 135(2), 205–215. <https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000001769>
- Yang, M., Silverman, J. L., & Crawley, J. N. (2011). Automated three-chambered social approach task for mice. *Current Protocols in Neuroscience*, 56(1), 8–26. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0826s56>
- Yeo, S.-I., Kim, J.-E., Ryu, H. J., Seo, C. H., Lee, B. C., Choi, I.-G., Kim, D.-S., & Kang, T.-C. (2011). The roles of fractalkine/CX3CR1 system in neuronal death following pilocarpine-induced status epilepticus. *Journal of Neuroimmunology*, 234(1), 93–102. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2011.03.005>
- Yona, S., Kim, K.-W., Wolf, Y., Mildner, A., Varol, D., Breker, M., Strauss-Ayalí, D., Viukov, S., Guillems, M., Misharin, A., Hume, D. A., Perlman, H., Malissen, B., Zelzer, E., & Jung, S. (2013). Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity*, 38(1), 79–91. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.12.001>
- Young, K., & Morrison, H. (2018). Quantifying microglia morphology from photomicrographs of immunohistochemistry prepared tissue using ImageJ. *Journal of Visualized Experiments*, 136, e57648. <https://doi.org/10.3791/57648>
- Zavala-Tecuapetla, C., Tapia, D., Rivera-Angulo, A. J., Galarraga, E., & Peña-Ortega, F. (2014). Chapter 3—Morphological characterization of respiratory neurons in the pre-Bötzing complex. In G. Holstege, C. M. Beers, & H. H. Subramanian (Eds.), *Progress in brain research* (Vol. 209, pp. 39–56). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63274-6.00003-5>
- Zhan, Y., Paolicelli, R. C., Sforzini, F., Weinhard, L., Bolasco, G., Pagani, F., Vyssotski, A. L., Bifone, A., Gozzi, A., Ragozzino, D., & Gross, C. T. (2014). Deficient neuron-microglia signaling results in impaired functional brain connectivity and social behavior. *Nature Neuroscience*, 17(3), 400–406. <https://doi.org/10.1038/nn.3641>
- Zhao, X.-F., Alam, M. M., Liao, Y., Huang, T., Mathur, R., Zhu, X., & Huang, Y. (2019). Targeting microglia using Cx3cr1-Cre lines: Revisiting the specificity. *ENeuro*, 6(4), ENEURO.0114-19.2019. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0114-19.2019>
- Zucca, S., Griguoli, M., Malézieux, M., Grosjean, N., Carta, M., & Mulle, C. (2017). Control of spike transfer at hippocampal mossy fiber synapses in vivo by GABAA and GABAB receptor-mediated inhibition. *The Journal of Neuroscience*, 37(3), 587–598. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2057-16.2016>

## SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found in the online version of the article at the publisher's website.

**How to cite this article:** Méndez-Salcido, F. A., Torres-Flores, M. I., Ordaz, B., & Peña-Ortega, F. (2022). Abnormal innate and learned behavior induced by neuron–microglia miscommunication is related to CA3 reconfiguration. *Glia*, 1–22. <https://doi.org/10.1002/glia.24185>