



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**UNAM**

**INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

**La integración de las nuevas células granulares en el establecimiento de la  
memoria espacial**

**TESIS**

Que para obtener el grado de Doctora en Ciencias Biomédicas

PRESENTA

Claudia Jimena Sandoval Arroyo

Director de Tesis: Dr. Víctor Ramírez-Amaya

Comité tutorial Dr. Federico Bermúdez-Rattoni, Dr. Roberto Prado Alcalá



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.

## **AGRADECIMIENTOS**

Mi comité académico,

Dr Víctor Ramírez-Amaya

Dr. Roberto Agustín Prado Alcalá

Dr. Federico Bermúdez Rattoni

A la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM  
Becario N°: 98554971

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología  
Becario N°: 196659

Al PAPIIT, por auspiciar el proyecto: IN216510-22

Al personal del departamento de análisis de imágenes digitales  
Ing. Elsa Nydia Hernández Ríos

Al personal de la Biblioteca  
M.V.Z. Román Pacheco Barrita  
Lic. Ángel Salazar Muro  
Dr. Francisco Javier Valles Valenzuela

El personal de Bioterio  
M.V.Z. Martín García Servín

Al personal de enseñanza  
Dra. Aurea Orozco  
M. en C. Leonor Casanova Rico

# Índice

**Resumen** ..... 1

**Abstract** ..... 2

## **Capítulo 1**

Historia del descubrimiento de la generación de nuevas neuronas en el sistema nervioso de mamífero adulto ..... 3

## **Capítulo 2**

Origen de las neuronas nuevas en el sistema nervioso del animal adulto ..... 9

## **Capítulo 3**

Integración anatómica y fisiológica de las neuronas que nacen en el animal adulto..... 16

## **Capítulo 4**

La neurogénesis en el hipocampo, ¿por qué es tan relevante? ..... 28

4.1 Neuroanatomía y características funcionales del Hipocampo ..... 30

4.2 Modelos de procesamiento en el Hipocampo..... 35

4.3 Neurogénesis en el giro dentado y su papel en la memoria..... 38

## **Capítulo 5**

Integración funcional de las nuevas neuronas que nacen en el animal adulto a redes neuronales que procesan información proveniente de la experiencia..... 42

## **Capítulo 6**

Planteamiento del problema ..... 49

Hipótesis ..... 49

Objetivo ..... 49

Métodos ..... 50

Resultados ..... 54

Discusión .....	60
Referencias.....	68
Índice Figuras.....	83
Índice Tablas.....	84
Publicación derivada del proyecto.....	85

## Resumen

En el sistema nervioso de mamíferos la generación de neuronas continúa aun después de la maduración sexual del individuo. Esto ocurre como producto de la división de células precursoras que se diferencian en neuronas. El bulbo olfatorio y el giro dentado del hipocampo son las regiones del SNC en donde continuamente se añaden neuronas nuevas en el animal adulto. La integración de neuronas nuevas en el giro dentado del hipocampo del animal adulto nos interesa particularmente, pues puede tener implicaciones en el procesamiento de información que permite la formación de memorias episódicas.

Las neuronas granulares que nacen en el animal adulto extienden sus proyecciones dendríticas y desarrollan una respuesta sináptica como el resto de las neuronas granulares. Esto sugiere que se integran funcionalmente a la red hipocampal. Sin embargo, para determinar si su integración esta implicada en el procesamiento de información proveniente de la experiencia, es necesario utilizar métodos histológicos que permitan identificar a las neuronas que se activan por la experiencia. La detección de genes de expresión inmediata temprana (GEI) como cFos y Arc, los cuales se inducen por actividad neuronal, ha permitido identificar a las neuronas nuevas que responden a la experiencia mediante el uso de triple inmunohistoquímica fluorescente y microscopia confocal. De esta manera, se ha observado que las neuronas que nacen en el adulto son capaces de responder específicamente a la conducta cuando tienen entre 1.5 y 5 meses de haber nacido.

En el presente trabajo nos propusimos determinar cuándo, a lo largo del desarrollo de la neurona que se integra en el adulto, aparece esta respuesta específica a la conducta. Encontramos así, que 30 días después de haber nacido, aparece en las neuronas incorporadas la respuesta específica a la conducta. También encontramos que las neuronas nuevas que responden a la conducta se ubican principalmente en la capa 1 de la banda de células granulares y vemos que la probabilidad con la que se reclutan las neuronas nuevas ante el procesamiento de información espacial, varia a lo largo de su vida. Esto nos permitió generar un modelo matemático que sugiere que la contribución de estas neuronas nuevas al procesamiento de información espacial es muy relevante, dado que son más las nuevas células que participan en la representación de un episodio. Experimentos adicionales demostraron además, que la velocidad con la que se integran las neuronas nuevas al GD puede ser acelerada mediante la estimulación conductual. En conclusión, en este trabajo describimos detalles importantes de la integración funcional de las neuronas nuevas a la red hipocampal que procesa información espacial y proponemos que su papel en el procesamiento de información espacial es altamente relevante.

## Abstract

In the mammalian central nervous system, neuron generation continues even after sexual maturation of the individual. This occurs as a result of the division of precursor cells that differentiate into neurons and migrate, in 2 cerebral nervous system structures, the olfactory bulb (OB) and the dentate gyrus (DG) of the hippocampus. The neurogenesis that takes place in the hippocampus of adult animals is particularly interesting because it has implications for the processing of episodic memory information.

These granule neurons born in the adult animal extend their projections and develop synaptic responses as the rest of the granule neurons. This suggests that they can be functionally integrated into hippocampal networks. However, to conclusively determine their functionality, these neurons should process input information from experience. To answer this fundamental question we used a new technology based on the detection of neural activity by visualizing the expression of immediate early genes (IEG) that are induced by behavioral related neuronal activity. By detecting the IEG Arc, in response to spatial behavioral stimulation it has been observed that neurons born in adult rats process spatial information, since they specifically respond to behavioral exploration when the adult neurons are 5 months old.

The aim of the present work was to determine when, after the new neuron was born, this specific response to behavior develops. We found that 30 days after the neuron was born, this specific response to behavior is already observed. We also found that the new neurons that respond to behavior are primarily located in DG layer 1. The likelihood of the new neurons to be recruited by spatial behavioral experience varies throughout its own life. This allowed us to generate a mathematical model that suggests that the contribution of these new neurons to spatial information processing is very important, and this contribution varies through the animal's life span.

Additional experiments showed that the speed of integration, of these new neurons, is accelerated by behavioral stimulation. In conclusion, adult born neurons are important elements of the episodic hippocampal network that processes spatial information and their contribution varies through-out the animal's life and is modulated by the animal's experience.

## Capítulo 1

### Historia del descubrimiento de la generación de nuevas neuronas en el sistema nervioso del animal adulto

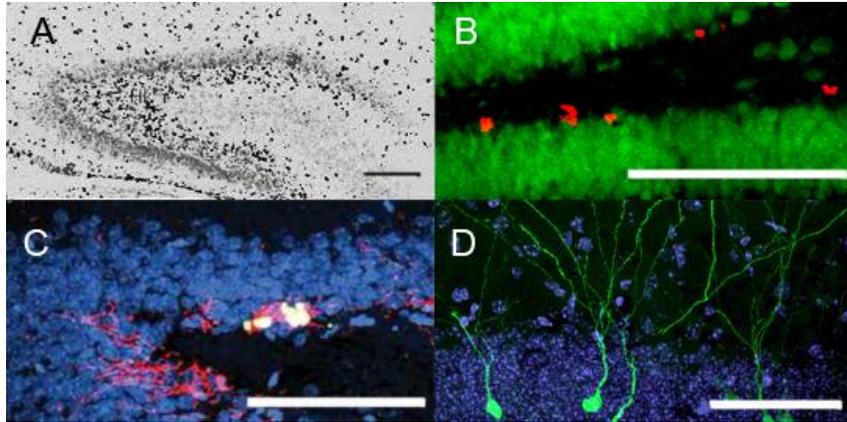
Durante muchos años se consideró que en el cerebro del animal adulto no ocurría la generación de neuronas nuevas, debido principalmente a que en 1914, Ramón y Cajal declaró que:

*“Las células nerviosas – a diferencia de todas las demás células de nuestro cuerpo – no se dividen, no se mueren, no re-nacen”*. (Ramón y Cajal 1914).

Cajal fue sin embargo, el primero en sugerir que podía ocurrir plasticidad en las comunicación de las neuronas del Sistema Nervioso Central (SNC) como producto de un daño o lesión, mientras que el pensamiento de la época aceptaba esto sólo en el Sistema Nervioso Periférico (SNP). Esto lo planteó en base a sus propios experimentos, que mostraban que tras una lesión en la corteza entorrinal se podía observar un incremento en la cantidad de proyecciones que arriban al hipocampo (Stahnisch y Nitsch, 2002). Esto sugería la posibilidad de regeneración en el SNC después de un trauma, lo que no era aceptado en la época. No obstante, Cajal claramente estaba a favor de la idea de que las modificaciones en los cuerpos de las neuronas sólo ocurrían durante el desarrollo del sistema nervioso central; que al concluir dejaba una red imperturbable por la experiencia, que sólo se modificaba ante el insulto. Esto incluía la idea de la inhabilidad proliferativa de las neuronas (Stahnisch y Nitsch, 2002). Pero hace aproximadamente 40 años se encontró evidencia de que en el sistema nervioso central (SNC) adulto de mamíferos se generan neuronas nuevas (Altman y Das, 1965; Kaplan, 1977; Nottebohm, 1984).

Esto se demostró con el uso de nucleótidos radioactivos como la [<sup>3</sup>H] timidina tritiada, que eran administrados sistémicamente a ratas y ratones, visualizados con autoradiografía y en cuyo tejido cerebral se observaba su incorporación en algunas pocas células con características neuroanatómicas de neuronas. Estas se encontraban en el giro dentado del hipocampo de la rata adulta (Altman y Das, 1965; Kaplan, 1977) y también en la región donde se controla el canto

(Hiper estriado ventral) en aves (Nottebohm, 1984). Este hallazgo sugería que células con características neuroanatómicas de neuronas habían pasado por un periodo de división cuando la [<sup>3</sup>H] timidina estaba disponible.



**Figura 1.** Diferentes técnicas utilizadas para visualizar neuronas granulares del GD del hipocampo que pasaron por un periodo de división en roedores adultos.

**A)** Autoradiografía con [<sup>3</sup>H] timidina tritiada sobrepuesta a la imagen correspondiente a una tinción de Nissl. Los puntos negros son células radioactivas, que pasaron por un período de división. Algunas de estas pueden ser neuronas. La línea corresponde a 20µm

**B)** Inmunohistoquímica para NeuN (Proteína nuclear que se expresa sólo en neuronas maduras, en verde) y BrdU (que se incorpora al DNA como un análogo de timidina y puede ser detectado inmunohistoquímicamente en las células que se dividieron, en rojo). La línea corresponde a 100µm

**C)** Inmunohistoquímica para DCX (Proteína que se expresa sólo en neuronas inmaduras y parece estar relacionado con migración en rojo) y BrdU (células que se dividieron en verde) DAPI núcleos (azul). La línea corresponde a 100µm

**D)** Retrovirus acoplado a GFP que se incorpora únicamente en células en división (verde). La línea corresponde a 100µm

En 1965, Altman y Das fueron los primeros en observar que algunas células en el giro dentado (GD) del hipocampo incorporaban la [<sup>3</sup>H] timidina tritiada, y al caracterizarlas morfológicamente sugirieron que eran neuronas. También reportaron que las nuevas células podían sobrevivir al menos hasta 2 meses. A pesar de esta evidencia, la noción de que había neurogénesis en el mamífero adulto no fue fácilmente aceptada. La amplia variedad de formas que puede presentar la glía generó mucha controversia sobre la naturaleza neuronal de las células que incorporaban la [<sup>3</sup>H] timidina. Es importante aclarar que al intentar explicar la generación de neuronas nuevas en el adulto, Altman propuso la existencia de células progenitoras neuronales como las células responsables de dar origen a las neuronas nuevas, lo que contrasta con la idea de que las neuronas al dividirse den origen a una nueva progenie con el mismo destino de diferenciación.

La idea de que es una célula precursora la que da origen a las neuronas nuevas en el animal adulto no contradice el postulado de Cajal, respecto a la incapacidad proliferativa de las células nerviosas, pero aun así, la comunidad científica siguió creyendo en el dogma de que “*en el cerebro adulto NO se generan neuronas nuevas*”.

Posteriormente Kaplan (1977), combinando técnicas de auto radiografía y microscopía electrónica, confirmó que la incorporación de [<sup>3</sup>H] timidina se podía observar en células del hipocampo, la corteza visual y el bulbo olfatorio (BO) que presentaban características ultra estructurales de neuronas. En 1984, Kaplan describió neuroblastos proliferativos en la zona subgranular (ZSG) del hipocampo y encontró que a las pocas horas de haber administrado el marcador radioactivo, algunas de las células marcadas ya mostraban sinápsis somáticas y procesos neuríticos, lo que sugería que las células que se habían dividido eran células precursoras de neuronas. Esto apoyo la idea de Altman de que células precursoras de neuronas daban origen a células nerviosas en el animal adulto. Kaplan también encontró neurogénesis en la corteza visual de ratas adultas en una proporción de células menos impactante que la observada en el hipocampo y en el BO (Figura 1 A).

Fernando Nottebohm, por su lado, con el uso de timidina tritiada estudio la neurogénesis en el cerebro adulto de aves, en particular de canarios. Fundamentalmente observó que la región, del cerebro de los canarios, involucrada en el control de la generación del canto, crecía, y demostró que este crecimiento se daba por la incorporación de neuronas nuevas (Nottebohm, 1981,1989; Small y Moore, 2009). Estos trabajos fueron motivados por la evidencia que mostraba la modificación en el tamaño de estructuras cerebrales involucradas en la adquisición de un nuevo canto durante etapas reproductivas (Nottebohm, 1981). Se encontró así que las células originadas en las paredes de los ventrículos migran hasta el área del canto y que ahí se diferencian y se integran como neuronas (Nottebohm, 1981, 1989, Álvarez-Buylla y Nottebohm 1988). Si bien estos trabajos confirmaron con certeza la posibilidad de observar neurogénesis en el cerebro adulto de aves, el hecho de que se tratara de animales no mamíferos, mantuvo al grupo de Nottebohm alejado de la opinión de Pasko Rakic, quien criticó de forma tajante la idea de que en el cerebro adulto de mamíferos se incorporaran neuronas nuevas. Rakic mostró extrema discrepancia con los datos de Kaplan y Altman dado que él no encontró evidencia de generación de ningún tipo de nuevas células en múltiples estructuras cerebrales de monos (*Macaca mulatta*) (Rakic., 1985). La postura de Rakic mantuvo vigentes las dudas de la comunidad acerca de la

fiabilidad de los datos obtenidos en roedores que sugerían neurogénesis en el sistema nervioso adulto de mamíferos.

La evidencia a favor de la hipótesis de que en el cerebro adulto de mamíferos había neurogénesis siguió acumulándose. Aparecieron entonces trabajos que con el uso de doble marcaje, con auto radiografía para [<sup>3</sup>H] timidina e inmuno histoquímica para NSE (enolasa específica de neuronas), demostraron que neuronas granulares del giro dentado del hipocampo se habían dividido previamente (Gould, et al., 1992; Cameron, et al., 1993). Si bien estos trabajos habían utilizado técnicas inmunohistoquímicas para hacer evidente el destino neuronal de las células que proliferaban, no se había detectado conjuntamente a las células que proliferaban.

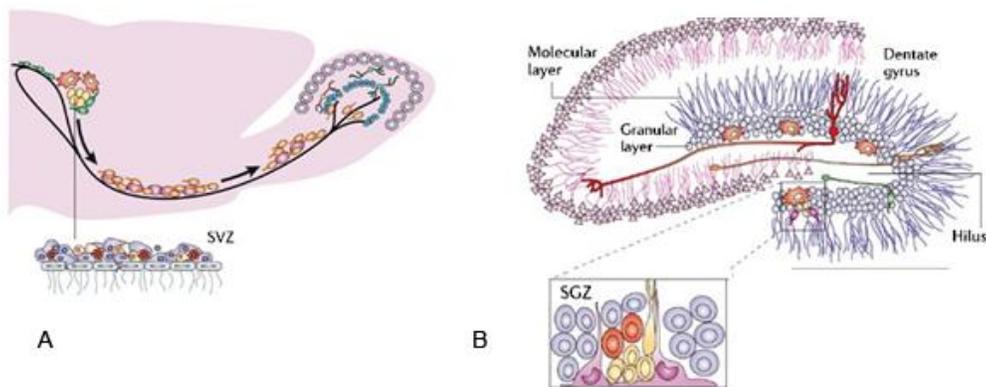
Desde mediados del siglo XX se conocía que una molécula llamada 5- Bromo-2'-deoxyuridina (BrdU) se incorporaba a la cadena de DNA de bacterias en lugar de la timidina (Dunn y Smith, 1954) y se encontró que también se incorporaba al DNA de líneas celulares de mamíferos (Eidinoff et al., 1959).

La necesidad que se tenía de detectar y medir la fase de síntesis (S) del ciclo celular motivó que se desarrollaran anticuerpos para detectar al BrdU (Erlanger y Beiser, 1964; Gratzner et al., 1975). Esta técnica inmunohistoquímica se utilizó para el estudio del cáncer (Morstyn, et al., 1983; Raza, et al., 1985, Hoshino, et al., 1985; deFazio, et al., 1987), la proliferación de células inmunes (Porstmann et al., 1985; Harms, 1987), para estudios de desarrollo (Raza, et al., 1984; Casasco, et al., 1988) y particularmente de desarrollo del sistema nervioso (Miller y Nowakoski, 1988). La primera vez que este método inmunohistoquímico se utilizó para detectar células que se dividen se aplicó al estudio de la neurogénesis en el adulto, para demostrar la generación de neuronas nuevas en el bulbo olfatorio de ratas (Coroto et al., 1993).

Actualmente se combina la detección de BrdU con marcadores fluorescentes para identificar las células que han pasado por un periodo de proliferación en combinación con la expresión la proteína verde fluorescente (GFP por sus siglas en inglés) con un promotor de citomegalovirus y sólo se incorpora a las células que se encuentran en proliferación. Cuando se identifica la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) en una célula, se hace evidente que ésta debió de haberse dividido en el periodo de disponibilidad del vector, y que al visualizarse con microscopia confocal se observa en toda su estructura citoplásmica (Palmer et

al., 1999, van Praag et al., 2001, Esposito et al., 2005). Esta estrategia es sofisticada y muy atractiva visualmente ya que se pueden ver las proyecciones y detalles muy finos de éstas en las células infectadas, pero la tasa de infección no permite detectar a todas las células que se han dividido y dado que se tiene que administrar intraparenquimamente, sólo se infectan las células cercanas a la región por donde penetró el dispositivo para su inyección. Por lo que no se suele usar para responder preguntas que impliquen una cuantificación precisa de las neuronas que nacieron en el animal adulto (van Praag et al., 2002). Sin embargo, este método ha sido de gran utilidad para caracterizar la integración funcional de las neuronas que nacen en el adulto como veremos más adelante (Figura 1 D).

Hoy en día no existe duda de que en el sistema nervioso de los mamíferos adultos sigue ocurriendo la generación de neuronas nuevas. Esto sabemos que ocurre principalmente en el bulbo olfatorio (BO) (Altman, 1969; Kaplan y Hinds, 1977; Bayer, 1983; Kirschenbaum et al., 1999) y en el hipocampo (Altman y Das, 1966; Kaplan y Hinds 1977; Rakic y Nowakowski, 1981, Gould et al, 1997). Se reconocen dos zonas neurogénicas, la zona sub ventricular (ZSV) que da origen a células que se diferencian en neuronas y migran al bulbo olfatorio, y la segunda, la zona sub granular del giro (ZSG) dentado en el hipocampo (Figura 2).



**Figura 2.** Regiones neurogénicas A). Sección sagital del cerebro de rata, en donde se observa la ZSV región donde ocurre la proliferación de células con destino de diferenciación neuronal. También se muestra la ruta por donde migran las células desde la ZSV hasta el bulbo olfatorio, lo que se conoce como vía migratoria rostral. B). Dibujo del hipocampo en donde se representan las células piramidales (en morado) de CA1 y CA3 y las células granulares en el GD (en azul). En ambas imágenes se representan diferentes tipos neuronales: En rojo están los astrocitos que al des diferenciarse generan células precursoras (en amarillo) las cuales proliferan y dan origen a las neuronas.

La neurogénesis que ocurre en los mamíferos adultos, es hoy día un tema de suma importancia para las neurociencias. Sabemos, por ejemplo, que una disminución en la tasa de neurogénesis en el individuo adulto está relacionada con la depresión. Se ha descubierto que la tasa de neurogénesis está reducida en pacientes con esta patología y que los antidepresivos incrementan la neurogénesis en un tiempo que coincide con los efectos de estos fármacos sobre los síntomas depresivos (Santarelli et al., 2003). También se sabe que la neurogénesis se reduce tanto con el estrés crónico como con el agudo, en donde sus efectos se correlacionan con defectos cognitivos (Gould et al., 1997).

Vemos así, que las implicaciones que tiene la neurogénesis en los mamíferos adultos, es muy relevante para una gran variedad de problemas relacionados con la función del sistema y lo que actualmente nos preguntamos es cuál es el papel que juegan estas neuronas nuevas en la función del sistema nervioso central. El reconocimiento de la neurogénesis en el SNC de mamíferos adultos representa un avance excepcional para la noción de que en el sistema nervioso adulto no ocurren modificaciones adaptativas en la estructura de la red neuronal, como lo pensaba Cajal.

A continuación describiremos la caracterización del origen de las neuronas que se incorporan en el cerebro adulto de mamíferos que reivindica la idea de que las neuronas no se dividen.

## Capítulo 2

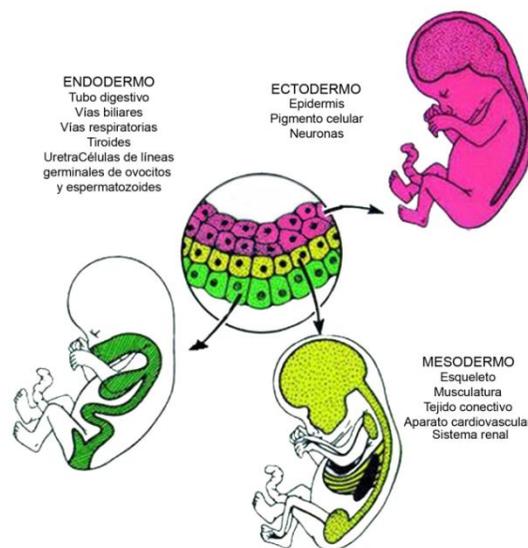
### Origen de las neuronas nuevas que en el sistema nervioso del animal adulto

Durante el desarrollo embrionario células pluripotentes también conocidas como células madre (CM), tienen la capacidad de diferenciarse en todos los tipos celulares que aparecen en el organismo adulto, dando lugar a todos los tejidos y órganos. Durante esta etapa temprana del desarrollo se forma la blástula como consecuencia de la segmentación del cigoto, formando una masa esférica de células que se sigue dividiendo para formar la mórula y más tarde la gástrula. Esta serie de divisiones celulares es la secuencia de desarrollo normal de cualquier animal. Durante la gastrulación se comienzan a generar tejidos primarios, la gástrula se organiza en una capa germinal que se divide en tres subcapas formando ectodermo, mesodermo y endodermo, cuyo destino germinal es el siguiente: (Figura 3)

**Ectodermo:** es la capa más externa que da origen al SNC; da origen a vías respiratorias, epidermis con anexos, y glándulas mamarias.

**Mesodermo:** es la capa media da origen al esqueleto, músculos aparatos circulatorio y reproductor.

**Endodermo:** capa más interna da origen al tubo digestivo, intestinos, páncreas, pulmones, e hígado.



**Figura 3.** Esquema representativo de las capas germinales en el que se muestran los tipos de tejidos que derivan de cada una de las subcapas. En el círculo se representan los diferentes tejidos, en morado se representan las celulares del ectodermo, este dará origen al sistema nervioso y a la epidermis. En verde se representan las células del endodermo que dará origen al epitelio que reviste el tubo digestivo. En amarillo se representan las células del mesodermo que dará origen, al esqueleto, musculatura lisa, el tejido conectivo, el aparato cardiovascular y renal y a los órganos del abdomen.

Una porción del ectodermo dorsal se convertirá en el tubo neural, el cual se expande debido a la proliferación celular (Gilbert, 2006). Las células madre de las paredes del tubo neural durante el desarrollo embrionario se dividen simétricamente (se generan 2 células idénticas) durante la expansión inicial, más adelante se dividen asimétricamente (una célula resulta en destino distinto y la otra queda con el destino original) para producir células progenitoras de neuronas que a su vez se dividen de forma simétrica, diferenciándose ambas en neuronas constituyendo una división neurogénica simétrica (Kosodo et al., 2004).

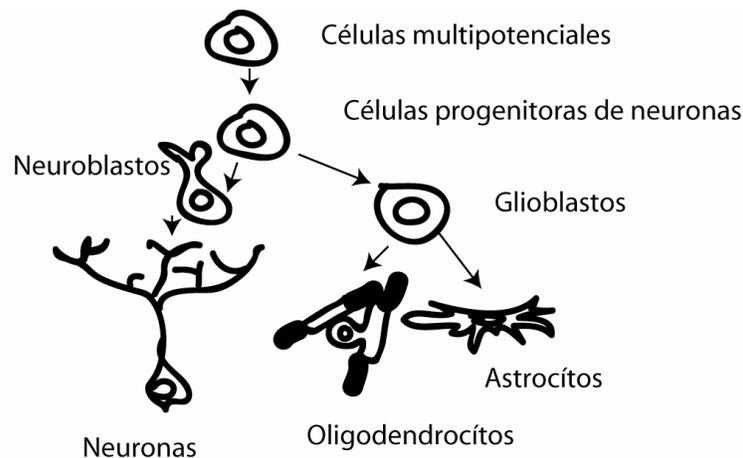
En consecuencia, estas neuronas no se volverán a dividir y dejan de ser consideradas como células madre. Este proceso de proliferación celular da origen a todo el sistema nervioso y las paredes del tubo neuronal se convertirán en la zona subventricular, que en el adulto sabemos mantiene la capacidad de división celular, cuyas células migran al bulbo olfatorio y en donde se diferencian en neuronas (Gilbert., 2006).

Existen 4 estados a través de los cuales las células pluripotenciales de la blástula se convierten en precursoras de neuronas o neuroblasto (Wilson y Edlund, 2001). Estos son: competencia, especificación, compromiso, y diferenciación. Los neuroblastos dejan el ciclo mitótico y expresan genes característicos de neuronas como doble cortina (DCX), marcadores nucleares de neuronas maduras (NeuN) y Nestina entre otros que son descritos más adelante.

Durante la adquisición de un determinado linaje o tipo celular intervienen interacciones con células colindantes, cuyos compromisos restringen la potencialidad de las restantes, como la localización física de la célula a lo largo de los ejes corporales que es determinada por gradientes de concentración de factores de crecimiento. La adquisición progresiva de un destino celular se considera cuando la célula alcanza un estado metabólico irreversible que la determina para convertirse en un linaje celular determinado. Una vez que han llegado a su destino extienden axones y dendritas, lo que permite la comunicación neuronal que más adelante dará origen a circuitos. Las células madre se pueden clasificar según su potencial de diferenciación: las células madre totipotenciales son capaces de producir tejido embrionario, las células madre pluripotenciales tienen la habilidad de diferenciarse a tejidos procedentes de cualquiera de las tres capas embrionarias, y por último, las células madre multipotenciales son capaces de

diferenciarse a distintos tipos celulares procedentes de la misma capa embrionaria (Weissman et al., 2001).

Hasta aquí se ha descrito lo que ocurre durante el desarrollo normal de un organismo. Es bien sabido que el sistema nervioso central en mamíferos tiene células con características multipotenciales, es decir que tienen la habilidad de generar múltiples tipos celulares, así como alta proliferación celular. Actualmente sabemos que las células que proliferan en el cerebro adulto de mamíferos dan lugar a neuronas nuevas y glía (Figura 4).

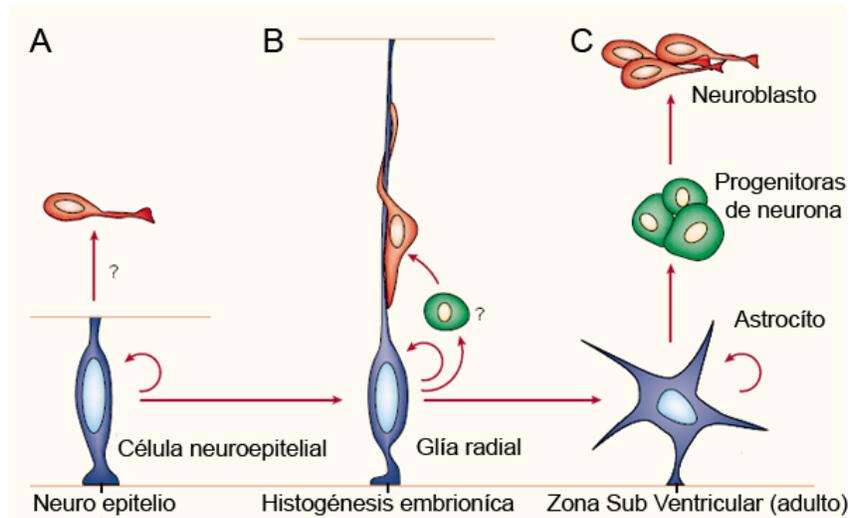


**Figura 4.** Jerarquía celular en la que se muestra el origen de diversas células del SNC, incluyendo a las neuronas, y la glía, ambas provenientes de células multipotenciales. Las células multipotentes tienen la capacidad de generar células del SN, desde glía, astrocitos, oligodendrocitos y diferentes tipos de neuronas (Tomado de Kempermann 2007)

Podemos concluir que en un principio todas las células tienen un mismo origen, y son totipotenciales pero al irse especializando pierden esa capacidad volviéndose multipotentes. (Figura 4).

Álvarez-Buylla y colaboradores generaron una hipótesis sobre el linaje celular de las células multi-potenciales. Se ha descrito que durante el desarrollo del cerebro, la glía radial produce astrocitos corticales y en datos recientes se ha observado que su división asimétrica produce neuronas corticales (Álvarez-Buylla et al., 2004). Estudios recientes han mostrado que las células neuro endodimales (CNE) producen o se transforman en glía radial (GR) que se puede dividir de forma asimétrica para producir glía o neuronas (Álvarez-Buylla et al., 2004). En

mamíferos la GR desaparece perinatalmente, se cree que se transforman en astrocitos. En la ZSV adulta de mamíferos se ha encontrado GR que persiste en la adultez y continúan produciendo neuronas. (Álvarez-Buylla et al., 1990, 2004). También existe la posibilidad de que las CNE, la GR y los astrocitos puedan dividirse simétricamente para incrementar sus poblaciones. Esto sugiere que existe un continuo linaje celular totipotencial que va desde el embrión hasta el adulto (Álvarez-Buylla et al., 2001) (Figura 5).

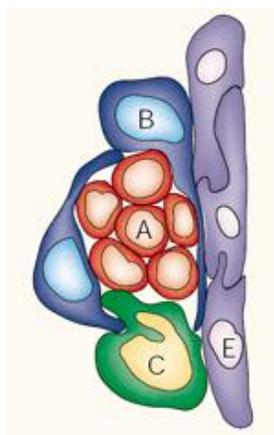


**Figura 5.** Hipótesis unificada sobre el linaje de células madre neurales. **A)** Células madre en morado en el neuro epitelio durante el desarrollo se extienden del ventrículo a la piamadre. **B)** Así como las células neuro epiteliales madre, la glía radial también (en morado) contactan regiones ventriculares y la superficie de la piamadre. Es posible que la glía radial actúe como célula madre neural y pueda ser una célula madre neural alargada. Se sabe que la glía radial se divide simétrica (no mostrado) o asimétrica (flechas) para producir neuronas (en rojo) que migran a la corteza a lo largo de las fibras de las células progenitoras. Es posible que la glía radial produzca de forma directa o indirecta células transitorias (en verde). **C)** La glía radial en etapas tardías se transforma en astrocitos corticales. Es posible que células derivadas de células gliales permanezcan en la ZSV (en azul). Así como la glía radial y las células neuro epiteliales algunos astrocitos de la ZSV hacen contacto con el ventrículo y extienden un tipo de cilio en el líquido cerebro espinal. Estos astrocitos se comportan como células madre, auto renovándose y produciendo neuronas nuevas (flechas), posiblemente a través de células intermedias (verde). (Tomado de Álvarez-Buylla et al 2001).

La transformación de la GR en astrocitos constituye un acontecimiento sorprendente en donde una célula diferenciada se convierte en otro tipo de célula con morfología y funciones diferentes. Esto corresponde a un periodo de transdiferenciación que se considera en general un fenómeno que ocurre durante el desarrollo (Landis, 1990; Patapoutian et al., 1995) y durante la regeneración en respuesta a una herida (Brockes, 1994) pero se ha sugerido que también puede ocurrir en el GD (Álvarez-Buylla et al., 2001).

