

Tesis Doctoral

Interacción entre circuitos excitatorios e inhibitorios en el reclutamiento de neuronas inmaduras en el hipocampo adulto

Pardi, María Belén

2015-03-26

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Pardi, María Belén. (2015-03-26). Interacción entre circuitos excitatorios e inhibitorios en el reclutamiento de neuronas inmaduras en el hipocampo adulto. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Pardi, María Belén. "Interacción entre circuitos excitatorios e inhibitorios en el reclutamiento de neuronas inmaduras en el hipocampo adulto". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015-03-26.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Interacción entre circuitos excitatorios e inhibitorios en el reclutamiento de neuronas inmaduras en el hipocampo adulto

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área
Ciencias Biológicas

Lic. María Belén Pardi

Directora de tesis: Dra. Antonia Marín Burgin

Consejero de estudios: Dra. Lidia Szczupak

Lugar de trabajo: Fundación Instituto Leloir - Instituto de Investigación en Biomedicina de Buenos Aires (IBioBA)- CONICET- MPSP

Buenos Aires, Argentina, 2015

Fecha de defensa: 26/03/2015

Interacción entre Circuitos Excitatorios e Inhibitorios en el Reclutamiento de Neuronas Inmaduras en el Hipocampo Adulto

La neurogénesis adulta en mamíferos produce continuamente células granulares (GC) que se integran a los circuitos del giro dentado del hipocampo. Si bien se ha demostrado la importancia de la neurogénesis adulta en procesos de aprendizaje y memoria espacial, la función de las GC nuevas es aún incierta. El objetivo de esta tesis es comprender cómo las GC generadas en el adulto contribuyen con la función del hipocampo, analizando qué capacidades de procesamiento le proveen al circuito. Las GC nacidas en el adulto maduran sus propiedades intrínsecas y sus conexiones sinápticas, alcanzando características indistinguibles de las de las GC nacidas durante el desarrollo. Por lo tanto, proponemos que es durante el proceso de maduración que las GC generadas en el adulto le proveen capacidades de procesamiento particulares al hipocampo, aportando a su función.

Para poner a prueba nuestra hipótesis, estudiamos cómo los *inputs* provenientes de la corteza entorrinal son procesados por GC nuevas inmaduras de cuatro semanas de edad (4wpiGC) y las GC maduras generadas en el desarrollo (matGC). Se utilizó la inyección hipocampal de retrovirus para expresar proteínas fluorescentes en las GC generadas en el adulto y, luego de cuatro semanas, se obtuvieron rodajas agudas del hipocampo de los ratones inyectados. Mediante imágenes de calcio y electrofisiología, analizamos tres aspectos de la capacidad de procesamiento de información:

En primer lugar, estudiamos el reclutamiento de las 4wpiGC y las matGC frente a la estimulación de la vía perforante medial (MPP), la principal aferencia al giro dentado. Observamos que las 4wpiGC se activan con estímulos más débiles que las matGC, constituyendo una población de neuronas con mayor excitabilidad. Estas diferencias están generadas por un mayor balance excitación/inhibición de las corrientes evocadas en las 4wpiGC, dado por una inhibición menor y más lenta en comparación con las matGC.

En segundo lugar, analizamos la habilidad de las GC de integrar o separar dos *inputs* de la MPP. Los resultados muestran que hay un mayor porcentaje de 4wpiGC que de matGC que responde frente a la estimulación de dos inputs independientes, lo cual sugiere que las 4wpiGC son más integradoras y las matGC, más selectivas. Esta característica de las 4wpiGC es transitoria, dado que cuando las GC nacidas en el adulto maduran se comportan como las matGC, nacidas durante el desarrollo.

Por último, estudiamos la capacidad de las GC de decodificar información temporal. Estimulando la MPP con trenes de pulsos a distintas frecuencias, observamos una mayor activación de las 4wpiGC a todas las frecuencias estudiadas, si bien tanto las 4wpiGC como las matGC se comportan como filtros pasa bajos. Los circuitos inhibitorios son los principales responsables de las diferencias observadas en la activación, tanto entre 4wpiGC y matGC, como entre las frecuencias.

Concluimos que la neurogénesis adulta le provee al hipocampo de poblaciones de GC inmaduras que presentan capacidades de procesamiento únicas. La inhibición surge como un mecanismo que genera heterogeneidad de respuestas en las poblaciones de GC del giro dentado.

Palabras clave: neurogénesis adulta, hipocampo, excitación/inhibición, imágenes de calcio, electrofisiología.

Interaction between Excitatory and Inhibitory Circuits in the Recruitment of Immature Adult Born Hippocampal Neurons

Adult neurogenesis in mammals continuously generates granule cells (GC) that mature and integrate into the hippocampal dentate gyrus circuitry. Although adult hippocampal neurogenesis has been implicated in cognitive processes related to spatial learning and memory, the specific role of new GC remains unclear. In this thesis, we aim to understand how adult-born GC contribute to the hippocampal function, addressing the question of what processing features they provide to the circuit. Adult-born GC mature along several weeks, changing their intrinsic properties and synaptic connectivity to the network, becoming indistinguishable from the GC generated during development. We, therefore, propose that it is when they are still immature that adult-born GC provide unique processing capacities, contributing to the hippocampal function.

To test our hypothesis, we studied how inputs arriving from the entorhinal cortex are processed by immature four week-old adult-born GC (4wpiGC) and mature GC generated in development (matGC). Adult-born GC were retrovirally labeled to express fluorescent proteins in adult mice, and acute hippocampal slices were prepared 4 weeks post retroviral injection. Three main aspects of processing function were analyzed with calcium imaging and electrophysiological recordings:

First, we studied the recruitment of 4wpiGC and matGC after stimulation of the medial perforant path (mPP), the main afferent pathway to the dentate gyrus. We found that 4wpi GC are activated with weaker inputs than matGC, representing a population of neurons with higher excitability. These activation differences are generated by an enhanced excitation/inhibition balance of evoked currents in 4wpiGC, given by a smaller and slower inhibition compared to matGC.

Second, we analyzed neurons' ability to separate or integrate independent mPP inputs. Results show there is a higher percentage of 4wpiGC which respond to two inputs than that of matGC, suggesting 4wpiGC are good integrators of information, whereas matGC are more specific in their responses. In addition, we showed that there is a temporal window for the differential processing of inputs by immature GC, since adult born GC, when already mature, behave as matGC, produced during development.

