



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

Doctorado en Ciencias Biomédicas

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**ANÁLISIS DE LA REORGANIZACIÓN MORFOLÓGICA Y FUNCIONAL DEL
GIRO DENTADO ADULTO EN RESPUESTA A UNA LESIÓN HIPOCAMPAL.
PAPEL DE LA NEUROGÉNESIS**

T E S I S

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

PRESENTA:

PSIC. ANDREA AGUILAR ARREDONDO

DIRECTORA DE TESIS:

**Dra. Angélica Zepeda Rivera
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM**

COMITÉ TUTOR:

**Dra. Clorinda Arias Álvarez
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM**

**Dra. Martha Lilia Escobar Rodríguez
Facultad de Psicología, UNAM**

CD. MX. JULIO

2018



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

Este proyecto fue realizado en el Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la asesoría de la Dra. Angélica Zepeda Rivera. Este trabajo contó con el apoyo financiero por beca de doctorado CONACyT 270435, además de los donativos PAPIIT-DGAPA IN203015 y CONACyT 176589. Se extiende el agradecimiento al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas por haber apoyado a la elaboración y culminación de esta investigación.

ÍNDICE

Glosario.....	3
Organización de la tesis.....	4
Resumen.....	6
Abstract.....	7
1. INTRODUCCIÓN.....	8
Antecedentes.....	8
1.1. Plasticidad.....	8
1.2. El giro dentado del hipocampo: Estructura.....	12
1.3. El giro dentado del hipocampo: Función.....	17
1.4. Neurogénesis en el giro dentado adulto.....	19
<i>Revisión Evaluating the functional state of adult-born neurons in the adult dentate gyrus of the hippocampus: from birth to functional integration.....</i>	<i>20</i>
1.5. El papel funcional de la neurogénesis en el giro dentado adulto.....	21
1.6. Modulación de la neurogénesis adulta.....	23
1.7. Neurogénesis posterior a daño.....	30
2. HIPÓTESIS.....	34
3. OBJETIVOS.....	34
4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	36
4.1. Sujetos.....	36
4.2. Lesión al giro dentado.....	36
4.3. Inyecciones de BrdU.....	37
4.4. Aparatos.....	37
4.4.1. Cámara de condicionamiento de miedo al contexto.....	37
4.4.2. Arena de campo abierto.....	38
4.5. Protocolos conductuales.....	38
4.5.1. Campo abierto.....	38
4.5.2. Condicionamiento y memoria de miedo al contexto.....	39
4.5.3. Exploración sin condicionamiento.....	40
4.6. Registro electrofisiológico.....	40
4.7. Procesamiento de tejido.....	41
4.7.1. Tinción de Nissl.....	41
4.7.2. Inmunofluorescencia.....	42
4.8. Estereología.....	43
4.8.1. Microscopia confocal.....	43
4.8.2. Análisis volumétrico del giro dentado y la lesión.....	43
4.9. Análisis estadístico.....	44
5. RESULTADOS.....	45

5.1. Reestructuración morfológica del giro dentado.....	45
5.2. Modulación del proceso neurogénico en el tiempo en respuesta a daño.....	48
5.2.1. La proliferación celular incrementa después de daño y se mantienen en el tiempo.....	49
5.2.2. El número de neuronas jóvenes incrementa después de daño y decrementa en el tiempo.....	50
5.2.3. Modulación de la respuesta neurogénica en el tiempo posterior al daño.....	50
5.2.4. Sobrevivencia de las nuevas neuronas después de daño.....	52
5.2.5. Activación de las nuevas neuronas generadas después de daño en respuesta a la evocación de la memoria dependiente de GD.....	52
5.2.6. Activación de las neuronas jóvenes y maduras preexistentes.....	57
5.2.7. La activación de las nuevas neuronas es dependiente de la evocación de la memoria.....	58
5.3. Recuperación de la función cognitiva en el tiempo después de daño al GD adulto.....	60
5.3.1. La lesión no genera déficits motores ni alteraciones en la ansiedad.....	60
5.3.2. La lesión no produce déficits en el aprendizaje del miedo al contexto.....	60
5.3.3. La evocación de la memoria contextual se recupera en el tiempo después de daño al GD.....	61
5.4. La Potenciación a Largo Plazo se reestablece en el tiempo.....	62
6. DISCUSIÓN.....	64
6.1. Reestructuración morfológica del GD en el tiempo después de daño.....	65
6.2. Modulación de la respuesta neurogénica después de daño.....	66
6.3. Las nuevas neuronas maduran y sobreviven 30 días después de daño.....	68
6.4. Las nuevas neuronas son capaces de activarse después del daño y su activación correlaciona con la recuperación de la función cognitiva.....	69
CONCLUSIÓN.....	73
7. REFERENCIAS.....	74
8. ANEXOS.....	85
8.1. Anexo 1. <i>Functional recovery of the dentate gyrus after a focal lesión is accompanied by structural reorganization in the adult rat.</i> 2013	
8.2. Anexo 2. <i>Behavior-associated neuronal activation after kainic acid-induced hippocampal neurotoxicity is modulated in time.</i> 2017	
8.3. Anexo 3. <i>Memory retrieval-induced activation of adult-born neurons generated in response to damage to the dentate gyrus.</i> 2018	

GLOSARIO

+C: Con condicionamiento	IL-1β: Interleucina 1 β
AK: Ácido kaínico	IL-6: interleucina 6
AP: Anteroposterior	KO: knockout
ApoER2: Receptor 2 de la apolipoproteína E	LPP: vía perforante lateral
APP: Proteína precursora del amiloide	LPS: lipopolisacarido
Arc: Proteína de citoesqueleto regulada por actividad	LTP: Potenciación de largo plazo
BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro	mA: miliamperes
BLBP: Proteína de unión a lípidos del cerebro	MAM: acetato de metilazoximetanol
BrdU: Bromodeuxiuridina	ML: mediolateral
CCL11:	MMC: Memoria de Ciedo al Contexto
CG: Capa granular	MOPP: célula asociada a la capamolecular-vía perforante
CMC: Condicionamiento de Miedo al Contexto	MOR: Movimientos Oculares Rápidos
CR: Calretinina	MPP: Vía perforante medial
DCX: Doblecortina	NeuN: Proteína de núcleo neuronal
dpl: Días post-lesión	NGF: Factor de crecimiento nervioso
DV: Dorsoventral	NMDA: N-metil d-Aspartato
EC: Corteza Entorrinal	PB: Buffer de fostatos
EC1: Estímulo Condicionado	PBS: Buffer de fosfatos con salina
EI: Estímulo Incondicionado	PCNA: antígeno nuclear de células en proliferación
EN: Estímulo Neutro	PS1: presenilina 1
ESC: Exploración sin condicionamiento	PSD-95: densidad postsináptica
GFAP: Proteína fibrilar ácido glial	SNC: Sistema Nervioso Central
GD: Giro dentado	Syp: sinaptofisina
HIPP: Célula asociada al hilus-vía perforante	TNF-a: Factor de Necrosis Tumoral α
HPA: Eje hipotálamo-pituitario-adrenal	VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular
IEGs: genes de expresión temprana	VLDLR: Receptor de lipoproteínas de muy baja densidad
IGF-1: Factor de crecimiento de insulina tipo-1	

ORGANIZACIÓN DE LA TESIS

El presente trabajo está dividido en 7 partes: Introducción y antecedentes, hipótesis, objetivos, metodología experimental, resultados, discusión y finalmente anexos.

En los *Antecedentes* se aborda el tema de plasticidad cerebral en general para después hacer hincapié en la neurogénesis del cerebro adulto. En una subsección sobre el estudio de las diferentes características de las nuevas neuronas en cada etapa de crecimiento y algunas técnicas novedosas para su estudio se añade la revisión *Evaluating the functional state of adult-born neurons in the adult dentate gyrus of the hippocampus: from birth to functional integration* publicada en 2015 durante el periodo de realización de mi doctorado (Aguilar-Arredondo *et al.*, 2015). Posteriormente se retoma la neurogénesis y los mecanismos que la modulan, poniendo especial interés en el daño cerebral.

Se presentan después la hipótesis de trabajo y los objetivos. La siguiente sección expone la metodología experimental abordada para los resultados que se presentan en esta tesis, sin embargo es posible revisar detalladamente las diferentes aproximaciones experimentales en los artículos añadidos hasta la sección final de *Anexos*.

Posteriormente se abordan los resultados obtenidos. El presente trabajo se centra en los resultados que dieron lugar al artículo de datos originales: *Memory retrieval-induced activation of adult-born neurons generated in response to damage to the dentate gyrus* (Aguilar-Arredondo y Zepeda 2018) (Anexo 3), por lo cual me centraré en la metodología y resultados de éste artículo. Sin embargo considero importante mencionar que también se agregan resultados provenientes de un artículo de datos originales publicado en 2013 que dio lugar a parte de mi tesis de licenciatura, pero que fue publicado en mi primer año de doctorado y que también constituyó parte de la tesis de licenciatura de la LIBB Gabriela Michel (Zepeda *et al.*, 2013) (Anexo 1). De manera similar se hará referencia a resultados provenientes de otro artículo de datos originales donde fui colaboradora principal y que dio lugar a parte de la tesis de licenciatura de la Psic. Ma. Fernanda López Hernández (Aguilar-Arredondo *et al.*, 2017) (Anexo 2).

A continuación se realizará la discusión de los resultados expuestos, refiriendo nuevamente trabajos en los que participé y que sirven para ampliar el marco de discusión de este trabajo.

Finalmente se añaden en la sección de *Anexos* los artículos de datos originales en los que participé como co-autora y en los que estoy como primera autora, todos producto del trabajo de doctorado y publicados durante ese periodo.

RESUMEN

La neuroplasticidad es la capacidad que posee el cerebro para modificarse en respuesta a una experiencia. Uno de los mecanismos de plasticidad ampliamente aceptados hoy en día en el cerebro de mamíferos adultos es la neurogénesis. Este proceso ocurre en dos zonas restringidas del cerebro adulto: la zona subventricular situada en las paredes de los ventrículos laterales y la zona subgranular ubicada en el giro dentado del hipocampo. El giro dentado del hipocampo (GD) es una estructura neurogénica que es capaz de reorganizarse funcional y estructuralmente después de una lesión. Aunado a ello, la recuperación funcional y un incremento en la neurogénesis son eventos que ocurren después de un daño cerebral, la posible relación entre ambos procesos permanece sin esclarecerse. En este trabajo exploramos si la neurogénesis y la activación de nuevas neuronas se correlacionan con la recuperación de GD a lo largo del tiempo. Indujimos una lesión al GD de ratas adultas jóvenes (3 meses) a través de una inyección de ácido kaínico dirigida al GD y analizamos la recuperación morfológica y funcional de la estructura lesionada, así como la modulación de la respuesta neurogénica posterior al daño. Analizamos la proliferación, maduración y activación de nuevas neuronas y de neuronas preexistentes después de que los animales realizaran una tarea de memoria de miedo al contexto (MMC) o una tarea de exploración espacial sin condicionamiento como tarea control. Cuantificamos el número de células BrdU+, así como las neuronas BrdU+ que colocalizaron con doblecortina (DCX) o con NeuN dentro del GD dañado y evaluamos el número de células en cada población con el marcador de actividad c-fos después de cada tarea. A los 10 días después de la lesión (dpl), una región de la capa de células granulares estaba desprovista de células, evidenciando el área dañada, mientras que a 30dpl esta región era significativamente más pequeña. A los 10dpl, el número de células BrdU+/DCX+/c-fos positivas aumentó en comparación con el grupo de lesión sham, pero la memoria de miedo al contexto se encontraba deteriorada. A los 30dpl, se observó un número significativamente mayor de células positivas para BrdU+/NeuN+/c-fos que a las 10 dpl, y la activación correlacionó con la recuperación de la memoria. El rendimiento en la tarea control de exploración indujo la actividad basal de c-fos en la población BrdU+/NeuN+. Previamente encontramos que la inducción de la potenciación de largo plazo (LTP) se encontraba impedida a los 10dpl, pero se recuperaba a los 25 y 60dpl. Estos resultados juntos sugieren que las neuronas que nacieron después del daño al GD, sobreviven al menos 30 días y se activan de una manera dependiente del tiempo y dependiente también de una demanda cognitiva, correlacionando la activación de nuevas neuronas NeuN+ con la reorganización morfológica, la recuperación funcional y sináptica del GD.

ABSTRACT

Neuroplasticity is the capability of change of the brain in response to experience, one of the plasticity mechanisms widely accepted today in adult mammalian brain is neurogenesis. It occurs in two restricted zones of the adult brain: the subventricular zone located in the walls of the lateral ventricles and the subgranular zone located in the dentate gyrus of the hippocampus. The dentate gyrus (DG) is a neurogenic structure that exhibits functional and structural reorganization after injury. Neurogenesis and functional recovery occur after brain damage, and the possible relation between both processes is a matter of study. We explored whether neurogenesis and the activation of new neurons correlated with DG recovery over time. We induced a DG lesion in young adult rats (3 month-old) through the intrahippocampal injection of kainic acid and analyzed morphological and functional recovery of damaged DG. We analyzed the proliferation, maturation and activation of newborn and remaining neurons in the DG after animals performed a contextual fear memory task (CFM) or a control spatial exploratory task. We quantified the number of BrdU+ cells that co-localized with doublecortin (DCX) or with NeuN within the damaged DG and evaluated the number of cells in each population that were labelled with the activity marker c-fos after either task. At 10 days post-lesion (dpl), a region of the granular cell layer was devoid of cells, evidencing the damaged area, whereas at 30 dpl this region was significantly smaller. At 10 dpl, the number of BrdU+/DCX+/c-fos positive cells was increased compared to the sham-lesion group, but CFM was impaired. At 30dpl, a significantly greater number of BrdU+/NeuN+/c-fos positive cells were observed than at 10 dpl, and activation correlated with CFM recovery. Performance in the spatial exploratory task induced marginal c-fos immunoreactivity in the BrdU+/NeuN+ population. In a previous study we found that the LTP induction was impaired at 10dpl, but not at 25 and 60dpl. These results together suggest that neurons born after the DG was damaged survive at least 30 days and are activated in a time- and task-dependent manner correlating the activation of newborn neurons NeuN+, with the morphological reorganization, with functional and with synaptic recovery.

1. INTRODUCCIÓN

El cerebro es un órgano que se encuentra en constante remodelación a lo largo de la vida de un organismo. Dicha remodelación produce cambios sutiles en los circuitos neuronales. Para las neurociencias es de interés estudiar no solo el resultado morfológico o estructural y funcional de reorganización, sino también los mecanismos que utiliza el sistema para poder ejecutar esta remodelación. La reorganización que ocurre en el sistema nervioso posterior al daño cerebral es de particular interés. La neurogénesis es un mecanismo de plasticidad que ocurre en el cerebro adulto de los mamíferos y en las últimas décadas ha despertado un creciente interés por evaluar su posible papel como mecanismo de neuroreparación posterior al daño cerebral. Numerosas investigaciones han demostrado que la neurogénesis adulta incrementa como producto de un daño cerebral, lo que ha llevado a algunos grupos de investigación a pensar en este fenómeno como un mecanismo de compensación ante la pérdida neuronal y de conectividad que sufre el circuito dañado. Sin embargo, hasta ahora no hay evidencia suficiente que muestre que la neurogénesis adulta tiene algún impacto sobre la reparación de un circuito, ni existen reportes que evidencien que las nuevas neuronas generadas después de daño son capaces de integrarse a un circuito dañado con la posibilidad de ser activadas ante una experiencia cognitiva mnémica asociada a la región lesionada.

ANTECEDENTES

1.1. Plasticidad

La plasticidad neuronal, también llamada neuroplasticidad, es un proceso de cambio y adaptación de un órgano producto de una experiencia dada. Hoy en día conocemos el término de una forma más amplia y la podemos definir como la habilidad que posee el sistema nervioso para responder reorganizando su función, estructura o conectividad ante estímulos extrínsecos e intrínsecos, como la experiencia, el tiempo, el ambiente y los estados internos de un organismo, como la motivación y la atención (Ruge *et al.*, 2012).

Los cambios plásticos a nivel estructural ocurren de forma más continua durante el desarrollo ontogénico de un organismo, sin embargo durante la etapa adulta también

ocurren cambios finos que remodelan de manera continua algunos circuitos neuronales. De esta manera, existen diferentes manifestaciones de la neuroplasticidad como son: cambios morfológicos a nivel celular, generación de nuevas células o alteraciones neuroquímicas que en su conjunto pueden dar lugar a las modificaciones en la conectividad de un circuito.

A nivel bioquímico existen algunas moléculas cuyos cambios pueden hablar de modificaciones plásticas, algunas de ellas son sinaptofisina (molécula asociada a las vesículas presinápticas) (Valtorta *et al.*, 2004), PSD-95 (molécula abundante en la postsinápsis vinculada con diversos aspectos de la transmisión sináptica) (Xu *et al.*, 2011) o genes de expresión temprana (IEG por sus siglas en inglés, *immediate early genes*) cuya expresión implica la activación de proteínas de citoesqueleto y otras asociadas a la transducción de señales como Arc, c-fos, zig 168, etc, por mencionar algunas (Lyford 1995, Lanahan *et al.*, 1998, Bramham *et al.*, 2010).

La modificación a nivel bioquímico de las moléculas anteriormente mencionadas puede traer consigo una modificación estructural e incluso funcional. Así mismo la secreción de ciertos factores neurotróficos como BDNF (Nudo *et al.*, 2006), IGF-1 (Liquitaya *et al.*, 2012) o NGF (Berry *et al.*, 2012) pueden generar también modificaciones morfológicas a nivel celular o estructural, así como en la comunicación o conectividad de un circuito; el reclutamiento a la sinapsis de maquinaria necesaria para la comunicación celular como neurotransmisores o receptores postsinápticos también es capaz de ejercer modificaciones morfológicas celulares y en la comunicación sináptica (Zepeda *et al.*, 2004). Una de las modificaciones estructurales que pueden generarse con la modulación de las moléculas mencionadas es la sinaptogénesis o generación de nuevas sinapsis, el cual es un proceso considerado sustrato del aprendizaje y la memoria (Waites *et al.*, 2005). Por ejemplo, se ha asociado al IEG Arc con la modulación de proteínas de estabilización del citoesqueleto, como la F-actina, proteína encargada de formar filamentos de citoesqueleto), que a su vez es capaz de mantener y estabilizar el proceso de LTP en el hipocampo, así como para mantener la fosforilación de cofilina, proteína de la familia de las actinas (Massaoudi *et al.*, 2007). De hecho Arc se ha mostrado que inmunoprecipita con PSD-95, lo cual sugeriría que Arc podría estar modulando la expansión de la densidad postsináptica en neuronas que son

activas (Lyford *et al.*, 1995). Así, Arc y otros IEG como c-fos, sugieren un estado de activación neuronal que podría estar vinculado con procesos cognitivos complejos propios del hipocampo (Besnard *et al.*, 2013).

En un trabajo realizado en nuestro laboratorio (Aguilar-Arredondo *et al.*, 2017) mostramos las modificaciones en los niveles de ARNm y en los contenidos de proteína de moléculas asociadas con plasticidad sináptica como Arc, Sinaptofisina y PSD-95, después de realizar una lesión hipocampal con ácido kaínico a ratas jóvenes y observamos que a los 30 días después de realizar la lesión (30dpl, *días post-lesión*) los niveles de mensajero y de proteína de sinaptofisina y de Arc incrementaban en comparación a una ventana de tiempo corta de 10dpl. Así mismo, observamos que a los 30dpl había un mayor número de neuronas maduras activas NeuN+/Arc+ en el giro dentado del hipocampo (GD), lo cual apoyaba observaciones previas de nuestro grupo de trabajo que apuntaban al restablecimiento en la comunicación a los 30dpl (Zepeda 2013). Más adelante me referiré nuevamente a éste trabajo y a los resultados obtenidos.

De manera similar en otro trabajo del laboratorio (Liquitaya *et al.*, 2012) observamos que la infusión de IGF-1 promovía la reestructuración del GD lesionado, así como una aceleración en su recuperación funcional, analizada por medio de una tarea de miedo al contexto. Concomitante a la recuperación funcional, observamos una arborización más compleja en neuronas jóvenes DCX+ en los animales lesionados tratados con IGF-1, lo cual sugiere que este factor trófico podría mediar la plasticidad celular y funcional durante el proceso de reorganización después de daño de un nicho neurogénico. Haré mención a este trabajo nuevamente en la sección de la discusión, pues se publicó durante el periodo que duró mi doctorado.

Además de los cambios en el crecimiento y modificación que tienen lugar en las células preexistentes, también existen cambios a nivel de la génesis celular en las zonas neurogénicas. Más adelante se ahondará sobre los nichos neurogénicos, pero vale la pena mencionar en este punto que existen dos zonas neurogénicas bien descritas en el cerebro adulto de los mamíferos: la zona subventricular que se encuentra en las paredes de los

ventrículos laterales y la zona subgranular que es la parte más interna del giro dentado del hipocampo, siendo posible la generación de células gliales, de vasos sanguíneos o de nuevas neuronas, procesos que modifican la plasticidad y conectividad de un circuito (Song *et al.*, 2012).

La generación de nuevas células constituye un mecanismo de plasticidad que posee relevancia en el campo de la reparación no sólo por las consecuencias estructurales, sino también por la importancia funcional. Se conoce que algunas funciones que se alteran por el daño nervioso tienden a recuperarse con el paso del tiempo, lo cual ha llevado a proponer que este proceso plástico podría estar jugando un papel importante en los mecanismos de reparación o compensación que tienen lugar después de daño. En nuestro laboratorio hemos observado que después de haber inducido un daño focal en el GD con la consecuente pérdida de la función, ésta se recupera un mes después (Zepeda *et al.*, 2013). Así mismo el incremento en nuevas neuronas se ha logrado vincular con mejoras en el aprendizaje y en el desempeño de tareas asociadas al área de integración de las nuevas neuronas (Sahay *et al.*, 2011).

Los numerosos cambios plásticos que pueden llevarse a cabo dentro del sistema nervioso, como los anteriormente mencionados ocurren ante un sinfín de estímulos, tales como ambientes cambiantes u hostiles, procesos cognitivos como el aprendizaje o la memoria, el ejercicio o la actividad física, ciertos tipos de dieta, el envejecimiento, enfermedades neurodegenerativas y también el daño cerebral.

Resulta de particular interés conocer cuáles son los mecanismos de plasticidad que emplea el sistema nervioso para repararse a sí mismo en condiciones de daño, pues dilucidar estos mecanismos puede tener un papel terapéutico significativo, como la generación de nuevos sistemas o nuevas aproximaciones que traten de emular o manipular procesos de reparación que permitan a un organismo sanarse adecuadamente.

A este respecto, la recuperación de las funciones perdidas después de un daño ha despertado el interés por estudiar las modificaciones que experimenta el cerebro posterior a una lesión. Durante décadas se ha demostrado que diversos mecanismos de plasticidad

se activan durante un proceso de daño cerebral (Wieloch y Nikolich 2006). El sistema nervioso emplea diversos mecanismos de plasticidad como modificaciones morfológicas o neuroquímicas de las células remanentes para repararse después de un daño (Zepeda *et al.*, 2004, Holopainen 2008), que en algunos casos se encuentran asociados con la recuperación de funciones alteradas (Bendel *et al.*, 2005).

Uno de los mecanismos de plasticidad que se activa posterior al daño es la neurogénesis adulta, la cual posee una relevancia particular debido a que el GD, que es una de las zonas en las que ocurre la neurogénesis, es una estructura plástica vinculada con procesos cognitivos determinados como el aprendizaje y la memoria. Lo anterior ha llevado a evaluar con mayor interés el impacto que podría tener la neurogénesis adulta como un mecanismo de reparación. En un trabajo previo del laboratorio se observó que después de lesionar el GD de forma focal se producía un daño caracterizado por ausencia de células granulares en la capa suprapiramidal del GD, sin embargo el área de daño se reducía con el tiempo a la par que el GD se estructuraba de manera natural (Hernández-Ortega *et al.*, 2007). Un tipo similar de reorganización se observa en el GD después de lesionarlo farmacológicamente, con el concomitante incremento en el número de nuevas neuronas NeuN+ que parecen reestablecer la estructura a los pocos días del daño (Ogita *et al.*, 2005). Esto ha llevado a preguntar si las nuevas neuronas podrían jugar un papel importante en la reestructuración del GD después de un daño, así como en la recuperación de una función.

1.2. El giro dentado del hipocampo: estructura

El GD posee numerosas características que lo hacen una estructura de interés para el estudio de fenómenos plásticos y cognitivos, ya que, como he mencionado anteriormente, de su integridad dependen procesos como el aprendizaje y la memoria (Lee y Kesner 2004) y constituye al mismo tiempo una de las dos zonas neurogénicas descritas en el cerebro mamífero adulto (Altman y Das 1965, Kemperman *et al.*, 1997).

El GD es una estructura trilaminar muy bien conservada en los mamíferos y proviene de lo que se conoce como una corteza primitiva o allocorteza; específicamente la arquicorteza es la que da lugar al hipocampo y al GD (Stephan 1975). Forma parte del circuito trisináptico

(GD-CA3-CA1) y se ubica debajo de la región CA1 del hipocampo. Juntos forman el circuito de procesamiento para procesos cognitivos que mencionaré más adelante.

La capa más externa del GD es la capa molecular, que prácticamente está libre de células y es donde se encuentran las dendritas de las células granulares que reciben la información proveniente de la corteza entorrinal a través de los axones que conforman la vía perforante. El GD también recibe información proveniente de las células musgosas por medio de las vías comisural y de asociación que se forman en el hilus contra e ipsilateral, respectivamente (Leranth C y Hajszan T 2007). Las dendritas localizadas en la capa molecular pertenecen a las células granulares, la información llega a las dos terceras partes más externas de la capa molecular, en particular, se sabe que el tercio más externo recibe información de la corteza entorrinal lateral, mientras que el tercio medial recibe información de la corteza entorrinal medial. Estas dendritas reciben información proveniente de la capa II de la corteza entorrinal, sin embargo puede haber axones de las capas V y VI y se estima que esta vía de entrada constituye el 85% de la inervación axo-espinal que recibe el GD (Hjorth-Simonsen *et al.*, 1972). Si bien en su mayoría esta región está ocupada por proyecciones, también es posible hallar algunas neuronas como las células MOPP (*molecular layer perforant path-associated cell*) cuyos axones proyectan a la vía perforante. Otro tipo de neuronas localizadas en la capa molecular son las axo-axónicas, llamadas así debido a que sus axones mantienen conexiones sinápticas con el segmento inicial de los axones de las neuronas granulares y debido a que son neuronas GABAérgicas se piensa que controlan la salida de información de la capa granular (Andersen *et al.*, 2007).

La capa media es la granular, que está compuesta principalmente de los cuerpos de las células granulares; estas poseen un diámetro de entre 8 a 12 μm y se encuentra densamente empaquetadas en lo que se denominará capa granular (CG), cuyos axones proyectan a la región CA3 formando la vía conocida como la vía de las fibras musgosas. La región CA3 del hipocampo posee conexiones directas que provienen de la capa II de la corteza entorrinal, sin embargo, antes de llegar a CA3 hacen sinapsis con las dendritas apicales de las neuronas del GD y posteriormente llegan a CA3; el GD a su vez envía los axones de las fibras musgosas anteriormente mencionadas, que hacen sinapsis con las

células piramidales muy cerca de la región somática (Treves *et al.*, 2008). Las células granulares son las más abundantes en esta capa y son de tipo glutamatérgico, sin embargo dentro de la capa granular existen otros tipos neuronales menos abundantes, tal es el caso de las células de canasta, un tipo de neuronas inhibitoras que se localizan en la región subgranular de esta capa y se han caracterizado por formar sinapsis con los cuerpos de las neuronas granulares (Andersen *et al.*, 2007). Un análisis del impacto del control inhibitor de las células de canasta sobre las neuronas granulares muestra que los axones de las células de canasta pueden llegar a extenderse 900 μ m en la región septal y 1.5mm en la región temporal del GD, lo que le permitiría influir sobre 10 mil células granulares aproximadamente (Sik *et al.*, 1997).

Por último, la capa más profunda es la capa polimórfica o hilus, que se compone de una gran variedad de tipos neuronales, siendo el tipo más común la célula musgosa cuyo axón proyecta a la capa molecular interna del GD ipsi y contralateral, siendo su blanco las dendritas de las células granulares (Andersen *et al.*, 2007), las células musgosas son interneuronas inmunoreactivas a glutamato, por lo cual no son exactamente el prototipo clásico de una interneurona (Amaral *et al.*, 1990). Otro tipo celular de esta región son las células HIPP (*hilar perforant path-associated cell*) cuyas dendritas corren paralelas a la capa granular, mientras que sus axones proyectan hacia las dos terceras partes más externas de la capa molecular, ejerciendo un control inhibitor sobre las neuronas granulares del GD.

Estas interneuronas tampoco son un modelo típico, pues aunque poseen una función inhibitora, poseen espinas que se encuentran a lo largo de los 3.5mm que puede llegar a medir un solo axón, ejerciendo control a lo largo de una gran fracción del GD. Se calcula que una interneurona es capaz de tener 100 mil terminales sinápticas ejerciendo este control sobre el GD (Amaral 1978). En esta capa también se localiza la región más medial de CA3 que se interpone entre la capa superior o suprapiramidal y la inferior o infrapiramidal de las dos capas que conforman el GD.

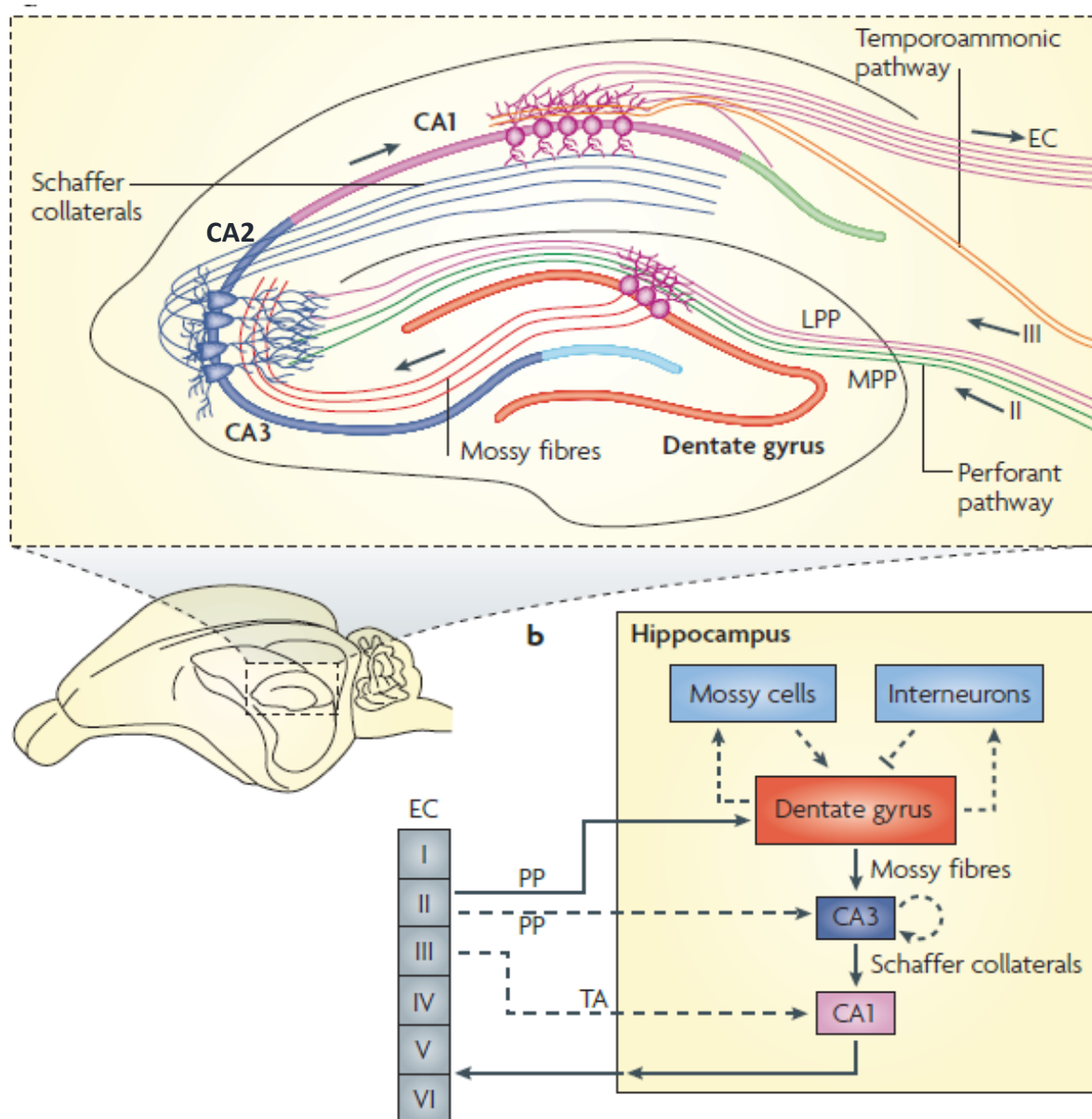


Fig. 1. Esquema de la conectividad del giro dentado del hipocampo. El GD recibe aferencias de la corteza entorrinal (EC), de la capa II (MPP) hacia la capa molecular interna y también recibe conexiones de la capa III (LPP) en la capa molecular externa. La capa II de la EC a su vez se conecta directamente hacia CA3. El GD envía información hacia CA3 por medio de la vía de las fibras musgosas que constituyen los axones de las neuronas granulares. CA3 a su vez envía información hacia CA1 por medio de las colaterales de Shaffer. CA1 también recibe invasión directa de la capa III de la EC. El GD inerva a las interneuronas locales, como las células de canasta o las HIPP, que a su vez inhiben a las propias células granules del GD. Así mismo estas activan a las células musgosas del hilus que activan también a las granulares del GD. EC: corteza entorrinal, LPP: vía perforante lateral, MPP: vía perforante medial, PP: vía perforante, TA: vía temporoamónica. (Tomado y modificado de Deng *et al.*, 2010).

Cabe mencionar que la vía de las fibras musgosas corre por esta porción del GD y se refiere al conjunto de axones provenientes de las células granulares, los cuales no se encuentran mielinizados y tienen su blanco hacia las dendritas de las neuronas piramidales de CA3. Estos axones poseen terminales ricas en zinc y su tamaño es mayor al de una terminal neuronal común, se calcula que alrededor de 50 sinapsis inervan a cada célula piramidal de CA3 (Amaral *et al.*, 1990). Se ha estudiado que las fibras musgosas no solo van hacia CA3, sino que en el camino inervan células de esta misma región, en particular células musgosas y células de canasta, por medio de colaterales que se desprenden de cada axón principal, es decir, de cada fibra musgosa (Ribak *et al.*, 1985, Acsady *et al.*, 1998).

El GD también recibe información proveniente de otras estructuras cerebrales, las principales son el núcleo septal, que envía información GABAérgica y colinérgica al GD hacia la capa polimórfica (hacia las células de canasta en particular, ejerciendo control inhibitorio) y también hacia la fracción interna de la capa molecular (ejerciendo un control excitador sobre las células granulares) respectivamente. Existe también una organización en el eje septotemporal, es decir, células localizadas en el núcleo septal medial envían información colinérgica a la parte septal o dorsal de GD, mientras que células localizadas en la parte lateral del núcleo septal inervan la región temporal del GD (Swanson 1978). El GD también recibe información proveniente del área supramamilar que envía aferencias aparentemente glutamatérgicas hacia la capa molecular interna, justamente en la zona más cercana y superficial a la capa granular (Kiss *et al.*, 2000). Otro núcleo que envía proyecciones al GD es el núcleo locus coeruleus, localizado en el núcleo pontino en el tallo cerebral; este envía fibras noradrenérgicas que contactan en el hilus y se extienden hasta el stratum lucidum de CA3 (Loughlin *et al.*, 1986).

El hilus también recibe una inervación más escasa pero apreciable de fibras dopaminérgicas provenientes del área ventral tegmental y finalmente recibe información del núcleo del rafe directamente en el hilus y en la zona subgranular. Particularmente algunas interneuronas, como las células de canasta, se activan mediante entradas serotoninérgicas (Vertes *et al.*, 1993). La conectividad particular del GD le confiere características funcionales particulares que se abordarán a continuación.

1.3. El giro dentado del hipocampo: función

La demostración de que el hipocampo juega un papel fundamental en la memoria y en el aprendizaje del humano apareció hace ya más de 60 años con los trabajos de Brenda Milner con el paciente H.M (Scoville y Milner 1957). Estas investigaciones revivieron el interés por estudiar el hipocampo y los procesos cognitivos ligados a él. La arquitectura particular del GD hacia CA3 y sus conexiones provenientes de la corteza entorrinal han llevado a proponer que la función principal del GD es la de generar un patrón de activación hacia CA3, completamente diferente del resto que puede recibir CA3 desde la corteza y de esta manera evitar generar interferencia sobre las nuevas memorias guardadas; el GD duplicaría, con la proyección del GD a CA3, la información o el mensaje que la vía perforante lleva a CA3 de los patrones de actividad de la capa II de la corteza entorrinal (Treves *et al.*, 2008).

Se ha demostrado que a pesar de tener una alta conectividad con diversas estructuras, el GD es una estructura altamente silente. Estudios realizados para detectar la actividad de la región por medio del contenido proteico de IEGs han mostrado que mientras que una tarea de exploración espacial es capaz de activar entre el 25-50% de las células piramidales de las áreas CA del hipocampo, solo lo hace de un 2-5% de la población total de neuronas granulares del GD (Ramirez-Amaya *et al.*, 2006, Tashiro *et al.*, 2007). Esta característica de disparo “escaso”, sumado al reclutamiento de las *células de lugar* y a su activación localización-específica (Moser *et al.*, 2008), sugiere que pueden constituir los dos componentes principales por los que los organismos somos capaces de almacenar memorias específicas y distinguir eventos.

Se sabe que las células de la corteza entorrinal también poseen una característica de disparo dependiente de la localización espacial del estímulo que las activa, como el área CA3. La diferencia radica en que mientras que en la corteza entorrinal el mismo grupo de células puede activarse ante dos distintos ambientes, sugiriendo que estas células poseen una única representación o mapa del lugar donde se encuentra el animal (Fyhn *et al.*, 2007), en CA3 un set de células particular se activa ante un ambiente determinado y no lo hace cuando el ambiente es uno distinto (Leutgeb *et al.*, 2004). Esta transformación en las representaciones espaciales entre las dos regiones sugiere que debe existir un mecanismo

que ayude a distinguir eventos que poseen características en común, es decir, un mecanismo de separación de patrones localizado en alguna región, posiblemente el GD (Revisado en Treves *et al.*, 2008).

Algunos trabajos donde se realizan lesiones al GD muestran que los animales son incapaces de separar eventos que son similares en espacio y tiempo. Por ejemplo, en una tarea que consiste en discriminar que comedero es reforzado con alimento y que comedero no lo es dentro de una cámara de condicionamiento, los animales lesionados, con daño en GD por colchicina, tuvieron problemas para discriminar el comedero correcto si este se encontraba más cercano al comedero incorrecto. Este déficit decremataba si la distancia entre el comedero correcto y el incorrecto era cada vez mayor, más aún, si se lesionaba con el mismo procedimiento CA1 no se observaban estos déficits (Gilbert *et al.*, 2001), lo cual sugiere que el GD puede estar asociado de forma particular y única a la separación de patrones de tipo espacial. La dificultad para localizar una plataforma dentro de un laberinto de agua ocurre en animales que son lesionados en el GD previo al aprendizaje, pero no así si fueron entrenados antes de la lesión (Lassalle *et al.*, 2002). Más aún, animales cuya vía perforante directa hacia CA3 fue lesionada no muestran déficits en una tarea espacial de laberinto "Hebb-Williams" (Lee *et al.*, 2004), que constituye una tarea de memoria de trabajo espacial donde los animales deben localizar un reforzador positivo (usualmente alimento), en un laberinto con diferentes caminos a recorrer (Pritchett & Mulder 2004). Esto sugiere entonces, que el GD participa en la fase de codificación de la información necesaria para llevar a cabo la función de separación de patrones.

Existe evidencia que muestra que el GD también está vinculado con ciertos procesos cognitivos como el aprendizaje y memoria "dependientes de contexto". Se ha demostrado que el daño extenso al GD o su desaparición total, produce un déficit en la ejecución correcta de tareas de memoria que implican asociaciones espaciales y contextuales como el condicionamiento de miedo al contexto (Lee y Kesner, 2004, Hernández-Rabaza *et al.*, 2008). El condicionamiento de miedo al contexto es un paradigma de aprendizaje que implica la asociación entre un contexto dado y un estímulo nocivo (por ejemplo: una descarga eléctrica). A partir de este tipo de condicionamiento, los mamíferos aprenden que

el contexto es un estímulo discriminativo de la presentación de un evento nocivo y cuando se reintroducen en dicho contexto despliegan una conducta de miedo que se manifiesta subsecuentemente como parálisis o inmovilidad, aun en ausencia del estímulo nocivo (Phillips y LeDoux 1992). Este último proceso constituye la “memoria de miedo al contexto” y se profundizará en ella posteriormente.

1.4. Neurogénesis en el giro dentado adulto

El GD posee una propiedad particular: además de ser una estructura plástica vinculada a procesos cognitivos, también es uno de los dos nichos neurogénicos del cerebro adulto (Altman y Das 1965). La neurogénesis adulta puede definirse como un proceso dinámico por el cual se generan neuronas funcionales a partir de progenitores neuronales. Este proceso se encuentra finamente modulado por estímulos fisiológicos, patológicos y farmacológicos y existen varias características que lo definen: por ejemplo, se caracteriza por ser asincrónico y localizado, pues se sabe que una determinada población de nuevas neuronas puede encontrarse en una etapa de maduración particular, diferente de otra población que puede estar más avanzada o menos en su desarrollo (Ming 2011).

Durante muchos años se mantuvo la idea de que la neurogénesis era un proceso exclusivo de los organismos en desarrollo y fue hasta la década de los 60 que se realizaron las primeras observaciones que apuntaban a que en el cerebro del mamífero adulto había una continua proliferación celular (Altman y Das, 1965 y 1966). Los primeros trabajos de neurogénesis mostraron, por medio de microscopía electrónica, que nuevas células del cerebro de ratas adultas adquirían un fenotipo neuronal (Kaplan y Hinds 1977). Más tarde y gracias al desarrollo de técnicas inmunohistoquímicas que permitían visualizar el linaje de las células recién nacidas, fue posible corroborar que en el cerebro adulto de roedores se generaban nuevas neuronas de forma constitutiva (Kuhn *et al.*, 1996; Kempermann *et al.*, 2003; García *et al.*, 2004; Ehninger *et al.*, 2008). El desarrollo de otras técnicas de marcado como el de los retrovirus hizo posible un estudio más detallado sobre el crecimiento morfológico y de conectividad y así mismo facilitó el estudio electrofisiológico de las nuevas neuronas (van Praag *et al.*, 2002, Zhao *et al.*, 2006).

A continuación se presenta una revisión, realizada durante el doctorado, que aborda las diferentes estrategias metodológicas que se han empleado para evaluar los procesos de maduración y estado funcional de las nuevas neuronas nacidas durante la etapa adulta en el giro dentado.

Andrea Aguilar-Arredondo, Clorinda Arias and Angélica Zepeda*

Evaluating the functional state of adult-born neurons in the adult dentate gyrus of the hippocampus: from birth to functional integration

Abstract: Hippocampal neurogenesis occurs in the adult brain in various species, including humans. A compelling question that arose when neurogenesis was accepted to occur in the adult dentate gyrus (DG) is whether new neurons become functionally relevant over time, which is key for interpreting their potential contributions to synaptic circuitry. The functional state of adult-born neurons has been evaluated using various methodological approaches, which have, in turn, yielded seemingly conflicting results regarding the timing of maturation and functional integration. Here, we review the contributions of different methodological approaches to addressing the maturation process of adult-born neurons and their functional state, discussing the contributions and limitations of each method. We aim to provide a framework for interpreting results based on the approaches currently used in neuroscience for evaluating functional integration. As shown by the experimental evidence, adult-born neurons are prone to respond from early stages, even when they are not yet fully integrated into circuits. The ongoing integration process for the newborn neurons is characterised by different features. However, they may contribute differently to the network depending on their maturation stage. When combined, the strategies used to date convey a comprehensive view of the functional development of newly born neurons while providing a framework for approaching the critical time at which new neurons become functionally integrated and influence brain function.

Keywords: electrophysiology; IEGs; immunohistochemistry; integration; methods; morphology; neurogenesis; optogenetics; time windows.

*Corresponding author: Angélica Zepeda, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Circuito Exterior s/n, 04510 Coyoacán, D.F., México, e-mail: azepeda@biomedicas.unam.mx

Andrea Aguilar-Arredondo and Clorinda Arias: Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Circuito Exterior s/n, 04510 Coyoacán, D.F., México

DOI 10.1515/revneuro-2014-0071

Received October 12, 2014; accepted January 9, 2015; previously published online March 9, 2015

Introduction

Neurogenesis is a well-described mechanism that occurs throughout the lifespan of several species and is a multistep process in which new neurons are generated from neural progenitor cells (NPCs), followed by further maturation and functional integration into preexisting circuits (Ming and Song, 2011). In 1965, Altman and Das described the generation of new cells in two restricted regions of the postnatal mammalian brain: the subventricular zone of the lateral ventricles and the subgranular zone (SGZ) in the hippocampal dentate gyrus (DG). The discovery of the generation of newly born cells in the adult brain led to investigation of whether these cells acquired a neuronal lineage. Only in the 1990s, with the use of 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU), a thymidine analogue that incorporates into the genome of dividing cells, in combination with specific neural markers, did it become possible to establish the presence of adult-born neurons in the above-mentioned regions (Lois and Alvarez-Buylla, 1993; Kuhn et al., 1996).

The finding that neurogenesis occurs in the hippocampal DG attracted attention because this is a well-known plastic structure involved in important cognitive processes, including some forms of learning and memory. Thus, the idea that adult-born neurons incorporated into the hippocampal circuit functionally contributing to such processes was an interesting possibility. Whether adult-born neurons become functionally relevant remained unknown for several years. Efforts to reveal the maturation process, functional state, and potential integration of adult-born neurons began with the analysis of molecular markers and with the use of electrophysiological techniques; later on, a groundbreaking technique consisting of retroviral labeling was developed as a tool allowing detailed *ex vivo* analysis of the morphological and electrophysiological state of newly born cells. More recently, optogenetics evolved as a

powerful technique for evaluating the functional integration of neurons born in adulthood. In this work, we review the information conveyed by the above-mentioned methodological approaches to address the maturation process and functional state of adult-born neurons, and we discuss the contributions and limitations of each strategy. As shown by the various approaches, newly born neurons are integrated gradually, and each technique reveals a level of functionality that goes from nonspecific activation to functional integration. When combined, the strategies used so far provide a comprehensive view of the functional development of newly born neurons and establish a framework for evaluating the timing of the functional integration of new neurons into existing circuits.

To what extent does the molecular expression profile of an adult-born neuron reflect its functional state?

Immunohistochemical studies in adult-born cells have provided a framework for establishing the developmental stage of a neuron. These studies have shown the particular time points at which transcription factors, function-related, and cytoskeletal proteins are expressed. Therefore, the molecular expression profile provides information on the anatomical and physiological maturation stage of a given neuron but does not reflect its functional integration.

Pioneering works first demonstrated that at the histochemical level, new cells did not only differentiate into neurons but also became fully mature (Cameron and McKay, 2001). These studies, based on histochemical markers, provided detailed descriptions of the morphology of the newly born neurons and allowed the characterization of their maturation stage based on the expression of transcription factors, as well as of other nuclear and cytoskeletal proteins (for a review, see Kempermann et al., 2004; von Bohlen and Halbach, 2007, 2011).

It is now well established that new neurons originate from neural stem/progenitor cells (type 1 cells) located in the innermost region of the granular layer, the SGZ. These are quiescent neural cells that possess a radial process extending throughout the granular layer of the DG and express cytoskeletal markers such as glial fibrillary acidic protein, nestin, and vimentin, as well as the cytoplasmic brain lipid binding protein (Blbp) and the transcription factor Sox2 (Encinas et al., 2006). Type 1 quiescent progenitors do not constitutively proliferate, but when activated, these cells give rise to type 2a precursor cells, which have self-renewal capacity and are highly proliferative (von Bohlen

and Halbach, 2007). Approximately 70% of these precursors begin to differentiate into neuronal lineages (Cameron et al., 1993; Cameron and McKay, 2001). At this early differentiation state, newly born cells express molecules such as the transcription factor NeuroD, the prospero-related homeobox 1 Prox-1 (Encinas et al., 2006), and the transcription factor Paired box protein (Pax-6) (Nacher et al., 2005). Some of these cells still self-renew (type 2b cells), but others begin showing characteristics of neuroblasts (type 3 cells). Type 2b and type 3 cells express cytoskeletal proteins such as polysialylated neuronal cell adhesion molecule (PSA-NCAM) and doublecortin (DCX), but only the latter express calretinin, a calcium binding protein (Kempermann et al., 2004; Encinas et al., 2006). Interestingly, a proportion of neuroblasts may simultaneously express young and mature neuronal makers (i.e., DCX and NeuN, respectively) (Esposito et al., 2005), which underscores the fact that maturation is a continuous process more than a ‘stage-defined process’.

Neuroblasts are already responsive at this stage, as suggested by results in our lab showing that 10-day-old DCX⁺ neurons coexpress immediate early genes (IEGs) such as c-Fos upon activation (unpublished data) (Figure 1). The electrical properties of neuroblasts reflect that they are at an immature stage because they are activated through GABA but do not yet respond to glutamate (Ge et al., 2006; Song et al., 2013).

In the first 2 weeks after birth, newly born cells migrate towards the inner zone of the granular layer (Kuhn et al., 1996; Esposito et al., 2005) and begin expressing molecules such as calbindin, a calcium binding protein that identifies a further step in maturation. By 1 month after birth, new neurons cease expressing young-neuron-related proteins such as DCX and PSA-NCAM, whereas the proportion of cells expressing calbindin and the neuronal nuclear antigen NeuN increases (von Bohlen and Halbach, 2007, 2011; Jagasia et al., 2009; Snyder et al., 2009). Thus, the process of transforming a neural stem cell into a mature neuron, at least in terms of its histochemical profile, takes 25–30 days (Encinas et al., 2006). In combination with electrophysiological and morphological studies, it has been shown that at this time point, newly born neurons are at a functional state that resembles that of preexisting mature granule neurons (see below). However, it is worth mentioning that most of the above-mentioned results refer to studies in the septal hippocampus and may differ from observations in the temporal hippocampus. As has recently been shown, neurons of the septal and temporal hippocampus undergo different maturation processes, at least in terms of their profiles of molecular markers (Bekiari et al., 2014), which is also consistent with electrophysiological data (Piatti et al., 2011) (see below).

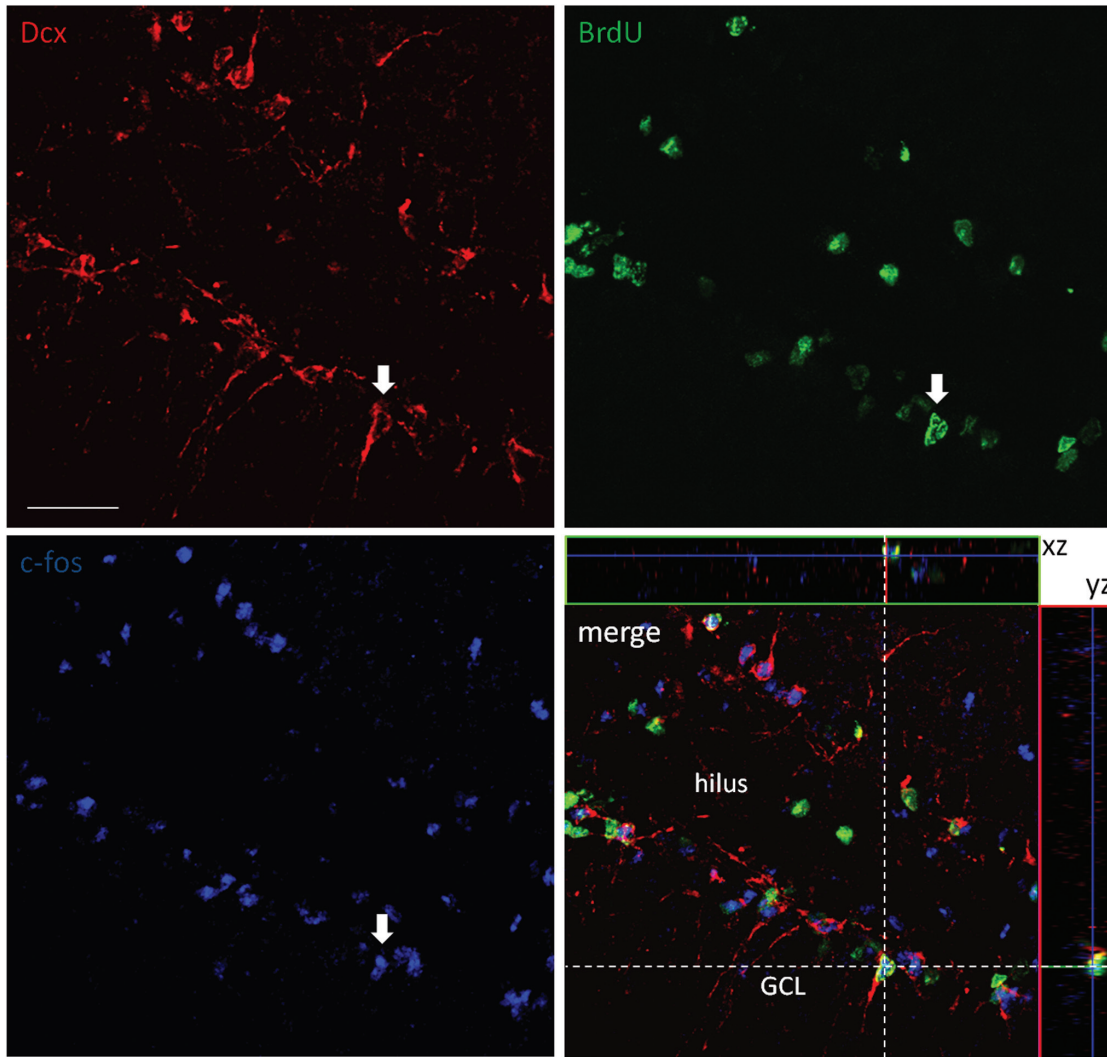


Figure 1: Adult-born young neurons in the DG express *c-Fos*.

Immunohistochemical and confocal analysis reveals a 10-day-old $\text{BrdU}^+/\text{DCX}^+/\text{c-Fos}^+$ cell (arrow). The panel shows a serial confocal stack comprising 20 microns in *z*. DCX^+ (red), BrdU^+ (green), and c-Fos^+ (blue). The bottom right image shows the merged channels as well as the orthogonal views (*xz*, *yz*). GCL, granule cell layer. Scale bar: 30 μm .

It is worth considering that even when molecular markers have provided a framework for establishing the developmental stage of a newly born neuron, they also pose limitations because many molecules are not specific to a single phase; instead, their expression is continuous and may overlap between stages (Figure 2).

Expression of IEGs in adult-born neurons

Expression analysis for IEGs fits in the study of molecular markers. However, we address the studies of IEG

expression in newly born cells in a subsection because, unlike other markers, they do reflect neuronal activity (see Saha and Dudek, 2013, for a review).

IEGs are a group of genes that are transcribed in the absence of *de novo* protein synthesis, and their mRNA can be detected 2 mins after synaptic activity (Guzowski et al., 1999). The peculiarity of these genes is that some can be detected only after activity: only the neurons that were activated in response to stimulation transcribe the mRNA and translate the protein. For this reason, IEGs have been postulated to provide information on the functional state of the cells. The most commonly analysed genes are *arc*, *zif268*, and *c-fos* (Guzowski et al., 2001). As part of the maturation process of new neurons, these

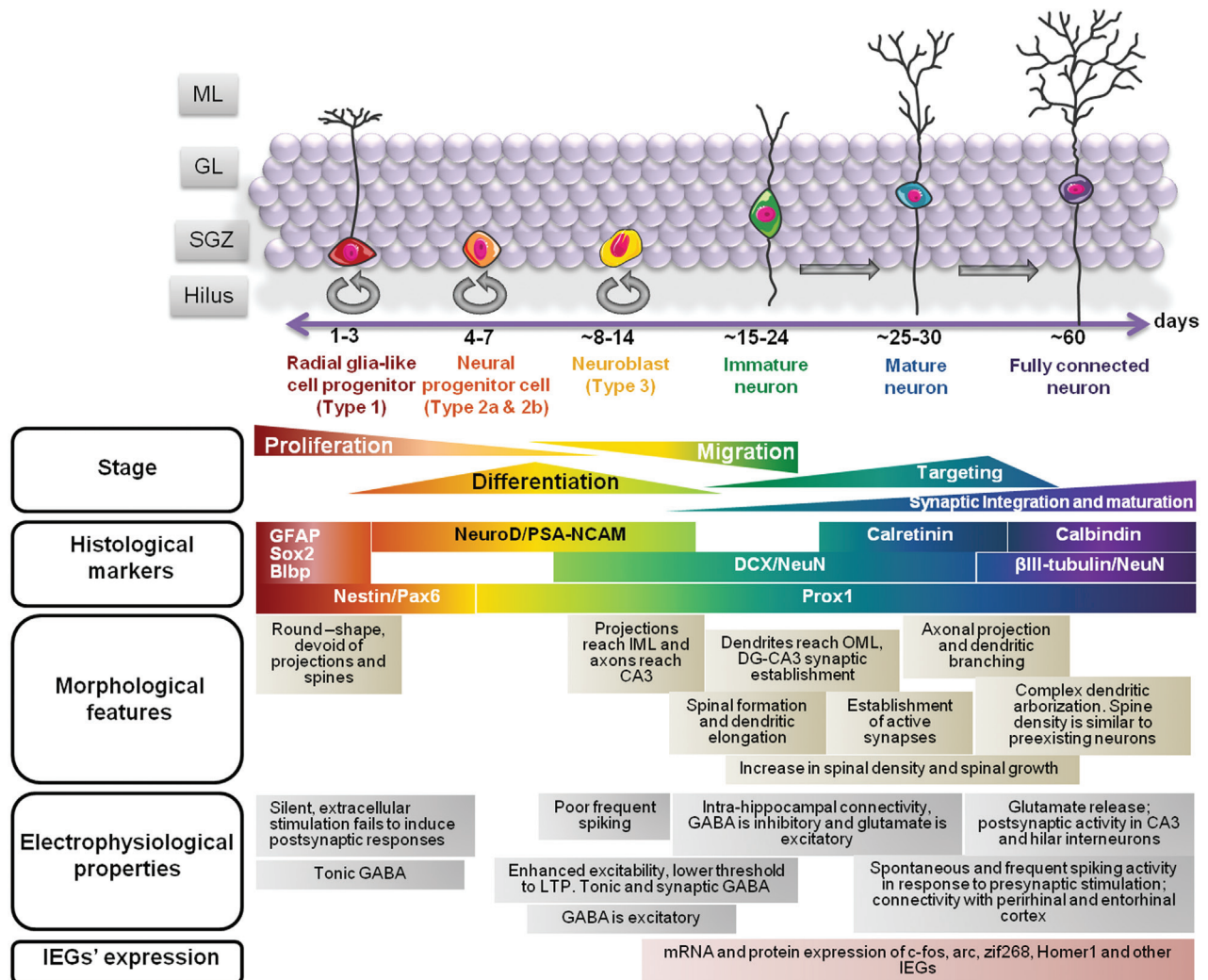


Figure 2: The neurogenic process over time.

Distinctive features based on morphological features, electrophysiological responses, and protein expression characterise neurons at different stages of the neurogenic process; together, they provide important information on the maturation and functional stages of new neurons. The figure depicts the GL of the DG and the maturation process of newly born cells as analysed via different techniques (see text for details). ML, molecular layer; GL, granular layer.

genes initiate transcription programs that have effects at different levels. IEGs can be transcription factors, but they can also be effector proteins located outside the nucleus, regulating synaptic or cytoskeletal functions. IEG proteins are induced in adult-born neurons upon different types of stimulation (Ramirez-Amaya et al., 2006; Kee et al., 2007; Kuipers et al., 2009; Clark et al., 2010, 2011; Gregoire et al., 2014). Behavioural studies have shown that 7-day-old neurons express Arc or Zif268 in the same proportion if animals perform a hippocampus-dependent or -independent task. They have also shown that the proportion of cells expressing these proteins increases as the newly born neurons mature (Kee et al., 2007; Sandoval et al.,

2011). However, IEG protein expression does not necessarily reveal functional integration. Preliminary work in our lab shows that 10-day-old neuroblasts express c-Fos upon retrieval of a memory context (Figure 1). However, given the immature state of the connections of the newly born neuron at this time point, the protein expression may reflect activation upon stimulation but does not imply that the cell is integrated into the circuit. A given neuron may express c-Fos as a consequence of a wide variety of molecular triggers (Kovacs, 1998) and that protein expression may only reflect that the cell is prone to activation. Even in 2-week-old adult-born neurons, the expression of c-Fos and Zif268 derived from kainic acid stimulation or

from exposure to an enriched environment may reflect the activation of signalling pathways (Jessberger and Kempermann, 2003; Tashiro et al., 2007).

In an interesting study, Bruel-Jungerman et al. (2006) showed that 2-week-old neurons express Zif268 after *in vivo* LTP-induction, suggesting that direct potentiation of immature neurons via the perforant pathway may occur. However, as the authors note, the induction of IEG expression by ambient glutamate remains a possible interpretation of the results.