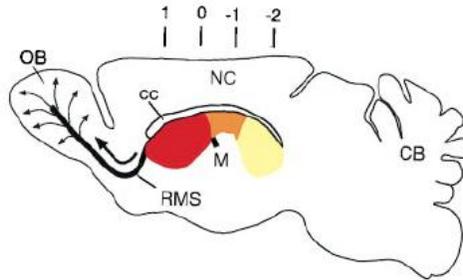
La proliferación en la ZSV continúa a lo largo de la vida y las células que de ella derivan migran hacia el BO en donde se diferencian en interneuronas (Goldman et al., 1997, Kuhn et al., 1996). A diferencia de la ZSG, la arquitectura celular de la ZSV ha sido bien descrita. Los

neuroblastos de la ZSV (células tipo A) migran en cadenas homotípicas por una red de vías interconectada, distribuida a lo largo de las paredes laterales de los ventrículos (Doetsch y Álvarez-Buylla, 1996) (Figura 6). Como se describió previamente, el cerebro de mamíferos tiene 2 regiones neurogénicas: las paredes de la ZSV, en donde las células que proliferan en esta región migran al bulbo olfatorio BO por medio de la vía migratoria rostral (ver Figura 2; Álvarez-Buylla, et al., 2001) y la ZSG del giro dentado, en donde proliferan células precursoras de neuronas que se integran a la banda de células granulares (ver Figura 2B) (Temple y Álvarez-Buylla, 1999). En la ZSV se encuentra una capa de células endoteliales que tiene contacto con el ventrículo (Álvarez-Buylla, et al., 2001). La interacción célula-célula entre la ZSV y la región endotelial es crucial para el mantenimiento de un microambiente local o nicho neurogénico. Se sugiere que las células tipo B pueden dividirse simétricamente para producir neuronas o asimétricamente, pudiéndose dividir múltiples ocasiones como lo hacen las células tipo C que aumentan el número de neuroblastos (Álvarez-Buylla, et al., 2001). Independientemente de la habilidad de actuar como progenitores primarios, las células tipo B, tanto en la ZSV como en la ZSG, tienen características de astrocitos dado que expresan la proteína ácida fibrilar glial (GFAP por sus siglas en inglés) y cuando son observadas con microscopio electrónico tienen características ultraestructurales de astrocitos. Las células tipo A se encuentran en contacto con células tipo B que se encuentran en un estado de proliferación lento y que tienen propiedades de astrocitos (Lois y Álvarez-Buylla, 1994). En esta misma cadena se encuentran células tipo C que son células inmaduras y de rápida división que se encuentran en un estado entre células tipo A y células tipo B (Figura 6).



**Figura 6.** Arquitectura de linajes putativos en la zona subventricular ZSV. La ZSV adulta consiste de cadenas organizadas de neuroblastos (células tipo A, en rojo), que se encuentran cubiertas por astrocitos de división lenta (células tipo B, en azul). También hay cadenas adyacentes descritas como en transición (células tipo C, en verde). Las células endoteliales (tipo E, en morado) están alineadas y algunas ocasiones son desplazadas por las tipo B que se dividen simétrica o asimétricamente para generar neuronas. (Tomado de Álvarez-Buylla et al., 2001)

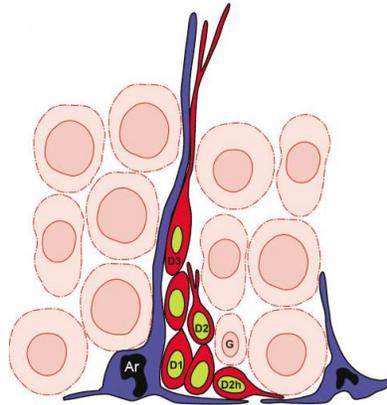
Muchas de estas células coinciden espacialmente en la región anterior y dorsal de la ZSV formando una vía llamada vía migratoria rostral (VMR). La VMR lleva al BO más de 30,000 neuroblastos por día en donde una fracción de estos se diferencian a neuronas granulares y perigranulares (Lois C et al., 1994) (Figura 7).



**Figura 7.** Esquema de un corte sagital de cerebro de ratona mostrando en diferentes colores las regiones de la pared del ventrículo lateral. La región anterior (rojo) se encuentra conectada con la región inferior (amarillo) a través del puente intermedio (naranja). Las flechas negras indican la migración de células precursoras de neuronas por la vía migratoria rostral (VMR) hacia el bulbo olfatorio en donde las células se organizan de forma radial para alcanzar las capas granular y glomerular. Los números indican las coordenadas estereotáxicas (anterior y posterior). Siglas en inglés: RMS, vía migratoria rostral; OB, bulbo olfatorio; M, foramen de Monro; NC, neocórtex; CB, Cerebelo; cc, cuerpo calloso.

La ZSG no tiene contacto con los ventrículos ni con el líquido cefalorraquídeo, se ubica en el hipocampo, en la franja interna que delimita a la lámina de las células granulares y el hilus (Figura 2). Las principales células progenitoras tienen características de astrocitos e interactúan directamente con su progenia. En la ZSG también se encuentran astrocitos con procesos radiales prominentes y extienden un proceso tangencial en la base de la ZSG. En algunos estudios se han referido a estos astrocitos como progenitores Tipo I que son las células progenitoras principales (Seri et al., 2004). Los progenitores hipocámpales Tipo I (astrocitos radiales) proyectan procesos radiales que sirven como guía para que las células granulares viajen a través de la capa de células granulares (CCG) del giro dentado (Álvarez-Buylla, et al., 1993), hasta establecerse en un lugar de la CCG y a partir de él extender sus dendritas hacia la capa molecular y los axones hacia las dendritas de las células piramidales de CA3. La progenie inmadura de los astrocitos radiales se conoce como células tipo D o progenitoras tipo 2 (Kempermann et al., 2004; Fukuda et al., 2003; Seri et al., 2003). Estas se encuentran en racimos y los procesos de los astrocitos radiales.

A diferencia de la progenia de la ZSV, los astrocitos de la ZSG no migran grandes distancias. Éstas células tipo D migran distancias muy cortas en las CCG para formar neuronas nuevas granulares (Seri et al., 2004) (Figura 8).



**Figura 8.** Modelo de la organización de las células en la ZSG en plano coronal astrocitos radiales en azul, con procesos tangenciales desde el hilus. En rojo se presentan a las células D con procesos incipientes que migran pequeñas distancia para alcanzar su posición final en la capa granular. (Modificado de Álvarez-Buylla, et al., 1993)

Lo que hasta ahora hemos visto es que las neuronas que se integran de novo en el cerebro adulto de mamíferos no se originan de neuronas que se dividieron, sino de células precursoras que dan lugar a células con destino de diferenciación neuronal. Esto reivindica el postulado original de Ramón y Cajal, en donde afirma que las neuronas no se dividen. La neurogénesis ocurre por la división de células progenitoras, con origen en las células gliales, y que tienen la capacidad de diferenciarse en neuronas, pero ciertamente las neuronas no se dividen.

### Capítulo 3

#### **Integración anatómica y fisiológica de las nuevas neuronas que nacen en el animal adulto.**

Las neuronas nuevas en el GD pasan por una serie de procesos que implican proliferación, migración, diferenciación, sobrevivencia, maduración, integración anatómica y funcional. Estos eventos son la recapitulación de lo que ocurre en el desarrollo ontogénico, pero ocurren más lentamente y con salvedades propias del cerebro adulto que son descritas más adelante (Ge et al., 2007; van Praag 2002).

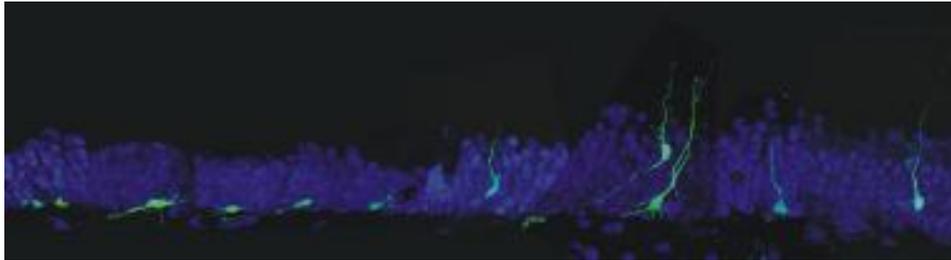
Como ya hemos descrito las células progenitoras de las nuevas células granulares se encuentran localizadas en el hilus donde hay una diversidad de tipos celulares que van desde la presencia de astrocitos, oligodendrocitos, así como neuronas inmaduras y maduras generando un microambiente que promueve continuamente la proliferación y diferenciación de células.

Las nuevas células granulares están influenciadas por una gran variedad de factores moleculares que al liberarse por las células vecinas, estimulan receptores en las células recién generadas, y de esta manera inciden sobre su diferenciación e integración (Zhao et al., 2008). Los procesos de diferenciación y maduración se han ido caracterizando tanto anatómica como funcionalmente principalmente en ratas y ratones (Espósito et al., 2005; Ming y Song, 2005; Duan et al., 2008; Zhao et al., 2006; Zhao et al., 2008).

El desarrollo de la anatomía se ha podido observar gracias a la expresión de proteínas como la DCX, con la cual se ha observado el proceso de maduración de forma definida (Brown et al., 2003). Los procesos dendríticos de las neuronas nuevas, se encuentran al principio en la ZSG y conforme pasan los días se comienzan a observar en la CCG (Brown et al., 2003).

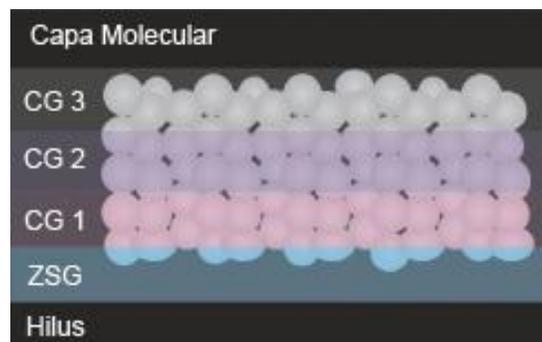
Con el uso de marcaje retroviral, que se incorpora únicamente en las células en proliferación y expresa la proteína verde fluorescente (GFP) (van Praag et al., 2002, Espósito et al., 2005, Ge et al., 2006) ha sido posible observar toda la membrana del cito esqueleto y por lo tanto estudiar las proyecciones dendríticas y axonales de las nuevas células granulares (Espósito et al., 2005) (Figura 9). También con el uso de trazadores retrógrados, ha sido posible observar que las neuronas nuevas alcanzan las dendritas piramidales de CA3 (Hastings y Gould, 1999).

Además se han observado que las células nuevas presentan conos de crecimiento, filipodia y crecimiento de espinas dendríticas (Ambrogini et al., 2004).



**Figura 9.** Fotomontaje de imágenes tomadas con un microscopio confocal mostrando el desarrollo anatómico de las neuronas nuevas a lo largo de la capa granular. (Las neuronas nuevas están marcadas con la técnica del retrovirus que se visualiza en verde). Se observa como la morfología de la célula cambia a lo largo del tiempo y como aparecen las proyecciones, es muy saliente la dendrita apical que se adentra en la capa molecular, también se puede apreciar un cambio en la posición del soma, lo que denota una migración de la célula a lo ancho de la capa granular, lo que también ocurre a lo largo del tiempo (Modificado de Espósito et al., 2005).

Se observan arborizaciones dendríticas de neuronas localizadas en las capas más cercanas a la lámina interior de la capa de células granulares, las cuales pueden alcanzar la capa molecular desde las láminas más internas, esto ocurre a las 2 semanas de vida de las nuevas células granulares (Espósito et al., 2005, Overstreet-Wadiche 2006). En este periodo post división, las neuronas nuevas ya establecieron sus conexiones con las células del hilus (células musgosas e interneuronas) así como con las células piramidales de CA3, mientras tanto sigue aumentando la complejidad de sus árboles dendríticos (Ge et al., 2007) (Figura 9).



**Figura 10.** Diagrama esquemático que representa las divisiones de la capa granular. Se utiliza para localizar a las neuronas nuevas (Espósito et al., 2005).

La distancia máxima que recorren es un rango de 50 a 100  $\mu\text{m}$  aunque no todas migran, algunas se mantienen en la ZSG (Kempermann et al, 2003). Hasta ahora no existe evidencia que muestre una localización particular de las neuronas nuevas que dependa de su estado de

maduración (Figuras 10 y 11). A los 30 días post división las neuronas nuevas muestran características de neuronas maduras, observándose más células con un marcador nuclear de neuronas maduras por excelencia NeuN que con DCX. Muestran un soma redondo que suele localizarse en las capas más internas de la CCG implicando que migraron. Su proyección axonal es conspicua, y se extiende hasta el hilus, presentan un árbol dendrítico más complejo con espinas dendríticas que se ubican en las regiones media y externa de la capa granular (Espósito et al., 2005).

A los pocos días después de administrar el marcador de proliferación BrdU (ver Figura 12), el número de células positivas disminuye dramáticamente hacia a las 4 semanas. El número de células BrdU positivas llega a un nivel que se mantiene estable por al menos 11 meses (Kempermann et al., 2003). Esto muestra que el número de células que nace decrece en un 80% a lo largo del periodo durante el cual se lleva a cabo la diferenciación de las neuronas nuevas, lo que sugiere que muchas de las neuronas que proliferan mueren antes de integrarse. Este periodo de muerte celular ha sido observado hasta las 4 semanas post división (Dayer et al., 2003).

Durante el periodo de integración a la capa de células granulares del GD, las neuronas nuevas pasan por varios procesos a muchos niveles que ocurren en paralelo. La interacción de moléculas sirve como señales clave, para comenzar a desarrollar características típicas de neuronas extendiendo dendritas y axones, generando la formación de circuitos (Gascón et al., 2010). Los circuitos neurales tienen actividad continua dependiente de plasticidad de las conexiones sinápticas. Esto implica que a lo largo de la vida existan procesos de reorganización o remodelamiento que permiten tanto fortalecer como desestabilizar la formación de nuevas sinápsis. Se ha identificado que la relación entre células progenitoras y células inmaduras ocurre con la molécula de adhesión celular neural (NCAM) (Gascón et al., 2010). NCAM es un miembro de la super familia de las inmunoglobulinas y está involucrada en el reconocimiento de superficie celular y puede promover la adhesión celular a través de mecanismos dependientes de  $Ca^{++}$  (Rutishauser U y Landmesser L, 1996). Tradicionalmente se le conoce como un mediador de interacciones entre células, de tal forma que se generan anclajes físicos entre ellas. Existe un forma que contiene un polímero de ácido polisiálico conocida como (PSA NCAM) que le provee propiedades únicas a la molécula debido a su carga negativa que permite atenuar las fuerzas de adhesión y regular, por lo tanto las interacciones celulares (Gascón et al., 2005, Gascón et al., 2007). La expresión de PSA NCAM es una característica de los nichos

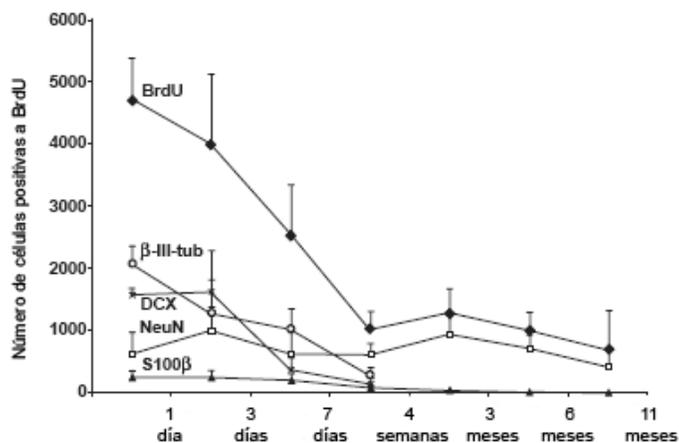
neurogénicos (Bonfanti, 2006). Su expresión está correlacionada con la etapa del desarrollo en donde las neuronas nuevas extienden sus procesos y además con el comienzo de su migración (Gascón et al., 2005, Gascón, 2007). En el adulto, así como durante el desarrollo del cerebro, se ha observado tanto en la ZSV, como en la VMR, que el fenómeno de la apoptosis aumenta hasta 3 veces cuando no existe NCAM (Gascón et al., 2007), no se sabe si algo similar ocurra en la ZSG, pero de forma indirecta alguna evidencia muestra que la PSA puede evitar la muerte celular (Hammond et al., 2006).

Ciertos factores tróficos se han visto relacionados con la PSA NCAM y la sobrevivencia de las neuronas nuevas. Algunos experimentos han demostrado que el ácido polisialico (PSA) incrementa la respuesta hacia BDNF. Se sugiere que el PSA dota a NCAM la habilidad de interactuar o activar receptores de la membrana celular (Vutskits et al., 2001).

Otro aspecto que se ha estudiado sobre la sobrevivencia de las nuevas células y PSA NCAM es la relación de esta última con el BDNF y sus receptores, en particular el TrkB. Esto debido a que la ausencia de PSA-NCAM conlleva a interrumpir la activación cuando PSA-NCAM está ausente (Vutskits et al., 2001; Muller E et al., 2000). Otra alternativa que ha sido estudiada es que la PSA-NCAM influye sobre el receptor de baja afinidad de la neurotrofina 3 (NT-3) llamado p 75 (Gascon et al., 2005). Por otro lado ya se conoce que las neurotrofinas generan sus efectos biológicos a través de 2 tipos de receptores Trk y p75. Existen tres isoformas de Trk, TrkA, B y C que se unen principalmente a la neurotrofina llamada factor de crecimiento neural (NGF), al factor neural derivado del cerebro (BDNF)-NT4/5 así como la neurotrofina 3 (NT3). Muchas acciones mediadas por neurotrofinas se han demostrado dependientes de la activación de Trk. El receptor p75 tiene afinidad similar para todas las neurotrofinas y se ha involucrado en apoptosis cuando es el único receptor activado. También se ha demostrado que la inhibición de cascadas proapoptóticas río abajo de p75, impiden por completo la muerte neuronal inducida por la ausencia de PSA. Estos datos brindan la posibilidad de que la ausencia de PSA en NCAM induce un incremento en la activación de las vías de señalización de p75. Como se viene describiendo, se sabe que en neuronas inmaduras sin PSA-NCAM se expresan niveles altos de p75 (Barret et al., 1998; Hirata et al., 2001) y esta evidencia muestra que la falta de PSA-NCAM no influencia sobre la actividad mitótica en los nichos neurogénicos, sino que se incrementa la muerte temprana de la neuronas inmaduras (Vutskits et al., 2001).

Durante la maduración celular de las primeras proteínas en observarse está la Nestina (proteína de filamentos intermedios implicada en el crecimiento del axón) y GFAP (Glial fibrillary acidic protein, proteína de filamentos intermedios se utiliza como marcador de astrocitos). Las neuronas nuevas que se originan en la ZSG migran una corta distancia de forma radial dentro de la CCG y se sugiere que esta migración es controlada por moléculas guía. Estas moléculas son proteínas que influyen en la extensión de axones, moléculas de adhesión celular como anteriormente se describió NCAM, que regula tanto la proliferación como la diferenciación de las células progenitoras a través de factores de transcripción (Amoreux et al., 2000).

Al transcurrir los días se pueden observar procesos cortos que se orientan de forma tangencial, y dejan de expresar GFAP, las células son altamente proliferativas y siguen teniendo un linaje de célula precursora. Existen grupos de células positivas a Nestina, pero sólo algunas expresan el marcador de neuronas inmaduras como  $\beta$  III-tubulina y DCX. Esto implica que puede haber poblaciones de neuronas inmaduras junto con células precursoras (Kempermann et al., 2003). DCX es una proteína asociada a micro túbulos, expresada durante etapas en las que la migración neuronal es alta. Se observa desde las 2 horas después de la administración de BrdU (Brown et al., 2003), en donde el porcentaje de células granulares en las que se incorporó el BrdU y co-localiza la DCX es de 60%. Entre el día 4 y 7 post división el porcentaje aumenta a 90%. Las células que son DCX positivas se observan en conjuntos, algunas con procesos dendríticos bien definidos y localizados al margen de la ZSG en el hilus (Brown et al., 2003; Kempermann et al., 2003). El número de células que expresan DCX y que integraron BrdU, decrementa después de la segunda semana, de la administración del BrdU, hasta ser prácticamente inexistente a la tercera semana, lo que indica que las células dejan de expresar DCX durante la maduración de las células, cuando se vuelven postmitóticas (Kempermann et al., 2003). Las células que son DCX positivas y que no expresan Nestina, tienen alta proliferación. Es en este periodo cuando hay más cambios morfológicos. Estas células expresan PSA-NCAM, que ha sido utilizada para marcar un estado precursor de la neurogénesis hipocampal adulta (Gascón et al., 2010).

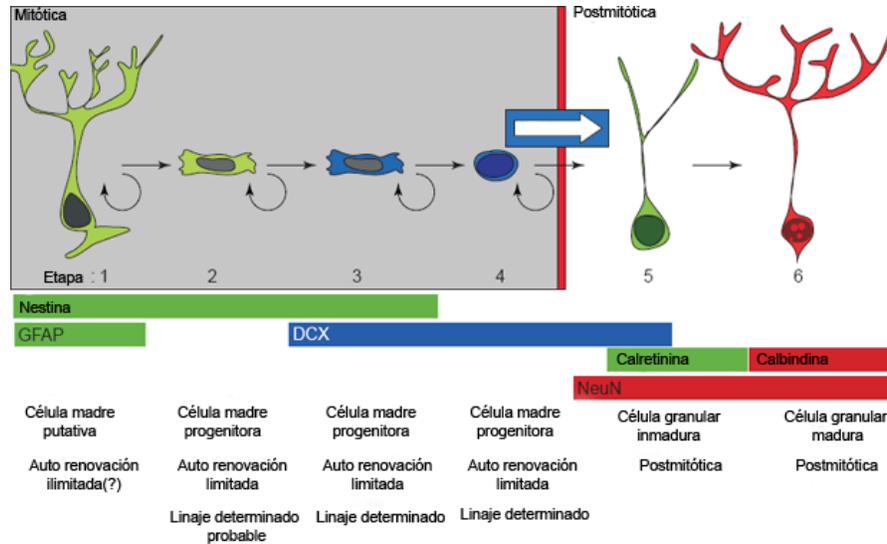


**Figura 11.** Número de células BrdU marcadas a diferentes periodos después de la inyección de BrdU con colocación de marcadores de células inmaduras  $\beta$ Tubulina proteína de microtúbulos expresada sólo en neuronas, DCX Doble cortina marcador de neuronas inmaduras proteína asociada a microtúbulos, S100B marcador de astrocitos. (Kempermann et al., 2003)

Como se nombró anteriormente a los pocos días después de administrar el BrdU (Figura 11), el número de células positivas disminuye dramáticamente; a las 4 semanas después de la administración de BrdU, el número de células BrdU positivas llega a un nivel que se mantiene estable por al menos 11 meses (Kempermann et al., 2003), esto muestra que el número de células que nace decrece a lo largo del periodo durante el cual se lleva a cabo la diferenciación de las neuronas nuevas; lo que sugiere que muchas (80%) de las neuronas que proliferan mueren antes de integrarse. Este periodo de muerte celular ha sido observado hasta las 4 semanas post división (Dayer et al., 2003). Se piensa que este fenómeno ocurre como un proceso de control preciso para el mantenimiento del número constante de neuronas en el GD, y para el adecuado procesamiento de la información en el sistema. Muchos factores ambientales están involucrados en la regulación de la muerte celular programada (MCP) también llamada apoptosis. Un ejemplo es el estrés, que se ha observado aumenta la muerte de las nuevas células al someter a animales a aprendizajes espaciales. Una nueva experiencia espacial se encuentra llena de agentes promotores de estrés generando la muerte de las neuronas nuevas. (Gould et al., 1997; Dupret et al., 2008).

Las neurotrofinas juegan también un papel en la MCP. El inicio de la MCP ha sido evidenciado tras la unión de neurotrofinas al receptor p75, siendo completamente opuesto el papel del resto de los receptores para estos factores tróficos que más bien promueven la sobrevivencia de las células. Esto ocurre cuando el receptor p75 es el único receptor activado,

pero cuando otros receptores neurotróficos se activan por ser de alta afinidad, la MCP no ocurre (Binder, 2007). Se piensa que este fenómeno ocurre como un proceso de control preciso para el mantenimiento del número constante de neuronas en el GD, y para el adecuado procesamiento de la información en el sistema.



**Figura 12.** Secuencia de desarrollo que describe los tipos celulares en la neurogénesis del GD. Se identifican 6 etapas que pueden ser identificadas en base a la morfología, habilidad de proliferación y expresión de marcadores de neuronas inmaduras y maduras como Nestina, GFAP, DCX, calretinina, calbindina y NeuN. (Kempermann et al., 2004).

Durante su etapa temprana post mitótica (segunda y tercer semana post división) las células nuevas expresan NeuN junto con Calretinina que es una proteína asociada al  $Ca^{++}$ , lo fija en el citoplasma generando distintos estados electrofisiológicos. Más tarde esa proteína es intercambiada por Calbindina (proteína reguladora del metabolismo de  $Ca^{++}$ ) que también mantiene los niveles de  $Ca^{++}$  intracelular pero en células maduras. (Kempermann et al., 2004, Kuhn et al., 1996) (Figura 12).

Se sabe que del día 1 al 7 post división las neuronas nuevas son prácticamente silentes, es decir la estimulación extracelular no induce respuesta post sináptica. (Espósito et al., 2005; Ge et al., 2006). La conectividad aferente se ha evaluado por la presencia o ausencia de respuesta sináptica evocada. Durante el proceso de maduración de las células granulares se han clasificado a neuronas silentes o sin respuesta a la entrada sináptica; neuronas con solamente respuesta despolarizante ante ácido- $\gamma$ -amino butírico (GABA) y neuronas con fluctuación a respuesta tanto al GABA como a glutamato. La respuesta a GABA se modifica por despolarización a

hiperpolarización entre las semanas 2 a la 4 después de la división Este intercambio es similar a lo observado durante el desarrollo (Ben Ari, 2002) (Figura 15).

En células de tan sólo 3 días de maduración no se observan corrientes sinápticas espontáneas cuando la vía perforante ha sido estimulada. Sin embargo, cuando se aplica un baño de bicuculina antagonista específico del receptor  $GABA_A$  ( $GABA_{Ar}$ ) en altas concentraciones (100  $\mu M$ ) se observan corrientes tónicas implicando que el GABA localizado en el espacio intersticial es el generador de este tipo de corriente dado que los receptores  $GABA_A$  se encuentran bloqueados. Esto demuestra que las nuevas células granulares se activan de forma tónica antes de cualquier corriente fásica detectable, que depende de actividad sináptica (Farrant y Nusser, 2005).

Si bien se sabe que GABA actúa durante las primeras etapas de maduración con un efecto excitatorio, esto ocurre dado que las neuronas nuevas tienen altas concentraciones de Cloro  $Cl^-$  en el citoplasma. La polaridad de la acción de GABA en las neuronas nuevas es determinada por la cantidad de iones cloruro en su interior. Existe una expresión secuencial de los transportadores de  $Cl^-$  que se cree son los responsables de transformar la función del receptor a GABA que va de depolarizante a hiperpolarización (Ge et al., 2006; Ge et al., 2008). Se sabe que en células que expresan DCX hay altos niveles de un importador de  $Cl^-$  (NKCC1) y bajos niveles del exportador de  $Cl^-$  KCC2. Esto hace que en las neuronas nuevas GABA sea depolarizante durante el periodo temprano del desarrollo de estas células, en las que se encuentra un alto contenido intracelular de  $Cl^-$ . El receptor a GABA se convertirá en hiperpolarizante alrededor de las 4 semanas de maduración. (Ge et al., 2006).

La excitabilidad incipiente de las neuronas nuevas ha sido evidenciada también por la pequeña amplitud de sus potenciales de acción. En el 2002, van Praag, caracterizó en rebanadas de cerebro de ratón la respuesta al input de las neuronas nuevas y observó que en etapas tempranas de su desarrollo presentan propiedades pasivas de la membrana características de neuronas jóvenes. Durante las etapas tempranas de maduración las neuronas muestran una Resistencia al input ( $R_{input}$ ) alta y una baja Capacitancia de la membrana ( $C_m$ ) que son características típicas de neuronas inmaduras en el cerebro en desarrollo. Conforme pasa el tiempo, la  $R_{input}$  decrementa y la  $C_m$  incrementa hasta llegar a niveles que son característicos de neuronas maduras. A las nuevas células les lleva de 4 a 7 semanas para ser completamente

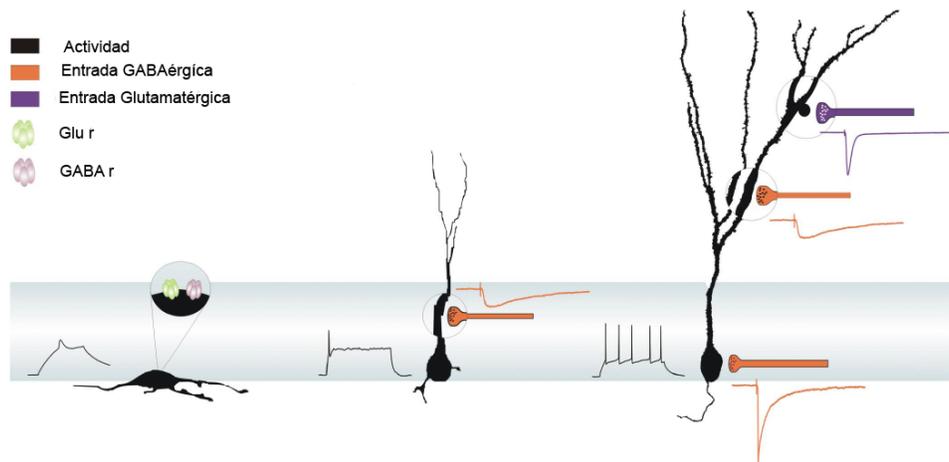
indistinguibles de las células pre existentes. En esta etapa las células debieron ya de haber llegado a su localización anatómica final.

Se ha descrito que existe un periodo crítico en donde las propiedades neuronales son particularmente susceptibles a modificaciones por la experiencia, volviéndose irreversible después de este periodo de maduración. Estos procesos son fundamentales para el establecimiento de circuitos neurales durante el desarrollo del cerebro (Hensch, 2004). En las neuronas maduras, existe un periodo crítico en el que se determina su destino de vida o muerte, el cual sabemos, como se describió anteriormente, dura aproximadamente entre 4 y 6 semanas, durante las cuales en ausencia de estimulación externa, la mayoría de las neuronas que nacen (80%) muere (Kemperman, et al., 2003). Pero durante esta etapa, las neuronas nuevas compensan su fragilidad, incrementando su plasticidad. Se ha observado que con estimulación que simula la actividad de disparo de las células de lugar cuando disparan en su campo receptivo espacial (Theta Burst Stimulation o TBS), se estudió si las neuronas de 4 meses de edad presentaban una potenciación a largo plazo como producto de esta estimulación. Se distinguieron 3 tipos de TBS, una de baja frecuencia, como la actividad en la periferia del campo receptivo espacial, la otra de frecuencia media, como la que se observa alrededor del centro del campo receptivo espacial y una de alta frecuencia como la que se presenta en el centro del campo receptivo espacial (Esto es descrito más adelante en el Capítulo 4).

Se observó así que en las células nuevas de un mes de edad, pero no así las de 4 meses, un incremento en la respuesta post-sináptica excitatoria, incluso con las frecuencias bajas, mientras que en las células granulares pre-existentes o en las de 4 meses, la potenciación de la respuesta post-sináptica sólo se observó con la frecuencia más alta (Schmidt-Hieber, et al., 2004). Esto mostró que las neuronas nuevas granulares presentan una plasticidad incrementada, lo que probablemente les permite integrarse a la red del hipocampo.

Un grupo de elementos de suma importancia que medía la plasticidad sináptica en el hipocampo son los receptores a glutamato *N*-metil-D aspartato (NMDA) (Nácher et al., 2007). Los receptores a NMDA son ionotrópicos; están constituidos por un complejo de proteínas formando tres subunidades NR1, NR2 y NR3, se expresan claramente durante el desarrollo del sistema nervioso y al parecer están asociados con una plasticidad sináptica aumentada (Nácher et al., 2007). Se ha descrito que la subunidad NR1 es necesaria para la formación de canales

funcionales (Schoepfer et al., 1994) del tipo NR2, de los cuales existen 4 miembros NR2A, NR2B, NR2C, NR2D que parece modulan propiedades de los receptores NMDA (Monyer et al., 1994). En las neuronas nuevas que se integran en el cerebro del animal adulto, pasa algo semejante. Los receptores a NMDA se expresan desde las etapas tempranas del desarrollo de las neuronas nuevas o en neuronas inmaduras, y se considera que la activación de los receptores NMDA regula varios mecanismos de integración en la neurogénesis en el cerebro adulto especialmente son relevantes para la sobrevivencia de las neuronas nuevas (Carleton et al., 2003; Náchter et al., 2007).



**Figura 13.** De izquierda a derecha. Representación esquemática mostrando la maduración de las neuronas nuevas. Morfología, excitabilidad, aferencias sinápticas y conectividad con corrientes postsinápticas. En negro se muestra la actividad eléctrica incipiente. En naranja se muestran las entradas GABAérgicas que son las primeras en hacer responder a las neuronas nuevas. En morado se muestran las entradas de Glutamato, esto ocurre una vez que las células tienen los receptores para este neurotransmisor. En verde difuminado son los receptores a glutamato y en morado difuminado los receptores a GABA. También se muestra el desarrollo de las dendritas y su posición en la CCG del GD (Esposito et al., 2005).

La plasticidad sináptica en neuronas nuevas ha sido estudiada con el retrovirus que se mencionó anteriormente (van Praag et al., 2002). Se observó que durante el periodo crítico para la sobrevivencia de las neuronas nuevas, éstas muestran una mayor plasticidad sináptica, lo que depende de una expresión temprana y abundante de receptores NR2B en las neuronas nuevas (Ge et al., 2007). Es muy importante mencionar que este método de marcaje celular no es el más indicado para realizar conteos o registros celulares dado que la probabilidad de que se incorpore el virus es muy baja.

Existen numerosos factores intracelulares que controlan la proliferación de las células pluripotenciales así como de su progénia. De entre los factores genéticos que inducen neurogénesis y morfogénesis embrionaria, varios como Notch, BMP, Eph/efrinas, Nogginn se

sabe que también participan regulando la proliferación y diferenciación de zonas neurogénicas en adultos (Álvarez-Buylla y Lim, 2004). Por ejemplo la expresión de receptores como las efrinas permite la comunicación célula-célula, regulando la proliferación celular. Estos receptores junto con sus ligandos se han visto implicados en la guía axonal y durante el desarrollo del SNC, así como durante la neurogénesis en el adulto (Holmberg et al., 2005).