Last, we studied GC capacity to decode frequency information. Stimulation with trains of different frequencies showed that 4wpiGC present higher levels of activation than matGC at all studied frequencies, though both behave as low-pass filters. Both,

differences in activation between 4wpiGC and matGC, and between frequencies, are mainly generated by inhibitory circuits.

We conclude that adult neurogenesis provides the hippocampus with populations of continuously renewing immature GC which present unique processing capacities. Inhibition emerges as a mechanism which generates heterogeneity of responses among the GC populations of the dentate gyrus.

Key words: adult neurogenesis, hippocampus, excitation/inhibition, calcium imaging, electrophysiology

Gracias aroma
azul,
fogata
encelo.
(...)
Gracias a lo que nace,
a lo que muere,
a las uñas
las alas
las hormigas,
los reflejos
el viento
la rompiente,
el olvido
los granos
la locura.
Muchas gracias gusano.
Gracias huevo.
Gracias fango,
sonido.
Gracias piedra.
Muchas gracias por todo.
Muchas gracias. (...)

(*Gratitud*, Oliverio Gironde)

Antonia: Por tu inmensa generosidad y el tremendo empuje que le diste a mi carrera y a mi crecimiento, no alcanzan las palabras de gratitud; estaré eternamente agradecida.

Alejandro Schinder, mi co-director de tesis: Gracias por tus grandes enseñanzas y acompañamiento, por abrirme las puertas de tu laboratorio, donde aprendí y disfruté enormemente.

A mis compañeros, amigos, del laboratorio de Antonia y del laboratorio de Alejandro: gracias por su hermosa y alegre compañía, por estar siempre dispuestos a dar una mano y a discutir los experimentos, por sus enseñanzas. En especial, gracias a Lucas Mongiat por siempre ayudarme con el setup; gracias a Yang, a Emilio y a Silvio, por ayudarme con el análisis y por su aporte de ideas a mi trabajo; gracias a Damiana, por ponerse al hombro la preparación del retrovirus; gracias a Natalia, por darme tantas manos; gracias a Diego, a Marie, a Mora y a Noel por estar siempre dispuestos a ayudarme.

Gracias al apoyo y al amor, fundamentales:
Gurval,
Mis padres,
Mi hermana Guadalupe,
Mis amigas y compañeras musicales Lupi y Jose,
Mis amigas y compañeras del camino científico, Mer, Mica, Dai, Ceci y Caro.

Gracias a Gustavo Murer, Fernando Locatelli y Juan Goutman por evaluar esta tesis.

Gracias a CONICET, a la UBA, a la Fundación Instituto Leloir y al IBioBA-CONICET-MPSP.

Índice

Introducción	9
Introducción a la Neurogénesis Adulta.....	10
El Hipocampo	12
<i>Estructura</i>	12
<i>Función</i>	13
El Giro Dentado.....	15
<i>Estructura</i>	15
<i>Función</i>	17
La Neurogénesis Adulta en el Giro Dentado del Hipocampo	18
<i>Importancia funcional de la neurogénesis adulta hipocampal</i>	18
<i>Maduración de las células granulares nacidas durante la adultez</i>	20
Circuitos inhibitorios y regulación de la actividad neuronal temporal y espacialmente..	23
Hipótesis y Objetivos	26
Materiales y Métodos	27
Resultados	39
Parte 1: Participación de las neuronas inmaduras en la actividad del giro dentado evocada por la estimulación de la vía perforante medial.	40
Introducción: Parte 1.....	40
Resultados: Parte 1.1	41
<i>Activación poblacional de las células granulares maduras e inmaduras frente a un pulso de estimulación de la vía perforante medial e influencia de los circuitos inhibitorios.</i>	41
Resultados: Parte 1.2	44
<i>Mecanismo sináptico que genera las diferencias de activación entre las células granulares maduras e inmaduras</i>	44
Conclusiones: Parte 1	46
Discusión: Parte 1	46
Figuras Resultados Parte 1	50
Parte 2: Capacidad de integración de inputs independientes de la vía perforante medial.	59
Introducción: Parte 2.....	59
Resultados: Parte 2.1	60

<i>Activación de las células granulares inmaduras y maduras frente a la estimulación de dos inputs independientes de la vía perforante medial e influencia de los circuitos inhibitorios</i>	60
Resultados: Parte 2.2	62
<i>Variación de la integración de inputs con la maduración neuronal.....</i>	62
Conclusiones: Parte 2	63
Discusión: Parte 2	63
Figuras Resultados Parte 2	67
Parte 3: Participación de las células granulares inmaduras en el procesamiento de estímulos complejos provenientes de la vía perforante medial	72
Introducción: Parte 3.....	72
Resultados: Parte 3.1	73
<i>Activación de las células granulares inmaduras y maduras frente a trenes de estimulación de la vía perforante medial e influencia de la inhibición.</i>	73
Resultados: Parte 3.2	76
<i>Mecanismo sináptico que genera las diferencias en la activación evocada por trenes de estimulación</i>	76
Conclusiones: Parte 3	79
Discusión: Parte 3	80
Figuras Resultados Parte 3	84
Conclusiones finales	95
Abreviaturas	98
Bibliografía.....	99

Introducción

Introducción a la Neurogénesis Adulta

Hasta mediados del siglo XX se consideraba que todas las neuronas del sistema nervioso de los mamíferos nacían durante el desarrollo embrionario y postnatal temprano, estableciéndose las redes neuronales permanentes para el resto de la vida (Gross 2000). Sin embargo, en la década de los 60' Joseph Altman observó por marcación con timidina tritiada el nacimiento de células en el cerebro adulto de rata, que según su consideración corresponderían a neuronas (Altman & Das 1965). No fue sino hasta la década de los 80' que estos resultados cobraron importancia tras el descubrimiento de neuronas nacidas en el cerebro de aves adultas en regiones involucradas con el canto por el grupo de Fernando Nottebohm (Paton & Nottebohm 1984). Notablemente, las neuronas encontradas en aves demostraron estar funcionalmente activas durante el canto. A partir de ese entonces, numerosos trabajos evidenciaron la existencia del nacimiento de neuronas en el adulto, llamado también "neurogénesis adulta", en diversas especies de peces, aves y mamíferos, incluyendo al hombre (Cayre et al. 2002; Eriksson et al. 1998). Recién en el 2002 se demostró la funcionalidad de las neuronas nacidas en el cerebro adulto de mamíferos, a partir del empleo de la técnica de marcación retroviral de las neuronas nuevas (Fig. I.1) (van Praag et al. 2002). Esta técnica se basa en el hecho de que la expresión de los transgenes de los retrovirus requieren la integración viral dentro del genoma hospedante, que sólo ocurre durante el ciclo celular (Lewis & Emerman 1994). Al incluir transgenes codificantes para proteínas fluorescentes (tales como "Green Fluorescent Protein" - GFP) en las construcciones retrovirales, puede marcarse al día de su nacimiento una población de neuronas de modo permanente. Esto ha permitido su estudio a nivel funcional en los años posteriores (van Praag et al. 2002; Laplagne et al. 2006; Mongiat et al. 2009).