It is important to recall that IEGs regulate several processes, and that as shown by Veyrac et al. (2013), their expression in young neurons is required for neurons to develop morphologically, mature and properly integrate into circuits. Whether nonspecific early activation facilitates functional recruitment once the neuron is mature remains under investigation. Interestingly, supporting the idea that IEG expression may be related to the activation state of the newly born neuron and consistent with electrophysiological data (Piatti et al., 2011) (see below), Snyder et al. (2012) reported that newly born neurons in the septal region of the hippocampus express Arc upon kainic stimulation earlier (at approximately 2 weeks of age) than those in the temporal hippocampus. Therefore, as clearly stated by Jessberger and Kempermann (2003), the expression of IEG proteins in young newly born neurons may well reflect an ‘adaptive rather than an immediate functional relevance’.

Morphological studies in adult-born neurons

Pioneer studies used retrograde tracing to analyse the morphology and connectivity of new cells (Stanfield and Trice, 1988; Markakis and Gage, 1999). More recently, the use of retroviral particles expressing fluorescent proteins such as GFP has proved to be a powerful tool for analysing neuronal structure and ultrastructure (van Praag et al., 2002). Using retrovirally expressed GFP, it has been established that 3–7 days after birth, new cells either exhibit a round form devoid of projections and spines or display a short process oriented parallel to the granular layer of the DG that does not reach the molecular layer (Esposito et al., 2005; Zhao et al., 2006). Thus, even when they receive GABAergic synaptic inputs from local interneurons, they still do not possess developed neurites. At 10 days old, projections from new neurons reach the inner molecular layer, and at 14 days after birth, they reach the middle molecular layer and show more elaborate arborisation. At

10–11 days after birth, axonal projections from newborn neurons reach CA3 (Hastings and Gould, 1999; Zhao et al., 2006). However, only when new cells are 15–17 days old do they begin to elongate dendrites and generate spines (Zhao et al., 2006). The presence of these morphological features correlates with electrophysiological maturation and a functional integration process (see below). Ultrastructural analysis has revealed that axons from 21-day-old adult-born neurons reach the outer molecular layer and form axo-dendritic and axo-spinous synapses with hilar interneurons and CA3 neurons, whereas at 28 days after birth, adult-born neurons exhibit a complex axonal and dendritic arbour and establish synaptic contacts (Zhao et al., 2006; Toni et al., 2008), displaying the morphology of a dentate granule neuron (van Praag et al., 2002). Thus, at this time point, new neurons morphologically resemble the preexisting mature neurons (Zhao et al., 2006). That dendritic spines are the major postsynaptic sites of glutamatergic inputs strongly suggests that the formation of spines reflects the functional integration of the adult-born neurons. By performing serial sections of the tissue and building 3D reconstructions from electron microscopy images of GFP-positive terminals, Toni et al. (2008) showed that mossy fibre boutons in CA3 from newly born cells displayed an immature morphology at 17 days old. Labelled synaptic boutons displayed the typical features of active synapses, such as presynaptic vesicles, a synaptic cleft, and postsynaptic density. However, other features associated with the synaptic maturation process, including the numbers of vesicles and active zones, continued to develop until day 75 after birth. At this later time point, boutons from adult-born neurons reached the same size as those from mature neurons born during early postnatal development. Thus, morphological and synaptic maturations were shown to develop together over time (Toni et al., 2008).

Using rabies virus-mediated retrograde tracing in combination with retroviral labelling, Vivar et al. (2012) characterised the afferents that innervate new granular cells at different maturation times after birth. The authors showed that at 21 days after birth, DG adult-born neurons establish transient intrahippocampal connections with interneurons, mossy cells, septal cholinergic cells, CA3 pyramidal cells, and, interestingly, mature granule cells (Vivar et al., 2012). Although at 28 days old, the general morphology of new neurons is very similar to that of preexisting neurons, it has been observed that the spine density differs between populations, with spines being less abundant in the new neurons and reaching a density similar to that in the preexisting neurons at 56 days after birth (Zhao et al., 2006). It has been shown that the

increase in the number of protrusions occurs along with the expression of glutamate receptors, suggesting that at this stage, adult-born neurons can integrate synaptically into the network (Laplagne et al., 2006; Toni et al., 2007, 2008). Adult-born neurons continue to develop a more complex dendritic branching and spinal growth, and maturation is finally completed approximately 6 months after the birth of the cells (Toni et al., 2007), when they also display electrophysiological properties of functionally mature connected cells (Zhao et al., 2006; for a review, see Vivar and van Praag, 2013) (Figure 2). This body of evidence provides an integrated view of the functional maturation process of newly born neurons by establishing a correlation over time between electrophysiological and anatomical features (Table 1). However, it should be noted that the above-mentioned results hold true under physiological maturation but may differ in a compromised environment, as shown by Perederiy et al. (2013). In that work, the authors showed that after DG deafferentation, newly born neurons display features of integration such as morphological maturation, including the presence of dendritic spines and complex dendritic arborisation, but ultrastructural analysis revealed that these new neurons do not form synapses (Perederiy et al., 2013).

Electrophysiological analysis of adult-born neurons

Pioneer studies on adult neurogenesis aimed to record the electrophysiological characteristics of new cells based on their position within the granular cell layer (Wang et al., 2000). However, the systematic study of the electrophysiological properties of new cells began after the development of retroviral GFP expression (van Praag et al., 2002; Tashiro et al., 2006b). With this approach, *ex vivo* visualisation of newly born neurons in brain slices from injected animals can be performed using fluorescence microscopy, and cells can be targeted for electrophysiological analysis.

Patch clamp recordings from retrovirus-labelled GFP cells have revealed that 1–7-day-old cells are silent: extracellular stimulation fails to induce postsynaptic responses. However, by day 8 after birth, new cells display immature electrophysiological properties. They fire small numbers of spontaneous action potentials with small amplitude and lack repetitive spiking in response to depolarising current steps (Esposito et al., 2005). Interestingly, it has been shown that the survival and further integration of these young neurons are initially regulated by local parvalbumin interneuron activity occurring as early as 4 days

after cell birth (Song et al., 2013). Later, at 3 weeks of age, stimulation of NMDA-type receptors has been shown to be key for the survival of adult-born neurons (Tashiro et al., 2006a). Young, immature new neurons (estimated to be 1–3 weeks old) have particular and unique electrophysiological properties that confer an enhanced excitability, such as low input resistance or lower thresholds for LTP (Schmidt-Hieber et al., 2004). One month after birth, new neurons are responsive to glutamatergic and GABAergic stimulation because they possess both types of receptors (Esposito et al., 2005). However, they still display higher input resistance and lower membrane capacitance than preexisting neurons do (van Praag et al., 2002; Esposito et al., 2005). Consistent with Vivar et al. (2012), Esposito et al. (2005) showed that by 4 weeks of age, new neurons bear abundant glutamatergic afferents and receive inputs from perirhinal cortex and lateral entorhinal cortex. This connectivity continues to develop over time, and within 4–8 weeks after birth, new neurons (i) display spontaneous spiking activity with increasing frequency in response to local and perforant pathway stimulation, (ii) acquire an action potential threshold of 43 mV, and (iii) develop perisomatic GABAergic contacts (van Praag et al., 2002; Mongiat et al., 2009). Thus, electrophysiological analysis demonstrates that at 4 weeks old, new neurons can be considered functionally integrated into a circuit because they integrate excitatory and inhibitory inputs, generate spikes, and release neurotransmitters onto postsynaptic neurons (see Mongiat and Schinder, 2011). These findings show not only that new neurons are synaptically functional by 4 weeks after birth but also that these cells continue to develop over time such that by 8 weeks of age, new neurons are indistinguishable from preexisting neurons. This indicates that they ultimately constitute a homogeneous neuronal population (van Praag et al., 2002; Esposito et al., 2005; Laplagne et al., 2006; Piatti et al., 2011; Vivar et al., 2012).

It should be considered that the electrophysiological maturation process of new neurons differs within the mouse DG. In the septal region of the DG, new cells display the properties of a mature neuron at 21 days after birth, whereas in the temporal region, they do not display such features until 28 days after birth. This suggests that the course of functional integration of new neurons depends on the region in which they are born and presents a possible reason for the discrepancies among results on the timing of functional integration (Piatti et al., 2011).

Another electrophysiological technique that has been used to address the timing of functional integration of newly born neurons is the microelectrode array (MEA). MEAs allow the identification of the maturation stage of

Table 1: Advantages and limitations of the different experimental approaches employed to analyse functional integration of the new neurons in the adult hippocampus (see text for details).

	Advantages	Limitations
Molecular expression profile analysis: <i>immediate early gene (IEG) expression</i>	Provides a fairly accessible way to analyse some morphological features and the maturation stage of a neuron given that particular molecules are differentially expressed depending on the developmental stage Provides information on the functional state of the cell. Neurons that activate upon <i>in vivo</i> stimulation express diverse IEGs, thus implying responsiveness while the animal was alive.	Some molecules are expressed in wide time windows and their expression may overlap between stages. Does not reflect the functional state of a new neuron. The identification of IEGs can be observed only within a limited period after neuronal activity. Thus, it is not possible to analyse the activation of new neurons at several days after stimulation. The expression of IEGs can be elicited by several types of stimulation, complicating the interpretation of the results. Does not unequivocally reveal functional integration.
Morphological analysis using <i>in vivo</i> injection of retroviral particles expressing fluorescent proteins	Allows a detailed characterisation of the anatomy of the cell, including the complexity of the dendritic arbor, spine generation, and axonal elongation, thus revealing the maturation stage of the neuron at the morphological level.	Requires vector constructions and <i>in vivo</i> transfection with high efficacy. Studies based only in morphological analysis cannot provide information concerning integrated or activated new neurons.
Electrophysiological analysis	Provides information about the electrophysiological features of adult-born neurons at a single cell level (i.e., resistance, capacitance). Reveals distinct functional features depending on the maturation stage of the cell as well as its connectivity within the network. When combined with <i>in vivo</i> expression of fluorescent proteins, the approach reveals the functional state of the neuron and its integration in the circuit.	Electrophysiological analysis of adult-born neurons necessarily requires retroviral labelling to ensure that the recording cells are new neurons. Also, the specific analysis of the output of adult-born neurons requires double patch recordings in acute brain slices. This is challenging given that a new neuron contacts only a limited number of all possible target cells.
Optogenetic studies	Allow to manipulate with precision specific groups of neurons in a living organism and provides information on the functional state of adult-born neurons and its implications in circuitry and cognition. Reveals functional integration.	It is an invasive technique given that an optical fibre and electrodes must be inserted in the brain for light stimulation and electrophysiological recording. Requires vector constructions and <i>in vivo</i> transfection with high efficacy.

a neuron based on its coupled activity, as well as on its frequency of network-wide bursting. With this technique, Stephens et al. (2012) sought to document the timing of network integration as hippocampal NPCs differentiated and matured. This approach, however, did not allow the identification of such events because newly born neurons failed to establish the synchronised bursting activity that neurons usually produce in culture (Stephens et al., 2012). The following possibilities may explain this result: (i) the lack of tonic depolarisation provided by basket cells during early stages of the development of new neurons, which is needed for their proper maturation (Ge et al., 2006), and (ii) the lack of hilar mossy cells, which activate adult-born neurons during a critical period for survival (Chancey et al., 2014). However, other factors may have contributed, such as the lack of glial cells in the

preparation. It is well established that radial glial cells are precursors of new neurons, but to our knowledge, the role of glial cells in the process of functional integration of adult-born hippocampal neurons remains unknown.

Optogenetic studies in adult-born neurons

Recent advances in optical methods, in combination with modified viruses expressing fluorescent proteins, have produced optogenetics, a fairly new approach for analysing neuronal activity and neuronal networks *in vivo* (for a review, see Kravitz and Kreitzer, 2011). This technique allows researchers to use light to stimulate distinct cell

types, enabling the activation or inhibition of targeted neurons in the living animal. The expression in precursor cells of the light-gated cation channel rhodopsin-2 (ChR2) (Nagel et al., 2003) has been particularly useful for studying the connectivity patterns established by newly born neurons. Although optogenetic approaches have now been used in a variety of studies aiming at revealing the gain and loss of neuronal function, as well as for unravelling neuronal circuits engaged in memory (Zhang et al., 2013) or behavioural responses (Courtin et al., 2014), only a handful of studies have addressed neurogenesis-associated events.

In a recent work, Song et al. (2013) selectively expressed ChR2-YFP in dentate PV⁺ neurons while labelling proliferating neural progenitors with RFP and showed that as early as 4 days after birth, RFP⁺ progeny received GABAergic inputs from parvalbumin neurons (Song et al., 2013). This evidence reveals that very young neurons are prone to activation, and initial GABAergic-driven depolarisation may affect the further survival of the neuron. However, such a response does not necessarily indicate that newly born neurons are functionally integrated at this stage. More recently, Chancey et al. (2014) demonstrated that 14-day-old neurons show excitatory postsynaptic currents arising from mossy cells as well as from perforant path axons, which provides evidence of an ongoing integration process.

In another study, Toni et al. (2008) performed *in vivo* injections of a retroviral vector carrying ChR2 and either GFP or the monomeric red fluorescent protein 1 and obtained hippocampal slices for further electrophysiological recordings. By activating ChR2-expressing cells with blue light, the authors were able to elicit neurotransmitter release from 3–4-month-old adult-born granule cells (ChR2/GFP⁺) and to record postsynaptic currents in putative target cells, thus showing the functional integration of the newly born neurons. However, it was only recently that Gu et al. (2012), using a combination of functional and anatomical approaches, provided evidence of a time window of functional integration with a clear impact on behaviour. The authors reversibly silenced the connections established by newly born neurons with their targets in CA3 at 2, 4, and 8 weeks after neuronal birth and reported that silencing the connections from 4-week-old but not from 2- or 8-week-old neurons disrupted the retrieval of contextual and spatial memory (Gu et al., 2012).

The final question about the functional role of new neurons into the preexisting hippocampal circuitry is based on their ability to influence the expression of a specific behaviour. Thus, many ablation studies have analysed the time at which eliminating newly born cells impairs learning and memory. Behavioural studies have yielded conflicting results, and in our view, they do not necessarily

reveal functional integration but may uncover the modulatory role of maturing newly born neurons in the performance of particular tasks (see Deng et al., 2009). However, recent approaches, such as the ‘tag and ablate’ transgenic strategy, have allowed the elimination of newly born neurons at specific time points after animals had learned different tasks. Using this approach, Arruda-Crvalho et al. (2014) showed that subsequent memory expression was impaired by selective ablation of new neurons at 7 weeks after animals were trained on hippocampus-dependent tasks. These results are consistent with electrophysiological and morphological studies, which show that at 7 weeks of age, newly born neurons have reached maturity, and this work adds further evidence of integration because the ablation of 7-week-old neurons present during a learning process interferes with memory recall (Arruda-Carvalho et al., 2014). Together, the above-mentioned results indicate a temporal window of 4–7 weeks during which the removal of newly born cells affects specific behaviours.

We will finish by identifying new strategies that hold promise for analysing the level of connectivity of newly born neurons. One such strategy that has not yet been fully exploited is GFP reconstitution across synaptic partners (Feinberg et al., 2008; Feng et al., 2014). This method is based on *ex vivo* analysis of viral infection and consists on the expression of fluorescent split-GFP fragments in different neurons via electroporation or stereotaxic injection. When two neurons are closely apposed across a synaptic cleft, GFP is reconstituted, thus indicating proximity in the range of the nanometre scale. This method has not yet been used in the field of neurogenesis but may yield interesting information about the ongoing process of functional integration of newly born neurons.

Conclusions

It has been five decades since adult neurogenesis was first described in the pioneering research of Altman and Das (1965) but less than 20 years since the development of techniques that unequivocally demonstrate that neurogenesis occurs in the DG of the adult hippocampus. Since then, several approaches based on immunohistochemistry, electrophysiology, molecular biology, and microscopy have been developed, and work using these approaches has demonstrated not only that the process of adult neurogenesis is reminiscent of that during development but also that newly generated neurons functionally integrate into preexisting circuits and influence behaviour. Here, we have reviewed the main experimental approaches that

have been employed to analyse the functional integration of adult-born neurons in the hippocampus. Results derived from the aforementioned work highlight the importance of approaching this complex process using multiple methodologies for interpreting the data. The evidence supports the conclusions that adult-born neurons are functional from an early stage even when they are not yet fully integrated into the circuit and that they may contribute differently to the network depending on their maturation stage. Experimental approaches for revealing functional integration of new neurons have focused on the analysis of their features at distinct levels, but the elimination of new neurons at different stages has also proved to be a useful strategy for revealing their role in the hippocampal synaptic circuit. This last strategy has not been fully exploited but has also proven useful for analysing the integration of new neurons at multiple time points. In combination, the strategies used to date provide a comprehensive view of the development and integration process of newly born neurons while generating a framework for analysing their functional impact.

Acknowledgments: A.Z. is supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACyT 176589 and the Dirección General del Personal Académico, DGAPA UNAM IA200312.

References

- Altman, J. and Das, G.D. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J. Comp. Neurol.* *124*, 319–335.
- Arruda-Carvalho, M., Akers, K.G., Guskjolen, A., Sakaguchi, M., Josselyn, S.A., and Frankland, P.W. (2014). Posttraining ablation of adult-generated olfactory granule cells degrades odor-reward memories. *J. Neurosci.* *34*, 15793–15803.
- Bekiari, C., Giannakopoulou, A., Siskos, N., Grivas, I., Tsingotjidou, A., Michaloudi, H., and Papadopoulos, G.C. (2014). Neurogenesis in the septal and temporal part of the adult rat dentate gyrus. *Hippocampus*. doi: 10.1002/hipo.22388.
- Bruel-Jungerman, E., Davis, S., Rampon, C., and Laroche, S. (2006). Long-term potentiation enhances neurogenesis in the adult dentate gyrus. *J. Neurosci.* *26*, 5888–5893.
- Cameron, H.A. and McKay, R.D. (2001). Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* *435*, 406–417.
- Cameron, H.A., Woolley, C.S., McEwen, B.S., and Gould, E. (1993). Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* *56*, 337–344.
- Chancey, J.H., Poulsen, D.J., Wadiche, J.I., and Overstreet-Wadiche, L. (2014). Hilar mossy cells provide the first glutamatergic synapses to adult-born dentate granule cells. *J. Neurosci.* *34*, 2349–2354.
- Clark, P.J., Kohman, R.A., Miller, D.S., Bhattacharya, T.K., Haferkamp, E.H., and Rhodes, J.S. (2010). Adult hippocampal neurogenesis and c-Fos induction during escalation of voluntary wheel running in C57BL/6J mice. *Behav. Brain Res.* *213*, 246–252.
- Clark, P.J., Bhattacharya, T.K., Miller, D.S., and Rhodes, J.S. (2011). Induction of c-Fos, Zif268, and Arc from acute bouts of voluntary wheel running in new and pre-existing adult mouse hippocampal granule neurons. *Neuroscience* *184*, 16–27.
- Courtin, J., Chaudun, F., Rozeske, R.R., Karalis, N., Gonzalez-Campo, C., Wurtz, H., Abdi, A., Baufreton, J., Bienvenu, T.C., and Herry, C. (2014). Prefrontal parvalbumin interneurons shape neuronal activity to drive fear expression. *Nature* *505*, 92–96.
- Deng, W., Saxe, M.D., Gallina, I.S., and Gage, F.H. (2009). Adult-born hippocampal dentate granule cells undergoing maturation modulate learning and memory in the brain. *J. Neurosci.* *29*, 13532–13542.
- Encinas, J.M., Vaahtokari, A., and Enikolopov, G. (2006). Fluoxetine targets early progenitor cells in the adult brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *103*, 8233–8238.
- Esposito, M.S., Piatti, V.C., Laplagne, D.A., Morgenstern, N.A., Ferrari, C.C., Pitossi, F.J., and Schinder, A.F. (2005). Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. *J. Neurosci.* *25*, 10074–10086.
- Feinberg, E.H., Vanhoven, M.K., Bendesky, A., Wang, G., Fetter, R.D., Shen, K., and Bargmann, C.I. (2008). GFP reconstitution across synaptic partners (GRASP) defines cell contacts and synapses in living nervous systems. *Neuron* *57*, 353–363.
- Feng, L., Kwon, O., Lee, B., Oh, W.C., and Kim, J. (2014). Using mammalian GFP reconstitution across synaptic partners (mGRASP) to map synaptic connectivity in the mouse brain. *Nat. Protoc.* *9*, 2425–2437.
- Ge, S., Goh, E.L., Sailor, K.A., Kitabatake, Y., Ming, G.L., and Song, H. (2006). GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature* *439*, 589–593.
- Gregoire, C.A., Bonenfant, D., Le Nguyen, A., Aumont, A., and Fernandes, K.J. (2014). Untangling the influences of voluntary running, environmental complexity, social housing and stress on adult hippocampal neurogenesis. *PLoS One* *9*, e86237.
- Gu, Y., Arruda-Carvalho, M., Wang, J., Janoschka, S.R., Josselyn, S.A., Frankland, P.W., and Ge, S. (2012). Optical controlling reveals time-dependent roles for adult-born dentate granule cells. *Nat. Neurosci.* *15*, 1700–1706.
- Guzowski, J.F., McNaughton, B.L., Barnes, C.A., and Worley, P.F. (1999). Environment-specific expression of the immediate-early gene Arc in hippocampal neuronal ensembles. *Nat. Neurosci.* *2*, 1120–1124.
- Guzowski, J.F., Setlow, B., Wagner, E.K., and McGaugh, J.L. (2001). 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.
- Hastings, N.B. and Gould, E. (1999). Rapid extension of axons into the CA3 region by adult-generated granule cells. *J. Comp. Neurol.* *413*, 146–154.
- Jagasia, R., Steib, K., Englberger, E., Herold, S., Faus-Kessler, T., Saxe, M., Gage, F.H., Song, H., and Lie, D.C. (2009). GABA-cAMP response element-binding protein signaling regulates maturation and survival of newly generated neurons in the adult hippocampus. *J. Neurosci.* *29*, 7966–7977.

- Jessberger, S. and Kempermann, G. (2003). Adult-born hippocampal neurons mature into activity-dependent responsiveness. *Eur. J. Neurosci.* *18*, 2707–2712.
- Kee, N., Teixeira, C.M., Wang, A.H., and Frankland, P.W. (2007). Preferential incorporation of adult-generated granule cells into spatial memory networks in the dentate gyrus. *Nat. Neurosci.* *10*, 355–362.
- Kempermann, G., Jessberger, S., Steiner, B., and Kronenberg, G. (2004). Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci.* *27*, 447–452.
- Kovacs, K.J. (1998). c-Fos as a transcription factor: a stressful (re) view from a functional map. *Neurochem. Int.* *33*, 287–297.
- Kravitz, A.V. and Kreitzer, A.C. (2011). Optogenetic manipulation of neural circuitry *in vivo*. *Curr. Opin. Neurobiol.* *21*, 433–439.
- Kuhn, H.G., Dickinson-Anson, H., and Gage, F.H. (1996). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J. Neurosci.* *16*, 2027–2033.
- Kuipers, S.D., Tiron, A., Soule, J., Messaoudi, E., Trentani, A., and Bramham, C.R. (2009). Selective survival and maturation of adult-born dentate granule cells expressing the immediate early gene *Arc/Arg3.1*. *PLoS One* *4*, e4885.
- Laplagne, D.A., Esposito, M.S., Piatti, V.C., Morgenstern, N.A., Zhao, C., van Praag, H., Gage, F.H., and Schinder, A.F. (2006). Functional convergence of neurons generated in the developing and adult hippocampus. *PLoS Biol.* *4*, e409.
- Lois, C. and Alvarez-Buylla, A. (1993). Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *90*, 2074–2077.
- Markakis, E.A. and Gage, F.H. (1999). Adult-generated neurons in the dentate gyrus send axonal projections to field CA3 and are surrounded by synaptic vesicles. *J. Comp. Neurol.* *406*, 449–460.
- Ming, G.L. and Song, H. (2011). Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron* *70*, 687–702.
- Mongiat, L.A. and Schinder, A.F. (2011). Adult neurogenesis and the plasticity of the dentate gyrus network. *Eur. J. Neurosci.* *33*, 1055–1061.
- Mongiat, L.A., Esposito, M.S., Lombardi, G., and Schinder, A.F. (2009). Reliable activation of immature neurons in the adult hippocampus. *PLoS One* *4*, e5320.
- Nacher, J., Varea, E., Blasco-Ibanez, J.M., Castillo-Gomez, E., Crespo, C., Martinez-Guijarro, F.J., and McEwen, B.S. (2005). Expression of the transcription factor *Pax 6* in the adult rat dentate gyrus. *J. Neurosci. Res.* *81*, 753–761.
- Nagel, G., Szellas, T., Huhn, W., Kateriya, S., Adeishvili, N., Berthold, P., Ollig, D., Hegemann, P., and Bamberg, E. (2003). Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *100*, 13940–13945.
- Perederiy, J.V., Luikart, B.W., Washburn, E.K., Schnell, E., and Westbrook, G.L. (2013). Neural injury alters proliferation and integration of adult-generated neurons in the dentate gyrus. *J. Neurosci.* *33*, 4754–4767.
- Piatti, V.C., Davies-Sala, M.G., Esposito, M.S., Mongiat, L.A., Trincherio, M.F., and Schinder, A.F. (2011). The timing for neuronal maturation in the adult hippocampus is modulated by local network activity. *J. Neurosci.* *31*, 7715–7728.
- Ramirez-Amaya, V., Marrone, D.F., Gage, F.H., Worley, P.F., and Barnes, C.A. (2006). Integration of new neurons into functional neural networks. *J. Neurosci.* *26*, 12237–12241.
- Saha, R.N. and Dudek, S.M. (2013). Splitting hares and tortoises: a classification of neuronal immediate early gene transcription based on poised RNA polymerase II. *Neuroscience* *247*, 175–181.
- Sandoval, C.J., Martinez-Claros, M., Bello-Medina, P.C., Perez, O., and Ramirez-Amaya, V. (2011). When are new hippocampal neurons, born in the adult brain, integrated into the network that processes spatial information? *PLoS One* *6*, e17689.
- Schmidt-Hieber, C., Jonas, P., and Bischofberger, J. (2004). Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature* *429*, 184–187.
- Snyder, J.S., Glover, L.R., Sanzone, K.M., Kamhi, J.F., and Cameron, H.A. (2009). The effects of exercise and stress on the survival and maturation of adult-generated granule cells. *Hippocampus* *19*, 898–906.
- Snyder, J.S., Ferrante, S.C., and Cameron, H.A. (2012). Late maturation of adult-born neurons in the temporal dentate gyrus. *PLoS One* *7*, e48757.
- Song, J., Sun, J., Moss, J., Wen, Z., Sun, G.J., Hsu, D., Zhong, C., Davoudi, H., Christian, K.M., Toni, N., et al. (2013). Parvalbumin interneurons mediate neuronal circuitry-neurogenesis coupling in the adult hippocampus. *Nat. Neurosci.* *16*, 1728–1730.
- Stanfield, B.B. and Trice, J.E. (1988). Evidence that granule cells generated in the dentate gyrus of adult rats extend axonal projections. *Exp. Brain. Res.* *72*, 399–406.
- Stephens, C.L., Toda, H., Palmer, T.D., DeMarse, T.B., and Ormerod, B.K. (2012). Adult neural progenitor cells reactivate superbursting in mature neural networks. *Exp. Neurol.* *234*, 20–30.
- Tashiro, A., Sandler, V.M., Toni, N., Zhao, C., and Gage, F.H. (2006a). NMDA-receptor-mediated, cell-specific integration of new neurons in adult dentate gyrus. *Nature* *442*, 929–933.
- Tashiro, A., Zhao, C., and Gage, F.H. (2006b). Retrovirus-mediated single-cell gene knockout technique in adult newborn neurons *in vivo*. *Nat. Protoc.* *1*, 3049–3055.
- Tashiro, A., Makino, H., and Gage, F.H. (2007). Experience-specific functional modification of the dentate gyrus through adult neurogenesis: a critical period during an immature stage. *J. Neurosci.* *27*, 3252–3259.
- Toni, N., Teng, E.M., Bushong, E.A., Aimone, J.B., Zhao, C., Consiglio, A., van Praag, H., Martone, M.E., Ellisman, M.H., and Gage, F.H. (2007). Synapse formation on neurons born in the adult hippocampus. *Nat. Neurosci.* *10*, 727–734.
- Toni, N., Laplagne, D.A., Zhao, C., Lombardi, G., Ribak, C.E., Gage, F.H., and Schinder, A.F. (2008). Neurons born in the adult dentate gyrus form functional synapses with target cells. *Nat. Neurosci.* *11*, 901–907.
- van Praag, H., Schinder, A.F., Christie, B.R., Toni, N., Palmer, T.D., and Gage, F.H. (2002). Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* *415*, 1030–1034.
- Veyrac, A., Gros, A., Bruel-Jungerman, E., Rochefort, C., Kleine Borgmann, F.B., Jessberger, S., and Laroche, S. (2013). *Zif268/egr1* gene controls the selection, maturation and functional integration of adult hippocampal newborn neurons by learning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *110*, 7062–7067.
- Vivar, C. and van Praag, H. (2013). Functional circuits of new neurons in the dentate gyrus. *Front. Neural Circuits* *7*, 15.
- Vivar, C., Potter, M.C., Choi, J., Lee, J.Y., Stringer, T.P., Callaway, E.M., Gage, F.H., Suh, H., and van Praag, H. (2012). Monosynaptic inputs to new neurons in the dentate gyrus. *Nat. Commun.* *3*, 1107.

- von Bohlen and Halbach, O. (2007). Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus. *Cell Tissue Res.* 329, 409–420.
- von Bohlen and Halbach, O. (2011). Immunohistological markers for proliferative events, gliogenesis, and neurogenesis within the adult hippocampus. *Cell Tissue Res.* 345, 1–19.
- Wang, S., Scott, B.W., and Wojtowicz, J.M. (2000). Heterogenous properties of dentate granule neurons in the adult rat. *J. Neurobiol.* 42, 248–257.
- Zhang, S.J., Ye, J., Couey, J.J., Witter, M., Moser, E.I., and Moser, M.B. (2013). Functional connectivity of the entorhinal-hippocampal space circuit. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 369, 20120516.
- Zhao, C., Teng, E.M., Summers, R.G., Jr., Ming, G.L., and Gage, F.H. (2006). Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *J. Neurosci.* 26, 3–11.

1.5. El papel funcional de la neurogénesis del GD adulto

El primer trabajo que sugirió que la neurogénesis en el cerebro adulto podía tener un impacto funcional fue el publicado por Goldman y Nottebohm, en donde observaron que había generación de nuevas neuronas en el núcleo que controlaba el canto en canarios (Goldman y Nottebohm 1983). Más adelante surgió un estudio que sugirió que la neurogénesis del GD de ratones adultos podía tener un impacto sobre el aprendizaje asociativo (Shors *et al.*, 2001), pues se observó que después de disminuir la neurogénesis en ratas adultas, empleando acetato de metilazoximetanol (MAM), un fármaco que bloquea la división celular, se impedía el condicionamiento palpebral.

Posteriormente se publicó una serie de trabajos en donde se observaba que después de reducir la neurogénesis adulta en roedores por distintos medios, se producían déficits en tareas dependientes de hipocampo (Wojtowicz *et al.*, 2008, Revisado en Deng *et al.*, 2010). Por ejemplo, empleando la radiación como método de eliminación de nuevas neuronas, algunos estudios mostraron déficits en la evocación de la memoria de miedo al contexto (Winocur *et al.*, 2006, Saxe *et al.*, 2006, Snyder *et al.*, 2005, Hernandez-Rabaza *et al.*, 2009, Warner-Schmidt *et al.*, 2008). Empleando métodos farmacológicos y genéticos para disminuir la neurogénesis también se han apreciado déficits en el porcentaje de inmovilidad de la memoria de miedo al contexto (Saxe *et al.*, 2006, Imayoshi *et al.*, 2008, Farioli-Vecchioli *et al.*, 2008). Estos trabajos apuntan a que las nuevas neuronas podrían participar en la codificación y en una mejor ejecución o recuerdo de este tipo particular de memoria, aunque es importante señalar que algunos estudios no han encontrado diferencias en esta tarea al decrementar la tasa neurogénica (Dupret *et al.*, 2009, Deng *et al.*, 2009, Snyder *et al.*, 2005). Cabe destacar que estos trabajos hacen referencia a la diferencia entre especies o de protocolos de condicionamiento que podrían catalogarse como condicionamientos débiles en comparación con los empleados en los estudios donde se observan déficits en la memoria.

Existen algunos trabajos que apuntan a que las nuevas neuronas también pueden contribuir a mejorar ciertos síntomas asociados a la depresión, la ansiedad, el envejecimiento y enfermedades neurodegenerativas. En modelos murinos de estas afecciones se ha

observado que el decremento en nuevas neuronas promueve la aparición de síntomas depresivos y ansiosos (Murray *et al.*, 2008), pero que si la neurogénesis se incrementa, empleando un transgénico que sobreexpresa el gen anti-apoptótico *Bax*, es posible que los animales puedan contender contra un evento estresor y presentar conductas antidepressivas (Culig *et al.*, 2017). El incrementar la producción y sobrevivencia de las nuevas neuronas puede mejorar tareas dependientes del GD como la separación de patrones (Sahay *et al.*, 2011). En algunos modelos transgénicos para la enfermedad de Alzheimer se ha observado que la expresión de algunos factores de transcripción como NeuroD1, necesario para la maduración adecuada de las células jóvenes (Gao *et al.*, 2009), puede rescatar el fenotipo sano de las nuevas neuronas y mejorar la memoria espacial (Richetin *et al.*, 2015). Más aún, en ratones senescentes se ha observado que incrementar la neurogénesis como se hizo en los ejemplos anteriores, trae consigo una disminución del déficit cognitivo en la tarea del laberinto de agua de Morris generado por el propio envejecimiento (Marlatt *et al.*, 2012, Gebara *et al.*, 2013).

La teoría de que las nuevas neuronas tienen un impacto positivo sobre la cognición también ha ido en la dirección opuesta. Un trabajo sugirió que la eliminación de nuevas neuronas por medios genéticos a través de un knockout (KO) de presenilina-1 favorecía la retención de la memoria de miedo al contexto por más tiempo (Feng *et al.*, 2001), otro estudio aseguró que la disminución de neuronas jóvenes DCX+ en ratones adultos correlacionaba con un mayor recuerdo de la memoria de miedo al contexto en comparación a una condición en la que la neurogénesis se aumentaba por medio de ejercicio; cuando esto sucedía había dificultad para recordar el contexto nocivo (Akers *et al.*, 2014). Si bien hubo variables no contempladas en estos estudios como el análisis únicamente de células BrdU+ o de neuronas inmaduras DCX+, estos resultados sugieren que una función de las nuevas neuronas es la de contribuir a la extinción de un recuerdo.

Otros estudios han empleado algunas técnicas más específicas para manipular la población de neuronas nuevas del GD. Un estudio que empleó optogenética mostró que después del entrenamiento en una tarea de miedo al contexto, solo se presentan déficits en la capacidad para evocar la información si se silenciaba de forma específica una población de nuevas

neuronas de 4 semanas de edad, pero no de 2 ni de 8. (Gu *et al.*, 2012). Aunque no siempre ha sido en la misma dirección, los trabajos apuntan en su mayoría a que las nuevas neuronas poseen un papel relevante en la codificación de la memoria y el aprendizaje. Es por ello que la participación activa de las nuevas neuronas en un proceso cognitivo sigue siendo un tema de estudio de muchos grupos de investigación, incluido el laboratorio donde se llevó a cabo esta investigación.

1.6. Modulación de la neurogénesis adulta

Como se ha revisado hasta ahora, el proceso neurogénico consta de una serie de etapas que se han dividido para su mejor estudio y de las cuales se han destacado características particulares que ayudan al mejor entendimiento de este fenómeno plástico, sin embargo es importante recordar que la neurogénesis es un continuo en donde los diferentes cambios ocurren paulatinamente y a veces pueden empalmarse.

Existen diferentes eventos que pueden modular la tasa neurogénica. Algunos son moduladores negativos, es decir, que pueden disminuir la tasa de producción de nuevas neuronas, tales como el estrés, el envejecimiento, la inflamación, las enfermedades neurodegenerativas o los trastornos del ánimo, la privación de sueño y ciertos tipos de dieta. Sin embargo, también hay moduladores positivos o eventos que incrementan la neurogénesis como el ejercicio, el ambiente enriquecido, el aprendizaje, la actividad sexual, así como ciertos tipos de alimentos, y de forma interesante también el daño cerebral. Sobre la neurogénesis y el daño nervioso se ahondará más en la siguiente sección. En esta sección hablaré brevemente sobre las repercusiones que tienen estos eventos sobre la neurogénesis en el cerebro adulto, así como de los mecanismos que subyacen a su regulación.

Numerosos trabajos han evaluado el impacto que poseen los moduladores negativos sobre la tasa de generación de nuevas neuronas. Existen diversos eventos que son estímulos estresores y por tanto tienen un efecto negativo en la neurogénesis, mayormente en la que ocurre en la región ventral del giro dentado (Lehmann *et al.*, 2013). Algunos de estos estresores son la exposición a un depredador o a un animal dominante (Gould *et al.*, 1997),

a su olor (Tanapat *et al.*, 2001, Mirescu *et al.*, 2004); aislamiento social (Dong *et al.*, 2004); la privación de sueño (Mirescu *et al.*, 2006) y los trastornos del ánimo como la ansiedad (Sah *et al.*, 2012) y la depresión (Malberg *et al.*, 2003); estos estímulos poseen algo en común: todos son estímulos estresores que generan hiperactivación del eje HPA (Hipotálamo-Pituitario-Adrenal) y elevación de glucocorticoides. Se ha observado que un tratamiento crónico con glucocorticoides exógenos desencadena comportamientos de tipo depresivo y ansioso acompañados de una disminución en la producción de nuevas neuronas en roedores, lo cual es mediado por una activación de los receptores a glucocorticoides (Murray *et al.*, 2008, Oomen *et al.*, 2007).

Esta respuesta se debe en parte a que las proyecciones glutamatérgicas provenientes del GD activan a las interneuronas GABAérgicas del núcleo del lecho de la estría terminal, el cual a su vez inhibe el eje HPA y por tanto inhibe la liberación de glucocorticoides (Anacker *et al.*, 2013, Revisado en Anacker *et al.*, 2017). Sin embargo, se ha observado en roedores que si se suprime la neurogénesis significativamente no se lleva a cabo la retroalimentación inhibitoria hacia el eje HPA e incrementan los niveles de glucocorticoides, desencadenando a su vez una disminución en la neurogénesis. De hecho se ha podido observar que la neurogénesis resulta necesaria para contrarrestar estos efectos en el eje HPA y controlar la respuesta incrementada (Schloesser *et al.*, 2009, Snyder *et al.*, 2011). Lo anterior implica que existe un circuito de retroalimentación en el que un estímulo estresor que desencadene hiperactividad del eje HPA y de liberación de glucocorticoides decreta la neurogénesis, y que ésta a su vez es necesaria para inhibir la respuesta hiperactiva al estrés. Así mismo se ha observado que aumentar la neurogénesis no solo antes (Hill *et al.*, 2015) sino después de un estímulo estresor puede ser suficiente para disminuir los efectos dañinos que tiene el estímulo estresor sobre el comportamiento, así como los niveles de corticoesterona (Culig *et al.*, 2017) de tal manera que incrementar la neurogénesis tiene efectos antidepressivos.

La privación de sueño también es un modulador negativo, pues se ha observado que la privación de sueño prolongada produce decremento en la tasa de proliferación celular y en la sobrevivencia de nuevas neuronas en roedores (Mirescu *et al.*, 2006, Zucconi *et al.*, 2006)

de un 50 a un 70% (Guzmán-Marín *et al.*, 2003). El mecanismo considerado para ejercer estos efectos es a través de un incremento en la liberación de corticoesterona, pues en ratones adrenalectomizados que liberan cantidades muy bajas de corticoesterona, no existe una disminución de la proliferación celular (Mirescu *et al.*, 2006). A su vez hay una disminución de factores tróficos como IGF-1, el cual disminuye su unión a su receptor después de periodos prolongados de privación de sueño intermitente (Everson y Crowley 2004) y de BDNF el cual disminuye después de 8 y 48 hrs de privación de sueño, particularmente de la fase de sueño de movimientos oculares rápidos (sueño MOR) (Guzmán-Marín *et al.*, 2006). Otro mecanismo puede ser el incremento en citosinas pro-inflamatorias como la IL-6 y el TNF- α , los cuales incrementan posterior a una privación de sueño (Irwin *et al.*, 2006). Más aún, pacientes con insomnio presentan altos niveles de IL-6 en plasma (Burgos *et al.*, 2006) y se ha evaluado que ambos factores están ligados a una disminución de la proliferación celular y a los efectos dañinos de la neuroinflamación sobre la neurogénesis hipocampal (Monje *et al.*, 2003).

Se sabe que la microglía y los astrocitos son los encargados de generar la respuesta inflamatoria (Wolf *et al.*, 2017) que posee características que se detallarán en la siguiente sección donde se hablará de daño y neurogénesis, sin embargo es importante mencionar en esta sección que la inflamación es un proceso que se acompaña de otras condiciones como el envejecimiento, el padecer algunas enfermedades neurodegenerativas y el alto consumo de dietas altas en grasas y que tiene un impacto negativos sobre la generación de precursores (Sierra *et al.*, 2010), su diferenciación y maduración (Zussy *et al.*, 2016) y hasta en la integración de las nueva neuronas (Jakubs *et al.*, 2008, Chugh *et al.*, 2013). Con el envejecimiento, la microglía produce más factores pro-inflamatorios como IL-6, IL-1B y TNF- α (Bachstetter *et al.*, 2011). Se ha observado que en el modelo murino de la enfermedad de Alzheimer "APPxPS1" la cantidad de nuevas neuronas es menor en comparación a sujetos sanos, así como la densidad de espinas dendríticas de las mismas y la capacidad para resolver tareas de tipo espacial, mostrando un déficit cognitivo que solo se elimina al administrar un factor de transcripción que rescata el fenotipo de las nuevas neuronas a uno sano y restablece la memoria espacial (Richetin *et al.*, 2015). También se ha asociado el

déficit cognitivo producto del consumo de dietas altas en grasas y de la diabetes tipo II con la inflamación en un modelo murino para la enfermedad de Alzheimer, el transgénico A β PP_{swe}/PSEN1dE9 (Matsuda *et al.*, 2017).

Algunas moléculas características de la enfermedad de Alzheimer tienen un papel regulador sobre la neurogénesis adulta. Así por ejemplo, la falta del alelo E4 de la apolipoproteína E incrementa la proliferación de precursores neurales en el GD, lo cual a la larga lleva a la exhaustividad de la poza de células tipo 1 (Yang *et al.*, 2011). Así mismo se ha observado que la expresión del fragmento intracelular de la APP (Proteína Precursora del Amiloide) decrementa la proliferación de progenitores neurales y su supervivencia (Ghosal *et al.* 2010) y que mutaciones en la PS1 también poseen efectos negativos sobre la producción de nuevas neuronas (Wang *et al.*, 2004). Por otro lado también se ha observado que la proliferación de progenitores neurales decrementa en modelos murinos de la enfermedad de Parkinson, específicamente cuando se restringe la inervación dopaminérgica. La proliferación se restablece cuando se administra un agonista selectivo del receptor a dopamina D2, lo cual sugiere que en la enfermedad de Parkinson existe un decremento en la proliferación debido a la denervación dopaminérgica (Höglinger *et al.*, 2006).

De manera contraria también existen moduladores que tienen un efecto positivo. Algunos factores propios del ambiente pueden influir en diversas etapas del proceso neurogénico. Se ha observado que la exposición a un ambiente complejo, es decir, a un ambiente que fomente la interacción social, retos cognitivos y motrices, así como diferentes elementos sensoriales afectan de manera positiva la sobrevivencia de las nuevas neuronas sin afectar la proliferación (Kempermann *et al.*, 1997, van Praag *et al.*, 1999, Bruel-Jungerman *et al.*, 2005), también puede modificar la diferenciación, influyendo en un incremento hacia la diferenciación neuronal (Tashiro *et al.*, 2007). Sin embargo en subsecuentes investigaciones se ha tratado de evaluar qué elemento del ambiente enriquecido es el que promueve estos efectos sobre la neurogénesis. De esta manera se ha descubierto que la rueda de ejercicio que se coloca para que los animales corran dentro del ambiente enriquecido es el elemento que más produce incrementos en la neurogénesis hipocampal y en la densidad de espinas dendríticas, asociándose con incrementos en VEGF, BDNF e IGF-1 como posibles

mediadores de este efecto (Trejo *et al.*, 2001, Fabel *et al.*, 2003, Farmer *et al.*, 2004, Pereira *et al.*, 2007, Stranahan *et al.*, 2007).

Se ha observado en numerosos trabajos con roedores que inducir a realizar actividad física voluntaria en una rueda de ejercicio genera un incremento no solo en el número de nuevas neuronas, sino en la proliferación celular, diferenciación neuronal y su sobrevivencia (van Praag *et al.*, 1999b; van Praag *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2006). Incluso en roedores senescentes se ha observado que correr promueve un incremento en el número de nuevas neuronas y rescata parcialmente la pérdida que se observa con el transcurso de la edad (van Praag *et al.*, 2005, Wu *et al.*, 2008). De manera interesante se ha observado que el correr genera una aceleración en la maduración de las nuevas neuronas del GD temporal de ratones adultos (Piatti *et al.*, 2011), promoviendo una más rápida integración al circuito, y que incluso es capaz de modificar el número, la morfología y los *inputs* glutamatérgicos que reciben las nuevas neuronas a tan solo 7 días de nacidas (Sah *et al.*, 2017). Así mismo el ejercicio se ha reportado como una actividad que puede compensar déficits cognitivos y rescatar los déficits producidos por el envejecimiento o las enfermedades neurodegenerativas. Marlatt y colaboradores demostraron que si se inducía, por medio de actividad física, un incremento en la neurogénesis hipocampal de ratones viejos de 9-15 meses de edad, había una mejora en su memoria espacial evaluada a través del laberinto de agua de Morris, y también un incremento en los niveles de BDNF (Marlatt *et al.*, 2012). Más aún, una exposición breve al ejercicio (2 semanas) es capaz de rescatar el déficit generado en la proliferación de progenitores neuronales en ratones producido por el envejecimiento, así como también puede reducir los niveles de activación de la microglia (Gebara *et al.*, 2013). De hecho, ratas envejecidas corredoras muestran niveles más bajos de factores pro-inflamatorios como IL-1 β en el hipocampo (Speisman *et al.*, 2013, Gibbons *et al.*, 2014) y CCL11 en el plasma sanguíneo, cuyo aumento está asociado con el envejecimiento (E *et al.*, 2014), sugiriendo que el correr tiene efectos anti-inflamatorios que a su vez previene el decremento de la neurogénesis hipocampal producida por el envejecimiento. Otro factor que regula la neurogénesis de manera positiva es el aprendizaje; desde finales de los 90 se encontró que el entrenamiento en una tarea espacial

asociada con el funcionamiento del hipocampo producía una mayor proliferación de nuevas células, donde muchas de estas expresaban marcadores de neuronas inmaduras (Gould *et al.*, 1999). Por mencionar algunos ejemplos, se ha observado que el condicionamiento palpebral y el aprendizaje espacial en el laberinto de agua de Morris, promueven un incremento en la proliferación hipocampal (Dupret *et al.*, 2007) y en la sobrevivencia de nuevas neuronas (Leuner *et al.*, 2006, Epp *et al.*, 2007, Epp *et al.*, 2011). Más aún, el aprendizaje de tipo espacial acelera la maduración de las nuevas neuronas, generando una mayor arborización y una integración más rápida al circuito, este efecto parece ser exclusivo para las nuevas neuronas y es mediado por la activación de sus receptores NMDA (Tronel *et al.*, 2010). Al mismo tiempo que se conoció que la neurogénesis adulta se modifica por el aprendizaje, también se observó que misma puede modular el aprendizaje, como se revisó en la sección anterior 1.5. *El papel funcional de la neurogénesis del giro dentado adulto.*

Por último también se conocen otros dos factores potencialmente benéficos para el incremento de nuevas neuronas: la dieta y la actividad sexual. Se ha observado que la reducción en la ingesta calórica incrementa la neurogénesis adulta de un 30-40% (Bondolfi *et al.*, 2004), efecto mediado parcialmente por BDNF (Lee *et al.*, 2002). La ingesta de ciertos nutrientes como los flavonoides (An *et al.*, 2008), el omega-3 (Kawakita *et al.*, 2006), el café en dosis bajas (Wentz *et al.*, 2009) y la cúrcuma (Kim *et al.*, 2008), son elementos que pueden favorecer la neurogénesis en el adulto, sin embargo el café en dosis altas (Wentz *et al.*, 2009), el etanol (Nixon *et al.*, 2002) y los alimentos altos en grasas (Lindqvist *et al.*, 2006) pueden ser perjudiciales para la tasa neurogénica. Por su parte se han observado resultados benéficos para la tasa neurogénica en ratas macho que tuvieron la oportunidad de copular durante 30 minutos con hembras receptoras, la tasa de proliferación incrementó un 30% a las 2 horas de la copulación. En otro experimento se observó un incremento en la tasa de sobrevivencia de las nuevas neuronas si dejaban a los machos copular durante 30 minutos diarios por 14 días (Leuner *et al.*, 2010). De manera similar se encontró que la copulación podía atenuar los déficits en la neurogénesis inducidos por el envejecimiento en ratas senescentes (Glasper *et al.*, 2013); en ratones una sesión de 90 minutos de copulación era suficiente para rescatar los déficits en la proliferación generados por la exposición a un

estímulo estresante (Kim *et al.*, 2013).

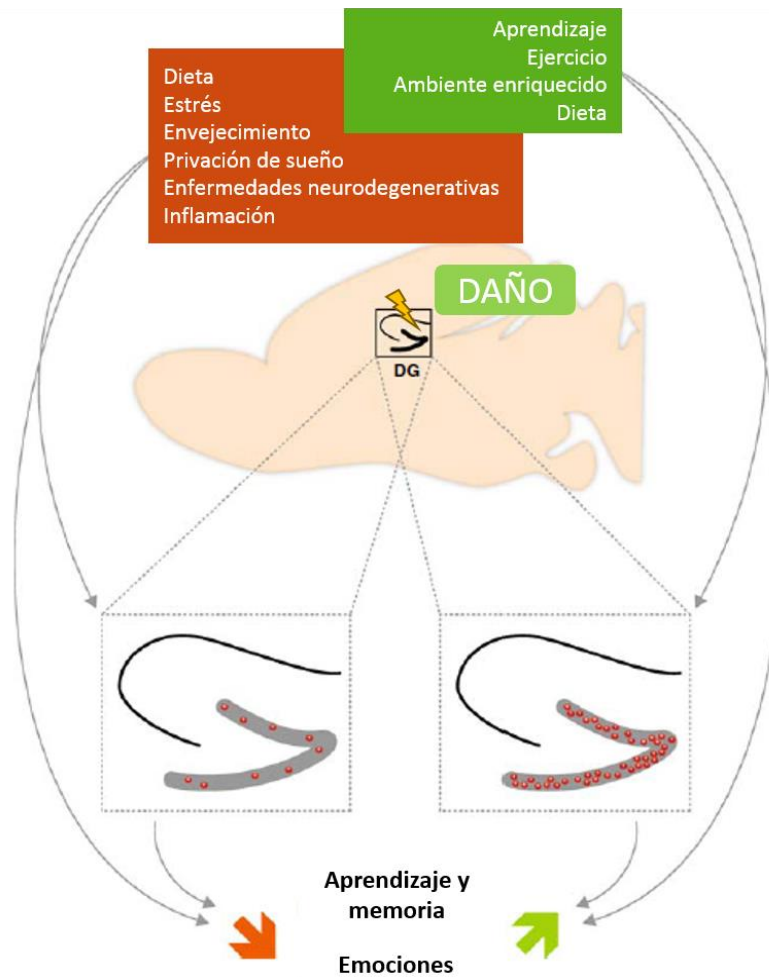


Fig. 2. Moduladores del proceso y tasa neurogénica. Existen diversos eventos que pueden disminuir (recuadro naranja) o que pueden incrementar (recuadro verde) el número de nuevas neuronas en el GD. Esto impacta a su vez sobre las capacidades cognitivas y emocionales del organismo. (Tomado y modificado de Stangl y Thuret 2009).

Como he revisado en la presente sección existen moduladores de la tasa neurogénica que son capaces de modificar no solo el número, sino la maduración e integración de las nuevas neuronas a su circuito. El proceso posee una duración aproximada de un mes, en condiciones fisiológicas, desde que una célula progenitora se activa hasta que madura como una nueva neurona y se integra al circuito; sin embargo, en procesos de daño este proceso ocurre de manera diferente no solo en número, sino en maduración, organización morfológica, localización, etc. La siguiente sección explora algunos de los trabajos realizados sobre la neurogénesis en el cerebro adulto en un contexto de daño nervioso,

abordándola desde diferentes tipos de lesión. Tomo también la siguiente sección para describir el modelo de daño empleado en esta investigación.

1.7. Neurogénesis posterior a daño

La neurogénesis adulta ocurre en condiciones fisiológicas como ya se ha descrito hasta ahora, sin embargo existen varias condiciones experimentales que pueden incrementar, o decrementar, su generación. De forma interesante el daño al sistema nervioso central (SNC) se perfila como uno de los moduladores positivos de este proceso plástico, con un interés y relevancia únicos en términos de reparación. Múltiples trabajos demuestran que la neurogénesis en el GD adulto incrementa posterior a un evento de daño, lo cual ha generado que algunos grupos de trabajo sugieran que la neurogénesis podría actuar como un posible mecanismo de neuroreparación. El estudio experimental de la neurogénesis posterior al daño del SNC se ha desarrollado a partir de modelos animales en los que se mimetizan algunas de las condiciones patológicas que suceden en los humanos.

El primer grupo en mostrar que existía un incremento en la neurogénesis en el GD posterior a un daño fue el de Liu y colaboradores (1998), quienes observaron un mayor número de células en proliferación y de neuronas BrdU+ (análogo de timidina que permite marcar células nuevas) que colocalizaban con el marcador neuronal NeuN (factor de transcripción asociado a neuronas maduras) en el GD posterior a un evento isquémico (Liu *et al.*, 1998). Posterior a esto numerosos grupos de investigación mostraron un incremento en la neurogénesis hipocampal como consecuencia de hipoxia (Zhu *et al.*, 2005, Varela-Nallar *et al.*, 2014), procesos isquémicos (Jin *et al.*, 2001, Kawai *et al.*, 2004, Xu *et al.*, 2016), crisis epilépticas (Bengzon *et al.*, 1997, Parent *et al.*, 1997, 2006, Scharfman *et al.*, 2000, Hosford *et al.*, 2016), trauma cerebral (Sun *et al.*, 2007, 2015; Kernie y Parent 2010; Neuberger *et al.*, 2017, Villasana *et al.*, 2015), daño mecánico (Gray y Sundstrom 1998), excitotoxicidad (Gray y Sundstrom 1998, Dong *et al.*, 2003, Hattiangady *et al.*, 2008, Zepeda *et al.*, 2013) y en modelos de enfermedades neurodegenerativas (Höglinger *et al.*, 2004). Este incremento no solo se observa cuando hay un daño directo al SNC. Por ejemplo, el daño inducido por inyecciones de LPS de forma intraperitoneal genera una respuesta inflamatoria que disminuye significativamente la cantidad de células progenitoras (Sierra *et al.*, 2010),

afectando también la diferenciación y la progresión de la maduración de los neuroblastos (Zussy *et al.*, 2016), así como la integración sináptica de las nuevas neuronas en el GD (Jakubs *et al.*, 2008, Chugh *et al.*, 2013).

De forma breve, se sabe que las células de la microglía y los astrocitos son los responsables de organizar la respuesta inflamatoria que sucede en el cerebro, aunque la microglía es la principal encargada (Wolf *et al.*, 2017). Si bien la respuesta de la microglía puede variar ampliamente dependiendo de la situación fisiológica a enfrentar, pueden existir algunas características en común cuando se detecta un estado fisiológico anormal, como la retracción de los procesos de las células, dando lugar a una morfología más redondeada y de procesos cortos denominada “reactiva”. Esta morfología permite la migración hacia las zonas donde se detecta un daño para fagocitar a las células dañadas por ese daño o a los elementos que están siendo patógenos para el sistema. Junto con los astrocitos las células microgliales montan una respuesta inflamatoria liberando factores pro-inflamatorios anteriormente mencionados como citosinas y quimiocinas. También se incrementa la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y se genera la cicatriz glial, es decir, un cúmulo de astrocitos “reactivos” que restringen la progresión de la lesión o daño cerebral que tiene lugar (Kettenmann *et al.*, 2011).

Así mismo, la administración intraperitoneal de pilocarpina, un agente epileptogénico, genera no sólo un incremento en el número de nuevas neuronas, sino que también produce una mayor complejidad en el árbol dendrítico de dichas nuevas neuronas, teniendo una arborización semejante a una neurona madura tan solo a los 14 días después del tratamiento. Más aún, son capaces de integrarse funcionalmente al circuito, pues pueden responder si la vía perforante se estimula (Overstreet-Wadiche *et al.*, 2006), lo cual sugiere que algunos tipos de daño son capaces de acelerar la integración de las nuevas neuronas. En algunos trabajos se ha logrado observar que después de una lesión traumática sobre la corteza cerebral de ratas y ratones, la cantidad de nuevas neuronas aumenta junto con la complejidad de sus árboles dendríticos. Este aumento parece estar acompañado de la integración funcional (Villasana *et al.*, 2015) y una mejora en tareas espaciales como el laberinto de agua de Morris (Sun *et al.*, 2007, 2015). Sin embargo es posible que algunas de

las características que desarrollan las nuevas neuronas generadas después del daño sean propias de ciertos tipos de daño, por ejemplo, se ha visto que después de inducir epilepsia en modelos animales incrementa el desarrollo de espinas dendríticas en las nuevas neuronas, lo cual podría optimizar o acelerar la comunicación en ventanas temporales subsecuentes al daño (Overstreet-Wadiche *et al.*, 2006), pero no sucede así después de trauma cerebral (Villasana *et al.*, 2015). Se sabe que algunos factores se segregan después de daño que podría desencadenar un incremento en la neurogénesis y contribuir a la reparación. En ratones lesionados por medio de TBI, el correr logra incrementar los niveles de BDNF al mismo tiempo que los niveles de nuevas neuronas NeuN+ incrementan (Piao *et al.*, 2013). En el laboratorio se realizó un trabajo donde observamos que la infusión crónica de IGF-1 después de daño al giro dentado, lograba reestablecer el déficit cognitivo inducido por la lesión al mismo tiempo que se observó una mayor complejidad en la arborización dendrítica de neuronas jóvenes DCX+ (Liquitaya *et al.*, 2012).

En otro trabajo previo del laboratorio, evaluamos el impacto funcional de realizar una lesión focal en el GD de ratas adultas y la modulación en el tiempo de la respuesta neurogénica. El daño lo realizamos mediante la inyección de ácido kaínico (AK), un análogo de ácido glutámico, a dosis subepileptogénicas directamente sobre el GD de los sujetos. Brevemente, el AK (*monohidrato del ácido acético 2-carboxi-4-isopropenil-3-pirrolidinil*) es un análogo no degradable del ácido glutámico, y agonista de los receptores ionotrópicos AMPA/Kainato que permite la despolarización y entrada masiva del ion Ca^{2+} produciendo excitotoxicidad en las células blanco, particularmente en el hipocampo (Wang *et al.*, 2005). Tan sólo 24 horas posteriores al daño focal en el GD, ocurrió un aumento en el número de células progenitoras BLBP+ en los sujetos lesionados en comparación con los sujetos control. De manera similar, 10 días después de la lesión (10dpl) se mostró un incremento significativo, en los sujetos lesionados en comparación al control, de neuronas jóvenes DCX+. El incremento observado en ambos marcadores sugiere que el daño promovió la generación tanto de progenitores neurales como de neuronas jóvenes. Aunado a esto se observó una pérdida en la capacidad para evocar una memoria aversiva al contexto, misma que se recuperó en sujetos de 25 y 60dpl (días post-lesión). Estos resultados muestran que

la neurogénesis incrementa posterior a un daño focal, acorde con otros trabajos y modelos de daño. Así mismo se observó una asociación entre la recuperación de la memoria y la reorganización del GD, sugiriendo que algunos mecanismos de plasticidad, entre ellos la neurogénesis, podrían jugar un papel importante en la recuperación anatómica y de la función del GD adulto (Zepeda *et al.*, 2013).

Como he revisado brevemente en esta sección diversos trabajos muestran que la tasa de generación de nuevas neuronas incrementa en el GD del cerebro adulto como consecuencia de un daño. En condiciones fisiológicas una fracción de estas sobrevive y madura como neuronas granulares, sin embargo aún es necesario evaluar el posible papel funcional de las nuevas neuronas en un contexto de daño. En el presente trabajo nos planteamos evaluar si las neuronas nacidas en el GD después de haber sido lesionado, podían seguir un proceso de maduración normal y ser capaces de activarse en respuesta a una tarea asociada al funcionamiento del mismo GD, sugiriendo así su posible contribución a la recuperación funcional de la estructura. Para este abordaje se emplearon diferentes marcadores histológicos que, junto con la detección de BrdU (un análogo de la timidina que se integra al ADN en síntesis y permite detectar células en proliferación), nos ayudaron a identificar la etapa de maduración de las nuevas neuronas nacidas después del daño, tales como: DCX (doblecortina, proteína que promueve la polimerización de microtubulos. Identifica neuronas jóvenes), GFAP (proteína fibrilar ácido glial, propia del citoesqueleto de astrocitos maduros), NeuN (Proteína del nucleo neuronal, que se expresa en neuronas maduras) y c-fos (proteína derivada del IEG del mismo nombre que detecta actividad neuronal reciente), en conjunto con lo analizado previamente empleando los marcadores de precursores neurales como: BLBP (proteína de unión lípidos del cerebro) y PCNA (antígeno nuclear de células en proliferación, expresada en células en proliferación), así como CR (Calretinina, proteína de unión a calcio expresada en neuronas que salieron de ciclo celular). La identificación de estos marcadores junto con la evaluación conductual y el análisis de la LTP *in vivo*, se conjuntaron para proveer información sobre la reorganización del GD después de daño y el papel de la neurogénesis como un posible mecanismo de reparación tanto anatómico como funcional.