Entre los sistemas de señalización celular que regulan la neurogénesis está una proteína que controla la transcripción y que es importante durante el desarrollo, es conocida como Sonic-hedgehog y está involucrada en el mantenimiento de las células progenitoras en los adultos (Laik et al., 2003). También el sistema de señalización Wnt además de ser importante para la comunicación celular, se sabe aumenta la proliferación del DG en animales adultos (Ie, et al., 2005). La vía Wnt es mediada por varios genes que son factores de transcripción como la familia LEF/TCF. En particular se ha encontrado que la expresión de Lef1 durante el desarrollo es esencial para la formación del cerebro en ratones. Y si no se expresa, los animales no tienen GD, teniendo un conjunto de células gliales e interneuronas en dicha región (Galceran et al., 2000). También se sabe que la secuencia de factores de transcripción para el desarrollo cortical Pax6- Neurog2-Tbr2-Neurod1-Tbr1, se encuentra en regiones neurogénicas del cerebro adulto. Pero, factores que regulan la neurogénesis en el adulto no son relevantes durante el desarrollo. (Kempermann, 2011). Es por eso que no se puede considerar al fenómeno de la neurogénesis en adultos sin la neurogénesis que ocurre durante el desarrollo, dado que muchos mecanismos se comparten.

Se considera que durante el desarrollo del organismo, la neurogénesis es controlada, es decir, que es determinada por diversos programas genéticos; mientras que en el sistema nervioso adulto se encuentra regulada, lo que indica que en el SNC del animal adulto intervienen otros factores como el ambiente y la experiencia (Gilbert, 2006). Hemos visto que las neuronas nuevas en el GD llegan a tener características de neuronas maduras del SNC, poseen una anatomía normal que les permite generar sinápsis eficientes, presentan potenciales de acción en respuesta a estímulos sinápticos tanto inhibitorios como excitatorios y son capaces de liberar los neurotransmisores clásicos (Song et al., 2002).

También podemos concluir que el proceso de integración de las neuronas nuevas en el cerebro adulto y los mecanismos que le subyacen, son semejantes a los que ocurren en el cerebro en desarrollo, con ciertas salvedades. Lo que es muy claro es que es un proceso más lento, probablemente porque las neuronas nuevas se tienen que integrar a una red previamente existente.

## Capítulo 4

### La neurogénesis en el hipocampo, ¿porqué es tan relevante?

Lashley en 1930, interesado en encontrar a una estructura responsable de la integración de la memoria hubiera visto con gran interés al paciente Henry Gustav Molaison (HM), quien tras sufrir de epilepsia intratable fue intervenido para remover la región medial del lóbulo temporal. En dicha intervención le fue extirpado el hipocampo casi en su totalidad, la corteza entorrinal y la amígdala. El efecto de la cirugía en su memoria fue dramático e inmediatamente evidente (Scoville y Milner, 1957, 2000). El paciente fue ampliamente estudiado por Brenda Milner, alumna de Donald O'Hebb, quien se encontró con el caso histórico de HM. La caracterización neuropsicológica de su déficit cognitivo fue exhaustiva y sistemática, lo que demostró una profunda amnesia para todos los eventos que ocurrieron después de la cirugía, mientras que los eventos que ocurrieron 19 meses previos a la cirugía eran recordados perfectamente. De esta manera, Scoville y Milner, concluyeron que el hipocampo era una estructura cerebral crucial para la formación de la memoria de eventos recientes, sin dejar de reconocer la contribución que la amígdala y la corteza podrían tener (Scoville y Milner, 2000).

Posteriormente se estudiaron otros casos en donde solamente se había removido o lesionado el hipocampo. En ellos se observaba incapacidad de adquirir nueva información, pero el déficit era menos severo que el que mostró HM. La incapacidad de HM de recordar eventos previos a la cirugía mostraba evidencia de lo que se conoce como amnesia retrógrada, mientras que la incapacidad de formar nuevas memoria se conoce como amnesia anterógrada. La experiencia con los pacientes humanos estimuló el desarrollo de modelos animales de lesión hipocampal así como de pruebas de memoria episódica y declarativa (no se considera semántica en animales). El caso de HM ha sido sólo uno de tantos que han permitido establecer que la memoria ocurre gracias a la existencia íntegra de varias estructuras (Scoville y Milner, 2000).

Para poder conocer los alcances de lesiones en el cerebro y su repercusión en la memoria se han llevado a cabo diversas aproximaciones en modelos animales para intentar dilucidar cómo es que la información es procesada y después recordada. Se han realizado lesiones a muchos niveles desde físicas hasta farmacológicas, tanto en primates como en roedores.

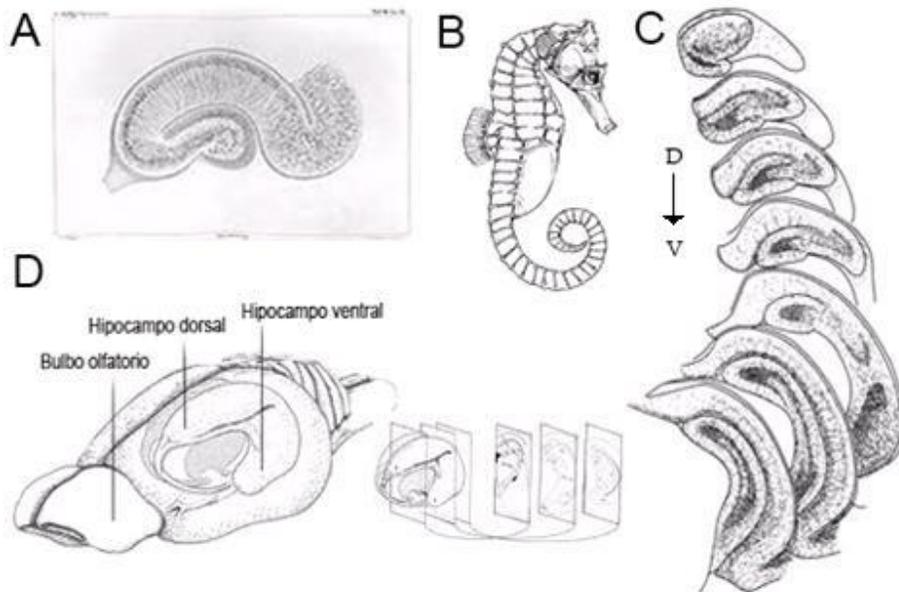
Algunas concepciones actuales de la memoria episódica enfatizan que existe organización temporal de la secuencia de eventos mientras estos van ocurriendo en el espacio y tiempo (Tulving E, 2002). Las representaciones de eventos se componen de la asociación entre objetos, acciones y lugares; así un episodio está compuesto de una secuencia de eventos única. Actualmente se conoce que el hipocampo procesa esas secuencias de eventos que componen un episodio (Eichenbaum H, 2007). La memoria episódica también implica la capacidad de distinguir entre secuencia de eventos que comparten elementos comunes (Fortin et al., 2002, Kesner et al., 2002). Dado que existen 2 vías por las cuales la información llega al GD (este punto es descrito más adelante), la corteza y los Cuernos de Ammon, algunos estudios computacionales han sugerido que el GD debe de tener una habilidad de eliminar la ambigüedad proveniente de dichas regiones, lo que es una función crítica para la formación de la memoria episódica (Levy W.B., 1996).

El hipocampo es una estructura de especial interés cuando hablamos de memoria. Tiene una participación fundamental en la integración de memoria episódica (Scoville y Milner, 1957; Milner y Penfield, 1955; Nadel y Moscovitch, 1997; Eichenbaum y Cohen, 1988), la cual resulta de la integración de información multimodal con la que se representa el tiempo y el contexto espacial, lo que conocemos como ubicación espacio-temporal. La memoria semántica se forma a partir de la memoria episódica y este proceso depende de la función hipocampal (Milner, 1972; Nadel, 1987) y su interacción con la corteza (Nadel y Moscovitch, 1997). Un tipo de memoria episódica es la memoria espacial que involucra una interacción directa con el ambiente para realizar distintas conductas, como lo es el forrajeo, búsqueda de comida, y de pareja, que son conductas básicas para la sobrevivencia del individuo. Mientras que la memoria semántica es la que nos permite identificar y clasificar estímulos, acciones, objetos, ideas y construir relaciones complejas entre ellos (Quillian, 1968; Tulving, 1972).

## 4.1 Neuroanatomía y características funcionales del Hipocampo

El hipocampo es una estructura que funciona como una red neuronal que lleva a cabo procesamiento de información (Marr, 1972). Esta compuesto de elementos particulares bien descritos y sus características neuroanatómicas son bondadosas para su estudio. El nombre de esta estructura deriva de su forma que es semejante a un caballito de mar, en griego Hippos = Caballo, Kampi=curva. Todos los mamíferos presentan en su encéfalo a la formación hipocampal de forma bilateral; es decir un hipocampo por hemisferio.

En mamíferos se localiza por debajo de la corteza, pero no es considerado como una estructura subcortical, en realidad se le considera una corteza, la corteza antigua o arquicorteza. Esta estructura en humanos se encuentra invaginado en el lóbulo temporal y se extiende temporo-septalmente. La porción temporal es la que presenta el mayor volumen y al final de esta sección se ubica la amígdala. En el hipocampo se reconocen 3 capas celulares a diferencia de la neocorteza cerebral que tiene 6. (Figura 14).



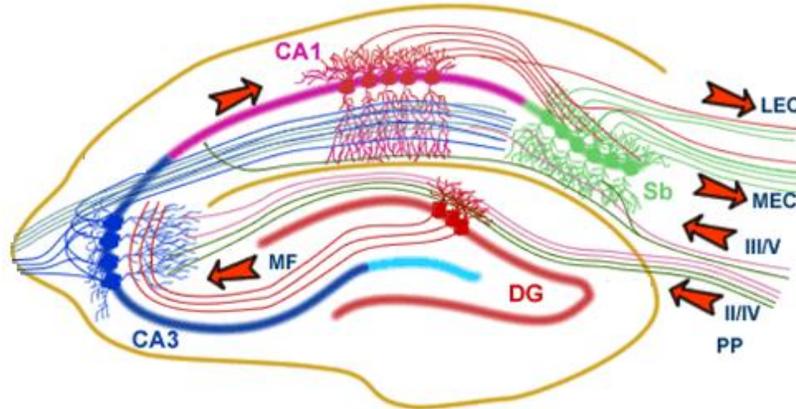
**Figura 14** Anatomía del hipocampo A) Dibujo de Lorente de Nó mostrando las 3 capas de la Arquicorteza. B) Caballito de mar en donde se muestra la supuesta similitud con la estructura cerebral. C) Cortes coronales del hipocampo vista dorsal a ventral D) Ubicación del hipocampo en el cerebro de rata.

Recibe entradas de los lóbulos frontales y los temporo-parietales (Squire y Zola-Morgan, 1988). Dadas estas características, el hipocampo tiene disponible información multimodal que ha sido procesada a lo largo de diferentes vías sensoriales interconectadas. Asimismo le llegan entradas adicionales provenientes de la amígdala y por vías separadas, vías de sistemas colinérgicos y otros sistemas regulatorios. Un sistema divergente extenso de salidas permite que el hipocampo tenga retroalimentación en la mayoría de las áreas de las cuales recibe entradas (Figura 15). Como se refirió anteriormente, varias estructuras resultan implicadas en estas lesiones y todas comparten el procesamiento del flujo de información cortical hacia otras estructuras del cerebro. La amígdala proyecta al hipocampo de forma directa desde el núcleo basal hacia CA1, CA2 y CA3, también como al subículo y el parasubículo. Y de forma indirecta desde la región parvicelular, se proyecta hacia la corteza entorrhinal (Pikkarainen et al., 1999).

La información es procesada en el hipocampo por una vía unidireccional bien distinguida; axones provenientes de la capa 2 de la CE llegan a las células granulares del Giro Dentado (GD) por la vía perforante (VP) y siguen hasta hacer sinapsis con las dendritas apicales de las células piramidales de los Cuernos de Ammon 3 (CA3). Un grupo independiente de fibras proyecta desde la CE de forma directa hacia los Cuernos de Ammon 1 (CA1) (Figura 15).

Las proyecciones axonales extrínsecas de CA3, las colaterales de Schaffer proveen una entrada mayor de las células de CA1 que son más pequeñas que las de CA3. En términos de números de células, la información parece que fluye del GD hasta un cuello de botella que es CA3 y después esparcida en CA1. La salida de CA1 regresa vía el subiculum a la CE en donde es redistribuida en áreas neocorticales. Además de las numerosas conexiones de las colaterales, otra característica de CA3 es la presencia de 2 entradas principales provenientes de la vía perforante (VP) y de las fibras musgosas (FM). La VP se origina de la corteza entorrhinal (CE), que es una estructura que funciona como la estación principal hacia el hipocampo; las FM son las proyecciones axonales de las células granulares del GD. Mientras las células granulares reciben la mayoría de sus entradas de la CE; a las FM les llega en general la misma información pero haciendo un relevo en el GD. Por lo que ha sido intrigante el entendimiento de la función de esta doble proyección (Fig 15). La principal proyección al hipocampo proviene de la corteza entorrhinal (CE), la cual tiene proyecciones multimodales y unimodales provenientes de áreas de asociación y llegan al hipocampo a través de la corteza perirhinal (CPR) que envía una proyección a las capas I-III de la parte dorsolateral de la CE. Las capas II-III originan proyecciones hacia la región septal del GD. Las capas V y VI de la CE dorsolateral reciben

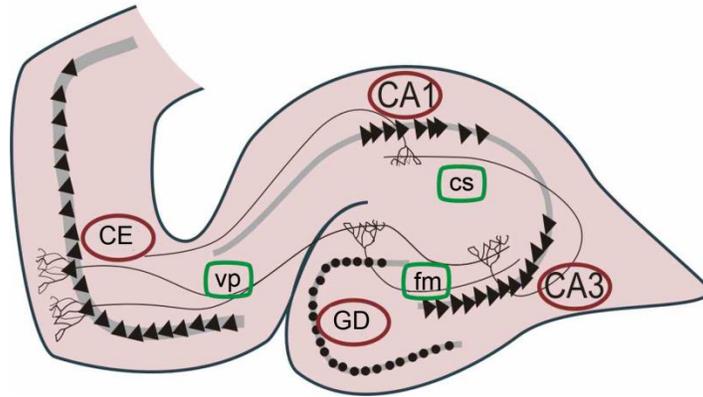
proyecciones de niveles septales del hipocampo y del subiculum, generando y regresando proyecciones a la Neo corteza (NC). De este modo la información que llega a las capas superficiales de la CE es transmitida al GD y al Hipocampo, y regresa por las capas profundas de la CE para después dirigirse a la Neo corteza (NC) (Figura 15).



**Figura 15** Hipocampo y sus principales aferencias. Línea rosa, fibras provenientes de la corteza entorrinal que conectan con las dendritas de las células granulares; eferencias: línea verde, fibras que retornan desde el subiculum hasta la corteza entorrinal; líneas rojas fibras musgosas que conectan las células granulares con las células piramidales de CA3, conservando la estructura trisináptica en el giro dentado. DG (Giro dentado), Sb (Subiculum). MF (Fibras musgosas), PP (Vía perforante), LEC (Corteza entorrinal lateral), MEC (Corteza entorrinal medial).

La entrada proveniente de la CE, como se ha venido describiendo, es dispersa y llega al GD a una capa extensa de células con propiedades de disparo escaso, lo que permite que cada célula granular cargue una pequeña y distinta fracción del total de esa entrada. Tanto el nivel escaso de disparo de las células granulares como su poca conexión con las piramidales de CA3, que producen la segregación de entradas de la corteza, podría mantenerse mientras entran a la red de CA (Leutgeb et al., 2005, 2007). Se ha descrito que la función del GD es la de separar patrones, esto se refiere a la operación en que patrones sobrepuestos o comunes, generados por entradas o experiencias distintas se transforman en patrones no sobrelapados de salida. A través de esta acción, los estímulos que activan una población común de neuronas se generan para activar poblaciones separadas de neuronas en CA3. Ésta es la forma en que el SNC reactiva representaciones del mundo exterior en un ambiente que se modifica continuamente.

También esto ha sido definido como ortogonalizar episodios, es decir hacer diferentes a las experiencias.



**Figura 16.** Esquema mostrando la circuitería básica del hipocampo. Corteza entorhinal (CE), vía perforante (vp) Giro dentado (GD), fm (fibras musgosas), cs (colaterales de Schaffer), CA1, CA3. (Modificado de DEI Lab) Las células granulares son círculos negros, y las piramidales son triángulos negros.

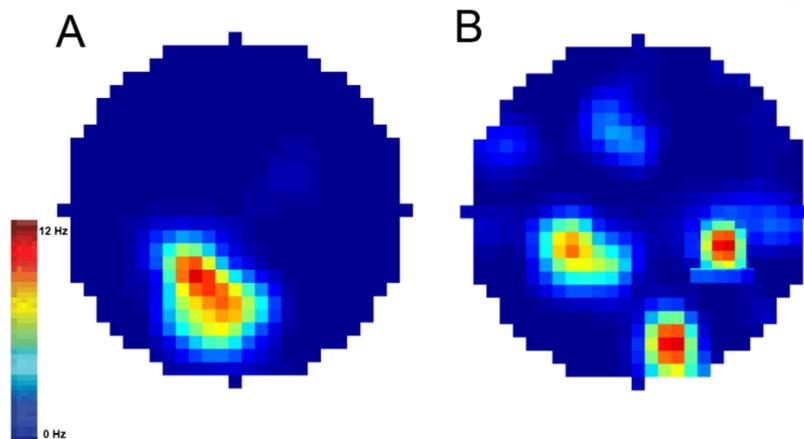
Los cuernos de Ammon, junto con el GD son parte del hipocampo propiamente o de la formación hipocampal. Algunos sin embargo consideran también al subiculum como parte del hipocampo (Riegert et al., 2004). Incluso las cortezas vinculadas al hipocampo, como la corteza entorhinal, pueden considerarse por algunos como parte de la formación hipocampal. Nosotros consideramos al hipocampo como los Cuernos de Ammon que contiene células piramidales o Cuernos de Ammon (CA) y el GD formado de células granulares. A continuación se explica con detalle las estructuras que le proyectan y el cómo se conecta esta red. (Figura 16).

La principal población celular del GD son las células granulares que son una estación paralela a las células de CA3. Las células piramidales de CA3, reciben en sus dendritas apicales proyecciones directas provenientes de la capa 2 de la corteza entorhinal y esas proyecciones también hacen sinápsis con las dendritas de las células granulares que mandan información por medio de sus axones llamados fibras musgosas (FM) a CA3 donde las fibras hacen contactos escasos pero fuertes cerca del soma de las células piramidales. Las preguntas que han surgido son: ¿Para qué sirve esa estación? ¿Qué tanto se duplica la información en CA3?

Al igual que otros circuitos corticales el circuito hipocampal es altamente dinámico y tiene la capacidad de modificar su conectividad cambiando el número de contactos sinápticos en una manera dependiente de actividad. Las conexiones en el hipocampo pueden ser añadidas, fortalecidas, debilitadas o eliminadas en respuesta a actividad neuronal (Ramírez-Amaya et al., 1999, Moser et al., 1994).

Así como se describió la importancia de la integridad del hipocampo en casos en humanos, existen modelos animales de lesiones del hipocampo que impiden el recuerdo pero no la adquisición de tareas espaciales en el laberinto acuático de Morris (LAM) (Morris et al., 1982). Edvard Moser, en 1998, logró identificar las porciones del hipocampo involucradas entre tareas espaciales, evidenciando que el 70 % de la región dorsal del hipocampo como necesaria para adquirir de forma satisfactoria procedimientos espaciales. Se ha descrito que la integración de señales de las diferentes porciones del hipocampo puede depender de sus conexiones longitudinales (Amaral y Witter, 1989). Lo que sugiere que el aprendizaje ocurre en agrupaciones de neuronas, y es concebible que las células que participan en la codificación de la memoria de lugar se encuentren más distribuidas cuando el hipocampo se encuentra íntegro (Moser et al., 1998).

Todos los subcampos del hipocampo contienen neuronas que son moduladas por la localización del animal en un ambiente (Barnes et al., 1990). Se creía que las señales de lugar dependían de cálculos dentro de la red del hipocampo (Quirk et al., 1992), pero se cuestionó mucho este punto de vista al hacer lesiones del GD y de CA3, porque se seguían observando disparos en CA1, planteando la posibilidad de que la información espacial llegaban a CA1 por el camino directo de la proyección de la vía perforante, en las capas II y III de la CE medial (McNaughton et al., 1989). Lo que se encontró fue un conjunto de disparos sintonizados con el espacio, similar a las células de lugar pero con la diferencia de ser múltiples disparos para cada célula que se arreglan de forma triangular. Se les llama células gradilla, implicando una representación de todo el ambiente (Hafting et al., 2005). Estas se encuentran ubicadas en la CE medial y proyectan a CA1. En conjunto, las células en gradilla señalan el cambio de posición del animal con una precisión similar a la proporcionada por las células de lugar (Hafting et al., 2005). Se cree que la convergencia de varias células en gradilla con una sola neurona de los cuernos de Ammon es suficiente para dar lugar a las propiedades de las células de lugar (Canto et al, 2008). Asimismo lesiones en esta área están relacionadas con déficits en ciertos aspectos de memoria dado que proyectan a CA1.



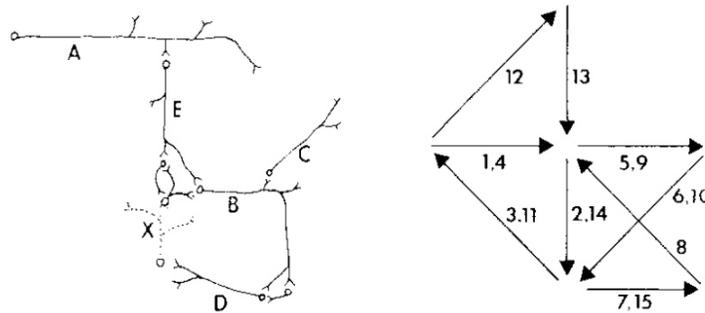
**Figura 17.** Ejemplos de registros electrofisiológicos mostrando a los campos receptivos espaciales en donde las células disparan dependiendo de la localización en el ambiente del animal. A) Registro electrofisiológico de una célula de lugar en CA de una rata en un ambiente redondo. B) Registro de electrofisiológico mostrando lugares en donde dispara una célula en gradilla de la CE. Los colores muestran la frecuencia de disparo para un campo receptivo espacial. Rojo es una frecuencia de 12 HZ y azul de 0 Hz.

#### 4.2 Modelos de procesamiento de información en el hipocampo

Ya se ha descrito el papel mnemónico del hipocampo en tareas en donde los sujetos requieren recordar su localización en el espacio. En roedores, registros electrofisiológicos de las células piramidales y granulares muestran patrones de actividad relacionados a un lugar en particular durante la exploración de ambientes espaciales y se les conoce como células de lugar (O'Keefe y Nadel, 1978) (Fig. 17). Se observan campos receptivos espaciales (patrones de actividad de las células de lugar), más definidos en esta área septal que en la región ventral donde los campos son muy grandes y su disparo es de menor frecuencia (Moser et al., 1998). Varios modelos del cómo es procesada la información junto con estudios clínicos han servido para tener una idea sólida de cómo se procesa la información y cómo es recuperada.

Edward Tolman en 1940 fue el primero en proponer la generación de mapas internos del mundo exterior, es decir la formación de memorias de episodios. Estudiaba los mapas cognitivos en animales y humanos. Demostró que los animales pueden aprender hechos o eventos del mundo y que lo podrían utilizar de forma subsecuente en otras experiencias.

En 1949, Donald O'Hebb, psicólogo canadiense, emitió la primera descripción elaborada de mecanismos por los cuales poblaciones de neuronas podrían subyacer una gran variedad de funciones cerebrales. Mostró por un lado oposición a los principios del conductismo radical y por otro, enfatizó qué ocurre entre el estímulo y la respuesta de procesos de alto nivel como la percepción, pensamiento y aprendizaje. Publicó un libro llamado "La organización del comportamiento" en el cual pretende tender un puente entre la neurofisiología y la psicología describiendo mecanismos de plasticidad sináptica. Hebb utiliza el concepto de ensamble como un conjunto de células disperso capaz de activarse brevemente ante un evento. Su visión implicaba que sólo una neurona no puede procesar información por lo que no se podría encausar alguna acción. De hecho sugiere que neuronas individuales pueden participar en distintos ensambles estando envueltas en varias representaciones. Actualmente las nuevas técnicas de registros electrofisiológicos permiten obtener registros simultáneos de hasta cientos de neuronas al mismo tiempo, lo que ha renovado las propiedades de los ensambles neuronales propuestas por Hebb (Figura 18).



**Figura 18.** Conexiones sinápticas y conexiones recurrentes. En la sección izquierda de la figura se muestra un conjunto de neuronas en las que B, D y X representan conexiones recurrentes que conducen la estimulación hacia las mismas células de donde se originó, lo cual significa que el circuito *reverbera* por un tiempo. En el panel de la derecha se esquematiza un *ensamble*. Las flechas constituyen la dirección y los números, la secuencia de los potenciales de acción entre las neuronas del circuito. Con esto se logra mostrar la posibilidad de una alternancia en la reverberación por rutas en paralelo funcional, que permiten al ensamble mantenerse activo por más tiempo (Modificado de Hebb, 2002).

Por su parte, David Marr, en 1971, realizó una integración de modelos psicológicos, de inteligencia artificial y neurofisiología para hacer un modelo sobre el procesamiento de información visual. Él propuso que para conocer al cerebro se requiere de un entendimiento de los problemas con los cuales éste se enfrenta y las soluciones que encuentra. También tiene una

visión general del papel del hipocampo en la memoria contemplando tanto la estructura anatómica como la visión psicológica de la estructura. Suponía que el hipocampo actuaba como un contenedor temporal de memoria. En donde los eventos son representados por patrones de actividad en unas poblaciones selectas de neuronas y de forma subsecuente la presentación de una pequeña parte de lo previamente establecido debe de permitir la reconstrucción completa del evento en términos de actividad celular. El modelo conceptual básico de Marr es la combinación de elementos del aprendizaje asociativo y el aprendizaje competitivo. En donde cada evento es representado por un patrón de actividad particular en las fibras de entrada de las células A. La ocurrencia de un evento causa el mapeo para construir en un segundo conjunto de células B sobre las cuales proyecta el grupo A con modificaciones en las sinápsis entre ellos. También describe que es posible que haya capas intermediarias, en donde las células del grupo B regresan conexiones para contactarse con A, a través de modificaciones sinápticas. Durante el proceso de recuperación de la información un evento almacenado debiera ser suficiente para activar a células de B que originalmente respondían al almacenaje para recrear el patrón completo original de disparo sobre la población de A. Las células de B responden en patrones de actividad que corresponden a partes de patrones ya establecidos. Marr describe la necesidad del porqué una estructura especializada en almacenaje transitorio es necesaria y supone que es una unidad complementaria a la neocorteza responsable de almacenaje instantáneo de nuevos datos mientras van llegando. Propone que la función de las células piramidales de la neocorteza es reconocer y clasificar la información que se va incorporando, así como descartando información de acuerdo a la relevancia que tenga con respecto a la experiencia del animal. En su artículo del hipocampo, argumenta que sería ineficiente establecer información transitoria en una memoria permanente de la neocorteza hasta que se sepa qué características de la nueva información son requeridas.

Igualmente, la conectividad neocortical puede que no sea lo suficientemente extensa para permitir asociaciones entre 2 células piramidales. Marr pensaba en términos de estados discretos de memoria, habiéndose dedicado en gran parte a cálculos sobre capacidad mnemónica, teniendo que considerar al mismo tiempo la actividad neuronal escasa del cerebro. De forma tal que para poder recuperar cada memoria a partir de piezas o claves surge un efecto colateral que es el papel potencial en el completamiento de patrones de conexiones recurrentes de CA3. Es curioso que Marr nunca otorgara un papel para el GD durante el procesamiento de información.

A principios de los años 90 Treves y Rolls formularon un modelo de almacenamiento de memoria en donde al circuito de CA3 se le asigna un papel de formar memorias de eventos discretos. Y postulan que para cualquier evento nuevo que ha sido memorizado existe un patrón de disparo de las células piramidales de CA3 y que su alta conectividad intrínseca formada por los axones colaterales de CA3 hacia otras células en CA3 permite el inicio de la recuperación de un episodio completo por la activación de pequeñas unidades que forman partes de esas representaciones. CA3 es considerado que opera de forma auto-asociativa, es decir que se recuperando patrones de activación completos a partir de patrones de entrada, en donde cada uno de los patrones de entrada forma una asociación con el patrón correspondiente de salida. Representaciones neuronales de diferentes eventos o episodios experimentados por el organismo serán establecidos y serán recuperados con una muestra de actividad neural. Rolls ha propuesto que la razón por la cual el hipocampo procesa tanto memoria de tipo espacial y no espacial es porque el procesamiento de estas memorias es, hasta cierto, punto análogo. Sugiere que en el momento en que la información se encuentra siendo procesada, CA3 actúa de forma auto-asociativa, permitiendo a las neuronas de CA3 generar episodios y escenas espaciales. El termino auto-asociativa se refiere a que las conexiones tienen la capacidad de modificarse en donde la fuerza de una conexión corresponde con la eficiencia sináptica (Hebb, 1940). Este fenómeno implica la capacidad de recuperar una memoria completa a partir de un simple elemento que la conforma.

La adición de neuronas en esta área provee una dimensión plástica distinta a la circuitería hipocampal existente (Schinder y Gage, 2004). Es por eso necesario conocer cómo ocurre este fenómeno.

### **4.3 Neurogénesis en el giro dentado y su papel en la memoria**

Las condiciones en las que las nuevas células granulares sobreviven se han ido descrito en varios estudios, en los cuales, se ha demostrado que durante las primeras 4 semanas de vida se determina el destino de sobrevivencia de estas células (Kempermann et al., 2003). Se ha descrito que en un día el número de nuevas células observado es de 9000 (Cameron and McKay, 2001). Este número disminuye dramáticamente después de 2 semanas, llegando a un decremento del 80 % de la población de las nuevas células (Gould y Gross, 2002, Kempermann et al., 2003).

Se ha demostrado que la estimulación de los animales con tareas dependientes del hipocampo incrementa la sobrevivencia de las nuevas células cuando dichas conductas ocurren hacia los 10 días después de que dichas células nacieron (Gould et al., 1997; Gould et al., 1999). Esto nos sugiere que las nuevas células podrían incorporarse funcionalmente a la red gracias a la conducta, pero sí éste es el caso, las células deben de ser capaces de responder a la conducta en dicho periodo de su maduración. Se ha confirmado que la sobrevivencia de las neuronas nuevas es regulada por la experiencia del animal. Después de 4 semanas de la administración de BrdU, se observaron muchas neuronas nuevas después de un periodo largo en un ambiente enriquecido (Kempermann et al., 1997). En este experimento se sugiere que el ambiente enriquecido proporciona diferentes posibilidades plásticas para la generación de mapas espaciales en comparación con vivir de forma aislada en una caja (van Praag et al., 2000).

Estudios subsecuentes han examinado si el aprendizaje afecta la sobre vivencia de las nuevas neuronas, encontrándose resultados contradictorios, en unos casos mueren y en otros sobreviven a largo plazo. Es posible que esto sea por las técnicas empleadas en la administración del BrdU, es decir, las neuronas nuevas han sido marcadas en diferentes tiempos en relación a la conducta, postulándose de esta forma un periodo de crucial importancia entre la regulación dependiente de experiencia y la sobrevivencia de las neuronas nuevas.

Para conocer el papel de las neuronas nuevas en el procesamiento de información hipocampal, se han llevado a cabo experimentos en los cuales la división celular ha sido bloqueada con diversas técnicas. Shors y colaboradores, en el 200, utilizaron un antimetabólico llamado acetato metilazometanol (MAM), el cual provocó un déficit en una tarea dependiente del hipocampo, condicionamiento de parpadeo que es una tarea en donde el animal debe de asociar estímulos separados en el tiempo. Lo interesante es que este procedimiento sólo afectó a este tipo de aprendizaje y no al condicionamiento de miedo al contexto, ni a la memoria de una tarea espacial en el (LAM). La contribución de las neuronas nuevas también ha sido evaluada con radiación de rayos gama ( $\gamma$ ) (Snyder et al., 2005), en donde se observa depleción específica de neuronas nuevas y el resultado conductual es que los animales si pueden adquirir la tarea en el LAM. El efecto que sí fue observado fue que la inducción de LTP en estos animales es más bajo.

Esto debido a que es necesario la subunidad NR2B del receptor *N-metil D-aspartato* (NMDA), que es fundamental para la memoria y plasticidad a largo plazo.

Otro acercamiento ha sido el uso de lentivirus (Jessberger et al., 2009) en donde se inhibió la vía de WNT que está críticamente relacionada con la generación de neuronas nuevas. Se encontró un efecto dependiente del nivel de neurogénesis para la retención de una tarea en el (LAM). En donde niveles bajos de neurogénesis estuvieron relacionados con peor ejecución en la tarea. De esta manera, la tarea de reconocimiento de objetos mostró déficits.

Todos estos experimentos de ablación muestran relaciones directas o indirectas para tipos particulares de aprendizaje, pero aún no se conoce la forma en que las nuevas células procesan la información.

Muchos investigadores se han cuestionado si las neuronas nuevas están meramente reemplazando a las neuronas maduras o hacen contribuciones únicas en funciones cerebrales específicas que no pueden ser procesadas por las neuronas previamente existentes.