En los mamíferos, la neurogénesis adulta está espacialmente restringida en condiciones normales a dos regiones del cerebro que constituyen nichos con potencial neurogénico: la zona sub-ventricular (SVZ) de los ventrículos laterales, donde se generan nuevas neuronas que migran hacia el bulbo olfatorio y se convierten en interneuronas; la zona sub-granular (SGZ) del giro dentado del hipocampo que da lugar a nuevas células granulares (GC), neuronas principales de proyección del giro dentado (Gage 2000). Cabe resaltar que en humanos únicamente se han encontrado neuronas nacidas en el adulto en el hipocampo (Eriksson et al. 1998), aunque estudios recientes sugieren que las neuronas nacidas en la SVZ podrían migrar hacia el estriado en lugar de hacia el bulbo olfatorio (Ernst et al. 2014).

Resulta llamativo que la neurogénesis adulta ocurra únicamente en dos regiones del cerebro. De su descubrimiento surgen diversas preguntas: ¿Por qué hay nacimiento de neuronas nuevas en ciertas regiones del cerebro y no en otras? ¿La neurogénesis adulta cumple alguna función o es tan sólo un rezago de la evolución? ¿Qué modificaciones funcionales aporta la neurogénesis adulta a la función del hipocampo?

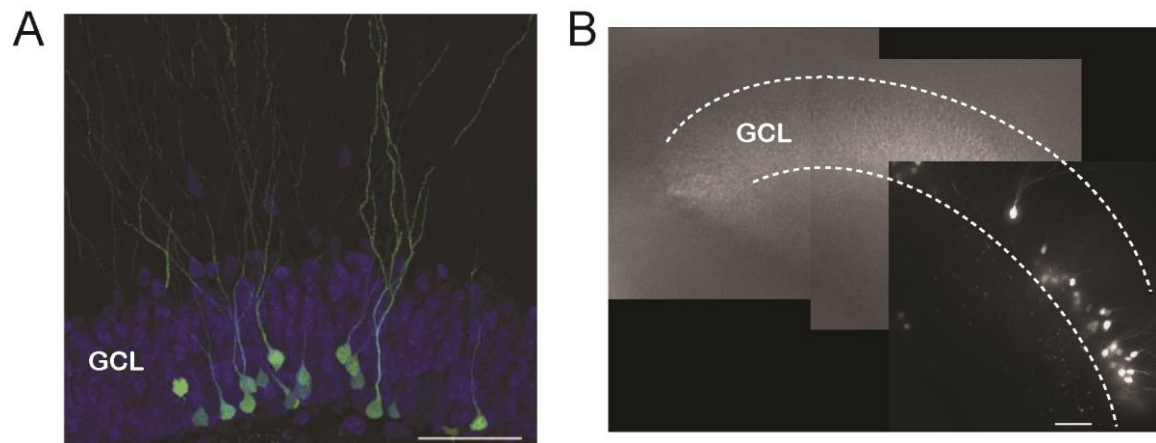


Figura 1.1. Marcado retroviral con fluorescencia de las células granulares nacidas en la adultez. A. Imagen de microscopía confocal de células nacidas en la adultez de siete semanas de edad, expresando Green Fluorescent Protein (GFP), en la capa de células granulares (GCL) en una sección de cerebro de ratón. Los somas de las células granulares están marcados con inmunohistoquímica contra NeuN. Adaptado de Laplagne y col., 2006 (Laplagne et al. 2006). **B.** Montaje de imágenes en microscopía de interferencia de contraste diferencial (DIC) y de fluorescencia verde de una rodaja aguda de hipocampo de un ratón adulto, con células granulares de seis semanas de edad marcadas con GFP. En línea punteada se señala la capa de GCL del lado superior del giro dentado. Barra de calibración: 50 μ m.

En la actualidad sabemos que aunque existan células madre en todo el cerebro, únicamente la SGZ y la SVZ representan un nicho óptimo donde éstas puedan dar lugar a progenitores neuronales y estos luego a neuronas (Alvarez-Buylla & Lim 2004). En el giro dentado del hipocampo, la neurogénesis ocurre a una tasa de 9000 neuronas por día en una rata adulta (Cameron & McKay 2001) y representa un 3-6% del total de las GC por mes. Las GC que nacen en el cerebro adulto se integran a la red neuronal preexistente (van Praag et al. 2002), madurando sus propiedades intrínsecas y su conectividad (Espósito et al. 2005), alcanzando características fisiológicas indistinguibles del resto de las GC (Laplagne et al. 2006), y manteniéndose en el circuito (Kempermann et al. 2003). La tasa de supervivencia de las GC sugiere que estas no reemplazan a las preexistentes sino que el espesor del giro dentado crece a lo largo de la vida (Kempermann et al. 2003; Leuner et al. 2004; Tashiro et al. 2007; Imayoshi et al. 2008). La tasa de nacimiento y de supervivencia de las GC es modificable por factores ambientales, tales como el ejercicio físico que la aumenta (van Praag et al. 1999), o la depresión que la disminuye (Duman 2004). Se ha demostrado que las GC generadas en el adulto se activan durante el

comportamiento y la memoria (Ramirez-Amaya et al. 2006; Kee et al. 2007; Tashiro et al. 2007; Trouche et al. 2009), y que su ablación impide ciertos tipos de aprendizaje y memoria espacial (Dupret et al. 2008; Farioli-Vecchioli et al. 2008; Garthe et al. 2009), lo que demuestra que la neurogénesis en la adultez cumple una función.

Qué función precisa cumplen las neuronas nuevas generadas en el giro dentado en el procesamiento de información del hipocampo es aún incierto. En esta tesis abordamos esta pregunta a nivel del microcircuito del giro dentado, estudiando el procesamiento de estímulos aferentes por la población de neuronas nuevas. Para una mayor comprensión del tema, antes de analizar la posible función de la neurogénesis adulta debemos introducir la función y la estructura de las regiones donde se integran las nuevas células granulares: el hipocampo y el giro dentado.