2. HIPÓTESIS

Las nuevas neuronas nacidas después de un proceso de daño en el giro dentado adulto son capaces de madurar normalmente y de activarse en respuesta a una tarea cognitiva asociada a la estructura lesionada, correlacionando con la reorganización estructural y funcional de la región a través del tiempo.

3. OBJETIVOS

3.1. General

Explorar en el tiempo y posterior a un daño excitotóxico focal en el giro dentado de ratas adultas, la reorganización morfológica y funcional del giro dentado, así como la maduración y la activación, ante un evento cognitivo, de las nuevas neuronas granulares.

3.2. Particulares

1. Realizar un daño excitotóxico focal al giro dentado de ratas adultas que incremente la tasa neurogénica.
2. Analizar el proceso de aprendizaje y memoria de miedo al contexto 10 y 30 días después de generar un daño focal o una lesión sham.
3. Analizar la reorganización morfológica del GD a ambas ventanas temporales posteriores al daño mediante análisis estereológico.
4. Analizar a ambas ventanas temporales en los animales lesionados y no lesionados el nivel de proliferación, sobrevivencia y maduración de las nuevas neuronas nacidas en el GD, por medio de la identificación de diferentes marcadores histológicos que identifiquen las poblaciones celulares de interés.
5. Evaluar a ambas ventanas temporales de los animales lesionados y no lesionados si las nuevas neuronas generadas son capaces de activarse en respuesta a la evocación de la memoria de miedo al contexto.
6. Analizar si la activación de las nuevas neuronas generadas después de daño es producto de la evocación de una memoria asociada a la estructura lesionada o si es generada por una activación basal.

7. Analizar la correlación temporal de la reorganización morfológica y funcional del GD con los niveles de producción de nuevas neuronas activas.

4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

4.1. Sujetos:

Todos los animales empleados en esta investigación se manipularon de acuerdo a las leyes locales y siguiendo el código de ética para trabajo con animales de laboratorio aprobado por la CICUAL (Protocolo No. 077) del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM haciendo lo posible para disminuir al máximo el malestar de los sujetos ante los protocolos requeridos.

Ratas: Se emplearon ratas jóvenes adultas macho, de 2.5-3 meses de edad, de la cepa Wistar con un peso de 250-350g (n=71). Se mantuvieron en grupos de 2-4 animales por caja en ciclo invertido de 12h luz/12h oscuridad cambiando los ciclos a las 7:00 horas y a las 19:00 horas. El alimento y el agua se proporcionaron *ad libitum*.

4.2. Lesión al giro dentado:

La lesión se realizó en el día 0 y se procedió a analizar el tejido al día 10 o 30 en diferentes grupos de sujetos, como se explicará en otra sección. La lesión se realizó mediante cirugía estereotáxica (Stoelting, Wood Dale, IL) anestesiando a los animales con Isoflurano al 2% en una mezcla de 95% O₂ y 5% CO₂. Para la cirugía, la barra de los incisivos se colocó a -3.3mm debajo del cero horizontal. A un grupo de sujetos se le infundieron unilateralmente 0.25µl de ácido kaínico (0.75mM; AK, Sigma Aldrich) en el giro dentado, empleando para ello una jeringa Hamilton de 10µl controlada por un inyector automático (Quintessential Stereotaxic Injector, Stoelting Co., Wood Dale, IL, EU). La infusión de AK se realizó en las siguientes coordenadas a partir de Bregma: AP -3.6, ML -2.4 y DV -3.6 (Paxinos *et al.*, 2007). El inyector se mantuvo en las coordenadas blanco durante 1 minuto posterior a la infusión. Para los sujetos del grupo de cirugía sham, se les introdujo el inyector en la misma zona del GD, pero se omitió la administración de solución alguna. Finalmente, se suturó la piel y se interrumpió la anestesia para devolver al animal a su caja-hogar. Se monitoreó la conducta de los animales en las horas siguientes a la infusión de AK, observándose únicamente el comportamiento característico de “sacudidas de perro mojado”, aproximadamente 60

minutos posteriores a la infusión; ninguno de los animales mostró crisis convulsivas generalizadas. Todos los animales se sacrificaron a los 10 ó 30 días posteriores a la lesión (10dpl y 30dpl) o a los 10 ó 30 días posteriores a la cirugía sham (10dsh y 30dsh)

Ácido Kaínico (AK): El AK (K0250; Sigma–Aldrich, Chemie, St. Louis, MO) empleado previamente se disolvió en 50µl de NaOH 1N aforándolo a 1ml con buffer de fosfatos 10mM (PB, NaH₂PO₄ 10mM, Na₂HPO₄ 10mM, pH 7.2), fijando el pH de la solución final entre 7.0-7.5. Este stock se diluyó 1:10 para finalmente infundirse 0.25µl/min que contiene 0.187 nmolas de AK.

4.3. Inyecciones de BrdU:

Con el objeto de identificar las células en proliferación que se generaron a partir del daño en el GD de las ratas adultas, se realizaron 5 inyecciones intraperitoneales de 5-bromo 2'-deoxiuridina (BrdU, Sigma Aldrich) a partir del tercer día posterior a la cirugía. Las inyecciones se administraron cada 24 horas durante 5 días consecutivos a una concentración de 100mg/kg disuelto en PBS 0.9% (0.9% NaCl en PB). El PBS se llevó a una temperatura de máximo 60°C para disolver el BrdU, inyectando un volumen final de 1ml por inyección. Los animales se perfundieron a los 10 ó 30 días posteriores a la cirugía para el análisis histológico.

4.4 Aparatos:

4.4.1. Cámara de condicionamiento de miedo al contexto (CMC): Con este instrumento se condicionó y evaluó a los animales en una tarea de miedo contextual. La cámara donde se llevó a cabo el condicionamiento de miedo al contexto posee las siguientes características: 25cm de largo x 25cm de ancho x 20cm de alto (San Diego Instruments). Las paredes y techo de la caja son de acrílico transparente y el piso removible está formado por una rejilla de 23 tubos de acero inoxidable que se conecta a una computadora para generar una corriente eléctrica de intensidad y duración variables controlada por el experimentador. La cámara está equipada con una matriz de rayos infrarrojos (16 por lado) a nivel del piso cuya interrupción detecta los movimientos dentro de la cámara, ésta información se registra y

envía a una computadora que almacena los datos y controla el equipo a través del software Freeze Monitor (Freeze Monitor, SD Instruments). Todos los movimientos fueron registrados por un observador y comparados con los datos obtenidos mediante el software Freeze Monitor.

4.4.2. Arena de Campo Abierto: La tarea de campo abierto, usada para evaluar motricidad y ansiedad en nuestros animales, se llevó a cabo en una arena con las siguientes medidas: 80cm de largo x 80cm de ancho x 30cm de alto. Dicha arena está dividida, por medio de una línea blanca, en cuadros de 20cm x 20cm generando 16 cuadros del mismo tamaño.

4.5. Protocolos conductuales:

Todos los animales se evaluaron en su fase de obscuridad en una habitación iluminada con luz roja. Previo a la aplicación de los protocolos conductuales se manipuló a los animales por 3 días consecutivos durante 10 minutos para generar habituación al experimentador. Con el objetivo de activar a las neuronas granulares del GD y poder analizar un correlato de la integración funcional de las nuevas neuronas de esa región, se realizó una tarea que se encuentra íntimamente relacionada al funcionamiento de la estructura: el Condicionamiento de Miedo al Contexto (CMC).

Se analizaron grupos independientes para el CMC y para la tarea control de exploración sin condicionamiento (ESC) al día 9 (n=32: AK=16, CMC n=8 y ESC n=8; Sham=16, CMC n=8 y ESC n=8) o al día 29 (n=31: AK=16, CMC n=8 y ESC n=8; Sham=15, CMC n=8 y ESC n=7) posterior a los procedimientos quirúrgicos. Un grupo extra sin cirugía se analizó para ambas tareas (n=8: CMC n=4 y ESC n=4). La tarea control de ESC se explicará más adelante. Veinticuatro horas después del CMC se procedió a la evaluación de la fase de memoria, los animales expuestos a la ESC se reintrodujeron a la cámara una vez más en el mismo contexto durante 5 minutos.

4.5.1. Campo Abierto: Previo a la realización del CMC o de la ESC se sometió a los animales a la tarea de campo abierto para analizar niveles de ansiedad y de desempeño motor. En el día 9 ó 29 post cirugía se colocó a cada animal individualmente en la arena de campo abierto

y se le dejó explorar durante 5 minutos. Cada animal se colocó en una esquina aleatoria del campo abierto. Se contabilizó el número de cruces en el centro y periferia como un indicador de ansiedad y de cruces en general como indicador de desempeño motor.

4.5.2. Condicionamiento y Memoria de Miedo al Contexto: Es un tipo de condicionamiento clásico que involucra la asociación entre un estímulo incondicionado que produce una respuesta por sí sólo (EI, choque eléctrico en las patas a través del piso) y un estímulo neutro que no posee significado alguno para el organismo (EN, el contexto de la cámara de condicionamiento). Como consecuencia de la asociación entre estos estímulos, la subsecuente presentación del EN produce la respuesta dada ante el EI la cual se caracteriza, en este tipo de memoria, por una inmovilidad motriz casi total. El EN (el contexto de la cámara) se convierte así en un estímulo predictor del EI (choque eléctrico), transformándose en lo que llamamos estímulo condicionado (EC1). La exposición al EC1 produce que los sujetos desplieguen una respuesta de inmovilidad o “freezing” como reflejo natural de miedo ante un estímulo que produce aversión. La inmovilidad en el contexto de condicionamiento se define operacionalmente como “la ausencia total de movimientos exceptuando los generados por la respiración” (De Oca *et al.*, 1998). Esta tarea se llevó a cabo en la cámara de condicionamiento previamente descrita en la sección de *Aparatos* y consta de dos fases:

Condicionamiento: esta fase tuvo lugar el día previo al sacrificio de los animales (9 ó 29 post-cirugía). Consistió en condicionar a los sujetos individualmente colocándolos en la cámara de condicionamiento y permitiéndoles explorarla por 2 min (periodo pre-choque) previo a la administración del primer choque eléctrico (1mA, 2s de duración). La exploración previa permite al sujeto asociar el contexto con el subsecuente estímulo nocivo que es el choque eléctrico. Posterior a los dos minutos, se administró el primer choque y se evaluó su respuesta de inmovilidad; los sujetos se expusieron a 4 choques eléctricos idénticos al primero con intervalos inter-choque de tiempo variable (de 60s-180s), midiéndose el tiempo de inmovilidad en cada uno de los ensayos; la sesión completa de CMC duró aproximadamente 12 minutos por sujeto.

Memoria: Veinticuatro horas después (día 10 o 30 post-cirugía) del condicionamiento tuvo lugar la segunda fase, la Memoria de Miedo al Contexto (MMC). La sesión de evocación de la memoria consistió en exponer a los animales durante 300 segundos al contexto de condicionamiento del día anterior, sin aplicar ningún estímulo adicional. Durante este tiempo se contabilizó el tiempo de inmovilidad que presentaban ante el puro contexto. Después de cada sesión la cámara se limpió con una solución compuesta de extrán (10% Merck, Darmstadt, Alemania) y etanol al 96% (10%) en agua bidestilada.

4.5.3. Exploración Sin Condicionamiento: Como parte del control conductual necesario para esta investigación, se incluyeron grupos de animales que no estuvieron expuestos al condicionamiento de miedo al contexto y por lo tanto tampoco a la evocación de la memoria de miedo (n=35: 10dpl n=8, 30dpl n=8, 10dsh n=8, 30dsh n=7 e Intactos n=4) pero que si realizaron una tarea de exploración espacial a manera de tarea control. Durante la primera fase (similar a la fase de aprendizaje) se expuso a cada animal a la cámara de condicionamiento pero sin la administración de choque eléctrico. Únicamente se les dejó explorar la cámara mientras transcurrían los 12 minutos que duraba la sesión y se midió su movilidad. Para la segunda fase, 24 horas después (similar a la fase de evocación) se colocó a los sujetos por 300 segundos en el mismo contexto y se evaluó su movilidad de la misma forma que en los grupos con MMC. Estos grupos son denominados de exploración sin condicionamiento (ESC).

4.6. Registro electrofisiológico

Potenciación de Largo Plazo (LTP) en la vía de las fibras musgosas

Esta aproximación electrofisiológica se empleó en otros grupos de animales para evaluar la capacidad de inducir un fenómeno de plasticidad entre dos regiones que se encuentran conectadas, en este caso el GD y la región CA3 del hipocampo, la cual es la aferencia principal del GD. El protocolo para inducir LTP se aplicó en animales de 10dpl, 25dpl y 60dpl con sus respectivos controles de cirugía sham, así como a un grupo de animales intactos con el objeto de evaluar si la conectividad entre ambas regiones se podía reestablecer en el

tiempo posterior a daño. La metodología se explica detalladamente en Zepeda (2013) y en la tesis de Aguilar-Arredondo A, (2011).

4.7. Procesamiento del tejido:

Todos los reactivos se adquirieron de la compañía Baker (Austin, Tx, EU), a menos que se especifique lo contrario. 30 minutos posteriores a la MMC o a la ESC, se realizó una perfusión intracardiaca a los sujetos, con 250ml de NaCl (0.9%) seguida de 250ml de paraformaldehído (4% en PB 0.1M, pH 7.4). La ventana temporal de extracción del tejido es importante debido a que se ha reportado que los niveles de proteína de IEGs alcanzan su máxima expresión hacia los 30 minutos posteriores a la evocación de la memoria. Si se extrae el tejido antes de 30 minutos se corre el riesgo de no observar la proteína por los medios inmunohistoquímicos debido a que no ha pasado el periodo de traducción del mensajero, como es el caso del IEG que empleamos en esta investigación que fue c-fos (Guzowski *et al.*, 2001).

Transcurrido este periodo de tiempo se llevó a cabo la perfusión y se extrajo el tejido cerebral, almacenándolo en solución fijadora a 4°C por 24 horas adicionales. Posteriormente, los cerebros se transfirieron a soluciones de 15% y 30% de sacarosa por 48 horas adicionales y se obtuvieron secciones coronales del hipocampo de 30 micras de grosor por medio de un criostato (Microm HM550, Thermo Scientific, Waltham, MA, EU). Una de cada 5 secciones se colocó en laminillas previamente gelatinizadas (portaobjetos bañados en solución de 1% de gelatina bovina y 0.01% CrSO₄) para llevar a cabo la tinción de Nissl y las demás secciones se almacenaron en líquido de crioprotección (25% etilenglicol, 25% glicerol y PB 0.1M, pH 7.4) para su posterior análisis inmunohistoquímico.

4.7.1. Tinción de Nissl: La Tinción de Nissl identifica los gránulos de Nissl, que son fragmentos de retículo endoplásmico rugoso, haciendo evidentes los cuerpos celulares, no así las dendritas y axones. Esta tinción se llevó a cabo en las secciones montadas en laminillas gelatinizadas y se realizó con el fin de observar el daño causado al GD y corroborar que dicha región fue lesionada. Estas secciones también se emplearon para el análisis estereológico Cavallieri que se describe más adelante. El tejido se sumergió durante 2

minutos en agua bidestilada para hidratarlo y posteriormente se sometió a deshidratación en 70%, 95% y 100% de EtOH durante 2 minutos por solución, posteriormente se sumergió por 2 minutos adicionales en violeta de cresilo (0.1%; Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, EU). Seguido de esto, los cortes se lavaron en H₂O por 2 minutos y prosiguieron 2 minutos en cada solución de EtOH de las previamente mencionadas; finalmente los cortes se lavaron en Xilol durante 2 minutos y se cubrieron con medio de montaje Permount (Fischer Scientific, NJ, EU) y un cubreobjetos.

4.7.2. Inmunofluorescencia (IF): Se empleó para identificar las diferentes poblaciones del proceso neurogénico generado a partir del daño generado, desde la proliferación, el linaje de las nuevas células, su etapa de maduración y su activación. Se realizaron triples IF en el tejido recolectado de los cerebros previamente cortados para identificar distintos marcadores como BrdU, NeuN o DCX y c-fos. Se tomaron cortes seriados (1 de cada 5 secciones) con 120 micras de separación constante entre cada uno.

Los cortes se lavaron en PBS (0.1M, 0.9% NaCl, pH 7.4), se permeabilizaron con PBS-Tx (Tritón 0.3%) y se desnaturalizaron durante 30 minutos a 37°C con HCl (2N). Posteriormente las secciones se lavaron con PBS frío (2-8°C, 0.1M, 0.9% NaCl, pH 7.4) y se bloquearon por 1 hora en solución bloqueadora (5% suero normal de caballo, Vector Laboratories, Burlingame, CA; en PBS-Tx) a temperatura ambiente. Se incubó en anticuerpo primario para detectar BrdU, DCX o NeuN y c-fos (anti-BrdU oveja 1:400, Abcam o anti-BrdU ratón 1:500, Roche; anti-NeuN ratón 1:500, Millipore o anti-DCX cabra 1:250, Santa Cruz Biotechnologies y anti-c-fos conejo, 1:1000 Santa Cruz Biotechnologies) toda la noche a 4°C. Al día siguiente se lavó el tejido y se incubó en anticuerpo secundario (Alexa Fluor 488 anti-oveja o anti-ratón, Alexa Fluor 647 anti-conejo, Alexa Fluor 555 anti-ratón, Invitrogen; Dylight 594 anti-cabra, Jackson Immunoresearch) por 2 horas a temperatura ambiente, seguido de lavados con PBS (0.1M, 0.9% NaCl, pH 7.4). Finalmente las secciones se montaron en portaobjetos silanizados previamente (2% de Silano en C₃H₆O) o cubiertos con Poli-lisina (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, EU) y se cubrieron con medio de montaje para fluorescencia DAKO (DAKO, Carpinteria, CA, USA) y se cubrieron con cubreobjetos. En la Fig.3 se muestra la línea temporal de la metodología experimental.

4.8. Estereología:

4.8.1. Microscopia confocal y estereología: Una vez obtenida la triple IF se evaluó el tejido por medio de microscopia confocal (Zeiss, LSM 5, Oberkochen, Alemania) y se analizaron las imágenes por medio del software LSM Image Browser. Se evaluaron 6 secciones seriadas (1 de cada 5) por sujeto (n=4 por grupo), separadas por un intervalo de 120 μ m entre cada corte y se tomaron 5 campos de cada giro dentado. Se obtuvieron reconstrucciones en el eje Z de cada uno de los 5 campos de los 6 cortes por sujeto. Se obtuvieron reconstrucciones, mediante un objetivo 40x de inmersión en aceite, de un grosor de 18-22 μ m, con un total de 8-11 cortes ópticos adquiridos a un intervalo de 1.8-2 μ m entre plano focal, en modo serial de adquisición confocal. Para cada reconstrucción se cuantificaba como una célula a aquel elemento que estuviera presente al menos en dos o más planos focales contiguos, es decir que tuviera un volumen mínimo de 4 μ m. El plano focal superior de cada reconstrucción se descartó para evitar sobreestimación. Se contabilizaron las siguientes poblaciones de células:

1. BrdU+ como reflejo de proliferación celular.
2. DCX+ como neuronas jóvenes.
3. BrdU+/DCX+ como nuevas neuronas jóvenes nacidas posterior al daño.
4. BrdU+/NeuN+ como nuevas neuronas en proceso de maduración.
5. DCX+/c-fos+ como neuronas jóvenes activas preexistentes.
6. NeuN+/c-fos+ como neuronas preexistentes activas.
7. BrdU+/NeuN+/c-fos+ como nuevas neuronas en maduración y activas y
8. BrdU+/DCX+/c-fos+ como nuevas neuronas jóvenes activas.

Cada población se multiplicó por 5 para obtener una estimación total. Esta estimación deriva de que entre cada sección analizada hay 4 cortes intermedios no analizados, como se explicó previamente, de tal manera que las cantidades totales de los cortes analizados se multiplican por 5 para obtener estimados de cada población.

4.8.2. Análisis volumétrico del giro dentado y la lesión: El volumen del GD se obtuvo a partir de las secciones teñidas con violeta de cresilo analizadas por el método estereológico de

Cavallieri (software Stereoinvestigator; MBF Bioscience, Inc., Williston, VT). Dicho análisis ayudó a obtener una medición del volumen del daño en la capa granular del giro dentado, así como de las células granulares que quedaron constituyéndolo, permitiéndonos analizar la reorganización de la estructura a través del tiempo posterior a la lesión. Se analizaron de 9 a 12 secciones por animal, separadas por 120 μ cada una. Para realizar el análisis se delineó el contorno de cada sección, el volumen de la capa granular de cada sujeto se obtuvo automáticamente por medio del software. Posteriormente se obtuvo el promedio del volumen por grupo en mm³ (sham n=8; 10dpl n=8 y 30dpl n=8), tanto del tamaño de la lesión como de la capa granular remanente. Los contornos se exportaron al software NeuroLucida (MBF Bioscience Inc., Williston, VT) y se generaron modelos visuales en 3D del GD conteniendo la zona de daño.

4.9. Análisis estadístico:

Para el análisis conductual de campo abierto, del condicionamiento de miedo al contexto y para los estimados estereológicos de las poblaciones celulares se empleó un ANOVA de dos vías seguido de una prueba *post hoc* Bonferroni. Para el análisis estadístico de los datos de estereología de cada población celular, se tomaron las sumatorias de los 5 campos de las 6 secciones y la sumatoria final se promedió entre los sujetos (n=4). El análisis estereológico de Cavallieri y la memoria de miedo al contexto se utilizó un ANOVA de una vía seguido de una prueba *post hoc* de Bonferroni. Todos los resultados se expresan como la media \pm error estándar.

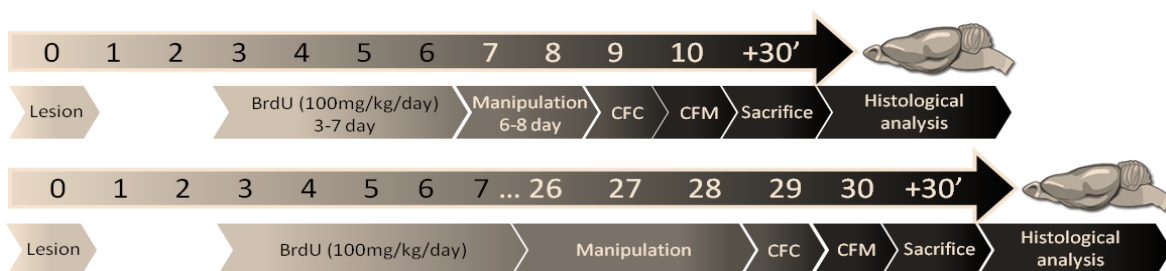


Fig. 3. Línea de tiempo de la aplicación de los protocolos experimentales. Se realizó una lesión con AK o una lesión sham al día cero, seguido de 5 días consecutivos de BrdU ip (100mg/kg/24h), posteriormente se realizó la manipulación de los sujetos y se aplicó el CMC y la MMC o la tarea control ESC. Treinta minutos después se extrajo el tejido cerebral para análisis estereológico, histológico e inmunohistoquímico.

5. RESULTADOS

5.1. Reestructuración morfológica del giro dentado en el tiempo

Con el objetivo de generar un daño que produjera un incremento en la neurogénesis de las ratas adultas y que nos permitiera evaluar el proceso de reorganización morfológica, se administró ácido kaínico (AK) directamente sobre el GD de los sujetos. Se infundió 0.25 μ l de AK a una concentración de 0.75nm/ μ l/0.75mM.

Como previamente pudimos observar (Zepeda *et al.*, 2013) la lesión dañó principalmente la capa suprapiramidal y el hilus, mientras que la lesión sham no generó ninguna alteración visible en la morfología del GD (Fig 4A). A los 10dpl la lesión se observó en el GD e hilus, el daño involucra una variedad de características morfológicas entre las que se encontró la interrupción a la capa granular (CG), es decir, la ausencia de células granulares, así mismo se observó, en algunas secciones, un adelgazamiento de la CG y picnosis tanto en la CG como en el hilus y en la capa molecular (CM) (Fig 4B). La ausencia de células granulares se observó en algunos sujetos extendida hasta la cresta y hacia la fracción más lateral del GD, al mismo tiempo que también pudo observarse a través del eje septo-temporal extendiéndose en este grupo en promedio de la coordenada AP -2.8 a -4.6 a partir de bregma (Fig 4E, panel izquierdo). Hacia los 30dpl, se observó una reducción de la lesión (Fig 4C) comparada con el grupo de 10dpl.

La lesión disminuyó de volumen, lo cual se constató mediante la realización de un modelado visual en 3D reconstruido en el software NeuroLucida (Fig 4A-C panel derecho: rojo: zona de lesión, verde: capa granular remanente), así como por medio de un análisis estereológico de Cavalieri (Fig 4D). Dicho análisis mostró una reducción significativa en el volumen del área lesionada comparando 10dpl vs 30dpl (ANOVA una vía: $F_{(1,14)}= 73.09$, $p\leq 0.001$), así como un incremento significativo en la CG remanente en la misma comparación de grupos (ANOVA una vía: $F_{(2,21)}= 9.765$, $p\leq 0.01$; Fig 2D). Más aún, al comparar los volúmenes de la CG remanente entre el grupo Sham y el de 30dpl no se hallaron diferencias estadísticamente significativas (ANOVA una vía: $F_{(2,21)}= 9.765$, $p>0.05$). De acuerdo a lo anterior también se observó una reducción en las coordenadas que abarcaba la lesión a los 30dpl de -3.4 a -3.9 a partir de Bregma en el eje AP (Fig 4E panel derecho).

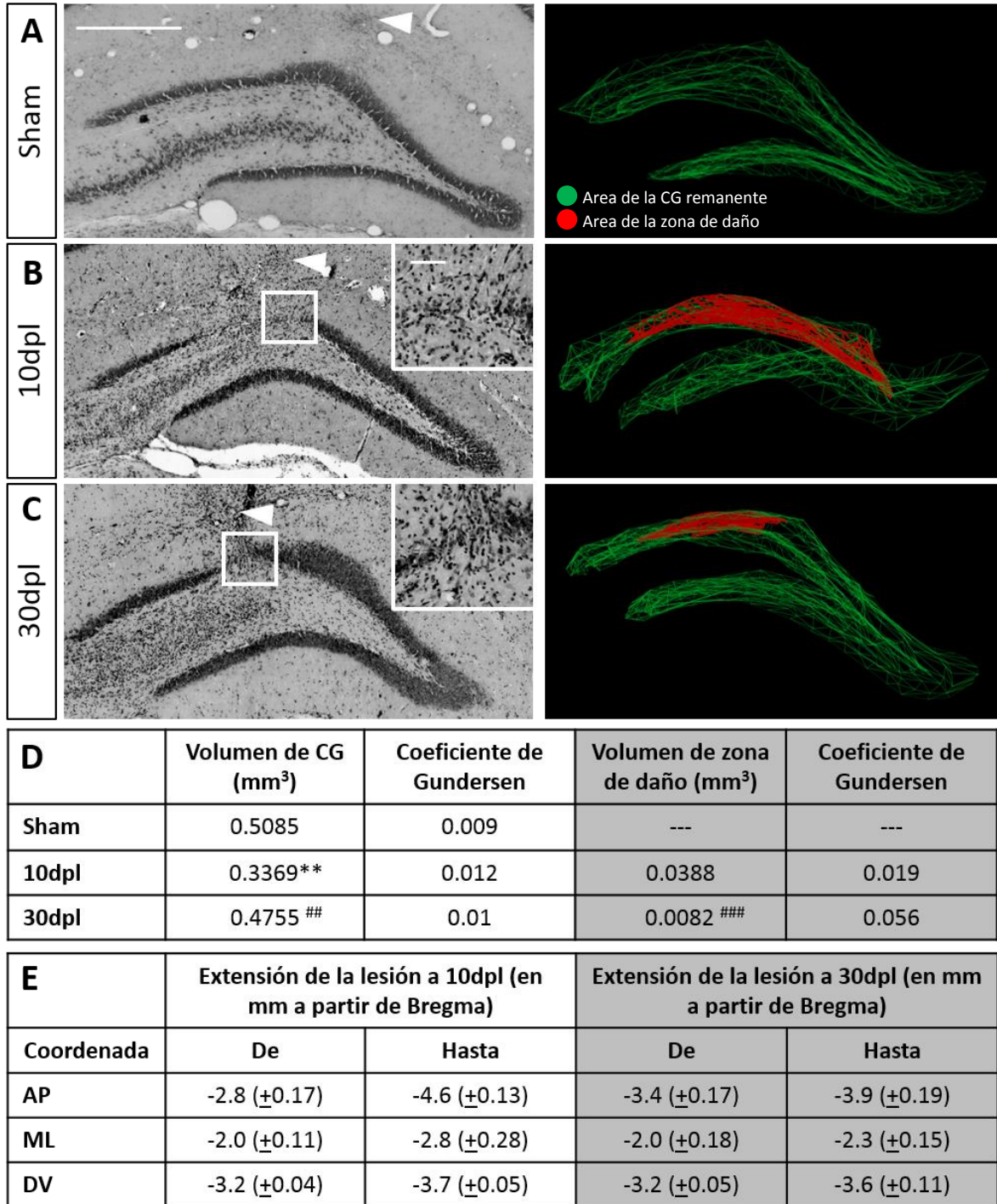


Fig. 4. Restablecimiento anatómico de la capa granular del giro dentado después de daño. La columna de la izquierda muestra imágenes representativas del GD de animales A) sham, B) 10dpl y C) 30dpl. En los recuadros blancos se observa la región de daño que corresponde a magnificaciones a 40X. Las flechas blancas indican el tracto de la cánula de infusión del AK. Escala 400µm y 60µm para las magnificaciones. En la columna de la derecha se muestran reconstrucciones visuales en 3D del GD de sujetos representativos de cada grupo, en verde se muestra la CG y en rojo la región de lesión desprovista de células. D) muestra el promedio del coeficiente de Gundersen y del volumen de la CG y de la región de daño obtenidos por medio de Cavalieri (sham (n = 8), 10dpl (n = 8) y 30dpl (n = 8)). E) muestra el promedio de la extensión del daño en coordenadas

a partir de Bregma en los ejes AP, ML y DV. ANOVA-una vía, *post hoc* Bonferroni. Volumen de la CG: 10dpl vs sham ** $p < 0.01$; 10 vs 30dpl ## $p < 0.01$. Sitio de lesión: 30 vs 10dpl ### $p < 0.001$.

A los resultados anteriores se suman unos previamente publicados (Zepeda *et al.*, 2013, Anexo 2) donde se observaron las mismas modificaciones en cuanto al volumen de la capa granular remanente a los 10 y 30dpl. En el trabajo referido se evaluó también el volumen de la capa granular a los 60dpl por medio de un análisis de Cavallieri. El volumen de la capa granular de los sujetos de esta ventana temporal resulta significativamente mayor al de 10dpl (ANOVA una vía: $F_{(3,15)} = 11.232$, $p < 0.01$), lo cual apoya la reestructuración del GD en el tiempo como un proceso que se mantiene.

Una evaluación de la macro estructura del GD por medio de NeuN y GFAP reveló que la capa granular (CG), completamente intacta en el grupo Sham (Fig 5A, panel izquierdo) efectivamente se encontraba desprovista de neuronas granulares a los 10dpl y que esta área se redujo en los sujetos de 30dpl (Fig 5B, C panel izquierdo). De forma interesante, mientras que en los sujetos sham la glía marcada por medio de GFAP mostraba una morfología y localización regular (Fig 5A, panel derecho), a los 10dpl ésta se localizó internalizada en la región desprovista de células NeuN+ y cruzando la capa granular, exhibiendo una marca característica de glía reactiva (Fig 5B, panel derecho), sin embargo en el GD de sujetos de 30dpl, la glía aunque se observaba reactiva en el hilus, no se encontraba internalizada en la CG (Fig 5C, panel derecho).

Estos datos en conjunto mostraron que la morfología del GD adulto se restablece a través del tiempo después de inducir un daño excitotóxico focal, reduciendo el área desprovista de neuronas granulares NeuN+ en la CG. Este restablecimiento morfológico ocurre a pesar de la presencia incrementada de glía reactiva, la cual también parece que disminuye conforme la reestructuración tiene lugar.

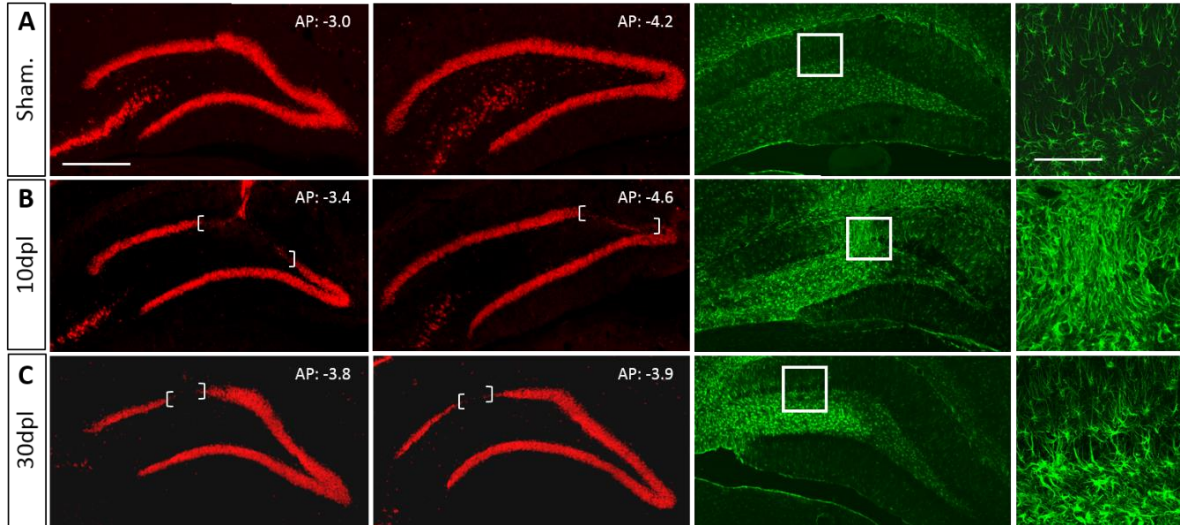


Fig. 5. Reorganización estructural dependiente del tiempo y activación glial en el GD lesionado. Imágenes representativas del GD mostrando células NeuN+ (rojo, panel izquierdo y medio-izquierdo) y células GFAP+ (verde, panel derecho y derecho-medio) de sujetos A) Sham, B) 10dpl y c) 30dpl. La lesión se muestra dentro de corchetes en las imágenes que muestran neuronas NeuN+. La columna derecha muestra magnificaciones del sitio de lesión señalado en el recuadro blanco de la columna media-derecha.

5.2. Modulación del proceso neurogénico en el tiempo en respuesta a daño al daño

Previamente (Zepeda et al 2013) habíamos realizado un análisis de diferentes marcadores histológicos después de daño. En el observamos un incremento en algunos marcadores, entre ellos DCX (indicador de neuronas jóvenes o inmaduras), PCNA (proteína propia de células en proliferación), BLBP (proteína propia de precursores neurales) y Calretinina (CR, proteína de unión a calcio de células que acaba de salir de ciclo celular). A las 24 horas de inducir el daño habíamos observado un aumento en células DCX+ en ambos hemisferios del animal, siendo ligeramente mayor el número en el lado ipsilateral de la lesión en comparación al lado contralateral, sin embargo el incremento máximo se observó hacia los 10dpl. Varias de estas células se encontraban en forma de nidos delineando secciones de la capa subgranular. A los 60dpl se observó un decremento en células positivas a este marcador. Las células CR+ que observamos fueron visibles desde las 24 horas después del daño en el lado ipsilateral y a 10dpl y 60dpl incrementaron también en el lado contralateral. También observamos incrementos en el número de células PCNA+ y BLBP+ que nos hablarían de marcadores de proliferación y de glía radial respectivamente. El mayor incremento se observó de nuevo a los 10dpl y en el lado ipsilateral al daño, sin embargo cabe destacar que a las 24 horas de inducido el daño se observó un incremento en el

número de células que proliferaron identificadas con PCNA. Si bien observamos estos incrementos en marcadores endógenos de proliferación, en neuronas jóvenes y postmitóticas, no se realizó un análisis sistemático que nos permitiera saber si estas poblaciones se habían generado a partir de la lesión, ni tampoco nos fue posible identificar algún elemento, a nivel de las poblaciones celulares evaluadas, que pudiéramos correlacionar con nuestros resultados conductuales.

Por ello, en el trabajo principal de esta tesis lo que hicimos fue introducir el marcado con BrdU para poder identificar nuevas poblaciones generadas a partir del daño y detectar también, por medio de otros marcadores, su linaje, su nivel de maduración y su estado de activación. Esto nos permitió relacionar la activación de nuevas neuronas maduras en estado de activación generadas después del daño al GD, con la reinstalación de la función de la estructura dañada, tanto a nivel conductual como sináptico. Después de observar el restablecimiento morfológico del GD de 10 a 30dpl, nos preguntamos si también la respuesta neurogénica estaba modulándose en respuesta al daño, de tal manera que su regulación correlacionara con la reorganización del GD. Contemplamos evaluar el proceso neurogénico comenzando por la proliferación celular y culminando el análisis con la activación de nuevas neuronas maduras. Todos los resultados analizados del proceso neurogénico en esta sección corresponden a individuos que se sometieron a la evocación de la MMC, a menos que se indique lo contrario.

5.2.1. La proliferación celular incrementa después de daño y se mantiene en el tiempo

La proliferación celular, identificada mediante el análogo de timidina BrdU, fue mayor en los grupos de sujetos lesionados, tanto de 10 como de 30dpl y en GD e hilus, en comparación a ambos grupos con cirugía Sham (Fig. 6 panel izquierdo; ANOVA dos vías: $F_{(3,12)}= 31.09$, $p \leq 0.001$ para 10dsh vs 10dpl en CG, 10dsh vs 10dpl en hilus y 30dsh vs 30dpl en hilus; $p \leq 0.01$ para 30dsh vs 30dpl en CG). Sin embargo se observó que la cantidad de nuevas células BrdU+ nacidas después del daño no disminuyó significativamente con el tiempo (ANOVA dos vías: $F_{(3,12)}= 31.09$, $p > 0.05$ para 10dsh vs 30dsh y para 10dpl vs 30dpl) y se mantuvo en niveles similares de 10 a 30dpl, así como de 10 a 30dsh. Así entonces, la

proliferación celular se mantuvo constante, tanto en condiciones de daño como en condiciones fisiológicas, y a través del tiempo.

5.2.2. *Él número de neuronas jóvenes incrementa después de daño y decrementa en el tiempo*

Otra población que evaluamos fue la de neuronas jóvenes, para lo cual empleamos el marcador de DCX. En esta fracción se contabilizaron aquellas neuronas jóvenes DCX+ que sólo mostraron ese marcador y ningún otro. Esta población corresponde a las neuronas jóvenes preexistentes al daño, pues no mostraban BrdU incorporado a su núcleo. Lo que observamos al estudiar esta población fue que no existían diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, tanto en la CG como en el hilus (Fig. 6 panel derecho, ANOVA dos vías: $F_{(3,12)} = 0.4740$, $p = 0.7032$), mostrando, como era de esperarse, que la generación de neuronas jóvenes no cambia si estas son generadas previo a daño y que su tasa de generación se mantiene relativamente constante en el tiempo.

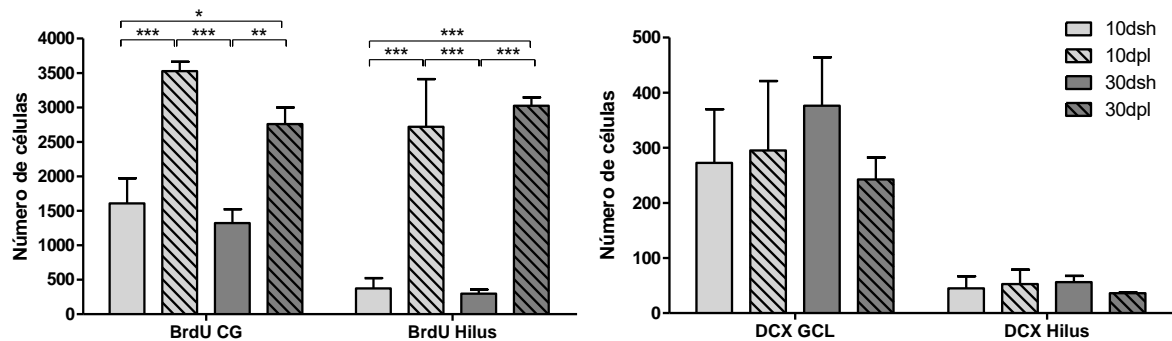


Fig. 6. Proliferación de nuevas células y neuronas inmaduras en el GD lesionado. Estimados estereológicos del número de células BrdU+ (panel izquierdo) y DCX+ (panel derecho) para los grupos sham ($n = 4$ para 10dsh y $n = 4$ para 30dsh) y lesión ($n = 4$ para 10dpl y $n = 4$ para 30dpl). * $p < 0.05$ y *** $p < 0.001$ ANOVA dos-vías seguido de una prueba *post hoc* Bonferroni.

5.2.3. *Modulación de la respuesta neurogénica en el tiempo posterior al daño*

Posteriormente nos preguntamos si una fracción de las células que habían proliferado eran neuronas nuevas jóvenes (BrdU+/DCX+) y si su desarrollo ocurría de forma regular aún después del daño. Observamos un incremento significativo a los 10dpl comparado con su grupo sham (Fig 7A). Algunas de las nuevas neuronas jóvenes BrdU+/DCX+ tenían procesos prolongados y complejos, desorganizados, con morfología aberrante e incluso horizontal (Fig 7B). A los 30dpl aún observamos algunas células BrdU+/DCX+ pero en este caso su

morfología era similar a la del grupo control (Fig 7C, D), mostrando de manera general que la morfología y organización de las células regresa a la normalidad con el tiempo.

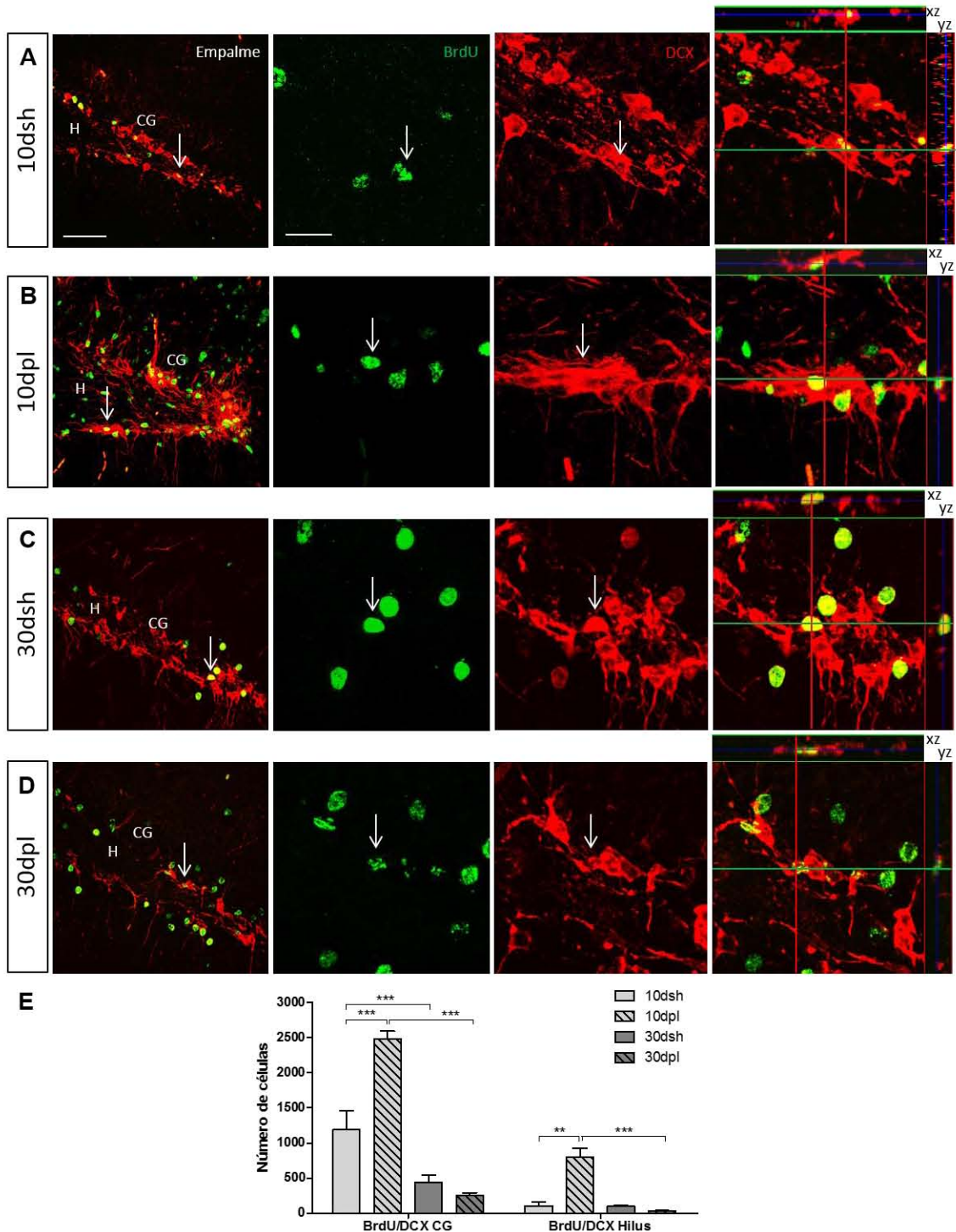


Fig. 7. El número de nuevas neuronas jóvenes en el GD lesionado cambia en el tiempo. Imágenes representativas de inmunofluorescencias para células BrdU (verde, columna izquierda-media) y DCX (rojo, columna derecha media) en secciones coronales del GD de animales A) 10dsh, B) 10dpl, C) 30dsh y D) 30dpl.

Las flechas blancas indican una célula que co-localiza para ambos marcadores (columna izquierda). La columna de la derecha muestra la co-localización de ambos marcadores en el eje z. E) Estimados estereológicos del número de células con doble marca BrdU+/DCX+ para los grupos sham (n = 4 para 10dsh y n = 4 para 30dsh) y lesión (n = 4 para 10dpl y n = 4 para 30dpl). **p<0.01 y ***p<0.001 ANOVA dos-vías seguido de una prueba *post hoc* Bonferroni. Escala: 100µm para las reconstrucciones en z stack y 20µm para las imágenes de los canales separados y los ortogonales.

Cuantitativamente el incremento en esta población fue de 2 veces mayor a los 10dpl en comparación al grupo 10dsh (ANOVA dos vías: $F_{(3,12)}= 15.91$, $p<0.001$), sin embargo esta respuesta disminuye con el tiempo, de tal forma que a los 30dpl los niveles de BrdU+/DCX+ bajan más allá de lo mostrado en el grupo control de 10dsh (ANOVA dos vías: $F_{(3,12)}= 15.91$, $p<0.001$). En el hilus la tendencia fue similar, siendo mayor el incremento solo en el grupo de 10dpl y regresando a niveles bajos a 30dpl (Fig 7E; ANOVA dos vías: $F_{(3,12)}= 15.91$, $p<0.001$). Estos resultados nos sugirieron que las células a los 30 días posteriores al daño ya no son DCX+, debido quizá a su proceso de maduración normal.

5.2.4. *Sobrevivencia de las nuevas neuronas después de daño*

Un punto importante en el campo de la neurogénesis que ocurre después de daño es si las nuevas neuronas son capaces de sobrevivir en la estructura dañada y contribuir a la recuperación estructural y funcional. Observamos que las nuevas neuronas eran capaces de sobrevivir tanto en el GD como en regiones ectópicas como el hilus (Fig 8A-D). A los 10dpl el número de nuevas neuronas maduras BrdU+/NeuN+ sobrepasa (3.5 veces más) significativamente lo cuantificado en el grupo control 10dsh (Fig 8E; ANOVA dos vías: $F_{(3,12)}= 51.9$, $p<0.01$) y estas células se hallan mayormente en la zona subgranular. Para los 30dpl el número es 4.3 veces mayor que lo encontrado a 10dpl, y 2.7 veces más que en su grupo control de 30dsh (ANOVA: $F_{(3,12)}= 51.9$, $p<0.001$). Estos resultados pueden reflejar un proceso de maduración regular de los 10 a los 30 días después del daño. Cabe destacar que a los 30dpl varias células BrdU+/NeuN+ se localizaban internalizadas en la CG, lo cual responde a su patrón de migración normal.

5.2.5. *Activación de las nuevas neuronas generadas después de daño en respuesta a la evocación de la memoria dependiente de GD*

Posteriormente evaluamos la presencia de c-fos en las poblaciones de nuevas neuronas jóvenes y maduras para analizar si era posible que las nuevas neuronas, generadas después

de daño, se activaran en respuesta a la evocación de la memoria asociada al GD y correlacionar así con los resultados conductuales descritos más adelante. Como se explicó anteriormente los animales fueron sometidos a un paradigma de CMC y MMC y 30 minutos después de la evocación se sacrificaron y se extrajo el tejido cerebral.

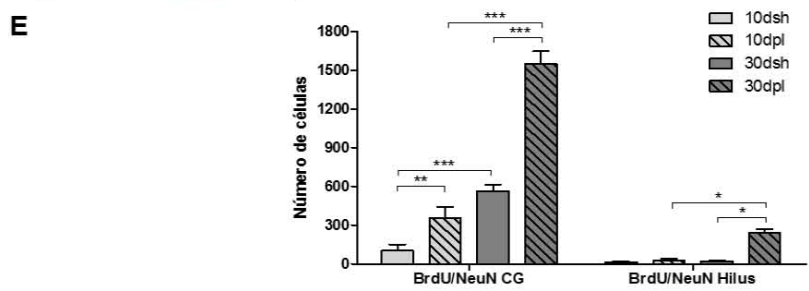
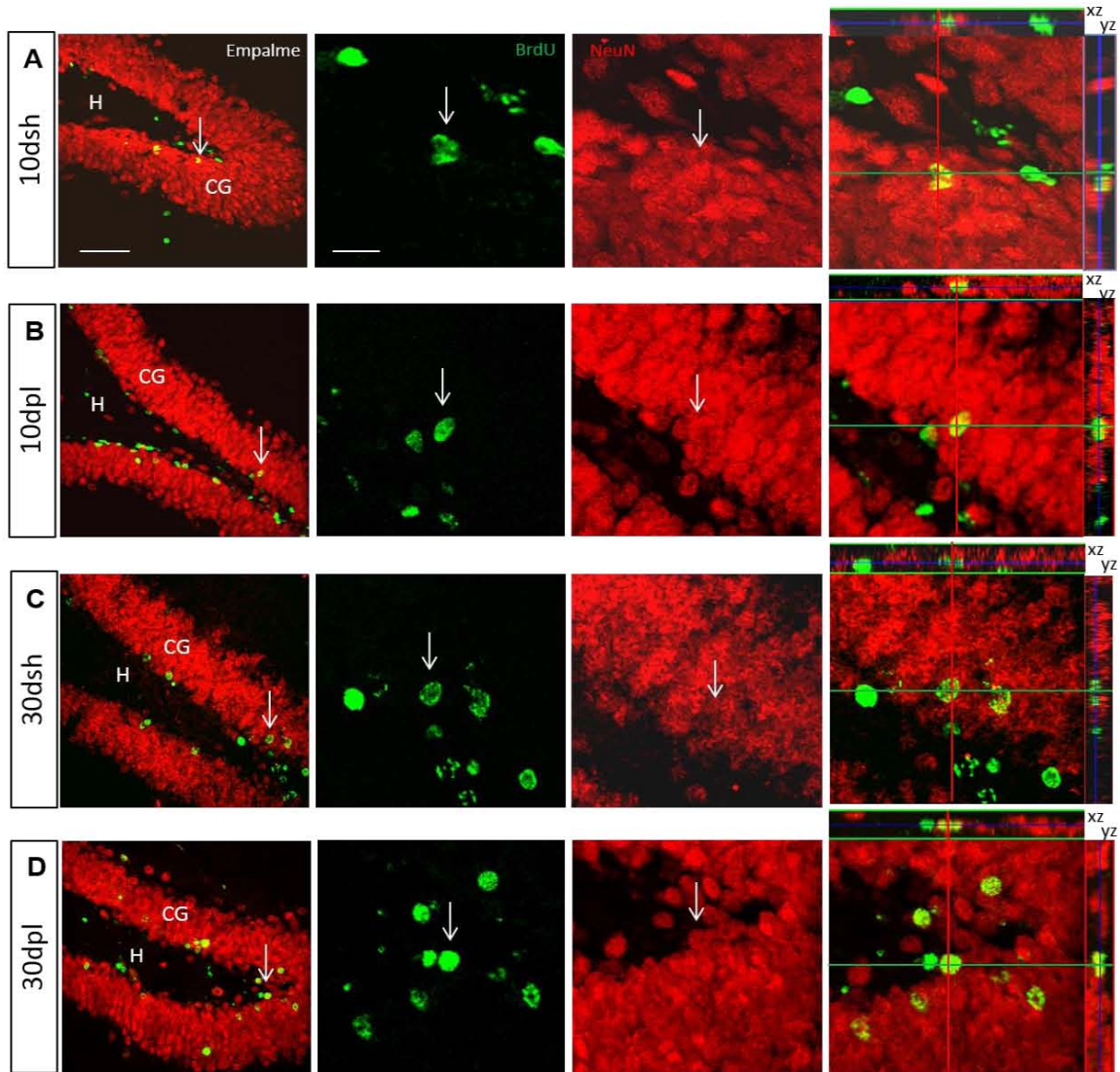


Fig. 8. El número de nuevas neuronas BrdU+/NeuN+ en el GD lesionado cambia en el tiempo. Imágenes representativas de inmunofluorescencias para células BrdU (verde, columna izquierda-media) y NeuN (rojo, columna derecha media) en secciones coronales del GD de animales A) 10dsh, B) 10dpl, C) 30dsh y D) 30dpl. Las flechas blancas indican una célula que co-localiza para ambos marcadores (columna izquierda). La columna de la derecha muestra la co-localización de ambos marcadores en el eje z. E) Estimados estereológicos del número de células con doble marca BrdU+/NeuN+ para los grupos sham (n = 4 para 10dsh y n = 4 para 30dsh) y lesión (n = 4 para 10dpl y n = 4 para 30dpl). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ ANOVA dos-vías seguido de una prueba *post hoc* Bonferroni. Escala: 100 μ m para las reconstrucciones en z stack y 20 μ m para las imágenes de los canales separados y los ortogonales.

Primero se evaluó la cantidad de nuevas neuronas jóvenes activadas (BrdU+/DCX+/c-fos+) y observamos que después del daño hubo un incremento de 2.4 veces en número en comparación con el grupo control 10dsh, indicando un incremento significativo en las nuevas neuronas jóvenes que pudieron activarse después del daño (Fig 9A, B y E; ANOVA dos vías: $F_{(3,12)} = 27.51$, $p < 0.001$), lo mismo se observó en el hilus (ANOVA dos vías: $F_{(3,12)} = 27.51$, $p < 0.01$).

A los 30dpl aun pudimos observar algunas células triplemente marcadas, su morfología de nuevo era muy similar al grupo control, sugiriendo una reorganización morfológica a nivel celular (Fig 9C-D), sin embargo el número disminuyó significativamente comparado con 10dpl tanto en la CG (ANOVA dos vías: $F_{(3,12)} = 27.51$, $p < 0.001$) como en el hilus (ANOVA dos vías: $F_{(3,12)} = 27.51$, $p < 0.01$).

También realizamos este análisis en la población de nuevas neuronas maduras NeuN+. El número de nuevas neuronas maduras activas (BrdU+/NeuN+/c-fos+) fue mayor en el grupo 10dpl en comparación al grupo de 10dsh (Fig 10A, B y E). A los 30dpl observamos un incremento del 222% y del 65% en comparación con 30dsh (ANOVA dos vías: $F_{(3,12)} = 9.576$, $p < 0.001$) y 10dpl (ANOVA dos vías: $F_{(3,12)} = 9.576$, $p < 0.001$) respectivamente (Fig 10C-E). Cabe señalar que la activación se observó en ambas ventanas temporales exclusivamente en la CG, no así en el hilus en donde no existieron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (ANOVA dos vías: $F_{(3,12)} = 9.576$, $p > 0.05$), sugiriendo que la activación se debe a la evocación, por el carácter región-dependiente observado. Estos resultados sugieren que un número mayor de células se activa ante la evocación en los grupos lesionados y que además esta cantidad incrementa con el tiempo, siendo mayor a los 30dpl que a los 10dpl. Algunas de estas células se presentaron ya insertadas en la CG (Fig 10D).

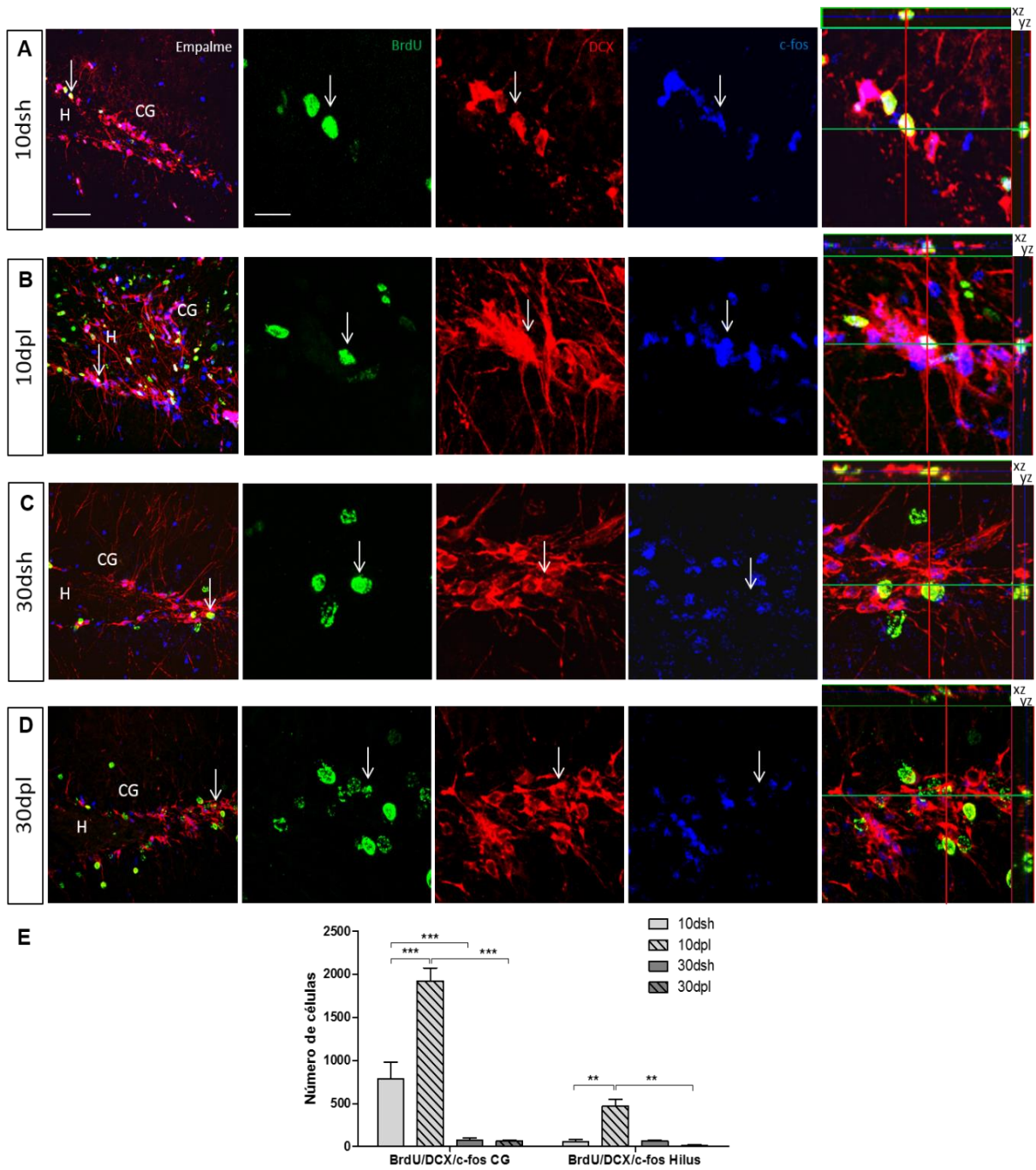


Fig. 9. Activación de nuevas neuronas jóvenes en el GD lesionado en el tiempo. Imágenes representativas de inmunofluorescencias para células BrdU (verde, columna izquierda-media), DCX (rojo, columna media) y c-fos (azul, columna derecha media) en secciones coronales del GD de animales A) 10dsh, B) 10dpl, C) 30dsh y D) 30dpl. Las flechas blancas indican una célula que co-localiza para ambos marcadores (columna izquierda). La columna de la derecha muestra la co-localización de los tres marcadores en el eje z. E) Estimados estereológicos del número de células con triple marca BrdU+/DCX+/c-fos+ para los grupos sham (n = 4 para 10dsh y n = 4 para 30dsh) y lesión (n = 4 para 10dpl y n = 4 para 30dpl). **p<0.01 y ***p<0.001 ANOVA dosis seguido de una prueba *post hoc* Bonferroni. Escala: 100µm para las reconstrucciones en z stack y 20µm para las imágenes de los canales separados y los ortogonales.