Siguiendo este punto de vista, Aimone y Gage han ido generando una hipótesis del funcionamiento de las neuronas nuevas. Ellos sugieren que las neuronas nuevas procesan la formación de asociaciones temporales. Y discuten la posibilidad de un impacto cognitivo de esta población que va cambiando de forma gradual. Cuando la memoria se va generando, se van formando grupos temporales de episodios a largo plazo. Igualmente han probado de forma teórica que la neurogénesis puede contribuir de 3 maneras en la formación de la memoria. Al principio, las neuronas nuevas inducen un grado de similitud entre las memorias aprendidas al mismo tiempo. A este proceso se le conoce como integración de patrones. En segundo lugar la maduración y el cambio en su excitabilidad hacen de esta característica un efecto dependiente del tiempo, apoyando la posibilidad de que la información temporal es incluida en nuevas memorias del hipocampo. Finalmente, sugieren que la adición de neuronas puede ser dependiente de experiencia resultando en una red en donde el GD codifica nuevos recuerdos en situaciones cotidianas tratando a los nuevos contextos de forma distinta, es decir separando patrones. En conjunto, estos resultados indican que las nuevas células granulares pueden afectar la función del hipocampo en varias maneras únicas que antes eran impredecibles. Su modelo apoya observaciones biológicas en donde las neuronas nuevas se reactivan por experiencia previa, utilizando GEI. También sugieren que el GD es una estructura que ha desarrollado un código o representación de eventos experimentados en la vida temprana.

Por otro lado, Alme y colaboradores en el 2010, proponen que las neuronas nuevas representan una población funcional de células granulares del GD, mientras que las viejas o pre-existentes se "jubilan". Esto se sugiere debido a las características de excitación de las neuronas nuevas en donde exhiben un periodo de excitabilidad aumentada en un periodo de las 2 semanas hasta los 5 meses. Entonces esta población podría participar en generar representaciones en CA3, después se vuelven inactivas para eventos futuros. Esta jubilación o retiro haría de eventos temporalmente dispersos, menos correlacionados en comparación con los que ocurren en una estrecha ventana de tiempo. Esto implica que las neuronas nuevas hacen separación de una forma sofisticada cuando se les añade un componente temporal.

## Capítulo 5

### **Integración funcional de las neuronas nuevas que nacen en el animal adulto a redes neuronales que procesan información proveniente de la experiencia**

La integración funcional de las neuronas nuevas comenzó a ser estudiada desde 1984 en aves por Fernando Nottebohm. Esto se realizó con la administración de [<sup>3</sup>H] timidina tritiada y después de un periodo de tiempo en el que podrían haberse integrado funcionalmente las neuronas nacidas durante la disponibilidad de este marcador, registró con pipetas de vidrio a neuronas en el área del canto, después de lo cual las inyectó con una solución de peroxidasa de rábano. Observó que las células que eran positivas a timidina y que habían sido inyectadas con la peroxidasa, resultaban ser neuronas nacidas en el adulto a las que había registrado exitosamente. Los registros de células nuevas mostraron que estas neuronas presentaban potenciales sinápticos depolarizantes ante un estímulo auditivo, lo que demostró que las neuronas nuevas de la región del canto nacidas en el ave adulta forman parte de circuitos neuronales funcionales.

Hacia principios de la década de los 2000, se realizaron experimentos semejantes en el hipocampo en los que, con el uso de un retrovirus acoplado a GFP, se identificó a las neuronas nuevas integradas en el GD del animal adulto, y mediante el uso de pipetas de vidrio se registró a las neuronas del GD ante estimulación experimental de la vía perforante; a las células registradas se les infundía un marcador fluorescente en el espectro del rojo (Cy3). De esta manera observaron que las células nuevas de 6 meses de edad presentaban características electrofisiológicas muy similares a las de células granulares maduras (van Praag., et al 2002), particularmente importante fue el hecho de haber observado una clara respuesta a la estimulación de la vía perforante, por lo que concluyeron que las neuronas nacidas en el GD del animal adulto estaban integradas funcionalmente a la red.

Sin embargo, quedaba todavía abierta la pregunta sobre si esta integración funcional permitía o no a las neuronas recientemente integradas responder ante la estimulación sensorial o conductual y determinar si las características de esta respuesta eran o no semejantes a la que presentan las neuronas que se integraron durante el desarrollo temprano. La respuesta a esta pregunta, no era fácil de obtener, con el uso de la electrofisiología; el reto era prácticamente inalcanzable. Debido a 2 razones, una es que el número de células granulares que responde a la

conducta es menor al 4% del total de células granulares del GD, y la segunda es que la estrategia de marcaje retroviral con la que se puede fácilmente combinar la caracterización electrofisiológica sólo marca aproximadamente al 50% de las neuronas que se están dividiendo.

Al calcular la probabilidad de encontrar neuronas nuevas con el retrovirus, que además respondan a la conducta vemos que la probabilidad de encontrar una nueva neurona que responda a la conducta es  $< 0.15$ , esto significa que deberíamos de registrar cientos de neuronas con pipetas durante la ejecución de una conducta y marcarlas a todas ellas de una manera tal que podamos identificarlas posteriormente, lo que no es posible con las herramientas metodológicas disponibles actualmente. De hecho, debido a la baja probabilidad de marcaje que tiene el retrovirus, van Praag en el 2002, tuvo que someter a sus animales a una rueda de actividad para incrementar la proliferación celular y aumentar así la probabilidad de registrar células nuevas.

La alternativa que algunos grupos de investigación eligieron para estudiar la actividad de poblaciones de células nuevas integradas en el animal adulto fue la de detectar la expresión de genes inmediatos tempranos. El primer trabajo en donde combinan la detección de neuronas nuevas con la detección de la expresión de un gen inmediato para identificar a las células que presentan actividad neuronal en respuesta a la conducta, fue el reportado por Jessberger & Kempermann en el 2003. En este trabajo estimularon a todas las células granulares con Kainato y PTZ, y así determinaron que las neuronas nuevas expresaban cFos y Zif268 desde 25 días después de nacidas, y observaron también que tanto las neuronas recientemente integradas como las nacidas postnatalmente podían expresar ambos genes inmediatos en respuesta a la experiencia de una tarea de laberinto de agua (Jessberger & Kempermann, 2003). En el BO se observó que un aprendizaje de discriminación olfatoria promueve la expresión de Zif268 en las nuevas células olfatorias de ratones (Alonso et al., 2006). Ambos trabajos demuestran que las neuronas nuevas expresan genes inmediatos, pero la falta de controles no estimulados en donde se mida con precisión el número de neuronas que expresan genes inmediatos y se compare con los sujetos estimulados, impide concluir que dicha expresión este ocurriendo en respuesta específica a la estimulación sensorial o conductual.

Un gen de expresión inmediata altamente confiable para identificar a las células que se activan por la conducta de exploración espacial se conoce como “*Activity Related Cytoesqueletal protein*” o Arc (Lyford, et al., 1995), también conocido como Arg 3.1 (Link, et al., 1995). Este

gen se induce por actividad neuronal de alta frecuencia, su expresión es dependiente de NMDA, se induce con BDNF y la actividad del promotor depende de CREB y otras moléculas que se activan por flujos de calcio. Con este gen se desarrolló el análisis compartamental de la actividad mediante hibridación insitu fluorescente o catFISH (por sus siglas en inglés), el cual es un método para estudiar la historia de actividad de las neuronas, ante la estimulación con eventos separados por un intervalo de tiempo de 30 min (Guzowski, et al., 1999; Vazdarjanova, et al., 2003; Ramírez-Amaya, et al., 2005). Mediante el uso de catFISH se pudo determinar que el mismo número de neuronas que responde con actividad y presenta campos receptivos espaciales en una situación de exploración espacial, es el mismo número de neuronas que expresa Arc en respuesta a las mismas condiciones conductuales (Guzowski, et al., 1999; Vazdarjanova, et al., 2003; Ramírez-Amaya, et al., 2005).

En 2005, Ramírez-Amaya y colaboradores observaron que en la rata adulta se puede detectar la expresión de la proteína de Arc en el GD después de la exploración espacial en un número de células igual al que expresa el mRNA. Lo que implica que el gen Arc es un excelente marcador de actividad neural, dado que proporciona de información sobre dónde cuándo y cuáles neuronas se activaron (Okuno et al., 2011).

La integración de las células a una red neuronal ha sido observada con la transcripción de ARN mensajeros de genes de expresión inmediata como cFos, Zif 268, (Jessberger y Kempermann), Homer 1a (Vazdarjanova et al., 2002) y Arc (Guzowski et al., 1999). Este método ha permitido identificar a las unidades celulares que resultan activadas de manera conductual, incluso pudiendo hacer discriminación entre eventos temporales (Guzowski et al., 2001b). El uso de estos genes en combinación con el uso del marcador de proliferación BrdU ha permitido realizar experimentos para ver si las neuronas nuevas se activan con el uso de estimulación conductual con un LAM; (Jessberger et al., 2008; Kee et al., 2006), ambientes enriquecidos (Kempermann et al., 1997; Tashiro et al., 2006), estimulación farmacológica con ácido kaínico (KA) (Jessberger et al., 2008, Snyder et al., 2011) o induciendo actividad electroconvulsiva con pentylenetetrazol (PTZ) (Jessberger et al., 2008).

Se sabe que la fase tardía de la LTP y la formación de memorias estables dependen de la transcripción de genes y de la expresión de nuevas proteínas. Los primeros que son los GEI incluyen a Zif 268 y Arc que se expresan después de varios minutos de la LTP o de exploración

espacial (Guzowski et al., 2000; Chawla et al., 2005). De forma consistente con los registros, una fracción significativa de la población hacia las 2 semanas post división, expresa Zif268 después de la LTP (Bruehl-Jungerman et al., 2006). También se ha visto que la exploración espacial en un ambiente novedoso genera la expresión de Zif268 y otros GEI en neuronas nuevas que tenían entre 2 y 5 de nacimiento (Jessberger y Kempermann 2003).

Estudios recientes, utilizando la expresión de Arc y c Fos como indicadores de actividad neural, sugieren que las neuronas nuevas pueden ser reclutadas de forma preferencial en circuitos que procesan información espacial así como la formación de la memoria. (Kee et al., 2007, Ramirez-Amaya et al., 2006; Tashiro et al., 2007).

Se ha podido determinar que las nuevas células de animales que vivieron en ambientes enriquecidos por ciertos periodos y después vivieron en condiciones normales se activan al volver a presentarse en esta misma condición (Tashiro et al., 2007).

El GEI Arc-Arg3.1 (*Activity related cytoskeletal protein*) y la expresión de su proteína se han utilizado como una estrategia para poder observar poblaciones neuronales que responden ante un episodio conductual. Sus patrones de expresión son congruentes con datos electrofisiológicos (Wang et al., 2006). Además es importante mencionar que la expresión de Arc es exclusiva de neuronas (Vazdarjanova et al., 2006), lo cual no es el caso del gen de expresión temprana cFos (Arenander et al., 1989). Por estas razones es más confiable estudiar los patrones anatómicos de la actividad neuronal con el uso de la proteína Arc (Guzowski et al., 1999; Vazdarjanova et al., 2002; Ramirez-Amaya et al., 2006a). Resultando una ventaja para estudiar a las células que presentan campos receptivos espaciales. Las mismas células que expresan el ARNm lo traducen a proteína, validando la detección de su proteína.

Arc es un gen de expresión inmediata temprana efector, lo que significa que está implicado en funciones celulares o modificaciones celulares, relacionado a la actividad neuronal. Se ha observado que después de un estímulo tipo LTP el ARNm de Arc es distribuido de forma rápida a lo largo del árbol dendrítico. En el GD el ARNm se induce en el cuerpo celular en la CCG a los 15 minutos de la alta estimulación y hacia los 30 minutos se encuentra en la capa molecular que contiene a las dendritas (Chawla et al., 2005). La proteína de Arc es observada en las dendritas distales 1 hora después del estímulo (Lyford et al., 1995). Tanto el ARNm como la proteína se distribuyen a lo largo de las dendritas y se ha sugerido que la proteína es sintetizada

localmente en las dendritas (Guzowski et al., 1999). Después de su transcripción, el ARNm de Arc se localiza selectivamente en la región dendrítica que recibió la aferencia sináptica que dio inicio a la transcripción (Guzowski et al., 1999). Se ha propuesto que participa en rearrreglos dendríticos estructurales, lo que sugiere que participa en la estabilización de la experiencia conductual, incluso (Rosi et al., 2005; Weiler y Greenough et al., 1993) se sugiere que Arc tiene una relación particular con receptores de glutamato en las espinas de las neuronas del hipocampo.

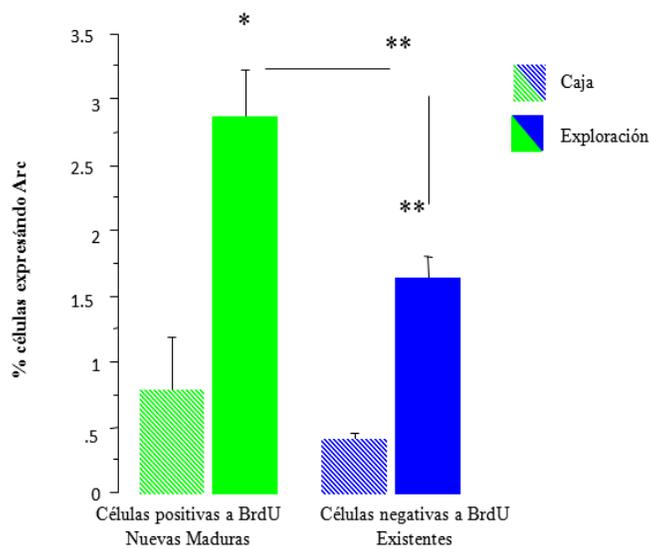
Por otro lado se ha descrito que la proteína de Arc es una de las pocas que regulan a la alza el tráfico de los receptores AMPA, e incluso estos receptores muestran una regulación transcripcional del mRNA de Arc. Actualmente se considera que en espinas dendríticas no activas disminuyen los cambios en procesos sinápticos, esto se basa en la interacción de CaMKII con Arc causando la endocitosis de receptores AMPA para borrar los cambios que ocurrieron de manera inespecífica, mientras que en las espinas activas, CaMKII no interactúa con Arc, lo que confiere alta actividad de cinasa y permite que ocurran modificaciones estructurales de manera que CaMKII actúa como un interruptor entre los grados de flujo de  $Ca^{++}$  (Donai et al., 2003). Además, Arc es necesario para el mantenimiento, pero no para la inducción de la potenciación a largo plazo, y de la memoria a largo plazo (Lyford et al., 1995).

Utilizando Arc como marcador de actividad junto con otros anticuerpos es posible identificar a neuronas nuevas y maduras utilizando BrdU y NeuN. Si bien se conoce que las neuronas nuevas se integran de forma anatómica y fisiológica a la red del hipocampo, no había sido claro si estas neuronas se integraban funcionalmente a la red de manera que respondieran a una conducta en particular a una experiencia de exploración espacial.

Teniendo como fundamento las cualidades plásticas de Arc, se ha observado que cuando las nuevas células tienen 5 meses de maduración, responden a la conducta de exploración de manera más sensible que las células pre-existentes (Ramírez-Amaya et al., 2006) (Fig. 17). Esto confirma la idea de que las nuevas células granulares están funcionalmente integradas a la red neuronal, de tal forma que son capaces de responder a la conducta expresando Arc. Estos hallazgos sugieren que las células nuevas que expresan esta proteína pueden mantener características plásticas diferentes al resto de la población de células del giro dentado (Schmidt-

Hieber et al., 2004) por un largo periodo de tiempo (Guzowski et al., 2001a; Plath et al., 2006; Shepherd et al., 2006).

Lo interesante es que las células nuevas maduras presentan una alta probabilidad de responder a la conducta, lo cual coincide con la idea de que las neuronas nuevas son más plásticas, requieren de una baja estimulación para disparar (van Praag et al., 2003, Schmidt-Hieber et al., 2004). Esta característica particular de las neuronas nuevas puede tener implicaciones importantes para explicar la función que cumplen ya que se ha sugerido que estas pueden ayudar al GD a llevar a cabo la separación de patrones por escalas de tiempo en el orden de días (Aimone et al., 2006). Sin embargo, es importante resaltar que esta alta sensibilidad a la conducta (Schmidt-Hieber et al., 2004, Ramírez-Amaya et al., 2006) no se ha descrito cómo es que evoluciona en el tiempo, se ha sugerido que las neuronas nuevas pueden ser mucho más sensibles y por lo tanto más plásticas antes de los 5 meses, esto es alrededor de las 2-6 semanas (Kee et al., 2007; Tashiro et al., 2007; Ge et al., 2007).



**Figura 19.** La proporción de células expresando Arc y BrdU en una población de neuronas nuevas comparada con la proporción de células expresando Arc en una población existente de neuronas granulares (Modificado de Ramírez-Amaya et al., 2006)

Tashiro y colaboradores en el 2007 observaron que células de sólo 2 semanas son preferencialmente reclutadas en circuitos que procesan información de experiencia de un ambiente enriquecido, lo que se ha descrito que promueve la sobrevivencia de las neuronas

nuevas. Con todas estas aproximaciones sigue quedando abierta la pregunta de cuándo se desarrolla la respuesta específica a la conducta.

Por su parte, Kee en el 2007 observó que células de 6 semanas eran reclutadas en circuitos expresando c-fos, este trabajo es de los primeros en mostrar que las nuevas células responden a una conducta, en este caso una tarea espacial. Sin embargo, este diseño experimental no resulta adecuado, dado que utilizan una estrategia de reclutamiento de unidades neuronales, previa a la conducta en donde ven la expresión de c-fos. Esto no permite saber el momento específico de la maduración en que las células responden a la conducta.

Además de que no tienen los controles intactos para comparar de forma precisa como nosotros que tenemos un grupo control para cada punto temporal.

Para poder resolver la pregunta de cuándo es que comienzan las nuevas células a formar parte de una red, la investigación en neurogénesis se ha enfrentado a problemas metodológicos, esto es debido a que la cantidad de neuronas nuevas que sobreviven y maduran es muy reducida, por lo que encontrarlas dentro del GD es muy difícil, además de que ya es conocido que sólo el 2 % de células responde a la conducta (Ramírez-Amaya et al., 2006) (Figura 18). Es por eso que no es recomendable el uso de registros electrofisiológicos. Esto ha hecho a la comunidad científica encontrar técnicas que permitan abordar el problema de la relevancia conductual de las neuronas nuevas.

## Capítulo 6

### Planteamiento del Problema

De acuerdo a los datos del trabajo de Jessberger y Kempermann en 2003, se sugeriría que sólo hasta después de 25 días las nuevas células serían capaces de responder ante un evento conductual expresando genes inmediatos.

Ramírez-Amaya y colaboradores en el 2006, demostraron que las células nuevas son capaces de responder ante una conducta de exploración y que se encuentran funcionalmente incorporadas a la red de comunicación neuronal del hipocampo. Expresando Arc después de 5 meses de su nacimiento. En particular hay más células nuevas expresando este gen que las células ya existentes, sugiriendo que las nuevas son más sensibles a la exploración.

Si bien se sabe que para los 5 meses las células son responsivas, nos interesa conocer cuándo ocurre la integración funcional de las neuronas nuevas que se originan en el giro dentado del hipocampo. La pregunta que surge es:

¿Cuándo es que las nuevas células granulares que nacen en el hipocampo adulto son capaces de activarse en respuesta a la conducta?

Para conocer a esta duda nos dimos a la tarea de evaluar distintas generación de neuronas nuevas para identificar el momento en que la expresión de Arc es específica a la conducta. De aquí se originó la siguiente hipótesis.

**Hipótesis:** La expresión de Arc debe de presentarse a la par que los marcadores de neuronas maduras, es decir desde los 15 días.

**Objetivo:** Identificar el momento de la maduración de las neuronas nuevas en el que se integran funcionalmente a redes relevantes para la conducta de exploración, expresando la proteína de Arc.

## Métodos

**Sujetos:** Treinta y cinco ratas de la cepa Wistar macho, de 4 meses de edad, fueron adquiridos en el bioterio del Instituto de Neurobiología. Fueron mantenidas de forma individual en cajas con libre acceso a comida y agua. La luz del vivario fue mantenida con un ciclo invertido 12:12 encendiéndose las luces a las 9 AM. Los animales fueron habituados a las condiciones del espacio y manipulados por 8 días antes de la ejecución del experimento.

**Administración de BrdU:** Dado que nuestro objetivo es establecer de forma precisa el día en que las neuronas nuevas son capaces de responder a estimulación conductual, comparamos diferentes procedimientos de administración para detectar el mayor número posible de células que nacen en un día. Encontramos que 200mg/kg suministrado en cuatro administraciones (50mg/kg) cada cuatro horas es donde se observan más células BrdU positivas se observan en la zona subgranular del GD comparado con otros protocolos de administración (datos no mostrados). La administración comenzaba a las 9:30 AM y terminaba a las 21:30 del mismo día. Después de las inyecciones de BrdU, los animales permanecieron en su caja habitación hasta que se cumplió el periodo de tiempo que se dejó para la maduración de las células y para llevar a cabo la experiencia conductual de exploración.

**Exploración Espacial:** Para poder analizar la capacidad de respuesta de las neuronas ante exploración espacial en diferentes puntos de la maduración de estas células 1, 7, 15, 30 y 45 días después de la administración de BrdU, los animales fueron expuestos a una tarea de exploración forzada a campo abierto en una sesión de 5 minutos (n=5, 4, 4, 4 y 3 respectivamente) y sacrificados 30 minutos después de la experiencia (Ramírez-Amaya, et al., 2005; Ramírez-Amaya, et al., 2006). Usamos 3 animales control de caja para cada punto temporal y se mantuvieron sin mover en su caja después de la administración de BrdU y fueron sacrificados al cumplir los periodos sin haber tenido la experiencia conductual. Todos los animales fueron manipulados 10 días antes de la experiencia conductual con excepción del día previo a la exploración. Se utilizó un ambiente cuadrado de acrílico transparente de 70 X 70 cm con paredes 30 cm. Todas la paredes fueron forradas y el piso fue dividido en 9 con líneas negras por fuera de la caja. Cada rata fue transportada de forma individual al área de conducta envuelto en una toalla y expuesto al ambiente. El ensayo consistió en colocar al animal en el

centro de un cuadrante y dejarlo libre por los siguientes 15 segundos para llevarlo al cuadrante que correspondiente. El orden de la visita a cada cuadrante se estableció de forma aleatoria manteniendo el mismo orden para cada animal, de esta manera, se colocaba al animal viendo al norte, a los 15 segundos se cambiaba al siguiente cuadrante pero viendo al sur y así sucesivamente. Al final de los 5 minutos cada cuadrante fue visitado de 2 a 3 veces. Inmediatamente después se regresaba al animal a su caja habitación y se esperaban 30 minutos para la obtención del cerebro (Figura 1 en Sandoval et al., 2011).

**Obtención del cerebro:** Se utilizó un sólo hemisferio del cerebro el cual fue seccionado con una matriz de acero (*Electron microscopy sciences*) con divisiones cada milímetro. Se quitó el bulbo olfatorio y el cerebelo. Se colocaron de 8 a 10 hemicerebros (por cuestión de espacio) en un molde formando bloques y fueron mantenidos con Tissue-Tec (Sakura Finetek, Torrance CA). Cada bloque contenía un hemicerebro de cada grupo conductual localizado en diferente posición por bloque. Se obtuvo un total de 4 bloques que fueron crioseccionados a 20  $\mu\text{m}$  de forma coronal a  $-18^{\circ}\text{C}$  en un criostato CM 1850 de Leica (Nussloch, Germany). Las secciones eran adheridas a portaobjetos (Lauka) que previamente fueron tratados con una solución de silano-acetona. Al terminar los cortes se almacenaron en un ultracongelador  $-70^{\circ}\text{C}$ . Los hemicerebros contralaterales también fueron colocados en bloques e igualmente fueron procesados.

**Inmunotinción:** Para poder maximizar la detección de BrdU en las células que expresan Arc, se eligieron de 20 a 30 cortes del hipocampo dorsal. Se utilizó un rango de entre -2.60 a -4.3 con respecto a Bregma para cada bloque.

Se realizó un protocolo de triple detección para NeuN, que detecta neuronas maduras, proteína de Arc para visualizar neuronas activadas y BrdU para ver a las células que tuvieron división similar a lo previamente descrito (Ramírez-Amaya, et al., 2006). El tejido fue fijado en Paraformaldehído al 2%, pH 7.4, por 8 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , 3 lavados en TBS pH 7.0. La acción de la peroxidasa se bloqueó con  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 2 % disuelto en TBS por 15 minutos. Se bloqueó el tejido con el sistema de amplificación de tiramida que es un concentrado de proteínas principalmente cisteína (TSA Perkin Emer). Las laminillas fueron secuencialmente incubadas con un anticuerpo hecho en ratón anti NeuN biotinilado para observar neuronas maduras (1:2000 Chemicon Bedford, MA). El segundo marcaje se llevó a cabo con un anticuerpo policlonal hecho en conejo anti Arc (1:500 que fue obtenido del laboratorio del Dr. Paul Worley, Universidad John

Hopkins). Y como tercer marcador se utilizó un anticuerpo hecho en ratón anti BrdU monoclonal (1:100 BD Biosciences México). Después de la detección de NeuN previo a la detección de Arc, los tejidos fueron permeabilizados con una solución de acetona con metanol 50:50 (Sigma) a 4°C por 15 minutos. Para la detección de BrdU el ADN fue desnaturalizado con formamida al 50% disuelta en 2 X SSC (Sigma) a 65 °C por dos horas, después se lavaron con 2 X SSC por 10 minutos, le siguió una incubación en 2N HCL a 37°C por 30 minutos, y un lavado en 0.1 M de ácido bórico pH 8.5 por 10 minutos. El anticuerpo biotinilado para NeuN fue detectado con el kit de amplificación avidina + biotina AB (Vector laboratories Burlingame) y revelado cianina 5 (Cy5) del sistema de fluorescencia TSA de Perkin Elmer. Antes de la detección de la proteína de Arc se bloqueó a los tejidos con los productos de bloqueo de Vector que son 2 soluciones A y B, a las cuales los tejidos fueron incubados de forma separada por 15 minutos respectivamente. Esto con el fin de bloquear el AB remanente de la amplificación de Cy5. Para la detección del anticuerpo de Arc, se utilizó un segundo anticuerpo biotinilado hecho en conejo (Vector). Las laminillas se bloquearon con el sistema A y B de Bloqueo (Vector) y amplificadas con el sistema AB de Amplificación (Vector) y la señal final fue detectada con Cy3 del sistema de fluorescencia TSA de Perkin Elmer. La IgG de ratón se bloqueó con el sistema MOM de Vector (Mouse on Mouse, Ratón en Ratón). Se continuó con la detección del anticuerpo BrdU con un anticuerpo hecho en ratón biotinilado, y la señal final fue amplificada con el sistema AB de amplificación (Vector) y con FITC del sistema de fluorescencia TSA de Perkin Elmer. Finalmente se llevó a cabo una contratinción con DAPI 1: 1000.

Con el objeto de conocer el linaje celular de las nuevas células en los primeros momentos de la maduración se llevó a cabo una doble inmunotinción anti doble cortina DCX y anti BrdU. Primero se llevó a cabo la detección de BrdU como se describió arriba. Se utilizó un anti DCX hecho en cabra 1: 200 (Santa Cruz) y se reveló con un anticuerpo anti cabra biotinilado 1:200; amplificado con AB y revelado con Cy3. Para todos los anticuerpos se llevaron a cabo control de tinción negativa y no se encontró señal en la ausencia de anticuerpos. Al terminar las tinciones se montaron con cubre objetos usando el medio de montaje Vectashield (Vector).

**Imagenología:** Se utilizó MosaiX módulo del sistema APOTOME (Carl Zeiss, México D.F. México). Se recurrió al uso de un objetivo 25X/0.80NA LCI Plan-Apochromat de inmersión en aceite. Y se obtuvieron imágenes en mosaicos con secciones ópticas de 1.5 µm de todo el GD. Dependiendo de la altura septotemporal del corte se usaban entre 8 y 12 tomas para armar el

GD con el MosaiX. Alrededor de 15 regiones de GD fueron utilizados de forma serial para cada animal lo que correspondió a  $\sim 450\mu\text{m}$  del hipocampo dorsal. La región más anterior se obtuvo en  $\sim 6.0\text{mm}$  desde la coordenada interaural y la más posterior fue tomada en  $\sim 4.7\text{mm}$ .

Utilizamos el programa de cómputo Metamorph para el análisis de las imágenes obtenidas. Se construyó una imagen en 2D utilizando el plano medio de las secciones ópticas, y fue utilizada como referencia en donde el GD fue dividido en 4 partes equidistantes (Figura 7 en Sandoval et al., 2011). La primera división corresponde a la zona subgranular (ZSG) y las otras 3 corresponden a las partes interna, media y externa de la capa granular del GD. Es importante aclarar que el grosor de la capa granular varía a lo largo del GD, por esta razón la proporción de la distancia entre cada división fue ajustada, asegurándonos que cada región midiera el 33% del grosor de la capa granular. Este procedimiento se llevó a cabo con la intención de analizar la posición de las nuevas células granulares a lo largo de la capa granular. Mientras tanto el MosaiX fue utilizado para identificar a las células NeuN positivas (Cy5), BrdU positivas (FITC) y la proteína de Arc positivas (Cy3).

Las células BrdU positivas que co-localizan con NeuN en animales que pertenecen al grupo de 15 días después de la administración del BrdU y de ahí en adelante. El BrdU co-localiza principalmente con DCX. Fueron muy pocas las células BrdU positivas que no colocalizaron con DCX del día 1 al 15. Y la mayoría de las células BrdU positivas que co-localizan con NeuN van desde el día 15 en adelante, que es similar a lo reportado anteriormente (Ramírez-Amaya et al., 2006), en donde las células sin DCX o sin NeuN representan  $\sim 10\%$  del total de las células BrdU positivas. Por esta razón incluimos todas las células BrdU positivas en el estudio. La tinción de NeuN fue utilizada para delinear la capa granular del GD. Las células Arc positivas fueron consideradas como las neuronas activadas tras la exploración espacial. Cada célula clasificada como BrdU positivas, Arc positivas o ambas fueron marcadas en una imagen de referencia, en la cual se indicaba su posición en la capa granular. Después de la clasificación se calculó el volumen de la capa granular, teniendo como referencia el tamaño de la sección en Z y el área de la capa granular del GD. Con el volumen de la capa granular, se pudo estimar el total de células granulares para cada animal como lo fue descrito anteriormente (Ramírez-Amaya et al., 2006, Rosi et al., 2005). Contabilizamos alrededor de 80,000 células granulares por animal que fueron incluidas en el análisis. Con este número fue posible calcular las proporciones de células BrdU positivas, las células que expresaron Arc y de las co-localizadas.

**Estadística:** Se usó ANOVA de una vía o MANOVA cuando fue apropiado para comparar la proporción de células BrdU positivas, Arc positivas y BrdU positivas y sólo Arc positivas para todas las condiciones a lo largo de la capa granular.

## Resultados

### Distribución de las neuronas nuevas en la capa de células granulares

La proporción de células BrdU positivas varía de forma notable a lo largo de la capa supra piramidal del giro dentado a lo largo de los diferentes puntos de maduración ( $F_{4,30} = 29.771$ ,  $P < 0.001$ ) (Fig. 2 C en Sandoval et al., 2011). Un día después de la administración del BrdU positivas la proporción de células granulares en el GD que lo incorporó fue el 0.26% y 60 % de éstas se encontraron en la (ZSG), 32% en la capa interna (capa1) del GD (ver Figura 1 C en Ramírez- Amaya et al., 2006) 7 % en la capa media (capa2) y el 1% restante se encuentra localizado en la capa externa (capa3). Siete días después de la administración del BrdU, la proporción de células BrdU positivas fue más alta que lo observando que al día 1 (Bonferroni  $p < 0.01$ ), donde el 0.35% de la población de células era BrdU positivas. A los 15 días de la inyección del BrdU la proporción de nuevas células fue de .23% y esto fue significativamente más bajo que al día siete ( $p$ 's  $< 0.01$ ) pero no significativamente diferente comparado con el día 1 uno. Al día 30 después del BrdU la proporción de células que lo incorporaron fue sólo el .17% siendo una proporción significativamente más baja comparada con los días 1, 7 y 15 ( $p$ 's  $< 0.01$ ). Finalmente, a los 45 días, la proporción de células nuevas fue solo del 0.15% que también resulta ser significativamente baja comparada con el día 1, 7, y 15 ( $p$ 's  $< 0.01$ ) pero no al día 30. Estos datos muestran que se detectan más neuronas nuevas a los 7 días después de la administración del BrdU, sugiriendo la que la disponibilidad del BrdU es de hasta 12 horas y se comprueba que muchas de las nuevas células mueren a lo largo del tiempo. Este fenómeno disminuye entre los 30 y 45 días después de la división.

La siguiente tabla muestra en porcentajes la localización de las de las células BrdU positivas a través de la capa de células granulares, observadas en los diferentes periodos de maduración.

	<b>ZSG</b>	<b>C1</b>	<b>C2</b>	<b>C3</b>
<b>Día 1</b>	60%	32%	7%	1%
<b>Día 7</b>	32%	54%	11%	~3%
<b>Día 15</b>	16%	58%	19%	6%
<b>Día 30</b>	13%	54%	24%	10%
<b>Día 45</b>	12%	51%	23%	13%

Tabla 1. Distribución en porcentaje de las células BrdU positivas en la zona subgranular y en la capa de células granulares de la capa de células granulares en el GD.