El Hipocampo

Estructura

Ubicado en lóbulo medio temporal, el hipocampo representa una región cerebral de procesamiento de alto orden jerárquico, puesto que recibe aferencias provenientes de diversas modalidades sensoriales (olfativa, somatosensorial, auditiva, visual, entre otros) a través de las capas II y III de la corteza entorrinal, región considerada de “procesamiento asociativo polisensorial” (Fig. I.2) (Lavenex & Amaral 2000). Además, a través del giro dentado, el hipocampo recibe aferencias del núcleo septal, del hipotálamo y del tallo neuronal (Johnston & Amaral 1998).

El hipocampo ha servido como modelo de estudio de la fisiología de los circuitos del sistema nervioso debido a que presenta una estructura histológica relativamente simple y organizada (Johnston & Amaral 1998). Por ejemplo, la potenciación a la largo plazo (LTP), mecanismo mediante el cual se refuerzan sinapsis, fue ampliamente estudiado y descrito por primera vez en el hipocampo (Lømo 2003). Formalmente, la región que nombramos hipocampo es parte de la “formación hipocampal” compuesta por el giro dentado (DG), CA3, CA2, CA1, el subiculum, el pre- y para-subiculum y la corteza entorrinal (EC). El hipocampo presenta conexiones en forma de *loop*, dado que su vía aferente y su vía eferente principales son capas dentro de la EC (Fig. I.2).

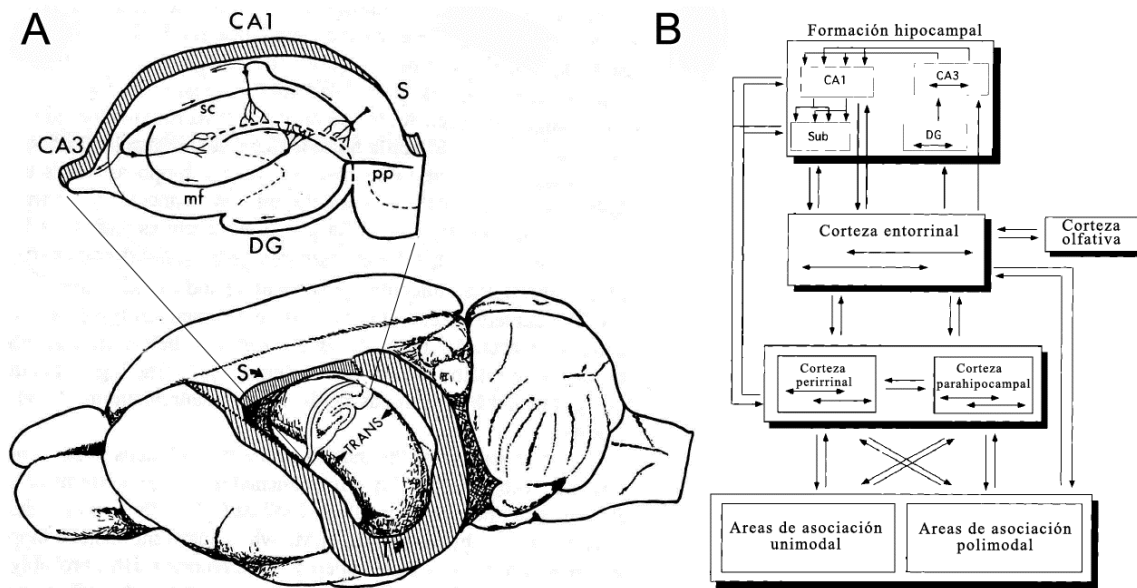


Figura 1.2. Estructura y jerarquía del hipocampo. **A.** Dibujo de un cerebro de rata. Se observa el hipocampo izquierdo debajo de la corteza y un corte perpendicular al eje longitudinal, característico de los experimentos de electrofisiología en rodajas agudas. En la rodaja, se muestran la vía perforante (PP) proveniente de la corteza entorrinal, contactando al giro dentado (DG), a CA3 y a CA1. Los axones de las células granulares del DG constituyen las fibras mossy (mf) que contactan a CA3. Los axones de las células piramidales de CA3 constituyen las colaterales Shaffer (sc) y contactan a CA1. Las células piramidales de CA1 proyectan hacia la corteza entorrinal. Adaptado de Johnston & Amaral, 1998 (Johnston & Amaral 1998). **B.** Esquema de las conexiones del hipocampo y su posicionamiento en la jerarquía de procesamiento de información del cerebro. El hipocampo es una región de procesamiento de información multimodal de alto orden jerárquico. Adaptado de Lavenex & Amaral, 2000 (Lavenex & Amaral 2000).

La EC proyecta desde la capa II hacia el DG y CA3, y desde la capa III hacia CA1 y el subiculum. Estas proyecciones se denominan vía perforante (PP). Dentro del hipocampo, las proyecciones excitatorias mantienen un patrón de tipo “feed-forward”, es decir, hacia adelante. Las GC del DG reciben las aferencias de la EC y mandan sus axones, conocidos como fibras “mossy” (MF), hacia CA3, dónde contactan las dendritas de las células piramidales (Fig. 1.2A). Las células piramidales de CA3 proyectan hacia CA1 vía las colaterales de “Schaffer” (SC), pero también presentan numerosos contactos recurrentes con otras células piramidales en CA3. Las células piramidales de CA1 proyectan hacia las capas V y VI de la EC directamente y a través del subiculum. Las células de las capas inferiores de la EC proyectan hacia las capas superiores y hacia las áreas corticales asociativas, cerrándose así el *loop*.

Función

Durante muchos años el estudio de la función del hipocampo ha sido abordado no solo desde la neurociencia sino también desde la neuropsiquiatría a través de estudios de

pacientes con lesiones. El caso más conocido es el del paciente H.M. (Henry Molaison, 1926-2008) quien luego de ser sometido a una cirugía de remoción del hipocampo bilateral (cirugía que además le costó la remoción de regiones adyacentes, incluidas la amígdala y la corteza entorrinal) presentó signos de amnesia anterógrada, es decir que había perdido la capacidad de formar nuevas memorias episódicas, pero conservaba su memoria de eventos pasados y su memoria de trabajo (Scoville & Milner 1957). Casos como este sentaron las bases del conocimiento de la función del hipocampo en la adquisición de la memoria episódica y su evocación a corto plazo, y sugieren que, luego de un tiempo, la memoria es “transferida” a otras regiones donde se almacena a largo plazo. La función del hipocampo en la memoria ha sido ampliamente estudiada en roedores y primates desde entonces, postulándose que participa en numerosos procesos mnésicos, tales como la memoria espacial, ciertos tipos de memoria asociativa y la memoria relacional (Squire 2004; Schultheiss, Nathan W.; Hinman, James R.; Hasselmo 2015).