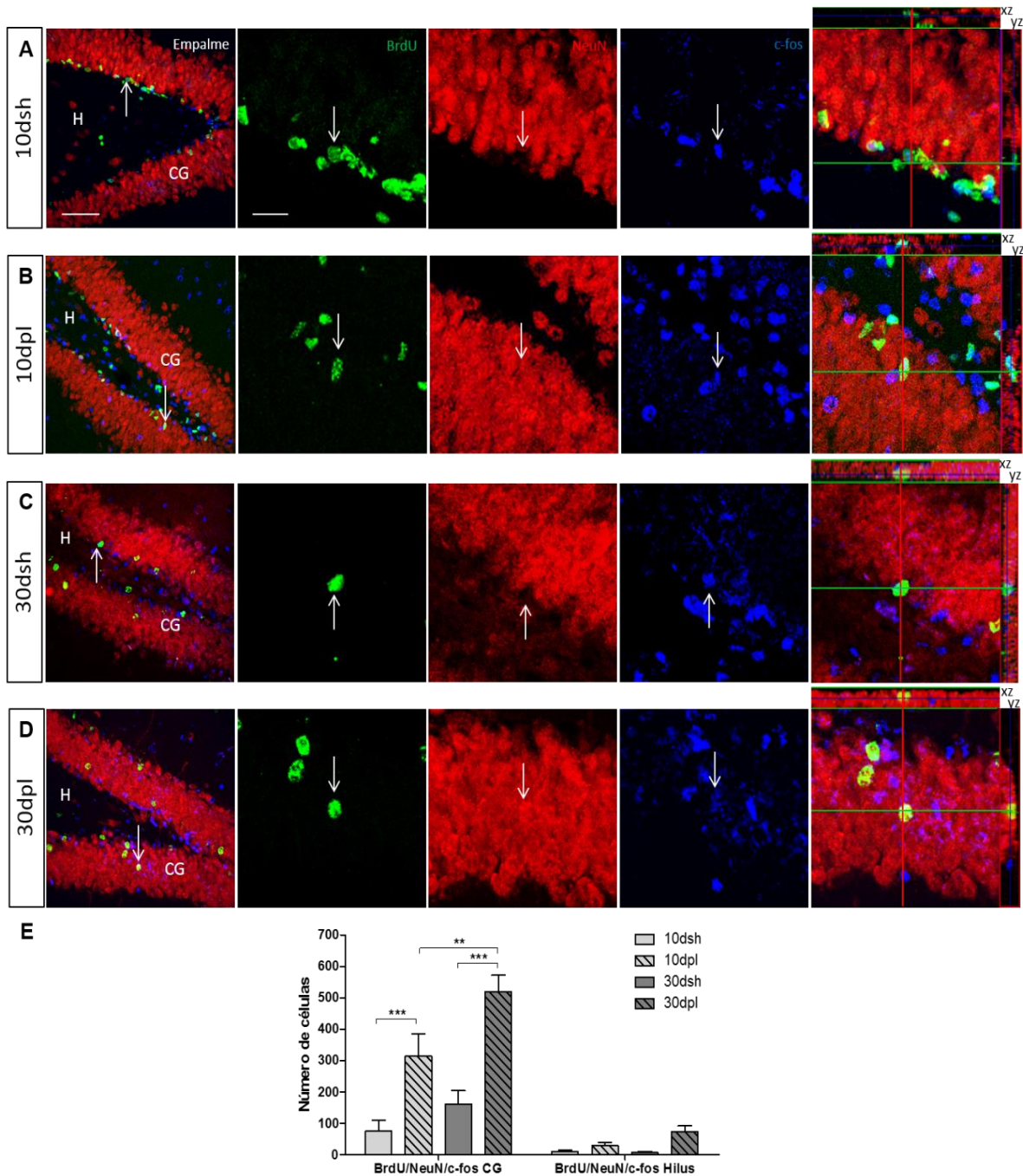


Fig. 10. La activación de nuevas neuronas NeuN+ en el GD lesionado incrementa en el tiempo. Imágenes representativas de inmunofluorescencias para células BrdU (verde, columna izquierda-media), NeuN (rojo, columna media) y c-fos (azul, columna derecha media) en secciones coronales del GD de animales A) 10dsh, B) 10dpl, C) 30dsh y D) 30dpl. Las flechas blancas indican una célula que co-localiza para los tres marcadores (columna izquierda). La columna de la derecha muestra la co-localización de los tres marcadores en el eje z. E) Estimados estereológicos del número de células con triple marca BrdU+/NeuN+/c-fos+ para los grupos sham (n = 4 para 10dsh y n = 4 para 30dsh) y lesión (n = 4 para 10dpl y n = 4 para 30dpl). **p<0.01 y ***p<0.001 ANOVA dos-vías seguido de una prueba *post hoc* Bonferroni. Escala: 100µm para las reconstrucciones en z stack y 20µm para las imágenes de los canales separados y los ortogonales.

5.2.6. Activación de neuronas jóvenes y maduras preexistentes

De la misma forma que se evaluó la población de nuevas neuronas jóvenes y maduras que se activaron por la evocación después de daño, también evaluamos la población de neuronas jóvenes DCX+ y maduras NeuN+ preexistente activadas.

En proporción podemos observar que la cantidad de neuronas preexistentes jóvenes DCX+ que se logran activar, es constante en el tiempo y es independiente de la lesión, lo cual sugiere que la activación de una neurona inmadura nacida antes de la lesión no se modifica. En el hilus tampoco presenta diferencias estadísticamente significativas (Fig. 11 panel izquierdo; ANOVA dos vía: $F_{(3,12)} = 6.663$, $p > 0.05$).

La tendencia en las neuronas maduras activas preexistentes NeuN+/c-fos+ fue diferente, siendo mayor a los 30dpl en comparación con el resto de los grupos (Fig. 11 panel derecho; ANOVA dos vía: $F_{(3,12)} = 9.363$, $p < 0.0001$) sugiriendo que la capacidad de activación de las neuronas maduras NeuN+ incrementa con el tiempo posterior al daño, no así en condiciones fisiológicas o sham, en donde el tiempo no parece ser una variable que afecte la tasa de activación de las neuronas maduras.

De manera semejante, anteriormente hemos evaluado en el tiempo la activación de neuronas maduras preexistentes después de daño hipocampal. Analizando los niveles de ARNm de sinaptofisina, una proteína propia de vesículas presinápticas (Syp) y de Arc, así como el contenido proteico y el número de células NeuN+ que expresan Arc encontramos una tendencia similar ante una tarea de exploración espacial hacia los 30dpl, es decir, un incremento en los niveles proteicos de Syp y Arc (ANOVA una vía, $p < 0.05$), así como un mayor número de células NeuN+/Arc+ a los 30dpl (ANOVA una vía, $p < 0.001$), lo cual corrobora nuestros resultados sobre la capacidad de activación de neuronas maduras preexistentes a 30 días después de generado un daño (Aguilar-Arredondo *et al.*, 2017). Estos resultados se encuentran detallados en el Anexo 4 de esta tesis.

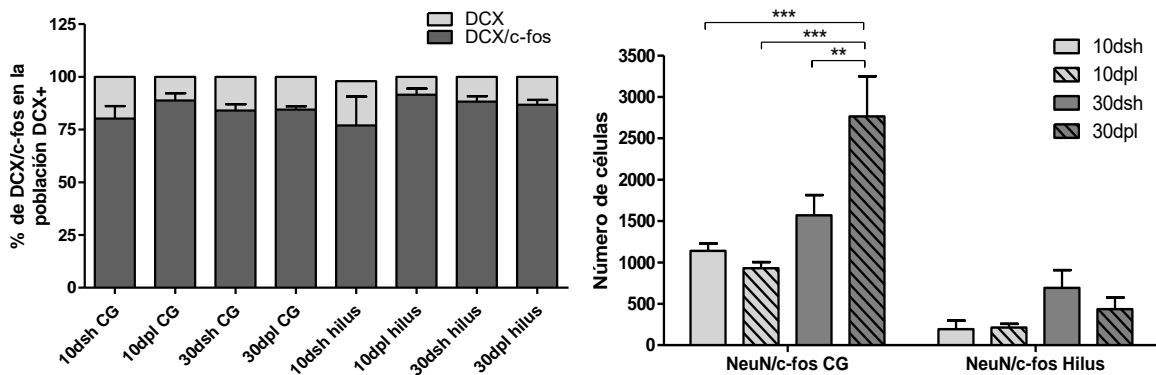


Fig. 11. Las neuronas preexistentes jóvenes se activan en proporción similar en el tiempo, mientras que las preexistentes NeuN+ activas incrementan en el tiempo. Estimados estereológicos del número de células c-fos+ (panel izquierdo) y BrdU+/c-fos+ (panel derecho) para los grupos sham (n = 4 para 10dsh y n = 4 para 30dsh) y lesión (n = 4 para 10dpl y n = 4 para 30dpl). **p<0.01 y ***p<0.001 ANOVA dos-vías seguido de una prueba *post hoc* Bonferroni.

5.2.7. La activación de las nuevas neuronas es dependiente de la evocación de la memoria

Para analizar si la activación que observamos en neuronas nuevas maduras BrdU+/NeuN+ se debía a una activación basal o si estaba asociada al evento de evocación de la memoria y por tanto al funcionamiento y reclutamiento de las nuevas neuronas por el GD, empleamos 1 grupo de animales independiente que fue evaluado en una tarea de exploración espacial sin condicionamiento (ESC). Este grupo de animales se introdujo de manera individual a la cámara de condicionamiento y se le dejó explorar libremente durante toda la sesión (12 minutos) sin administrarle ningún tipo de estímulo extra al contexto de la cámara. 24 h después se reintrodujo en el mismo contexto y exploró por 5 minutos. Comparamos el número de neuronas c-fos+ en la población de nuevas neuronas BrdU+/NeuN+ y lo comparamos contra los resultados observados en la misma población del grupo de animales sometido a CMC y a MMC a los 30dpl (Fig 12A-E). Observamos que el número de células triple marcadas era aproximadamente 6 veces mayor en el grupo 30dpl expuesto al protocolo de CMC (+C) en comparación al grupo 30dpl de exploración sin condicionamiento (ESC) sometido a solo la exploración (Fig 12D y E; ANOVA dos vías; $F_{(2,9)} = 23.7$, $p < 0.001$), sugiriendo que las nuevas neuronas que sobrevivieron 30dpl se activan en respuesta a una tarea modulada por el GD.

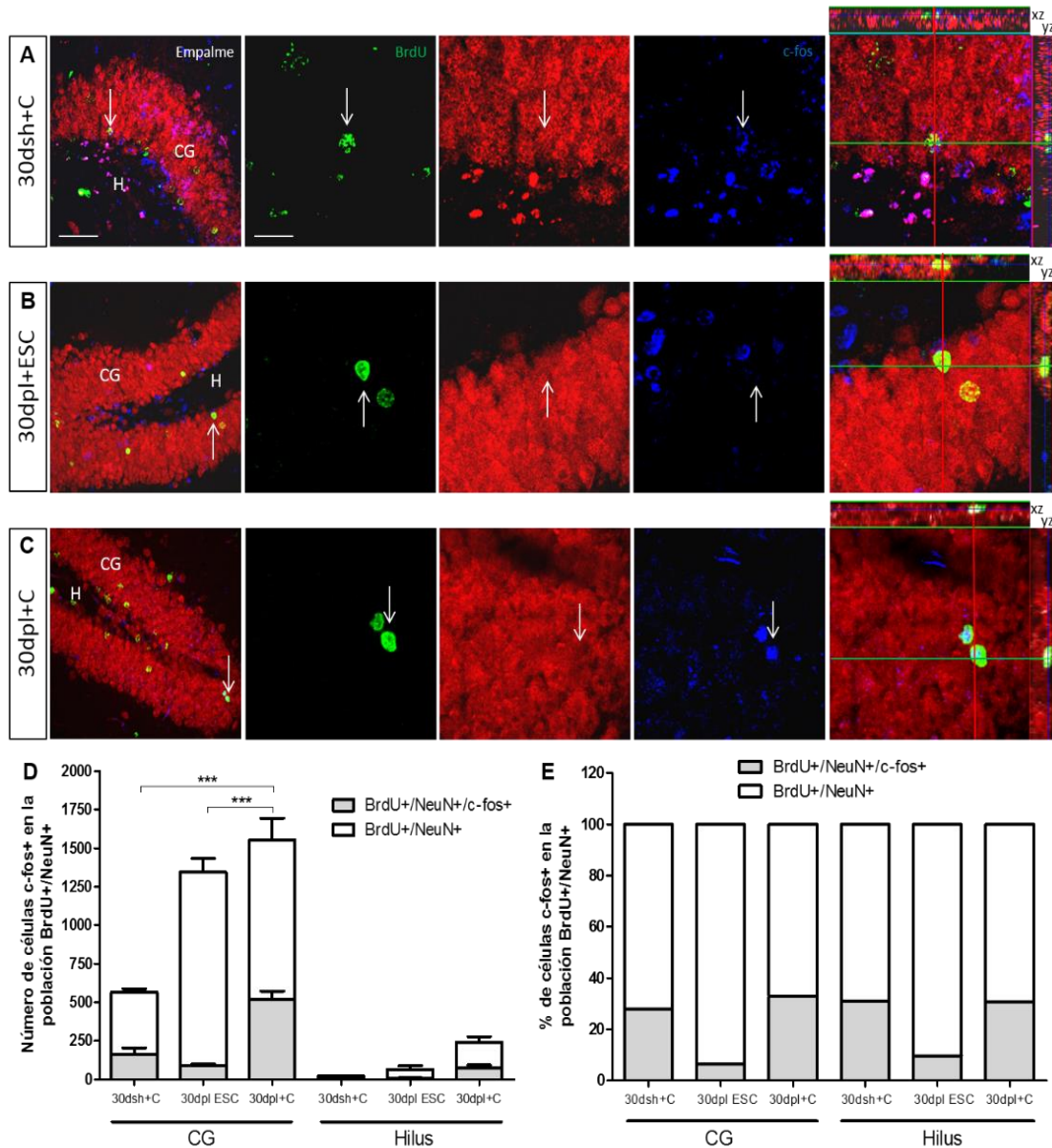


Fig. 12. Las nuevas neuronas NeuN+ nacidas después de daño se activan en respuesta a la evocación de la memoria. Imágenes representativas de inmunofluorescencias para células BrdU (verde, columna izquierda-media), NeuN (rojo, columna media) y c-fos (azul, columna derecha media) en secciones coronales del GD de animales A) 30dsh con condicionamiento “+C”, B) 30dpi con exploración “ESC” y C) 30dpi con condicionamiento “+C”. Observamos que existe un número mayor de células triple marcadas se observan en la CG pero no en el hilus. Las flechas blancas indican la misma célula desplegada en los tres canales por separado (columna izquierda). La columna de la derecha muestra la co-localización de los marcadores en el eje z. E) Estimados estereológicos del número y la proporción de células con triple marca BrdU+/NeuN+/c-fos+ dentro de la población de neuronas nuevas BrdU+/NeuN+ en los grupos condicionados “+C” y de exploración sin condicionamiento “ESC” (n = 4 para todos los grupos). ***p<0.001 ANOVA dos-vias seguido de una prueba *post hoc* Bonferroni. Escala: 100µm para las reconstrucciones en z stack y 20µm para las imágenes de los canales separados y los ortogonales.

5.3. Recuperación de la función cognitiva en el tiempo y después de daño al GD adulto

Analizamos el desempeño de los animales en el CMC a diferentes ventanas de tiempo después del daño para correlacionar el impacto que podía tener la activación de nuevas neuronas sobre la recuperación cognitiva.

5.3.1. La lesión no genera déficits motores ni alteraciones en la ansiedad

Primero se analizó el desempeño en la tarea de campo abierto, para asegurar que la inmovilidad observada no fuera producto de un déficit motor o de estados de ansiedad. En esta tarea no observamos diferencias estadísticas entre los grupos intacto, sham, 10dpl y 30dpl (Fig 13A; ANOVA dos vías: $F_{(4,66)} = 0.4869$, $p=0.9072$) ni en el número de cruces por la periferia de la arena, ni en el centro de la misma, indicando que los animales no desplegaron ninguna deficiencia motora ni tampoco ningún comportamiento de ansiedad que pudiera impactar sobre su desempeño en el CMC y en la MMC.

5.3.2. La lesión no produce déficits en el aprendizaje del miedo al contexto

Posteriormente se realizó el CMC donde se observó que todos los animales eran capaces de aprender. La curva de aprendizaje incrementó conforme los ensayos sucedían en la sesión de condicionamiento, tanto en los animales lesionados de 10dpl y de 30dpl, como en los de cirugía sham y en los intactos, y en comparación al desempeño del grupo control de ESC (Fig 13B; ANOVA dos vías: $F_{(4,66)} = 12.61$, $p<0.001$). El porcentaje de inmovilidad del grupo ESC fue bajo, de 12% aproximadamente a lo largo de toda la sesión, en comparación a los demás grupos cuya curva de aprendizaje reflejaba un incremento en la inmovilidad cada vez mayor. Desde el primer ensayo los porcentajes de inmovilidad de todos los grupos comparados con el grupo ESC fueron estadísticamente diferentes (ANOVA dos vías: $F_{(4,66)} = 12.61$, $p<0.05$) y se mantuvieron en incremento el resto de la sesión.

De manera similar la tarea de reconocimiento de lugar, tarea de tipo espacial vinculada con el funcionamiento del hipocampo, no se vio afectada por el daño ocasionado, ni en la fase de adquisición, ni de evocación, siendo los sujetos capaces de identificar el objeto en la locación novedosa (Zepeda *et al.*, 2013).

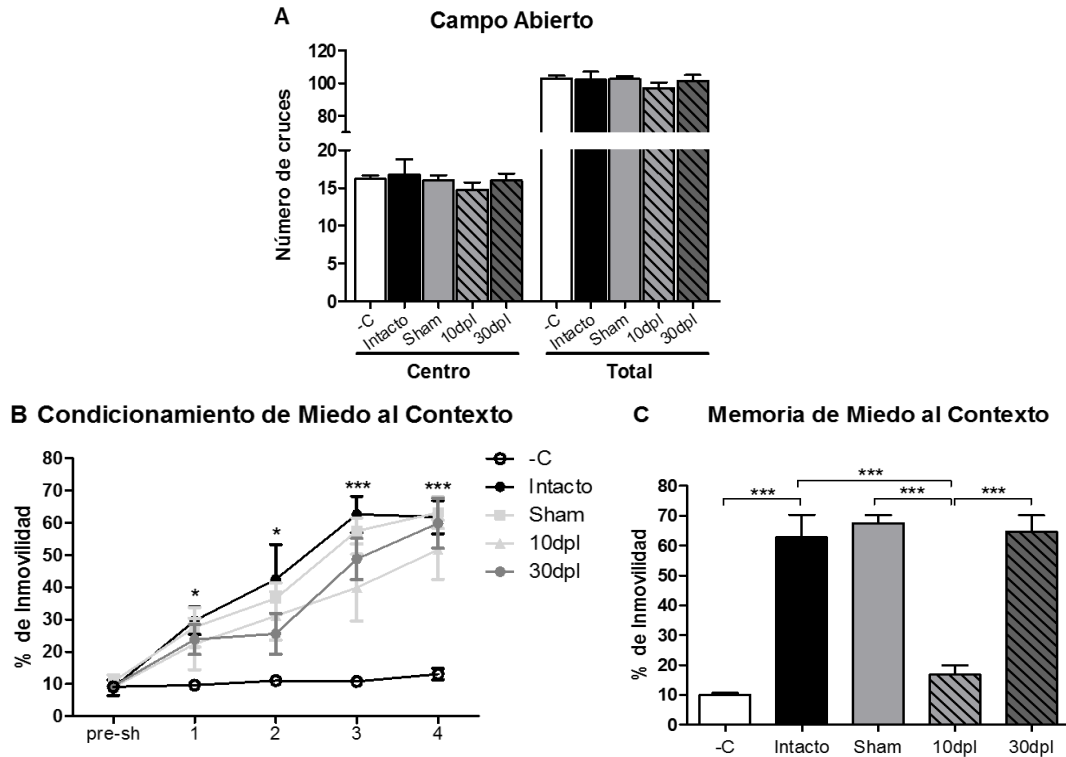


Fig. 13. La memoria de miedo al contexto se restablece en el tiempo después del daño al GD. A) La ejecución en la tarea de campo abierto no muestra diferencias entre los grupos. La cantidad de cruces centrales y totales, asociados con la conducta ansiosa y la habilidad motriz, no difiere entre los grupos ($p > 0.05$ ANOVA de dos vías seguido de una prueba *post hoc* Bonferroni). B) Curva de aprendizaje del condicionamiento de miedo al contexto (CMC). Todos los grupos muestran un incremento en la curva de aprendizaje comparado con el grupo control sin condicionamiento (ESC) (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ para todos los grupos vs ESC; ANOVA de dos vías seguido de prueba *post hoc* Bonferroni). C) Porcentaje de inmovilidad durante la evocación del miedo al contexto (MMC). Se hallaron diferencias significativas entre el grupo 10dpi comparado con el resto de los grupos, a excepción del grupo control ESC (*** $p < 0.001$; ANOVA de una vía seguido de prueba *post hoc* Bonferroni). Para grupo ESC $n = 35$: Intacto $n = 4$, sham $n = 15$, 10dpi $n = 8$ y 30dpi $n = 8$. Para los grupos condicionados $n = 36$: Intacto $n = 4$, sham $n = 16$, 10dpi $n = 8$ y 30dpi $n = 8$.

5.3.3. La evocación de la memoria contextual se recupera con el tiempo después de daño al GD

24 horas posteriores al condicionamiento evaluamos la evocación de la memoria de miedo al contexto y encontramos que los animales intactos y sham desplegaron un alto porcentaje de inmovilidad, entre 60-70%, sugiriendo que existía un recuerdo del miedo al contexto. A los 10dpi los animales no recordaron el contexto previamente condicionado, reflejado por un porcentaje bajo de inmovilidad (ANOVA una vía: $F_{(4,66)} = 162.6$, $p < 0.001$) que posee similitud con el porcentaje desplegado por el grupo control ESC. Este resultado refleja que los animales de 10dpi no recordaron el evento nocivo al que se sometieron a pesar de que

fueron capaces de aprender sin dificultad. Consistente con nuestros resultados previos (Zepeda *et al.*, 2013) a los 30dpl, los animales fueron capaces de recordar el contexto aversivo, reflejado por el incremento en el porcentaje de inmovilidad, similar a los grupos control de sujetos intactos y sham (Fig 13C). Estos resultados nos muestran que la función del GD se restablece con el tiempo después del daño al mismo. Más aún esta recuperación correlaciona con un incremento dependiente del tiempo en la cantidad de nuevas neuronas NeuN+ activas, como se muestra en la figura 11.

5.4. La Potenciación a Largo Plazo se reestablece en el tiempo

Los resultados anteriores apoyan la idea de que existe una población de nuevas neuronas maduras y activas que podría estar relacionada con el restablecimiento de la memoria de miedo al contexto.

En nuestro trabajo previo (Zepeda *et al.*, 2013) realizamos un protocolo de inducción de Potenciación de largo plazo (LTP) a las diferentes ventanas temporales para analizar si el circuito que va del GD al área CA3 del hipocampo se había reestructurado sinápticamente después del daño y si era posible establecer un correlato con la recuperación de la memoria. Lo que observamos fue que a los 10dpl la LTP se encontraba impedida en comparación al resto de los grupos (Fig. 14; ANOVA medidas repetidas, $F_{(6,23)} = 7.15$ $p < 0.0001$). De forma interesante, la LTP se pudo evocar a los 25dpl y 60dpl siendo similar a la LTP observada en los grupos sham y el intacto (ANOVA medidas repetidas, $F_{(6,23)} = 7.15$ $p > 0.05$). La metodología y resultados de estos experimentos se encuentran detallados en el artículo correspondiente al Anexo 2 de esta tesis.

Como se muestra en las figuras 11 y 12, a los 30 más no a los 10dpl, hay un aumento significativo de neuronas NeuN+/c-fos+ lo cual correlaciona con el tiempo en el que se reestablece tanto la LTP como la memoria de miedo al contexto. Así en su conjunto, estos resultados podrían sugerir que las nuevas neuronas maduras y activables juegan un papel en el proceso plástico de reorganización funcional que ocurre después del daño al GD.

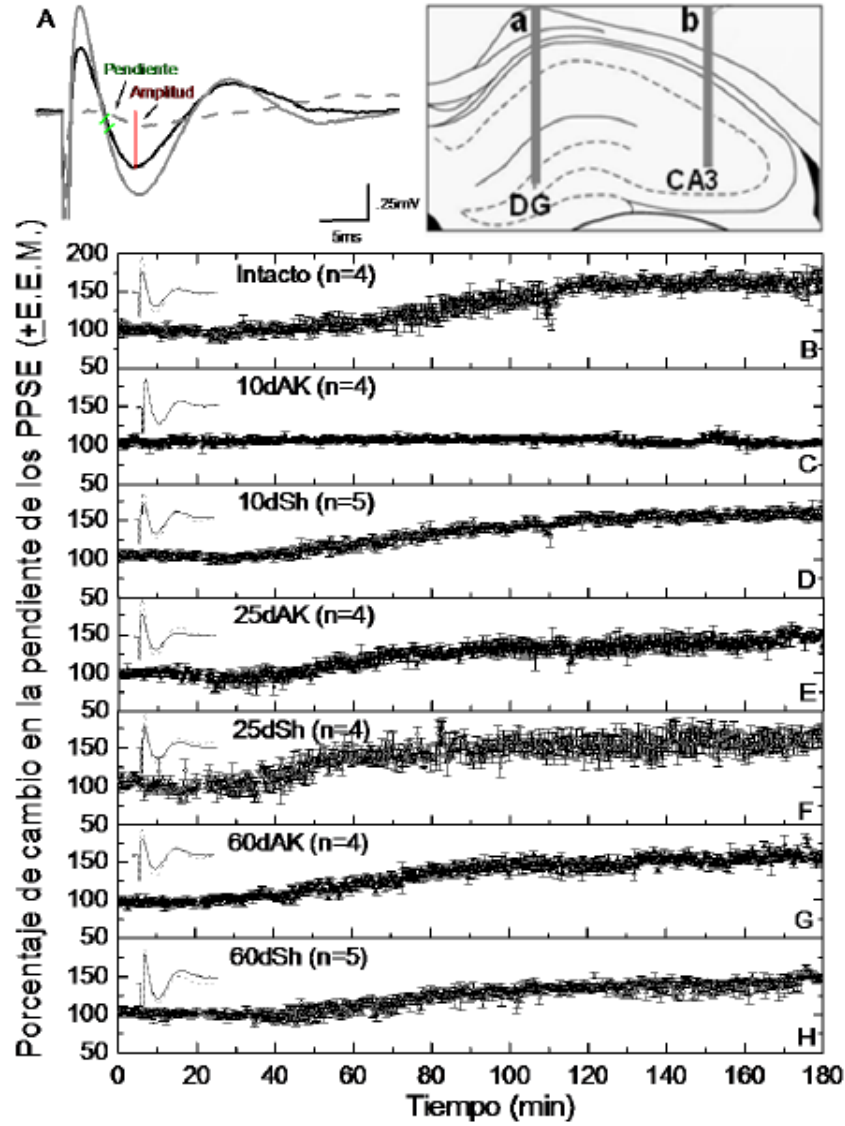


Fig. 14. La LTP inducida *in vivo* se recupera en el tiempo después del daño al GD. A) (Izquierda) Trazo representativo de la línea base de los PPSE (línea negra sólida, potenciales postsinápticos excitatorios), así como de la señal obtenida después de inducir la LTP con trenes de alta frecuencia (línea gris sólida). La línea gris punteada representa la señal obtenida después de aplicar DCG-IV, el cual selectivamente bloquea selectivamente las respuestas de las fibras musgosas a un 15% de la línea base. Gráfico de la LTP obtenida *in vivo* en la vía de las fibras musgosas. Los registros pertenecen a los grupos B) Intacto, C) 10dpl, D) 10dsh, E) 25dpl, F) 25dsh, G) 60dpl y H) 60dsh. La LTP se encontró impedida sólo en el grupo de 10dpl. El trazo mostrado en la parte superior izquierda de cada registro indica el promedio de los potenciales de campo de las fibras musgosas obtenidos antes (línea sólida) y 170 minutos después (línea punteada) de los trenes de alta frecuencia.

6. DISCUSIÓN

La neurogénesis en el cerebro adulto constituye uno de los mecanismos de plasticidad que ocurren como producto de una experiencia. Es una de las formas en las que la plasticidad neuronal se manifiesta y por ello posee un papel significativo en la función cerebral, así como en las diversas manifestaciones patológicas cerebrales y en la salud en general (Ruge *et al.*, 2012).

La neurogénesis ocurre en lugares determinados del cerebro del mamífero adulto como es el giro dentado del hipocampo. Se sabe que las nuevas neuronas son capaces de madurar e integrarse a un circuito de manera tal que puedan participar en las funciones de esa región, como por ejemplo en aspectos cognitivos como la memoria espacial o la separación de patrones (Snyder *et al.*, 2005, Deng *et al.*, 2009).

Uno de los tópicos más interesantes del estudio de la neurogénesis es si las nuevas neuronas pueden llegar a madurar, sobrevivir e integrarse de igual manera, con una repercusión funcional, en un circuito que fue dañado, participando de esta manera en el restablecimiento anatómico y funcional de la estructura dañada.

En este trabajo la morfología y la función del GD se restablecieron en el tiempo después del daño, consistente con observaciones previas de nuestro laboratorio (Zepeda *et al.*, 2013). A la par observamos un incremento no solo en la proliferación celular, sino en la generación de nuevas neuronas y en la sobrevivencia de estas después de daño, con un fenotipo maduro. Una fracción de estas nuevas neuronas maduras se activaron de forma específica en respuesta a la evocación de la memoria de miedo al contexto, proceso cognitivo asociado en parte al funcionamiento del GD, sin embargo no se activaron en respuesta a la exploración espacial, lo cual sugiere que las nuevas neuronas generadas después del daño sobreviven al menos 30 días después del daño al GD y se integran sinápticamente, mostrado por la presencia de marcadores de actividad dependiente de la evocación de la memoria de miedo al contexto.

6.1. Restructuración morfológica del GD en el tiempo después de daño

En este trabajo y en conjunto a otros artículos publicados en nuestro laboratorio y en otros laboratorios, observamos una reestructuración del GD en el tiempo (Ogita *et al.*, 2005, Hernandez-Ortega *et al.*, 2007, Zepeda *et al.*, 2013). A los 30 días después de inducir el daño, el GD se remodela reduciendo el tamaño del área de lesión en comparación a lo observable a los 10dpl, y de forma interesante siguiendo su forma original. Esta observación se reportó por otros grupos de trabajo y parece involucrar a la proteína de la matriz extracelular relina (Heinrich 2006, Haas *et al.*, 2010, Orcinha *et al.*, 2016).

Se sabe que la relina actúa a través de sus receptores más estudiados, el receptor de apolipoproteína E2 (ApoER2, también llamado LRP8) y el receptor de lipoproteína de baja densidad (VLDLR) (Trommsdorff *et al.*, 1999) para activar proteínas adaptadoras, como Dab-1 (Trommsdorff *et al.*, 1999, Howell *et al.*, 2000) y señales para estabilizar la actina del citoesqueleto. Esta estabilización se da a través de la fosforilación de la cofilina, que se vuelve incapaz de desensamblar a la F-actina y en consecuencia se estabiliza el citoesqueleto (Frotscher *et al.*, 2007, 2010, Chai *et al.*, 2009). En los ratones mutantes para relina, la falta de esta proteína desencadena la migración neuronal aberrante y su posicionamiento incorrecto (Trommsdorff *et al.*, 1999). En nuestro trabajo observamos la falta de neuronas en una región bien definida de la CG a los 10dpl junto con nuevas neuronas jóvenes BrdU+/DCX+ ectópicas, que sugieren una migración aberrante. Sin embargo, a los 30dpl, la tinción de Nissl y la inmunofluorescencia de NeuN muestran que el GD se encuentra reorganizado. Esto podría depender en parte de la dispersión de células preexistentes inducida por la falta de relina (Del Rio *et al.*, 1997), así como del proceso neurogénico inducido por el daño.

Después de daño ocurre una proliferación incrementada y sostenida como se observa por el número de células BrdU+, tanto en la CG como en el hilus. Si bien una fracción de estas células son neuronas, otra fracción podría corresponder a la generación de nuevas células gliales. Se sabe que el tipo y estado de las células cercanas al daño podrían influir de manera significativa en el progreso de la reparación. En este trabajo observamos una reacción glial incrementada a los 10dpl, donde las células gliales se encontraban inmersas en la capa

granular interrumpida. Sin embargo, a los 30dpl esta infiltración glial parecía bajar en la CG, mas no en el hilus a medida que también se recuperaba la marca de NeuN. Podríamos pensar que el incremento sostenido en BrdU podría estar dando lugar a nuevas células gliales que mantuvieran un proceso reactivo al daño en el hilus, que sin embargo no parece impedir que la CG del GD se reorganice. En estudios previos del laboratorio se ha observado que la arborización dendrítica no sucede en ventanas de tiempo cercanas a una lesión cortical, cuando justamente se forma una cicatriz glial que impide la regeneración de una estructura. Sin embargo, en momentos posteriores, cuando la reacción glial ha disminuido, los procesos dendríticos se mezclan con la glía reactiva formando un ambiente permisivo para el crecimiento (Zepeda *et al.*, 2004).

6.2. Modulación de la respuesta neurogénica después de daño

Consistente con múltiples trabajos, en este trabajo se observó que el daño genera un incremento en el número de células en proliferación, así como de nuevas neuronas (Liu *et al.*, 1998, Scharfman *et al.*, 2000, Sun *et al.*, 2007, Villasana *et al.*, 2015, Xu *et al.*, 2016) tal como lo muestra el incremento de BrdU+/DCX+. En nuestro modelo de daño, las nuevas neuronas jóvenes que observamos a los 10dpl desplegaban una morfología aberrante, es decir, tenían procesos horizontales o dirigidos hacia el hilus y tenían una anatomía desorganizada en términos generales, además de localizarse ectópicamente como detallaré más adelante. Sin embargo, a los 30dpl las pocas nuevas neuronas jóvenes que observamos poseían una morfología organizada, con sus dendritas cruzando la CG y dirigiéndose hacia la capa molecular; su anatomía ahora se parecía más a una nueva neurona joven generada en condiciones fisiológicas. En algunos trabajos se ha observado que la poda sináptica promueve la arborización (Kozlowski *et al.*, 1994) y la maduración neuronal (Beining *et al.*, 2017) después de una lesión cortical, de tal manera que las dendritas de neuronas denervadas se remodelan para mantener la homeostasis (Platschek *et al.*, 2016). Dado lo anterior, la poda sináptica se ha propuesto como un mecanismo que subyace a la reorganización funcional (Kozlowski *et al.*, 1994). Así mismo el número de nuevas neuronas jóvenes decreció significativamente a los 30dpl, lo cual podría deberse a una dilución del BrdU a esta ventana temporal y después de subsecuentes divisiones promovidas por la

proliferación excesiva posterior al daño (Brandt *et al.*, 2013). Sin embargo, esto es poco probable debido a que la proliferación total, identificada con BrdU, permaneció alta hasta los 30dpl como muestra la figura 6, aunque no se descarta que, en tiempos posteriores a los 30 días, los niveles de proliferación regresen a niveles cercanos al basal. De hecho también se ha podido observar que 28 días y de 1-6 meses después de una inyección de BrdU en condiciones fisiológicas, aún es posible visualizar la marca de manera clara, aunque se ha reportado una reducción de cerca del 50% producida más por muerte celular, que por dilución de la marca del análogo (Dayer *et al.*, 2003). Otra opción podría ser que esta disminución refleje que las nuevas neuronas llevan a cabo un proceso de maduración regular y que las nuevas células que a los 10dpl eran DCX+, a los 30dpl alcancen la maduración y expresen NeuN+, proveyendo un sustrato para una subsecuente plasticidad funcional que requiera neuronas maduras.

Consistente con nuestros resultados se observó una migración aberrante hacia el hilus, que se ha reportado anteriormente que ocurre a través de un mecanismo asociado a la proliferación excesiva. En un modelo de incremento en la tasa neurogénica, por medio de la eliminación del gen pro-apoptótico *Bax*, se observaron células granulares posicionadas de forma incorrecta en el hilus (Myers *et al.*, 2013), algo que anteriormente solo había sido detectado mediante la generación de crisis epilépticas severas (Parent *et al.*, 1997). En este trabajo pudimos observar células nuevas BrdU+/DCX+ a los 10dpl, así como BrdU+/NeuN+ a los 30dpl posicionadas en el hilus, lo cual podría sugerir que la alta proliferación inducida después del daño desencadena un posicionamiento inadecuado de una fracción de las nuevas neuronas en el hilus.

También en el hilus, las nuevas neuronas jóvenes BrdU+/DCX+ solo presentaron c-fos a los 10dpl mas no después, mientras que las nuevas neuronas maduras BrdU+/NeuN+ no presentaron c-fos en ninguna ventana temporal después de daño. Esto podría deberse al bajo umbral de excitación que presentan las nuevas neuronas cuando son jóvenes (Schmidt-Hieber *et al.*, 2004), pero también podría hablar de un papel funcional de las nuevas neuronas NeuN+ activadas, pues esta población incrementa en el tiempo solo en la CG y a la par de la recuperación de la memoria, sólo se localizan en la CG.

6.3. Las nuevas neuronas maduran y sobreviven 30 días después de daño

Bajo condiciones fisiológicas las nuevas neuronas expresan NeuN una semana después de nacidas (Snyder *et al.*, 2009), sin embargo en nuestro trabajo algo interesante es que el número de esta población incrementa hasta los 30dpl comparado con los grupos sin daño. Mientras que el incremento inicial de la neurogénesis a los 10dpl en la población BrdU+/NeuN+ podría reflejar la incorporación de BrdU en progenitores tipo 2b que en 10 días alcanzan la maduración y expresan NeuN; a los 30dpl el incremento sostenido en esa población puede reflejar la maduración de las nuevas neuronas. De hecho el comportamiento en espejo de las poblaciones de BrdU+/DCX+ y de BrdU+/NeuN+ a los 30dpl sugeriría un proceso de maduración normal en el que una fracción de las nuevas neuronas jóvenes que se observan incrementadas a los 10dpl, madura y se convierte en NeuN+ a los 30dpl, disminuyendo el número de células BrdU+/DCX+ a los mismos 30dpl.

Otra alternativa que podría explicar el incremento de BrdU+/NeuN+ a los 10dpl es que el daño indujera no solo un incremento en el número sino una aceleración en la maduración de las nuevas neuronas, de tal manera que expresen más rápidamente marcadores de maduración neuronal como NeuN+. Este proceso ha sido previamente documentado en ratones que están bajo tratamiento con antidepresivos como la fluoxetina (Wang *et al.*, 2008, Åmellem *et al.*, 2017), en animales corredores, cuyas nuevas neuronas del GD temporal maduran y se integran al circuito más rápido que en condiciones sedentarias (Piatti *et al.*, 2011) y en un modelo transgénico de la enfermedad de Alzheimer (APPxPS1) en donde la expresión directa de NeuroD1 en progenitores hipocampales que se encuentran en ciclo celular acelera la maduración de las nuevas neuronas. Incluso se ha observado que este tratamiento es capaz de rescatar el déficit en la densidad de espinas dendríticas de las nuevas neuronas y de reestablecer la memoria espacial en animales de (Richetin *et al.*, 2015). También se ha observado que después de inducir crisis epilépticas las células DCX+ de 12 días de edad se observan con una arborización más compleja que alcanza a llegar hasta la capa molecular externa en comparación a animales control cuyas dendritas llegan a la capa molecular interna (Overstreet-Wadiche *et al.*, 2006). Apoyando esta hipótesis, en nuestro laboratorio hemos encontrado una producción mayor de

neuronas Calretinina+ (CR, marcador de neuronas que salieron de ciclo celular y que procedieron con su maduración) a las 24 horas después de un daño focal similar al que realizamos en este trabajo en el hemisferio ipsilateral a la lesión, incremento que se mantuvo hasta los 60dpl. Esto nos sugeriría que a las 24h del daño un mayor número de neuronas prosigue con su maduración neuronal en comparación al control (Zepeda *et al.*, 2013).

Si bien el número de células BrdU+/NeuN+ incrementó a los 10dpl en comparación a su control, aún no se observa recuperación funcional, lo cual sugeriría que las células pueden aún no ser funcionales. Los datos obtenidos con relación a los déficits de reorganización sináptica (Zepeda *et al.*, 2013) y conductual (Liquitaya *et al.*, 2012) observados anteriormente, son consistentes con esa idea. Sin embargo, también podría deberse a que se necesita que el número de BrdU+/NeuN+ exceda un número determinado para poder tener un impacto conductual. En este trabajo la recuperación funcional solo se observa hasta los 30dpl cuando el número de células de esta población incrementa 4.3 veces la cantidad observada a los 10dpl.

6.4. Las nuevas neuronas son capaces de activarse después de daño y su activación correlaciona con la recuperación de la función cognitiva

Para evaluar la activación de las nuevas neuronas nacidas después de daño identificamos la presencia de c-fos, la cual es producto de un IEG, que incrementa en el soma neuronal producto de una experiencia. Se ha observado que a los 30 minutos de la evocación de una memoria de miedo al contexto un mayor número de neuronas granulares del GD muestran c-fos en comparación a animales que no fueron sometidos a un condicionamiento de este tipo en particular (Besnard *et al.*, 2013) o a una experiencia cognitiva en general (Guzowski *et al.*, 2001).

Al estudiar la población de nuevas células activas, es decir BrdU+/c-fos+ incluimos a todas aquellas células que podrían ser también DCX+ y/o NeuN+. Debido a esa inclusión es posible explicar el decremento en el número de células nuevas totales activas hacia los 30dpl, pues a medida que una neurona madura recibe mayor inervación GABAérgica (Esposito *et al.*,

2005), se mantiene silente o requiere un estímulo lo suficientemente saliente para evocar actividad. Sin embargo, a los 10dpl las nuevas células pueden hallarse en una edad muy temprana por lo que su susceptibilidad a activarse es mayor, dado el bajo umbral de excitación propio de su edad (Schmidt-Hieber *et al.*, 2004).

En contraposición a lo observado con la población activa de nuevas células, observamos que las neuronas NeuN+ anteriores al daño, es decir preexistentes, incrementaban solo a los 30dpl. El número de neuronas NeuN+/c-fos+ fue incluso mayor que el de DCX+/c-fos+ de 10 y 30dpl, sin embargo a los 10dpl las neuronas jóvenes fueron más propensas a activarse en comparación con su control, lo cual sugeriría que en general las células localizadas en una región dañada son más susceptibles de activarse y podrían ser uno de los mecanismos de compensación que reestablecen la función del GD, pues solo a los 30dpl, cuando el número de neuronas activas es mayor además de poseer un fenotipo maduro, se correlaciona con una recuperación de la función cognitiva. Consistente con estos resultados nosotros observamos en un estudio previo que después de un daño hipocampal, el contenido de las proteínas Syp y Arc incrementaba de manera significativa a los 30dpl, a la par que la marca co-localizaba con neuronas NeuN+ en el GD después de que las ratas realizaran una tarea espacial dependiente del hipocampo (Aguilar-Arredondo *et al.*, 2017). Tanto Syp como Arc juegan un papel importante en la creación de nuevas sinapsis y en la activación de sinapsis no activas (Tarsa *et al.*, 2002, Okuno *et al.*, 2012). Sin embargo, pueden no ser los únicos cambios que experimentan las neuronas preexistentes, pues en un proceso de lesión se presentan modificaciones en la organización celular que subyacen diferentes cambios neuroanatómicos. Algunos de estos cambios pueden dar lugar a la elongación axónica y a un aumento en la arborización dendrítica (Jones 1992, Darian-smith 1994) así como también a la reorganización de la estructura sináptica como es la regeneración pre y postsináptica que puede culminar en sinaptogénesis (Briones 2006) o que puede implicar una modulación en la neurotransmisión inhibitoria y excitadora (Zepeda *et al.*, 2004).

Algunos trabajos previos han reportado la integración a un circuito de las nuevas neuronas del GD después de un daño de tipo traumático (Sun *et al.*, 2007, Villasana *et al.*, 2015) o de

crisis convulsivas (Ovestreet-Wadiche *et al.*, 2006), sin embargo no se ha podido asociar esta integración funcional con una recuperación conductual. El razonamiento que nos llevó a inducir el daño directamente en el GD fue que las nuevas neuronas generadas compensarían la pérdida neuronal producida en un circuito ya establecido y que por lo tanto evaluar su participación en la reorganización sería más factible en una estructura con funciones cognitivas muy bien asociadas y que además es una estructura neurogénica. Consistente con esta hipótesis el daño indujo el nacimiento de nuevas neuronas NeuN+ que sobrevivieron hasta 30 días y que además presentaron un marcador de actividad neuronal, c-fos, ante la evocación de una tarea dependiente del GD, el condicionamiento de miedo al contexto. En apoyo a esta especificidad, no se encontraron niveles más altos de BrdU+/NeuN+/c-fos en animales que se sometieron a una tarea control de exploración espacial, es decir, las nuevas neuronas maduras no se activan en una tarea que no parece involucrar mayormente al GD. Más aún, la activación de las nuevas neuronas NeuN+ solo ocurre en las neuronas que se localizan en la CG, no así en las que se encuentran en el hilus, lo cual nos sugiere que la activación de nuevas neuronas después de daño es región-específica y tarea-dependiente.

Nuestros resultados también muestran una activación muy temprana de las nuevas neuronas jóvenes BrdU+/DCX+, estos resultados son sorprendentes debido a que no se había reportado antes la presencia de un IEG en células menores a 2 semanas de edad y bajo condiciones fisiológicas (Jessberger y Kempermann 2003, Bruel-Jungerman 2006, Ramirez-Amaya *et al.*, 2006, Kee *et al.*, 2007), ni la integración sináptica en células menores a 16 días (Ovestreet-Wadiche *et al.*, 2006). Una explicación a estos resultados es que las nuevas neuronas nacidas en respuesta a daño difieren de las células nacidas bajo condiciones fisiológicas, recordemos que el umbral de activación es menor en neuronas jóvenes que en neuronas maduras (Schmidt-Hieber *et al.*, 2004) y esta facilitación en la excitabilidad podría estar involucrada en los altos niveles de c-fos en esta población; sin embargo experimentos posteriores serán necesarios para dilucidar dichas diferencias y analizar el papel que podrían jugar .

Algunos trabajos han mostrado la participación de nuevas neuronas en la reinstalación de una función perdida. En un estudio se mostró que la degeneración natural de un circuito del telencéfalo, produce un deterioro en la estructura del canto en aves, mientras que la reintegración del circuito mediada por nuevas neuronas llevaba a la recuperación de la conducta del canto en los mismos animales (Cohen *et al.*, 2016). De tal manera que la neurogénesis compensatoria podría representar la reorganización morfológica, mientras que la presencia de c-fos en las nuevas neuronas representaría su integración funcional al circuito y por tanto su papel en la recuperación de la función (Snyder *et al.*, 2009 a y b).

Si bien observamos la activación de nuevas neuronas maduras ante la evocación de la memoria reestablecida, no se descarta que otros mecanismos de plasticidad influyan tanto en la recuperación morfológica como funcional. Se sabe que después de una pérdida neuronal, el sistema reacciona incrementando la generación de nuevas neuronas manteniendo la población de células funcionales. La corteza entorrinal, por ejemplo, establece nuevas conexiones con células granulares, después de que ha sido dañada, de tal manera que sería conveniente evaluar la sinaptogénesis de la EC-GD para analizar si puede ser un mecanismo que subyace a la recuperación de una función (Platschek *et al.*, 2017).

Estos resultados son consistentes con lo obtenido anteriormente en cuanto a la reorganización sináptica. A los 10dpl, la LTP se encuentra impedida al mismo tiempo que hay un déficit en la memoria y niveles bajos de actividad en nuevas neuronas NeuN+. Sin embargo, a los 30dpl el número de neuronas nuevas activas incrementa significativamente correlacionando con la inducción de la LTP en una ventana temporal similar y con la recuperación de la memoria de miedo al contexto. En conjunto estos datos sugieren que las nuevas neuronas podrían estar jugando un papel en la recuperación de la función del GD a una ventana de tiempo determinada después del daño.

Hemos evaluado también la participación de factores tróficos como el IGF1 en la reparación del GD mediado por el proceso neurogénico y hasta ahora hemos podido observar que la infusión crónica de este factor podría acelerar la maduración de las neuronas jóvenes DCX+ ayudándolas a desarrollar un árbol dendrítico más complejo y elaborado que posiblemente

promueva la recuperación de la función (Liquitaya *et al.*, 2012). Las intervenciones de esta índole pueden tener un fuerte impacto terapéutico en la modulación de la reparación después de daño.

Con base en nuestros resultados sabemos entonces que las nuevas neuronas sobreviven en la estructura lesionada y se activan en respuesta a una demanda cognitiva específica, sugiriendo que las nuevas neuronas nacidas después de daño son capaces de integrarse funcionalmente al circuito. Futuros experimentos que decrementen la tasa de nuevas neuronas producidas después de daño, serán esenciales para saber si las nuevas neuronas que observamos realmente son las responsables de la reorganización morfológica y funcional.

CONCLUSIÓN

La función de la neurogénesis en el hipocampo adulto es aún un tema de debate, múltiples investigaciones siguen realizándose para dilucidar cuál podría ser la contribución de la integración de nuevas neuronas no solamente en condiciones normales, sino también durante o después de un proceso patológico. Indiscutiblemente es un proceso de plasticidad que sucede como producto de una experiencia y en este caso en particular, después de daño. En este proyecto ofrecimos evidencia sobre que nuevas neuronas nacen y sobreviven por lo menos 30 días en una estructura lesionada, además, una fracción de estas es capaz de activarse en respuesta a una demanda cognitiva dependiente del área lesionada. Esta activación de las nuevas neuronas ocurre en al mismo tiempo que la recuperación de la función cognitiva, que la reorganización morfológica del GD y que la reorganización sináptica. Otros mecanismos de plasticidad podrían estar contribuyendo a esta recuperación, sin embargo este trabajo sugiere un posible rol de la neurogénesis adulta en la reparación y en la recuperación de la función cognitiva.

7. REFERENCIAS

1. Acsády L, Kamondi A, Sík A, Freund T, Buzsáki G (1998) GABAergic cells are the major postsynaptic targets of mossy fibers in the rat hippocampus. *J Neurosci* 18:3386–3403
2. Aguilar-Arredondo A, Arias C, Zepeda A (2015) Evaluating the functional state of adult-born neurons in the adult dentate gyrus of the hippocampus: From birth to functional integration. *Rev Neurosci* 26.
3. Aguilar-Arredondo A (2011) Evaluación de la reorganización anatomo-funcional del giro dentado después de una lesión excitotóxica. Papel de la neurogénesis.
4. Aguilar-Arredondo A, Arias C, Zepeda A (2015) Evaluating the functional state of adult-born neurons in the adult dentate gyrus of the hippocampus: from birth to functional integration. *Rev Neurosci* 26
5. Aguilar-Arredondo A, López-Hernández F, García-Velazquez L, Arias C, Zepeda A (2017) Behavior-associated Neuronal Activation After Kainic Acid-induced Hippocampal Neurotoxicity is Modulated in Time. *Anat Rec* 300:425–432.
6. Akers KG, Martinez-Canabal A, Restivo L, Yiu AP, De Cristofaro A, Hsiang HL, Wheeler AL, Guskjolen A, Niibori Y, Shoji H, Ohira K, Richards BA, Miyakawa T, Josselyn SA, Frankland PW (2014) Hippocampal neurogenesis regulates forgetting during adulthood and infancy. *Science* (80-) 344:598–602.
7. Altman J, Das GD (1966) Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. I. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in neonate rats, with special reference to postnatal neurogenesis. *J Comp Neurol* 126:337–389
8. Altman J, Das GD (1965) Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124:319–335.
9. Amaral DG (1978) A Golgi study of cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat. *J Comp Neurol* 182:851–914
10. Amaral DG, Ishizuka N, Claiborne B (1990) Neurons, numbers and the hippocampal network. *Prog Brain Res* 83:1–11
11. Åmellem I, Suresh S, Chang CC, Tok SSL, Tashiro A (2017) A critical period for antidepressant-induced acceleration of neuronal maturation in adult dentate gyrus. *Transl Psychiatry* 7:e1235
12. An L, Zhang Y-Z, Yu N-J, Liu X-M, Zhao N, Yuan L, Chen H-X, Li Y-F (2008) The total flavonoids extracted from Xiaobuxin-Tang up-regulate the decreased hippocampal neurogenesis and neurotrophic molecules expression in chronically stressed rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 32:1484–1490
13. Anacker C, Cattaneo A, Musaelyan K, Zunszain PA, Horowitz M, Molteni R, Luoni A, Calabrese F, Tansey K, Gennarelli M, Thuret S, Price J, Uher R, Riva MA, Pariante CM (2013) Role for the kinase SGK1 in stress, depression, and glucocorticoid effects on hippocampal neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:8708–8713
14. Anacker C, Hen R (2017) Adult hippocampal neurogenesis and cognitive flexibility-linking memory and mood. *Nat Rev Neurosci* 18:335–346
15. Andersen Per, Morris Richard, Amaral David, Bliss Tim and OJ ed. (2007) the hippocampus book. Oxford University Press.
16. Bachstetter AD, Morganti JM, Jernberg J, Schlunk A, Mitchell SH, Brewster KW, Hudson CE, Cole MJ, Harrison JK, Bickford PC, Gemma C (2011) Fractalkine and CX3CR1 regulate hippocampal neurogenesis in adult and aged rats. *Neurobiol Aging* 32:2030–2044.

17. Beining M, Jungenitz T, Radic T, Deller T, Cuntz H, Jedlicka P, Schwarzacher SW (2017) Adult-born dentate granule cells show a critical period of dendritic reorganization and are distinct from developmentally born cells. *Brain Struct Funct* 222:1427–1446
18. Bendel O, Bueters T, Von Euler M, Ove Ögren S, Sandin J, Von Euler G (2005) Reappearance of hippocampal CA1 neurons after ischemia is associated with recovery of learning and memory. *J Cereb Blood Flow Metab* 25:1586–1595.
19. Bengzon J, Kokaia Z, Elmer E, Nanobashvili A, Kokaia M, Lindvall O (1997) Apoptosis and proliferation of dentate gyrus neurons after single and intermittent limbic seizures. *Proc Natl Acad Sci* 94:10432–10437.
20. Berry A, Bindocci E, Alleva E (2012) NGF, Brain and Behavioral Plasticity. *Neural Plast* 2012:1–9
21. Besnard A, Serge L, Jocelyne C (2014) Comparative dynamics of MAPK/ERK signalling components and immediate early genes in the hippocampus and amygdala following contextual fear conditioning and retrieval. *Brain Struct Funct* 219:415–430.
22. Bondolfi L, Ermini F, Long JM, Ingram DK, Jucker M (2004) Impact of age and caloric restriction on neurogenesis in the dentate gyrus of C57BL/6 mice. *Neurobiol Aging* 25:333–340
23. Bramham CR, Alme MN, Bittins M, Kuipers SD, Nair RR, Pai B, Panja D, Schubert M, Soule J, Tiron A, Wibrand K (2010) The Arc of synaptic memory. *Exp Brain Res* 200:125–140
24. Brandt MD, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G, Reuter K, Bick-Sander A, Behrens W von der, Kempermann G (2003) Transient calretinin expression defines early postmitotic step of neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis of mice. *Mol Cell Neurosci* 24:603–613
25. Briones TL, Suh E, Jozsa L, Woods J (2006) Behaviorally induced synaptogenesis and dendritic growth in the hippocampal region following transient global cerebral ischemia are accompanied by improvement in spatial learning. *Exp Neurol* 198:530–538
26. Bruel-Jungerman E, Laroche S, Rampon C (2005) New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment. *Eur J Neurosci* 21:513–521.
27. Burghardt NS, Fenton A a, Dranovsky A (2011) Improve Pattern Separation. *October* 472:466–470.
28. Chai X, Förster E, Zhao S, Bock HH, Frotscher M (2009) Reelin stabilizes the actin cytoskeleton of neuronal processes by inducing n-cofilin phosphorylation at serine3. *J Neurosci* 29:288–299.
29. Chugh D, Nilsson P, Afjei S-A, Bakochi A, Ekdahl CT (2013) Brain inflammation induces post-synaptic changes during early synapse formation in adult-born hippocampal neurons. *Exp Neurol* 250:176–188.
30. Cohen RE, Macedo-Lima M, Miller KE, Brenowitz EA (2016) Adult Neurogenesis Leads to the Functional Reconstruction of a Telencephalic Neural Circuit. *J Neurosci* 36:8947–8956.
31. Culig L, Surget A, Bourdey M, Khemissi W, Le Guisquet A-M, Vogel E, Sahay A, Hen R, Belzung C (2017) Increasing adult hippocampal neurogenesis in mice after exposure to unpredictable chronic mild stress may counteract some of the effects of stress. *Neuropharmacology* 126:179–189.
32. Darian-Smith C, Gilbert CD (1994) Axonal sprouting accompanies functional reorganization in adult cat striate cortex. *Nature* 368:737–740.
33. Dayer AG, Ford AA, Cleaver KM, Yassaee M, Cameron HA (2003) Short-term and long-term survival of new neurons in the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol* 460:563–572.
34. De Oca BM, DeCola JP, Maren S, Fanselow MS (1998) Distinct regions of the periaqueductal gray are involved in the acquisition and expression of defensive responses. *J Neurosci* 18:3426–3432.
35. Del Río JA, Heimrich B, Borrell V, Förster E, Drakew A, Alcántara S, Nakajima K, Miyata T, Ogawa M, Mikoshiba K, Derer P, Frotscher M, Soriano E (1997) A role for Cajal–Retzius cells and reelin in the development of hippocampal connections. *Nature* 385:70–74.
36. Deng W, Saxe MD, Gallina IS, Gage FH (2009) Adult-Born Hippocampal Dentate Granule Cells Undergoing Maturation Modulate Learning and Memory in the Brain. *J Neurosci* 29:13532–13542

37. Deng W, Aimone JB, Gage FH (2010) New neurons and new memories: How does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat Rev Neurosci* 11:339–350.
38. Dong H, Goico B, Martin M, Csernansky CA, Bertchume A, Csernansky JG (2004) Modulation of hippocampal cell proliferation, memory, and amyloid plaque deposition in APP^{sw} (Tg2576) mutant mice by isolation stress. *Neuroscience* 127:601–609.
39. Dong H, Csernansky C a, Goico B, Csernansky JG (2003) Hippocampal neurogenesis follows kainic acid-induced apoptosis in neonatal rats. *J Neurosci* 23:1742–1749.
40. Dupret D, Revest JM, Koehl M, Ichas F, De Giorgi F, Costet P, Abrous DN, Piazza PV (2008) Spatial relational memory requires hippocampal adult neurogenesis. *PLoS One* 3.
41. E L, Burns JM, Swerdlow RH (2014) Effect of high-intensity exercise on aged mouse brain mitochondria, neurogenesis, and inflammation. *Neurobiol Aging* 35:2574–2583.
42. Ehninger D, Kempermann G (2008) Neurogenesis in the adult hippocampus. *Cell Tissue Res* 331:243–250.
43. Epp JR, Spritzer MD, Galea LAM (2007) Hippocampus-dependent learning promotes survival of new neurons in the dentate gyrus at a specific time during cell maturation. *Neuroscience* 149:273–285.
44. Epp JR, Haack AK, Galea LAM (2011) Activation and survival of immature neurons in the dentate gyrus with spatial memory is dependent on time of exposure to spatial learning and age of cells at examination. *Neurobiol Learn Mem* 95:316–325.
45. 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.
46. Everson CA, Crowley WR (2004) Reductions in circulating anabolic hormones induced by sustained sleep deprivation in rats. *Am J Physiol Metab* 286:E1060–E1070.
47. Fabel K, Fabel K, Tam B, Kaufer D, Baiker A, Simmons N, Kuo CJ, Palmer TD (2003) VEGF is necessary for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis. *Eur J Neurosci* 18:2803–2812.
48. Farioli-Vecchioli S, Saraulli D, Costanzi M, Pacioni S, Cinà I, Aceti M, Micheli L, Bacci A, Cestari V, Tirone F (2008) The timing of differentiation of adult hippocampal neurons is crucial for spatial memory. *PLoS Biol* 6:e246
49. Farmer J, Zhao X, van Praag H, Wodtke K, Gage FH, Christie BR (2004) Effects of voluntary exercise on synaptic plasticity and gene expression in the dentate gyrus of adult male Sprague-Dawley rats in vivo. *Neuroscience* 124:71–79.
50. Feng R, Rampon C, Tang YP, Shrom D, Jin J, Kyin M, Sopher B, Martin GM, Kim SH, Langdon RB, Sisodia SS, Tsien JZ (2001) Deficient neurogenesis in forebrain-specific presenilin-1 knockout mice is associated with reduced clearance of hippocampal memory traces. *Neuron* 32:911–926.
51. Frotscher M (2010) Role for Reelin in stabilizing cortical architecture. *Trends Neurosci* 33:407–414.
52. Frotscher M, Zhao S, Förster E (2007) Development of cell and fiber layers in the dentate gyrus. *Prog Brain Res* 163:133–142.
53. Fyhn M, Hafting T, Treves A, Moser M-B, Moser EI (2007) Hippocampal remapping and grid realignment in entorhinal cortex. *Nature* 446:190–194
54. Gao Z, Ure K, Ables JL, Lagace DC, Nave K-A, Goebbels S, Eisch AJ, Hsieh J (2009) Neurod1 is essential for the survival and maturation of adult-born neurons. *Nat Neurosci* 12:1090–1092
55. Garcia ADR, Doan NB, Imura T, Bush TG, Sofroniew M V. (2004) GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. *Nat Neurosci* 7:1233–1241.
56. Gebara E, Sultan S, Kocher-Braissant J, Toni N (2013) Adult hippocampal neurogenesis inversely correlates with microglia in conditions of voluntary running and aging. *Front Neurosci* 7:145.