La proporción de células que se encontró en cada región del GD se comparó entre los diferentes grupos utilizando una ANOVA de una vía. La proporción de célula en la ZSG difiere estadísticamente entre grupos ( $F_{4,30} = 176.086$ ,  $P < 0.001$ ), donde la proporción de células BrdU positivas que se encontró en animales sacrificados al día 1 fue estadísticamente significativa (se utilizó corrección Bonferroni como prueba poshoc) con el resto de los grupos ( $p < 0.01$ ). Para C1 la proporción de BrdU positivas es diferente entre grupos ( $F_{4,30} = 47.687$ ,  $P < 0.001$ ). El análisis poshoc reveló diferencias entre animales sacrificados al día 1, mientras que los animales sacrificados al día 15, 30 y 45 ( $p < 0.01$ ). También se encontraron diferencias entre animales sacrificados a los 7 días con respecto a los días 15, 30 y 45 ( $p < 0.01$ ). En la C2 hay diferencias estadísticamente significativas entre los animales sacrificados al día 15 y el día 30 PBI ( $p < 0.01$ ). En C3 hay diferencias significativas entre grupos ( $F_{4,30} = 35.403$ ,  $P < 0.001$ ) el análisis poshoc mostró diferencias entre cada grupo ( $p < 0.01$ ), excepto para el día 1 comparado con el día 7 y entre los animales sacrificados al día 7 con los sacrificados al día 15. Las diferencias encontradas en la proporción de células localizadas en las diferentes regiones entre animales sacrificados a diferentes tiempos indican que las neuronas nuevas migran a lo ancho del GD.

### **Expresión escasa de Arc en el Giro dentado después de la exploración espacial**

Después de la exploración espacial la expresión del GEI Arc se observó en el ~1.5% de la población de células granulares, mientras que para los animales control sólo el ~0.3% de las células granulares fueron clasificadas como Arc positivas. Las diferentes proporciones de células expresando Arc entre condiciones control y experimental fue estadísticamente significativa ( $F_{1,33} = 12.042$ ,  $P < 0.001$ ) y los números revelan que una población escasa de células granulares

expresaron Arc en respuesta a una exploración espacial novedosa en un campo abierto (Fig. 3A en Sandoval et al., 2011) como ha sido reportado anteriormente (Ramírez-Amaya et al., 2005; Rosi et al., 2005; Chawla et al., 2005).

### **La expresión específica de Arc en respuesta a exploración espacial se desarrolla hasta el día 30 después de la división.**

La expresión de Arc en la población de células BrdU positivas (Fig 3B en Sandoval et al., 2011) es diferente a lo largo de los grupos ( $F_{4,30} = 29.771$ ,  $P < 0.001$ ). Un día después de la administración del BrdU, se observó la expresión de Arc en ~1.3% de las células BrdU positivas en los animales control y en los que fueron expuestos a la exploración 1.01% de las células BrdU positivas. Estas proporciones no fueron significativamente diferentes. A los 7 días de nacidas los animales control muestran una proporción de neuronas nuevas expresando Arc de 1.56%, pero de nuevo no hubo diferencias entre el grupo experimental. La proporción de células expresando Arc entre el día uno y el día siete no es diferente. Al día 15, después de la administración de BrdU, la proporción de células expresando Arc fue ~2.3% para condiciones control y 2.9% para los animales que tuvieron exploración y no hubo diferencias significativas entre ambos grupos. Aunque existe una tendencia elevada de la expresión de Arc en células nuevas entre el día 1 y el día 15, no se encontraron diferencias en la proporción de células BrdU positivas expresando la proteína de Arc entre estos días y de forma importante no hay diferencia en la proporción de células expresando Arc en respuesta a la exploración sugiriendo que la expresión de Arc no ocurre sin la exploración. En cambio cuando las neuronas nuevas tienen 30 días, la proporción de células BrdU positivas expresando Arc fue estadísticamente diferente entre los animales controles que mostraron (~1.5%) mientras que los que hicieron la conducta tuvieron (~5%  $p < 0.01$ ). También se encontraron diferencias entre los animales control y los que tuvieron la exploración en la proporción de células BrdU positivas a los 45 días después de la administración del BrdU en donde para los animales sin conducta el 0.7% de las células expresaron Arc, y para los animales experimentales la proporción expresando la proteína de Arc fue de 4.87% ( $p < 0.001$ ). Estos resultados muestran que la expresión de Arc es específica a la respuesta espacial y se desarrolla alrededor del día 30 después de la división, dado que la expresión de Arc en los animales control decae 50% entre el día 30 y el 45 apuntando que la respuesta se vuelve específica.

## **La expresión de Arc en células BrdU positivas se observa principalmente en la capa 1 del Giro dentado**

La identificación de la posición de las nuevas células en la capa granular tal y como ha sido descrito (Kempermann et al., 2003) nos permitió observar que las nuevas células granulares expresando Arc se encuentran en la capa 1 del GD (Figura 2E en Sandoval et al., 2011); donde la proporción de células BrdU positivas expresando Arc de la población de células se calculó en relación a la población total de células BrdU positivas y comparada entre los grupos experimentales y los controles (Figura 3A en Sandoval et al., 2011). Se encontraron diferencias entre los grupos control y los experimentales en C1 ( $F_{1,33} = 8.754$ ,  $P < 0.01$ ) donde se encontró que el 89.3% de las células BrdU positivas expresando Arc para el grupo de animales que exploraron, mientras que para el grupo control la proporción de células BrdU positivas expresando Arc fue de 63.78%. En C2 hay diferencias significativas entre condiciones control y experimental en la proporción de células expresando Arc ( $F_{1,33} = 14.509$ ,  $P < 0.001$ ), de cualquier forma la proporción más alta se encontró en el grupo control en donde el 29.56% de sus células BrdU positivas expresando Arc se localizaron aquí, mientras que para el grupo experimental fue 1.67%. En C3 no se encontraron diferencias entre la proporción de células BrdU positivas expresando Arc a lo largo de las diferentes capas (Wilks lambda  $F_{2,31} = 7.183$ ,  $P < 0.01$ ). Es claro que la C1 es la región que muestra más células expresando Arc en las células BrdU positivas. Es importante notar que en la ZSG no se encontraron células expresando Arc.

## **Cálculo de la proporción de neuronas nuevas que responden a la exploración a lo largo de la vida del animal**

Encontramos que la proporción de las nuevas células granulares que responden a la exploración 30 días después de su nacimiento resulta ser el 5%, y al día 45 fue de 4.8 %. Previamente, en nuestro grupo se reportó que a los 5 meses de edad de las nuevas células, la proporción de células BrdU positivas que responden a la estimulación conductual de exploración fue el ~2.8% (Ramírez-Amaya et al., 2005). Esto sugirió que la probabilidad de que una nueva neurona responda a la exploración decremente a lo largo del tiempo (Kuhn et al., 1996). En este estudio incluimos 80 000 células granulares de la capa supra piramidal, que se obtuvieron de 450  $\mu\text{m}$  en el eje septo temporal. El total de la región muestra midió 1300  $\mu\text{m}$ , y al calcular la cantidad de células granulares obtuvimos alrededor de ~231,000 DG células por

animal. De esta población el 1.5% respondió a la exploración espacial, similar a lo que ha sido reportado previamente (Chawla et al., 2005; Kuhn et al., 1996; Ramírez- Amaya et al., 2006), lo que sugiere que ~3465 responden ante exploración en esta región dorsal del giro dentado esto es por animal. Nosotros creemos que la probabilidad de que las neuronas nuevas nacidas en el adulto respondan ante la exploración espacial cambia de forma lineal a lo largo del tiempo (Figura 5A en Sandoval et al., 2011). En donde los círculos rojos representan los datos obtenidos durante mi doctorado y en amarillo representa el dato obtenido por Ramírez-Amaya en el 2006. Esta línea representa un modelo en donde calculamos la probabilidad de las neuronas nuevas respondan a la exploración espacial después de 150 días de nacidas. El intercepto de la línea hasta obtener la probabilidad cero indica que a los 301 días de nacidas, las nuevas células dejarían de responder a la exploración.

Reconocemos que un modelo linear con sólo 3 puntos representa claras limitaciones y que se necesitan más puntos temporales entre los días 45 y 360. Esto nos permitiría determinar si un modelo linear es adecuado y por lo tanto predecir que las nuevas células dejan de responder después de cumplir un año.

Sabemos que las neuronas nuevas que sobreviven 4 semanas permanecen vivas a lo largo del tiempo (Kempermann et al., 2003), es por eso que podemos asumir que las neuronas nuevas detectadas durante los días 30 y 45 representan el número de células que nacieron al día 1 y que sobrevivieron. Es importante considerar que la tasa de proliferación celular varía a lo largo de la vida del animal y ésta modifica el número de neuronas estables a lo largo de la vida. Dado que la formación del GD ocurre durante las primeras semanas post natales, la madurez sexual de los animales se alcanza a las 6 semanas, y las neuronas que sobrevivieron por 4 semanas permanecen a largo plazo, realizamos más cálculos usando el número de células granulares que nacieron y sobrevivieron desde el día 70 post natal. Para estimar los parámetros de este modelo de regresión lineal acumulativo de neuronas que nacieron antes de que el animal fuera sexualmente maduro y que sobrevivieron a lo largo de la vida del animal asumiendo que no hay mortalidad después de los 30 días de maduración (Fig. 5 B en Sandoval et al., 2011). De este modo obtuvimos el número de neuronas nuevas a lo largo de la vida de un animal (Fig. 5 C en Sandoval et al., 2011).

Para poder estimar el número de neuronas nuevas granulares que contribuyen en el procesamiento espacial del GD a lo largo de la vida de un animal, consideramos que se van añadiendo neuronas, así como su probabilidad de responder en distintos momentos de su maduración, generando una convolución de estas variables (Fig. 6 A y 6 B en Sandoval et al., 2011). El cálculo resultante mostró que el momento en el que el máximo número de neuronas que nacieron después de la formación del GD contribuye en el procesamiento de información es a los 217 días, en donde 2057 de las neuronas nacidas en el adulto en la región muestra se predice responderán a la exploración espacial (Fig. 5 D en Sandoval et al., 2011). Esto representa el 60 % del total de la población de células granulares.

Al incluir en el cálculo todas las neuronas que se originan después del nacimiento del animal y que sobreviven por 30 días, se obtiene un resultado que sugiere que es al día 129 de la vida del animal cuando más neuronas participan, y en donde el 99% de las neuronas responden a la exploración, resultando en neuronas nuevas que se generaron en el animal (Figura 5 D opaco en Sandoval et al., 2011).

Hacemos énfasis en que este modelo representa una nueva hipótesis que sugiere que las neuronas que nacen en el hipocampo de un animal adulto cambian su probabilidad de contribución en el procesamiento de información espacial tanto a lo largo de la vida del animal, como de la misma vida de la nueva neurona. Este modelo sin duda debe de estimular la generación de nuevos estudios para evaluar la relevancia de la contribución de las nuevas células granulares incorporadas a lo largo del tiempo.

## **Discusión**

### **Las nuevas células granulares en la red del Giro Dentado**

El número de células marcadas con BrdU varía entre el día 7 y el día 45, la proporción de células BrdU positivas va de 0.35 % a 0.15% del total de células granulares respectivamente, lo que sugiere que en las primeras 4 semanas aproximadamente 60% de las neuronas nuevas muere, lo que es semejante a lo reportado por otros grupos (Cameron y McKay, 2001; Snyder et al., 2011). Es correcto considerar que la pérdida de células se debe a la muerte neuronal debido a que el marcaje con BrdU no cambia a lo largo del tiempo (Cameron y McKay, 2001), incluso el número de neuronas marcadas se mantiene estable entre 1 y 11 meses (Kempermann et al., 2003), lo que indica que la pérdida de detección de neuronas BrdU positivas no se debe a una incapacidad de detectar la marca. También se tiene evidencia de que en condiciones normales se detectan en el GD células positivas a diferentes tipos de caspasas, las cuales se sabe que se expresan durante procesos de apoptosis. Por otro lado, estimulación que promueve proliferación, como el aprendizaje espacial, también incrementa el número de células apoptóticas (Dupret, et al., 2007). De la mano con la idea de que durante la maduración se mueren neuronas nuevas, entre más jóvenes son, mayor es la probabilidad de que éstas expresen proteínas relacionadas con la apoptosis (Dupret, et al., 2007). Esto muestra que durante la maduración de las neuronas nuevas, muchas de ellas mueren por medio de apoptosis, sin embargo falta cuantificar con detalle cuántas neuronas mueren y cuántas se integran funcionalmente a la red, pero podríamos estimar que son números muy parecidos, ya que lo que sabemos es que el giro dentado no cambia de volumen a lo largo de la vida adulta del animal y se considera que la muerte celular compensa el número de unidades que se integran diariamente.

### **La expresión de Arc**

Si Arc fuese un elemento crucial durante el desarrollo podríamos decir que algunos de sus mecanismos podrían compartirse en la edad adulta. Por lo que su expresión en células nuevas ocurriría como parte de un proceso normal; pero no ocurre de esta forma. Arc no interviene en ningún proceso durante el desarrollo. Experimentos en donde el gen es abatido, muestran que los animales (ratones) son viables, pero en relación a procesos cognitivos como la prueba de memoria en un LAM, se observan déficits en su ejecución (Plath et al., 2006). Por otro

lado se sabe que la expresión de Arc ocurre en neuronas y en células germinales postmitóticas en testículos en el animal adulto (Maier et al., 2003).

### **Integración anatómica y funcional de las nuevas células granulares**

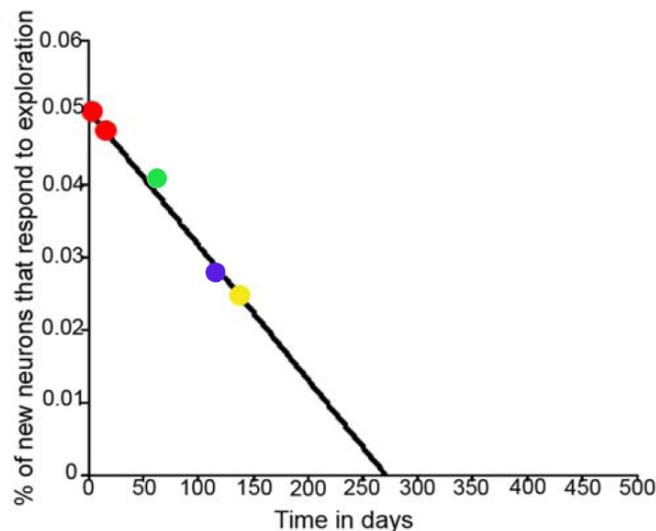
Los datos obtenidos en nuestro trabajo muestran que las células nuevas y las células granulares en general, que responden a la exploración espacial expresando Arc, se ubican principalmente en la capa 1 de la banda de células granulares. En nuestro laboratorio hemos visto que otras conductas como la tarea de reconocimiento de objetos induce la expresión de Arc en células granulares que están ubicadas principalmente en la capa 3 (Bello y colaboradores en preparación).

Esto sugiere que las demandas cognitivas de cada tarea podrían determinar a los grupos neuronales que se han de reclutar para procesar dicha información, y al parecer cada uno de estos grupos neuronales tiene una ubicación determinada en las distintas capas de la banda de células granulares. En este trabajo vimos que la exploración espacial no induce la expresión de Arc en células ubicadas en la ZSV, pero hemos visto que la tarea de reconocimiento de objetos que esto sí ocurre. Lo que se sugiere es que las células en esta región pueden estar funcionalmente integradas y participan también en el procesamiento de información. No obstante, cuando analizamos exclusivamente la respuesta de las células nuevas a la tarea de reconocimiento de objetos, observamos que éstas se ubican principalmente en la capa 1, igual que lo vimos nosotros ante la tarea de exploración espacial. Es posible que esto ocurra debido a que las neuronas nuevas, de aproximadamente 1 mes de edad, y que están ubicadas en la capa 1, sean las células más maduras (Espósito et al., 2005), y por lo tanto serán las que mayor probabilidad tengan de ser reclutadas por el procesamiento de información y expresar Arc en respuesta a la conducta (Angevine, 1965; Altman y Dayer, 1990).

Reconocemos que nuestro modelo de regresión que indica que la probabilidad de que las neuronas respondan a la conducta varía linealmente a lo largo de la vida de la célula, resulta poco sólido si lo basamos en sólo 3 puntos temporales, lo que nos obliga a generar más experimentos que provean más puntos temporales que lo confirmen. Afortunadamente, 2 grupos independientes de investigación, realizaron experimentos utilizando la misma conducta y los

mismos métodos de análisis de la actividad de neuronas nuevas que utilizamos nosotros, pero con 2 diferentes puntos temporales en la maduración de las neuronas nuevas.

Marrone y colaboradores en el 2011, utilizaron la misma tarea que nosotros y mostraron que las neuronas nuevas del GD de 4 meses de edad en animales jóvenes mostraban una probabilidad de responder a la conducta de 2.8%. Por otro lado, Belarbi y colaboradores, mostraron datos en donde células granulares nuevas de 2 meses de edad mostraban una probabilidad de 4.1% de expresar Arc en respuesta a la exploración espacial. Al integrar estas probabilidades en el modelo de regresión lineal, podemos ver cómo se ajustan con mucha precisión (Figura 19).



**Figura 20.** Modificación de la figura 5 del artículo Sandoval et al., 2011, en donde se muestra una regresión lineal obtenida con el porcentaje de células nuevas que expresan Arc en respuesta a la exploración espacial a los 30 y 45 días de maduración (en rojo), a los 150 días (en amarillo). Se añadieron 2 puntos temporales, 60 días de los datos de Belarbi et al., 2012 y 120 días proveniente de Marrone et al., 2011 (verde y azul respectivamente).

Otra de las ideas que asume el modelo, en el resultado de la convolución, es que independientemente de la tasa de proliferación que sabemos varía a lo largo de la vida del animal, la probabilidad de las neuronas nuevas de responder a la conducta dependerá solamente de la edad de la célula. En el trabajo de Marrone et al., 2011, se utilizaron animales viejos en los que se observó que la proliferación es más baja a la observada que en animales jóvenes, dato ya reportado previamente en la literatura (Drapeau et al., 2003). Sus datos también muestran que aunque sean pocas las células, siguen teniendo la misma probabilidad de responder a la exploración expresando Arc, tal y como se observa en animales jóvenes. La pregunta de si la tasa de proliferación modifica la probabilidad de que las neuronas nuevas respondan a la

conducta ha sido abordado por Martínez-Canabal y colaboradores en el 2010. Ellos incrementaron la tasa de proliferación en ratones, dado que vivían con acceso a una rueda de actividad. Observaron que la probabilidad de expresar el gen *cfos* en respuesta a la conducta, es la misma en animales que vivieron en estas condiciones en comparación con animales en donde la tasa de proliferación era normal, es decir, más baja. Estas observaciones muestran que la probabilidad de respuesta de una nueva neurona depende de la edad de la célula y no de la tasa de proliferación o la edad de los animales. Lo que valida la idea que asume el modelo que integra la probabilidad de respuesta y la tasa de proliferación, y en el que se sugiere que las neuronas nuevas contribuyen de manera importante al procesamiento de información espacial, sobretodo cuando el animal es un adulto joven.

Sería interesante poder determinar si el modelo es válido para el procesamiento de información de otras tareas conductuales, pero al parecer las reglas podrían ser diferentes para información como la que contiene la tarea de reconocimiento de objetos, ya que como mencionamos previamente, esta tarea recluta células granulares ubicadas principalmente en la capa 3 y no en la capa 1 como la información espacial. Por otro lado, será importante determinar si la sobrevivencia que se induce por estimulación sensorial o conductual, modifican o no la probabilidad de respuesta de las neuronas, y finalmente habrá que integrar al modelo los cambios en la proliferación que se inducen por la experiencia.

No podemos pasar por alto que durante los primeros quince días de vida de las neuronas nuevas, éstas expresan Arc al parecer de manera espontánea. Esta expresión inespecífica la consideramos en el trabajo que publicamos como ruido, de hecho calculamos la proporción de células que a lo largo del proceso de maduración de las neuronas nuevas podrían estar expresando Arc espontáneamente y encontramos que aproximadamente el 50% de la expresión basal de Arc en animales no estimulados, se debe a la expresión espontánea que ocurre en las neuronas granulares de animales control de caja o que no han sido estimulados por ninguna conducta. Este aparente ruido irrelevante, podría ser en realidad un ruido importante para el procesamiento de información, esto si consideramos el concepto de ruido estocástico o resonancia estocástica. El término estocástico se refiere al fenómeno que ocurre en un sistema que procesa información, y cuyo comportamiento es intrínsecamente no determinista, y en donde el sistema tiene un umbral de activación que depende del nivel de señal-ruido, con esto el sistema maximiza la transferencia de información en la presencia de un nivel específico de ruido

o entrada aleatoria mayor a cero, de tal manera que disminuye el umbral de respuesta; en estas condiciones el sistema resuena con un nivel particular de ruido. En condiciones de bajas intensidades de ruido, la señal no provoca que el sistema atraviese el umbral, lo que hace que poca señal sea procesada y el sistema tiende a no responder. Por otra parte, cuando las intensidades de ruido son muy altas, la respuesta es dominada por el ruido, dando lugar a una baja relación de señal ruido y por lo tanto a un decremento en la probabilidad de respuesta. De esta manera el sistema funciona más eficientemente cuando los niveles de ruido son moderados, en donde el ruido permite que la señal alcance el umbral, pero no es tan grande como para ensombrecerla. De esta manera, una gráfica de la razón de señal ruido en función de la intensidad de ruido se muestra como una  $\cap$ , o U invertida. En pocas palabras, el ruido es necesario para que la información pueda ser procesada. Y las neuronas nuevas cuando son inmaduras, contribuyen con al menos el 50% del ruido en el sistema, lo que podría explicar por qué el tratamiento que inhibe la proliferación de células que todavía no están lo suficientemente maduras como para procesar información, afectan tareas cognitivas.

Una aproximación biológica al ruido estocástico la podemos encontrar en los estudios de Carla Shatz, quien estudia la formación de circuitos en la vía visual. Podemos referirnos a sus experimentos para entender la respuesta de las neuronas nuevas que expresan Arc de manera espontánea. Shatz y colaboradores en el 2007, descubrieron que el cableado adulto emerge de interacciones dinámicas entre neuronas. Durante el desarrollo intrauterino antes de que exista visión, el ojo genera patrones de disparo de manera espontánea, enviándolos al cerebro. El bloqueo de esa actividad en el útero, o la prevención de la visión después del nacimiento, interrumpe la afinación de circuitos así como el cableado hacia el cerebro.

Cuando se están formando conexiones que ya tienen un destino, no se encuentran establecidas con un patrón preciso como ocurre en el sistema maduro. Por ejemplo las conexiones entre la retina y su núcleo blanco en el tálamo, el núcleo geniculado lateral (NGL) se encuentran muy bien organizadas con respecto a la entrada del ojo en el adulto, de manera que las células ganglionares de los ojos opuestos forman conexiones con capas específicas del ojo adyacente en el NGL. En contraste, en el feto no existen de forma inicial dichas capas, las entradas a las células ganglionares de ambos ojos están entre mezcladas y de forma gradual se organizan en capas. Las capas del ojo se forman antes de que los conos y bastones estén maduros y por lo tanto no se pueden generar señales de visión (Butts et al., 2007). Es posible que este tipo de

proceso sea similar al que ocurre en el GD del hipocampo, en donde un ruido basal es necesario para procesar información.

El impacto de la neurogénesis se ha evaluado en varias tareas de memoria asociativa dependientes del hipocampo. La mayoría de estos efectos han sido probados con agentes antimitóticos, en donde los animales muestran dificultad en tareas de condicionamiento de miedo tanto en memoria a corto como a largo plazo (Shors et al., 2002; Winocour et al., 2006; Snyder et al., 2009). Estos procedimientos en otros grupos de investigación han mostrado en dónde se afecta la extinción, así como el paso de la información a la corteza.

Shors, en su trabajo del 2002, describe que el fenómeno de la inhibición de la proliferación sobre el aprendizaje dependiente del hipocampo, es decir, en la adquisición de tareas espaciales puede deberse a 2 posibilidades. La primera es que todos los tipos de aprendizajes dependientes del hipocampo involucran a neuronas nuevas para la adquisición, pero la navegación espacial puede ocurrir con un porcentaje pequeño de neuronas nuevas. Esto ha sido apoyado por reportes en donde sólo una porción del hipocampo es necesaria para que la adquisición de una tarea espacial ocurra (Moser et al., 1995). La segunda posibilidad es que sólo algunos tipos de aprendizajes dependientes del hipocampo necesiten de nuevas células. Los mismos argumentos se pueden generar en la adquisición del miedo condicionado, es decir que con pocas células se puede adquirir la tarea. Además, haciendo un recuento sobre las técnicas de depleción celular y el momento en que se realiza la conducta, nos dimos cuenta que se pueden estar dirigiendo a poblaciones de células distintas. Esto es si el tiempo entre la depleción y la conducta es corto (hasta una semana) estarían interfiriendo en el ruido que nosotros observamos del día 1 hasta el día 30, mientras que si esperan más tiempo (3-4 semanas) para realizar la conducta estarían involucrando a las células nuevas que procesan la información, por lo que los resultados de memoria se ven afectados.

Creemos que las neuronas nuevas durante el periodo de consolidación de la memoria no deberían de ser las mismas que las que procesaron la adquisición, de acuerdo a lo sugerido por Treves y Rolls porque el código en el Giro Dentado va cambiando gradualmente.

Los métodos utilizados por Tashiro et al 2007 y Kee et al., 2007 utilizaron estrategias de reclutamiento de neuronas, y esperaban que las que respondieran en la memoria fuera el mismo conjunto, pero según esta teoría de no serían las mismas células debido a la constante proliferación.

La importancia biológica de la neurogénesis hipocampal depende de la participación de estas nuevas células en el procesamiento de información. Su impacto en la circuitería de un sistema adulto será altamente determinado por el cómo se comportan en relación a células granulares existentes que fueron generadas durante el desarrollo.

No sabemos si las neuronas nuevas se siguen generando para remplazar aquellas neuronas que van muriendo, o el incremento de su número sea para ajustarse al tamaño de la red neural. En esta serie de experimentos pudimos encontrar no sólo el momento de la maduración de las neuronas nuevas en que responden a una conducta de exploración.

También pudimos calcular con nuestros datos que el mayor porcentaje de células que expresan Arc corresponde a células que incorporaron BrdU, es decir que son neuronas nuevas integradas en la red hipocampal.

Hasta ahora todo parece indicar que las células dejan de responder a lo largo del tiempo, lo cual aún queda pendiente dado que implicaría hacer un experimento de más de un año de duración. Heather Cameron ha dicho *"Use it, then lose it"*; es decir, "Úsalas que después se pierden". Aún no tenemos idea qué tanto tiempo después de que se integraron a la red dejan de formar parte de ella y tampoco conocemos los mecanismos intracelulares involucrados. Este fenómeno implica que el código de información cambia que es lo que Treves y Rolls sugieren. Esto pareciera necesario para impedir que la nueva información afecte la capacidad de almacenamiento en CA3.

Es por eso que el GD se debe de silenciar para que CA3 aprenda cosas nuevas, si esto no ocurre, se estaría reactivando la información previamente adquirida generando interferencia. Se ha propuesto que sólo aquellas neuronas que forman conexiones relevantes se incorporan a la red, promoviendo un refinamiento de los circuitos neurales existentes (Aimone et al., 2006). La mayoría de la evidencia muestra su participación en la separación de patrones.

Algo importante de resaltar es que no se ha realizado investigación sobre la conectividad postsináptica, debido al reto experimental que implica identificar en registros electrofisiológicos a la presinápsis de las neuronas nuevas que se encuentren conectadas a células postsinápticas blanco del hipocampo, esto técnicamente aún resulta un gran reto. El saber si las neuronas

nuevas liberan glutamato u otro neurotransmisor y si su función presináptica es similar al de las pre-existentes son problemas que no han sido resueltos.

La idea de nuestro modelo podría hacerse extensiva a etapas tempranas del desarrollo. Nuestros datos contribuyen de forma importante al entendimiento del fenómeno de la incorporación y funcionamiento de las nuevas neuronas en el animal adulto. También, abren la puerta al planteamiento de nuevas ideas que generen protocolos para que se continúe generando teorías de la participación de las nuevas células granulares en otras conductas.

## Referencias

- Abrous DN, Koehl M, Le Moal M. (2005) Adult Neurogenesis: From Precursors to Network and Physiology. *Physiol Rev* 85: 523–569.
- Aimone JB, Wiles J, Gage FH (2006) Potential role for adult neurogenesis in the encoding of time in new memories. *Nat Neurosci* 9:723-727.
- Alme CB, Buzzetti RA, Marrone DF, Leutgeb JK, Chawla MK, Schaner MJ, Bohanick JD, Khoboko T, Leutgeb S, Moser EI, Moser MB, McNaughton BL, Barnes CA. (2010) Hippocampal granule cells opt for early retirement. *Hippocampus* 20(10):1109-23.
- Alonso M, Viollet C, Gabellec MM, Meas-Yedid V, Olivo-Marin JC, Lledo PM. (2006) Olfactory discrimination learning increases the survival of adult-born neurons in the olfactory bulb. *J Neurosci.* 26(41):10508-13.
- Altman J, Das GD (1965) Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124:319-335.
- Altman J. (1969) Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol.* 137(4):433-57.
- Alvarez-Buylla A, García -Verdugo JM, Tramotin AD (2001) A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells *Nat Rev Neurosci.* (4) : 287-293
- Alvarez-Buylla A, Nottebohm F. (1988) Migration of young neurons in adult avian brain. *Nature*; 335(6188):353-4.
- Amaral DG, Witter MP (1989) The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* 31:571–591.
- Ambrogini P, Cuppini R, Cuppini C, Ciaroni S, Cecchini T, Ferri P, Sartini S, Del Grande P. (2000) Spatial learning affects immature granule cell survival in adult rat dentate gyrus. *Neurosci Lett* 286: 21-24.
- Ambrogini P, Lattanzi D, Ciuffoli S, Agostini D, Bertini L, Stocchi V, Santi S, Cuppini R (2004) Morpho-functional characterization of neuronal cells at different stages of maturation in granule cell layer of adult rat dentate gyrus. *Brain Res* 1017:21-31.
- Amoureux MC, Cunningham BA, Edelman GM, Crossin KL. (2000) N-CAM binding inhibits the proliferation of hippocampal progenitor cells and promotes their differentiation to a neuronal phenotype. *J Neurosci.* May 15;20(10):3631-40.
- Andersen P, Bliss TVP, Skrede KK (1971) Lamellar organization of hippocampal excitatory pathways. *Exp Brain Res* 13:222–238.
- Angevine Jr JB (1965) Time of neuron origin in the hippocampal region. An autoradiographic study in the mouse. *Exp Neurol Suppl* 2:1–70.

- Arenander AT, de Vellis J, Herschman HR (1989) Induction of c-fos and TIS genes in cultured rat astrocytes by neurotransmitters. *J Neurosci Res* 24:107-114.
- Bannigan JG., (1985) The effects of 5-bromodeoxyuridine on fusion of the cranial neural folds in the mouse embryo. *Teratology* 32:229-239.
- Barrett GL, Georgiou A, Reid K, Bartlett PF, Leung D. (1998) Rescue of dorsal root sensory neurons by nerve growth factor and neurotrophin-3, but not brain-derived neurotrophic factor or neurotrophin-4, is dependent on the level of the p75 neurotrophin receptor. *Neuroscience*. 85(4):1321-8.
- Bayer SA. (1983) 3H-thymidine-radiographic studies of neurogenesis in the rat olfactory bulb. *Exp Brain Res*. 50(2-3):329-40.
- Bear MF (1994). Synaptic plasticity: LTP and LTD. *Curr. Opin. Neurobiol.* 4, 389-399
- Belarbi K, Arellano C, Ferguson R, Jopson T, Rosi S. (2012) Chronic neuroinflammation impacts the recruitment of adult-born neurons into behaviorally relevant hippocampal networks. *Brain Behav Immun* (1):18-23.
- Benjelloun-Touimi S, Jacque CM, Derer P, De Vitry F, Maunoury R, Dupouey P (1985) Evidence that mouse astrocytes may be derived from the radial glia: an immunohistochemical study of the cerebellum in the normal and reeler mouse. *J Neuroimmunol* 9:87-97.
- Biebl M, Cooper CM, Winkler J, Kuhn HG (2000) Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain. *Neurosci Lett*. 291(1):17-20.
- Binder DK. (2007) Neurotrophins in the dentate gyrus. *Prog Brain Res*;163:371-97.
- Bischofberger J. (2007) Young and excitable: new neurons in memory networks *Nat Neurosci*. (3): 273-275.
- Blaschke AJ, Weiner JA, Chun J. (1998) Programmed cell death is a universal feature of embryonic and postnatal neuroproliferative regions throughout the central nervous system. *J Comp Neurol* 396(1):39-50.
- Bonfanti L. (2006) PSA-NCAM in mammalian structural plasticity and neurogenesis. *Prog Neurobiol*. (3):129-64. Epub 2006 Oct 9.
- Brakeman PR, Lanahan AA, O'Brien R, Roche K, Barnes CA, Huganir RL, Worley PF. (1997) Homer: a protein that selectively binds metabotropic glutamate receptors. *Nature* 386(6622):284-288.
- Brockes JP. (1994) New approaches to amphibian limb regeneration. *Trends Genet*. (5):169-73.
- Brown JP, Couillard-Després S, Cooper-Kuhn CM, Winkler J, Aigner L, Kuhn HG. (2003) Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *J Comp Neurol*. 467(1):1-10.