Además de su función en la formación de memoria, el hipocampo ha sido vinculado a la función de representación del espacio. En la década del 70’ John O’Keefe descubrió, mediante registros *in vivo* en ratas en libre movimiento, neuronas hipocampales que se activan en locaciones específicas del espacio (O’Keefe & Dostrovsky 1971; O’Keefe 1976) y propuso que poblaciones de estas neuronas, a las que llamaron “place cells”, forman un mapa cognitivo del espacio mediante el cual la navegación puede ser guiada. Las *place cells* fueron halladas inicialmente en CA1 pero posteriores trabajos demostraron su existencia también en CA3 y el DG (McNaughton et al. 1983; Jung & McNaughton 1993). Células que se activan en locaciones específicas del espacio también fueron halladas treinta años más tarde en la EC por May-Britt Moser y Edvard I. Moser (Fyhn et al. 2004; Hafting et al. 2005). Estas no se activan en una única región del espacio, sino que presentan múltiples sitios de activación organizados en forma de grilla hexagonal, motivo por el cual recibieron el nombre de “grid cells”. Se postula que las *place cells* y las *grid cells* conforman en conjunto un código de orientación espacial que permite la navegación en el espacio. Si bien la formación de memoria y la navegación parecen fenómenos muy distintos, se ha propuesto que los mecanismos que utiliza la memoria han evolucionado a partir de los mecanismos de navegación en el mundo físico y se hipotetiza que los algoritmos neuronales que subyacen a la navegación en el espacio real y mental son fundamentalmente los mismos (Buzsáki & Moser 2013).

En los últimos años se ha avanzado además en la comprensión de las funciones específicas de las distintas subregiones del hipocampo, dentro de la representación espacial y la formación de la memoria. Un ejemplo, es la representación de experiencias

que ocurren en distintos contextos espaciales en patrones de actividad neuronal que representen dichos contextos con una interferencia mínima, proceso conocido como "*pattern separation*". Otro ejemplo, es la posibilidad de establecer asociaciones en los patrones de actividad y recordar memorias almacenadas a partir de la utilización de señales parciales que reactiven dichos patrones, proceso conocido como "*pattern completion*". Se ha sugerido que el giro dentado del hipocampo, por su escasa y dispersa actividad, realiza *pattern separation* y la región de CA3, mediante sus conexiones recurrentes, realiza *pattern completion* (Rolls & Kesner 2006; Gilbert et al. 2001; Rolls 2010; Treves et al. 2008; Marr 1971; Olton & Papas 1979).

Así, para comprender los mecanismos por los cuales el hipocampo lleva a cabo sus funciones es fundamental el estudio de la funcionalidad de sus distintas sub-regiones, teniendo en cuenta los componentes y la conectividad de sus circuitos, la actividad poblacional, la dinámica temporal y su plasticidad. Resulta de especial interés en este contexto, el hecho de que el DG, que constituye la principal vía de entrada al hipocampo, presente una forma de plasticidad particular mediante la integración constante de neuronas nacidas durante la adultez.

El Giro Dentado

Estructura

El giro dentado (DG) del hipocampo presenta una estructura trilaminar en forma de "V" o "C" según su ubicación en el eje dorso-ventral. La lámina del medio está constituida principalmente por un arreglo compacto de somas de las células principales, la células granulares (GC), por ello recibe el nombre de capa de células granulares (GCL). Las GC extienden sus árboles dendríticos hacia la lámina que se encuentra de lado exterior de la "V", la capa molecular (ML), y sus axones hacia el interior de la "V", al Hilus (Fig. 1.3).

La ML está formada principalmente por neuropilo y se divide en tres sub-capas: la capa molecular externa (OML), donde llegan axones provenientes de la EC lateral (LEC) que constituyen la vía perforante lateral (LPP); la capa molecular medial (MML), donde llegan axones de la EC medial (MEC), que constituyen la vía perforante medial (mPP), y la capa molecular interna (iML), donde llegan axones de la vía comisural y asociacional, que serían aferencias propias del hipocampo de tipo feed-back y aferencias provenientes del lado contralateral del hipocampo (Johnston & Amaral 1998). Los

axones de las vías perforantes hacen sinapsis sobre las dendritas de las GC, y también sobre dendritas de interneuronas inhibitorias, que luego inhiben a las GC, ejerciendo inhibición de tipo “feed-forward” (Fig. I.3A).