57. Ghosal K, Stathopoulos A, Pimplikar SW (2010) APP intracellular domain impairs adult neurogenesis in transgenic mice by inducing neuroinflammation. *PLoS One* 5:e11866.
58. Gibbons TE, Pence BD, Petr G, Ossyra JM, Mach HC, Bhattacharya TK, Perez S, Martin SA, McCusker RH, Kelley KW, Rhodes JS, Johnson RW, Woods JA (2014) Voluntary wheel running, but not a diet containing (-)-epigallocatechin-3-gallate and β -alanine, improves learning, memory and hippocampal neurogenesis in aged mice. *Behav Brain Res* 272:131–140.
59. Gilbert PE, Kesner RP, Lee I (2001) Dissociating hippocampal subregions: A double dissociation between dentate gyrus and CA1. *Hippocampus* 11:626–636.
60. Glasper ER, Gould E (2013) Sexual experience restores age-related decline in adult neurogenesis and hippocampal function. *Hippocampus* 23:303–312.
61. Goldman SA, Nottebohm FN (1983) Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:2390–2394.
62. Gould E, McEwen BSS, Tanapat P, Galea LAM a, 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.
63. Grassi Zucconi G, Cipriani S, Balgkouranidou I, Scattoni R (2006) ‘One night’ sleep deprivation stimulates hippocampal neurogenesis. *Brain Res Bull* 69:375–381.
64. Gray WP, Sundstrom LE (1998) Kainic acid increases the proliferation of granule cell progenitors in the dentate gyrus of the adult rat. *Brain Res* 790:52–59.
65. Gu Y, Arruda-Carvalho M, Wang J, Janoschka SR, Josselyn SA, Frankland PW, Ge S (2012) Optical controlling reveals time-dependent roles for adult-born dentate granule cells. *Nat Neurosci* 15:1700–1706.
66. Guzman-Marin R, Suntsova N, Methippara M, Greiffenstein R, Szymusiak R, McGinty D (2005) Sleep deprivation suppresses neurogenesis in the adult hippocampus of rats. *Eur J Neurosci* 22:2111–2116.
67. Guzowski JF, Setlow B, Wagner EK, McGaugh JL (2001) 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.
68. Gwak YS, Kang J, Leem JW, Hulsebosch CE (2007) Spinal AMPA receptor inhibition attenuates mechanical allodynia and neuronal hyperexcitability following spinal cord injury in rats. *J Neurosci Res* 85:2352–2359.
69. Haas CA, Frotscher M (2010) Reelin deficiency causes granule cell dispersion in epilepsy. *Exp Brain Res* 200:141–149
70. Hattiangady B, Rao MS, Shetty AK (2008) Plasticity of hippocampal stem/progenitor cells to enhance neurogenesis in response to kainate-induced injury is lost by middle age. *Aging Cell* 7:207–224.
71. Heinrich C (2006) Reelin Deficiency and Displacement of Mature Neurons, But Not Neurogenesis, Underlie the Formation of Granule Cell Dispersion in the Epileptic Hippocampus. *J Neurosci* 26:4701–4713.
72. Hernández-Ortega K, Ferrera P, Arias C (2007) Sequential expression of cell-cycle regulators and Alzheimer’s disease-related proteins in entorhinal cortex after hippocampal excitotoxic damage. *J Neurosci Res* 85:1744–1751.
73. Hernández-Rabaza V, Hontecillas-Prieto L, Velázquez-Sánchez C, Ferragud A, Pérez-Villaba A, Arcusa A, Barcia JA, Trejo JL, Canales JJ (2008) The hippocampal dentate gyrus is essential for generating contextual memories of fear and drug-induced reward. *Neurobiol Learn Mem* 90:553–559.
74. Hernández-Rabaza V, Llorens-Martín M, Velázquez-Sánchez C, Ferragud A, Arcusa A, Gumus HG, Gómez-Pinedo U, Pérez-Villalba A, Roselló J, Trejo JL, Barcia JA, Canales JJ (2009) Inhibition of adult

- hippocampal neurogenesis disrupts contextual learning but spares spatial working memory, long-term conditional rule retention and spatial reversal. *Neuroscience* 159:59–68.
75. Hill AS, Sahay A, Hen R (2015) Increasing Adult Hippocampal Neurogenesis is Sufficient to Reduce Anxiety and Depression-Like Behaviors. *Neuropsychopharmacology* 40:2368–2378.
 76. Hjorth-Simonsen A, Jeune B (1972) Origin and termination of the hippocampal perforant path in the rat studied by silver impregnation. *J Comp Neurol* 144:215–231.
 77. Höglinger GU, Rizk P, Muriel MP, Duyckaerts C, Oertel WH, Caille I, Hirsch EC (2004) Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. *Nat Neurosci* 7:726–735.
 78. Holopainen IE (2008) Seizures in the developing brain: Cellular and molecular mechanisms of neuronal damage, neurogenesis and cellular reorganization. *Neurochem Int* 52:935–947.
 79. Hosford BE, Liska JP, Danzer SC (2016) Ablation of Newly Generated Hippocampal Granule Cells Has Disease-Modifying Effects in Epilepsy. *J Neurosci* 36:11013–11023
 80. Howell BW, Herrick TM, Hildebrand JD, Zhang Y, Cooper JA (n.d.) Dab1 tyrosine phosphorylation sites relay positional signals during mouse brain development. *Curr Biol* 10:877–885
 81. Imayoshi I, Sakamoto M, Ohtsuka T, Takao K, Miyakawa T, Yamaguchi M, Mori K, Ikeda T, Itohara S, Kageyama R (2008) Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. *Nat Neurosci* 11:1153–1161.
 82. Irwin MR (2006) Sleep Deprivation and Activation of Morning Levels of Cellular and Genomic Markers of Inflammation. *Arch Intern Med* 166:1756.
 83. Jakubs K, Bonde S, Iosif RE, Ekdahl CT, Kokaia Z, Kokaia M, Lindvall O (2008) Inflammation Regulates Functional Integration of Neurons Born in Adult Brain. *J Neurosci* 28:12477–12488.
 84. Jessberger S, Kempermann G (2003) Adult-born hippocampal neurons mature into activity-dependent responsiveness. *Eur J Neurosci* 18:2707–2712.
 85. Jin K, Minami M, Lan JQ, Mao XO, Bateur S, Simon RP, Greenberg DA (2001) Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. *Proc Natl Acad Sci* 98:4710–4715.
 86. Jones TA, Schallert T (1992) Overgrowth and pruning of dendrites in adult rats recovering from neocortical damage. *Brain Res* 581:156–160.
 87. Kaplan MS, Hinds JW (1977) Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science* 197:1092–1094.
 88. Kawai T, Takagi N, Miyake-Takagi K, Okuyama N, Mochizuki N, Takeo S (2004) Characterization of BrdU-Positive Neurons Induced by Transient Global Ischemia in Adult Hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab* 24:548–555.
 89. Kawakita E, Hashimoto M, Shido O (2006) Docosahexaenoic acid promotes neurogenesis in vitro and in vivo. *Neuroscience* 139:991–997.
 90. 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.
 91. 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 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12466205>.
 92. Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH (1997) More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386:493–495.
 93. Kernie SG, Parent JM (2010) Forebrain neurogenesis after focal Ischemic and traumatic brain injury. *Neurobiol Dis* 37:267–274.
 94. Kettenmann H, Hanisch U-K, Noda M, Verkhratsky A (2011) Physiology of microglia. *Physiol Rev* 91:461–553.

95. Kim J-I, Lee JW, Lee YA, Lee D-H, Han NS, Choi Y-K, Hwang BR, Kim HJ, Han JS (2013) Sexual activity counteracts the suppressive effects of chronic stress on adult hippocampal neurogenesis and recognition memory. *Brain Res* 1538:26–40.
96. Kim SJ, Son TG, Park HR, Park M, Kim M-S, Kim HS, Chung HY, Mattson MP, Lee J (2008) Curcumin stimulates proliferation of embryonic neural progenitor cells and neurogenesis in the adult hippocampus. *J Biol Chem* 283:14497–14505.
97. Kiss J, Csáki A, Bokor H, Shanabrough M, Leranth C (2000) The supramammillo-hippocampal and supramammillo-septal glutamatergic/aspartatergic projections in the rat: a combined [³H]-aspartate autoradiographic and immunohistochemical study. *Neuroscience* 97:657–669.
98. Kozłowski DA, Jones TA, Schallert T (1994) Pruning of dendrites and restoration of function after brain damage: Role of the NMDA receptor. *Restor Neurol Neurosci* 7:119–126.
99. 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
100. Lanahan A, Worley P (1998) Immediate-Early Genes and Synaptic Function. *Neurobiol Learn Mem* 70:37–43.
101. Lassalle J-M, Bataille T, Halley H (2000) Reversible Inactivation of the Hippocampal Mossy Fiber Synapses in Mice Impairs Spatial Learning, but neither Consolidation nor Memory Retrieval, in the Morris Navigation Task. *Neurobiol Learn Mem* 73:243–257
102. Lee I, Kesner RP (2004) Encoding versus retrieval of spatial memory: Double dissociation between the dentate gyrus and the perforant path inputs into CA3 in the dorsal hippocampus. *Hippocampus* 14:66–76.
103. Lee I, Kesner RP (2004) Differential contributions of dorsal hippocampal subregions to memory acquisition and retrieval in contextual fear-conditioning. *Hippocampus* 14:301–310.
104. Lee J, Duan W, Mattson MP (2002) Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice. *J Neurochem* 82:1367–1375.
105. Lehmann ML, Brachman RA, Martinowich K, Schloesser RJ, Herkenham M (2013) Glucocorticoids orchestrate divergent effects on mood through adult neurogenesis. *J Neurosci* 33:2961–2972.
106. Leranth C, Hajszan T (2007) Extrinsic afferent systems to the dentate gyrus. In, pp 63–799.
107. Leuner B, Glasper ER, Gould E (2010) Sexual experience promotes adult neurogenesis in the hippocampus despite an initial elevation in stress hormones. *PLoS One* 5:e11597.
108. Leuner B, Gould E, Shors TJ (2006) Is there a link between adult neurogenesis and learning? *Hippocampus* 16:216–224.
109. Leutgeb S (2004) Distinct Ensemble Codes in Hippocampal Areas CA3 and CA1. *Science* (80) 305:1295–1298
110. Lindqvist A, Mohapel P, Bouter B, Frielingsdorf H, Pizzo D, Brundin P, Erlanson-Albertsson C (2006) High-fat diet impairs hippocampal neurogenesis in male rats. *Eur J Neurol* 13:1385–1388.
111. Liquitaya-Montiel A, Aguilar-Arredondo A, Arias C, Zepeda A (2012) Insulin Growth Factor-1 promotes functional recovery after a focal lesion in the dentate gyrus. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 11.
112. Liu J, Solway K, Messing RO, Sharp FR (1998) Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils. *J Neurosci* 18:7768–7778.
113. Loughlin SE, Foote SL, Grzanna R (1986) Efferent projections of nucleus locus coeruleus: morphologic subpopulations have different efferent targets. *Neuroscience* 18:307–319.
114. 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.

115. Malberg JE, Duman RS (2003) Cell proliferation in adult hippocampus is decreased by inescapable stress: reversal by fluoxetine treatment. *Neuropsychopharmacology* 28:1562–1571.
116. Marlatt MW, Potter MC, Lucassen PJ, van Praag H (2012) Running throughout middle-age improves memory function, hippocampal neurogenesis, and BDNF levels in female C57BL/6J mice. *Dev Neurobiol* 72:943–952.
117. Matsuda T, Hisatsune T (2017) Cholinergic Modification of Neurogenesis and Gliosis Improves the Memory of A β PPswe/PSEN1dE9 Alzheimer's Disease Model Mice Fed a High-Fat Diet. *J Alzheimers Dis* 56:1–23.
118. Messaoudi E, Kanhema T, Soule J, Tiron A, Dageyte G, da Silva B, Bramham CR (2007) Sustained Arc/Arg3.1 Synthesis Controls Long-Term Potentiation Consolidation through Regulation of Local Actin Polymerization in the Dentate Gyrus In Vivo. *J Neurosci* 27:10445–10455.
119. Ming G-L, Song H (2011) Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron* 70:687–702.
120. Mirescu C, Peters JD, Noiman L, Gould E (2006) Sleep deprivation inhibits adult neurogenesis in the hippocampus by elevating glucocorticoids. *Proc Natl Acad Sci* 103:19170–19175.
121. Mirescu C, Peters JD, Gould E (2004) Early life experience alters response of adult neurogenesis to stress. *Nat Neurosci* 7:841–846.
122. Monje ML, Toda H, Palmer TD (2003) Inflammatory Blockade Restores Adult Hippocampal Neurogenesis. *Science* (80-) 302:1760–1765.
123. Moser EI, Kropff E, Moser M-B (2008) Place cells, grid cells, and the brain's spatial representation system. *Annu Rev Neurosci* 31:69–89.
124. Murray F, Smith DW, Hutson PH (2008) Chronic low dose corticosterone exposure decreased hippocampal cell proliferation, volume and induced anxiety and depression like behaviours in mice. *Eur J Pharmacol* 583:115–127.
125. Myers CE, Bermudez-Hernandez K, Scharfman HE (2013) The Influence of Ectopic Migration of Granule Cells into the Hilus on Dentate Gyrus-CA3 Function Avoli M, ed. *PLoS One* 8:e68208
126. Neuberger EJ, Swietek B, Corrubia L, Prasanna A, Santhakumar V (2017) Enhanced Dentate Neurogenesis after Brain Injury Undermines Long-Term Neurogenic Potential and Promotes Seizure Susceptibility. *Stem Cell Reports* 9:972–984.
127. Nixon K, Crews FT (2002) Binge ethanol exposure decreases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurochem* 83:1087–1093.
128. Nudo RJ (2006) Plasticity. *NeuroRX* 3:420–427.
129. Ogita K, Nishiyama N, Sugiyama C, Higuchi K, Yoneyama M, Yoneda Y (2005) Regeneration of granule neurons after lesioning of hippocampal dentate gyrus: Evaluation using adult mice treated with trimethyltin chloride as a model. *J Neurosci Res* 82:609–621.
130. Okuno H, Akashi K, Ishii Y, Yagishita-Kyo N, Suzuki K, Nonaka M, Kawashima T, Fujii H, Takemoto-Kimura S, Abe M, Natsume R, Chowdhury S, Sakimura K, Worley PF, Bito H (2012) Inverse synaptic tagging of inactive synapses via dynamic interaction of Arc/Arg3.1 with CaMKII β . *Cell* 149:886–898.
131. Oomen CA, Mayer JL, de Kloet ER, Joëls M, Lucassen PJ (2007) Brief treatment with the glucocorticoid receptor antagonist mifepristone normalizes the reduction in neurogenesis after chronic stress. *Eur J Neurosci* 26:3395–3401.
132. Orcinha C, Münzner G, Gerlach J, Kiliyas A, Follo M, Egert U, Haas CA (2016) Seizure-Induced Motility of Differentiated Dentate Granule Cells Is Prevented by the Central Reelin Fragment. *Front Cell Neurosci* 10.
133. Overstreet-Wadiche LS (2006) Seizures Accelerate Functional Integration of Adult-Generated Granule Cells. *J Neurosci* 26:4095–4103.

134. Parent JM, Yu TW, Leibowitz RT, Geschwind DH, Sloviter RS, Lowenstein DH (1997) Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *J Neurosci* 17:3727–3738.
135. Paxinos G, Watson C (2007) *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 6th editio. Academic Press.
136. Pereira AC, Huddleston DE, Brickman AM, Sosunov AA, Hen R, McKhann GM, Sloan R, Gage FH, Brown TR, Small SA (2007) An in vivo correlate of exercise-induced neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:5638–5643.
137. Phillips RG, LeDoux JE (1992) Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav Neurosci* 106:274–285.
138. Piao C-S, Stoica BA, Wu J, Sabirzhanov B, Zhao Z, Cabatbat R, Loane DJ, Faden AI (2013) Late exercise reduces neuroinflammation and cognitive dysfunction after traumatic brain injury. *Neurobiol Dis* 54:252–263.
139. Piatti VC, Davies-Sala MG, Esposito MS, Mongiat LA, Trincherro MF, Schinder AF (2011) The Timing for Neuronal Maturation in the Adult Hippocampus Is Modulated by Local Network Activity. *J Neurosci* 31:7715–7728.
140. Platschek S, Cuntz H, Deller T, Jedlicka P (2017) Lesion-Induced Dendritic Remodeling as a New Mechanism of Homeostatic Structural Plasticity in the Adult Brain. In: *The Rewiring Brain*, pp 203–218. Elsevier.
141. Platschek S, Cuntz H, Vuksic M, Deller T, Jedlicka P (2016) A general homeostatic principle following lesion induced dendritic remodeling. *Acta Neuropathol Commun* 4:19.
142. Pritchett K, Mulder G (2004) Hebb-Williams mazes. *Contemp Top Lab Anim Sci* 43:44–45
143. 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.
144. Ribak CE, Seress L, Amaral DG (1985) The development, ultrastructure and synaptic connections of the mossy cells of the dentate gyrus. *J Neurocytol* 14:835–857.
145. Richetin K, Leclerc C, Toni N, Gallopin T, Pech S, Roybon L, Rampon C (2015) Genetic manipulation of adult-born hippocampal neurons rescues memory in a mouse model of Alzheimer’s disease. *Brain* 138:440–455.
146. Ruge D, Liou L-M, Hoad D (2012) Improving the Potential of Neuroplasticity. *J Neurosci* 32:5705–5706.
147. Sah A, Schmuckermair C, Sartori SB, Gaburro S, Kandasamy M, Irschick R, Klimaschewski L, Landgraf R, Aigner L, Singewald N (2012) Anxiety- rather than depression-like behavior is associated with adult neurogenesis in a female mouse model of higher trait anxiety- and comorbid depression-like behavior. *Transl Psychiatry* 2:e171.
148. Sah N, Peterson BD, Lubejko ST, Vivar C, Van Praag H (2017) Running reorganizes the circuitry of one-week-old adult-born hippocampal neurons. *Sci Rep* 7:1–15.
149. Sahay A, Scobie KN, Hill AS, O’Carroll CM, Kheirbek MA, Burghardt NS, Fenton AA, Dranovsky A, Hen R (2011) Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. *Nature* 472:466–470.
150. Saxe MD, Battaglia F, Wang J-W, Malleret G, David DJ, Monckton JE, Garcia ADR, Sofroniew M V., Kandel ER, Santarelli L, Hen R, Drew MR (2006) Ablation of hippocampal neurogenesis impairs contextual fear conditioning and synaptic plasticity in the dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci* 103:17501–17506.
151. Scharfman HE, Goodman JH, Sollas AL (2000) Granule-like neurons at the hilar/CA3 border after status epilepticus and their synchrony with area CA3 pyramidal cells: functional implications of seizure-induced neurogenesis. *J Neurosci* 20:6144–6158.
152. Schloesser RJ, Manji HK, Martinowich K (2009) Suppression of adult neurogenesis leads to an increased hypothalamo-pituitary-adrenal axis response. *Neuroreport* 20:553–557.

153. SCOVILLE WB, MILNER B (1957) Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 20:11–21.
154. Shors TJ, Miesegaes G, Beylin A, Zhao M, Rydel T, Gould E (2001) Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature* 410:372–376.
155. Sik A, Penttonen M, Buzsáki G (1997) Interneurons in the Hippocampal Dentate Gyrus: an In Vivo intracellular Study. *Eur J Neurosci* 9:573–588.
156. Snyder JS, Hong NS, McDonald RJ, Wojtowicz JM (2005) A role for adult neurogenesis in spatial long-term memory. *Neuroscience* 130:843–852.
157. Snyder JS, Choe JS, Clifford MA, Jeurling SI, Hurley P, Brown A, Kamhi JF, Cameron HA (2009) Adult-Born Hippocampal Neurons Are More Numerous, Faster Maturing, and More Involved in Behavior in Rats than in Mice. *J Neurosci* 29:14484–14495.
158. Snyder JS, Radik R, Wojtowicz JM, Cameron HA (2009) Anatomical gradients of adult neurogenesis and activity: Young neurons in the ventral dentate gyrus are activated by water maze training. *Hippocampus* 19:360–370.
159. Snyder JS, Soumier A, Brewer M, Pickel J, Cameron HA (2011) Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behaviour. *Nature* 476:458–461.
160. Song J, M. Christian K, Ming GL, Song H (2012) Modification of hippocampal circuitry by adult neurogenesis. *Dev Neurobiol* 72:1032–1043.
161. Speisman RB, Kumar A, Rani A, Foster TC, Ormerod BK (2013) Daily exercise improves memory, stimulates hippocampal neurogenesis and modulates immune and neuroimmune cytokines in aging rats. *Brain Behav Immun* 28:25–43.
162. Stephan H (1975) *Allocortex: Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen*. Berlin ; New York : Springer-Verlag.
163. Stranahan AM, Khalil D, Gould E (2007) Running induces widespread structural alterations in the hippocampus and entorhinal cortex. *Hippocampus* 17:1017–1022.
164. Sun D, Daniels TE, Rolfe A, Waters M, Hamm R (2015) Inhibition of Injury-Induced Cell Proliferation in the Dentate Gyrus of the Hippocampus Impairs Spontaneous Cognitive Recovery after Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma* 32:495–505.
165. Sun D, McGinn MJ, Zhou Z, Harvey H Ben, Bullock MR, Colello RJ (2007) Anatomical integration of newly generated dentate granule neurons following traumatic brain injury in adult rats and its association to cognitive recovery. *Exp Neurol* 204:264–272.
166. Swanson L (1978) Functions of the septohippocampal system. In, pp 25–48. Amsterdam: Elsevier North Holland.
167. Tanapat P, Hastings NB, Rydel TA, Galea LA, Gould E (2001) Exposure to fox odor inhibits cell proliferation in the hippocampus of adult rats via an adrenal hormone-dependent mechanism. *J Comp Neurol* 437:496–504.
168. Tarsa L, Goda Y (2002) Synaptophysin regulates activity-dependent synapse formation in cultured hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:1012–1016.
169. 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* 27:3252–3259.
170. Trejo JL, Carro E, Torres-Aleman I (2001) Circulating insulin-like growth factor I mediates exercise-induced increases in the number of new neurons in the adult hippocampus. *J Neurosci* 21:1628–1634.
171. Treves A, Tashiro A, Witter ME, Moser EI (2008) What is the mammalian dentate gyrus good for? *Neuroscience* 154:1155–1172.

172. Trommsdorff M, Gotthardt M, Hiesberger T, Shelton J, Stockinger W, Nimpf J, Hammer RE, Richardson JA, Herz J (1999) Reeler/Disabled-like disruption of neuronal migration in knockout mice lacking the VLDL receptor and ApoE receptor 2. *Cell* 97:689–701.
173. Tronel S, Fabre A, Charrier V, Oliet SHR, Gage FH, Abrous DN (2010) Spatial learning sculpts the dendritic arbor of adult-born hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci* 107:7963–7968
174. Valtorta F, Pennuto M, Bonanomi D, Benfenati F (2004) Synaptophysin: leading actor or walk-on role in synaptic vesicle exocytosis? *BioEssays* 26:445–453.
175. van Praag H (2005) Exercise Enhances Learning and Hippocampal Neurogenesis in Aged Mice. *J Neurosci* 25:8680–8685.
176. van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage FH (1999) Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:13427–13431
177. van Praag H, Kempermann G, Gage FH (1999) Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci* 2:266–270.
178. van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH (2002) Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 415:1030–1034.
179. Varela-Nallar L, Rojas-Abalos M, Abbott AC, Moya EA, Iturriaga R, Inestrosa NC (2014) Chronic hypoxia induces the activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway and stimulates hippocampal neurogenesis in wild-type and APP^{swe}-PS1 Δ E9 transgenic mice in vivo. *Front Cell Neurosci* 8.
180. Vertes RP (1992) PHA-L analysis of projections from the supramammillary nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 326:595–622.
181. Villasana LE, Kim KN, Westbrook GL, Schnell E (2015) Functional Integration of Adult-Born Hippocampal Neurons after Traumatic Brain Injury. *eNeuro* 2.
182. Waites CL, Craig AM, Garner CC (2005) MECHANISMS OF VERTEBRATE SYNAPTOGENESIS. *Annu Rev Neurosci* 28:251–274.
183. Wang Q, Yu S, Simonyi A, Sun GY, Sun AY (2005) Kainic Acid-Mediated Excitotoxicity as a Model for Neurodegeneration. *Mol Neurobiol* 31:003-016.
184. Wang R, Dineley KT, Sweatt JD, Zheng H (2004) Presenilin 1 familial Alzheimer's disease mutation leads to defective associative learning and impaired adult neurogenesis. *Neuroscience* 126:305–312.
185. Warner-Schmidt JL, Madsen TM, Duman RS (2008) Electroconvulsive seizure restores neurogenesis and hippocampus-dependent fear memory after disruption by irradiation. *Eur J Neurosci* 27:1485–1493.
186. Wentz CT, Magavi SSP (n.d.) Caffeine alters proliferation of neuronal precursors in the adult hippocampus. *Neuropharmacology* 56:994–1000.
187. Wieloch T, Nikolich K (2006) Mechanisms of neural plasticity following brain injury. *Curr Opin Neurobiol* 16:258–264.
188. Winocur G, Wojtowicz JM, Sekeres M, Snyder JS, Wang S (2006) Inhibition of neurogenesis interferes with hippocampus-dependent memory function. *Hippocampus* 16:296–304.
189. Wojtowicz JM, Askew ML, Winocur G (2008) The effects of running and of inhibiting adult neurogenesis on learning and memory in rats. *Eur J Neurosci* 27:1494–1502
190. Wolf SA, Boddeke HWGM, Kettenmann H (2017) Microglia in Physiology and Disease. *Annu Rev Physiol* 79:619–643.
191. Wu C-W, Chang Y-T, Yu L, Chen H, Jen CJ, Wu S-Y, Lo C-P, Kuo Y-M (2008) Exercise enhances the proliferation of neural stem cells and neurite growth and survival of neuronal progenitor cells in dentate gyrus of middle-aged mice. *J Appl Physiol* 105:1585–1594

192. Xu W, Sun X, Song C, Mu X, Ma W, Zhang X, Zhao C (2016) Bumetanide promotes neural precursor cell regeneration and dendritic development in the hippocampal dentate gyrus in the chronic stage of cerebral ischemia. *Neural Regen Res* 11:745.
193. Xu W (2011) PSD-95-like membrane associated guanylate kinases (PSD-MAGUKs) and synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 21:306–312.
194. Yang C-P, Gilley JA, Zhang G, Kernie SG (2011) ApoE is required for maintenance of the dentate gyrus neural progenitor pool. *Development* 138:4351–4362.
195. Zepeda A, Aguilar-Arredondo A, Michel G, Ramos-Languren LE, Escobar ML, Arias C (2013) Functional recovery of the dentate gyrus after a focal lesion is accompanied by structural reorganization in the adult rat. *Brain Struct Funct* 218:437–453.
196. Zepeda A, Sengpiel F, Guagnelli MA, Vaca L, Arias C (2004) Functional reorganization of visual cortex maps after ischemic lesions is accompanied by changes in expression of cytoskeletal proteins and NMDA and GABA(A) receptor subunits. *J Neurosci* 24:1812–1821
197. Zhao C, Teng EM, Summers RG, Ming G-L, Gage FH (2006) Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *J Neurosci* 26:3–11
198. Zhu L, Zhao T, Li H, Zhao H, Wu L, Ding A, Fan W, Fan M (2005) Neurogenesis in the adult rat brain after intermittent hypoxia. *Brain Res* 1055:1–6.
199. Zussy C, Loustalot F, Junyent F, Gardoni F, Bories C, Valero J, Desarmenien MG, Bernex F, Henaff D, Bayo-Puxan N, Chen J-W, Lonjon N, de Koninck Y, Malva JO, Bergelson JM, di Luca M, Schiavo G, Salinas S, Kremer EJ (2016) Coxsackievirus Adenovirus Receptor Loss Impairs Adult Neurogenesis, Synapse Content, and Hippocampus Plasticity. *J Neurosci* 36:9558–9571.

8. ANEXOS

Functional recovery of the dentate gyrus after a focal lesion is accompanied by structural reorganization in the adult rat

Angélica Zepeda · Andrea Aguilar-Arredondo ·
Gabriela Michel · Laura Elisa Ramos-Languren ·
Martha L. Escobar · Clorinda Arias

Received: 25 October 2011 / Accepted: 14 March 2012 / Published online: 6 April 2012
© Springer-Verlag 2012

Abstract The adult brain is highly plastic and tends to undergo substantial reorganization after injury to compensate for the lesion effects. It has been shown that such reorganization mainly relies on anatomical and biochemical modifications of the remaining cells which give rise to a network rewiring without reinstating the original morphology of the damaged region. However, few studies have analyzed the neurorepair potential of a neurogenic structure. Thus, the aim of this work was to analyze if the DG could restore its original morphology after a lesion and to establish if the structural reorganization is accompanied by behavioral and electrophysiological recovery. Using a subpileptogenic injection of kainic acid (KA), we induced a focal lesion in the DG and assessed in time (1) the loss and recovery of dependent and non dependent DG cognitive functions, (2) the anatomical reorganization of the DG using a stereological probe and immunohistochemical markers for different neuronal maturation stages and, (3) synaptic plasticity as assessed through the induction of in vivo long-term potentiation (LTP) in the mossy fiber pathway (CA3-DG). Our results show that a DG focal lesion with KA leads to a well delimited region of neuronal loss, disorganization of the structure, the loss of associated mnemonic functions and the impairment to elicit LTP. However, behavioral and synaptic plasticity expression

occurs in a time dependent fashion and occurs along the morphological restoration of the DG. These results provide novel information on neural plasticity events associated to functional reorganization after damage.

Keywords Excitotoxicity · LTP · Damage · Contextual fear memory · Plasticity · Hippocampus

Introduction

The central nervous system is a plastic structure which may reorganize as a consequence of naturally occurring events, such as learning and memory, but also in response to injury. It is now well established that central nervous system lesions lead to functional loss, but that remaining cells may display plastic adaptations that contribute to the recovery of the function (Nudo et al. 1996; Carmichael and Chesselet 2002; Zepeda et al. 2004; Brown et al. 2007; Winship and Murphy 2008; Sigler et al. 2009). However, reinstatement of the original morphology of the damaged structure does not necessarily accompany such recovery (Zepeda et al. 2004). Recently in view of the continuous generation of new neurons in the adult mammalian subventricular zone (SVZ) (Doetsch and Alvarez-Buylla 1996) and dentate gyrus of the hippocampus (DG) (Kuhn et al. 1996), the process of neurogenesis has gained attention as a possible mechanism for neurorepair. Thus, the DG represents a unique structure to evaluate the impact of plastic events on functional and morphological reorganization after injury given its cellular proliferative potential.

Several works have shown the increased production of endogenous progenitors in the SVZ and DG and the migration of new proliferating cells toward the lesion area in ischemia (Jin et al. 2001; Arvidsson et al. 2002; Parent

A. Zepeda (✉) · A. Aguilar-Arredondo · G. Michel · C. Arias
Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental,
Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional
Autónoma de México, AP 70-228, 04510 México, D.F., México
e-mail: azepeda@biomedicas.unam.mx

A. Zepeda · L. E. Ramos-Languren · M. L. Escobar
División de Investigación y Estudios de Posgrado,
Facultad de Psicología, Universidad Nacional Autónoma
de México, 04510 México, D.F., México

et al. 2002; Bendel et al. 2005) and epilepsy models (Bengzon et al. 1997; Gray and Sundstrom 1998; Nakagawa et al. 2000; Scharfman et al. 2000). However, naturally occurring structural and functional reorganization is still under debate (for a review see Zepeda et al. 2009).

Stimulation of adult neural progenitors leading to hippocampal morphological and functional reorganization has been achieved after infusion of growth factors (Nakatomi et al. 2002). However, regeneration of injured brain regions where proliferation occurs at a very low rate has not been shown to occur beyond doubt (for review see Okano and Sawamoto 2008). Plasticity in the hippocampus has been mainly shown to occur only when particular combinations of trophic factors are exogenously provided (Nakatomi et al. 2002) although these results have been challenged (Bendel et al. 2005; Sun et al. 2007; Ogita et al. 2005). Thus, it remains controversial whether naturally occurring neurorepair events (i.e. non-stimulated) may be sufficient to account for the morphological restoration of a damaged structure. Although few studies have shown that the DG tends to reorganize morphologically after damage in young (Dong et al. 2003) and adult rodents (Ogita et al. 2005; Hernandez-Ortega et al. 2007), the cellular mechanisms leading to such restoration and its time-dependent functional significance remain unknown.

Given that the DG constitutes a highly plastic structure which is clearly associated with cognitive functions such as the contextual fear memory, we evaluated the structural, behavioral and the long-term potentiation (LTP) of the DG after an excitotoxic focal lesion induced with kainic acid (KA) and addressed the time-dependent correlation between naturally occurring neuronal proliferation and maturation within the structure with functional recovery.

Our results show a time-dependent morphological reorganization of the DG which correlates with the restoration of its volume and is accompanied by modifications in histochemical markers associated to different stages of neuronal maturation. Moreover, induction of *in vivo* LTP in the DG-CA3 pathway along with functional recovery of DG dependent behavioral tasks was observed in a time-dependent manner.

Materials and methods

Animals

Adult male Wistar rats ($n = 54$), weighing between 250 and 300 g (3–4 months old) were used throughout the study and handled in accordance with local government rules and the Society for Neuroscience Guide for the Care and Use of Laboratory Animals with approval of the Animal Care Committee of the Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of subjects used. The total number of animals per group is shown in Fig. 1.

During the whole experimental procedure, four rats per cage were housed in a laboratory environment with an inverted 12 h artificial light/dark cycle with free access to water and food.

Lesion procedures

For all the experiments, animals were anesthetized with 2–3 % isoflurane in a mixture of 95 % O₂ and 5 % CO₂ and placed in a stereotaxic system (Stoelting, Wood Dale, Ill). The dentate gyrus (DG) of the hippocampus was localized according to bregma (Paxinos and Watson 1986): AP-3.8, LM-2.4, and DV-3.5. The excitotoxic lesion was induced by a unilateral injection of 1 μ l (0.75 nM) of kainic acid (KA; Sigma-Aldrich, Chemie, St. Louis, MO) at a rate of 1 μ l/min in the right DG. The KA was dissolved in 1 M NaOH pH 7.0–7.4, and the solution was brought to the desired volume with 10 mM phosphate buffer (pH 7.4). KA was infused using a micro syringe mounted on a microinjection pump (Stoelting, Co., Wood Dale, IL, USA). Sham animals received 1 μ l/min of 10 mM phosphate buffer. The skin was then sutured, anesthesia was discontinued, and animals were returned to their acrylic cages until the time of perfusion.

During the first hours after the experiment and for the days that followed, the rats were observed until the day of perfusion. None of the rats presented seizures at any time point and only scarce wet-rat shakes were observed in some rats during the first hour after KA infusion.

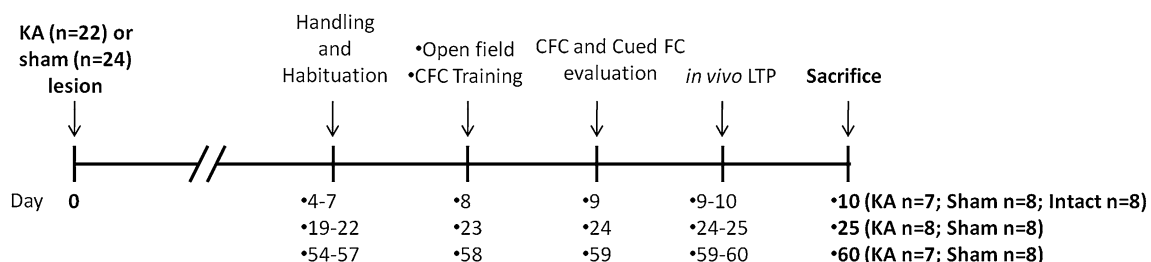


Fig. 1 Schematic representation of experimental procedures. On *top* of the time line, experimental procedures are depicted, on *bottom*, days corresponding to each procedure. *CFC* contextual fear conditioning, *cued FC* cued fear conditioning

Apparatus

Open field arena

For the open field motor activity task, an 80 cm long \times 80 cm wide \times 30 cm high black floor and wall acrylic arena was used. The arena was divided in 20 cm \times 20 cm squares for quantifiable locomotion recording.

Place recognition arena and objects

A 60 cm long \times 60 cm wide \times 30 cm height black floor and wall acrylic arena was used. Objects used for this task were plastic and glass boxes, lids and containers; all were 6–7 cm high, 4–10 cm wide and 4–10 cm deep.

Contextual fear-conditioning chamber

For the contextual fear-conditioning task, a conditioning chamber 25 cm long \times 25 cm wide \times 20 cm high was used (San Diego Instruments, San Diego, CA, USA). The walls and the roof consisted of transparent acrylic and the removable floor consisted of 23 stainless steel rods. The chamber was equipped with a matrix of 32 infrared beams at the level of the floor. Movements inside the chamber were registered by the interruption of a beam and the information was sent to a computer. The roof of the chamber was equipped with a speaker producing an 80 dB and 2 kHz sound.

Altered context chamber

The fear-conditioning chamber was employed with radical context modifications: the floor was covered with a white acrylic platform, the walls were covered on the outside with a black–white stripe pattern, an acrylic insert was vertically placed inside the chamber so it was divided in two triangular compartments, and a cherry scented ball of cotton was placed below the acrylic floor.

Behavioral testing

A schematic representation of the time line of experimental procedures is shown in Fig. 1.

Animals were tested during the dark cycle, the training and test room was dark and no visual cues were available. At day 4 ($n = 15$; KA = 7, sham = 8), 19 ($n = 16$; KA = 8, sham = 8) or 54 ($n = 15$; KA = 7, sham = 8) after the lesion and for three consecutive days, animals were habituated to the experimenter and to the open field arena. For the next 3 days, animals were trained and tested as follows: on day 7, 22 or 57 subjects were evaluated in a

place recognition task; on day 8, 23 or 58, motor behavior in the open field test was assessed and subjects were subsequently trained in contextual fear conditioning and on day 9, 24 or 59 postlesion, we evaluated contextual fear memory and cued fear memory in an altered context.

Behavioral procedures

Open field testing

To evaluate general motor performance animals were individually placed in one corner of the open field arena as previously described, and the arena was divided into 16 squares marked by white lines. Number of crossings was scored for 5 min.

Place recognition test

Place recognition is a spatial memory task particularly modulated by the CA1 of the hippocampus (Ennaceur et al. 1997; Brun et al. 2002; Mumby et al. 2002). Subjects were individually placed in the open field arena with two identical objects located in two opposite corners of the box at 25 cm distance from each corner. Subjects were allowed to freely explore the objects for 5 min (Acquisition period “A”) and then returned to their homepage for 15 min (this period constituted the retention interval), and the time (s) that the subject spent exploring each object was recorded. In the mean time, the objects and the arena were wiped with cleaning solution: 10 % EtOH, 10 % Extran (Merck, Darmstadt, Germany) diluted in water. After this period, one of the objects was located in a new position (novel location) while the other remained at the same location (familiar location). The subject was then allowed to explore both objects for 5 min (Recall period “R”). The session was recorded and exploring time was registered. A recognition index was obtained after calculating: time spent exploring the novel location/(time spent exploring the novel location + time spent exploring the familiar location).

Contextual fear memory

Contextual memories are modulated mainly by the hippocampal DG (Phillips and LeDoux 1992; Lee and Kesner 2004; Saxe et al. 2006). Briefly, a tone (conditioned stimulus) is paired to an electric shock (unconditioned stimulus) in a given context. As a consequence of the conditioning process, subjects develop a conditioned response of freezing, which reflects aversion and is defined as “total absence of movement except for those generated by breathing” (Phillips and LeDoux 1992). The task was performed in the fear-conditioning chamber previously described in the *Apparati* section. The task consisted of one

training and one evaluation session separated by 24 h. Eight, 23 or 58 days after the lesion, subjects were individually trained by placing them in the conditioning chamber where they were allowed to explore for 2 min (pretone) before the first pairing of tone–shock was delivered. The tone had a 20 s duration and co-terminated with a 2 s, and 1 mA foot-shock. Movement was recorded for the following 4 min and four consecutive tone–shock pairings were administered. The total duration of the training session was 22 min. 24 h later, subjects were evaluated for aversive contextual memory: animals were placed individually in the training context and freezing was scored for the entire 5 min session. Subjects were then returned to their home cages. After each session, the chamber was wiped with cleaning solution.

Cued fear memory

Two hours after evaluation in the aversive context, subjects were evaluated for cued aversive memory, which mainly depends on the basolateral amygdala (LeDoux et al. 1990). Each subject was placed in the altered context chamber for 400 s; the tone (20 s duration) used in the contextual fear-conditioning protocol was presented twice, 120 and 260 s after the session had started. No shock was administered and freezing was scored for the next 3 min.

Electrophysiological recordings

Mossy fiber (MF) pathway long-term potentiation (LTP)

After the last behavioral test, animals were prepared for electrophysiological recording for *in vivo* LTP. Electrophysiological recordings at the MF pathway were performed in anesthetized animals as previously described (Escobar et al. 1997, 2003; Gomez-Palacio-Schjetnan and Escobar 2008, 2010). Responses were recorded using a monopolar microinfusion electrode placed in the CA3 pyramidal layer of the dorsal hippocampus at the following stereotaxic coordinates: AP -2.9 mm, ML $+2.2$ mm, and DV -3.0 mm (Paxinos and Watson 1986). Responses were evoked using a bipolar electrode via direct and unilateral stimulation of the MF at the coordinates AP -3.5 mm, ML -2.0 mm, and DV -3.1 mm (Paxinos and Watson 1986). Low frequency responses were evoked once every 20 s throughout a 20 min baseline period, after which high frequency stimulation (HFS) (3 trains/100 Hz/1 s/20 s intertrain) was applied and evoked responses were collected for 3 h (Escobar et al. 1997; Schjetnan and Escobar 2010). Mossy fiber LTP was calculated as a percentage of change compared to the mean slope of the field potentials of the entire baseline period prior to the delivery of HFS.

Mossy fiber synapses express presynaptic inhibitory group II of metabotropic glutamate receptors (mGluRs). Thus, a criterion that allows to distinguish MF EPSPs from non-MF EPSPs as well as from area CA3 population spikes, is the selective reduction of this synaptic response caused by the metabotropic glutamate receptor II agonist, 2-(2,3-dicarboxy-cyclopropyl) glycine (DCG-IV).

Microinfusion of DCG-IV (0.5 μ l of 5 μ M in 5 min) was used at the end of the electrophysiological recordings to verify that the signal was generated by mossy fiber inputs (Calixto et al. 2003). DCG-IV was delivered via microinfusion electrodes which consisted on 33-gauge stainless steel epoxyite-covered cannulae coupled to polyethylene tubing through a 26-gauge stainless steel ring, connected to a Teflon-coated stainless steel wire (0.005-in. diameter). Polyethylene tubing was attached to a 10- μ l Hamilton syringe that was driven by a microinfusion pump (Cole Palmer Co. Vernon Hills, IL).

Histological procedures

All chemicals were purchased from Baker (Austin, Tx) unless otherwise stated. After 1, 10, 25 and 60 days of surgery, subjects were anesthetized with sodium pentobarbital and transcardially perfused with 250 ml of 0.9 % chilled saline followed by 250 ml of 4 % chilled formaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4). A group of three to five subjects per time point was evaluated for histological analysis. Brains were removed and left in fixative for an additional 24 h. They were successively transferred to 15 and 30 % sucrose, and 30 μ m coronal sections were cut in a cryostat (Microm HM550, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA); one of each five was mounted on gelatin covered slides and stained with cresyl violet. The rest of the sections were collected in 24-well plates (Corning, NY, USA) filled with cryoprotection solution (25 % ethylene glycol, 25 % glycerol, 50 % PB 0.2 M pH7.4) and stored at 4 °C until ready to be processed for immunohistochemical procedures.

Immunohistochemistry

Free floating sections were processed for brain lipid binding protein (BLBP), calretinin (CR), doublecortin (DCX), neuronal antigen (NeuN), glial fibrillary acidic protein (GFAP) and proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Table 1 describes the details of utilized antibodies.

Sections were washed three times for 10 min in PBS–Triton (0.3 %). All sections were then incubated at room temperature for 2 h in 5 % horse serum (1:25; Vector Laboratories, Burlingame, CA) diluted in 0.3 % Triton-X-100 in PBS, except for those treated for PCNA where the antigen was first recovered at 80 °C for 20 min in 10 mM

Table 1 Primary antibodies used for immunohistochemical procedures

Primary antibodies					
Antigen	Stage	Binding	Host	Dilution	Company
Brain lipid binding protein (BLBP)	Neural progenitors	Cytoplasmic proteins	Rabbit	1:500	Chemicon; Billerica, MA, USA
Calretinin (CR)	Early postmitotic neurons	Calcium-binding protein	Rabbit	1:500	Swant; Marly 1 Switzerland
Doublecortin (DCX)	Migratory neuroblasts	Microtubules	Goat	1:400	Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, CA, USA
Glial fibrillary acidic protein (GFAP)	Radial glia and mature astrocytes	Intermediate filament proteins	Rabbit	1:1,000	DAKO; Glostrup, Denmark
Neuronal nuclei (NeuN)	Postmitotic neurons	Nuclear proteins	Mouse	1:800	Sigma; St. Louis, MO, USA
Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)	Proliferation	DNA polymerase delta auxiliary protein	Mouse	1:1,000	DAKO; Glostrup, Denmark

Table 2 Secondary antibodies used for immunohistochemical procedures

Secondary antibodies				
Antibody	Host	Dilution	Company	
CY3, CY5 and FITC anti-rabbit. anti-goat and anti-mouse.	Donkey	1:500	Jackson Immuno Research; West Grove, PA, USA	
Dylight 594 anti-goat	Donkey	1:600	Jackson Immuno Research; West Grove, PA, USA	
Alexa Fluor 488 anti-mouse	Donkey	1:500	Invitrogen; Carlsband, CA, USA	
Alexa Fluor 546 anti-rabbit	Donkey	1:250	Invitrogen; Carlsband, CA, USA	

sodium citrate solution, pH 6.0. After blocking, sections were incubated overnight at 4 °C in anti NeuN or in combination of two primary antibodies, BLBP/PCNA or DCX/CR or DCX/NeuN or GFAP/NeuN (see Table 1 for details) diluted in blocking solution. Sections were washed three times for 10 min with PBS and then incubated for 1 h at room temperature with the corresponding secondary antibodies (see Table 2) diluted in blocking solution. In some cases, sections were counterstained with DAPI (1 µg/ml) (Invitrogen, Carlsbad, CA). Sections were mounted in Superfrost glass slides (Thermo Scientific, Waltham; MA) with the antifading medium; 1,4-diazabicyclo octane solution (DABCO) (Sigma, St. Louis, MO).

Confocal microscopy and image analysis

Histological sections where cell counting was performed were captured and analyzed using the Zeiss LSM5 confocal microscope (Oberkochen, Germany). Cell counting was performed on three to four 20 µm sections from three animals for each experimental condition. Each section analyzed was separated by 40 µm from the next and contained information from a 14 µm optical section in the axial plane. Four fields per section at a 40× magnification within the granular layer were randomly analyzed for the

different cell markers. Sections in which counting was performed corresponded to the injured region (as observed by the disorganized granular layer) and were contained within coordinates AP −3.14 and −4.30 mm according to Paxinos and Watson (1986). Images were exported to Image J software (version 1.42q, Wayne Rasband, National Institutes of Health); the number of positive cells per optical field was recorded and average was calculated. A student's *t* test was performed to validate significant differences between sham and lesion groups.

Volumetric analysis of the Dentate Gyrus

Dentate granule cell layer volume of Nissl stained and NeuN immunohistochemically processed sections was calculated using a stereological method, the Cavalieri Estimator Protocol from StereoInvestigator software (MBF Bioscience, Inc., Williston, VT). 12 sections per animal each separated by 120 µm and contained within AP −3.2 and −4.8 were randomly evaluated. The contour of the DG from all sections was delineated, the volume of the granular layer from each subject was automatically calculated and the average per group (10, 25, or 60 day postlesion; sham and KA) was obtained and reported in mm³. Contours were exported to NeuroLucida software (MBF

Bioscience Inc., Williston, VT) and reconstructions from the DG were produced to create a visual model of the volume of the structure.

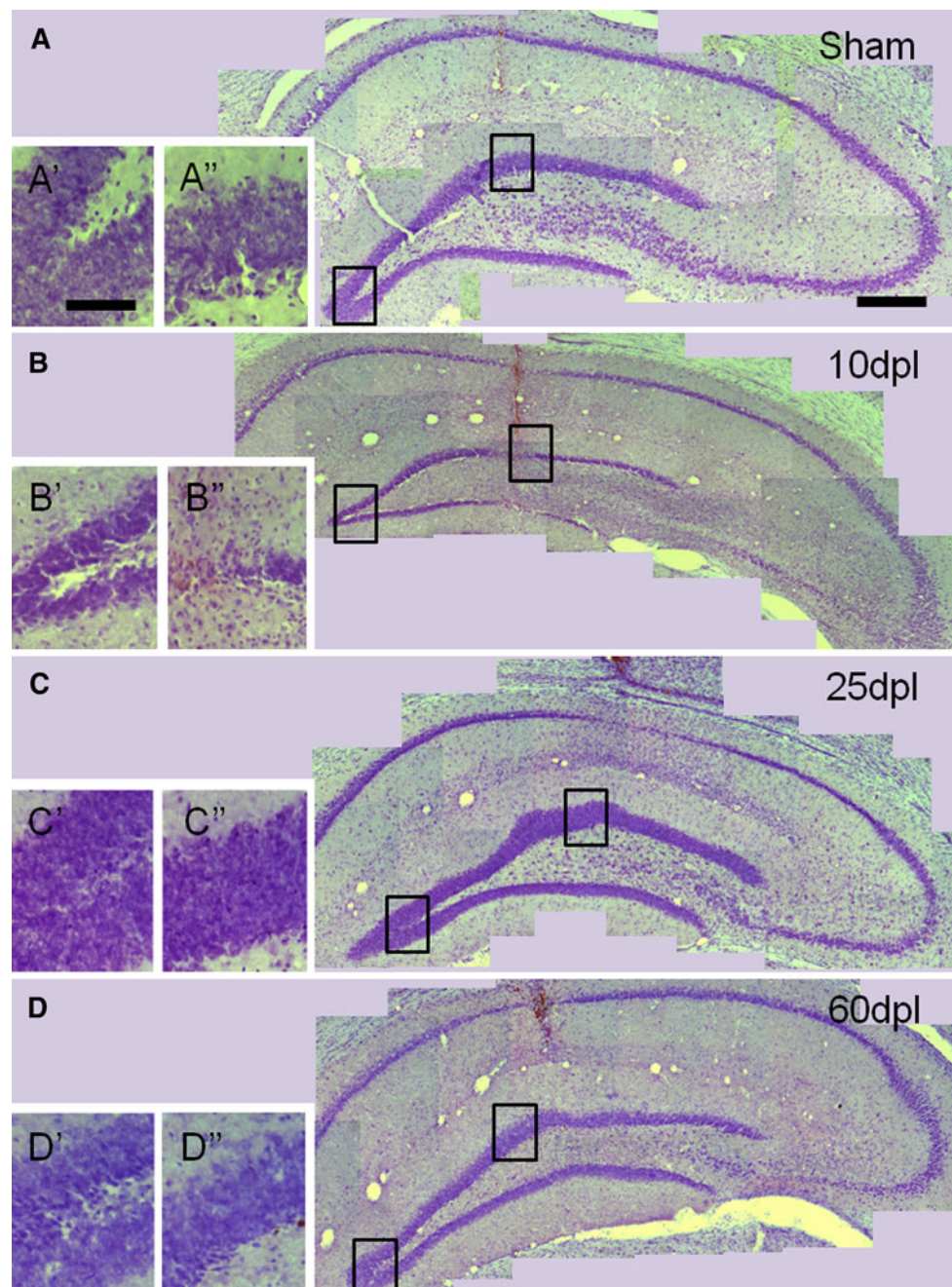
Results

Excitotoxic focal lesion in the dentate gyrus in time

The evidence of the lesion as assessed through Nissl staining is shown in Fig. 2. Coronal sections show a well-

delimited region in the DG where granular cells were absent or where the morphology of the DG in animals killed 10 days postlesion (dpl) was altered as compared to the sham group (Fig. 2a, b); this observation was true for 6/7 subjects. At 25 dpl, the DG dorsal layer appeared continuous, but with slight deformations (Fig. 2c) and in 7/7 animals killed at 60 dpl the DG appeared completely reorganized (i.e. the lesion site was not evident) throughout the anteroposterior and dorsoventral axes (Fig. 2d). Well-delimited and sparse neuronal death was also observed in the CA1 and CA3 subfields, respectively; damage was still

Fig. 2 Reconstruction of Nissl stained dentate gyrus coronal sections captured at $\times 10$ were assembled to reconstruct the DG. **a** sham, **b** 10 dpl, **c** 25 dpl, **d** 60 dpl. *Insets* show a $\times 40$ magnification of the region shown in *black frames*. *A'–D'* correspond to the crest of the DG and *A''–D''* correspond to the dorsal layer of the DG



evident in these regions until 25 and 60 dpl corroborating the selectivity of DG morphological reorganization (Fig. 2b–d).

A volumetric analysis using the Cavalieri probe (MBF, Bioscience Inc., Williston, VT) for measuring the DG (Fig. 3a) showed that the average granular layer volume in the 10 dpl group was significantly diminished as compared to the sham, 25 and 60 dpl groups ($F_{(3,15)} = 11.232$; $p < 0.01$, one way ANOVA). However, the DG volume from the 25 dpl group did not differ from the sham or 60 dpl groups (Fig. 3b). All the Cavalieri analyses yielded a Gundersen coefficient <0.05 (Table 3) (Gundersen and Jensen 1987). These results show that the granular layer recovers its original volume with time after the lesion.

Morphological reorganization of the DG

To analyze cellular proliferation and neuronal maturation events associated to the morphological reorganization of the DG, a multiple immunofluorescence and confocal microscopy analysis for DCX- and CR-positive neurons and NeuN-positive nuclei was performed in brains from animals killed at 1, 10 and 60 dpl. DCX is a microtubule marker widely used to evaluate neurogenesis levels, as its expression occurs in neuronal committed newly born cells (Rao and Shetty 2004; Couillard-Despres et al. 2005), whereas CR expression relates to an early postmitotic step of neuronal differentiation (Kempermann et al. 2003). The DG of animals that received a KA injection and were killed at 1 dpl, showed a twofold increase in DCX expression as compared to sham subjects ($p < 0.05$; t test). Such increase progressed reaching the highest level both in the ipsi and contralateral sides to the lesion at 10 dpl. A student's t test showed significant differences between 10 dpl and sham groups ($p < 0.05$) (Fig. 4a–c and right middle panel). After 60 dpl, when the DG appeared completely restructured, the number of DCX-positive cells was similar to that observed in the hippocampus from sham animals (Fig. 4d and right middle panel). In sham animals, DCX-positive cells

exhibited the phenotype of undifferentiated granule cells with short dendrites mostly oriented horizontally toward the SGZ (Fig. 4e). In addition to the rise in DCX-positive cell number at 1 dpl, a more differentiated phenotype was observed and consisted in an increased number of elongated dendrites vertically oriented toward the granular cell layer (Fig. 4f) which contrasted with the short and horizontally oriented neurites found in sham injected animals. At 10 dpl, there were abundant DCX-expressing dense cell clusters in the SGZ (Fig. 4g), suggesting that an intense process of neuronal proliferation was taking place. However, at 60 dpl, the total number and the appearance of DCX-positive cells returned to control levels (Fig. 4h and right middle panel). Although KA was applied unilaterally, an increase in markers of cell proliferation was also observed in the intact hemisphere. It is thus conceivable that the neuronal excitation elicited by KA might propagate to the contralateral hippocampus through commissural fibers and transiently increase cell proliferation without producing structural changes (Fig. 4, bottom panel). In this sense, it has been reported that the unilateral administration of neurotoxic compounds leads to the expression of stress

Table 3 Volume and Gundersen's coefficient corresponding to the average per group of the granular layer of the DG

Group	Volume granular cell layer (mm ³)	Gundersen's coefficient
Sham/intact	0.667 ($n = 5$)	0.010
10 dpl	0.305 ($n = 4$)**	0.021
25 dpl	0.547 ($n = 4$)	0.016
60 dpl	0.633 ($n = 6$)	0.015

Data show mean \pm S.E.M. of the volume of the granular layer of the DG and the corresponding Gundersen's coefficient of error. Volume of dentate granular layer of 10 dpl group is diminished and differs from that of sham, 25 and 60 dpl groups ($F_{(3,15)} = 11.232$; ** $p < 0.01$; one way ANOVA). No differences among the rest of the groups were observed

Fig. 3 Visual modeling and volumetric analysis of the dentate gyrus. **a** NeuroLucida projection from a Nissl stained coronal section showing the DG of a sham animal, **b** stereological analysis of the granular layer of the DG reveals that the volume in the 10 dpl group significantly differs from sham, 25 and 60 dpl ($F_{(3,15)} = 11.232$; ** $p < 0.01$)

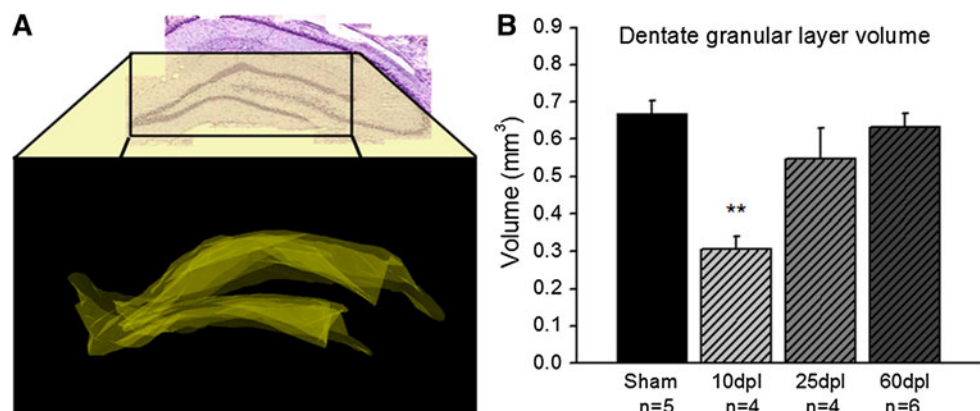
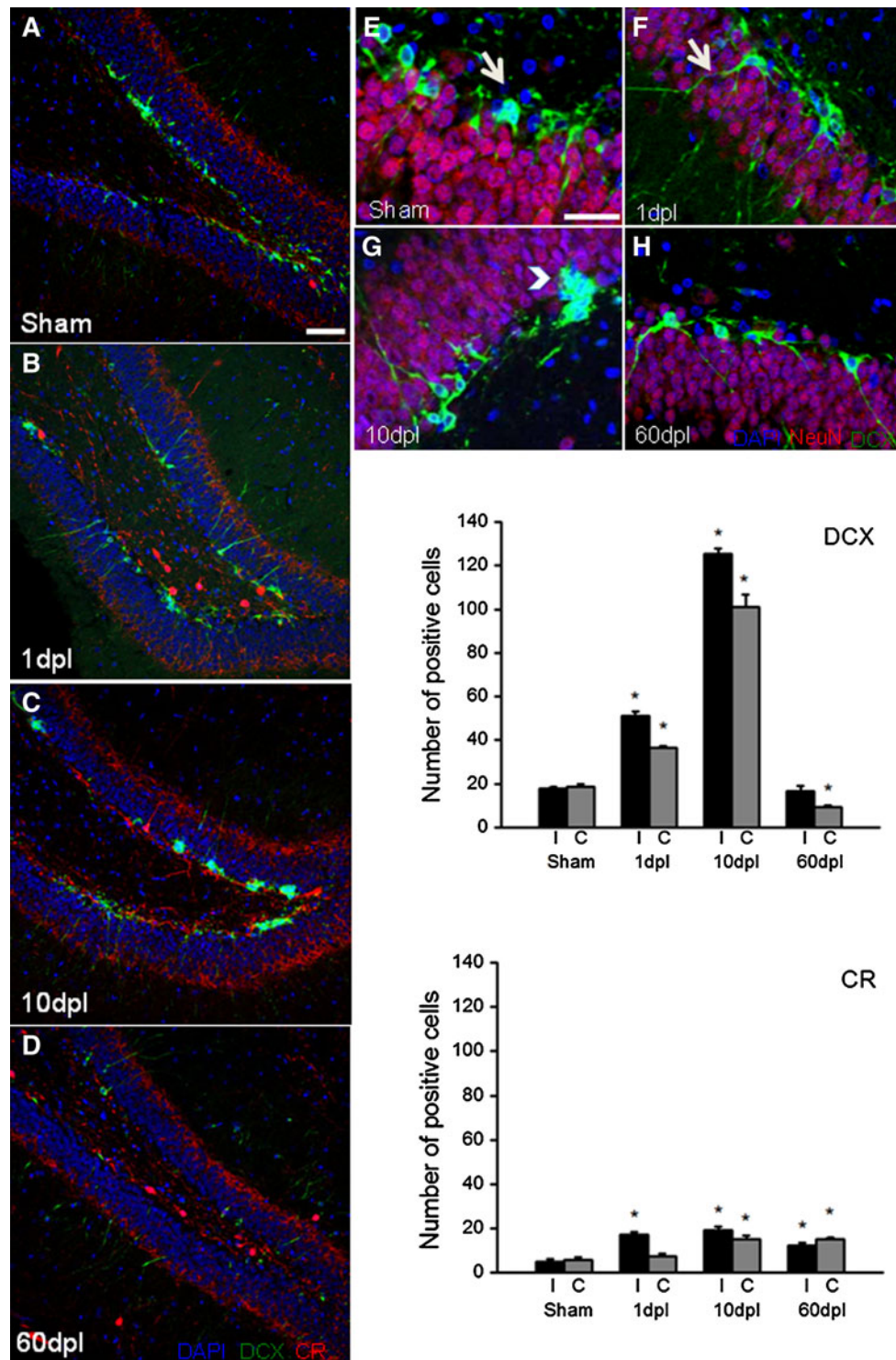


Fig. 4 Immunohistochemistry for doublecortin (DCX) and calretinin (CR) in coronal sections from an injured DG. Blue, cell nuclei stained with DAPI. DCX (green) and CalR (red) (a–d). Representative sections from a sham lesion animal (a); and subjects killed at 1 dpl (b); 10 dpl (c) and; 60 dpl (d). e–h Higher magnifications of different regions of the DG from a sham animal and subjects killed at 1 dpl (f), 10 dpl (g) and 60 dpl (h); DCX (green), NeuN (red). Arrows point at morphological differences between DCX-positive cells from a sham subject (e) and another killed 1 dpl (f); arrowhead indicates the appearance of DCX-expressing dense cell clusters at 10 dpl (g). Photomicrographs are representative of 3–4 sections from 3–5 different animals of each experimental group. Values represent mean \pm S.E.M. of three different experiments where DCX-positive cells (right middle panel) and CalR-positive cells (right bottom panel) were counted; I ipsilateral, C contralateral. Asterisks denote significant differences as compared to sham (student's *t* test) $p < 0.05$. Scale bars 50 μ m



proteins in the intact hemisphere (Arias et al. 1998; Ayala and Tapia 2008).