- Butts DA, Kanold PO, Shatz CJ (2007) A burst-based “Hebbian” learning rule at retinogeniculate synapses links retinal waves to activity-dependent refinement. *PLoS Biol.* 5(3):e61.
- Cameron HA, McEwen BS, Gould E (1995) Regulation of adult neurogenesis by excitatory input and NMDA receptor activation in the dentate gyrus. *J Neurosci.* 15(6):4687-92.
- Cameron HA, McKay RD (2001) Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J Comp Neurol* 435:406-417.
- Cameron HA, Woolley CS, McEwen BS, Gould E (1993) Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* 56:337-344.
- Cameron RS, Rakic P (1991) Glial cell lineage in the cerebral cortex: A review and a synthesis. *Glia* 4:124–137.
- Campbell K, Götz M (2002) Radial glia: multi-purpose cells for vertebrate brain development. *Trends Neurosci.* 25(5):235-8.
- Carleton A, Petreanu LT, Lansford R, Alvarez-Buylla A, Lledo PM (2003) Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb. *Nat Neurosci.* 6(5):507-18
- Casasco A, Calligaro A, Casasco E, Marchetti C, Poggi P, Casasco M (1988) An immunocytochemical method for studying embryo cytokinetics. *Basic Appl Histochem.* 32(2):293-6.
- Chawla MK, Barnes CA (2007) Hippocampal granule cells in normal aging: insights from electrophysiological and functional imaging experiments. *Prog Brain Res* 163:661-821.
- Chawla MK, Guzowski JF, Ramirez-Amaya V, Lipa P, Hoffman KL, Marriott LK, Worley PF, McNaughton BL, Barnes CA (2005) Sparse, environmentally selective expression of Arc RNA in the upper blade of the rodent fascia dentata by brief spatial experience. *Hippocampus* 15:579-86.
- Choi BH, Lapham LW (1978) Radial glia in the human fetal cerebrum: a combined Golgi, immunofluorescent and electron microscopic study. *Brain Res* 148:295–311.
- Dayer AG, Ford AA, Cleaver KM, Yassaee M, and Cameron HA (2003) Short-term and long-term survival of new neurons in the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol* 460: 563–572.
- deFazio A, Leary JA, Hedley DW, Tattersall MH. (1987) Immunohistochemical detection of proliferating cells in vivo. *J Histochem Cytochem.* 35(5):571-7
- Doetsch F, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1997) Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci.* 17(13):5046-61.

- Doetsch, F & Alvarez-Buylla A (1996) Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain. *Proc. Natl Acad. Sci USA* 93: 14895-14900.
- Donai H, Sugiura H, Ara D, Yoshimura Y, Yamagata K, Yamauchi T. (2003) Interaction of Arc with CaM kinase II and stimulation of neurite extension by Arc in neuroblastoma cells expressing CaM kinase II. *Neurosci Res.* (4):399-408.
- Drapeau E, Mayo W, Aurousseau C, Le Moal M, Piazza PV, Abrous DN (2003) Spatial memory performances of aged rats in the water maze predict levels of hippocampal neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:14385–14390.
- Duan X, Kang E, Liu CY, Ming GL, Song H. (2008) Development of neural stem cell in the adult brain. *Curr Opin Neurobiol.* 18(1):108-15.
- Dunn D, Smith J (1955) Occurrence of a New Base in the Deoxyribonucleic Acid of a Strain of Bacterium Coli. *Nature* 175, 336-337.
- Dupret D, Fabre A, Döbrössy MD, Panatier A, Rodríguez JJ, Lamarque S, Lemaire V, Oliet SH, Piazza PV, Abrous DN.(2007) Spatial learning depends on both the addition and removal of new hippocampal neurons. *PLoS Biol.* 5(8):e214.
- Eichenbaum H, Cohen NJ.( 1988) Representation in the hippocampus: what do hippocampal neurons code? *Trends Neurosci.* 11(6):244-8.
- Eichenbaum H, Yonelinas A P, Ranganath C, (2007.) The medial temporal lobe and recognition memory. *Annual Review of Neuroscience*, 30, 123-152.
- Eichenbaum H. (2001) The hippocampus and declarative memory: cognitive mechanisms and neural codes. *Behav Brain Res* 127(1-2):199-207.
- Eidinoff ML, Cheong L, Rich MA. (1959) Incorporation of unnatural pyrimidine bases into deoxyribonucleic acid of mammalian cells. *Science* 129(3362):1550-1.
- Erlanger BF, Beiser SM. (1964) Antibodies specific for ribonucleosides and ribonucleotides and their reaction with DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jul;52:68-74.
- Espósito MS, Piatti VC, Laplagne DA, Morgenstern NA, Ferrari CC, Pitossi FJ, Schinder AF (2005) Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. *J Neurosci* 25:10074-10086.
- Farrant M, Nusser Z (2005 ) Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. *Nat Rev Neurosci.* 6(3):215-29.
- Fortin NJ, Agster K L, and Eichenbaum H B, (2002). Critical role of the hippocampus in memory for sequences of events. *Nature Neuroscience* 5; 458–462.
- Fukuda S, Kato F, Tozuka Y, Yamaguchi M, Miyamoto Y, Hisatsune T (2003) Two distinct subpopulations of nestin-positive cells in adult mouse dentate gyrus. *J Neurosci* 23:9357–9366.

Gascon E, Vutskits L, Jenny B, Durbec P, Kiss JZ. (2007) PSA-NCAM in postnatally generated immature neurons of the olfactory bulb: a crucial role in regulating p75 expression and cell survival. *Development* 134(6):1181-90.

Gascón E Vutskits L, Kiss JZ (2010) The Role of PSA-NCAM in Adult Neurogenesis. *Structure and Function of the Neural Cell Adhesion Molecule NCAM Advances in Experimental Medicine and Biology* 663 (2) 127-136.

Gascon E, Vutskits L, Zhang H, Barral-Moran MJ, Kiss PJ, Mas C, Kiss JZ. (2005) Sequential activation of p75 and TrkB is involved in dendritic development of subventricular zone-derived neuronal progenitors in vitro. *Eur J Neurosci.* 21(1):69-80.

Ge S, Goh EL, Sailor KA, Kitabatake Y, Ming GL, Song H (2006) GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature* 439:589-593.

Ge S, Pradhan DA, Ming GL, Song H. (2007) GABA sets the tempo for activity-dependent adult neurogenesis. *Trends Neurosci.* 30(1):1-8.

Ge S, Sailor KA, Ming GL, Song H. (2008) Synaptic integration and plasticity of new neurons in the adult hippocampus. *J Physiol.* 15;586(16):3759-65.

Ge S, Yang CH, Hsu KS, Ming GL, Song H. (2007) A critical period for enhanced synaptic plasticity in newly generated neurons of the adult brain. *Neuron* 54: 559-566.

Geinisman Y, Disterhoft JF, Gundersen HJ, McEchron MD, Persina IS, Power JM, van der Zee EA, West MJ. (2000) Remodeling of hippocampal synapses after hippocampus-dependent associative learning. *J Comp Neurol.*417(1):49-59.

Gerd Kempermann (2011) Seven principles in the regulation of adult neurogenesis *Eur J Neurosci* 33 (6) 1018-1024

Gilbert, Scott F. *Developmental Biology* Eighth Edition. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc., 2006.

Goldman SA, Kirschenbaum B, Harrison-Restelli C, Thaler HT (1997) Neuronal precursor of adult rat subependymal zone persist into senescence, with no decline in the spatial extent or response to BDNF *J Neurobiol* 32 : (6) 554:566

Gould E, Beylin A, Tanapat P, Reeves A, Shors TJ (1999) Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat Neurosci* 2:260-265.

Gould E, Gross CG (2002) Neurogenesis in adult mammals: some progress and problems. *J Neurosci* 22:619-623.

Gould E, McEwen BS, Tanapat P, Galea LA, Fuchs E (1997) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J Neurosci* 17:2492-2498.

- Gould E, McEwen BS, Tanapat P, Galea LA, Fuchs E. (1997) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J Neurosci.* (7):2492-8.
- Gratzner HG, Leif RC, Ingram DJ, Castro A (1975) The use of antibody specific for bromodeoxyuridine for the immunofluorescent determination of DNA replication in single cells and chromosomes. *Exp Cell Res.* 95(1):88-94.
- Guzowski JF, Lyford GL, Stevenson GD, Houston FP, McGaugh JL, Worley PF, Barnes CA (2000) Inhibition of activity-dependent arc protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory. *J Neurosci* 20:3993-4001.
- Guzowski JF, McNaughton BL, Barnes CA, Worley PF (1999) Environment-specific expression of the immediate-early gene Arc in hippocampal neuronal ensembles. *Nat Neurosci* 2:1120-1124.
- Guzowski JF, McNaughton BL, Barnes CA, Worley PF (2001a) Imaging neural activity with temporal and cellular resolution using FISH. *Curr Opin Neurobiol* 11:579-584.
- Guzowski JF, Setlow B, Wagner EK, McGaugh JL (2001b) Experience-dependent gene expression in the rat hippocampus after spatial learning: a comparison of the immediate-early genes Arc, c-fos, and zif268. *J Neurosci* 21:5089-5098.
- Hafting T, Fyhn M, Molden S, Moser MB, Moser EI (2005) Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. *Nature* 436(7052):801-6.
- Hammond MS, Sims C, Parameshwaran K, Suppiramaniam V, Schachner M, Dityatev A. (2006) Neural cell adhesion molecule-associated polysialic acid inhibits NR2B-containing N-methyl-D-aspartate receptors and prevents glutamate-induced cell death. *J Biol Chem.* Nov 17;281(46):34859-69.
- Harms D. (1987) Diagnostic pitfalls in solid childhood tumors. *Pathol Res Pract.* 182(2):183-7.
- Hastings NB, Gould E (1999) Rapid extension of axons into the CA3 region by adult-generated granule cells. *J Comp Neurol* 413:146-154.
- Hirata H, Hibasami H, Yoshida T, Ogawa M, Matsumoto M, Morita A, Uchida A. (2001) Nerve growth factor signaling of p75 induces differentiation and ceramide-mediated apoptosis in Schwann cells cultured from degenerating nerves. *Glia* 36(3):245-58.
- Holmberg J, Armulik A, Senti KA, Edoff K, Spalding K, Momma S, Cassidy R, Flanagan JG, Frisén J. (2005) Ephrin-A2 reverse signaling negatively regulates neural progenitor proliferation and neurogenesis. *Genes Dev.* 15;19(4):462-71.
- Hoshino M. (1985) Responses to family members of patients in medical crises. *Kangogaku Zasshi.* 49(1):69-73.

- Ie DC, Colamarino SA, Song HJ, Désiré L, Mira H, Consiglio A, Lein ES, Jessberger S, Lansford H, Dearie AR, Gage FH. (2005) Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. *Nature*, 437(7063):1370-5.
- Jarvis ED, Nottebohm F. (1997) Laboratory of Animal Behavior, Motor-driven gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Apr 15;94(8):4097-102.
- Jessberger S, Kempermann G (2003) Adult-born hippocampal neurons mature into activity-dependent responsiveness. *Eur J Neurosci* 18:2707-2712.
- Jones SP, Rahimi O, O'Boyle MP, Diaz DL, and Claiborne BJ (2003) Maturation of Granule Cell Dendrites After Mossy Fiber Arrival in Hippocampal Field CA3. *Hippocampus* 13:413-427.
- Kac M, Logan J, Fluctuation Phenomena, eds. E.W. Montroll & J.L. Lebowitz, North-Holland, Amsterdam, 1976 pp 113-1.25
- Kaplan MS, Hinds JW (1977) Neurogenesis in the adult rat: Electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science* 197; 4308: 1092-1094.
- Karten YJ, Jones MA, Jeurling SI, Cameron HA. (2006) GABAergic signaling in young granule cells in the adult rat and mouse dentate gyrus. *Hippocampus* 16:312–20.
- Kee N, Sivalingam S, Boonstra R, Wojtowicz JM. (2002) The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis. *J Neurosci Methods*.115(1):97-105.
- Kee N, Teixeira CM, Wang AH, Frankland PW (2007) Preferential incorporation of adult-generated granule cells into spatial memory networks in the dentate gyrus. *Nat Neurosci* 10:355-362.
- Kempermann G, Gast D, Kronenberg G, Yamaguchi M, Gage FH (2003) Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development* 130:391-399.
- Kempermann G, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G (2004) Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci* 27:447-452
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH (1997) Genetic influence on neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Sep 16;94(19):10409-14.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH (1997) More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386:493-495.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH (1998). Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *J Neurosci* 18:3206–3212.
- Kesner R. P., Gilbert P. E., and Barua L. A. (2002) The role of the hippocampus in memory for a temporal order of a sequence of odors *Behav Neurosci*. 116(2):286-90

- Kesner RP, Gilbert PE, Barua LA. (2002) The role of the hippocampus in memory for the temporal order of a sequence of odors. *Behavioral Neuroscience* 116, 2: 286–290.
- Kirschenbaum B, Doetsch F, Lois C, Alvarez-Buylla A. (1999) Adult subventricular zone neuronal precursors continue to proliferate and migrate in the absence of the olfactory bulb. *J Neurosci.* 19(6):2171-80.
- Kosodo Y, Röper K, Haubensak W, Marzesco AM, Corbeil D, Huttner WB. (2004) Asymmetric distribution of the apical plasma membrane during neurogenic divisions of mammalian neuroepithelial cells. *EMBO J.* 23(11):2314-24.
- Kriegstein A, Alvarez-Buylla A. (2009) The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci* 32:149-84.
- Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH (1996) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* 16:2027-2033.
- Kuipers SD, Tiron A, Soule J, Messaoudi E, Trentani A, Bramham CR (2009) Selective survival and maturation of adult-born dentate granule cells expressing the immediate early gene *Arc/Arg3.1*. *PLoS One* 4:e4885
- Laik, Kaspar BK, Gage FH, Schaffer DV (2003). Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo. *Nat Neurosci*, 6(1):21-7,
- Landis S.C. (1990) Target regulation of neurotransmitter phenotype. *Trends Neurosci* 13:344-350.
- Lee E, Son H (2009) Adult hippocampal neurogenesis and related neurotrophic factors. *BMB Rep.* 42:239-44.
- Lee I, Yoganarasimha D, Rao G, Knierim J(2004) Comparison of population coherence of place cells in hippocampal subfields CA1 and CA3. *Nature* 430:456-459.
- Leutgeb JK , Treves A, Meyer R, Barnes CA, McNaughton BL, Moser MB, Moser EI, (2005) Progressive transformation of hippocampal neuronal representations in "morphed" environments. *Neuron* 48: 345-358.
- Leutgeb JK, Leutgeb S, Moser MB, Moser EI (2007) Pattern separation in the dentate gyrus and CA3 of the hippocampus. *Science* 315:961–966.
- Levitt P, Rakic P (1980) Immunoperoxidase localisation of glial fibrillary acidic protein in radial glial cells and astrocytes of the developing rhesus. *J Comp Neurol.*193(3):815-40.
- Levy WB(1996) A sequence predicting CA3 is a flexible associator that learns and uses context to solve hippocampal-like tasks *Hippocampus* 6; 6: 579–590.
- Link W, Konietzko U, Kauselmann G, Krug M, Schwanke B, Frey U, Kuhl D. (1995) Somatodendritic expression of an immediate early gene is regulated by synaptic activity.

- Lois C, Alvarez-Buylla A. (1994) A. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 264, 1145–1148.
- Lois C, Garcia-Verdugo, J. M. y Alvarez-Buylla, A. (1996) Chain migration of neuronal precursors. *Science* 271, 978–981.
- Lyford GL, Yamagata K, Kaufmann WE, Barnes CA, Sanders LK, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Lanahan AA, Worley PF (1995) Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. *Neuron* 14:433-445.
- Maier B, Medrano S, Sleight SB, Visconti PE, Scrable H (2003) Developmental association of the synaptic activity-regulated protein arc with the mouse acrosomal organelle and the sperm tail. *Biol Reprod.* 68(1):67-76.
- Marin-Padilla M. (1995) Prenatal development of fibrous (white matter), protoplasmic (gray matter), and layer I astrocytes in the human cerebral. *J Comp Neurol.* 357(4):554-72
- Marr D (1971) Simple memory: A theory for archicortex. *Proc R Soc Lond Ser B* 262:23–81.
- Marrone DF, Ramirez-Amaya V, Barnes CA (2011) Neurons generated in senescence maintain capacity for functional integration. *Hippocampus.* Jun 21. doi: 10.1002/hipo.20959. [Epub ahead of print]
- McAndrews MP, Milner B. (1991). The frontal cortex and memory for temporal order. *Neuropsychologia* 29(9):849-59.
- McMillan TM, Powell GE, Janota I, Polkey CE.(1987) Relationships between neuropathology and cognitive functioning in temporal lobectomy patients.*J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 50(2):167-76.
- McNaughton BL, Battaglia FP, Jensen O, Moser EI, Moser MB. (2006) Path integration and the neural basis of the 'cognitive map'. *Nat Rev Neurosci.* 7(8):663-78.
- Miller MW, Nowakowski RS. (1988) Use of bromodeoxyuridine-immunohistochemistry to examine the proliferation, migration and time of origin of cells in the central nervous system *Brain Res.*457(1):44-52.
- Milner B, Penfield W. (1955) The effect of hippocampal lesions on recent memory. *Trans Am Neurol Assoc.* 1955-1956;(80th Meeting):42-8.
- Milner B. (1972) Disorders of learning and memory after temporal lobe lesions in man. *Clin Neurosurg.*19:421-46.
- Ming GL, Song H.(2005) Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci.* 28:223-50.

- Misson JP, Edwards MA, Yamamoto M, Caviness VS Jr. (1988) Identification of radial glial cells within the developing murine central nervous system: studies based upon a new immunohistochemical marker. *Brain Res Dev Brain Res.* 44(1):95-108.
- Misson JP, Takahashi T, Caviness VS Jr. (1991) Ontogeny of radial and other astroglial cells in murine cerebral cortex. *Glia* 4:138–148
- Morris RG, Garrud P, Rawlins JNP, O’Keefe J (1982) Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297:681– 683.
- Morstyn G, Hsu SM, Kinsella T, Gratzner H, Russo A, Mitchell JB. (1983) Bromodeoxyuridine in tumors and chromosomes detected with a monoclonal antibody. *J Clin Invest.* (5):1844-50.
- Moscovitch M; Nadel L; Winocur G; Gilboa A; Rosenbaum RS. (2006); The cognitive neuroscience of remote episodic, semantic and spatial memory. *Curr Opin Neurobiol*;16(2):179-90.
- Moser MB, Moser EI (1998) Distributed encoding and retrieval of spatial memory in the hippocampus. *J Neurosci* 18:7535-7542.
- Moser MB, Trommald M, Andersen P. (1994) An increase in dendritic spine density on hippocampal CA1 pyramidal cells following spatial learning in adult rats suggests the formation of new synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(26):12673-12675.
- Mullen RJ, Buck CR, Smith AM (1992) NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development.* 116(1):201-11.
- Muller D, Djebbara-Hannas Z, Jourdain P, Vutskits L, Durbec P, Rougon G, Kiss JZ. (2000) Brain-derived neurotrophic factor restores long-term potentiation in polysialic acid-neural cell adhesion molecule-deficient hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 11;97(8):4315-20. Epub 2000.
- Nácher J, Verea E, Miguel Blasco-Ibañez J. Gómez-Climent M, Castillo –Gómez E, Crespo C, Martínez-Guajiro FJ, McEwen BS (2007) N-methyl-D-aspartate receptor expression during adult neurogenesis in the rat dentate gyrus. *Neuroscience* 144(3): 855-864
- Nadel L, Moscovitch M. Memory consolidation, retrograde amnesia and hippocampal complex *Curr Opin Neurobiol.* (1997) 7(2):217-27.
- Nadel L. (1987) A brain structure: the hippocampus. *Science* 235(4796):1682a.
- Nakazawa K, McHugh TJ, Wilson MA, Tonegawa S (2004) NMDA receptors, place cells and hippocampal spatial memory. *Nat Rev Neurosci* 5:361–372.
- Nelson E, (1985) *Quantum Fluctuations*, Princeton University Press, Princeton,
- Nottebohm F. (1989) From bird song to neurogenesis. *Sci Am.*260(2):74-9.
- Nottebohm F. (1981) A brain for all seasons: cyclical anatomical changes in song control nuclei of the canary brain. *Science.* 214(4527):1368-70.

- Nottebohm F. (1981) A brain for all seasons: cyclical anatomical changes in song control nuclei of the canary brain. *Science*. 214(4527):1368-70.
- O'Keefe J (1976) Place units in the hippocampus of the freely moving rat. *Exp Neurol* 51:78-109.
- Overstreet-Wadiche LS, Bensen AL, Westbrook GL. (2006) Delayed development of adult-generated granule cells in dentate gyrus. *J Neurosci* 26:2326-34.
- Palmer TD, Markakis EA, Willhoite AR, Safar F, Gage FH. (1999) Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS. *J Neurosci*. 1;19(19):8487-97.
- Patapoutian A, Wold BJ, Wagner RA. (1995). Evidence for developmentally programmed transdifferentiation in mouse esophageal muscle. *Science*
- Paton J.A, Nottebohm F (1984) Neurons Generated in the adult brain are recruited into functional circuits. *Science* 225(4666):1046-1048
- Piatti VC, Espósito MS, and Scinder AF (2006) The Timing of Neuronal Development in Adult Hippocampal Neurogenesis. *Neuroscientist* 12:463-468.
- Pikkarainen M, Rönkkö S, Savander V, Insausti R, Pitkänen A (1999) Projections from the lateral, basal, and accessory basal nuclei of the amygdala to the hippocampal formation in rat. *JComp Neurol*. 403(2):229-60.
- Pixley SK, de Vellis J. (1984) Transition between immature radial glia and mature astrocytes studied with a monoclonal antibody to vimentin. *Brain Res* 317:201–209.
- Plath N, Ohana O, Dammermann B, Errington ML, Schmitz D, Gross C, Mao X, Engelsberg A, Mahlke C, Welzl H, Kobalz U, Stawrakakis A, Fernandez E, Waltereit R, Bick-Sander A, Therstappen E, Cooke SF, Blanquet V, Wurst W, Salmen B, Bösl MR, Lipp HP, Grant SG, Bliss TV, Wolfer DP, Kuhl D. (2006) Arc/Arg3.1 is essential for the consolidation of synaptic plasticity and memories. *Neuron*, 52(3):437-44.
- Porstmann T, Ternynck T, Avrameas S. (1985) Quantitation of 5-bromo-2-deoxyuridine incorporation into DNA: an enzyme immunoassay for the assessment of the lymphoid cell proliferative response. *J Immunol Methods*. 82(1):169-79.
- Pulvers J N, Schenk J, Arai Y, Fei JF, Saito K, Huttner WB (2007) On the origin of neurons. *Genome Biology* 2007, 8:311.
- Qian Z, Gilbert ME, Colicos MA, Kandel ER, Kuhl D. (1993) Tissue-plasminogen activator is induced as an immediate-early gene during seizure, kindling and long-term potentiation. *Nature*. 361(6411):453-7.

- Quillian, M. (1968). Semantic Memory, in M. Minsky (ed.), *Semantic Information Processing*, pp 227-270, MIT Press; reprinted in Collins & Smith (eds.), *Readings in Cognitive Science*, section 2.1
- Rakic P (1985) Limits of neurogenesis in primates. *Science*. 227(4690):1054-6.
- Rakic P, Adult Neurogenesis in Mammals An Identity Crisis (2002) *The Journal of Neurosci* 22 (3) 614- 618.
- Rakic P, Nowakowski RS. (1981) The time of origin of neurons in the hippocampal region of the rhesus monkey. *J Comp Neurol*. 196(1):99-128
- Ramirez-Amaya V, Balderas I, Sandoval J, Escobar ML and Bermudez-Rattoni F (2001) Spatial long term memory is related to mossy fiber synaptogenesis, *JNeurosci* (18) 7340-7348.
- Ramirez-Amaya V, Marrone DF, Gage FH, Worley PF, Barnes CA (2006) Integration of new neurons into functional neural networks. *J Neurosci* 26:12237-12241.
- Rao MS, Hattiangady B, Abdel-Rahman A, Stanley DP, Shetty AK (2005) Newly born cells in the ageing dentate gyrus display normal migration, survival and neuronal fate choice but endure retarded early maturation. *Eur J Neurosci* 21:464-476.
- Rao VR, Pintchovski SA, Chin J, Peebles CL, Mitra S K, Finkbeiner S (2006) AMPA receptor regulate transcription of the plasticity related immediate-early gene *Arc* *Nat Neurosci* 9: 887-895
- Rapp PR, Gallagher M. (1996) Preserved neuron number in the hippocampus of aged rats with spatial learning deficits. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:9926-9930.
- Raza A, Kempinski M, Preisler HD, Block AW. (1985) A permanent method of detecting SCE by immunofluorescence using monoclonal anti-BrdU antibodies. *Cancer Genet Cytogenet*. 15(1-2):187-9.
- Raza A, Preisler HD, Mayers GL, Bankert R. (1984) Rapid enumeration of S-phase cells by means of monoclonal antibodies. *N Engl J Med*. 12;310(15):991.
- Ribak CE, Seress L, Amaral DG. (1985) The development, ultrastructure and synaptic connections of the mossy cells of the dentate gyrus. *J Neurocytol*. 14(5):835-57.
- Riegert C, Galani R, Heilig S, Lazarus C, Cosquer B, Cassel JC (2004) Electrolytic lesions of the ventral subiculum weakly alter spatial memory but potentiate amphetamine-induced locomotion. *Behav Brain Res*. 152(1):23-34.
- Rihn LL, Claiborne BJ (1990) Dendritic growth and regression in rat dentate granule cells during late postnatal development. *Brain Res Dev Brain Res* 54:115-124.
- Rosi S, Ramirez-Amaya V, Vazdarjanova A, Worley PF, Barnes CA, Wenk GL (2005) Neuroinflammation alters the hippocampal pattern of behaviorally induced *Arc* expression. *J Neurosci* 25:723-731.

Rossi C, Angelucci A, Costantin L, Braschi C, Mazzantini M, Babbini F, Fabbri ME, Tessarollo L, Maffei L, Berardi N, Caleo M (2006) Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is required for the enhancement of hippocampal neurogenesis following environmental enrichment. *Eur J Neurosci* 24 (7):1850 -1856

Rutishauser U, Landmesser L. (1996) Polysialic acid in the vertebrate nervous system: a promoter of plasticity in cell-cell interactions. *Trends Neurosci.* 19(10):422-7.

Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, Belzung C, Hen R. . (2003) Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science.* 301(5634):805-9.

Scharfman HE. (2007) The CA3 "backprojection" to the dentate gyrus. *Prog Brain Res* 163:627-637.

Schmidt-Hieber C, Jonas P, Bischofberger J (2004) Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature* 429:184-187.

Scoville WB, Milner B.( 1957) Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 20(1):11-21

Seri B, Garcia-Verdugo JM, Collado-Morente L, McEwen BS, Alvarez-Buylla A (2004) Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus. *J Comp Neurol* 478:359–378

Seri B, Garcia-Verdugo JM, McEwen BS, Alvarez-Buylla A (2001) Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci* 21:7153–7160.

Shepherd JD, Rumbaugh G, Wu J, Chowdhury S, Plath N, Kuhl D, Huganir RL, Worley PF (2006) Arc/Arg3.1 mediates homeostatic synaptic scaling of AMPA receptors. *Neuron* 52:475-484.

Small SA, Chawla MK, Buonocore M, Rapp PR, Barnes CA (2004) Imaging correlates of brain function in monkeys and rats isolates a hippocampal subregion differentially vulnerable to aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:7181-7186.

Small TW, Moore IT (2009) Seasonal neuroplasticity of the song control system in tropical, flexibly, and opportunistically breeding birds. *Gen Comp Endocrinol* 163(1-2):135-41.

Squire LR, Zola-Morgan S (1988) Memory: brain systems and behavior. *Trends in Neurosci* 11: (4): 170 -5.

Stahnisch FW, Nitsch R (2002) Santiago Ramón y Cajal's concept of neuronal plasticity: the ambiguity lives on. *Trends Neurosci.* 11:589-91.

Steffenach HA, Sloviter RS, Moser EI, Moser MB (2002) Impaired retention of spatial memory after transection of longitudinally oriented axons of hippocampal CA3 pyramidal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:3194-3198.

- Suzuki WA, Amaral DG (2004) Functional neuroanatomy of the medial temporal lobe memory system. *Cortex* 40(1):220-2.
- Temple S, Alvarez-Buylla A (1999) Stem cells in the adult mammalian central nervous system *Curr Opin in Neurobiol* 9 (1): 135-141
- Tischmeyer W, Grimm R. (1999) Activation of immediate early genes and memory formation. *Cell Mol Life Sci.* 55(4):564-74.
- Tolman EC, Gleitman H (1949) Studies in spatial learning; place and response learning under different degrees of motivation. *J Exp Psychol.* 39(5):653-9.
- Treves A, Rolls ET (1992) Computational constraints suggest the need for two distinct input systems to the hippocampal CA3 network. *Hippocampus* 189–199.
- Trouche S, Bontempi B, Roulet P, Rampon C (2009) Recruitment of adult-generated neurons into functional hippocampal networks contributes to updating and strengthening of spatial memory. *Proc Natl Acad Sci* 106:5919–24.
- Tulving E (2002 ) Episodic memory: from mind to brain. *Annual Review of Psychology* 53, 1–25.
- van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage FH (1999). Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:13427–13431.
- van Praag H, Kempermann G, Gage FH (2000) Neural consequences of environmental enrichment. *Nat Rev Neurosci* 1:191-198.
- van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH (2002) Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 415:1030-1034.
- van Praag H, Shubert T, Zhao C, Gage FH. (2005). Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *J Neurosci* 25:8680–8685.
- Vazdarjanova A, McNaughton BL, Barnes CA, Worley PF, Guzowski JF (2002) Experience-dependent coincident expression of the effector immediate-early genes *arc* and *Homer 1a* in hippocampal and neocortical neuronal networks. *J Neurosci* 22:10067-10071.
- Vescovi AL, Galli R, Reynolds BR (2006) Brain tumour stem cells. *Nature Reviews Cancer.* 6:425-436.
- Vutskits L, Djebbara-Hannas Z, Zhang H, Paccard JP, Durbec P, Rougon G, Muller D, Kiss JZ. (2001) PSA-NCAM modulates BDNF-dependent survival and differentiation of cortical neurons. *Eur J Neurosci.* Apr;13(7):1391-402.
- Vutskits L, Gascon E, Zraggen E, Kiss JZ. (2006) The polysialylated neural cell adhesion molecule promotes neurogenesis in vitro. *Neurochem Res.* Feb;31(2):215-25. Epub 2006 Mar 30.

- Wang KH, Majewska A, Schummers J, Farley B, Hu C, Sur M, Tonegawa S (2006) In vivo two-photon imaging reveals a role of arc in enhancing orientation specificity in visual cortex. *Cell* 126:389-402.
- Wang S, Scott BW, Wojtowicz N. (2000) Heterogenous Properties of Dentate Granule Neurons in the Adult Rat. *Dev Neurobiol*; 2: 248–57.
- Warner-Schmidt JL and RS Duman (2007) Vascular endothelial growth factor is an essential mediator of the neurogenic and behavioral actions of antidepressants. *Proc Nat Acad Sci (USA)* 104:4647-4652.
- Weiler II, Greenough WT. (1993) Metabotropic glutamate trigger postsynaptic protein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 90:7168-7171
- Weissman IL, Anderson DJ, Gage F. (2001) Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 17:387-403.
- West MJ, Slomianka L, Gundersen HJ. (1991) Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat Rec*. 231:482-497.
- Willshaw DJ, Buckingham JT (1990) An Assessment of Marr's Theory of the Hippocampus as a Temporary Memory. *Philosophical Transactions: Biological Sciences* 329 :205-215.
- Winocur G, Wojtowicz JM, Sekeres M, Snyder JS, Wang S. (2006) Inhibition of neurogenesis interferes with hippocampus-dependent memory function. *Hippocampus* 16:296–304.
- Witter M P, Groenewegen HJ, Lopes da Silva F H, Lohman AH (1989) Functional organization of the extrinsic and intrinsic circuitry of the parahippocampal region. *Progress in Neurobiology* 33: 3; 161–253.
- Wojtowicz JM (2012) Adult neurogenesis. From circuits to models. *Behav Brain Res*. 14;227(2):490-6
- Worley PF, Bhat RV, Baraban JM, Erickson CA, McNaughton BL, Barnes CA. (1993) Thresholds for synaptic activation of transcription factors in hippocampus: correlation with long-term enhancement. *J Neurosci*. 13(11):4776-86.
- Wyss JM, Swanson LW, Cowan WM (1979) A study of subcortical afferents to the hippocampal formation in the rat. *Neuroscience* 4: 463-476.
- Zhao C, Deng W, Gage FH. (2008) Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 132(4):645-60.
- Zhao C, Teng EM, Summers RG Jr, Ming GL, Gage FH. (2006). Distinct morphological stages of dentate granule neuron

## Índice de figuras

Figura 1.- Técnicas para visualizar neuronas nuevas en el DG

Figura 2.- Regiones neurogénicas

Figura 3.- Esquema de capas germinales y su destino celular

Figura 4.- Jerarquía celular del origen de células en el SNC

Figura 5.- Hipótesis unificada sobre el linaje de células madres neurales

Figura 6.- Linajes putativos en la ZSV

Figura 7.- Corte sagital mostrando la VMR

Figura 8.- Modelo de organización de células en la ZSG

Figura 9.- Fotomontaje de imágenes ( integración anatómica)

Figura 10.- Diagrama esquemático de la capa de células granulares

Figura 11.- Número de células sobrevivientes a lo largo del tiempo

Figura 12.- Secuencia de eventos morfológicos del desarrollo de las nuevas neuronas

Figura 13.- Representación esquemática de los cambios fisiológicos de las nuevas neuronas

Figura 14.- Anatomía del Hipocampo

Figura 15.- Circuito trisináptico del Hipocampo

Figura 16.- Aferencias y eferencias del Hipocampo

Figura 17.- Registro electrofisiológicos mostrando campos receptivos espaciales

Figura 18.- Ensamblés según Hebb

Figura 19.- Proporción de células BrdU positivas expresando Arc modificado de Ramírez-Amaya et al., 2005

Figura 20.- Modificación de la figura 5 de Sandoval et al., 2011 con datos de otros grupos utilizando los mismos métodos

## Índice de tablas

Tabla 1.- Porcentaje de células Brd U positivas localizadas en la capa de células granulares ....

# When Are New Hippocampal Neurons, Born in the Adult Brain, Integrated into the Network That Processes Spatial Information?