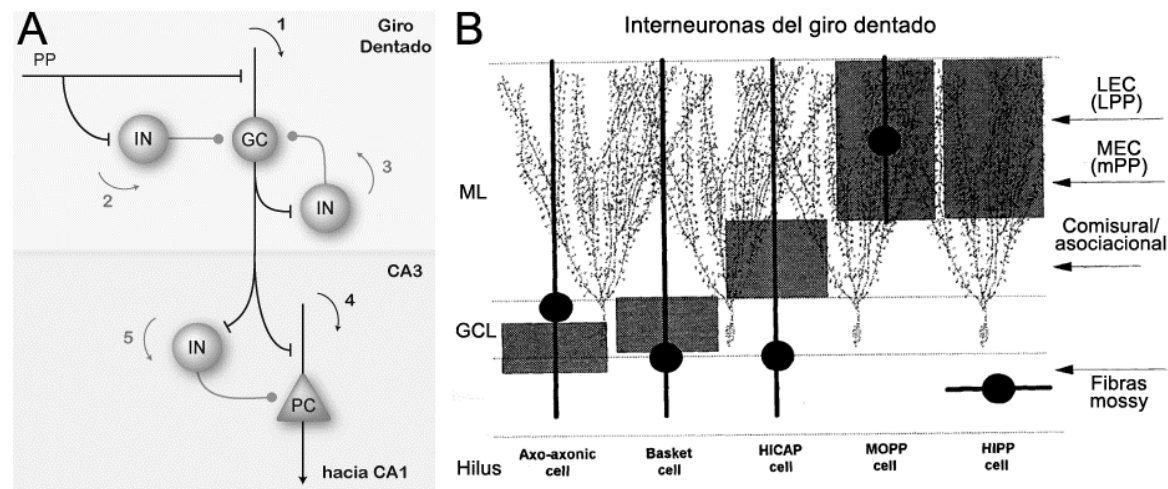


Figura I.3. Microcircuitos del giro dentado. **A.** Esquema de las conexiones principales aferentes y eferentes de las células granulares (GC) del giro dentado. IN: interneuronas inhibitorias. PC: células piramidales. 1: La vía perforante (PP) hace sinapsis excitatorias sobre las dendritas de las GC. 2: La PP estimula IN que luego hacen sinapsis inhibitorias sobre las GC. Esta inhibición se denomina feed-forward. 3: Las GC estimulan IN que luego hacen sinapsis inhibitorias sobre las GC. Esta inhibición se denomina feed-back. 4: Las GC hacen sinapsis excitatorias sobre las PC de CA3. 5: Las GC estimulan IN que luego hacen sinapsis inhibitorias sobre las PC de CA3. **B.** Esquema de la diversidad de interneuronas inhibitorias del giro dentado. Se indican las tres capas del giro dentado: capa molecular (ML), capa de células granulares (GCL) y el Hilus. Se muestran cinco tipos de interneuronas (Axo-axonic cell, Basket cell, HICAP cell, MOPP cell y HIPP cell) indicando la ubicación de su soma (círculo negro), la ubicación de sus dendritas (raya negra) y la región de inervación de su axón (recuadro gris). A la derecha se indican las aferencias que contactan a las interneuronas, distribuidas según su ubicación dentro del giro dentado. LEC: corteza entorrinal lateral. LPP: vía perforante lateral. MEC: corteza entorrinal medial. mPP: vía perforante medial. Se muestran las dendritas con espinas de las células granulares. Adaptado de Freund & Buzsáki, 1996 (Freund & Buzsáki 1996).

Los axones de las GC (fibras *mossy*) que se extienden hacia CA3 a través del Hilus se ramifican contactando interneuronas inhibitorias e interneuronas excitatorias (*mossy cells*), formando *loops* de inhibición y excitación de tipo “feed-back” (Fig. I.3A) (Ribak & Seress 1983; Acsády et al. 1998). En CA3 las fibras mossy contactan a las células piramidales y a interneuronas inhibitorias locales de CA3.

Los somas de las interneuronas inhibitorias se encuentran distribuidos en las tres capas del DG (Fig. I.3B) (Freund & Buzsáki 1996). Algunas extienden sus axones hacia la ML, inhibiendo a las GC sobre su árbol dendrítico, afectando la integración dendrítica (células HICAP, HIPP y MOPP). Otras inervan los somas de las GC ejerciendo inhibición perisomática, fuertemente silenciadora. Dentro de estas se destacan las “Basket cells”, que reciben su nombre debido que sus axones rodean a los somas de las células

principales formando una red con apariencia de canasta. Otras inervan el segmento inicial de los axones de las GC afectando su eferencia. Las interneuronas son diversas tanto a nivel fisiológico como a nivel de los marcadores moleculares que expresan.

Entre la GCL y el Hilus se encuentra la SGZ, dónde se ubican las células madre que se diferencian a los progenitores neuronales que dan origen a las GC nacidas en la adultez. Durante su maduración, estas migran hacia la GCL, y extienden sus procesos neuríticos, integrándose en el circuito (Schinder & Bischofberger 2008). Un 3-6% de las GC de la GCL corresponden a GC nacidas en la adultez (Dayer et al. 2003), y algunas de estas en proceso de maduración, representan una población de neuronas inmaduras.

Función

La GCL de una rata contiene 1,2 millones de GC, un alto número en comparación al número de células de su región aferente, la capa II de la EC, que contiene 250.000 células (West et al. 1991; Rapp & Gallagher 1996). Esto muestra en la entrada al hipocampo a través de DG hay divergencia que podría dar lugar a una actividad de las GC dispersa o "sparse". Experimentos de marcación de la actividad a partir de la expresión de genes tempranos (iEG, del inglés "immediate early genes") como c-Fos o Arc, indicarían que efectivamente la activación de GC en el giro dentado es dispersa, observándose una marcación de tan sólo el 2 % del total de las neuronas (Chawla et al. 2005; Tashiro et al. 2007; Alme et al. 2010). De hecho, experimentos con registros de la actividad hipocampal *in vivo* revelan que las GC se activan en ciertas situaciones específicas y que su tasa de disparo de potenciales de acción es baja, aunque puede presentar ráfagas breves de potenciales de acción a altas frecuencias (Jung & McNaughton 1993; Leutgeb et al. 2007), de manera contraria a lo que sucede en la EC (Barnes et al. 1990). Es decir que la actividad de las GC es dispersa en cuanto a número de células activas y en cuanto los niveles de activación. Una posible explicación de la baja actividad de las GC puede deberse a la fuerte inhibición *feed-forward* y *feed-back* que se recluta en el DG frente la estimulación aferente.

Como hemos mencionado anteriormente, se ha propuesto que la función de separación de patrones o "*pattern separation*" reside en el DG del hipocampo. Experimentos comportamentales en los que se lesionan específicamente neuronas del DG apoyan esta hipótesis. Por ejemplo, animales inyectados intra-hipocampalmente con colchicina, que mata específicamente a las GC del DG, fueron incapaces de distinguir entre posiciones cercanas de pellets de comida (Gilbert et al. 2001), es decir que su capacidad de discriminación espacial se vio impedida. Modelos computacionales proponen que la

actividad dispersa podría generar separación de patrones, en cuanto que patrones similares podrían activar poblaciones de GC dispersas no superpuestas y así separar la información aferente, y su representación en CA3 (O'Reilly & McClelland 1994). Sin embargo, experimentos donde se registra el cambio de actividad neuronal con la modificación del ambiente, revelan que la misma población de GC neuronas se activa con la exploración de dos ambientes similares (Leutgeb et al. 2007; Alme et al. 2010), poniendo en cuestionamiento el modelo de separación de patrones basado en la representación de estímulos por distintos engramas de GC dispersas.

Resulta llamativo que el DG del hipocampo presente una población de neuronas activas muy pequeña que se active repetidamente en distintos ambientes. ¿Qué particularidades presentan las neuronas que se activan y en qué se distinguen de las que no lo hacen? ¿Por qué se activan las mismas neuronas ante situaciones diferentes? Debido a la existencia de la neurogénesis adulta, la población de GC del giro dentado no es homogénea. El nacimiento continuo de neuronas nuevas hace que un pequeño porcentaje de GC corresponda a neuronas nuevas en proceso de maduración, que ya se encuentran integradas al circuito pero presentan características fisiológicas diferentes al resto de las GC (Mongiat et al. 2009; Espósito et al. 2005; Ge et al. 2007) ¿Podría la población de neuronas activas corresponder a neuronas inmaduras nacidas en el adulto?