The inner molecular and infragranular layers of the DG displayed CR immunoreactivity in sham animals (Fig. 4a). A three-fold increase in CR-positive cells was observed as

soon as 1 dpl and until 60 dpl in the SGZ as well as in the hilus (Fig. 4b–d and right bottom panel). Interestingly, after 10 and 60 dpl, the CR immunoreactivity was also strongly observed in the inner molecular and infragranular layers of DG. Increase in CR expression was significantly

different from the sham group at all time points in the ipsilateral DG, but also in the contralateral DG at 10 dpl ($p < 0.05$; t test).

To determine changes in the contents of neural progenitor cells, we performed a quantitative analysis of BLBP-positive cells in view that this protein is considered as a specific marker of radial glia-like cells in the SGZ (Steiner et al. 2006). At 1 dpl, few BLBP/PCNA-positive co-localizing cells were observed (Fig. 5b). The content of BLBP-positive cells significantly increased at 10 dpl in the damaged DG (including the SGZ and the hilus) as compared to the sham group ($p < 0.05$; t test) (Fig. 5a–c and right middle panel), and at 60 dpl, labeling of this marker returned to basal levels (Fig. 5d).

The proliferation cell nuclear antigen (PCNA) showed an increase from day 1 to 60 postlesion as compared to sham levels ($p < 0.05$, t test) (Fig. 5a–d) reaching the highest point at 10 dpl (Fig. 5c and right bottom panel). However, colocalization with BLBP was mostly evident at 1 dpl (Fig. 5e–h).

To evaluate the presence of the glial response to damage, we analyzed GFAP-positive cells. Figure 6 shows the distribution of radial glia-like cells in the sham DG. Loss of GFAP-positive cells became evident as soon as 1 dpl in the SGZ (compare Fig. 6A, a with B,b) and processes in remaining cells shortened and diminished in number. However, at 10 dpl radial glia-like cells became distinguishable again (compare Fig. 6a with c). Remarkably, the GFAP-positive astrocytic response typical of damage was confined to the hilus but was not observed within the injured SGZ region (Fig. 6B, C).

To further analyze the cellular contents of the reorganized region, we performed a NeuN immunohistochemistry at all time points. Interestingly the DG of 6/7 animals killed at 10 dpl showed an area devoid of NeuN-positive nuclei (compare Fig. 7a, b) within the granular layer, whereas at 25 and 60 dpl none of the analyzed sections showed such a region, instead NeuN-positive cells were uniformly distributed along the DG in the whole AP axis (Fig. 7c, d). Moreover, the hilar region appeared devoid of NeuN-positive cells at 10 and 25 dpl, while scarce cells were observed at 60 dpl. Thus, structural reorganization at the later time points studied seems to be particular of the granular layer of the DG.

Focal dentate gyrus lesion impairs contextual fear memory, but functional recovery occurs in time

To address the functional impact of the lesion on behavior, we evaluated all groups in the cued fear memory and contextual fear memory tasks. Cued memory is known to rely on the amygdala, whereas contextual fear memory depends on the hippocampus and particularly on the DG (Phillips

and LeDoux 1992). Intact, sham and lesioned animals received five tone–shock pairings in a single session. Figure 8a shows that in the 2 min lapse before the tone–shock pairing, subjects displayed a normal movement behavior, which translates into low percentage of freezing. However, freezing increased gradually after each pairing in all groups, thus animals were successfully conditioned regardless of the time postlesion when they were trained (Fig. 8b). No significant differences in freezing were obtained among groups ($F_{(6,47)} = 1.309$, $p = 0.1624$, repeated measures ANOVA). 24 h after the training session, animals were evaluated for contextual fear memory and, 2 h later, in cued fear memory in an altered context. Figure 8c shows that cued fear memory was preserved in all lesion groups (i.e. percentage of freezing time was not different from sham groups at any time point) ($F_{(6,47)} = 0.827$, $p = 0.55$, factorial ANOVA). These results differed from those observed after evaluating contextual fear memory. Figure 8d shows that only the 10 dpl group spent significantly less time freezing than its control group in the aversive context ($F_{(6,47)} = 13.587$, $p < 0.0001$, factorial ANOVA) whereas freezing time in such context in the 25 and 60 dpl groups was not significantly different from the sham or intact groups, thus revealing an initial loss and a subsequent functional recovery of the impaired behavior.

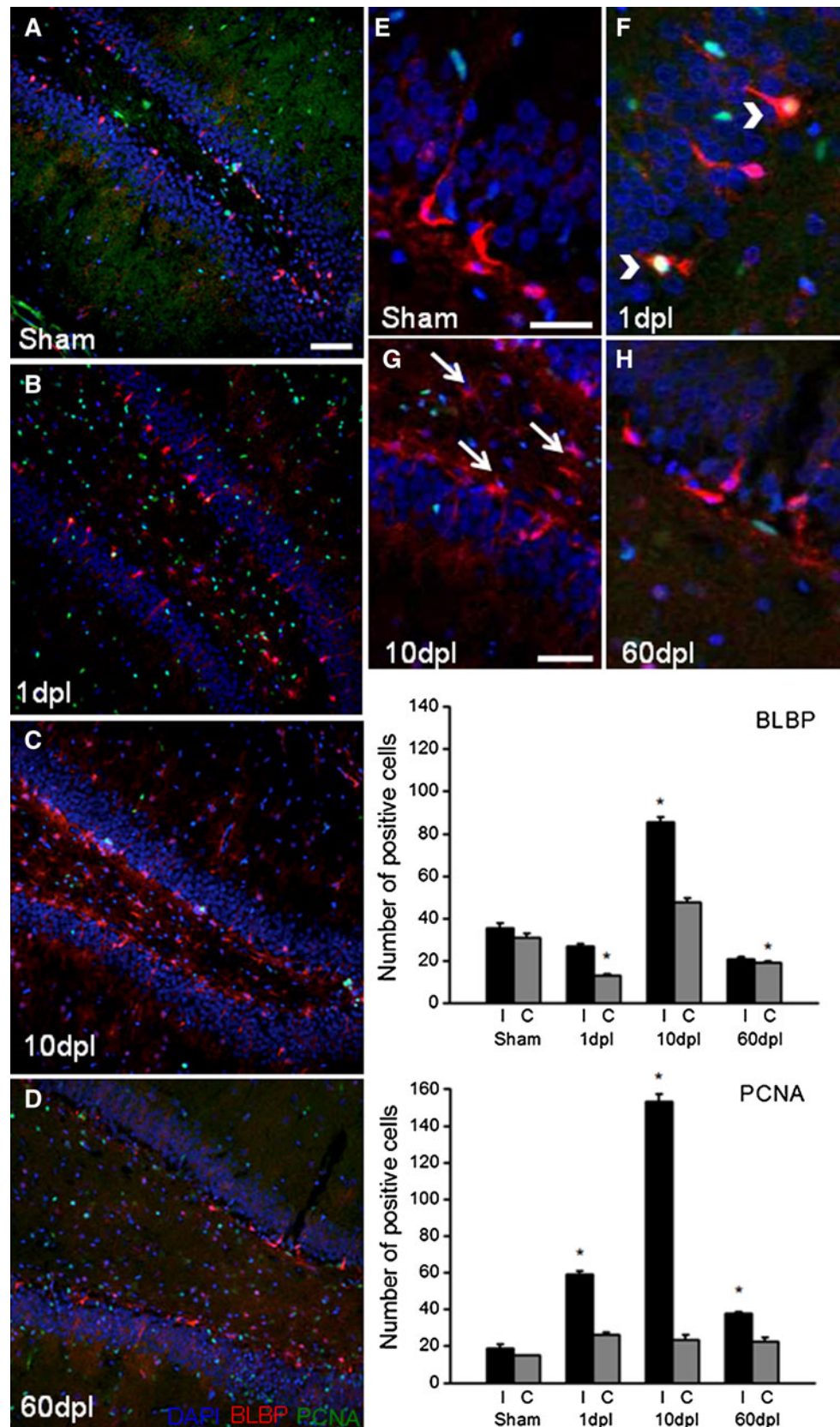
Given that freezing behavior implies lack of movement, we tested the animals in the open field test to guarantee that freezing was not caused by motor alterations or by the lack of interest in exploring the environment. Figure 9a shows no significant differences in the number of visited squares in the open field test among groups at any time point evaluated thereby confirming that freezing was dependent on the conditioning and not on motor impairment or emotional distress.

In addition, we explored the functional outcome of the lesion in the place recognition task which has been shown to be particularly modulated by the CA1 subfield of the hippocampus. Figure 9b shows that place memory was not impaired by the DG lesion at any time point evaluated and that injured animals spent a similar amount of time exploring the new location of a known object as the sham and intact groups ($F_{(6,47)} = 0.304$, $p = 0.9316$, repeated measures ANOVA). Thus, the deficit provoked by the lesion was restricted to a function mainly modulated by the DG.

Long-term potentiation recovers in time

To evaluate whether behavioral recovery and structural reorganization correlated with synaptic plasticity of the DG, we induced high frequency LTP in vivo on the mossy fiber pathway (DG-CA3). Figure 10a (top left panel) shows a schematic representation of the mossy fiber pathway and

Fig. 5 BLBP-positive glia-like neuroprecursor cells in DG at different time points after KA lesion. Coronal sections showing a triple immunofluorescence of BLBP cells (red), DAPI-labeled cell nuclei (blue) and proliferating cells with PCNA (green) (a–d). At higher magnifications of regions shown in a–c, BLBP-positive cells with PCNA nuclei were observed at 1 dpl (f, arrowhead), but not at 10 or 60 dpl (g–h). At 10 dpl a robust increase of BLBP was evident in the subgranular zone and in the hilar region (g, arrows). Quantification of cell number positive to BLBP and PCNA in the injected (I) and contralateral hippocampus (C) is shown. Photomicrographs are representative of 3–4 sections from 3–5 different animals of each experimental group. Values represent mean \pm S.E.M. of three different experiments. Asterisks denote significant differences as compared to sham (student's *t* test) $p < 0.05$. Scale bars 50 μ m



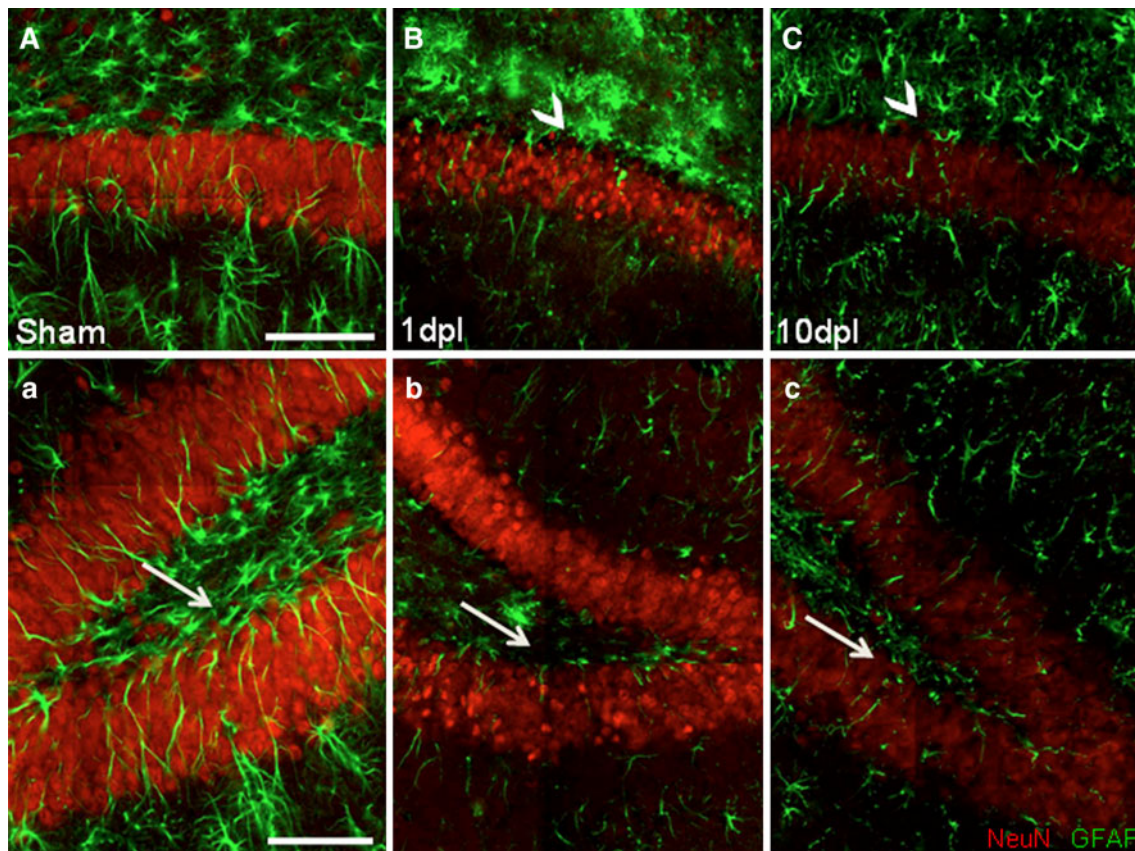


Fig. 6 GFAP positive cells at 1 and 10 d after KA lesion. Coronal sections labeled with NeuN (red) and GFAP (green) of sham injected animals show the presence of radial-like glial cells (A and a). At 1 dpl, GFAP-positive radial processes shortened and diminished in number (arrow, compare a and b) and at this time point as well as at

10 dpl a gliotic reaction was observed in the injured dorsal blade of DG without entering into the granular cell layer (B, C arrowheads). At 10 dpl some radial-like glial cells became evident (arrow, c). Photomicrographs are representative of 3–4 sections from 3–5 different animals per group. Scale bars 40 μm

electrode placement. The CA3 EPSP consisted of potentials of 0.38 ± 0.07 mV (mean \pm SEM) elicited with 20–40 μA current pulses of 0.1–0.25 ms duration. These responses began at 1.8–3.3 ms poststimulation and presented their valley at 7.1 ms with an average slope of 0.15 ± 0.007 (mean \pm SEM) in agreement with previous studies (Escobar et al. 1997; Gomez-Palacio-Schjetnan and Escobar 2008; Schjetnan and Escobar 2010). Microinfusion of DCG-IV at the end of the electrophysiological recordings selectively blocked mossy fiber responses to 15 % of baseline signals, presenting potentials of 0.09 ± 0.02 mV with a mean slope of 0.06 ± 0.001 (mean \pm S.E.M.), verifying that the signal was generated by mossy fiber inputs (Fig. 10a, right panel).

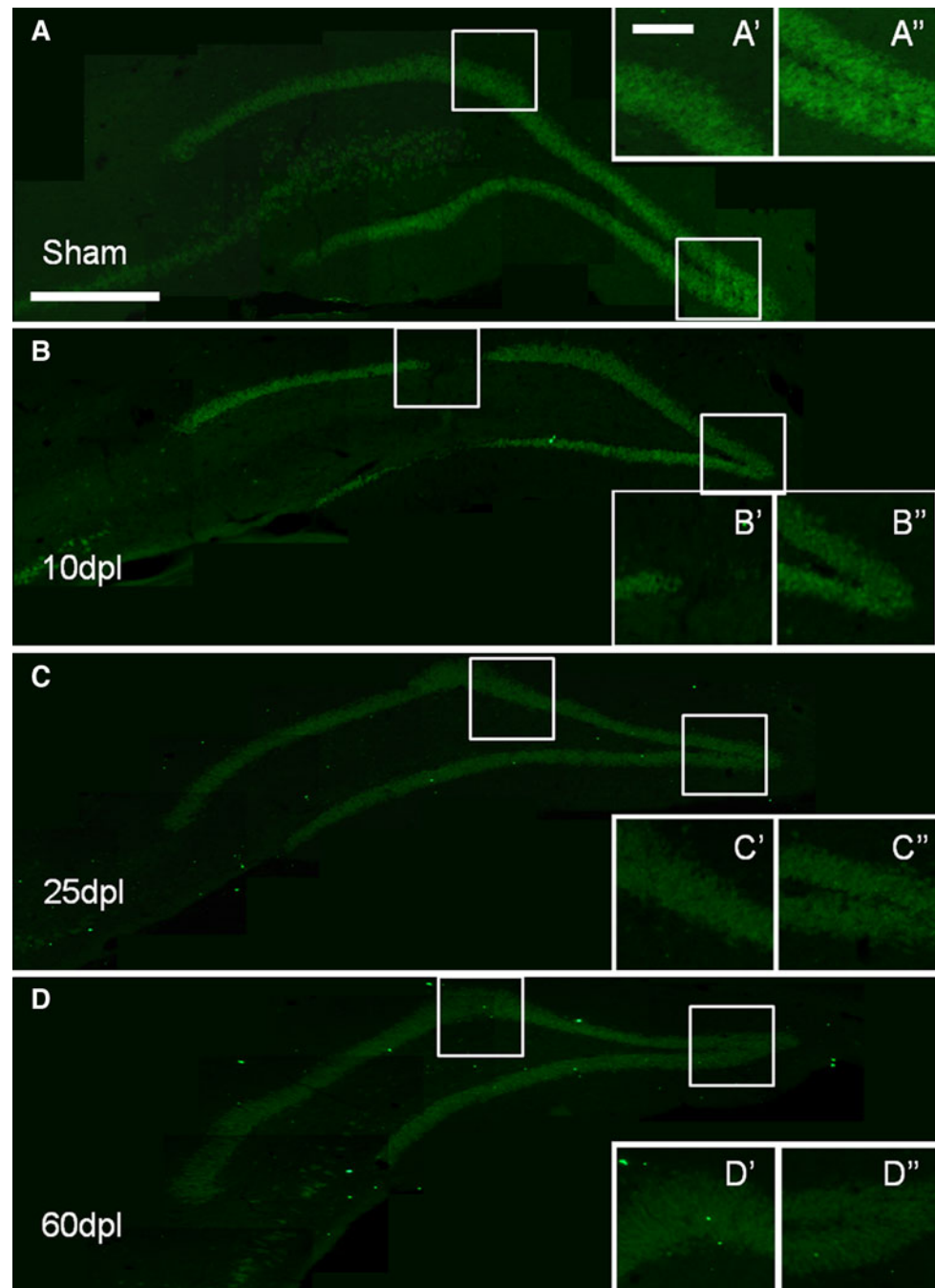
The present results show that high frequency stimulation (HFS) (three trains 100 Hz/1 s/20 s intertrain) was capable of inducing LTP at the DG-CA3 pathway in adult rats in vivo in accordance with previous studies (Escobar et al. 1997; Gomez-Palacio-Schjetnan and Escobar 2008; Schjetnan and Escobar 2010). Mossy fiber LTP was characterized by a slow initial increase in the EPSP slope that has been related to the independence of NMDA receptors

activation and opioid peptide relevant modulation (Derrick et al. 1991, 1992; Escobar et al. 1997). At 1 h post-stimulation, the intact group presented a mean EPSP increase (mean \pm SEM) of 147.71 ± 1.45 (Fig. 10b). However, at 10 dpl DG-CA3-LTP could not be elicited (Fig. 10c), as opposed to the 10-day sham lesion group (Fig. 10d). Repeated-measures ANOVA for slope increases revealed significant differences among groups ($F_{6,23} = 7.15$) and a post hoc Fisher's test showed significant differences between the 10 dpl group and all of the other groups ($p < 0.001$). Interestingly, at 25 and 60 dpl, LTP could be elicited and did not differ from the corresponding sham or intact groups (Fig. 10e–h). HFS-induced potentiation was not associated with after discharges or other overt epileptiform activity as assessed by the continuously recorded hippocampal EEG (data not shown).

Discussion

In this study, we show that the DG is capable of reorganizing functionally and structurally in time after

Fig. 7 NeuN immunohistochemistry reveals the morphological reorganization of the DG in time. Six to seven images captured at $\times 10$ were assembled to reconstruct the DG. **a** Sham; **b** 10 dpl; **c** 25 dpl; **d** 60 dpl; scale bar 400 μm . Insets show a $\times 40$ magnification of the region shown in white frames. *A'*, *B'*, *C'* and *D'* correspond to the dorsal layer of the DG and *A''*, *B''*, *C''* and *D''* correspond to the crest of the DG; scale bar 100 μm



undergoing a unilateral focal lesion and that reorganization relied exclusively on endogenous mechanisms. We demonstrate that the granular cell layer of DG is able to repopulate after a focal lesion and that the structural reorganization correlated in time with the recovery of contextual memory function and with *in vivo* restoration of LTP in the DG-CA3 pathway.

It is feasible that newly added granule cells played a role in this remodeling process, as we detected a long-lasting increase in hippocampal neurogenic markers corresponding in time with the refill of the lesion site. We evaluated

several markers to make a follow up of the morphological reorganization process. Cells in the SGZ expressing BLBP are undifferentiated, radial glia-like neural stem cells (Suh et al. 2007). As early as 24 h after the lesion, few BLBP-positive cells with PCNA-positive nuclei were already present reaching the highest levels at 10 dpl. Thus, the beginning of proliferation of these precursors started soon after the lesion. PCNA remained high at all time points as compared to sham levels reflecting proliferation of several kinds of cells, but also likely suggesting an ongoing process of DNA repair (Eisch and Mandyam 2006).

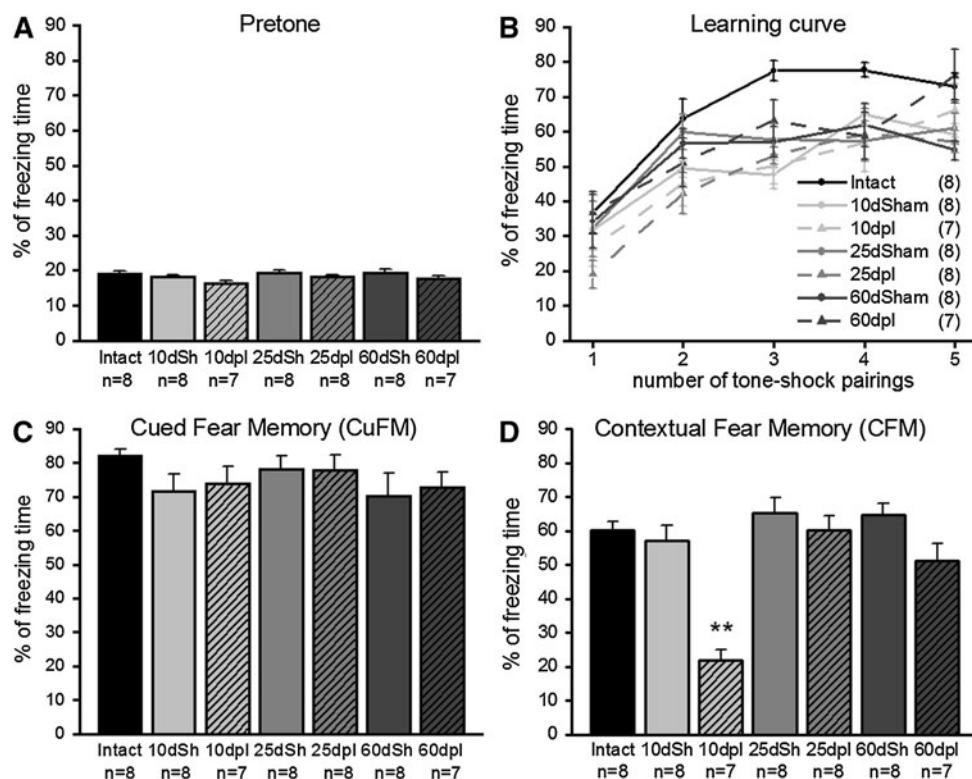


Fig. 8 Contextual fear-conditioning recovery in time. **a** Freezing percent of time spent during the pretone period (120 s). All groups displayed a similar low percentage ($F_{(6,47)} = 1.312$, $p = 0.27$; factorial ANOVA) of freezing in the conditioning context before the tone–shock pairings were administered. **b** Percentage of time spent freezing during the conditioning session. All groups increase the freezing time according to the presentation of tone–shock pairings; “*n*” per group is depicted in parenthesis. ($F_{(6,47)} = 1.309$,

$p = 0.1624$, Repeated measures ANOVA). **c** Evaluation of freezing in the cued fear memory task, all groups display an elevated percentage of time spent freezing which did not differ among each other ($F_{(6,47)} = 0.827$, $p = 0.55$; factorial ANOVA). **d** Freezing behavior in the contextual fear memory task. Significant differences were observed between 10dpl and the rest of the groups ($F_{(6,47)} = 13.587$, $**p < 0.0001$; factorial ANOVA)

As soon as 24 h after KA injection, we also detected the increase in DCX-positive cells with vertically oriented cellular processes as opposed to the short and horizontally oriented neurites found in sections from sham animals. This occurred prior to a robust rise in cells expressing BLBP in agreement with the idea that most radial glial-like cells are quiescent and only a short subset is recruited to proliferate (Ledergerber et al. 2006). Thus, a group of DCX-expressing cells might contain proliferative type-2 progenitor cells (Jessberger et al. 2005; Hodge et al. 2008) which may start a neurorepair process. It has been shown that DCX-expressing cells within the DG reemerge after traumatic brain injury and it has been suggested that they are the more likely contributors to stable neurogenesis (Yu et al. 2008; Kernie and Parent 2010). Although similar changes in number and morphology of DCX-positive cells have been reported after systemic KA-induced seizures (Gu et al. 2010) we cannot attribute this observation to seizures because we used a subepileptogenic dose and only few rats showed isolated wet-rat shakes during the first hour after infusion.

It was noteworthy that the number of CR-positive cells increased as early as 24 h after KA lesion. CR has been considered as a marker of interneurons and Cajal–Retzius cells in the DG, which co-express the glycoprotein reelin (Tissir and Goffinet 2003) a pivotal factor in maintaining the lamination in the hippocampus as well as in the rest of the brain (Duveau et al. 2011). Interestingly, CR immunoreactivity was increased also at the sharp borders toward the outer molecular layer of the DG as reported in studies of morphological organization of this structure (Del Turco et al. 2004). In cortical lesion models, newly generated cells may differentiate into neurons and glia in the regenerating cortex, but lamination is not reinstated (Kolb et al. 2007).

Our results show that at 60 dpl, the zone originally devoid of cells was refilled with NeuN-positive nuclei. Thus, even when we cannot rule out the possibility that plastic events involving neurite reorganization of pre-existing neurons is contributing to the observed recovery (Zepeda et al. 2004) the replenishing of the granule cell layer is associated in time with functional reorganization.

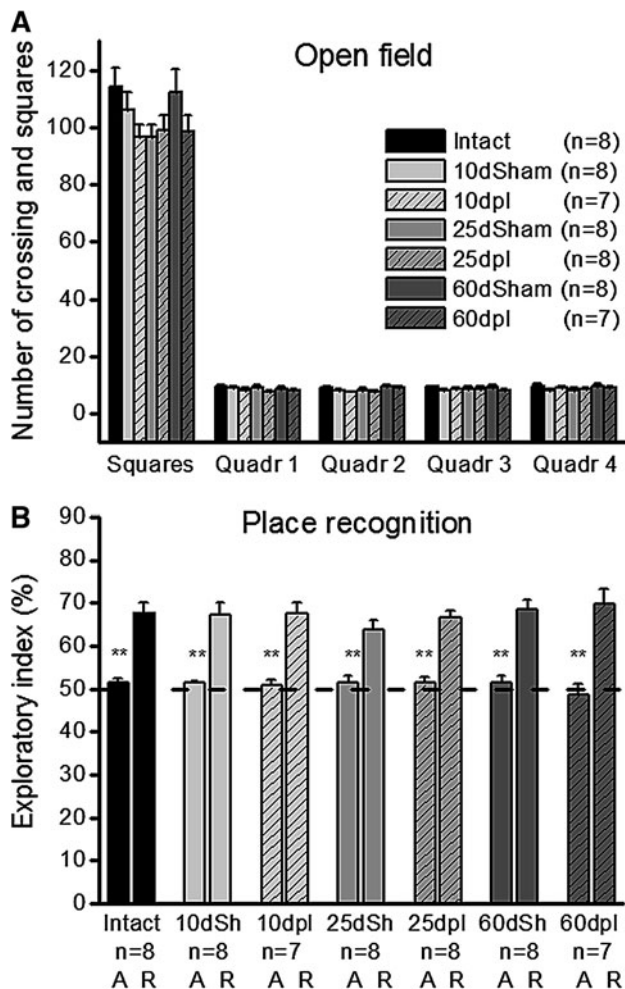


Fig. 9 Behavior in control tasks independent from the DG. **a** Performance in the open field shows motor facilitation in all subjects without group differences ($F_{(6,47)} = 1.561$, $p = 0.1797$; repeated measures ANOVA). **b** Performance in a place recognition task shows a similar exploratory index among groups between the familiar and novel location. *A* Acquisition period, *R* recall period ($F_{(6,47)} = 0.304$, $p = 0.9316$, repeated measures ANOVA)

However, further studies are required for establishing the precise adaptive mechanisms underlying DG restoration.

Our results show an increase of neurogenic markers also in the contralateral hippocampus, which are not necessarily associated to the morphological reorganization process in the damaged granular layer, but with molecular and cellular signals which may activate the contralateral hippocampus through commissural fibers. The cellular response of a lesion in the contralateral region of an injured structure has been previously documented (Arias et al. 1998; Ayala and Tapia 2008).

Functional recovery has been extensively shown to occur after brain injury (for review see (Murphy and Corbett 2009). However, structural disorganization may prevail despite behavioral recovery (Kolb et al. 2007).

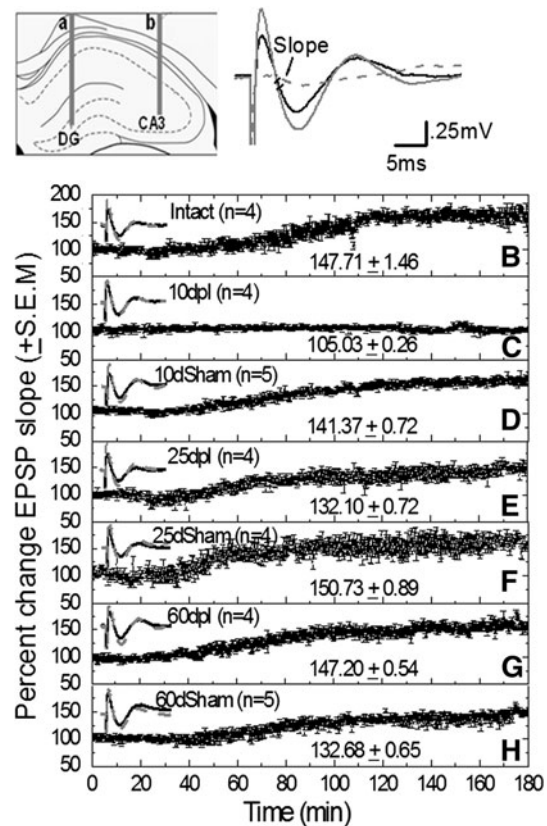


Fig. 10 Mossy fiber LTP induction in vivo by HFS recovers in time. **a** Left schematic representation of the mossy fiber pathway and electrode placement showing the stimulated (CA3) (a) and recorded (DG) (b) sites in a coronal plane. Right representative traces of the EPSP obtained at baseline (full line) and after DCG-IV application (dotted line). Note that DCG-IV selectively blocked mossy fiber responses to 15 % of baseline signals. Plot of mossy fiber evoked responses from the intact group (B); 10 dpl (C); 10 d sham lesion (D); 25 dpl (E); 25 d sham lesion (F); 60 dpl (G); 60 d sham lesion (H). DG-CA3-LTP induction was only blocked in the 10 dpl group. Inner numbers show mean \pm S.E.M. EPSPs slope (percent of baseline) obtained 1 h after HFS for each group. The trace on the top left in each graph shows the average of MF field potentials obtained immediately before (full line) and 170 min after (dotted line) HFS

Our results showed that 60 days after a focal lesion to the DG it reorganizes anatomically to the point that (1) the volume of the structure recovers to control levels and, (2) the lesion site is no longer evident as revealed by NeuN immunohistochemistry. Interestingly, such structural reorganization has not been documented after cortical damage and we did not detect at any time point the glial scar typical of cortical lesions (Zepeda et al. 2003, 2004). Both, the core and the scar have been proposed to form a restrictive environment for neural repair processes to occur (see Robel et al. 2011 for review). Thus, the cortical and DG milieus may substantially differ and the latter may provide a more permissive environment for cellular plastic events to occur.

Morphological restoration may in turn give rise to the recovery of the aversive memory function, which importantly relies on the DG integrity (Saxe et al. 2006). We can be certain that the animals formed an aversive association through the learning period, given that freezing increased within the session in all groups. This result is in line with previous studies showing that the dorsal hippocampal neurons are not required for learning context fear, but are required for fear context retrieval (Maren et al. 1997). Thus, the initial failure in freezing reflects a memory loss and not an acquisition deficit, whereas freezing after 25 and 60 dpl reveals the ability to remember the aversive context. Generalized freezing can be discarded given that motor behavior in the open field as well as in the 2 min period prior to the tone appearance in the altered context remained intact (data not shown). A work by Winocur et al. (2006) has previously shown that inhibition of neurogenesis after irradiation provokes a deficit in fear memory for as long as 2 months after ablation, thus suggesting a role of new neurons for the adequate performance on hippocampus-dependent memory function. Also a previous work has shown that after a traumatic brain injury, reappearance of neurons correlate with behavioral recovery and the DG has been proposed as the neurogenic source (Sun et al. 2007). Our results show that reorganization, as evaluated with NeuN, occurs along functional recovery and within 25 days which correlates with the time-window in which newly generated neurons have been shown to mature (Zhao et al. 2006).

In addition to the morphological and behavioral reorganization, the parallel reinstatement of LTP occurred. Our results show that at 25 and 60 dpl, HFS was capable of inducing *in vivo* LTP at the DG-CA3 pathway that was blocked 10 dpl. These results are supported by previous studies showing that low dose of gamma radiation, drastically reduced new cell proliferation, selectively blocked LTP at DG *in vitro* (Snyder et al. 2001) and prevented the LTP recovery after ischemic damage (Wang et al. 2005). To our knowledge, mossy fiber LTP after a DG lesion has not been previously addressed. Thus, we can only speculate that the parallel reinstatement of LTP along with the morphological and behavioral reorganization could rely on well described plastic adaptive mechanisms such as sprouting of fibers, and modifications in the excitatory/inhibitory balance, but the idea that new neurons may be participating in the organization of a preexisting neuronal network should also be considered (Kempermann et al. 2002, 2004).

Of particular interest, functional and morphological reorganization in our study occurred in the absence of exogenous molecules known to enhance plastic responses in the CNS (Yoshimura et al. 2001; Kolb et al. 2007). Moreover, the time lapse in which recovery occurred is

consistent with the time that takes new neurons to migrate and integrate into the rodent DG circuit (Cameron et al. 1993; Zhao et al. 2006).

In conclusion, our results provide information on the progression of the cellular processes that are triggered after a neurogenic niche injury in the adult and show that the restoration of the original morphology of the damaged structure occurs in parallel to the functional recovery of the DG, as assessed through behavioral and electrophysiological approaches.

Acknowledgments We thank Pedro Medina, Miguel Tapia, Patricia Ferrera and Alicia Sampieri for technical assistance. We thank Verdon Taylor for providing facilities in the development of histochemical procedures. This project was supported by DGAPA-PAPIIT IN215609, IN213210 and CONACyT 60851.

Conflict of interest None.

References

- Arias C, Becerra-García F, Arrieta I, Tapia R (1998) The protein phosphatase inhibitor okadaic acid induces heat shock protein expression and neurodegeneration in rat hippocampus *in vivo*. *Exp Neurol* 153(2):242–254
- Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z, Lindvall O (2002) Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med* 8:963–970
- Ayala GX, Tapia R (2008) HSP70 expression protects against hippocampal neurodegeneration induced by endogenous glutamate *in vivo*. *Neuropharmacology* 55(8):1383–1390
- Bendel O, Bueters T, von Euler M, Ove Ogren S, Sandin J, von Euler G (2005) Reappearance of hippocampal CA1 neurons after ischemia is associated with recovery of learning and memory. *J Cereb Blood Flow Metab* 25:1586–1595
- Bengzon J, Kokaia Z, Elmer E, Nanobashvili A, Kokaia M, Lindvall O (1997) Apoptosis and proliferation of dentate gyrus neurons after single and intermittent limbic seizures. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:10432–10437
- Brown CE, Li P, Boyd JD, Delaney KR, Murphy TH (2007) Extensive turnover of dendritic spines and vascular remodeling in cortical tissues recovering from stroke. *J Neurosci* 27:4101–4109
- Brun VH, Otnass MK, Molden S, Steffenach HA, Witter MP, Moser MB, Moser EI (2002) Place cells and place recognition maintained by direct entorhinal-hippocampal circuitry. *Science* 296:2243–2246
- Calixto E, Thiels E, Klann E, Barrionuevo G (2003) Early maintenance of hippocampal mossy fiber–long-term potentiation depends on protein and RNA synthesis and presynaptic granule cell integrity. *J Neurosci* 23:4842–4849
- 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
- Carmichael ST, Chesselet MF (2002) Synchronous neuronal activity is a signal for axonal sprouting after cortical lesions in the adult. *J Neurosci* 22:6062–6070
- Couillard-Despres S, Winner B, Schaubeck S, Aigner R, Vroemen M, Weidner N, Bogdahn U, Winkler J, Kuhn HG, Aigner L (2005) Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. *Eur J Neurosci* 21:1–14

- Del Turco D, Gebhardt C, Burbach GJ, Pleasure SJ, Lowenstein DH, Deller T (2004) Laminar organization of the mouse dentate gyrus: insights from BETA2/Neuro D mutant mice. *J Comp Neurol* 477:81–95
- Derrick BE, Weinberger SB, Martinez JL Jr (1991) Opioid receptors are involved in an NMDA receptor-independent mechanism of LTP induction at hippocampal mossy fiber-CA3 synapses. *Brain Res Bull* 27:219–223
- Derrick BE, Rodriguez SB, Lieberman DN, Martinez JL Jr (1992) Mu opioid receptors are associated with the induction of hippocampal mossy fiber long-term potentiation. *J Pharmacol Exp Ther* 263:725–733
- 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
- Dong H, Csernansky CA, Goico B, Csernansky JG (2003) Hippocampal neurogenesis follows kainic acid-induced apoptosis in neonatal rats. *J Neurosci* 23:1742–1749
- Duveau V, Madhusudan A, Caleo M, Knuesel I, Fritschy JM (2011) Impaired reelin processing and secretion by Cajal–Retzius cells contributes to granule cell dispersion in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *Hippocampus* 21:935–944
- Eisch AJ, Mandym CD (2006) Adult neurogenesis and central nervous system cell cycle analysis: novel tools for exploration of the neural causes and correlates of psychiatric disorders. In: Janigro D (ed) *The cell cycle in the Central Nervous System*. Humana Press, NJ, pp 335–356
- Ennaceur A, Neave N, Aggleton JP (1997) Spontaneous object recognition and object location memory in rats: the effects of lesions in the cingulate cortices, the medial prefrontal cortex, the cingulum bundle and the fornix. *Exp Brain Res* 113:509–519
- Escobar ML, Barea-Rodriguez EJ, Derrick BE, Reyes JA, Martinez JL Jr (1997) Opioid receptor modulation of mossy fiber synaptogenesis: independence from long-term potentiation. *Brain Res* 751:330–335
- Escobar ML, Figueroa-Guzman Y, Gomez-Palacio-Schjetnan A (2003) In vivo insular cortex LTP induced by brain-derived neurotrophic factor. *Brain Res* 991:274–279
- Gomez-Palacio-Schjetnan A, Escobar ML (2008) In vivo BDNF modulation of adult functional and morphological synaptic plasticity at hippocampal mossy fibers. *Neurosci Lett* 445:62–67
- Gray WP, Sundstrom LE (1998) Kainic acid increases the proliferation of granule cell progenitors in the dentate gyrus of the adult rat. *Brain Res* 790:52–59
- Gu P, Li Y, Shang Y, Hou Y, Zhao S (2010) Proliferation changes in dentate gyrus of hippocampus during the first week following kainic acid-induced seizures. *Yakugaku Zasshi* 130:1751–1754
- Gundersen HJ, Jensen EB (1987) The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc* 147(Pt 3):229–263
- Hernandez-Ortega K, Ferrera P, Arias C (2007) Sequential expression of cell-cycle regulators and Alzheimer’s disease-related proteins in entorhinal cortex after hippocampal excitotoxic damage. *J Neurosci Res* 85:1744–1751
- Hodge RD, Kowalczyk TD, Wolf SA, Encinas JM, Rippey C, Enikolopov G, Kempermann G, Hevner RF (2008) Intermediate progenitors in adult hippocampal neurogenesis: Tbr2 expression and coordinate regulation of neuronal output. *J Neurosci* 28:3707–3717
- Jessberger S, Romer B, Babu H, Kempermann G (2005) Seizures induce proliferation and dispersion of doublecortin-positive hippocampal progenitor cells. *Exp Neurol* 196:342–351
- Jin K, Minami M, Lan JQ, Mao XO, Bateur S, Simon RP, Greenberg DA (2001) Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:4710–4715
- Kempermann G (2002) Why new neurons? Possible functions for adult hippocampal neurogenesis. *J Neurosci* 22:635–638
- 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, Wiskott L, Gage FH (2004) Functional significance of adult neurogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 14:186–191
- Kernie SG, Parent JM (2010) Forebrain neurogenesis after focal ischemic and traumatic brain injury. *Neurobiol Dis* 37:267–274
- Kolb B, Morshead C, Gonzalez C, Kim M, Gregg C, Shingo T, Weiss S (2007) Growth factor-stimulated generation of new cortical tissue and functional recovery after stroke damage to the motor cortex of rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 27:983–997
- 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
- Ledergerber D, Fritschy JM, Kralic JE (2006) Impairment of dentate gyrus neuronal progenitor cell differentiation in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *Exp Neurol* 199:130–142
- LeDoux JE, Cicchetti P, Xagoraris A, Romanski LM (1990) The lateral amygdaloid nucleus: sensory interface of the amygdala in fear conditioning. *J Neurosci* 10:1062–1069
- Lee I, Kesner RP (2004) Differential contributions of dorsal hippocampal subregions to memory acquisition and retrieval in contextual fear-conditioning. *Hippocampus* 14:301–310
- Maren S, Aharonov G, Fanselow M (1997) Neurotoxicities of the dorsal hippocampus and Pavlovian fear conditioning in rats. *Behav Brain Res* 88:261–274
- Mumby DG, Gaskin S, Glenn MJ, Schramek TE, Lehmann H (2002) Hippocampal damage and exploratory preferences in rats: memory for objects, places, and contexts. *Learn Mem* 9:49–57
- Murphy TH, Corbett D (2009) Plasticity during stroke recovery: from synapse to behaviour. *Nat Rev Neurosci* 10:861–872
- Nakagawa E, Aimi Y, Yasuhara O, Tooyama I, Shimada M, McGeer PL, Kimura H (2000) Enhancement of progenitor cell division in the dentate gyrus triggered by initial limbic seizures in rat models of epilepsy. *Epilepsia* 41:10–18
- Nakatomi H, Kuriu T, Okabe S, Yamamoto S, Hatano O, Kawahara N, Tamura A, Kirino T, Nakafuku M (2002) Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell* 110:429–441
- Nudo RJ, Wise BM, SiFuentes F, Milliken GW (1996) Neural substrates for the effects of rehabilitative training on motor recovery after ischemic infarct. *Science* 272:1791–1794
- Ogita K, Nishiyama N, Sugiyama C, Higuchi K, Yoneyama M, Yoneda Y (2005) Regeneration of granule neurons after lesioning of hippocampal dentate gyrus: evaluation using adult mice treated with trimethyltin chloride as a model. *J Neurosci Res* 82:609–621
- Okano H, Sawamoto K (2008) Neural stem cells: involvement in adult neurogenesis and CNS repair. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363:2111–2122
- Parent JM, Valentin VV, Lowenstein DH (2002) Prolonged seizures increase proliferating neuroblasts in the adult rat subventricular zone-olfactory bulb pathway. *J Neurosci* 22:3174–3188
- Paxinos G, Watson C (1986) *The rat brain stereotaxic coordinates*. Academic Press, Sydney
- Phillips RG, LeDoux JE (1992) Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav Neurosci* 106:274–285
- Rao MS, Shetty AK (2004) Efficacy of doublecortin as a marker to analyse the absolute number and dendritic growth of newly generated neurons in the adult dentate gyrus. *Eur J Neurosci* 19:234–246

- Robel S, Berninger B, Gotz M (2011) The stem cell potential of glia: lessons from reactive gliosis. *Nat Rev Neurosci* 12:88–104
- Saxe MD, Battaglia F, Wang JW, Malleret G, David DJ, Monckton JE, Garcia AD, Sofroniew MV, Kandel ER, Santarelli L, Hen R, Drew MR (2006) Ablation of hippocampal neurogenesis impairs contextual fear conditioning and synaptic plasticity in the dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:17501–17506
- Scharfman HE, Goodman JH, Sollas AL (2000) Granule-like neurons at the hilar/CA3 border after status epilepticus and their synchrony with area CA3 pyramidal cells: functional implications of seizure-induced neurogenesis. *J Neurosci* 20:6144–6158
- Schjetnan AG, Escobar ML (2010) In vivo BDNF modulation of hippocampal mossy fiber plasticity induced by high frequency stimulation. *Hippocampus*. doi:10.1002/hipo.20866
- Sigler A, Mohajerani MH, Murphy TH (2009) Imaging rapid redistribution of sensory-evoked depolarization through existing cortical pathways after targeted stroke in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:11759–11764
- Snyder JS, Kee N, Wojtowicz JM (2001) Effects of adult neurogenesis on synaptic plasticity in the rat dentate gyrus. *J Neurophysiol* 85:2423–2431
- Steiner B, Klempin F, Wang L, Kott M, Kettenmann H, Kempermann G (2006) Type-2 cells as link between glial and neuronal lineage in adult hippocampal neurogenesis. *Glia* 54:805–814
- Suh H, Consiglio A, Ray J, Sawai T, D'Amour KA, Gage FH (2007) In vivo fate analysis reveals the multipotent and self-renewal capacities of Sox2+ neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell* 1:515–528
- Sun D, McGinn MJ, Zhou Z, Harvey HB, Bullock MR, Colello RJ (2007) Anatomical integration of newly generated dentate granule neurons following traumatic brain injury in adult rats and its association to cognitive recovery. *Exp Neurol* 204:264–272
- Tissir F, Goffinet AM (2003) Reelin and brain development. *Nat Rev Neurosci* 4:496–505
- Wang S, Kee N, Preston E, Wojtowicz JM (2005) Electrophysiological correlates of neural plasticity compensating for ischemia-induced damage in the hippocampus. *Exp Brain Res* 165:250–260
- Winocur G, Wojtowicz JM, Sekeres M, Snyder JS, Wang S (2006) Inhibition of neurogenesis interferes with hippocampus-dependent memory function. *Hippocampus* 16:296–304
- Winship IR, Murphy TH (2008) In vivo calcium imaging reveals functional rewiring of single somatosensory neurons after stroke. *J Neurosci* 28:6592–6606
- Yoshimura S, Takagi Y, Harada J, Teramoto T, Thomas SS, Waeber C, Bakowska JC, Breakefield XO, Moskowitz MA (2001) FGF-2 regulation of neurogenesis in adult hippocampus after brain injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:5874–5879
- Yu TS, Zhang G, Liebl DJ, Kernie SG (2008) Traumatic brain injury-induced hippocampal neurogenesis requires activation of early nestin-expressing progenitors. *J Neurosci* 28:12901–12912
- Zepeda A, Vaca L, Arias C, Sengpiel F (2003) Reorganization of visual cortical maps after focal ischemic lesions. *J Cereb Blood Flow Metab* 23:811–820
- Zepeda A, Sengpiel F, Guagnelli MA, Vaca L, Arias C (2004) Functional reorganization of visual cortex maps after ischemic lesions is accompanied by changes in expression of cytoskeletal proteins and NMDA and GABA(A) receptor subunits. *J Neurosci* 24:1812–1821
- Zepeda A, Michel G, Aguilar-Arredondo A, Arias C (2009) Neurogenesis after brain stroke: is there a relationship with functional recovery? *Curr Trends Neurol* 3:33–44
- 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

Behavior-associated Neuronal Activation After Kainic Acid-induced Hippocampal Neurotoxicity is Modulated in Time

ANDREA AGUILAR-ARREDONDO,* FERNANDA LÓPEZ-HERNÁNDEZ,
LIZBETH GARCÍA-VELÁZQUEZ, CLORINDA ARIAS, AND ANGÉLICA ZEPEDA
Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF, México

ABSTRACT

Kainic acid-induced (KA) hippocampal damage leads to neuronal death and further synaptic plasticity. Formation of aberrant as well as of functional connections after such procedure has been documented. However, the impact of such structural plasticity on cell activation along time after damage and in face of a behavioral demand has not been explored. We evaluated if the mRNA and protein levels of plasticity-related protein synaptophysin (*Syp* and SYP, respectively) and activity-regulated cytoskeleton-associated protein mRNA and protein levels (*Arc* and Arc, respectively) in the dentate gyrus were differentially modulated in time in response to a spatial-exploratory task after KA-induced hippocampal damage. In addition, we analyzed Arc+/NeuN+ immunopositive cells in the different experimental conditions. We infused KA intrahippocampally to young-adult rats and 10 or 30 days post-lesion (dpl) animals performed a hippocampus-activating spatial-exploratory task. Our results show that *Syp* mRNA levels significantly increase at 10dpl and return to control levels after 30dpl, whereas SYP protein levels are diminished at 10dpl, but significantly increase at 30dpl, as compared to 10dpl. *Arc* mRNA and protein levels are both increased at 30dpl as compared to sham. Also the number of NeuN+/Arc+ cells significantly increases at 30dpl in the group with a spatial-exploratory demand. These results provide information on the long-term modifications associated to structural plasticity and neuronal activation in the dentate gyrus after excitotoxic damage and in face of a spatial-exploratory behavior. *Anat Rec*, 300:425–432, 2017. © 2016 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: hippocampal plasticity; dentate gyrus; synaptophysin; immediate early gene; spatial-exploratory behavior; injury; intrahippocampal kainic acid

Andrea Aguilar-Arredondo and Fernanda López-Hernández equally contributed to this work.

Grant sponsor: CONACyT; Grant number: 176589; Grant sponsor: PAPIIT; Grant number: IN203015.

*Correspondence to: Angélica Zepeda, Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México,

AP 70-228, 04510 México, DF, México. Tel: +52-55-56229215; Fax: +52-55-56229182 E-mail: azepeda@biomedicas.unam.mx

Received 18 November 2015; Revised 2 May 2016; Accepted 23 May 2016.

DOI 10.1002/ar.23513

Published online 11 November 2016 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

Kainic acid (KA)-induced hippocampal neurotoxicity elicits synaptic reorganization displayed at a behavioral level as limbic seizures and memory impairments (Ben-Ari, 1985; Grötlicke et al., 2008; Carriero et al., 2012; Pearson et al., 2014). Neuronal overactivation induced by locally infused KA affects hippocampal subregions that concentrate post-synaptic KA receptors in the CA3-CA1 pyramidal neurons and in granule cells of the dentate gyrus (DG) or presynaptic receptors in mossy fibers (Carta et al., 2014). At the molecular and cellular levels, KA-induced toxicity is associated with the activation of a cascade of events that include gene expression, sprouting of mossy fibers, and the establishment of new synaptic contacts. Together, these changes participate in the induction of reactive plasticity that implies the formation of aberrant connections (Represa et al., 1987; Davenport et al., 1990; Bouilleret et al., 1999; Artinian et al., 2015). Many studies have reported morphological, neurochemical, electrophysiological and behavioral changes after local and systemic KA administration (reviewed by Ben-Ari and Cossart, 2000). However, structural and activity plasticity markers may also evidence events occurring along time in the damaged hippocampus. Structural plasticity can be indirectly assessed through presynaptic protein contents, such as synaptophysin (SYP) a major integral membrane protein of synaptic vesicles (Thiel, 1993; Janz, et al., 1999) that participates in both synaptic vesicle formation and availability (Kwon and Chapman, 2011).

Activity-regulated cytoskeleton-associated protein (Arc) is an immediate early gene induced by a variety of conditions including seizures, exploration of novel environments, and spatial learning (Lyford, et al., 1995; Ramirez-Amaya et al., 2005; Messaoudi et al., 2007; Farris et al., 2014) all of which activate hippocampal neurons. Basal Arc contents are very low, thus its presence has been widely used as a neuronal activity marker for *in vivo* analysis of robust neuronal activation (Toyoda et al., 2010) and for neural activity associated to several types of behavioral experiences (Vazdarjanova et al., 2006; Ramirez-Amaya et al., 2013; Carasatorre et al., 2015; Meconi et al., 2015).

Injury- as well as exploratory behavior-induced plasticity in rodents has been extensively documented; plastic events include modifications in mRNA and protein synthesis, which may ultimately impact the activation and function of synapses (Carasatorre et al., 2015). SYP and Arc are plasticity-related molecules that reflect structural and functional synaptic modifications. To address if synaptic organization and function change along time in response to hippocampal damage and in face of a hippocampus-activating spatial-exploratory demand, we evaluated mRNA expression and protein contents of Arc and SYP and analyzed neuronal Arc contents and localization through immunohistochemistry at two different time-points after intrahippocampal administration of KA.

MATERIAL AND METHODS

Surgical Procedures

Male Wistar rats 10–12 weeks old (250–320 g) bred at the facilities of the Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM were used throughout the study. They were handled according to the Rules for Research in Health

Matters (Mexico) and the local Animal Care Committee approved all animal treatments. All efforts were made in order to reduce the number of animals used for this study and to avoid their suffering. During the whole experimental procedure, four rats per cage were housed in a laboratory environment with an inverted-12 hr artificial light/dark cycle with free access to water and food.

For intrahippocampal KA infusion, animals were anesthetized with 2% isoflurane in a 95% O₂/5% CO₂ mixture and placed on a stereotaxic frame as previously described (Arias et al., 2002). Coordinates used were AP—3.6 mm from bregma, L—2.4 mm from midline, and V—3.6 mm from dura according to Paxinos and Watson (1986). A volume of 0.25 μ L solution containing 0.175 nmol KA (Sigma—Aldrich, MO) was unilaterally injected at a rate of 0.25 μ L/min, and 1 min later the needle was withdrawn. The skin was sutured, anesthesia was discontinued, and animals were returned to their acrylic cages until behavioral procedures took place. KA was dissolved in 1M NaOH, pH was adjusted to 7.0–7.5, and the solution was brought to the desired volume with 10mM phosphate buffer (pH 7.2). KA was infused using a micro syringe mounted on a microinjection pump (Stoelting, IL). Sham surgeries consisted on all surgical procedures previously mentioned: the injection needle was inserted but no intrahippocampal solution was delivered. KA-infused animals as well as sham animals were sacrificed either at 10 or 30 days after surgical procedures.

Sham animals from 10 and 30 days post-surgery were grouped as “sham” since no significant differences were found between these groups for any comparison.

Spatial-Exploratory Behavior

All behavioral procedures were performed during the animal's dark phase of the day cycle.

The same experimenter handled the animals throughout the study. For habituation, animals were handled for 10 min on three consecutive days before performing the spatial-exploratory task. Animals from the control “Cage group” did not leave their housing cage until sacrifice. Nine or 29 days after surgery, another set of animals was individually placed in a conditioning chamber 25 cm long \times 25 cm high with transparent acrylic walls and a metallic-rods floor (San Diego Instruments, CA) and were let free to explore for 12 min (“Exploration group”). After each exploration session, the chamber was wiped with cleaning solution: 10% EtOH, 10% Extran (Merck, Darmstadt, Germany) diluted in water. On the next day, animals were placed inside the same chamber for 5 min for free exploration and were then taken to a dark room in which they stayed for 30 min until perfusion. Tissue from the “Cage group” was analyzed only for immunohistochemistry.

Western-Blot

Thirty minutes after the last session of spatial-exploratory behavior, animals were fast-decapitated with a guillotine; brains were removed and subsequently immersed for 1 min in ice-cold artificial cerebrospinal fluid (aCSF) (126 mM NaCl, 3.5 mM KCl, 1.2 mM NaH₂PO₄, 1.3 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 11 mM glucose, 2 mM NaHCO₃, pH 7.4). Brains were fixed in a plate,

placed in a vibroslice apparatus (Campden Instruments, IN) and immersed in ice-cold aCSF. Three hippocampal coronal slices (400- μ M thick) were collected per rat based on the lesion area. The DG was carefully dissected with a scalpel in ice-cold aCSF and homogenized (Sonic Vibra Cell, CT) in 200 μ L lysis buffer containing 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1% NP-40, 0.5% deoxycholate and protease inhibitors. Twenty five to sixty micrograms of enriched fraction of DG proteins were loaded onto a 10% or 8% SDS-PAGE gel. After electrophoresis, proteins were transferred to a nitrocellulose membrane. Membranes were blocked in PBS with 5% BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma-Aldrich, MO) overnight at 4°C. Next, membranes were incubated overnight at 4°C in primary antibodies mouse anti-synaptophysin (1:200, Chemicon, CA) or rabbit anti-Arc (1:200, Synaptic Systems, Goettingen, Germany). Membranes were washed three times for 10 min each with PBS/0.1% Tween 20, and then incubated at room temperature for 2 h in a mouse anti- α -tubulin (1:1,000, Sigma-Aldrich, MO) or a mouse anti- β -actin (1:1000, Sigma-Aldrich, MO) antibody. Membranes were washed three times in PBS/0.1% Tween 20 for 10 min each. Finally, they were incubated in the secondary antibody goat anti-mouse (1:12,000 Santa Cruz Biotechnology, TX) or goat anti-rabbit (1:12,000; Santa Cruz Biotechnology, TX) diluted in 5% BSA PBS. Membranes were washed three times for 10 min each in PBS/0.1% Tween 20 and the antibody signal was detected by 3, 3'-Diaminobenzidine Tetrahydrochloride (DAB) (Sigma-Aldrich, MO). Densitometric analysis of the immunoblot was carried out using ImageJ software (NIH, MD). The results are expressed as arbitrary optic density units (O.D.U).

Histological Procedures

For histological analysis of the lesion site, an independent group of animals was sacrificed at 10 or 30 days post-surgery. Four subjects per time-point were anesthetized with sodium pentobarbital and transcardially perfused with 250 mL of 0.9% chilled saline followed by 250 mL of 4% chilled formaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4). Brains were removed and left in fixative for an additional 24 h. They were successively transferred to 15 and 30% sucrose. Brains were removed from the sucrose solution and 30 μ m coronal sections were obtained in a cryostat (Microm HM550, Thermo Scientific, MA); one out of five consecutive sections was mounted on gelatin-covered slides and stained with cresyl violet. Images of the whole hippocampus including the lesion site were acquired under a light microscope with a digital camera using a 40 \times objective. Each hippocampus was reconstructed using the individual images.

Immunohistochemistry

Brain sections were collected in 24-well plates (Corning, NY) filled with cryoprotection solution (25% ethylene glycol, 25% glycerol, 50% PB 0.2M pH7.4) and stored at 4°C until ready to be processed for immunohistochemical procedures.

Free-floating coronal sections (30 μ m thickness) were processed for Arc protein and neuronal antigen (NeuN) immunofluorescence. Three sections separated each by 120 μ m were analyzed. All sections were washed three

times for 10 min in PBS and were permeabilized in 0.3% PBS-Triton. Antigen retrieval was then performed using sodium borohydride (0.1% in phosphate buffer). All sections were blocked for 1 h at room temperature with 0.3% donkey serum in 0.3% PBS-Triton and incubated in primary antibodies rabbit anti-Arc (1:500, Synaptic Systems, Goettingen, Germany) and mouse anti-NeuN (1:500, Millipore, MA) at 4°C overnight. Sections were then incubated in secondary antibodies Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit (1:500, Invitrogen, CA) and Alexa Fluor 555 donkey anti-mouse (1:500, Invitrogen, CA) for 2 h at room temperature. Sections were then washed three times for 10 min in PBS and were mounted in polylysine-coated slides. They were finally covered with a DAKO mounting solution and a coverslip.

Image Analysis

Arc+/NeuN+ neurons in the DG were counted in image stacks from 30 μ m thickness sections (Zeiss, LSM 510, Germany). Images were acquired with a 40 \times objective; three different fields per section were randomly selected from the crest, supra and infrapyramidal layers (one field per region) and cells from each field were counted. Three sections per subject in total from the lesioned hippocampus or from the hippocampi of sham animals were analyzed ($n = 4$ per group). The number of double-labeled cells appearing in the "z" plane was manually registered in each stack of images using the LSM viewer. Estimates of cell numbers were obtained as follows: the number of cells in each field from one animal was counted (nine fields per animal). This number was then multiplied by 5 (which is the number of sections that separate one section from the next including the section where the counting was performed) and the average of the estimate per group was reported.