C. Jimena Sandoval<sup>1</sup>, Marisela Martínez-Claros<sup>1,9</sup>, Paola C. Bello-Medina<sup>1,9</sup>, Oswaldo Pérez<sup>2</sup>, Víctor Ramírez-Amaya<sup>1\*</sup>

**1** Laboratorio de redes neuronales plásticas, Departamento de Neurobiología Conductual y Cognitiva, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla, Querétaro Qro, México, **2** Laboratorio de neurofisiología de la percepción, Departamento de Neurobiología Conductual y Cognitiva, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla, Querétaro Qro, México

## Abstract

Adult-born neurons in the dentate gyrus (DG) functionally integrate into the behaviorally relevant hippocampal networks, showing a specific Arc-expression response to spatial exploration when mature. However, it is not clear when, during the 4- to 6-week interval that is critical for survival and maturation of these neurons, this specific response develops. Therefore, we characterized Arc expression after spatial exploration or cage control conditions in adult-born neurons from rats that were injected with BrdU on one day and were sacrificed 1, 7, 15, 30, and 45 days post-BrdU injection (PBI). Triple immunostaining for NeuN, Arc, and BrdU was analyzed through the different DG layers. Arc protein expression in BrdU-positive cells was observed from day 1 to day 15 PBI but was not related to behavioral stimulation. The specific Arc-expression response to spatial exploration was observed from day 30 and 45 in about 5% of the BrdU-positive cell population. Most of the BrdU-positive neurons expressing Arc in response to spatial exploration (~90%) were located in DG layer 1, and no Arc expression was observed in cells located in the subgranular zone (SGZ). Using the current data and that obtained previously, we propose a mathematical model suggesting that new neurons are unlikely to respond to exploration by expressing Arc after they are 301 days old, and also that in a 7-month-old rat the majority (60%) of the neurons that respond to exploration must have been born during adulthood; thus, suggesting that adult neurogenesis in the DG is highly relevant for spatial information processing.

**Citation:** Sandoval CJ, Martínez-Claros M, Bello-Medina PC, Pérez O, Ramírez-Amaya V (2011) When Are New Hippocampal Neurons, Born in the Adult Brain, Integrated into the Network That Processes Spatial Information? PLoS ONE 6(3): e17689. doi:10.1371/journal.pone.0017689

**Editor:** Paul Adlard, Mental Health Research Institute and the University of Melbourne, Australia

**Received:** November 9, 2010; **Accepted:** February 10, 2011; **Published:** March 9, 2011

**Copyright:** © 2011 Sandoval et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was funded by CONACyT 51028 and PAPIIT IN213907 and IN216510-21. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

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

\* E-mail: vramirez@unam.mx

These authors contributed equally to this work.

## Introduction

New neurons born in the adult mammal Dentate Gyrus (DG) functionally integrate into the hippocampal network [1,2,3]. The integration process resembles the one described during early development [4,5] but is slower [6,7]. During the first 4 weeks ~80% of the new neurons die, and the remaining 20% survive for at least 11 months [8]. Thus, the first 4 weeks are critical for the survival of these new neurons and also for their maturation [9,10]. For example, in the first week after birth new neurons are partially differentiated [11] and express doublecortin (DCX), which is important for neuronal migration [12], and by the third week ~90% of the new neurons express NeuN, a marker of mature neurons [12,8]. New neurons do not show electrophysiological features of maturity until the third week [13,14]: their GABAergic response, which is initially depolarizing, becomes hyperpolarizing around this time [15,16], and the glutamatergic input matures during weeks 3 and 4 [13,14,15]. Anatomically, the axon, dendrites, and their spines reach maturity around weeks 3 to 4 [17,14,18].

By detecting the expression of the immediate early gene (IEG) Arc induced by spatial exploration, we previously examined the functional integration of 5-month-old, adult-born granular neurons into the behaviorally relevant hippocampal network [2]. We found that more adult-born neurons expressed Arc in animals allowed to explore, than in cage control animals, indicating that adult-born neurons have a specific Arc-expression response to spatial exploration [2]. Nevertheless, it is not clear when this specific response to exploration appears.

By detecting the expression of the IEGs cFos and Arc evoked during a water-maze task in previously trained animals, Kee and colleagues [19] observed that 6-week-old new neurons, but not younger ones, are recruited into circuits that can be re-activated at 10 weeks. They also showed that the expression of cFos after a single water-maze session occurs only in 6-week- but not in 1-week-old new neurons, similar to previous findings showing cFos expression after seizures only in 3-week-old new neurons [20]; this earlier work was the first to show responsiveness of adult-born granular neurons to spatial behavior [20]. Additionally, Tashiro and colleagues found that when they are 2 weeks old, new neurons are preferentially

recruited into circuits that process information from experience in an enriched environment, which enhances new neuron survival [21].

However, the question remains as to when, during this critical period for survival and maturation, do adult-born neurons integrate into the behaviorally relevant hippocampal network, developing a specific response to spatial exploration? The expression of the IEG Arc and its protein product, stimulated by behaviorally induced neural activity [22] and important for synaptic plasticity [23,24], is detected as early as 24 hours after the birth of adult-born granular neurons [25]. Therefore, this question can be answered by comparing Arc protein expression in new granular neurons 30 minutes after spatial exploration or cage control conditions during the critical time for survival and maturation, without affecting these processes by behavioral stimulation.

Animals were administered BrdU on day 0 and sacrificed on day 1, 7, 15, 30, or 45, in each case thirty minutes after a 5-minute exploration session or cage control conditions (Fig. 1). Their brains were processed for triple immunohistochemistry for NeuN, Arc, and BrdU (also for DCX&BrdU and Arc&DCX), and semi-confocal and confocal microscopy images were taken for later analysis (see Fig. 2A&B, Fig. 3, Fig. 4A, and Fig. 5D–H).

We found that the expression of Arc occurs without stimulation in 1- to 15-day-old new granular neurons. A specific response to exploration was observed in ~5% of the 30- to 45-day-old new neurons. This temporal pattern of Arc expression in response to spatial exploration reflects the course of selective survival and integration in a network that processes spatial information. Ninety percent of the BrdU-positive cells expressing Arc in response to spatial exploration were located in DG layer 1 (L1), and no Arc expression was detected in new cells located in the subgranular zone (SGZ). Based on calculations using the current data and that obtained previously [2], we hypothesize that new neurons may no longer respond to spatial exploration after they are 301 days old, and that in a 7-month-old animal the majority (60%) of the neurons that respond to exploration were born during adulthood.

## Results

### Survival and migration of new neurons

The proportion of BrdU-positive cells in the DG upper blade varied significantly across the different maturation times ( $F_{4,30} = 29.771$ ,  $p < 0.001$ ) (Fig. 2C). One day post BrdU injection (PBI), 0.26% of the entire population of granular DG cells included in the study had incorporated BrdU, and seven days PBI, the percentage of BrdU-positive cells (0.35%) was significantly higher (the Bonferroni test yields a  $p < 0.01$ ). At 15 days PBI, the proportion of new granular cells was 0.23%, which was significantly lower than on day 7 ( $p < 0.01$ ) but not statistically different from day 1. Thirty days PBI, the percentage of BrdU-positive cells was only 0.17% and was significantly lower than that found on days 1, 7, and 15 PBI ( $p$ 's  $< 0.01$ ). Finally, 45 days PBI,

the percentage of BrdU-positive cells was only 0.15%, which was significantly lower than on days 1, 7, and 15 ( $p$ 's  $< 0.01$ ) but was not different from day 30. The ANOVA of the absolute BrdU-positive cell counts revealed a similar pattern through time ( $F_{4,30} = 89.772$ ,  $p < 0.001$ , Bonferroni test yields  $p$ 's  $< 0.01$ ). These counts represent the average number of BrdU-positive cells found in each PBI group (Fig. 2D), without adjusting for the total population of granular cells included in the analysis.

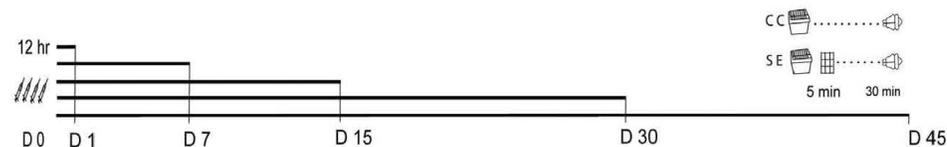
In the animals sacrificed on day 1 PBI (Fig. 2E), 60% of the BrdU-positive cells were located in the sub granular zone (SGZ), 32% in DG layer 1 (L1), 7% in layer 2 (L2), and only 1% were found in layer 3 (L3). On day 7 PBI, 32% of the BrdU-positive cells were located in the SGZ, 54% in L1, 11% in L2, and 3% in L3. On day 15 PBI, 16% of the BrdU-positive cells were located in the SGZ, 58% in L1, 19% in L2, and 6% in L3. At 30 days PBI, 13% of the BrdU-positive cells were located in the SGZ, 54% in L1, 24% in L2, and 10% in L3. Finally, at 45 days PBI, 12% of the BrdU-positive cells were located in the SGZ, 51% in L1, 23% in L2, and 13% in L3.

The proportion of cells found in each DG layer was compared between the different PBI groups using a one-way ANOVA (Fig. 2E). The proportion of cells in the SGZ differed among groups ( $F_{4,30} = 176.086$ ,  $p < 0.001$ ), where the proportion of BrdU-positive cells found in animals sacrificed on day 1 PBI was significantly different (using the Bonferroni post hoc correction) from all other groups ( $p < 0.01$ ). For L1, the proportion of BrdU-positive neurons differed significantly among groups ( $F_{4,30} = 47.687$ ,  $p < 0.001$ ), and the post hoc analysis showed differences between animals sacrificed at day 1 PBI and all other groups ( $p < 0.01$ ). Differences were also found between animals sacrificed at day 15 and day 45 PBI ( $p < 0.01$ ). In L2, significant differences were found in the proportion of BrdU-positive cells among groups ( $F_{4,30} = 40.070$ ,  $p < 0.001$ ), and the post hoc analysis revealed differences between animals sacrificed at day 1 PBI and the animals sacrificed 15, 30, and 45 days PBI ( $p < 0.01$ ); differences were also found between animals sacrificed at day 7 PBI and those sacrificed at days 15, 30, and 45 PBI ( $p < 0.01$ ); in L3, significant differences were found among groups ( $F_{4,30} = 35.403$ ,  $p < 0.001$ ), and the post hoc analysis revealed that most of the PBI groups differed from each other ( $p < 0.01$ ), except those sacrificed on day 1 vs. day 7 PBI and animals sacrificed on day 7 vs. 15 PBI.

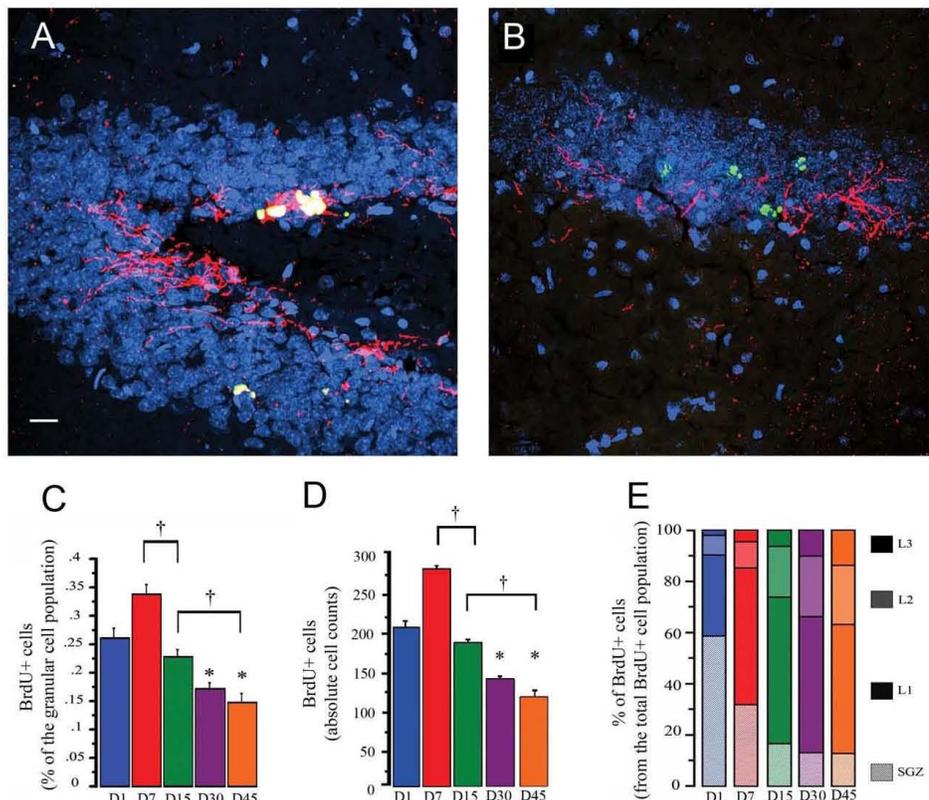
The differences in the proportion of BrdU-positive cells located in the different regions between the animals sacrificed at different PBI times indicate that the newly incorporated cells migrate through the different DG layers.

### Sparse Arc expression in DG granular cells after spatial exploration

After spatial exploration (SE), the expression of the immediate early gene Arc was observed in ~1.5% of the granular cell



**Figure 1. Schematic representation of the experimental procedure.** BrdU was administered on day 0, in 4 separate ip injections (50 mg/Kg each) every 4 h from 9:00 A.M. to 9:00 P.M. Animals were sacrificed 1, 7, 15, 30, or 45 days post BrdU injections (PBI), either from their home cages (cage control, CC) or 30 min after a 5-min spatial exploration (SE). doi:10.1371/journal.pone.0017689.g001



**Figure 2. Survival and migration of adult-born granular cells.** Confocal images, taken with a 25× objective, of the DG stained with DCX in red, BrdU in green, and counterstained with DAPI in blue. A) shows BrdU-positive cells co-localizing (yellow) with DCX from an animal sacrificed 7 days PBI; B) shows BrdU-positive cells from an animal sacrificed 45 days PBI that do not co-localize with DCX. C) Average proportion of BrdU-positive cells from the total granular cell population found in each (1, 7, 15, 30, and 45 days) PBI group. \* $P < 0.01$  as compared to day 1 PBI group, †  $P < 0.01$  between indicated groups. Note the significant decrease in the proportion of BrdU-positive cells found with time after new neurons were born. D) Absolute BrdU-positive cell counts found in each PBI group (1, 7, 15, 30 and 45 days); note that the results are very similar to the proportions shown in C. E) Percentage of BrdU-positive cells from the total BrdU-positive cell population found in each DG layer: the subgranular zone (SGZ), DG layer 1 (L1), DG layer 2 (L2), and DG layer 3 (L3), for the different PBI times. The different proportions of BrdU-positive cells found in the various layers with increasing time suggest that new cells migrate through the DG layers. doi:10.1371/journal.pone.0017689.g002

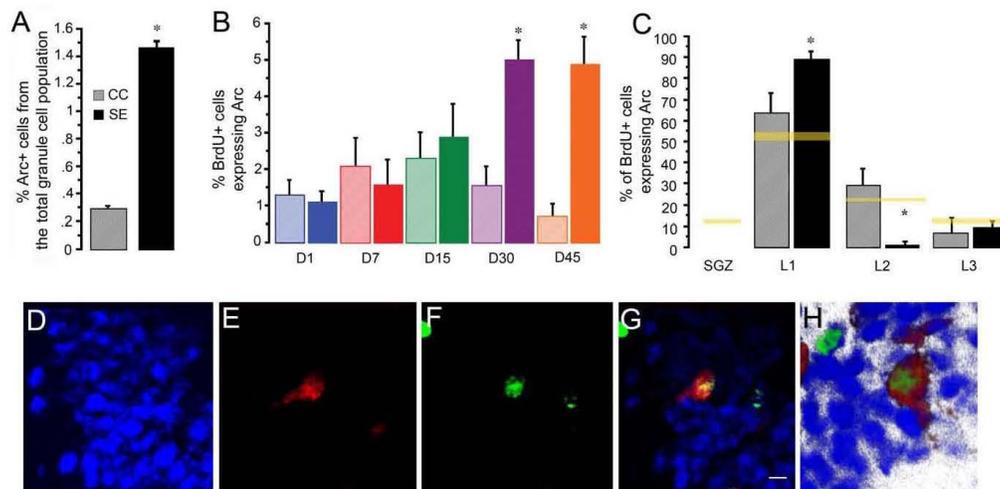
population, while in the cage control (CC) animals only ~0.3% of the granular cells were classified as Arc positive. The percentage of cells expressing Arc was significantly different ( $F_{1,33} = 12.042$ ,  $p < 0.001$ ) between CC and SE animals, demonstrating that a small population of granular neurons in the DG expressed Arc in response to a novel spatial exploration in an open box (Fig. 3A), as previously reported [22,26,27], and suggesting a sparse DG code for spatial information.

#### Specific Arc expression response to spatial exploration develops in new neurons over a 30-day period

By using double staining, we observed that in animals sacrificed at early PBI times (1–15), BrdU is found mostly in DCX-positive cells and in late PBI time (30–45) primarily in NeuN-positive neurons (Fig. 3D–H). We also observed that Arc can be expressed

in DCX positive cells. At early times (Fig. 4.) For these reasons we included all BrdU-positive cells found in the different DG layers in further analysis.

Arc expression in the BrdU-positive population differed across the different treatment groups (Fig. 3B). A 2-way ANOVA showed significant differences between days PBI ( $F_{4,25} = 3.79$ ,  $p < 0.02$ ); between exploration and cage control conditions ( $F_{4,25} = 13.603$ ,  $p < 0.01$ ), and among days and the behavioral treatment ( $F_{4,25} = 5.437$ ,  $p < 0.0027$ ). One day PBI, Arc expression was observed in 1.3% of the BrdU-positive cells found in cage control animals (CC) and in 1.01% of the BrdU-positive cells found in animals exposed to spatial exploration (SE); these values were not significantly different. Arc was expressed in 2.1% of the 7-day-old new neurons from CC animals and in a similar percentage (1.56%) of the corresponding new neurons from SE animals. Moreover,



**Figure 3. Arc expression after spatial exploration.** A) Percentage of the whole granular cell population that expresses Arc after spatial exploration. Note that Arc expression is observed in a higher proportion of cells in the exploration group (solid bar) than in cage controls (patterned bar). \* $P < 0.001$ . B) Percentage of BrdU-positive cells that expressed Arc in each PBI group, i.e., sacrificed either directly from its home cage (CC, patterned bar) or after spatial exploration (SE, solid bar). Arc expression in BrdU-positive cells occurs with no behavioral stimulation from day 1 until day 15 PBI, but on days 30 and 45 PBI, Arc expression was observed in significantly more BrdU-positive neurons from exploration animals than from cage controls. \* $P < 0.01$ . C) Percentage of BrdU-positive cells expressing Arc in each DG layer, either after cage control conditions (patterned bar) or spatial exploration (solid bar). The yellow horizontal bars represent the proportion of the total BrdU-positive cells found in each layer on days 30 and 45. Note that no Arc expression was found in BrdU-positive neurons in the SGZ. In L1, the IEG Arc was expressed in a larger proportion of new neurons from exploration animals than from the cage controls, \* $P < 0.01$ , indicating that BrdU-positive neurons located in L1 are more likely to respond to exploration. The opposite was observed in L2, i.e. the proportion of BrdU-positive cells in L2 that expressed Arc was much lower in SE than in CC animals. D to H)  $40\times$  confocal images taken from the middle plane of a confocal microscope image stack were used to verify the co-localization of Arc and BrdU. D) NeuN in blue, E) Arc protein in red, F) BrdU in green, G) NeuN, Arc, and BrdU merge; note that BrdU-positive neurons expressing Arc appear yellow. H) Flat image obtained from a 3D voxels reconstruction. The rotation of the 3D projection was used to confirm BrdU and Arc co-localization. The scale bar in G is  $100\ \mu\text{m}$ . doi:10.1371/journal.pone.0017689.g003

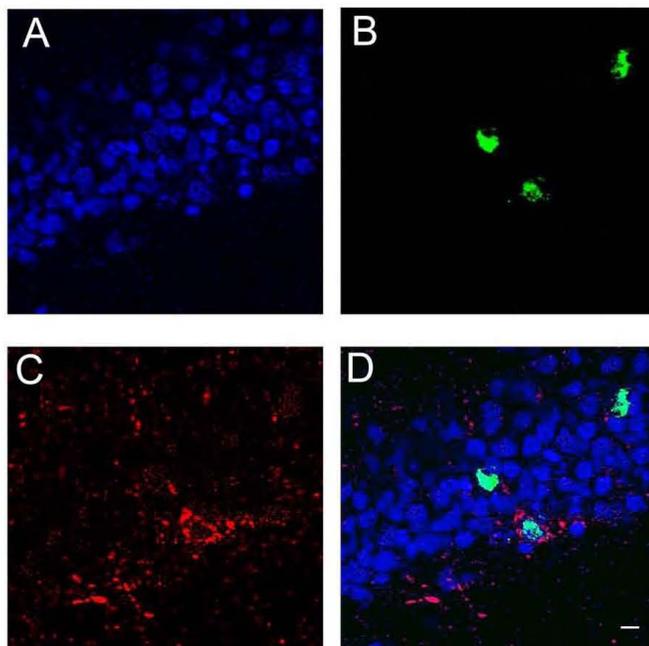
the proportion of 7-day-old, BrdU-positive cells expressing Arc (BrdU+/Arc+ cells) did not differ from the proportion of new cells expressing Arc on day 1 PBI from either the SE or CC group. Fifteen days PBI, Arc was expressed in a similar proportion of new cells from CC animals ( $\sim 2.3\%$ ) and from the SE group ( $2.9\%$ ). Although Arc expression in BrdU-positive cells tended to increase from day 1 to day 15 PBI, this increase was not statistically significant. Importantly, these results suggest that Arc expression at this early time after these new neurons were born may not be driven by spatial behavior stimulation. In contrast, when new neurons were 30 days old, the proportion of BrdU+/Arc+ cells was significantly greater ( $p < 0.01$ ) in SE ( $\sim 5\%$ ) than in CC animals ( $\sim 1.5\%$ ). The proportion of BrdU+/Arc+ cells at 45 days PBI also differed significantly ( $p < 0.001$ ) between SE ( $4.8\%$ ) and CC animals ( $0.7\%$ ).

A repeated measures ANOVA was done on the percentage of cells expressing Arc at the different PBI times and revealed significant changes with time ( $F_{1,5} = 26.839$ ,  $p < 0.01$ ), differences between SE and CC groups ( $F_{4,4} = 3.385$ ,  $p < 0.05$ ), and also a significant interaction ( $F_{4,6} = 5.887$ ,  $p < 0.01$ ), indicating that a specific Arc expression response to spatial exploration developed between 30 and 45 days after new neurons were born.

It is important to note that the proportion of BrdU+/Arc+ cells in response to exploration at 45 days PBI was significantly greater than the percentage of total granular cells expressing Arc in response to exploration ( $T_6 = 7.995$ ,  $p < 0.001$ ).

#### Exploration-induced Arc expression in BrdU-positive cells is observed mainly in DG L1

The position of the BrdU-positive cells expressing Arc within the different granular layers of the dentate gyrus [8] was identified, and for each layer we calculated the proportion of BrdU-positive cells expressing Arc relative to the total population of BrdU-positive cells that express Arc. These proportions were compared between CC and SE groups (Fig. 3C) at all 5 time points when the animals were sacrificed. Significant differences were found between CC and SE animals in L1 ( $F_{1,33} = 8.754$ ,  $p < 0.01$ ), where  $89.3\%$  of the BrdU-positive cells expressing Arc from the SE group but only  $63.78\%$  from the CC group were located. In L2, the proportion of Arc-expressing cells also differed significantly between CC and SE animals ( $F_{1,33} = 14.509$ ,  $p < 0.001$ )  $29.56\%$  of the BrdU-positive cells expressing Arc from the CC group were located in L2 as compared to  $1.67\%$  from the SE animals. In L3, no significant differences were found between groups. The MANOVA analysis revealed significant differences between the various layers in the proportion of BrdU-positive cells expressing Arc (Wilks lambda  $F_{2,31} = 7.183$ ,  $p < 0.01$ ), and it is clear that the L1 region had the highest Arc expression in BrdU-positive cells. Importantly, BrdU-positive cells expressing Arc were not found in the SGZ. Using a Student's t-test we compared the proportion of BrdU+/Arc+ cells with the proportion of BrdU-positive cells among the different DG layers. Since the specific Arc expression



**Figure 4. Arc expression in DCX-positive cells.** The images show double immunohistochemistry for Arc and DCX, and were taken with the Apotome microscope system (Zeiss) with a 40×/1.3 NA objective using Z section resolution. A) DAPI is shown in blue, B) Arc protein is shown in green, C) DCX is shown in red, and D) the 3 channels were merged. Scale bar=100  $\mu$ m. doi:10.1371/journal.pone.0017689.g004

response to exploration develops after 30 days, in this analysis we included only the animals sacrificed 30 and 45 days after the BrdU injection. The proportion of BrdU+/Arc+ cells were significantly higher than the proportion of BrdU+ cells in L1 only for SE animals and not for CC animals ( $p < 0.01$ ). In contrast, in layer 2 of SE but not CC animals, the proportion of BrdU+/Arc+ cells was significantly lower ( $p < 0.01$ ) than the proportion of all BrdU+ cells. No differences were found in layer 3.

#### A hypothesis suggesting that adult-born neurons modify their contribution to spatial information processing throughout their life and the animal's life span

Here, we found that the proportion of new granular cells that responded to exploration 30 days after these neurons were born was 5%, and at day 45 PBI it was 4.8%. Previously, we reported that ~2.8% of the 5-month-old, newly incorporated neurons responded to exploration [2]. This suggests that the likelihood of a new neuron to respond to behavioral exploration decreases with time [28]. In this study, we included ~80,000 upper blade DG granular cells per animal, obtained from 450  $\mu$ m in the antero-posterior axis. The whole sample region measured 1300  $\mu$ m, and we calculated that it contained 231,000 DG granular neurons. From this population of neurons, 1.5% (3,465) responded to spatial exploration, a result similar to what has been reported previously [22,26,27].

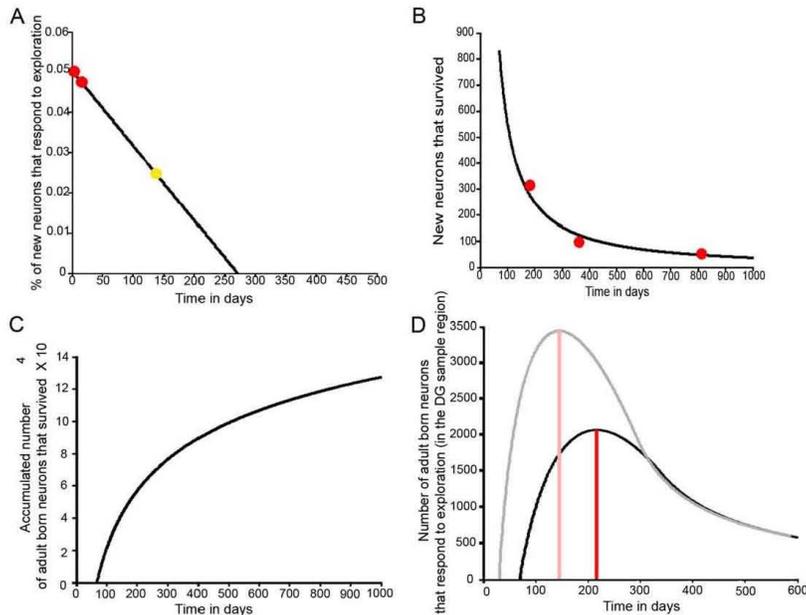
We hypothesize that the probability of the adult-born granular neurons to respond to spatial exploration changes linearly with time:

$$P(t) = P_0 + rt$$

where  $P_0$  indicates the percentage of neurons that respond when they are 30 days old. We used a linear regression to estimate the parameters of our model ( $P_0 = .054$ ,  $r = -0.0002$ ,  $R^2 = 0.9989$ ,  $\beta = 0.0208$ ), and the result is shown in Figure 5A, where the red circles represent our current data, and the yellow circle represents our earlier result [2]. The line represents the model, with which we calculate the probability that granular cells will respond to spatial exploration after they are more than 150 days old. Obtaining the intercept of the line to reach a probability of 0 by the following formula:

$$t = -\frac{P_0}{r} = -\frac{0.054}{0.0002}$$

This suggests that 301 days after the new neurons were born, they no longer respond to spatial exploration. We also used the individual data from each animal to calculate this linear regression and obtained a significant regression ( $P_0 = 0.0505$ ,  $r = -0.0002$ ,  $R^2 = 0.5101$ ,  $\beta = 0.0135$ ), validating the conclusion obtained with the average proportions. We acknowledge that a linear model with only 3 data points presents clear limitations, and further research is needed to add more data points between 45 and 360 days. This will allow us to determine if a linear model is adequate and will test the prediction that cells no longer respond to exploration after they are ~1 year old.



**Figure 5. Contribution of adult-born neurons to spatial information processing: a hypothesis suggested by integrating our current data with that obtained previously.** A) Linear regression plot calculated using the percentage of BrdU-positive cells that specifically respond to spatial exploration by expressing Arc from animals sacrificed on days 30 and 45 PBI (red dots), and those sacrificed 150 days PBI (yellow dot) [2]. Using this model we calculated the maximum length of time throughout the life span of the animal during which adult-born neurons respond to spatial exploration (time in days means age of animals in X axis for all graphs). The result suggests that after 301 (271+30) days, the neurons born in the adult brain may no longer respond to spatial exploration. B) The data obtained from Kuhn [29] was scaled to fit our BrdU-positive cell proportions, and a power model was used to calculate the number of neurons that survived at the different times through the animal's life. C) Cumulative number of new neurons that survived after 30 days including all the neurons born since 70 days post natal, when the animal is already mature. D) Total number of neurons born after DG development that contributes to the DG spatial exploration response over the course of the animal's life span. The red line shows the time (day 217) when the maximum number of newly incorporated neurons participates in the DG network response to spatial information processing. At this time, 2057 new neurons respond to spatial exploration, which represents 60% of the total DG granular cell population that responds to spatial exploration. The super-imposed graph (shown in light colors) represents the same calculation including the number of neurons born since postnatal day 1 that survive for 30 days. Notice in particular that the contribution to spatial information processing of neurons born after the DG development is complete increases through the early age of the animals, and after reaching its maximum, it rapidly decreases to a plateau reached in late adulthood.  
doi:10.1371/journal.pone.0017689.g005

The number of new granular neurons found 45 days after birth in the sampled regions was 345. Adult-born neurons that survived for 4 weeks remained stable for at least 11 months [8]; therefore, we can assume that the number of newly incorporated neurons detected at days 30–45 PBI represents the number of cells born on day 1 that will survive for the rest of the animal's life. However, the rate of cell proliferation varies across the animal's life span [29], and this modifies the number of stable new neurons throughout the life time.

Animal's age in days = t	180	360	810
# of Neurons in the sampled region	58	18	10

By using these data [29] we propose a power model:

$$N(t) = N_0 \left(\frac{t}{30}\right)^s$$

Since the DG is fully assembled after the first post-natal weeks [30], sexual maturity is reached after 6 weeks [31], and the neurons

that survive for 4 weeks remain, we perform further calculations using the number of granular cells that were born and survived since post-natal day 70.  $N_0$  is then the number of new granular neurons that survive for 30 days. In order to estimate the parameters of our model, we calculate a linear regression. We choose 's' such that the equation predicts the number of BrdU-positive cells that we detect after 45 days in the current work (Figure 2C&D). ( $N(150) = 345$ ). The result,  $N_0 = 2218.2$ , is shown in Figure 5B, where the red dots are the data and the solid line is the model. From these data we calculate the cumulative number of neurons that were born after the animal was sexually mature and that survived throughout the animal's life span, assuming that there is no mortality after 30 days of maturation [8].

$$\int_0^t N(\tau) d\tau$$

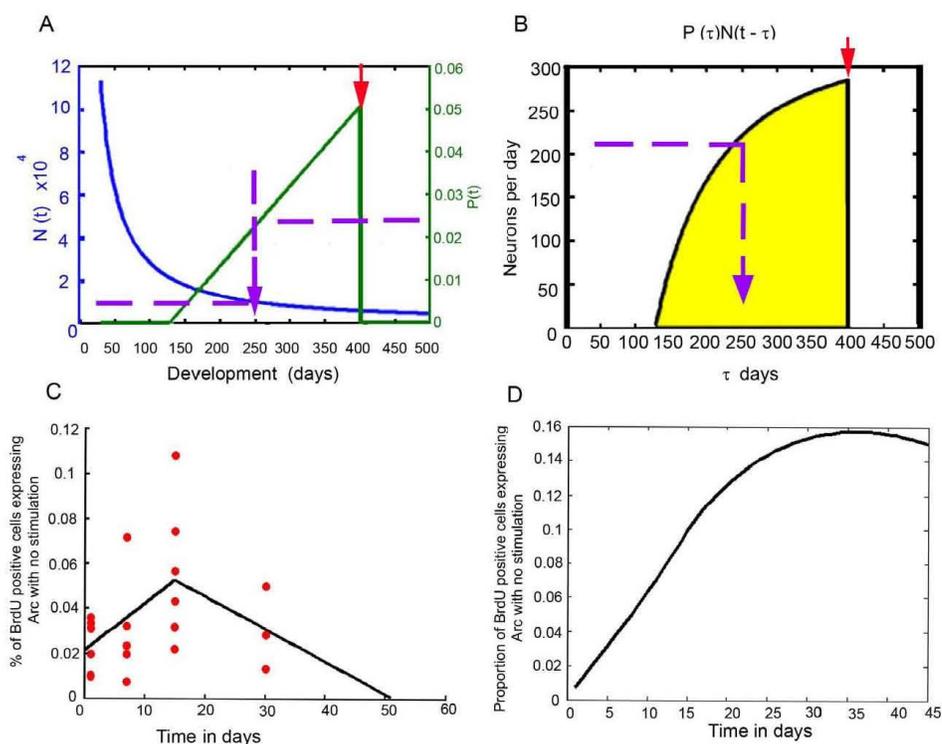
The cumulative number of adult-born granular neurons over the course of the animal's life span is shown in Figure 5C. In order to estimate the number of adult-born granular neurons that contribute to the DG response to spatial exploration throughout the animal's life span, we considered the number of neurons that are added through time ( $N(t)$ ), and the probability that they will respond at different time intervals ( $P(t)$ ) after they were added. In order to combine these measurements we used a convolution of the variables  $N$  and  $P$ .

$$R(t) = \int_{30}^{\infty} N(\tau)P(t-\tau)d\tau$$

This is the overlap level of  $N$  and the function of  $P$  transferred and inverted, which implies the number of new neurons  $N(\tau)$  at

time  $t$  (throughout the animal's life span) under the proportion  $P(t-\tau)$  that contribute to spatial information processing (see Fig. 6A and 6B for a graphic explanation). The resulting calculation showed that the time  $t$ , when the maximum number of neurons, that were born after the DG network was fully formed, contribute to spatial information processing, is at day 217, where 2057 of the adult-born neurons in the sample region are predicted to respond to spatial exploration (Fig. 5D). This represents 60% of the total granular cell population that responds to this behavior. If we include in our calculation all the neurons born after the animal's birth that survive for 30 days, the result suggest that at day 129 of the animal's life, 99% of the neurons that respond to exploration are neurons that were born post-natally (Figure 5D, shaded line).