En esta tesis estudiamos la capacidad de las GC nacidas el adulto inmaduras de participar de la actividad global del giro dentado frente a distintos tipos de estimulación. Sus características fisiológicas únicas y la secuencia de maduración de sus contactos sinápticos aferentes nos llevan a proponer que las GC inmaduras se activan de un modo diferente que el resto de las GC del circuito. A continuación, detallaremos la función de la neurogénesis adulta y la secuencia de maduración de las GC nacidas en el adulto, enfatizando la evidencia que nos conduce a proponer una función específica de las GC inmaduras.

La Neurogénesis Adulta en el Giro Dentado del Hipocampo

Importancia funcional de la neurogénesis adulta hipocampal

Aun sin conocerse los mecanismos responsables, numerosos trabajos han demostrado la importancia de la neurogénesis adulta del giro dentado. Estos se focalizan en tres ejes: la modulación de la tasa de neurogénesis o sobrevida por factores ambientales y/o

fisiológicos; el impedimento del aprendizaje o la memoria por la ablación específica de las GC nuevas; la activación de las GC nuevas en situaciones de aprendizaje/memoria.

Al considerarse a la neurogénesis adulta como un fenómeno que otorga plasticidad al circuito del giro dentado, resulta relevante el hecho de que su tasa de nacimiento y de sobrevivencia sea modificable por factores que pudieran requerir su incremento o su decrecimiento. Por ejemplo, la actividad física voluntaria es capaz de aumentar la proliferación de GC generando un mayor número de neuronas nuevas (van Praag et al. 1999; Brown et al. 2003; Kronenberg et al. 2003), al igual que la exposición a un ambiente enriquecido, que además aumenta la sobrevivencia de estas neuronas (Kempermann et al. 1997; Kempermann et al. 1998; van Praag et al. 2000; Brown et al. 2003; Tashiro et al. 2007; Kronenberg et al. 2003). De manera contraria, la tasa de generación de neuronas nuevas disminuye con el envejecimiento (Kempermann et al. 1998; Morgenstern et al. 2008), y en situaciones de estrés (Mirescu & Gould 2006) y de depresión (Duman 2004). Por otra parte, dependiendo del tipo de paradigma utilizado y de la edad de las células nuevas, el aprendizaje dependiente del hipocampo puede específicamente aumentar o disminuir la sobrevivencia neuronal (Gould et al. 1999; Döbrössy et al. 2003; Leuner et al. 2004; Olariu et al. 2005; Dupret et al. 2007). También se ha observado un aumento del número de neuronas nuevas en ciertas condiciones patológicas como en presencia de convulsiones o isquemia (Parent & Lowenstein 2002; Kokaia & Lindvall 2003). La vinculación del número de neuronas con el estado fisiológico del animal sugiere que las GC nuevas cumplen una función importante.

Por otro lado, numerosos trabajos han estudiado la función de la neurogénesis adulta estudiando alteraciones en las capacidades mnésicas producidas por la ablación de las neuronas nuevas. En los comienzos, la ablación se realizaba mediante la irradiación con rayos x o el uso de agentes anticancerígenos, pero más recientemente se han empleado estrategias genéticas que permiten una mayor precisión temporal y especificidad. En términos generales, se ha observado que la reducción o el bloqueo de la neurogénesis adulta afecta los aprendizajes dependientes del hipocampo, como el aprendizaje espacial (Dupret et al. 2008; Farioli-Vecchioli et al. 2008; Garthe et al. 2009). Más específicamente trabajos recientes sugieren que la neurogénesis adulta estaría involucrada en la función de separación de patrones o "*pattern separation*", dado que su manipulación afecta el aprendizaje de tareas de discriminación espacial y de contextos similares (Clelland et al. 2009; Creer et al. 2010; Sahay, Scobie, et al. 2011; Nakashiba et al. 2012). Otros trabajos muestran que la neurogénesis adulta estaría relacionada con desórdenes afectivos, como la ansiedad (Samuels & Hen 2011).

Por último, algunos trabajos han estudiado la participación de las GC nacidas en el adulto mediante la co-marcación con análogos de timidina, como el BrdU, y la expresión de iEG. Estos trabajos muestran que las neuronas nacidas en el adulto se activan en distintas fases del aprendizaje y por lo tanto sugieren su participación en los procesos de aprendizaje y memoria. Por ejemplo, la activación de las neuronas nuevas se ha demostrado frente al paradigma de laberinto acuático de Morris, o “Morris Water Maze” (Kee et al. 2007; Trouche et al. 2009), frente a la exploración espacial de un arena (Ramirez-Amaya et al. 2006) y frente a la exposición de un ambiente enriquecido (Tashiro et al. 2007). Estos trabajos además, indican que la expresión de iEG en las GC depende de su estadio de maduración.

Los trabajos de marcación con iEG se complementan con los experimentos electrofisiológicos en rodajas de cerebro que muestran que las GC nacidas en el adulto son capaces de ser activadas por estímulos aferentes (van Praag et al. 2002; Schmidt-Hieber et al. 2004; Mongiat et al. 2009), así como comunicarse a través de sus eferencias (Toni et al. 2008; Gu et al. 2012). De este modo, es amplio el consenso de que las GC generadas en el adulto están funcionalmente integradas al circuito neuronal.

Los experimentos mencionados previamente evidencian en su conjunto que la neurogénesis adulta cumple una función. Sin embargo, aún se desconocen los mecanismos de procesamiento circuitales mediante los cuales las neuronas nuevas llevan a cabo su función. ¿Es tan sólo la adición de unidades de procesamiento al giro dentado lo que es importante? ¿O las neuronas nuevas procesan la información de un modo diferente que el resto de las neuronas, proveyéndole capacidades particulares al circuito del DG?

Maduración de las células granulares nacidas durante la adultez

La neurogénesis adulta del DG comienza en la SGZ con la diferenciación de células madre neuronales a progenitores neuronales. Estos sufren varias divisiones, amplificándose, y luego se diferencian a neuronas. Inicialmente se producen 9000 GC por día en una rata adulta, pero entre un 50% y 75% muere entre los 6 y 28 días de maduración (Cameron & McKay 2001; Dayer et al. 2003; Kempermann et al. 2003). Las GC que sobreviven, continúan su maduración y se integran al circuito de modo permanente (Dayer et al. 2003; Kempermann et al. 2003; Espósito et al. 2005; Zhao et al. 2006).