RT-PCR

The DG was dissected as previously described for protein extraction. Total RNA was isolated from the DG using the TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific, MA) according to the manufacturer's instructions. The mRNA was reverse transcribed using the ImProm-II Reverse Transcription System (Promega, WI) using 1 μ g of total RNA and 0.5 μ g of OligodT primer. Expression analysis for *Arc* and *Syp* genes was determined using the Kapa Sybr Fast qPCR kit (Kapa Biosystems, DE, USA) and 20 ng of cDNA per reaction; *Gapdh* gene was used as the endogenous control. The primer forward and reverse sequences were as follows: *Arc*, 5'-CAGTCTGGGCAGCATAGC-3' and 5'-GTATGAATCACTGCTGGGG-3'; *Syp*, 5'-TGTTTGCCTTCTACTCCA-3' and 5'-GCTGTAGCCAGAAAGTCCATC-3'; and *Gapdh*, 5'-GCCTGGAGAAACCTGCCAA-3' and 5'-CTTTAGTGGCCCTCGGC-3' (Integrated DNA Technologies, CA). For each experimental sample, triplicate reactions were performed and negative controls for each gene were included. The reaction was performed using the StepOne Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, MA) and analyzed with the StepOne v2.3 software.

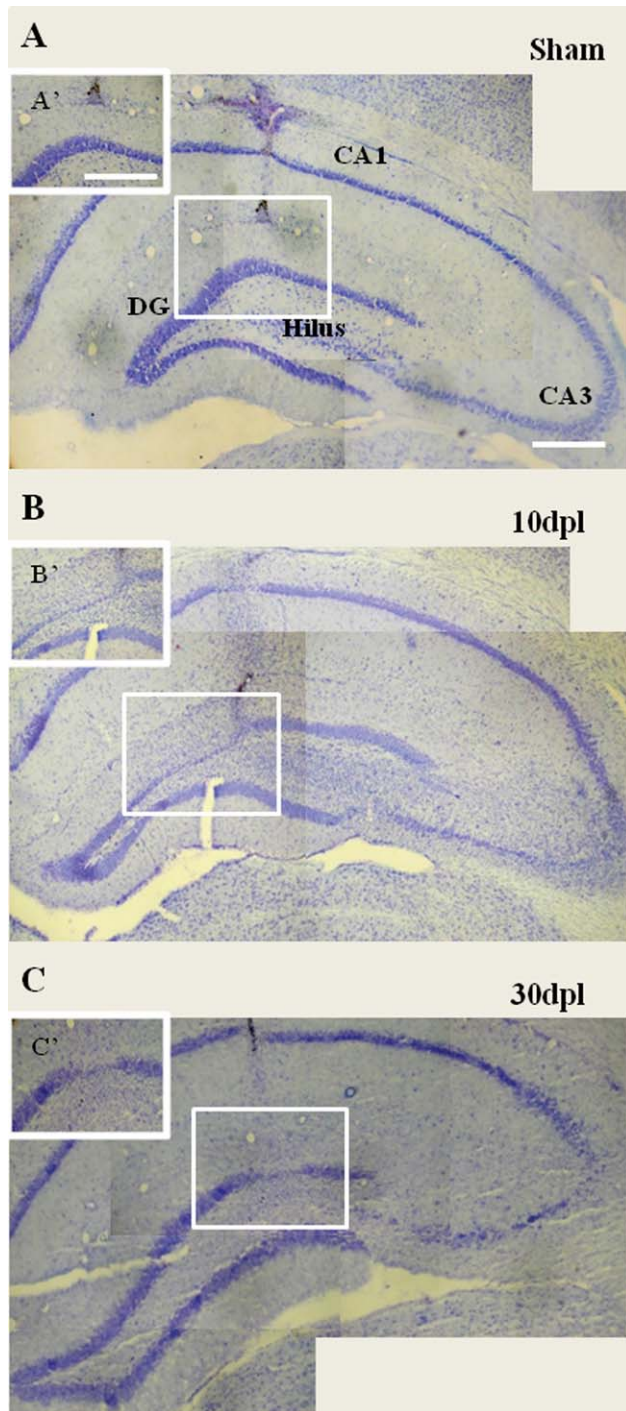


Fig. 1. Reconstruction of representative Nissl stained hippocampus coronal sections unilateral to the injection site. Images were captured under a 10 \times objective. (A) Sham, (B) Injected site at 10dpl, (C) Injected site at 30dpl. Scale bar: 400 μ m. Insets show a 40 \times magnification of the region shown in white frames (A'–C'). Scale bar: 200 μ m.

Statistical Analysis

Data are presented as mean \pm SEM. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, CA). Statistical significance was determined

by a One Way ANOVA followed by a Newman–Keuls post-hoc test.

RESULTS

We evaluated changes in synaptophysin and Arc contents and expression in time after an intrahippocampal injection of KA and in face of a spatial-exploratory demand in adult rats. In a group of animals, we induced spatial-exploratory behavior at 10 or 30 days post lesion. Spatial-exploratory behavior was elicited by introducing the animals in a novel chamber for 12 min and 24 hr later re-exposing them for 5 min to the same chamber. Another group of animals comprised the behavior-control group and they stayed in their housing cages throughout the experiment until sacrifice (tissue from this group was analyzed only for immunohistochemistry). One hour after the exploration task concluded, animals were sacrificed; we measured the expression of *Arc* and *Syp* mRNA, analyzed the contents of the same proteins and analyzed Arc+/NeuN+ nuclei.

Excitotoxic Hippocampal Damage in Time

The only behavioral change observed after intrahippocampal administration of 0.175 nmoles of KA in all animals was the occurrence of sporadic wet-rat shakes, which started about 30 min after the recovery from anesthesia and lasted for about 3–4 h.

The evidence and extent of the KA lesion as assessed through Nissl staining is shown in Figure 1. Coronal sections from sham animals show that the pyramidal and granular layers appear continuous (Fig. 1A), whereas sections from animals that received the KA infusion show a lesion as evidenced by limited regions devoid of cells in CA1, CA3, DG and hilus both at 10 and 30 days after infusion (Fig. 1B,C). Remarkably, and in agreement with previous observations (Hernández-Ortega, 2007; Zepeda et al., 2013) the DG of animals sacrificed at 30 days post lesion (dpl) shows a very limited region of cell loss (Fig. 1C) as compared to those sacrificed at 10dpl (Fig. 1B).

Differential Modifications in Time in mRNA and Protein Contents of SYP and Arc

RT-PCR data show that at 10dpl, there is a significant increase ($P < 0.05$) in *Syp* mRNA expression as compared to that of the sham group. Whereas at 30dpl, the expression levels of this gene significantly decrease as compared to 10dpl ($P < 0.01$) but do not differ from the sham group (Fig. 2A). In contrast, contents of SYP protein were significantly increased ($P < 0.05$) only at 30dpl as compared to 10dpl (Fig. 2B,C).

Arc mRNA expression is also modified in time after the excitotoxic lesion. Figure 3A shows that mRNA transcription levels are similar between 10dpl and sham and a significant increase is observed between sham and 30dpl ($P < 0.05$). A similar trend was observed for Arc protein; at 10dpl, levels remain similar to those displayed by the sham group. But they significantly increase at 30dpl as compared to sham ($P < 0.05$) and to 10dpl levels ($P < 0.05$) (Fig. 3B,C).

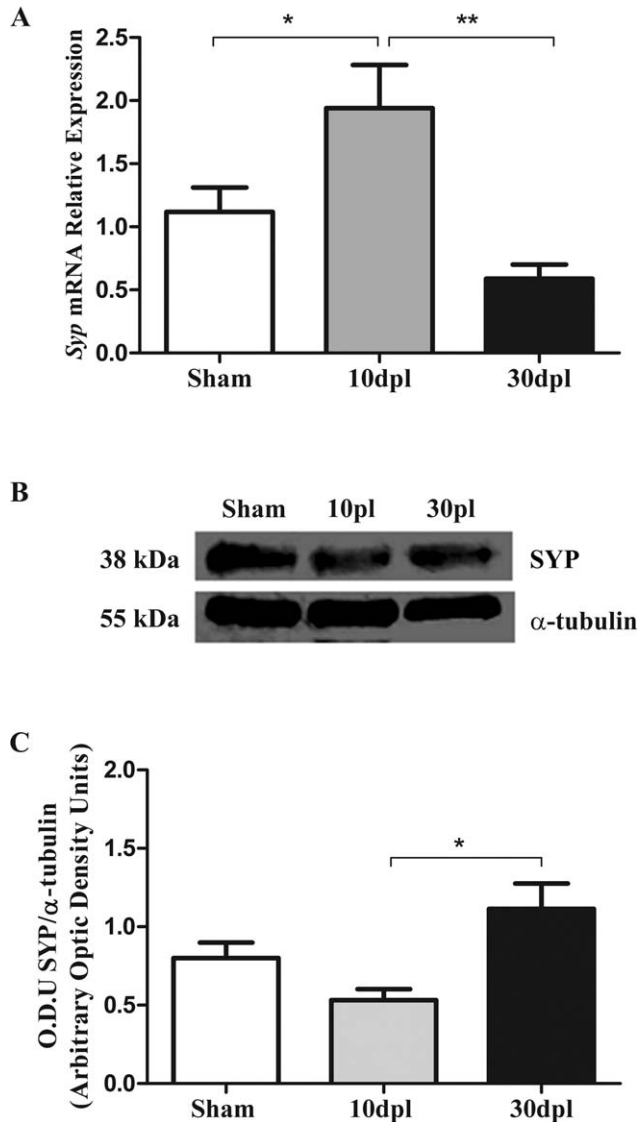


Fig. 2. Time-dependent modifications in *Syp* mRNA expression and SYP protein contents in the whole DG. (A) Relative *Syp* mRNA expression levels in the DG normalized to *Gapdh* ($n = 4$). (B) Representative Western blots of SYP obtained from DG homogenates of a control animal (sham), and an animal sacrificed at 10dpl or at 30dpl. (C) Densitometric analysis; protein contents were normalized to α -tubulin. Data represent optic density mean \pm SEM per group: sham ($n = 8$); 10dpl ($n = 5$); 30dpl ($n = 5$). The asterisk denotes a significant difference ($*P \leq 0.05$, $**P < 0.01$) between groups.

Number of Arc+ Mature Neurons Increases in Time After KA Lesion and After a Spatial-Exploratory Demand

Figure 4 shows the number of Arc+ neurons in the different experimental conditions as revealed by immunohistochemistry and image analysis. In the groups with no spatial-exploratory behavior ("C" for caged) the number of Arc+/NeuN+ cells did not change among the sham, 10dpl and 30dpl groups (Fig. 4A,B). However, in the group with exploratory behavior ("E" for exploration) the number of Arc+ neurons increased significantly at

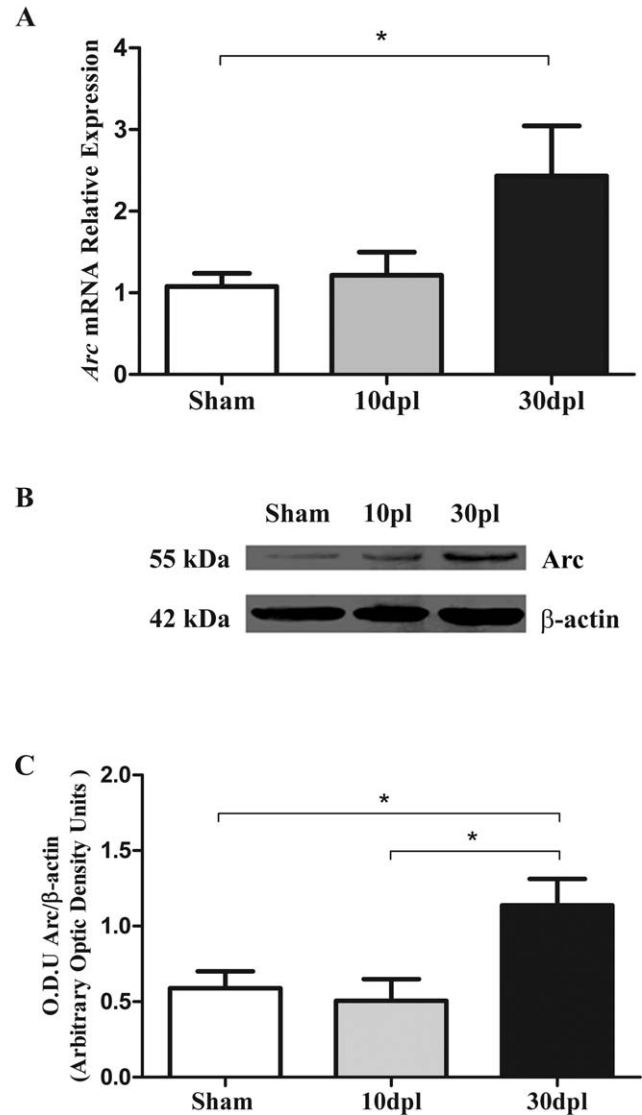


Fig. 3. Time-dependent modifications in Arc mRNA and protein contents in the whole DG. (A) Relative Arc mRNA expression levels in the DG normalized to *Gapdh* ($n = 4$). (B) Representative Western blots of Arc obtained from DG homogenates of a control animal (sham), and an animal sacrificed at 10dpl or at 30dpl. (C) Densitometric analysis; protein contents were normalized to β -actin. Data represent optic density mean \pm SEM per group: sham ($n = 7$); 10dpl ($n = 4$); 30dpl ($n = 5$). The asterisk denotes a significant difference ($*P \leq 0.05$) between groups.

30dpl as compared to the rest of the groups (Fig. 4A, right most panel). Interestingly, the increase in Arc protein signal was also clearly observed in neurites located in the molecular layer of the DG only at 30dpl regardless of the spatial-exploratory behavior (Fig. 4A, insets).

DISCUSSION

The hippocampus is a highly plastic structure, which has been extensively shown to display structural modifications after learning (Ramírez-Amaya et al., 2005), damage (Ben-Ari, 1985; Zepeda et al., 2013), and limbic seizures (Sutula and Dudek, 2007; Ben-Ari, 2008),

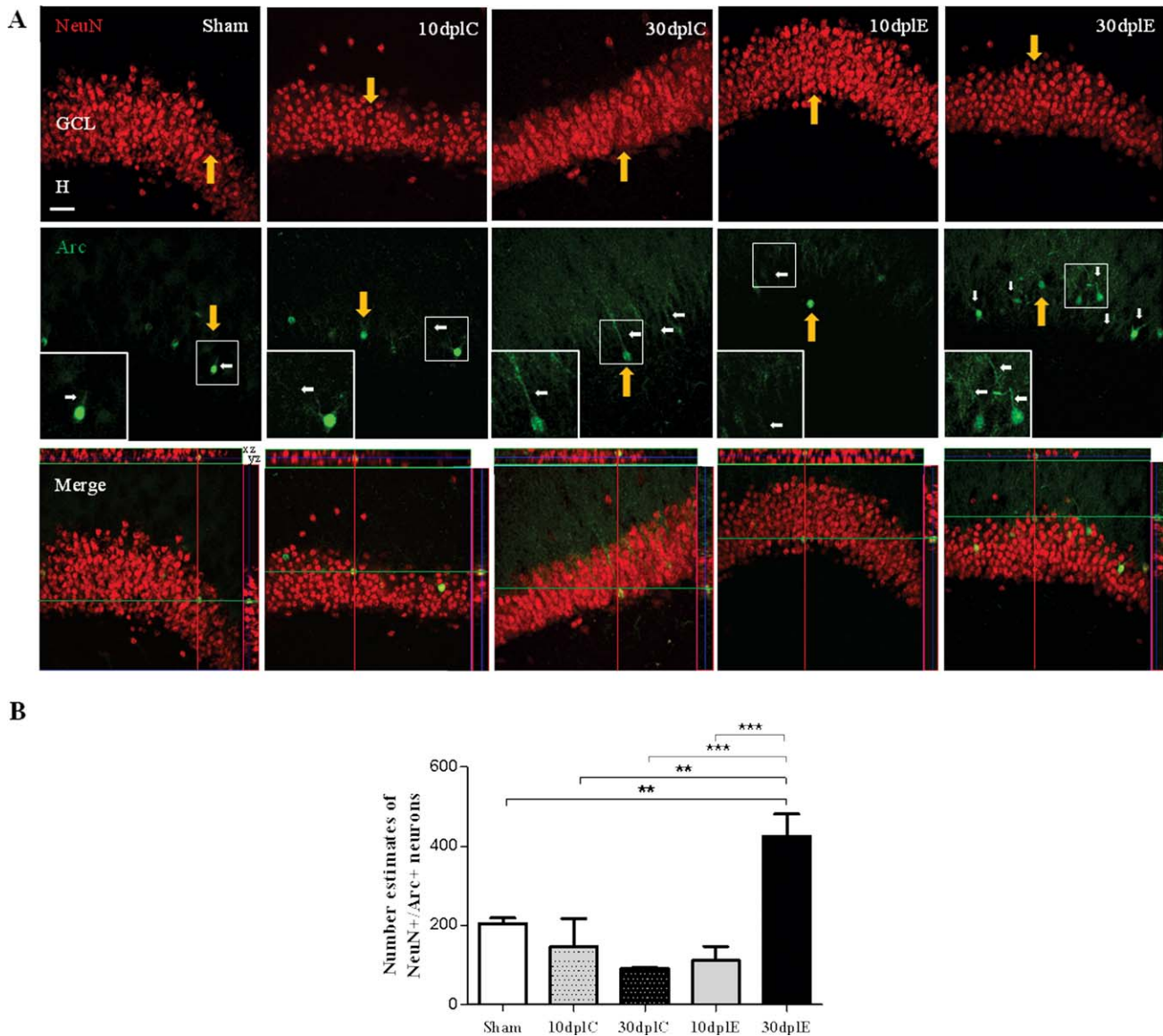


Fig. 4. Neuronal expression of Arc in the DG after a KA-lesion in animals with/without a spatial-exploratory demand. (A) Confocal z-stack images of the DG from a sham subject, from animals without the spatial-exploratory demand sacrificed at 10dpl and 30dpl ("C" for caged) and animals with the spatial-exploratory demand sacrificed at 10dpl and 30pl ("E" for Exploration). Images show mature neuronal nuclei (NeuN, red, upper row); Arc protein signal (green, middle row) and co-localization of both proteins in DG cells (lower row). NeuN+/-

Arc+ double-labeled neurons are signaled by yellow arrows and are shown in the orthogonal planes (lower row). White arrows show Arc expression in neurites at the outer molecular layer of the DG. Insets show high magnification images from Arc+ neurites. (B) Number estimates of NeuN+/Arc+ cells in the DG is expressed as mean \pm SEM of number of cells counted in three fields from three sections per animal; $n = 4$ per group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Scale bar: 60 μ m.

among other events. In this work we show that a focal lesion induced by an intrahippocampal infusion of KA changes the expression profile of synaptic- as well as of activity-related proteins in a time-dependent manner and in face of a spatial-exploratory demand.

It has been extensively shown that intrahippocampal KA infusion induces neurotoxicity and reactive synaptic plasticity associated to axonal sprouting and formation of novel synaptic contacts, mainly on the dendrites of the granular cells in the dentate gyrus (Ben-Ari et al., 2008). The long-lasting changes in hippocampal circuitry

can disrupt the normal inhibition-excitation balance that underlies epileptogenic susceptibility. In the present study we provide evidence that reactive plasticity can also impact the activation of neuronal networks after a spatial behavioral demand, long time after the neurotoxic insult.

We found that the protein levels of both, SYP and Arc dramatically increase at 30 days as compared to 10 days post-KA infusion. Because SYP is a protein involved in regulating synaptic transmission and Arc is considered a synaptic activity-associated protein, our results suggest

a time-dependent correlation between reactive synaptogenesis and neuronal activation. In support of this, we observed an increase in SYP contents at 30 days after KA damage, which correlates with the time when reactive synaptogenesis is established (Yang et al., 1998). At 30dpl, the increase in SYP protein levels negatively correlates with its mRNA levels. SYP has been widely used as a marker of synapse number and it plays an important role in synapse formation and stabilization (Tarsa and Goda, 2002). Hence, it is considered to be a correlate of synaptic number and plasticity both in animal models and in humans (Masliah et al., 1989; Smith et al., 2000; Ishibashi, 2002; Chambers et al., 2005). SYP is a very stable protein and it has been described that during development its levels increase without increasing the rate of transcription (Daly and Ziff, 1997). Thus the disparity that we found between the total levels of protein and its mRNA levels is not surprising. Our results suggest that SYP production during reactive synaptogenesis is not limited by the rate of gene transcription and may indicate that the rate of translation of a pool of *Syp* mRNA is increased early in the process of new synaptic contact formation. In agreement, we observed a significant increase in *Syp* mRNA levels at 10 days after the KA infusion and its significant decay after 30 days.

Another important question that we addressed in this study was “to what extent could newly formed synapses activate neurons under a spontaneously spatial-exploratory behavioral demand?”

It is well known that spatial exploration allows the hippocampus gathering spatial information and is associated with sparse granule cell activity and scarce but sustained *Arc* mRNA expression (Ramírez-Amaya et al., 2005; Alme et al., 2010; Ramírez-Amaya et al., 2013) linked to plasticity mechanisms in the hippocampus. It has been demonstrated that *Arc* mRNA travels into the activated region of the dendrites (Steward and Worley, 2001) and can promote synaptic scaling in non-activated synapses (Okuno et al., 2012). Here we found that after 30 days of an intrahippocampal KA infusion, a robust increase in both *Arc* mRNA and protein occurs after a spatial-exploratory demand, in contrast to the scarce activation observed after 10dpl. Interestingly, only the 30dpl group that performed a spatial-exploratory task showed a significant increase in *Arc*+ somata. Thus implying that the induced exploratory behavior was responsible for the increase in neuronal activation in damaged animals. However, we also observed an increase in *Arc* protein signal in the neurites of the 30dpl groups regardless of the spatial-exploratory behavior, which could suggest a dendritic activation process in the molecular layer of the DG that constitutes a region where reactive mossy fiber reinnervation occurs.

It is worth considering that under physiological circumstances, synaptic expansion induced by behavioral experience has been associated to the improvement of spatial information processing in the hippocampus, as suggested by an increase in neuronal *Arc* (Carasatorre et al., 2015). Thus, the increase in *Arc*+ somata in lesioned animals that faced a spatial-exploratory behavior may reflect the activation or recruitment of a number of neurons initially not involved in the task.

In summary, our present results provide evidence on the long-term modifications associated to structural

plasticity and neuronal activation in the DG after excitotoxic damage and in response to a spatial-exploratory task.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Patricia Ferrera for excellent technical support.

LITERATURE CITED

- Alme CB, Buzzetti RA, Marrone DF, Leutgeb JK, Chawla MK, Schaner MJ, Bohanick JD, Khoboko T, Leutgeb S, Moser EI, et al. 2010. Hippocampal granule cells opt for early retirement. *Hippocampus* 20:1109–1123.
- Arias C, Montiel T, Quiroz-Baez R, Massieu L. 2002. β -amyloid neurotoxicity is exacerbated during glycolysis inhibition and mitochondrial impairment in the rat hippocampus in vivo and in isolated nerve terminals: Implications for Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 176:163–174.
- Artinian J, Peret A, Mircheva Y, Marti G, Crépel V. 2015. Impaired neuronal operation through aberrant intrinsic plasticity in epilepsy. *Ann Neurol* 77:592–606.
- Ben-Ari Y. 1985. Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: Mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 14:375–403.
- Ben-Ari Y. 2008. Epilepsies and neuronal plasticity: For better or for worse?. *Dialogues Clin Neurosci* 10:17–27.
- Ben-Ari Y, Cossart R. 2000. Kainate, a double agent that generates seizures: Two decades of progress. *Trends Neurosci* 23:580–587.
- Ben-Ari Y, Crépel V, Represa A. 2008. Seizures beget seizures in temporal lobe epilepsies: The boomerang effects of newly formed aberrant kainatergic synapses. *Epilepsy Curr* 8:68–72.
- Bouillere V, Ridoux V, Depaulis A, Marescaux C, Nehlig A, Le Gal La Salle G. 1999. Recurrent seizures and hippocampal sclerosis following intrahippocampal kainate injection in adult mice: Electroencephalography, histopathology and synaptic reorganization similar to mesial temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 89:717–729.
- Carasatorre M, Ochoa-Alvarez A, Velázquez-Campos G, Lozano-Flores C, Díaz-Cintra SY, Ramírez-Amaya V. 2015. Hippocampal synaptic expansion induced by spatial experience in rats correlates with improved information processing in the hippocampus. *PLoS One* 10:e0132676.
- Carriero G, Arcieri S, Cattalini A, Corsi L, Gnatkovsky V, de Curtis M. 2012. A guinea pig model of mesial temporal lobe epilepsy following nonconvulsive status epilepticus induced by unilateral intrahippocampal injection of kainic acid. *Epilepsia* 53:1917–1927.
- Carta M, Fièvre S, Gorlewicz A, Mülle C. 2014. Kainate receptors in the hippocampus. *Eur J Neurosci* 39:1835–1844.
- Chambers JS, Thomas D, Saland L, Neve RL, Perrone-Bizzozero NI. 2005. Growth-associated protein 43 (GAP-43) and synaptophysin alterations in the dentate gyrus of patients with schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29:283–290.
- Daly C, Ziff EB. 1997. Post-transcriptional regulation of synaptic vesicle protein expression and the developmental control of synaptic vesicle formation. *J Neurosci* 17:2365–2375.
- Davenport CJ, Brown WJ, Babb TL. 1990. Sprouting of GABAergic and mossy fiber axons in dentate gyrus following intrahippocampal kainate in the rat. *Exp Neurol* 109:180–190.
- Farris S, Lewandowski G, Cox CD, Steward O. 2014. Selective localization of *arc* mRNA in dendrites involves activity- and translation-dependent mRNA degradation. *J Neurosci* 34:4481–4493.
- Gröticke I, Hoffmann K, Löscher W. 2008. Behavioral alterations in a mouse model of temporal lobe epilepsy induced by intrahippocampal injection of kainate. *Exp Neurol* 213:71–83.
- Hernández-Ortega K, Ferrera P, Arias C. 2007. Sequential expression of cell-cycle regulators and Alzheimer's disease-related

- proteins in entorhinal cortex after hippocampal excitotoxic damage. *J Neurosci Res* 85:1744–1751.
- Ishibashi H. 2002. Increased synaptophysin expression through whisker stimulation in rat. *Cell Mol Neurobiol* 22:191–195.
- Janz R, Südhof TC, Hammer RE, Unni V, Siegelbaum SA, Bolshakov VY. 1999. Essential roles in synaptic plasticity for synaptogyrin I and synaptophysin I. *Neuron* 24:687–700.
- Kwon SE, Chapman ER. 2011. Synaptophysin regulates the kinetics of synaptic vesicle endocytosis in central neurons. *Neuron* 70:847–854.
- 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.
- Mashiah E, Terry RD, DeTeresa RM, Hansen LA. 1989. Immunohistochemical quantification of the synapse-related protein synaptophysin in Alzheimer disease. *Neurosci Lett* 103:234–239.
- Meconi A, Lui E, Marrone DF. 2015. Sustained Arc expression in adult-generated granule cells. *Neurosci Lett* 603:66–70.
- Messaoudi E, Kanhema T, Soulé J, Tiron A, Dagey G, da Silva B, Bramham CR. 2007. Sustained Arc/Arg3.1 synthesis controls long-term potentiation consolidation through regulation of local actin polymerization in the dentate gyrus in vivo. *J Neurosci* 27:10445–10455.
- Okuno H, Akashi K, Ishii Y, Yagishita-Kyo N, Suzuki K, Nonaka M, Kawashima T, Fujii H, Takemoto-Kimura S, Abe M, et al. 2012. Inverse synaptic tagging of inactive synapses via dynamic interaction of Arc/Arg3.1 with CaMKII β . *Cell* 149:886–898.
- Paxinos G, Watson C. 1986. *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 2nd ed. San Diego: Academic Press.
- Pearson JN, Schulz KM, Patel M. 2014. Specific alterations in the performance of learning and memory tasks in models of chemoconvulsant-induced status epilepticus. *Epilepsy Res* 108:1032–1040.
- Ramirez-Amaya V, Angulo-Perkins A, Chawla MK, Barnes CA, Rosi S. 2013. Sustained transcription of the immediate early gene Arc in the dentate gyrus after spatial exploration. *J Neurosci* 33:1631–1639.
- Ramirez-Amaya V, Vazdarjanova A, Mikhael D, Rosi S, Worley PF, Barnes CA. 2005. Spatial exploration-induced Arc mRNA and protein expression: Evidence for selective, network-specific reactivation. *J Neurosci* 25:1761–1768.
- Represa A, Tremblay E, Ben-Ari Y. 1987. Kainate binding sites in the hippocampal mossy fibers: Localization and plasticity. *Neuroscience* 20:739–748.
- Smith TD, Adams MM, Gallagher M, Morrison JH, Rapp PR. 2000. Circuit-specific alterations in hippocampal synaptophysin immunoreactivity predict spatial learning impairment in aged rats. *J Neurosci* 20:6587–6593.
- Steward O, Worley PF. 2001. A cellular mechanism for targeting newly synthesized mRNAs to synaptic sites on dendrites. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:7062–7068.
- Sutula TP, Dudek FE. 2007. Unmasking recurrent excitation generated by mossy fiber sprouting in the epileptic dentate gyrus: An emergent property of a complex system. *Prog Brain Res* 163:541–563.
- Tarsa L, Goda Y. 2002. Synaptophysin regulates activity-dependent synapse formation in cultured hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:1012–1016.
- Thiel G. 1993. Synapsin I, synapsin II, and synaptophysin: Marker proteins of synaptic vesicles. *Brain Pathol* 3:87–95.
- Toyoda T, Nomura H, Hashikawa K, Nonaka A, Matsuki N. 2010. Persistent neural activity regulates Arc/Arg3.1 transcription in the dentate gyrus. *J Neurosci Res* 88:3060–3066.
- Vazdarjanova A, Ramirez-Amaya V, Insel N, Plummer TK, Rosi S, Chowdhury S, Mikhael D, Worley PF, Guzowski JF, Barnes CA. 2006. Spatial exploration induces ARC, a plasticity-related immediate-early gene, only in calcium/calmodulin-dependent protein kinase II-positive principal excitatory and inhibitory neurons of the rat forebrain. *J Comp Neurol* 498:317–329.
- Yang Y, Tandon P, Liu Z, Sarkisian MR, Stafstrom CE, Holmes GL. 1998. Synaptic reorganization following kainic acid-induced seizures during development. *Brain Res Dev Brain Res* 107:169–177.
- Zepeda A, Aguilar-Arredondo A, Michel G, Ramos-Languren LA, Escobar M, Arias C. 2013. Functional recovery of the dentate gyrus after a focal lesion is accompanied by structural reorganization in the adult rat. *Brain Struct Funct* 218:437–453.



Memory retrieval-induced activation of adult-born neurons generated in response to damage to the dentate gyrus

Andrea Aguilar-Arredondo¹ · Angélica Zepeda¹

Received: 21 November 2017 / Accepted: 10 April 2018 / Published online: 16 April 2018
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

Abstract

The dentate gyrus (DG) is a neurogenic structure that exhibits functional and structural reorganization after injury. Neurogenesis and functional recovery occur after brain damage, and the possible relation between both processes is a matter of study. We explored whether neurogenesis and the activation of new neurons correlated with DG recovery over time. We induced a DG lesion in young adult rats through the intrahippocampal injection of kainic acid and analyzed functional recovery and the activation of new neurons after animals performed a contextual fear memory task (CFM) or a control spatial exploratory task. We analyzed the number of BrdU+ cells that co-localized with doublecortin (DCX) or with NeuN within the damaged DG and evaluated the number of cells in each population that were labelled with the activity marker c-fos after either task. At 10 days post-lesion (dpl), a region of the granular cell layer was devoid of cells, evidencing the damaged area, whereas at 30 dpl this region was significantly smaller. At 10 dpl, the number of BrdU+/DCX+/c-fos positive cells was increased compared to the sham-lesion group, but CFM was impaired. At 30 dpl, a significantly greater number of BrdU+/NeuN+/c-fos positive cells was observed than at 10 dpl, and activation correlated with CFM recovery. Performance in the spatial exploratory task induced marginal c-fos immunoreactivity in the BrdU+/NeuN+ population. We demonstrate that neurons born after the DG was damaged survive and are activated in a time- and task-dependent manner and that activation of new neurons occurs along functional recovery.

Keywords Plasticity · Kainic acid · Adult-born neurons activation · Hippocampus · Injury · Cognitive demand · IEG · Hilus

Introduction

The adult brain undergoes continuous modifications throughout life. Numerous events, including changes in cell structure and communication, lead to the continuous anatomical and functional fine-scale remodelling of neural circuits. Adult neurogenesis is one type of plastic event and occurs in two restricted zones in the adult mammalian brain: the subventricular zone (SVZ) of the lateral ventricles and the subgranular zone (SGZ) of the dentate gyrus (DG) of the hippocampus (Altman and Das 1965; Kaplan and Hinds 1977; Lois and Alvarez-Buylla 1993; Kempermann et al. 1997). The neurogenic process in the DG comprises

multiple steps, which begin with the proliferation of neural progenitors, followed by the differentiation of the progeny into neuronal lineage and neuronal maturation (Zhao et al. 2008; Suh et al. 2009; for reviews see; Ming and Song 2011 and see; Aguilar-Arredondo et al. 2015). Approximately, 3% of new neurons are functionally integrated into the rodent hippocampal circuit (Ramirez-Amaya et al. 2006). The process from the birth to integration of new neurons requires approximately 4 weeks (van Praag et al. 2002; Esposito 2005; Overstreet-Wadiche and Westbrook 2006; Zhao 2006; Toni et al. 2007, 2008), but the morphology of new neurons continues to develop for up to 4 months after birth (van Praag et al. 2002). The activation of adult-born neurons in the hippocampus, which has been considered an initial feature of functional integration (Jessberger and Kempermann 2003; Ramirez-Amaya et al. 2006; Kee et al. 2007; Clark et al. 2012) has been assessed by evaluating contents of the protein encoded by the immediate early gene (IEG) c-fos, because the levels of this protein rapidly increase in neurons

✉ Angélica Zepeda
azepeda@biomedicas.unam.mx

¹ Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 70-228, 04510 Mexico, DF, Mexico

in response to learning and memory (Ramirez-Amaya et al. 2006; Besnard et al. 2014).

Adult neurogenesis is modulated by several experimental conditions. Interestingly different types of brain damage, such as hypoxia (Zhu et al. 2005; Varela-Nallar et al. 2014), traumatic brain injury (Sun et al. 2007, 2015; Kernie and Parent 2010; Neuberger et al. 2017), ischaemia (Liu et al. 1998; Jin et al. 2004; Kawai et al. 2004; Xu et al. 2016), epilepsy (Bengzon et al. 1997; Parent et al. 1997, 2006; Scharfman et al. 2000; Hosford et al. 2016) and excitotoxic damage (Gray and Sundstrom 1998; Dong et al. 2003; Hattiangady et al. 2008; Zepeda et al. 2013) increase neurogenesis. Although this increase represents a plastic event, studies aiming to provide information on its possible functional role in the context of injury are still necessary.

Based on previous findings from our group, damage to the DG in young-adult rats is accompanied by the morphological, functional and electrophysiological recovery of the structure 25 days after the induction of an excitotoxic lesion, but not at an earlier time point (Zepeda et al. 2013). We, therefore, hypothesized that neurons born within the damaged neurogenic structure undergo a regular process of maturation and become activated, thus contributing to the observed functional recovery. We induced a DG lesion in young-adult rats through the intrahippocampal injection of kainic acid and analysed the following events at different time points: (1) morphological restoration of the damaged structure; (2) neurogenic responses; (3) survival of new neurons; (4) activation of new neurons by examining c-fos co-localization after animals performed a DG-mediated contextual fear memory task (CFM) or a control spatial exploratory task and; (5) contextual fear memory recovery. Consistent with our previous observations, the morphology of the DG was restored over time after injury in the present study. Moreover, neurons born after the lesion survive for at least 30 days and express the activity marker c-fos after animals performed a CFM task, but not after they performed a control spatial-exploration task. Moreover, at 10 days post-lesion (dpl), when a significant number of DCX+ cells were immunoreactive to c-fos but only a few number of new NeuN+ neurons co-expressed the activation marker, contextual fear memory was impaired, whereas at 30 dpl, when a significant number of new NeuN+ neurons were c-fos immunopositive, contextual fear memory was restored.

Materials and methods

Animals

“Principles of laboratory animal care” (NIH publication No. 86-23, revised 1985) and specific national laws were followed. All animals were handled in accordance with local

government rules and the methods approved by the Animal Care Committee at the Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Methods have been previously described in detail (Zepeda et al. 2013). Efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of subjects used. Adult male Wistar rats ($n = 71$) weighing between 250 and 300 g (2.5–3 months old) were used throughout the experiment. During the entire procedure, rats were housed in groups of four per cage in laboratory environment conditions with an inverted 12 h artificial light/dark cycle and free access to water and food.

Apparatus

Open field arena

We used an open field arena measuring 80 cm wide \times 80 cm long \times 30 cm tall with a black acrylic floor and walls. The arena was divided into 20 cm \times 20 cm squares to facilitate the registering of locomotion.

Contextual fear-conditioning chamber

A conditioning chamber measuring 25 cm long \times 25 cm wide \times 20 cm tall was used (San Diego Instruments, San Diego, CA, USA). The chamber consisted of transparent acrylic walls and roof, and a removable floor with 23 stainless steel rods. The system was equipped with a matrix of 32 infrared beams at the floor level. Movements inside the chamber were registered by the interruption of a beam and were recorded with the aid of software (Freeze Monitor, SD Instruments). Movements were also recorded by an observer and were compared to those recorded by the computer.

Kainic acid solution

Kainic acid (KA, K0250; Sigma–Aldrich, Chemie, St. Louis, MO Sigma–Aldrich, MO) was dissolved in 1 N NaOH, and the solution was brought to the desired volume with 10 mM phosphate buffer (pH 7.2) for a final 0.75 mM solution. The pH was adjusted to 7.0 with 2 N HCl.

Lesion procedures

For all experiments, animals were anaesthetized with 2–3% isoflurane in a mixture of 95% O₂/5% CO₂ and placed in a stereotaxic system (Stoelting, Wood Dale, IL). The DG of the hippocampus was located relative to the Bregma: AP – 3.6, LM – 2.4, and DV – 3.6 (Paxinos and Watson 2007). First, the scalp was incised and retracted, then a circular craniotomy was performed above the mentioned coordinates, and the dura was carefully sliced with the tip of a syringe needle in the area at which the cannula was inserted.

We inserted the cannula and injected 0.25 μ l (0.75 mM) of kainic acid (Sigma–Aldrich, Chemie, St. Louis, MO) at a rate of 0.25 μ l/min in the right DG using a 10 μ l Hamilton micro syringe mounted on a microinjection pump (Stoelting, Co., Wood Dale, IL, USA). After the injection was complete, the cannula was left in place for 1 min. In the sham group, the syringe was placed in the abovementioned coordinates, but no solution was delivered. The skin was then sutured, anaesthesia was discontinued, and the animals were returned to their acrylic cages until the behavioural analysis was performed. During this period, animals were continuously monitored. None of the rats exhibited seizures at any time point and only a few wet-rat shakes were observed in some rats during the first few hours after the KA infusion. All animals were killed at 10 or 30 days post-lesion (dpl) or at 10 and 30 days post-sham surgery (10 or 30 dsh).

BrdU injections

Three days after surgery (either lesion or sham), rats received one daily i.p. injection of BrdU (5-bromo-2-deoxyuridine; Sigma) for 5 consecutive days. BrdU was administered at a dose of 100 mg/kg of body weight in a 0.9% NaCl solution that had been previously vortexed and heated at 60 °C. Animals were perfused at 10 or 30 days after surgery for further immunohistochemical analysis (Fig. 1).

Behavioural testing

Animals were tested during the dark portion of the day-cycle in a room provided with red light. Animals were handled and habituated to the experimenter for three consecutive days before behavioural procedures were performed. Independent groups performed the contextual fear conditioning (CFC) or the spatial exploratory task (SET) on day 9 ($n=40$; KA = 16: $n=8$ for CFC and $n=8$ for SET; sham = 16: $n=8$ for CFC and $n=8$ for SET) or on day 29 ($n=31$; KA = 16: $n=8$ for CFC and $n=8$ for SET; sham = 15: $n=8$ for CFC and $n=7$ for SET) after surgical procedures. An additional group of intact animals ($n=8$) was used as control for anaesthetics/surgical procedures in the corresponding behavioural

analysis ($n=4$ for CFC and $n=4$ or SET). 24 h after CFC, trained animals were evaluated for contextual fear memory (CFM) on either day 10 or 30 post-surgery. 24 h after SET, animals that had only explored the conditioning chamber were reintroduced to the same chamber as a control task. Intact animals were either evaluated for CFM or were reintroduced to the chamber for a second session of spatial exploration (see “Groups”).

Open field task analysis

Immediately before the CFC and SET, animals were evaluated in an open field arena to analyze anxiety and general motor performance. Animals were individually placed in the arena on day 9 or 29 after lesion or after sham surgery. Each animal was individually placed in a corner of the arena and exploration was recorded; the number of squares and quadrants crossed were scored for 5 min. Caution was taken to counterbalance the introduction of the animals to each of the four corners of the arena.

Contextual fear conditioning (CFC) and memory (CFM)

Contextual memories are mainly modulated by the DG (Phillips and LeDoux 1992; Lee and Kesner 2004; Saxe et al. 2006). CFC consists of associating an electric foot-shock (unconditioned stimulus) with a given context (conditioned stimulus). As a consequence of this conditioning process, animals develop a conditioned freezing response in the conditioned context. Freezing or immobility reflects aversion and is defined as “the total absence of movement, except for those generated by breathing” (Phillips and LeDoux 1992). The task was performed in the fear-conditioning chamber described in the “Apparatus” section, and consisted of one training and one evaluation session separated by a 24 h interval. At 9 or 29 days after surgery, rats were individually trained by placing them in the conditioning chamber and allowing them to explore the apparatus for 2 min (pre-shock) before the first foot-shock was delivered (2 s duration and 1 mA). During the session, five foot-shocks were delivered at variable intervals ranging from 30 to 180 s and movement

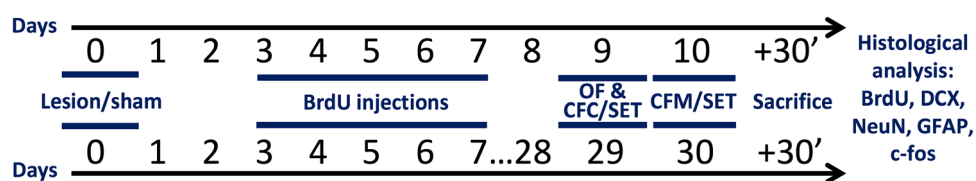


Fig. 1 Experimental design. Kainic acid injection or sham surgery was performed on “day 0”. BrdU was injected (100 mg/kg, ip) from days 3–7 after surgery. On day 9 or 29 after surgery, rats performed the open field (OF) task immediately before undergoing contextual fear conditioning (CFC) or being introduced to a neutral chamber for

the spatial exploration assessment (spatial exploratory task, SET). 24 h later, animals were either evaluated in the contextual fear memory (CFM) task or performed a second spatial exploration session. 30 min after memory retrieval, animals were sacrificed and brains were extracted for histological and immunohistochemical analyses

was evaluated. The entire training session lasted 12 min. 24 h later, subjects were evaluated for CFM by placing individual animals in the training context in the absence of shock, and freezing times were recorded for 5 min. Subjects were then returned to their home cages. After each session, the chamber was wiped with a cleaning solution consisting of 10% EtOH and 10% Extran (Merck, Darmstadt, Germany) diluted in distilled water.

Spatial exploratory task

A group of 35 animals performed a spatial exploratory task that served as a control for cell activation compared to CFM-induced cell activation. At 9 or 29 days post-surgery, rats were individually placed in the conditioning chamber described in the “Apparatus” section and allowed to freely explore the apparatus for 12 min. No shock was delivered at any time point during the session. On the next day, each rat was again placed in the chamber and allowed to freely explore the chamber for 5 min. The freezing time was recorded for each animal.

Groups

Animals were distributed into the following groups: 10 dpl + CFM ($n=8$), 10 dsh + CFM ($n=8$), 10 dpl + SET ($n=8$), 10 dsh + SET ($n=8$), 30 dpl + CFM ($n=8$), 30 dsh + CFM ($n=8$), 30 dpl + SET ($n=8$), 30 dsh + SET ($n=7$), and intact (no surgery) ($n=8$ total; $n=4$ CFM and $n=4$ SET). Brains from all groups, except for the intact, were processed for immunohistochemistry at the end of the experiment.

Histological procedures

All chemicals were purchased from Baker (Austin, Tx, USA) unless otherwise stated. 30 min immediately after CFM or after the second SET, animals were anesthetized with sodium pentobarbital and were transcardially perfused with 250 ml of 0.9% chilled saline followed by 250 ml of 4% chilled formaldehyde (PFA) in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4). Perfusion was performed 30 min after behavioural procedures to further capture the expression of the protein encoding the c-fos immediate early gene (IEG); the highest levels of this protein were recorded at this time point after CFM in a previous study (Besnard et al. 2014). Brains were removed, incubated with PFA for 24 h and then successively transferred to 15 and 30% sucrose solutions. We obtained 30 μ m coronal sections using a (Microm HM550, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA); sections were maintained in cryoprotectant solution (25% ethylene glycol, 25% glycerol, 50% 0.2 M PB, pH 7.4) and stored at 4 °C. One of every five sections was mounted on gelatine-covered slides and stained with cresyl violet for a volumetric

analysis of the lesion area and the DG (see “Volumetric analysis of the DG and the lesion”). The remaining sections were used for immunohistochemistry and stereological analysis (see “Immunofluorescence” and “Stereological estimates”).

Nissl staining

Nissl staining was performed to estimate the volume of the lesions and to analyze the gross morphology of the DG in all groups. Sections were mounted in gelatine-covered slides and rehydrated with distilled water. Sections were then dehydrated in a series of alcohol solutions (70, 95 and 100%, 2 min in each) and immersed in xylol. Sections were rehydrated, immersed in 0.1% cresyl violet (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) and dehydrated before being covered with Permount (Fischer Scientific, NJ, USA) and a coverslip.

Immunofluorescence

Free-floating sections were processed for BrdU, Doublecortin (DCX) NeuN and c-fos immunodetection to analyze proliferation, immature neurons, mature neurons and cell activation markers, respectively. Sections were permeabilized by soaking them in 0.3% PBS–Triton three times for 10 min each and were then blocked with 5% horse serum (Vector Laboratories, Burlingame, CA) diluted in 2% PBS–Triton at room temperature for 1 h. After blocking, sections were incubated with a combination of three primary antibodies overnight at 4 °C: BrdU/NeuN/c-fos, anti-BrdU (1:300 sheep, Abcam), anti-NeuN (1:500 mouse, Millipore) and anti-c-fos (rabbit 1:1000, Santa Cruz Biotechnology) or BrdU/DCX/c-fos, anti-BrdU (1:400 mouse, Jackson ImmunoResearch), DCX (1:250 goat, Santa Cruz Biotechnology) and c-fos diluted in blocking solution. Sections were then incubated with a combination of the appropriate secondary antibodies for 2 h at room temperature: Alexa Fluor 488-conjugated donkey anti-sheep (1:300, Invitrogen), Alexa Fluor 555-conjugated donkey anti-mouse (1:500, Invitrogen) Alexa Fluor-conjugated 647 donkey anti-rabbit (1:500, Invitrogen) Alexa Fluor 488-conjugated donkey anti-mouse (1:500, Invitrogen) and DyLight 594-conjugated donkey anti-goat (1:250, Jackson ImmunoResearch) diluted in blocking solution. Sections were then mounted on slides coated with poly-L-lysine (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA); DAKO fluorescent mounting medium (DAKO, Carpinteria, CA, USA) was applied and sections were covered with a coverslip.

Stereological estimates

Confocal microscopy and stereological-based cell estimates

Immunofluorescently labelled sections were analysed using a confocal microscope (Zeiss LSM5, Oberkochen, Germany). Using a 40× oil immersion objective lens, we acquired *z* stacks containing information from 8 to 11 optical slices separated by a 1.8–2.0 μm interval. We performed a stereological analysis of one of every five serial sections, analysing five fields from each of the 6 sections obtained from each animal ($n=4$ per experimental condition) using Zeiss LSM Image Browser software. An 18–22 μm *z* stack per field was obtained; the following fields comprising almost the whole DG (including the hilus) within AP coordinates –2.8 and –4.8 of the Paxinos atlas were analysed: one in the crest, two in the suprapyramidal blade and two in the infrapyramidal blade of the granular cell layer. Cells were counted as double- or triple-labelled if analysed markers appeared simultaneously in at least two adjacent focal planes. Cell estimates were obtained after multiplying the total number of cells in each category by 5: BrdU+, DCX+, *c-fos*+, BrdU+/DCX+, BrdU+/DCX+/*c-fos*+, BrdU+/NeuN+ and BrdU+/NeuN+/*c-fos*+

Volumetric analysis of the DG and the lesion

The volume of the dentate granular cell layer from Nissl-stained sections was calculated using the Cavalieri estimator stereological method (StereoInvestigator software; MBF Bioscience, Inc., Williston, VT). Nine to twelve sections per animal, each separated by 120 μm within AP –2.6 and –4.8, were used. The contour of the DG from all sections was delineated, the volume of the granular layer from each subject was automatically calculated and the average per group (sham, $n=8$; 10 dpl, $n=8$; 30 dpl, $n=8$) was obtained and reported in mm³. Contours were exported to NeuroLucida software (MBF Bioscience Inc., Williston, VT) and reconstructions from the DG containing the lesion were produced to create a 3D visual model of the structure. The volume of the lesion was obtained using the same method by delineating the area devoid of cells in each section.

Statistical analysis

Two-way ANOVA followed by a Bonferroni post hoc test was used to analyse data from the open field task, contextual fear conditioning test and estimates of cell numbers. One-way ANOVA followed by a Bonferroni post hoc test was performed for Cavalieri estimations and the contextual fear memory analysis. Results are expressed as mean ± SEM.

Results

The morphology of the dentate gyrus is restored over time after a focal excitotoxic lesion

Damage to the DG mainly affected the suprapyramidal layer and the hilus. Sham lesions did not affect the morphology of the DG, as shown by the continuity of nuclei in the granular cell layer (GCL) and hilus (Fig. 2a). At 10 days post-lesion (dpl), damage comprised a variety of distinctive morphological features; the main feature was the lack of cells in the suprapyramidal layer of the GCL (Fig. 2b). This lack of cells was observed along the septo-temporal axis and sometimes reached the crest of the medio-lateral axis (Fig. 2b, right panel). At this time point, numerous pyknotic nuclei were observed in the hilus, the GCL and the molecular layer (Fig. 2b, see the inset). At 30 dpl, the damaged area, as defined by the region devoid of cells, was consistently reduced compared to 10 dpl (Fig. 2c); the significant reduction in the lesion volume over time was confirmed by NeuroLucida projections and the Cavalieri analysis (Fig. 2a–c right panels; d). Consistent with our previous observations (Hernández-Ortega et al. 2007; Zepeda et al. 2013), the sizes (area and volume) of the lesion in the septo-temporal axis and the mediolateral plane were significantly smaller at 30 dpl than at 10 dpl; one-way ANOVA: $F_{(1,14)}=73.09$, $p<0.001$ (Fig. 2d, e). In agreement, the volume of the remaining GCL was smaller in the 10 dpl group compared to the sham group and also compared to 30 dpl group; one-way ANOVA: $F_{(2,21)}=9.765$, $p<0.01$. But no differences were found in the volume of the remaining GCL in the 30 dpl group compared to the sham group (Fig. 2d, e). The right panels in Fig. 2 show a 3D volumetric reconstruction of the conserved GCL in green and the region devoid of cells in red. Notably, Nissl sections from all sham and injured groups displayed the cannula tract above the suprapyramidal layer (Fig. 2a–c left panels, arrowheads).

NeuN immunohistochemistry confirmed the reduction of the lesion area over time (Fig. 3a–c). The DG from 10 dpl animals showed regions devoid of NeuN+ neurons in a portion of the suprapyramidal layer and crest along the septo-temporal axis; the same finding was observed in the hilus (Fig. 3b, left-most panel). However, at 30 dpl, we consistently observed a reduction in the area devoid of NeuN+ neurons along the DG septo-temporal and mediolateral axes (Fig. 3c). We evaluated GFAP+ cells at 10 and 30 dpl to determine whether the reduction in the size of the lesion area at 30 dpl was due to reactive gliosis (Fig. 3, right-most panels) and observed that reactive gliosis was increased in the hilus and the GCL at 10 dpl and that reactive glia were occupying the site devoid of NeuN+

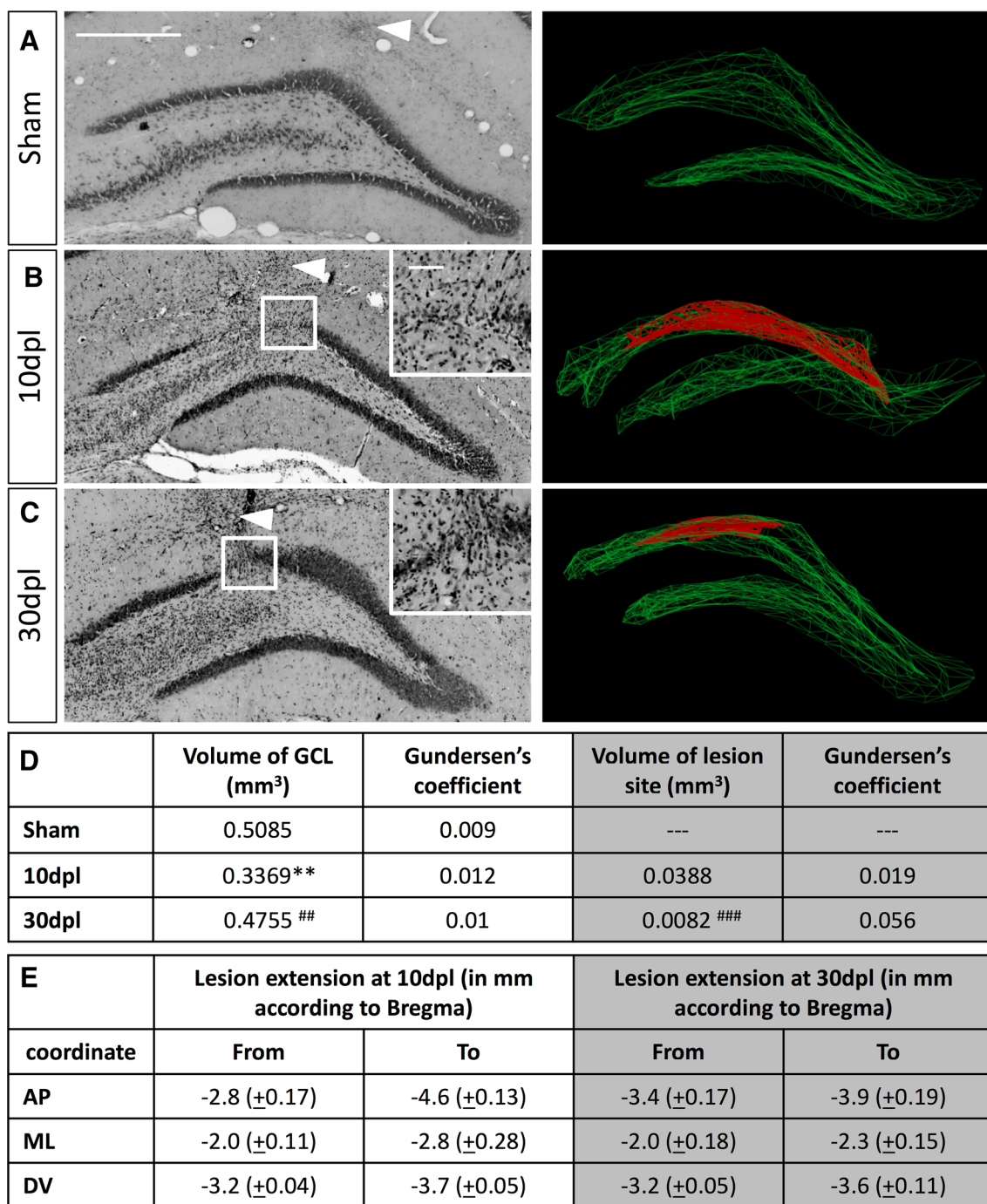


Fig. 2 Morphological restoration after damage of the granular cell layer of the dentate gyrus and reduction of the lesion volume over time. The left column shows representative Nissl-stained coronal sections of the DG from **a** sham; **b** 10 dpl and **c** 30 dpl groups. The lesion site is framed in white and insets show the corresponding 40× magnification images; arrowheads denote pyknotic nuclei left by the tract of the cannula. Scale bars: 400 and 60 μm for each magnification. Right columns show a visual model of the DG from NeuroLudica projections based on Nissl-stained coronal sections. Projections show 3D reconstructions of the DG in green and of the area devoid of nuclei in red. **d** Average volume and Gundersen's coefficient for the

granular cell layer (white columns) and the lesion site (grey-shaded columns) from sham ($n=8$), 10 dpl ($n=8$) and 30 dpl groups ($n=8$) obtained after a stereological Cavalieri analysis. **e** Data showing the extents of the lesions in the AP, ML and V coordinates as visualized in sections containing an area devoid of cells in the GCL. Data represent stereotaxic coordinates in mm from Bregma; mean \pm SE values show the initial (“from”) and final (“to”) coordinates where the lesion was observed. Statistical analyses were performed using one-way ANOVA followed by a Bonferroni *post hoc* test in all cases. GCL volume: 10 dpl vs sham ** $p < 0.01$; 10 vs 30 dpl ## $p < 0.01$. Lesion site: 30 vs 10 dpl ### $p < 0.001$

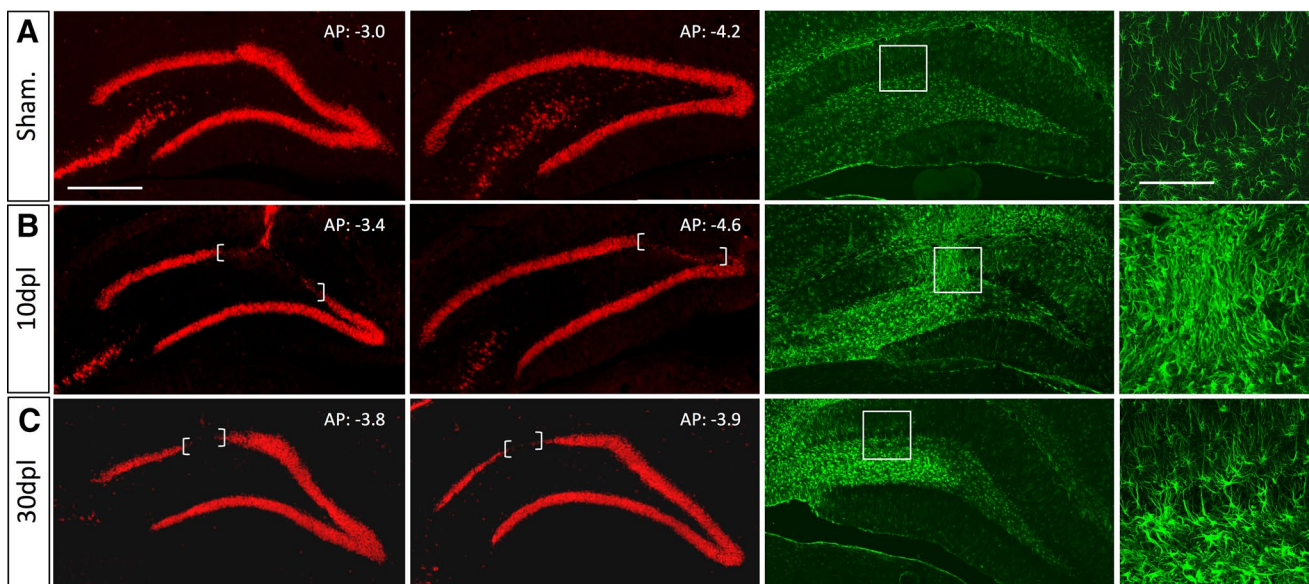


Fig. 3 Time-dependent structural reorganization of the GCL and glial activation in the injured DG. Representative images of immunofluorescence of the DG show NeuN+ cells (red, left-most and left-middle panels) at two different AP coordinates and GFAP+ cells (green, right-middle and right-most panels) from: **a** sham; **b** 10 dpl and **c** 30 dpl groups. The last column shows the high magnification images of GFAP immunohistochemistry in the core injury site depicted in the white square. Notably, at 10 dpl (middle row), the lesion is evidenced

as the absence of NeuN+ neurons in the granular layer and hilus (left-most and left middle panels, brackets). The lesion site is also evident at 30 dpl (bottom row) but the area is reduced (brackets), NeuN+ cells are still missing in the hilus. Right-middle and right-most panels show reactive gliosis in the hilus and granular cell layer. Notice the reactive gliosis within the lesion site in the GCL in the right-most panel in **b** but not in **c**. Scale bars: 400 and 60 μm for GFAP immunohistochemistry at each magnification

neurons in the GCL (Fig. 3b, right-most panel). At 30 dpl, GFAP reactivity was still increased in the hilus, but the density of GFAP+ cells within the GCL was diminished to the point that no scar proper was evident within the lesion site (Fig. 3c, right-most panel). Based on these results, (1) the morphology of the adult DG is restored over time after the induction of focal excitotoxic damage; (2) the area devoid of NeuN+ cells in the damaged DG consistently diminishes over time, and; (3) morphological restoration occurs even in the presence of a substantial number of reactive GFAP+ cells.