We emphasize that this model is presented only as a new hypothesis suggesting that the neurons born in the adult mammal hippocampus change their contribution throughout both, their own and the animal's life span. These results, though inconclusive,



**Figure 6. Illustration of the calculation procedure.** A) As an example of our calculation that lead to the results found in Figure 6D, we can estimate the number of cells that contribute to the spatial exploration response at day 400 in the life of (red arrow), from cells born on day 250. We found ~11,000 new neurons that were born on day 250 and survive for at least 30 days; when we multiplied this by the proportion of neurons that responds to exploration at day 400 (2%), we calculated that ~220 cells respond to exploration (purple arrow in B); B) When all the new neurons are considered (area under the line in yellow) we have a total number of neurons that respond at day 400, from the cumulative number of new neurons at that time. C) To determine the background due to Arc expression during early development of new neurons, we calculated the probability of neurons to express Arc from 1 to 30 days, using 2 linear models. D) A similar convolution as the one used for our previous calculation was done to estimate the number of adult-born neurons found from 1 to 30 days PBI (Figure 5 C). Note that the maximum proportion of neurons that express Arc with no stimulation is ~0.16%; for comparison, cage control animals present 0.31% of cells expressing Arc with no previous stimulation (Figure 5 A), and this represents ~10% of the granular cells expressing Arc after spatial exploration. doi:10.1371/journal.pone.0017689.g006

should stimulate further studies that evaluate the relevance and contribution of newly incorporated granular neurons through time.

## Discussion

During the first 6 weeks, the average proportion of BrdU-positive cells found in the DG from all animals fell from  $\sim 0.35\%$  on day 7 to  $\sim 0.15\%$  on day 45, suggesting that  $\sim 60\%$  of the neurons detected on day 7 died over the course of the next 5 weeks.

It has been reported that in mouse, new neurons that survive more than 4 weeks represent 20% to 45% of the proliferating cells [2,32] and that in rats, they represent 42 to 60% of the newly born neurons [32,11]. In the present work, the number of BrdU-positive cells found on day 1 PBI was lower than the number of cells found on day 7 PBI. This may be explained by the fact that on day 1, only 12 hrs had passed since the last BrdU administration, and more new cells may have incorporated BrdU in the following hours [33]. This is consistent with an earlier report that used a single exposure to [ $^3$ H]-methyl-thymidine and found more labeled cells on day 7 than on day 1 [34]. Here, we found that the proportion of granular cells born on one day that survive for 45 days is 0.15%, and that these cells may survive for 3 to 11 months [8,32]; the result was similar using the absolute BrdU-positive cells counts. We calculated that the whole DG contains  $\sim 1,200,000$  granular cells, which is consistent with previous reports [35,36] and suggests that the number of cells born in the DG during one day that survive is  $\sim 1,800$ . A similar number can be calculated by using the estimated number of cells born each day in the adult rat DG [33] and subtracting the dying neurons [8,32].

The location of the BrdU-positive cells among the different DG layers throughout time indicated that new cells migrate from the SGZ through the rest of the layers, as previously reported [8,14]. The highest migration from the SGZ to DG L1 and L2 was reported to occur between day 7 and 14 [14]. We observed that from day 1 to 15 PBI, when expression of DCX is highest [12], the location of new cells changed significantly, primarily from the SGZ to DG L1 and L2, indicating that this new neurons migrate through the DG layers. Our results also show that a small proportion of BrdU-positive cells ( $\sim 10\%$ ) stay in the SGZ. Most (51%) of the BrdU-positive cells that survive for 45 days stay in DG L1, consistent with previous observations that  $\sim 60\%$  of the newly incorporated neurons were located in this layer [8]; at day 45 PBI the percentage of new cells that we found in L2 was 22.6%, and in L3 it was 13.5%, also consistent with the earlier report.

The proportion of DG neurons expressing Arc after exploration was 1.5%, significantly higher than that observed in the cage control animals and in agreement with the notion of a sparse code for spatial information processing in the DG [22,26,27].

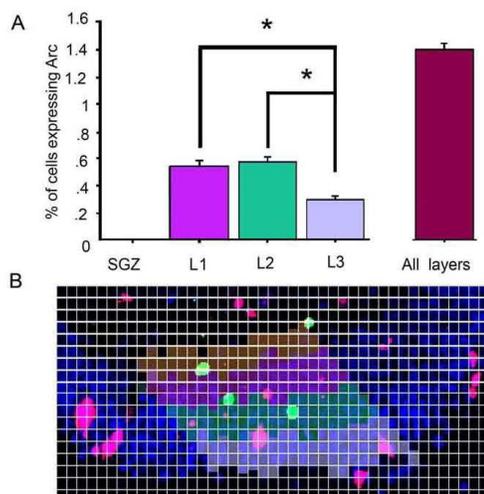
The likelihood to observe Arc expression in BrdU-positive cells increases throughout new neuron maturation, as recently reported for other IEGs such as zif268 and cFos [32]. The highest IEG (zif268 and cFos) expression, after kainite-induced seizures, was observed at 4 weeks and remained stable at 10 weeks. The expression of zif268 induced by water maze training was maximal at 3 weeks; however, it is not clear if such expression was specifically induced by the behavioral treatment, since no behavioral controls were shown [32]. In our case, from day 1 until day 15 PBI the proportion of BrdU-positive cells expressing Arc was similar in cage control and exploration animals. Likewise, in animals that received LTP-inducing stimulation, Arc expression was reported in both the stimulated and the non-stimulated hemispheres in 1-day-old new neurons [25]. These data suggest that Arc expression in new neurons at an early stage of their

development occurs independently of sensory or behavioral stimulation. We cannot suggest that this seemingly spontaneous or constitutive Arc expression [25] is independent of neuronal activity, but it may occur without synaptic stimulation since immature granular neurons do not respond to synaptic input or are "silent" at this early stage [14]. It is possible then, that these new neurons may be activated in response to paracrine BDNF release or other signals [37], which is an interesting idea since this time is critical for the maturation and synaptic integration of adult-born neurons. Arc expression at this early stage may be indicative of an ongoing biological process involved in the synaptic integration of adult-born neurons [25]. This hypothesis is supported by recent evidence showing that Arc increases the density of immature spines and regulates spine morphology [38]. Studying the role of Arc expression in young, adult-born granular neurons may help to understand the cellular mechanisms underlying the synaptic integration of these neurons.

On the other hand, Arc expression at these early stages may represent background noise in the system. For this reason, we calculated the number of new neurons that contribute to Arc expression in the general population. The result indicated that in cage control animals  $\sim 50\%$  of all the granular neurons expressing Arc may be new granular neurons born between 1 and 30 days before sacrifice (See Fig. 6C & D). However, this represents only  $\sim 10\%$  of the neurons expressing Arc in response to spatial exploration, suggesting that the background noise produced by this Arc expression in young new neurons contributes relatively little to the whole DG network response to exploration.

At days 30 and 45 PBI, Arc expression in the BrdU-positive cells was significantly higher in animals allowed to explore than in cage controls, indicating that a specific response to exploration develops with maturation. Previously, it was reported that the unspecific expression of Arc in response to LTP stimulation lasted for about 28 days, but the number of BrdU-positive cells expressing Arc under these conditions increased on day 28 in the granular cell layer, and from day 14 onwards in the SGZ [25]. In contrast, we found no Arc expression in the BrdU-positive neurons located in the SGZ (Fig. 3C), indicating that new granular cells found in this DG region are not responsive to behavioral exploration and may not be functionally integrated into the behaviorally relevant network. This agrees with our own analysis of Arc expression in the different DG layers (Fig. 7A), where we did not find Arc-expressing cells after spatial exploration in the SGZ. This may suggest that migration from the SGZ to the DG granular layer is mandatory for new neurons to be able to respond to behavioral exploration and express Arc. The discrepancies with Kuiper's work may also be explained by the different stimulation methods and the animals that were used. It is possible, even in the non-stimulated hemisphere and in the SGZ [24], that a strong electrophysiological stimulus can activate the CA3c commissural projections [39], thereby inducing Arc expression in new neurons due to their enhanced plasticity [40]. Another possibility is that the functional integration of adult-born neurons into the hippocampal network may take longer in Sprague Dawley than in Wistar rats.

The enhanced plasticity of newly incorporated neurons (4 to 6 weeks of age) was confirmed in the present study with the observation that  $\sim 5\%$  of the new neurons found at 30 45 days PBI responded to exploration by expressing Arc, whereas only 1.5% of the total DG neurons responded. This difference is similar to a previous report [19] and agrees with our earlier findings [2], where a significantly higher proportion of 5-month-old new neurons than of total DG neurons expressed Arc in response to spatial exploration.



**Figure 7. Dentate gyrus layer segmentation and Arc expression in the different layers.** A) Shows a representative DG layer image segmented into 4 equidistant layers. NeuN-positive granular cells are shown in blue, Arc-expressing cells in pink, and BrdU-positive cells in green. The grid was used as a guide for the segmentation procedure, and the cells that were mainly (>50%) located in grids from a particular layer were considered to belong to that layer. The segmentation is represented by an overlay of translucent colors. In brown is the SGZ, in purple L1, in green L2, and in gray L3. B) Percentage of granular cells (from the general population) expressing Arc in the different DG layers after spatial exploration. The red bar is the proportion of cells expressing Arc in all layers.  
doi:10.1371/journal.pone.0017689.g007

The timing for the development of this Arc expression in response to spatial exploration coincides with the dynamic cellular process that takes place in these cells [9,14,10] and reflects the course of selective survival and integration into a network that processes spatial information. Around the time new neurons become responsive [13,14] and their glutamatergic and GABAergic input matures [13,14,15,16], the expression of Arc rises and becomes specific. This suggests that the enhanced survival effect of behavioral stimulation soon after new neurons are born [41,42] depends on a non-specific activation of DG neurons, probably related to BDNF expression [43,44].

In animals exposed to spatial exploration, ~90% of their BrdU-positive cells that express Arc were located in DG L1 compared to 60% in the cage control group. The distribution pattern of BrdU-positive neurons among the DG layers (Figure 2D) is similar to that observed for BrdU-positive neurons expressing Arc in cage control animals but notably different from the distribution of new neurons that respond to spatial exploration by expressing Arc. The observations that mature (28-day-old), new neurons found in DG L1 exhibit a well-defined dendritic structure, a conspicuous axonal projection extending towards the hilus, and spiny dendrites reaching the outer molecular layer [14] suggest that neurons located in L1 mature earlier, developing a functional response to the input, while neurons located in L2 and L3 develop these features later. This may explain why most of the adult-born neurons that are functionally integrated into the behaviorally relevant network are located in this inner layer, and suggests that

the time required for migration may delay the functional integration of new neurons; thus, it is expected that neurons located in L2 and L3 will acquire the ability to respond specifically to spatial exploration at a time point later than 45 days, since Arc-expressing cells are found in all 3 granular layers with a bias towards those located in the inner DG (see Fig. 4B).

When we estimated the proportion of BrdU-positive cells that respond to spatial exploration by expressing Arc over the course of the animal's life span, we found a highly significant linear regression; thus, our hypothesis is that neurons born in the adult DG after day 301 do not respond to exploration anymore; this does not suggest that new neurons lose their integration within the network but rather that they can no longer be recruited into circuits that process spatial information (Fig. 5A), which may be related to a network mechanism that ensures that the DG code for spatial information can change. It is important to acknowledge that a non-linear model may also fit the data, and that more data points are required to demonstrate that our hypothesis is correct; however, the hypothesis is supported by the highly significant linear regression analysis and by the fact that the number of new neural units under the curve throughout the animal's life (Fig. 6D) agrees with the total number of Arc-expressing cells after exploration.

The hypothesis that old granular cells no longer process spatial information after a certain time agrees with the granular cell retirement hypothesis [45], which suggests that granular neurons process spatial information for a limited period of time. This satisfies an important requirement of the associative memory model from Treves and Rolls [46], which proposes that: "...during retrieval..., the mossy fiber input should be absent or strongly reduced..., in order not to blur the signal relayed by the perforant path". Our data suggest that, instead of shutting down or reducing the DG input to the CA3 during retrieval, a few granular neurons retire every day, gradually changing the DG code of a particular experience. This hypothesis is of great interest, but its validity must be tested by further research with more time points, especially at late maturation times for adult-born neurons.

The model also suggests that in a 7-month-old animal, 60% ([5-month-old and 99%] if we include all neurons added postnatally) of the total granular neurons that responded to exploration should be neurons born after the DG was fully formed. This suggests that adult-born neurons may contribute more to spatial information processing than pre-natally born granular neurons. This idea was recently tested in mice that received the administration of the thymidine analog CidU either on embryonic day 18 or postnatal day 7 and another thymidine analog IdU on postnatal day 60 [47]. The results showed no differences in the proportion of granular cells responding to spatial behavior by expressing cFos. However, if we compare the time of analysis (Postnatal day 60) with our model (Fig. 5D) and consider that rats and mice present slight differences in the speed of maturation and life span [31,48], it is possible that differences may be observed at later time points, congruently, other groups had recently found a higher proportion of adult born granular neurons responding to behavior compare to prenatally born granular neurons (Nora Abrous, Personal Communication). In any case, the model suggests that adult neurogenesis plays a pivotal role in spatial information processing, and that this contribution changes with time, which may explain cognitive changes related to hippocampal function over the course of the animal's life.

## Methods

### Subjects

Thirty-five adult male Wistar rats (4 months of age) were provided by the bioterium of our Institute. Rats were individually

housed, had access to water and food *ad libitum*, and were maintained on an inverted 12 h:12 h light-dark cycle, with lights on at 9:00 am. The animals were allowed to habituate to the room conditions and handled daily for at least 10 days before experiments began. The “bioethics committee” from our institute headed by Dr. Magdalena Giordano Noyola approved all the protocols and experimental procedures performed with the animals in the present study, which were done in accordance with international ethical guidelines for animal care and handling (ID:INEU/SA/CB/034).

#### BrdU administration

Given that our goal was to accurately establish the date on which new neurons were able to respond to behavioral stimulation, we compared different 5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) (Sigma, St Louis MO) administration procedures to maximize the number of newborn neurons detected on a single day. A dose of 200 mg/Kg, divided into four, 50-mg/Kg injections (diluted in 0.15 M NaCl solution) and administered every 4 hrs gave the highest number of BrdU-positive cells in the hippocampal dentate gyrus, as compared to other procedures tested. The first BrdU injection was at 9:30 am and the last was at 9:30 pm on the same day. After the BrdU administration, the animals remained undisturbed in their home cages until they were sacrificed after or without a 5-min spatial exploration session (see Fig. 1).

#### Spatial exploration

In order to examine the response of new neurons to spatial exploration at different maturation times, 1, 7, 15, 30, or 45 days post BrdU injections (PBI), the animals were exposed to a 5-min exploration session ( $n=5, 4, 4, 4,$  and  $3$  respectively) and were sacrificed 30 min later (Fig. 1). The exploration environment was an open square box,  $70 \times 70$  cm, with 20-cm-high walls made of translucent acrylic. All the walls were covered with orange foamy paper, and the floor was partitioned into nine grids using black foamy paper strips. Each rat was fully covered with a white towel, then individually transported to the behavioral room, placed in the center of one of the grids in the apparatus, and moved to the center of a different grid every 15 s. This ensures that each of the grids was visited two or three times during the 5-min exploration session [22]. Immediately after exploration, the animal was placed back in its home cage and kept undisturbed. Cage control animals for each PBI group ( $n=3$ ) remained undisturbed in their home cages during the behavioral session and were sacrificed the same day and time as their respective exploration group.

#### Brain extraction

Thirty min after the exploration session, each animal was killed by quick decapitation. The rat's brain was quickly and carefully extracted and frozen in 2-methylbutane (Sigma) by immersing it in a dry ice/ethanol slurry. The rat brains were stored at  $-70^\circ\text{C}$ .

#### Blocking and sectioning

Using a stainless steel matrix (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA), brain hemisections including the whole hippocampi were obtained. From 8 to 10 brain sections were molded into a block with Tissue-Tec OCT compound® (Sakura Finetek, Torrance, CA), such that each block contained brains from all groups and the position of each group differed in each block. The blocks (4 total) were cryosectioned into 20- $\mu\text{m}$ -thick coronal sections at  $-18^\circ\text{C}$  in a CM1850 Leica cryostat (Nussloch, Germany), captured on slides (Lauka, MEX) pre-treated with

diethyl-polycarbonate (Sigma) solution, and kept in a sealed box at  $-70^\circ\text{C}$  before the immunostaining procedure.

#### Immunostaining

In order to maximize the detection of BrdU-positive cells expressing Arc, 30 to 40 serial sections from the dorsal hippocampus (Range between  $-2.60$  to  $-4.3$  from bregma) from each block were selected for the staining procedure. We used a triple immunostaining protocol similar to that described previously to detect NeuN, Arc, and BrdU [2]. The tissue was fixed in 2% paraformaldehyde, pH 7.4, for 8 min at  $4^\circ\text{C}$ , washed in Tris-buffered saline (TBS), pH 7.0, and quenched in TBS with 2%  $\text{H}_2\text{O}_2$  for 20 min. The sections were blocked for 40 min in tyramide signal amplification (TSA) kit blocking buffer (Perkin Elmer Life Sciences, Emeryville, CA). The tissue was then incubated sequentially with biotinylated mouse anti-NeuN antibody (1:2000; Chemicon, Bedford, MA), with polyclonal rabbit anti-Arc antibody for the second detection (1:500; a kind gift from Paul F. Worley's laboratory), and for the third detection with mouse anti-BrdU monoclonal antibody (1:500 BD Biosciences México DF, México). After detecting NeuN and before Arc antibody incubation, the tissue was permeabilized with acetone/methanol (50:50, v/v; Sigma) at  $4^\circ\text{C}$  for 15 min. For the detection of BrdU, the tissue was taken through a DNA denaturing procedure, consisting of an incubation with 50% formamide in  $2 \times \text{SSC}$  buffer (Sigma) at  $65^\circ\text{C}$  for 2 h, washed in  $2 \times \text{SSC}$  for 10 min, incubated in 2 N HCl at  $37^\circ\text{C}$  for 30 min, and washed in 0.1 M boric acid, pH 8.5, for 10 min. Biotinylated anti-NeuN was detected with the avidin-biotin A+B Vectastain amplification kit (Vector laboratories, Burlingame, CA) and the cyanine-5 (Cy5) TSA fluorescence system (PerkinElmer); before Arc detection, the A/B blocking kit (Vector laboratories) was used to block the remaining A+B, and the rabbit anti-Arc was detected with biotinylated anti-rabbit antibody (Vector laboratories), amplified with the A+B Vectastain amplification kit, and finally visualized with the Cy3 TSA fluorescence system (PerkinElmer). Mouse IgG from the first detection was blocked using the mouse-on-mouse blocking kit (Vector Laboratories) before detection of BrdU. The mouse anti-BrdU antibody was detected with a biotinylated anti-mouse antibody in which the signal was amplified using an A+B Vectastain amplification kit, and finally observed using the FITC TSA fluorescence system (PerkinElmer).

In order to determine the neuronal lineage of BrdU-positive cells detected early in their maturation, a double staining for doublecortin (DCX) and BrdU was done. In this case, BrdU detection as described above was carried out first, and DCX was detected afterwards using a goat anti-DCX antibody (1:200, Santa Cruz®), then amplified with A+B Vectastain amplification kit, and revealed with Cy3. We also performed double immunohistochemistry for Arc and DCX combining the methods described above. No staining was observed in the absence of the primary or secondary antibodies, for all antigens.

#### Imaging and Analysis

The MosaicX module for the APOTOME system (Carl Zeiss, México, DF, México) with the  $25 \times / 0.80\text{NA}$  LCI Plan-Apochromat oil immersion objective was used to obtain whole dentate gyrus (DG) mosaic image stacks (with 1.5- $\mu\text{m}$  optical Z sections). About 8 to 12 individual image stacks were collected and assembled by the MosaicX system (Carl Zeiss) for each DG. About twenty-three whole DG mosaics, taken from the serial stained sections, were imaged for each animal, corresponding to a dorsoventral length of  $\sim 460$   $\mu\text{m}$  from the dorsal hippocampus. Note that only those sections that were optimally stained were

included in the analysis. The most anterior section was  $\sim 6.0$  mm and the most posterior was  $\sim 4.7$  mm from the interaural plane [49].

Using the Metamorph imaging software, a 2D image was constructed using the middle plane image from each DG Mosaic stack. This was used as the reference image, in which the DG granular layer was partitioned into 4 layers [8] (see Fig. 7B for a visual description of the segmentation); one represented the subgranular zone (SGZ), and the other 3 represented the inner (L1), middle (L2), and outer (L3) part of the DG granular layer. It is important to note that the DG granular layer thickness varies across the length of the blade; for this reason, the proportion was adjusted throughout the whole length of the DG granular layer, assuring that the inner, medial, and outer DG granular layers always represented 33% of the whole layer thickness in order to analyze the position of the new granular neurons within the DG granular layer. Meanwhile, the Mosaic stack was used to identify the NeuN-positive cells (image in blue), the cells that had incorporated BrdU (image in green), and those expressing Arc (image in red). The BrdU-positive cells co-localized with NeuN, particularly in the animals sacrificed 15 or more days after BrdU administration; in animals sacrificed earlier, BrdU co-localized primarily with DCX (Fig. 2A and B). Nearly all of the BrdU-positive cells co-localized with DCX on days 1 to 15, and most of them co-localized with NeuN from day 30 onwards. These expression time points are similar to those reported earlier [12], in which the DCX or NeuN cells represented  $\sim 90\%$  of the total BrdU-positive population. Moreover, we found that in animals sacrificed at early time points (1–15 days PBI) during the maturation of these new neurons, Arc expression was found in DCX cells (Fig. 7A). For this reason, we included all BrdU-positive cells in the study, and the NeuN staining was used to delineate the DG granular layer. The Arc-positive cells were considered to be the activated neurons. Each cell was classified as BrdU-positive, Arc-positive or positive for both BrdU and Arc, and its classification was marked in the reference image, according to its position in the granular layer. It is important to clarify that the image stack was used to properly classify each cell as Arc-positive or BrdU-positive; additionally, when a cell was classified as both

BrdU-positive and Arc-positive, a 40 $\times$  confocal image stack was projected as a 3D image to confirm this classification (see Fig. 3D to H). The absolute BrdU-positive cell counts are the summation of all BrdU-positive cells found in all DG images from each animal ( $\sim 23$  images per animal), and an average per group was obtained. After classification, the DG granular layer volume was calculated in the reference image, using a 40 $\times$  confocal image in which the useful planes were obtained that, in combination with the area of the DG granular layer, were used to calculate the depth of the tissue (see Figure 2C and D). The total number of granular cells within the volume of the DG granular layer was estimated for each animal, as described before [25,27]. We estimated that about  $\sim 80,000$  granular neurons per animal were included in the analysis. Using the total number of granular cells per animal, the proportions of BrdU-positive cells, Arc-expressing cells, and BrdU-positive Arc-expressing cells were calculated.

### Statistics

One-way ANOVA with Bonferroni as a Post-hoc test, MANOVA, or a student's t-test was used where appropriate to compare the proportion of BrdU-positive, Arc-expressing, and BrdU-positive Arc-expressing cells in the different conditions and throughout the DG granular layer.

### Acknowledgments

We thank Nydia Hernández-Ríos from the Confocal Microscopy Unit (INB UNAM) and Cúberito Dorado Mendicita from lab A-13 (INB UNAM) for technical assistance. This work is part of Claudia Jimena Sandoval Arroyo's Ph.D. thesis for the "Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas" of the "Universidad Nacional Autónoma de México".

### Author Contributions

Conceived and designed the experiments: VRA CJS. Performed the experiments: CJS MMC PCB. Analyzed the data: VRA CJS OP. Contributed reagents/materials/analysis tools: NHR CDM. Wrote the paper: VRA CJS.

### References

- van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, et al. (2002) Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 415: 1030–1034.
- Ramirez-Amaya V, Marrone DF, Gage FH, Worley PF, Barnes CA (2006) Integration of new neurons into functional neural networks. *J Neurosci* 26: 12237–12241.
- Toni N, Laplagne DA, Zhao C, Lombardi G, Ribak CE, et al. (2008) Neurons born in the adult dentate gyrus form functional synapses with target cells. *Nature Neurosci* 11: 901–907.
- Rihn LL, Claiborne BJ (1990) Dendritic growth and regression in rat dentate granule cells during late postnatal development. *Brain Res Dev Brain Res* 54: 115–124.
- Jones SP, Rahimi O, O'Boyle MP, Diaz DL, Claiborne BJ (2003) Maturation of granule cell dendrites after mossy fiber arrival in hippocampal field CA3. *Hippocampus* 13: 413–427.
- Rao MS, Hattiangady B, Abdel-Rahman A, Stanley DP, Shetty AK (2005) Newly born cells in the ageing dentate gyrus display normal migration, survival and neuronal fate choice but endure retarded early maturation. *Eur J Neurosci* 21: 464–476.
- Overstreet-Wadiche LS, Bensen AL, Westbrook GL (2006) Delayed development of adult-generated granule cells in dentate gyrus. *J Neurosci* 26: 2326–2334.
- Kempermann G, Gast D, Kronenberg G, Yamaguchi M, Gage FH (2003) Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus. *Development* 130: 391–399.
- Abrous DN, Koehl M, Le Moal M (2005) Adult Neurogenesis: From precursors to network and physiology. *Physiol Rev* 85: 523–569.
- Piatti VC, Espósito MS, Schinder AF (2006) The timing of neuronal development in adult hippocampal neurogenesis. *Neuroscientist* 12: 463–468.
- Dayar AG, Ford AA, Cleaver KM, Yassaei M, Cameron HA (2003) Short-term and long-term survival of new neurons in the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol* 460: 563–572.
- Brown JP, Couillard-Despres S, Cooper-Kuhn CM, Winkler J, Aigner L, et al. (2003) Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *J Comp Neurol* 467: 1–10.
- Ambrogini P, Lattanzi D, Ciuffoli S, Agostini D, Bertini L, et al. (2004) Morpho-functional characterization of neuronal cells at different stages of maturation in granule cell layer of adult rat dentate gyrus. *Brain Res* 1017: 21–31.
- Esposito MS, Piatti VC, Laplagne DA, Morgenstern NA, Ferrari CG, et al. (2005) Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. *J Neurosci* 25: 10074–10086.
- Ge S, Goh EL, Sailor KA, Kitabatake Y, Ming GL, et al. (2006) GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature* 439: 589–593.
- Karten YJ, Jones MA, Jewring SI, Cameron HA (2006) GABAergic signaling in young granule cells in the adult rat and mouse dentate gyrus. *Hippocampus* 16: 312–20.
- Hastings NB, Gould E (1999) Rapid extension of axons into the CA3 region by adult-generated granule cells. *J Comp Neurol* 413: 146–154.
- Zhao C, Teng EM, Summers RG, Jr., Ming GL, Gage FH (2006) Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *J Neurosci* 26: 3–11.
- Kee N, Teixeira CM, Wang AH, Frankland PW (2007) Preferential incorporation of adult-generated granule cells into spatial memory networks in the dentate gyrus. *Nat Neurosci* 10: 355–362.
- Jessberger S, Kempermann G (2003) Adult-born hippocampal neurons mature into activity-dependent responsiveness. *Eur J Neurosci* 18: 2707–2712.
- Tashiro A, Makino H, Gage FH (2007) Experience-specific functional modification of the dentate gyrus through adult neurogenesis: a critical period during an immature stage. *J Neurosci* 27: 3252–9.

22. Ramírez-Amaya V, Vazdarjanova A, Mikhael D, Rosi S, Worley PF, et al. (2005) Spatial exploration induced *Arc* mRNA and protein expression: Evidence for selective, network-specific reactivation. *J Neurosci* 25(7): 1761–1768.
23. Guzowski JF, Lyford GL, Stevenson GD, Houston FP, McLaugh JL, et al. (2000) Inhibition of activity-dependent arc protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory. *J Neurosci* 20: 3993–4001.
24. Plath N, Ohana O, Dammermann B, Errington ML, Schmitz D, et al. (2006) Arc/Arg3.1 is essential for the consolidation of synaptic plasticity and memories. *Neuron* 52: 437–444.
25. Kuipers SD, Tiron A, Soule J, Messaoudi E, Trentani A, et al. (2009) Selective survival and maturation of adult-born dentate granule cells expressing the immediate early gene Arc/Arg3.1. *PLoS One* 4: e4885.
26. Rosi S, Ramírez-Amaya V, Vazdarjanova A, Worley PF, Barnes CA, et al. (2005) Neuroinflammation alters the hippocampal pattern of behaviorally induced Arc expression. *J Neurosci* 25: 723–731.
27. Chawla MK, Guzowski JF, Ramírez-Amaya V, Lipa P, Hoffman KL, et al. (2005) Sparse, environmentally selective expression of Arc RNA in the upper blade of the rodent fascia dentata by brief spatial experience. *Hippocampus* 15: 579–586.
28. Bischofberger J (2007) Young and excitable: new neurons in memory networks. *Nat Neurosci* 3(3): 273–275.
29. Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH (1996) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* 16: 2027–2033.
30. Schlessinger AR, Cowan WM, Gottlieb DI (1975) An autoradiographic study of the time of origin and the pattern of granule cell migration in the dentate gyrus of the rat. *J Comp Neurol* 159: 149–175.
31. Adams W, Boice R (1983) A longitudinal study of dominance in an outdoor colony of domestic rats. *J Comp Psychol* 97: 24–33.
32. Snyder JS, Choe SC, Clifford MA, Jeurling SI, Hurley P, et al. (2009) Adult-Born hippocampal Neurons are more numerous, faster maturing, and more involved in behavior in rats than in mice.
33. Cameron HA, McKay RD (2001) Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J Comp Neurol* 435: 406–417.
34. Cameron HA, Woolley CS, McEwen BS, Gould E (1993) Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* 56: 337–344.
35. West MJ, Slomianka L, Gundersen HJ (1991) Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat Rec* 231: 482–497.
36. Rapp PR, Gallagher M (1996) Preserved neuron number in the hippocampus of aged rats with spatial learning deficits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 9926–9930.
37. Babu H, Ramirez-Rodriguez G, Fabel K, Bischofberger J, Kempermann G (2009) Synaptic network activity induces neuronal differentiation of adult hippocampal precursor cells through BDNF signaling. *Frontiers in Neuroscience* 3: 49.
38. Peebles CL, Yoo J, Thwin MT, Palop JJ, Noebels JL, et al. (2010) Arc regulates spine morphology and maintains network stability in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 18173–8.
39. Scharfman HE (2007) The CA3 “backprojection” to the dentate gyrus. *Prog Brain Res* 163: 627–637.
40. Ge S, Yang CH, Hsu KS, Ming GL, Song H (2007) A critical period for enhanced synaptic plasticity in newly generated neurons of the adult brain. *Neuron* 54: 559–566.
41. Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH (1997) More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386(6624): 493–495.
42. Ambrogini P, Cuppini R, Cuppini C, Ciaroni S, Cecchini T, et al. (2000) Spatial learning affects immature granule cell survival in adult rat dentate gyrus. *Neurosci Lett* 286: 21–24.
43. Rossi C, Angelucci A, Costantin L, Braschi C, Mazzantini M, et al. (2006) Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is required for the enhancement of hippocampal neurogenesis following environmental enrichment. *Eur J Neurosci* 24: 1850–1856.
44. Lee E, Son H (2009) Adult hippocampal neurogenesis and related neurotrophic factors. *BMB Rep* 42: 239–44.
45. Alme CB, Buzzetti RA, Marrone DF, Leutgeb JK, Tashiro A, et al. (2010) Hippocampal Granule Cells Opt for Early Retirement. *Hippocampus* 10: 1109–1123.
46. Treves A, Rolls ET (1992) Computational constraints suggest the need for two distinct input systems to the hippocampal CA3 network. *Hippocampus* 2: 189–199.
47. Stone SSD, Teixeira CM, Zaslavsky K, Wheeler AL, Martinez-Canabal A, et al. (2010) Functional convergence of developmentally and adult-generated granule cells in dentate gyrus circuits supporting hippocampus-dependent memory. *Hippocampus* Sep 7, Online.
48. Drickamer LC (1977) Seasonal variation in litter size, bodyweight and sexual maturation in juvenile female house mice (*Mus musculus*). *Laboratory Animals* 11: 159–162.
49. Paxinos G, Watson G (1998) The rat brain in stereotaxic coordinates Academic Press An imprint of Elsevier. Fourth edition.