Modulation of the neurogenic response over time

After observing the morphological restoration of the DG from 10 to 30 dpl, we asked how the neurogenic response evolved. Therefore, we first evaluated the presence of young new born BrdU+/DCX+ neurons in control and lesion groups (Fig. 4a–e). At 10 dpl, we observed a significant increase in the number of BrdU+/DCX+ cells within the DG compared to the sham group; a fraction of BrdU+/DCX+ neurons showed prolonged and complex processes, which looked disorganized and displayed an aberrant morphology, including horizontal angles of growth (Fig. 4b). Notably, at 30 dpl, young new born BrdU+/DCX+ neurons were still observed (Fig. 4d) and their branching patterns resembled the sham group, showing that

the gross dendritic morphology and organization returns to normal over time (Fig. 4c). Quantitatively, the number of young new born neurons in the GCL was twofold higher at 10 dpl than in the lesion control group (10 days after the sham lesion, 10 dsh) (Two-way ANOVA: $F_{(3,12)} = 15.91$, $p < 0.001$), but this response decreased over time, such that at 30 dpl, the number of BrdU+/DCX+ cells was reduced to less than the 10 dsh levels. Of notice, the number of BrdU+ cells did not change between the 10 dsh and the 30 dsh groups (Two-way ANOVA: $F_{(3,12)} = 2.308$, $p > 0.05$). The number of BrdU+/DCX+ neurons also increased in the hilus (Two-way ANOVA: $F_{(3,12)} = 15.91$, $p < 0.01$) of injured animals at 10 dpl compared to 10 dsh and the response diminished over time, returning to control levels at 30 dpl (Two-way ANOVA: $F_{(3,12)} = 15.91$, $p < 0.001$). Thus, (1) at 30 dpl, new cells are no longer DCX+, as expected from the regular maturation process (Snyder et al. 2009a), and (2) the exacerbated neurogenic response is not sustained and is modulated over time (Fig. 4e).

The number of NeuN+ cells increases after a short time and new cells survive for up to 30 days after injury

A main concern regarding neurogenesis after damage is whether a substantial number of new neurons survive to maturity within the damaged structure and contribute to

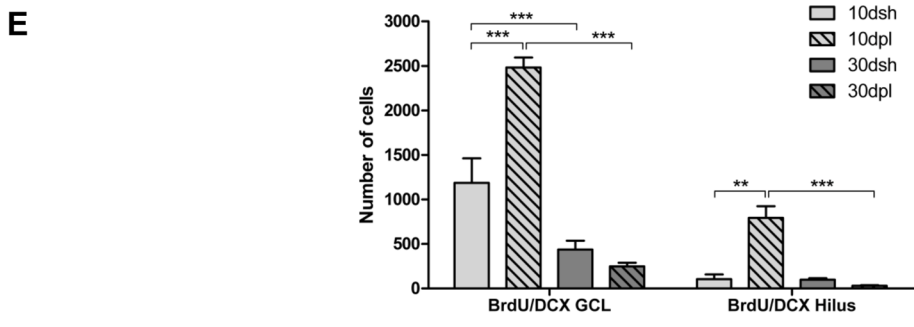
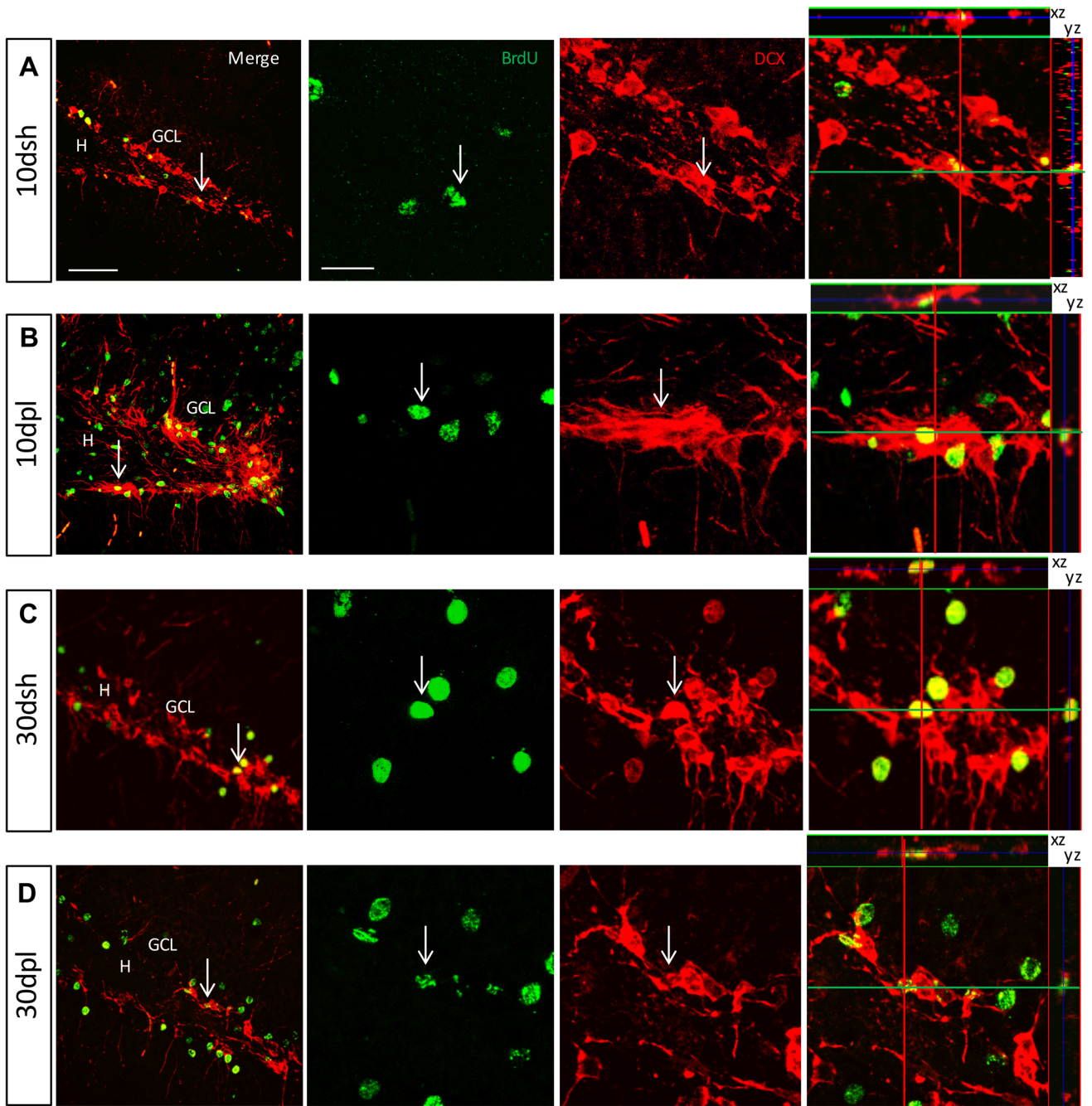


Fig. 4 The number of young new born neurons in the injured DG changes over time. Representative images of immunofluorescence for BrdU (green) and DCX (red) in cells from coronal sections of the DG in **a** 10 dsh, **b** 10 dpl, **c** 30 dsh and **d** 30 dpl groups. In each group, white arrows indicate a cell in the *z* stack reconstruction from the merged channels (left-most panel); BrdU+ (left-middle panel) and DCX+ (right-middle panel). The right-most panel shows the co-localization of the markers; *xz* and *yz* axes are shown on top and right margins of the image. **e** Stereological estimates of the number of double-labelled BrdU+/DCX+ cells in the GCL and hilus from sham ($n=4$ for 10 dsh and $n=4$ for 30 dsh) and lesion groups ($n=4$ for 10 dpl and $n=4$ for 30 dpl) over time. Means \pm SEM per group based on data obtained from 30 *z* stack fields in 6 sections per subject. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. Scale bars: 100 μm for *z* stack reconstructions; 20 μm for single channel images and orthogonal images

structural and functional recovery. We observed the survival of new neurons in the SGZ of the GCL and in ectopic regions such as the hilus (Fig. 5a–d). At 10 dpl, BrdU+/NeuN+ cells significantly outnumbered (by 3.5-fold) neurons in the GCL of the 10 days sham group (Two-way ANOVA: $F_{(3,12)} = 51.9$, $p < 0.01$) (Fig. 5e); these cells were mainly present in the SGZ. By 30 dpl, the number of new mature cells was 4.3-fold higher than in the 10 dpl group (Two-way ANOVA: $F_{(3,12)} = 51.9$, $p < 0.001$) and 2.7-fold higher than in the lesion control group (Two-way ANOVA: $F_{(3,12)} = 51.9$, $p < 0.001$) (Fig. 5e). This result may reflect the maturation process from 10 dpl (when a fraction of cells was NeuN+) to 30 dpl (when a greater number of cells became NeuN+). At this time point, a portion of these cells occupied the granular layer, consistent with their regular migratory process (Fig. 5c, d).

New neurons generated after damage express activity markers after contextual fear memory retrieval but not after a spatial exploratory task

We analysed the presence of *c-fos* immunoreactivity in new neurons from animals that performed a CFM to evaluate whether neurons born after damage were activated in response to a DG-mediated task. One day before killing (9 or 29 days post-lesion), injured animals were conditioned in the contextual fear memory task (CFC) and evaluated for contextual fear memory (CFM) 24 h later. 30 min after memory retrieval, animals were sacrificed and we evaluated *c-fos* expression using immunohistochemistry (Fig. 6a–d). The number of BrdU+/DCX+/c-fos immunoreactive cells in the GCL was 2.4-fold higher in the 10 dpl group than in the 10 days sham group, indicating a significant increase in the number of new neurons that were activated after damage (Two-way ANOVA: $F_{(3,12)} = 27.51$, $p < 0.001$) (Fig. 6a, b, e); the same finding was observed for the hilus (Two-way ANOVA: $F_{(3,12)} = 27.51$, $p < 0.01$). At 30 dpl, we still observed a few triple-labelled young, activated new born

neurons (Fig. 6d) and their morphology resembled young cells in the control lesion group (Fig. 6c). However, the number of young, activated new born neurons had significantly diminished at this time point compared to 10 dpl in both the GCL (Two-way ANOVA: $F_{(3,12)} = 27.51$, $p < 0.001$) and in the hilus (Two-way ANOVA: $F_{(3,12)} = 27.51$, $p < 0.01$) (Fig. 6e).

According to the analysis of the activation of new NeuN+ neurons, a greater number of BrdU+/NeuN+/c-fos positive cells were detected in the DG of the 10 dpl group than in the DG of the 10 days sham group (Fig. 7a, b). This activated population of NeuN+ new cells was limited to the SGZ. After 30 dpl, we observed 70% and 40% increases in the proportions of active BrdU+/NeuN+ neurons compared to the 30 dsh (Two-way ANOVA: $F_{(3,12)} = 9.576$, $p < 0.001$) and 10 dpl groups (Two-way ANOVA: $F_{(3,12)} = 9.576$, $p < 0.001$) respectively (Fig. 7c–e). Thus, a greater number of newly born NeuN+ cells were susceptible to activation after damage, and this number increases over time. Notably, some of these BrdU+/NeuN+/c-fos immunoreactive cells were already present within the GCL (Fig. 7d). In contrast, in the hilus, the number of triple-labelled cells was not different among groups, thus showing that neurons born after damage express activity markers in response to contextual fear memory retrieval in a region-dependent manner. Moreover, *c-fos* immunoreactivity observed in hilar DCX+ cells was not present in hilar NeuN+ cells.

We used two independent groups of animals that were tested after 30 dpl or 30 dsh in a spatial exploratory task to analyse whether the activation of new neurons was specific to contextual fear memory retrieval. Animals explored the conditioning chamber as described in the “Materials and methods” section and were reintroduced to the same chamber after 24 h. No shock was delivered to this control group at any time point. We compared the number of *c-fos* immunoreactive BrdU+/NeuN+ cells after the two behavioural tasks (Fig. 8a–e) and observed that the number of triple labelled cells was \approx sixfold higher in the group of animals exposed to the contextual fear memory retrieval protocol (+C) than in the group of animals subjected to the spatial exploration task (SET) (Two-way ANOVA: $F_{(2,9)} = 23.7$, $p < 0.001$) (Fig. 8d, e), suggesting that surviving new born neurons are specifically activated in response to a DG-modulated task.

Contextual fear memory is restored over time after DG damage

We analysed the performance of animals in the CFM at different time points after damage to correlate the impact of activated newly born neurons on cognitive recovery. Animals were first evaluated in an open field task to control for motor impairments or anxiety behaviours. In this control

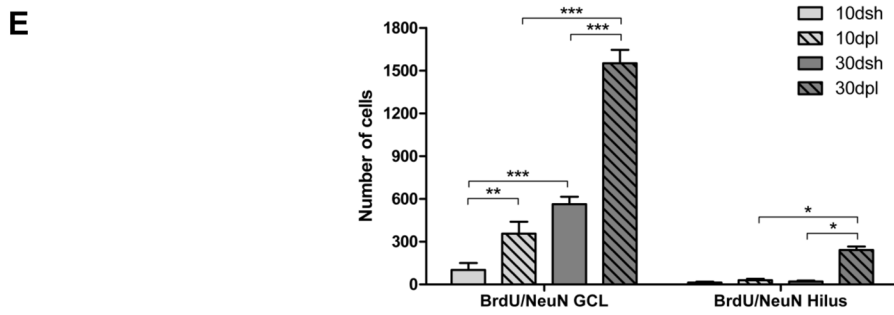
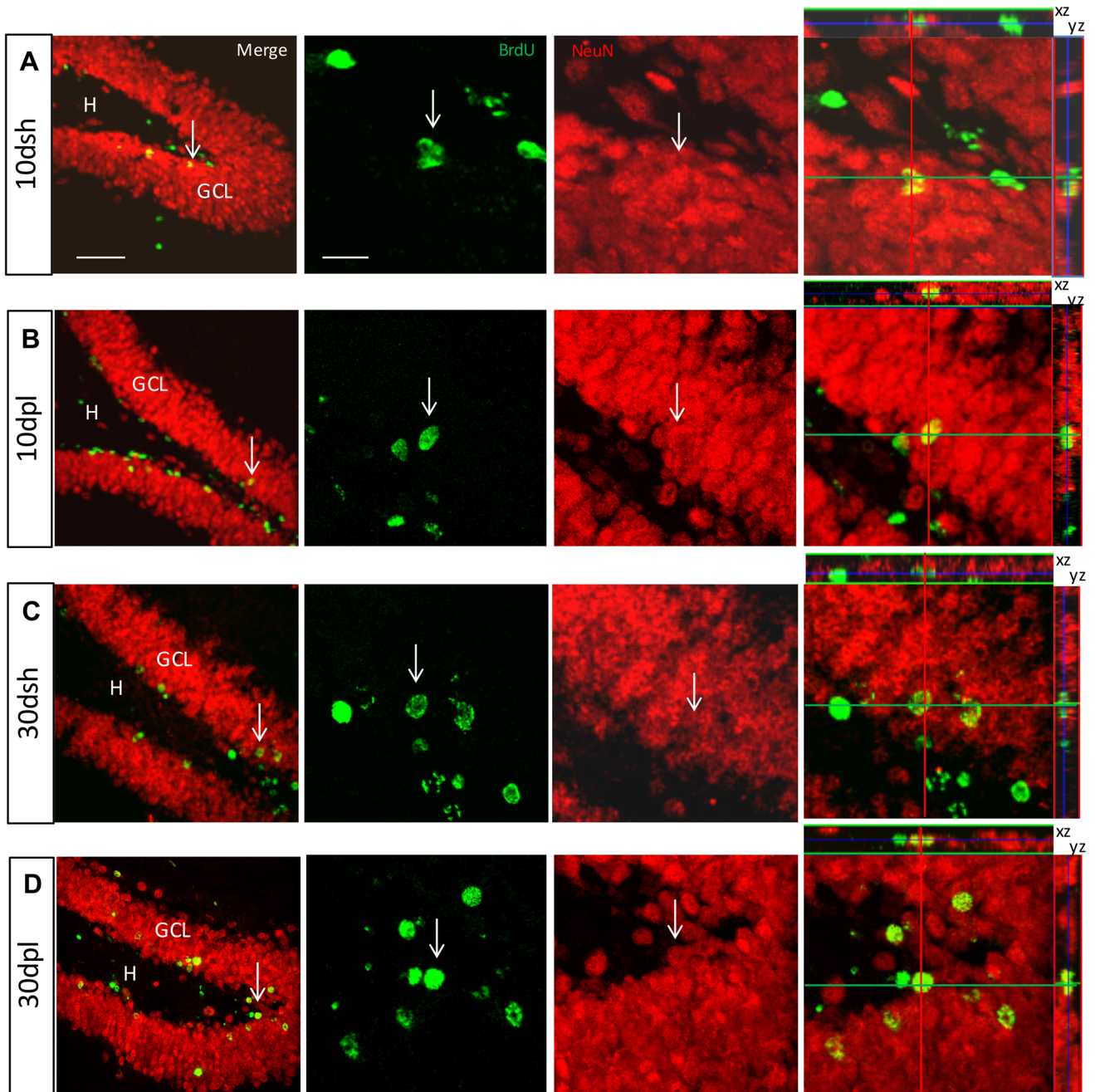


Fig. 5 The number of new NeuN+ neurons in the injured DG increases over time. Representative images of immunofluorescence for BrdU (green) and NeuN (red) in cells in coronal sections of the DG from **a** 10 dsh, **b** 10 dpl, **c** 30 dsh and **d** 30 dpl groups. In each group, white arrows indicate a cell in the *z* stack reconstruction from the merged channels (left-most panel); BrdU+ (left-middle panel) and NeuN+ (right-middle panel). The right-most panel shows the co-localization of the markers; *xz* and *yz* axes are shown on top and right margins of the image. **e** Stereological estimates of the number of double-labelled BrdU+/NeuN+ cells in the GCL and hilus from sham ($n=4$ for 10 days and $n=4$ for 30 days) and lesion groups ($n=4$ for 10 days and $n=4$ for 30 days) over time. Means \pm SEM per group based on data obtained from 30 *z* stack fields in 6 sections per subject. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. Scale bars: 100 μ m for *z* stack reconstructions; 20 μ m for single channel images and orthogonal images

task, we did not observe differences between intact, sham, 10 and 30 dpl groups (Two-way ANOVA: $F_{(4,66)} = 0.4869$, $p = 0.9072$) indicating that animals did not display motor impairments or anxiety behaviours that could impact their performance on contextual fear conditioning and CFM (Fig. 9a). All animals were able to learn in the CFC task, as shown by the learning curve and compared to the SET group (Two-way ANOVA: $F_{(4,66)} = 12.61$, $p < 0.001$) (Fig. 9b). 24 h after conditioning, we evaluated the animals for contextual fear memory and found that intact and sham animals displayed high freezing levels, suggesting the recall of the aversive context. At 10 dpl, animals did not recall the aversive context, as shown by the low freezing levels (One-way ANOVA: $F_{(4,66)} = 162.6$, $p < 0.001$) (Fig. 9c), suggesting that at this time point, injured animals did not remember the aversive context even when learning was not affected. Consistent with our previous results, at 30 dpl, all animals were able to remember the aversive context, as shown by the significant increase in freezing percentage. Based on these results, DG function is restored over time after DG damage and recovery correlates with a time-dependent increase in neurogenesis and the activation of a number of NeuN+ newly born DG neurons.

Discussion

Adult hippocampal neurogenesis is a well-established plastic mechanism that constitutively occurs in specific areas of the adult brain. Adult-born neurons become functionally integrated and contribute to different types of memory, particularly spatial memory and pattern separation (Snyder et al. 2005; Deng et al. 2009). A main topic of study in the context of damage is whether the long-lasting neurogenic process, which includes survival, maturation, and activation of neurons born after an insult, occurs endogenously within the damaged structure and represents a mechanism of morphological restoration and functional recovery. In

the present study, the morphology and function of the DG were restored over time after damage, consistent our previous report (Zepeda et al. 2013). Moreover, neurons born after damage not only survive but also are prone to activation in response to a DG-mediated memory task, but not a spatial exploratory task. Thus, we now provide evidence that a significant number of neurons born within a damaged neurogenic structure survive for at least 30 days after injury and become synaptically integrated, as shown by their task-dependent triggered activation.

Morphological recovery of the DG over time

A consistent observation in our previous study that was reproduced here is that the GCL appears to recover its original shape at 30 dpl (i.e., remodelling or morphological restoration seems to occur in a structural pattern). This observation has been previously reported and seems to at least partially depend on the extracellular matrix protein reelin (Heinrich 2006; Haas and Frotscher 2010; Orcinha et al. 2016). In our study, we observed a lack of neurons in a well-defined region of the GCL at 10 dpl, along with BrdU+/DCX+ young new born neurons positioned in ectopic places, showing aberrant migration. However, Nissl staining and NeuN immunofluorescence revealed the restoration of the DG shape at 30 dpl, which might depend on the dispersion of pre-existing cells induced by the lack of reelin at the site of injury (Del Rio et al. 1997) along with the neurogenic process that occurred following damage. Consistent with our results, aberrant migration to the hilus has been previously reported to occur through a mechanism independent of severe seizures (Myers et al. 2013). New DCX+ cells in the hilus only displayed c-fos immunoreactivity at 10 dpl, but not afterwards, whereas NeuN+ cells in the hilus were not c-fos immunoreactive at any time point. This result may rely on the increased excitability previously reported in young cells but also underscores a possible functional role for new neurons located in the GCL, because the number of BrdU+/NeuN+/c-fos immunopositive cells in this region increased over time after damage along with the recovery of contextual fear memory.

The molecular environment provided by the type and state of cells surrounding a lesion may differentially impact the progress of repair of the injured site. At 10 dpl, glial cells had infiltrated the granular layer, but at 30 dpl, this layer is consistently devoid of glial cells. As shown in our previous study, dendritic sprouting is not observed at short times after a cortical lesion, when abundant glial scarring is present. However, at later times points, when the glial reaction has receded, dendritic processes intermingle with reactive glia, thus showing that a potentially non-permissive environment for growth can change over time (Zepeda et al. 2004).

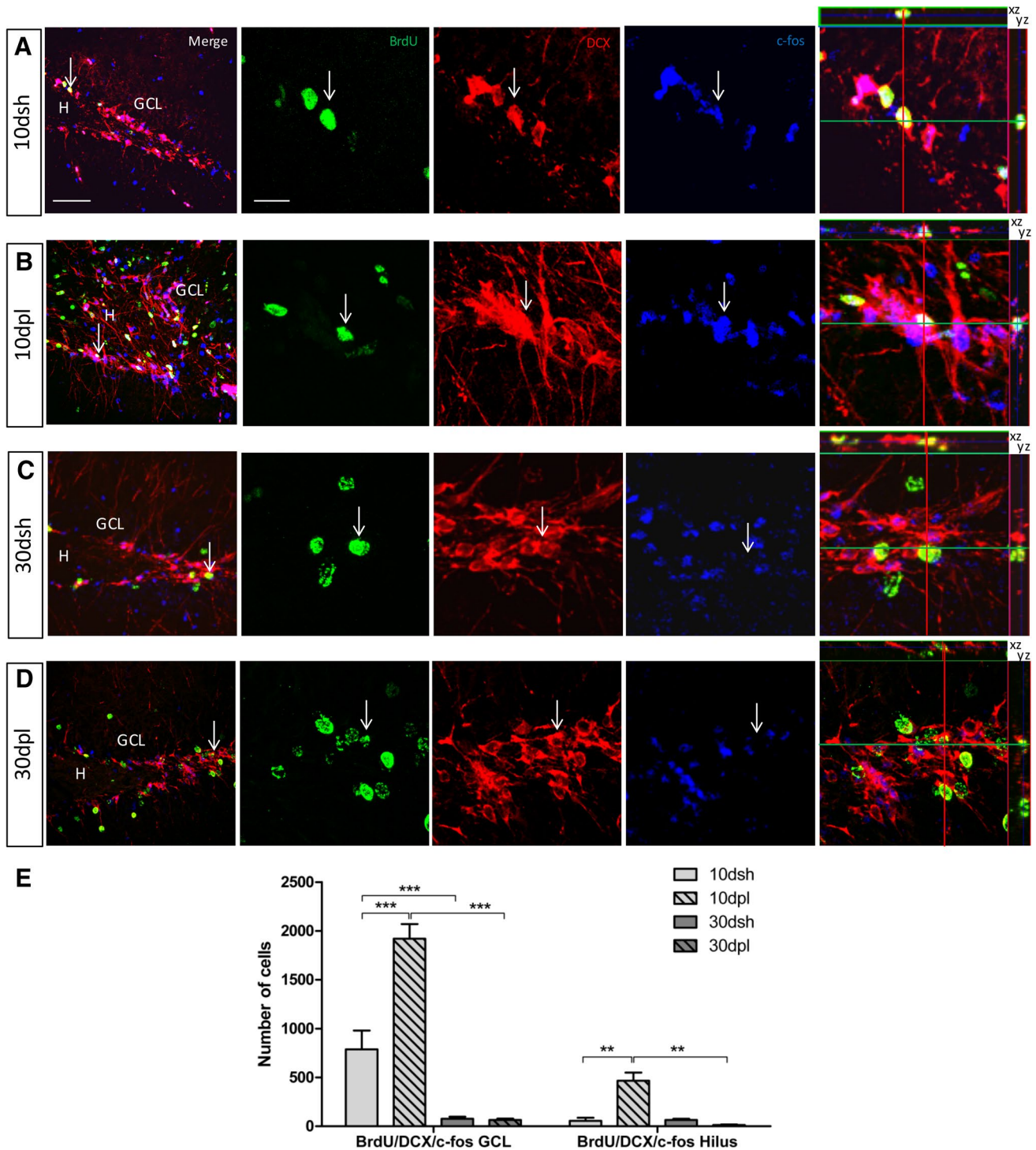


Fig. 6 Activation of young new born neurons in the injured DG over time. Representative images of immunofluorescence for BrdU (green), DCX (red) and c-fos (blue) in cells in coronal sections of the DG from **a** 10 dsh, **b** 10 dpl, **c** 30 dsh and **d** 30 dpl groups. In each group, white arrows indicate a cell in the *z* stack reconstruction from the merged channels (left-most panel): BrdU+ (left-middle panel), DCX+ (middle panel) and c-fos (right-middle panel). The right-most panel shows the co-localization of the markers; *xz* and *yz* axes are shown on top and right margins of the image. At 30 days, most cells

were BrdU+/DCX+/c-fos-. **e** Stereological estimates of the number of triple-labelled BrdU+/DCX+/c-fos+ cells in the GCL and hilus from sham ($n=4$ for 10 days and $n=4$ for 30 days) and lesion groups ($n=4$ for 10 days and $n=4$ for 30 days) over time. Means \pm SEMs per group based on data obtained from 30 *z* stack fields in 6 sections per subject. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. Scale bars: 100 μ m for *z* stack reconstructions; 20 μ m for single channel images and orthogonal images

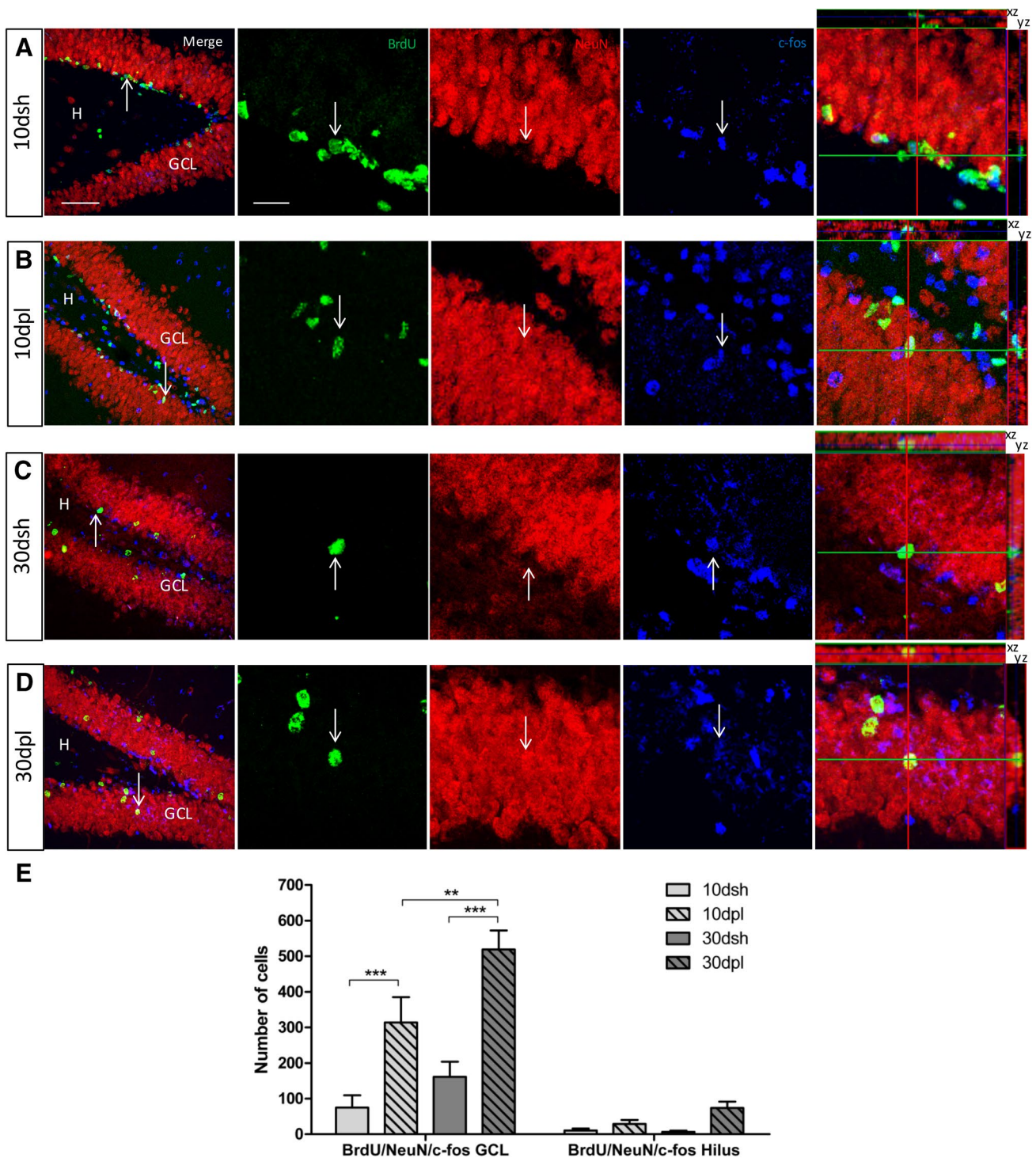


Fig. 7 The number of activated NeuN+ new neurons in the injured DG increases over time. Representative images of immunofluorescence showing BrdU (green), NeuN (red) and c-fos (blue) in cells in coronal sections of the DG from **a** 10 dsh, **b** 10 dpl, **c** 30 dsh and **d** 30 dpl groups. In each group, white arrows indicate a cell in a z stack reconstruction from merged channels (left-most panel): BrdU+ (left-middle panel), NeuN+ (middle panel) and c-fos positive (right-middle panel). The right-most panel shows the co-localization of the markers; xz and yz axes are shown on top and right margins of

the image. **e** Stereological estimates of the number of triple-labelled BrdU+/NeuN+/c-fos positive cells in the GCL and hilus from sham ($n=4$ for 10 days and $n=4$ for 30 days) and lesion groups ($n=4$ for 10 days and $n=4$ for 30 days) in time. Means \pm SEM per group based on data obtained from 30 z stack fields in 6 sections per subject. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. Scale bars: 100 μ m for z stacks reconstructions; 20 μ m for single channel images and orthogonal images

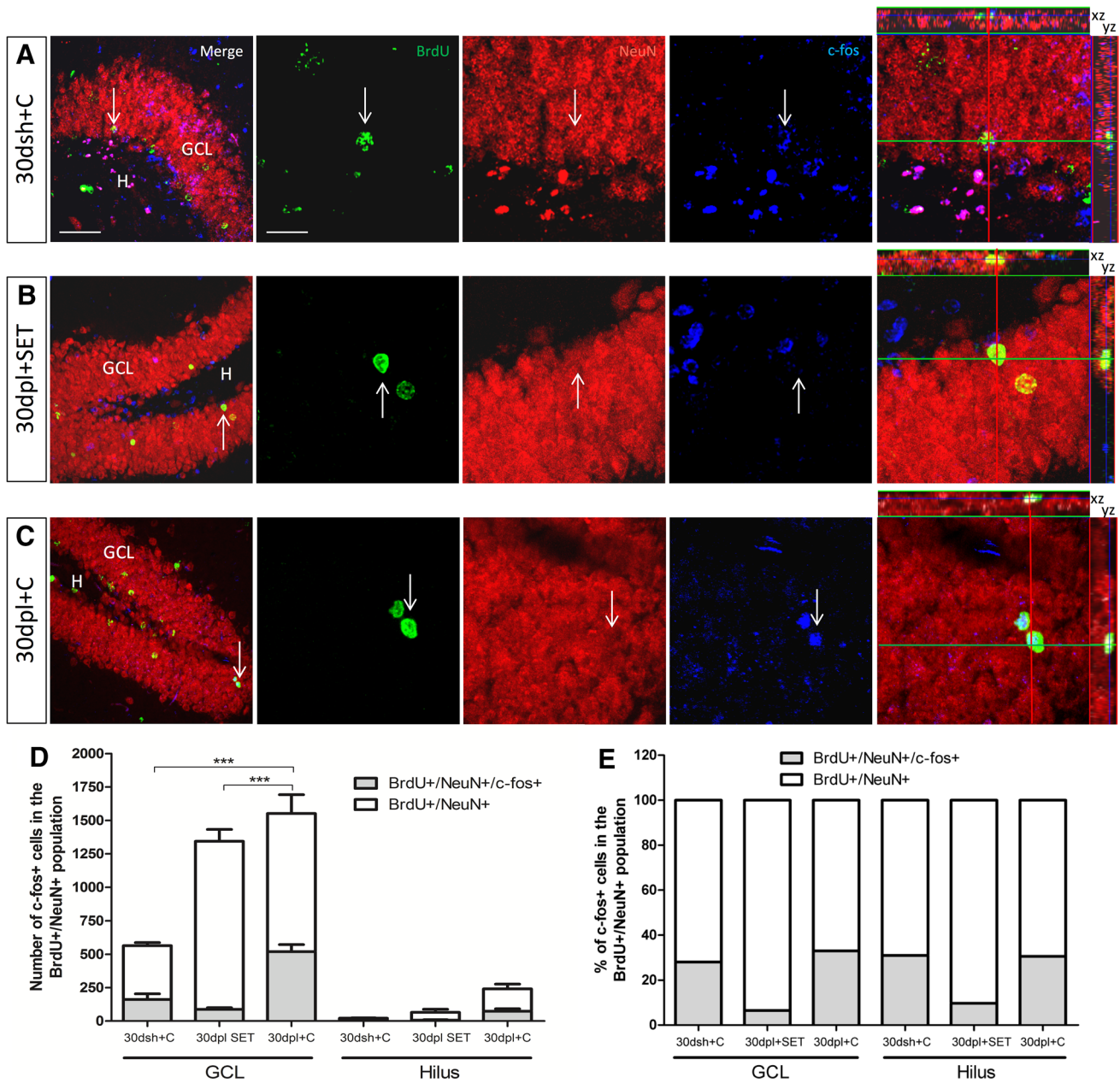


Fig. 8 Mature neurons born after DG injury are activated in response to a memory retrieval task. Representative images of BrdU (green), NeuN (red) and c-fos (blue) immunofluorescence in coronal sections from **a** 30 dsh, conditioned “+C”, **b** 30 dpl, spatial exploration “SET” and **c** 30 dpl, conditioned “+C” subjects. In each group, white arrows indicate a cell in a z stack reconstruction from merge channels (left-most panel): BrdU+ (left-middle panel), NeuN+ (middle panel) and c-fos positive (right-middle panel). The right-most panel shows the co-localization of each marker; xz and yz axes are shown on top and right margins of the image. A greater number of BrdU+/NeuN+/c-fos+ was observed in the 30 dpl group than in its behaviour and

lesion control groups. Additionally, the number of triple labelled cells was only significantly increased in the GCL, but not the hilus. Stereological estimates of **d** the number and **e** proportion of triple-labelled BrdU+/NeuN+/c-fos positive within the BrdU+/NeuN+ population in the conditioned “+C” and spatial exploration “SET” groups over time. Means \pm SEM per group based on data obtained from 30 z stack fields in 6 sections per subject ($n=4$ for all groups). * $p<0.05$ and *** $p<0.001$ two-way ANOVA followed by Bonferroni’s post hoc test. Scale bars: 100 μ m for z stack reconstructions; 20 μ m for single channel images and orthogonal images

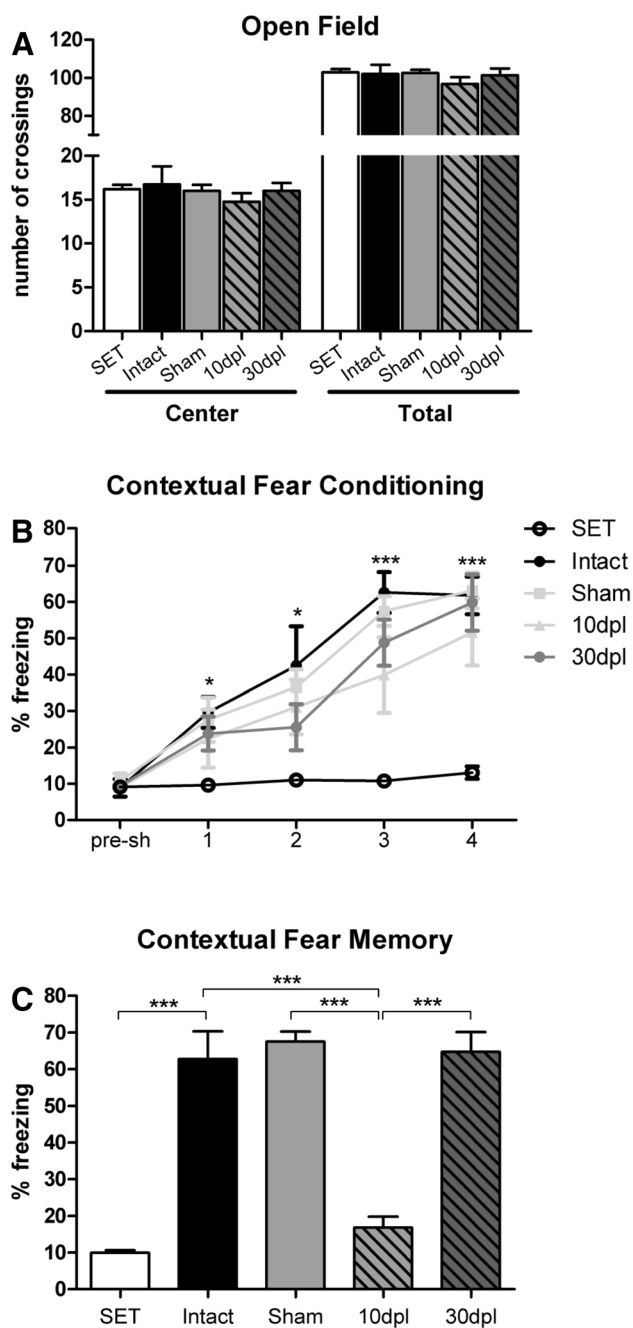


Fig. 9 Contextual fear memory is restored over time after DG damage. **a** Performance in the open field task was not different among groups. The number of centre crossings, which are associated with anxiety behaviours, and the number of total crossings, which are associated with motor ability, were not different among groups ($p > 0.05$ two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test). **b** Learning curve for contextual fear conditioning (CFC). All groups show an increasing learning curve compared to the non-conditioned group (SET) ($*p < 0.05$, $***p < 0.001$ for all groups vs SET; two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test). **c** Percentage of freezing behaviour during contextual fear memory retrieval (CFM). Significant differences were observed between the 10 dpl group and the other groups, with the exception of the SET group. ($***p < 0.001$, one-way-ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test). For SET $n = 35$; Intact $n = 4$, sham $n = 15$, 10 dpl $n = 8$, 30 dpl $n = 8$. For conditioned groups $n = 36$: Intact $n = 4$, sham $n = 16$, 10 dpl $n = 8$ and 30 dpl $n = 8$

Young cells born after damage display an irregular morphology

Consistent with previous reports of DG damage (Ogita et al. 2005), the lesion generated in the present study induced the proliferation of young new born neurons, as evidenced by the increase in the number of BrdU+/DCX+ cells. In our model, these new born cells show an initial aberrant gross dendritic morphology, as suggested by their disorganized, horizontal ramifications. However, young new born neurons observed at 30 dpl, showed dendritic retraction and a morphology that resembled cells born under physiological conditions. Additionally, at this time point, the number of BrdU+/DCX+ cells was significantly diminished compared to 10 dpl. On the one hand, this may be due to the rapid degradation of BrdU that results from the increased proliferation occurring at 10 dpl (Brandt et al. 2003) and on the other hand, this decrease may also reflect that cells born within the damaged region continue to develop in a regular manner, possibly providing a substrate for further functional plasticity. Consistent with the maturation hypothesis, Platschek et al. (2016) have shown that dendritic remodelling occurs in denervated neurons to maintain homeostasis (Platschek et al. 2016). Interestingly, maturation-dependent pruning (Beining et al. 2017) and dendritic arborisation followed by pruning have previously been observed after cortical damage, and pruning has been proposed to be a mechanism underlying functional reorganization (Kozłowski et al. 1994).

New neurons survive for up to 30 days after damage

Under physiological conditions, new cells in the rat and mouse DG are already positive for the neuronal marker NeuN even 1 week after birth (Snyder et al. 2009a). However, an interesting observation from our study and reports from other groups (Ogita et al. 2005) is that at 10 and 30 dpl, the number of BrdU+/NeuN+ cells continues to increase compared to sham groups. The initial increase may reflect the proportion of cells that incorporated BrdU while they were still autorenovating-type 2b progenitors, and therefore, are NeuN+ after 10 days. Meanwhile, the sustained increase in the number of NeuN+ cells may reflect the maturation of the new cells. The decrease in DCX+ cells at this time point, as well as recent data showing the shift from DCX+/Calbindin- to DCX-/Calbindin+ cells along time (Radic et al. 2017) may also support this idea. Calbindin is a mature granular cell marker, thus an analysis of DCX-/Calbindin+ cells is needed to conclusively clarify this issue. An alternative explanation for the initial (10 dpl) increase in the number of NeuN+ cells is that an accelerated process of maturation occurs within the damaged region. A shift in neuronal maturation has been shown to occur in fluoxetine-treated mice (Wang et al. 2008; Åmellem et al. 2017) and in

voluntarily running animals (Piatti et al. 2011). Nevertheless, even when the number of new NeuN+ neurons had increased at 10 dpl compared to the control, behavioural recovery had not yet occurred. Thus, at this time point, these cells may not yet necessarily be functional, as evidenced by our previous studies showing LTP and behavioural impairments (Liquitaya-Montiel et al. 2012; Zepeda et al. 2013), or the new NeuN+ population must exceed a number of cells to exert a behavioural impact. To our knowledge, the number of new neurons that is sufficient or necessary to acquire and to impair and reinstate a lost function has not been evaluated. Based on our results, functional recovery becomes evident after 30 dpl, when the number of BrdU+/NeuN+ cells is 4.3-fold higher than the number observed at 10 dpl.

Function-associated c-fos activity marker is present in NeuN+ cells born after damage, and activation correlates with functional recovery

Previous works have revealed an increase in the neurogenic response in the hippocampus and the further anatomical integration, as well as functional integration of new cells after traumatic brain injury (Sun et al. 2007; Villasana et al. 2015). This type of injury, as well as medial cerebral artery occlusion, affects cortical and subcortical structures, and the anatomical integration of new neurons in the striatum occurs after damage (Yamashita et al. 2006; Magnusson et al. 2014). To our knowledge, concomitant activation of cells and recovery of cognitive function have not been shown. Our rationale for directly inducing damage in the DG was that if new neurons compensate for neuronal loss in an established circuit, then their participation in reorganization would more easily be examined in a well-defined structure important for cognitive function that is also a natural neurogenic niche. Consistent with this hypothesis, new neurons born in the damaged DG survive for up to 30 dpl, and a significant fraction of NeuN+ cells express an activation marker in response to a DG-mediated task, namely, the recall of an aversive context. However, cells do not appear to be significantly activated after a control task involving spatial exploration of a previously explored environment in which aversive recall was not involved. Hence, activation of new born neurons, as observed by c-fos levels, depends on DG-dependent cognitive demand and does not seem to reveal spontaneous excitability. Notably, at 30 days post-lesion, activation only occurs in new NeuN+ neurons within the GCL, but not within the hilus, indicating region-specific activation of new neurons born after damage that survive in regular and ectopic regions, which has been shown to be strongly involved in experience-associated cognitive demand. Our results also show the early activation of BrdU+/DCX+ young new born neurons. This result was surprising because the expression of different immediate early genes was only

detected 2 weeks after birth under physiological conditions in other studies (Jessberger and Kempermann 2003; Bruel-Jungerman 2006; Ramirez-Amaya et al. 2006; Kee et al. 2007). A possible explanation for our observation is that cells born in response to damage differ from cells born under physiological conditions. Further experiments exploring synaptic excitability in the context of damage will provide valuable information to clarify these discrepancies. New neurons have been shown to underlie the reinstallation of a lost function as recently described. In such study, Cohen et al. (2016) showed that the natural degeneration of a telencephalic neural circuit in adulthood leads to song structure degradation in songbirds, whereas circuit reintegration mediated by new neurons leads to song behaviour reinstatement. Thus, compensatory neurogenesis may represent the mechanism of morphological and functional reorganization and c-fos-positive new neurons may indicate functionally integrated cells (Snyder et al. 2009b, a). After neuronal loss, the system potentially reacts by increasing the generation of new neurons to maintain the pool of functional cells. Cells in the entorhinal cortex (EC) have been shown to establish new connections with granular cells after an EC lesion; thus, an analysis of whether DG damage induces synaptogenesis from EC cells onto new DG cells would be worthwhile and provide a possible mechanism of functional recovery (Platschek et al. 2017).

Based on our results, neurons born within a damaged structure survive and are activated in response to a specific cognitive demand, thus suggesting that neurons born in response to damage may functionally integrate into the circuit. Future experiments showing that the depletion of DCX cells worsens motor recovery after damage (Wang et al. 2012) would be of interest to resolve the question of whether the new neurons observed in our model may in fact be responsible for the observed morphological and functional reorganization.

Conclusions

The functional specificity of adult-born neurons in the hippocampus is still a topic of debate, but they appear to indisputably represent a form of plasticity. We now provide evidence showing that neurons born within the damaged neurogenic structure survive for up to 30 days and are activated in a time- and task-dependent manner. The observation on neuronal survival and activation along with functional recovery provides information on possible roles of neurogenesis in morphological repair and cognitive recovery.

Acknowledgements This work was supported by Grants from Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) 203015 and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

(CONACyT) 176589. Aguilar-Arredondo is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and was supported by CONACyT 270435. We thank Clorinda Arias for providing helpful comments on the manuscript and Josué Ramirez Jarquín, Miguel Tapia and Patricia Ferrera for providing technical support.

Funding This work was supported by grants from Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) 203015 and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) 176589 and 270435.

Compliance with ethical standards

This work has not been published previously, nor is it under review in any other journal. All authors of the study accept the contents of the manuscript and consent to the submission of the work. None of the authors have been cited for any scientific misconduct.

Conflict of interest The authors have no conflicts of interest to declare.

Ethical approval All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.

Human and animal rights statement All procedures involving animals were performed in accordance with the ethical standards of the institution or practice at which the studies were conducted.

References

- Aguilar-Arredondo A, Arias C, Zepeda A (2015) Evaluating the functional state of adult-born neurons in the adult dentate gyrus of the hippocampus: from birth to functional integration. *Rev Neurosci*. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2014-0071>
- Altman J, Das GD (1965) Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124:319–335
- Åmellem I, Suresh S, Chang CC et al (2017) A critical period for antidepressant-induced acceleration of neuronal maturation in adult dentate gyrus. *Transl Psychiatry* 7:e1235. <https://doi.org/10.1038/tp.2017.208>
- Beining M, Jungenitz T, Radic T et al (2017) Adult-born dentate granule cells show a critical period of dendritic reorganization and are distinct from developmentally born cells. *Brain Struct Funct* 222:1427–1446. <https://doi.org/10.1007/s00429-016-1285-y>
- Bengzon J, Kokaia Z, Elmer E et al (1997) Apoptosis and proliferation of dentate gyrus neurons after single and intermittent limbic seizures. *Proc Natl Acad Sci* 94:10432–10437. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.19.10432>
- Besnard A, Serge L, Jocelyne C (2014) Comparative dynamics of MAPK/ERK signalling components and immediate early genes in the hippocampus and amygdala following contextual fear conditioning and retrieval. *Brain Struct Funct* 219:415–430. <https://doi.org/10.1007/s00429-013-0505-y>
- Brandt MD, Jessberger S, Steiner B et al (2003) Transient calretinin expression defines early postmitotic step of neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis of mice. *Mol Cell Neurosci* 24:603–613. [https://doi.org/10.1016/S1044-7431\(03\)00207-0](https://doi.org/10.1016/S1044-7431(03)00207-0)
- Bruel-Jungerman E (2006) Long-term potentiation enhances neurogenesis in the adult dentate gyrus. *J Neurosci* 26:5888–5893. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0782-06.2006>
- Clark PJ, Bhattacharya TK, Miller DS et al (2012) New neurons generated from running are broadly recruited into neuronal activation associated with three different hippocampus-involved tasks. *Hippocampus* 22:1860–1867. <https://doi.org/10.1002/hipo.22020>
- Cohen RE, Macedo-Lima M, Miller KE, Brenowitz EA (2016) Adult neurogenesis leads to the functional reconstruction of a telencephalic neural circuit. *J Neurosci* 36:8947–8956. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0553-16.2016>
- Del Río JA, Heimrich B, Borrell V et al (1997) A role for Cajal–Retzius cells and reelin in the development of hippocampal connections. *Nature* 385:70–74. <https://doi.org/10.1038/385070a0>
- Deng W, Saxe MD, Gallina IS, Gage FH (2009) Adult-born hippocampal dentate granule cells undergoing maturation modulate learning and memory in the brain. *J Neurosci* 29:13532–13542. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3362-09.2009>
- Dong H, Csernansky C, Goico B, Csernansky JG (2003) Hippocampal neurogenesis follows kainic acid-induced apoptosis in neonatal rats. *J Neurosci* 23:1742–1749
- Esposito MS (2005) Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. *J Neurosci* 25:10074–10086. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3114-05.2005>
- Gray WP, Sundstrom LE (1998) Kainic acid increases the proliferation of granule cell progenitors in the dentate gyrus of the adult rat. *Brain Res* 790:52–59. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(98\)00030-4](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(98)00030-4)
- Haas CA, Frotscher M (2010) Reelin deficiency causes granule cell dispersion in epilepsy. *Exp Brain Res* 200:141–149. <https://doi.org/10.1007/s00221-009-1948-5>
- Hattiangady B, Rao MS, Shetty AK (2008) Plasticity of hippocampal stem/progenitor cells to enhance neurogenesis in response to kainate-induced injury is lost by middle age. *Aging Cell* 7:207–224. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2007.00363.x>
- Heinrich C (2006) Reelin deficiency and displacement of mature neurons, but not neurogenesis, underlie the formation of granule cell dispersion in the epileptic hippocampus. *J Neurosci* 26:4701–4713. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5516-05.2006>
- Hernández-Ortega K, Ferrera P, Arias C (2007) Sequential expression of cell-cycle regulators and Alzheimer’s disease-related proteins in entorhinal cortex after hippocampal excitotoxic damage. *J Neurosci Res* 85:1744–1751. <https://doi.org/10.1002/jnr.21301>
- Hosford BE, Liska JP, Danzer SC (2016) Ablation of newly generated hippocampal granule cells has disease-modifying effects in epilepsy. *J Neurosci* 36:11013–11023. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1371-16.2016>
- Jessberger S, Kempermann G (2003) Adult-born hippocampal neurons mature into activity-dependent responsiveness. *Eur J Neurosci* 18:2707–2712. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2003.02986.x>
- Jin K, Minami M, Xie L et al (2004) Ischemia-induced neurogenesis is preserved but reduced in the aged rodent brain. *Aging Cell* 3:373–377. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9728.2004.00131.x>
- Kaplan M, Hinds J (1977) Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science* 197:1092–1094. <https://doi.org/10.1126/science.887941>
- Kawai T, Takagi N, Miyake-Takagi K et al (2004) Characterization of BrdU-positive neurons induced by transient global ischemia in adult hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab* 24:548–555. <https://doi.org/10.1097/01.WCB.0000117807.29980.1A>
- 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. <https://doi.org/10.1038/nn1847>
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH (1997) Genetic influence on neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:10409–10414. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.19.10409>

- Kernie SG, Parent JM (2010) Forebrain neurogenesis after focal ischemic and traumatic brain injury. *Neurobiol Dis* 37:267–274. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.11.002>
- Kozlowski DA, Jones TA, Schallert T (1994) Pruning of dendrites and restoration of function after brain damage: role of the NMDA receptor. *Restor Neurol Neurosci* 7:119–126. <https://doi.org/10.3233/RNN-1994-7207>
- Lee I, Kesner RP (2004) Differential contributions of dorsal hippocampal subregions to memory acquisition and retrieval in contextual fear-conditioning. *Hippocampus* 14:301–310. <https://doi.org/10.1002/hipo.10177>
- Liquitaya-Montiel A, Aguilar-Arredondo A, Arias C, Zepeda A (2012) Insulin growth factor-I promotes functional recovery after a focal lesion in the dentate gyrus. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. <https://doi.org/10.2174/1871527311201070818>
- Liu J, Solway K, Messing RO, Sharp FR (1998) Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils. *J Neurosci* 18:7768–7778
- Lois C, Alvarez-Buylla A (1993) Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:2074–2077. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.5.2074>
- Magnusson JP, Goritz C, Tatarishvili J et al (2014) A latent neurogenic program in astrocytes regulated by Notch signaling in the mouse. *Science* 346:237–241. <https://doi.org/10.1126/science.346.6206.237>
- Ming G, Song H (2011) Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron* 70:687–702. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.001>
- Myers CE, Bermudez-Hernandez K, Scharfman HE (2013) The influence of ectopic migration of granule cells into the hilus on dentate gyrus-CA3 function. *PLoS One* 8:e68208. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068208>
- Neuberger EJ, Swietek B, Corrubia L et al (2017) Enhanced dentate neurogenesis after brain injury undermines long-term neurogenic potential and promotes seizure susceptibility. *Stem Cell Rep* 9:972–984. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.07.015>
- Ogita K, Nishiyama N, Sugiyama C et al (2005) Regeneration of granule neurons after lesioning of hippocampal dentate gyrus: evaluation using adult mice treated with trimethyltin chloride as a model. *J Neurosci Res* 82:609–621. <https://doi.org/10.1002/jnr.20678>
- Orcinha C, Münzner G, Gerlach J et al (2016) Seizure-induced motility of differentiated dentate granule cells is prevented by the central reelin fragment. *Front Cell Neurosci*. <https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00183>
- Overstreet-Wadiche LS, Westbrook GL (2006) Functional maturation of adult-generated granule cells. *Hippocampus* 16:208–215. <https://doi.org/10.1002/hipo.20152>
- Parent JM, Yu TW, Leibowitz RT et al (1997) Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *J Neurosci* 17:3727–3738
- Parent JM, Elliott RC, Pleasure SJ et al (2006) Aberrant seizure-induced neurogenesis in experimental temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol* 59:81–91. <https://doi.org/10.1002/ana.20699>
- Paxinos G, Watson C (2007) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Elsevier, New York
- Phillips RG, LeDoux JE (1992) Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav Neurosci* 106:274–285. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.106.2.274>
- Piatti VC, Davies-Sala MG, Esposito MS et al (2011) The timing for neuronal maturation in the adult hippocampus is modulated by local network activity. *J Neurosci* 31:7715–7728. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1380-11.2011>
- Platschek S, Cuntz H, Vuksic M et al (2016) A general homeostatic principle following lesion induced dendritic remodeling. *Acta Neuropathol Commun* 4:19. <https://doi.org/10.1186/s40478-016-0285-8>
- Platschek S, Cuntz H, Deller T, Jedlicka P (2017) Lesion-induced dendritic remodeling as a new mechanism of homeostatic structural plasticity in the adult brain. In: Van Ooyen A, Butz-Ostendorf M (eds) *The rewiring brain: a computational approach to structural plasticity in the adult brain*. Academic Press, San Diego, pp 203–218
- Radic T, Frieß L, Vijikumar A et al (2017) Differential postnatal expression of neuronal maturation markers in the dentate gyrus of mice and rats. *Front Neuroanat*. <https://doi.org/10.3389/fnana.2017.00104>
- Ramirez-Amaya V, Marrone DF, Gage FH et al (2006) Integration of new neurons into functional neural networks. *J Neurosci* 26:12237–12241. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2195-06.2006>
- Saxe MD, Battaglia F, Wang J-W et al (2006) Ablation of hippocampal neurogenesis impairs contextual fear conditioning and synaptic plasticity in the dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci* 103:17501–17506. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607207103>
- Scharfman HE, Goodman JH, Sollas AL (2000) Granule-like neurons at the hilar/CA3 border after status epilepticus and their synchrony with area CA3 pyramidal cells: functional implications of seizure-induced neurogenesis. *J Neurosci* 20:6144–6158
- Snyder JS, Hong NS, McDonald RJ, Wojtowicz JM (2005) A role for adult neurogenesis in spatial long-term memory. *Neuroscience* 130:843–852. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.10.009>
- Snyder JS, Choe JS, Clifford MA et al (2009a) Adult-born hippocampal neurons are more numerous, faster maturing, and more involved in behavior in rats than in mice. *J Neurosci* 29:14484–14495. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1768-09.2009>
- Snyder JS, Radik R, Wojtowicz JM, Cameron HA (2009b) Anatomical gradients of adult neurogenesis and activity: young neurons in the ventral dentate gyrus are activated by water maze training. *Hippocampus* 19:360–370. <https://doi.org/10.1002/hipo.20525>
- Suh H, Deng W, Gage FH (2009) Signaling in adult neurogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 25:253–275. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.042308.113256>
- Sun D, McGinn MJ, Zhou Z et al (2007) Anatomical integration of newly generated dentate granule neurons following traumatic brain injury in adult rats and its association to cognitive recovery. *Exp Neurol* 204:264–272. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2006.11.005>
- Sun D, Daniels TE, Rolfe A et al (2015) Inhibition of injury-induced cell proliferation in the dentate gyrus of the hippocampus impairs spontaneous cognitive recovery after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 32:495–505. <https://doi.org/10.1089/neu.2014.3545>
- Toni N, Teng EM, Bushong EA et al (2007) Synapse formation on neurons born in the adult hippocampus. *Nat Neurosci* 10:727–734. <https://doi.org/10.1038/nn1908>
- Toni N, Laplagne DA, Zhao C et al (2008) Neurons born in the adult dentate gyrus form functional synapses with target cells. *Nat Neurosci* 11:901–907. <https://doi.org/10.1038/nn.2156>
- van Praag H, Schinder AF, Christie BR et al (2002) Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 415:1030–1034. <https://doi.org/10.1038/4151030a>
- Varela-Nallar L, Rojas-Abalos M, Abbott AC et al (2014) Chronic hypoxia induces the activation of the Wnt/β-catenin signaling pathway and stimulates hippocampal neurogenesis in wild-type and APP^{swe}-PS1^{ΔE9} transgenic mice in vivo. *Front Cell Neurosci*. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00017>
- Villasana LE, Kim KN, Westbrook GL, Schnell E (2015) Functional integration of adult-born hippocampal neurons after

- traumatic brain injury. *eNeuro*. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0.0056-15.2015>
- Wang J-W, David DJ, Monckton JE et al (2008) Chronic fluoxetine stimulates maturation and synaptic plasticity of adult-born hippocampal granule cells. *J Neurosci* 28:1374–1384. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3632-07.2008>
- Wang X, Mao X, Xie L et al (2012) Conditional depletion of neurogenesis inhibits long-term recovery after experimental stroke in mice. *PLoS One* 7:e38932. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038932>
- Xu W, Sun X, Song C et al (2016) Bumetanide promotes neural precursor cell regeneration and dendritic development in the hippocampal dentate gyrus in the chronic stage of cerebral ischemia. *Neural Regen Res* 11:745. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.182700>
- Yamashita T, Deguchi K, Sawamoto K et al (2006) Neuroprotection and neurosupplementation in ischaemic brain. *Biochem Soc Trans* 34:1310–1312. <https://doi.org/10.1042/BST0341310>
- Zepeda A, Sengpiel F, Guagnelli MA, Vaca L, Arias C (2004) Functional reorganization of visual cortex maps after ischemic lesions is accompanied by changes in expression of cytoskeletal proteins and NMDA and GABA(A) receptor subunits. *J Neurosci* 24(8):1812–1821. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3213-03.2004>
- Zepeda A, Aguilar-Arredondo A, Michel G et al (2013) Functional recovery of the dentate gyrus after a focal lesion is accompanied by structural reorganization in the adult rat. *Brain Struct Funct* 218:437–453. <https://doi.org/10.1007/s00429-012-0407-4>
- Zhao C (2006) Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *J Neurosci* 26:3–11. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3648-05.2006>
- Zhao C, Deng W, Gage FH (2008) Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 132:645–660. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.033>
- Zhu L, Zhao T, Li H et al (2005) Neurogenesis in the adult rat brain after intermittent hypoxia. *Brain Res* 1055:1–6. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.04.075>