La marcación con retrovirus ha permitido la visualización detallada de la morfología de las neuronas nuevas, así como la caracterización de su fisiología y conectividad a distintos tiempos, a lo largo de su maduración (van Praag et al. 2002; Ming & Song 2011) (Fig. 1.4A). El fenotipo neuronal se determina dentro de los primeros días tras la división celular. Las incipientes neuronas comienzan a extender sus dendritas hacia la ML y su axón hacia CA3 (Zhao et al. 2006), muestran potenciales de acción pequeños (Espósito et al. 2005), y presentan una alta resistencia de membrana, debido a la pérdida de canales de potasio característicos de las células gliales (Fukuda et al. 2003).

Entre la primera y la segunda semana de maduración, las neuronas nuevas migran hacia el tercio más interno de la capa granular (Espósito et al. 2005; Mathews et al. 2010). Su morfología muestra un árbol dendrítico inmaduro y sin espinas que se extiende hasta la capa molecular (Zhao et al. 2006). Reciben sus primeras aferencias sinápticas dendríticas mediadas por receptores GABA_A (Espósito et al. 2005). En esta instancia el GABA es excitatorio porque el potencial de reversión del Cl⁻ está despolarizado (-35 mV) debido a la expresión del co-transportador de Na⁺, K⁺ y Cl⁻, NKCC1 (Ge et al. 2006; Tozuka et al. 2005).

Entre la segunda y la tercera semana de edad, las neuronas granulares nuevas adquieren la capacidad de disparar potenciales de acción repetitivos y exhiben árboles dendríticos con espinas dendríticas que alcanzan la LML (Espósito et al. 2005; Zhao et al. 2006). Consistentemente, el registro de corrientes excitatorias post-sinápticas espontáneas evidencia el surgimiento de aferentes glutamatérgicos (Espósito et al., 2005). A la tercer semana se reduce la expresión de NKCC1 por lo que el GABA se convierte en inhibitorio (Ge et al. 2006); por ende se registran corrientes inhibitorias post-sinápticas espontáneas lentas, correspondientes a las sinapsis GABAérgicas dendríticas. Entre las dos y las tres semanas de madurez, además, los axones de las GC nuevas ya se encuentran extendidos sobre CA3 (Sun et al. 2013; Toni et al. 2008).

A las cuatro semanas las GC nacidas en el adulto poseen ya la morfología característica de las neuronas granulares maduras, aunque aún continúan ocurriendo modificaciones en sus espinas dendríticas (Zhao et al. 2006). En esta instancia ya se registran las primeras evidencias de contactos GABAérgicos inhibitorios perisomáticos (Espósito et al. 2005). Por lo tanto, las GC de cuatro semanas ya se encuentran contactadas con sus aferencias glutamatérgicas y GABAérgicas, aunque los contactos no estarían maduros en comparación con los de las GC nacidas en el desarrollo (Mongiat et al. 2009; Espósito et al. 2005). Por otra parte, trabajos recientes sugieren que los contactos eferentes de las GC de cuatro semanas en CA3 ya son semejantes a los de las neuronas maduras, aunque

los contactos sobre las neuronas inhibitorias del DG se establecerían con posterioridad (Temprana et al. 2015; Gu et al. 2012).

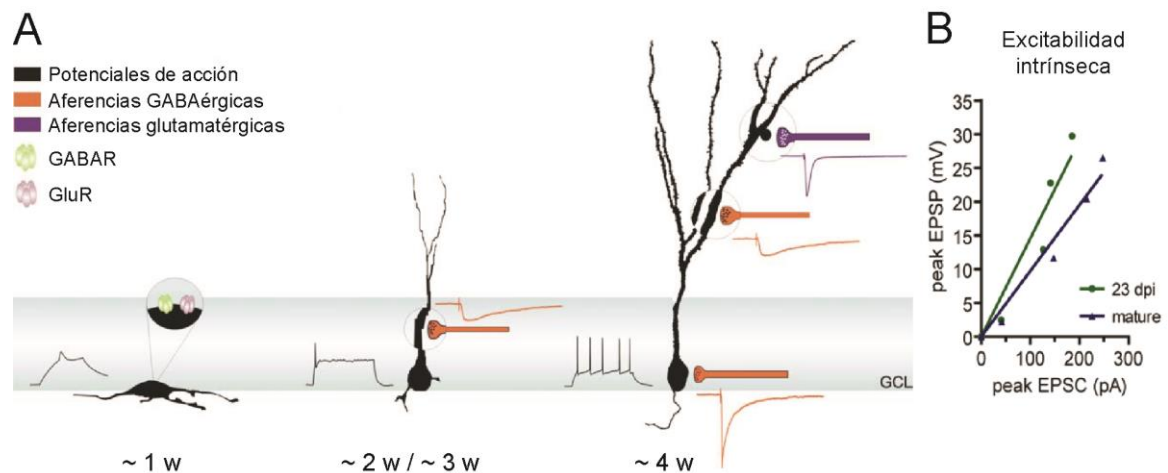


Figura I.4. Características de las células granulares inmaduras. A. Primeros estadios de la maduración de la morfología, la capacidad de evocar potenciales de acción y las sinapsis aferentes de las células granulares nacidas en la adultez. Se muestran las características de neuronas inmaduras de una, dos/tres y cuatro semanas de edad aproximadamente (1 w, 2 w/3 w y 4 w, respectivamente) en la capa de células granulares (GCL). En los primeros días las células ya expresan receptores de GABA (GABAR) y de glutamato (GluR). La inhibición dendrítica antecede a la excitación. La excitación antecede a la inhibición perisomática. Una neurona de 4 w ya recibe contactos de excitación y de inhibición dendrítica y perisomática, y ya produce potenciales de acción. Adaptado de Espósito y col., 2005 (Espósito et al. 2005). **B.** Las células granulares de entre tres y cuatro semanas de edad (verde) tienen una mayor conversión de la corriente postsináptica excitatoria (EPSC) a una diferencia de potencial postsináptico excitatorio (EPSP) que las células granulares maduras nacidas durante el desarrollo (azul). Adaptado de Mongiat y col., 2009 (Mongiat et al. 2009).

Las GC de cuatro semanas de edad, aún tienen una baja expresión de canales de K^+ y por ello presentan una resistencia de membrana (R_i) del doble que las GC maduras (Mongiat et al. 2009). Esto hace que las GC de cuatro semanas sean intrínsecamente más excitables que las GC maduras, dado que una misma corriente sináptica genera un mayor cambio de potencial de membrana (Fig. I.4B). Por otra parte, estas células tienen menores umbrales de inducción de LTP, y alcanzan mayores niveles de potenciación de las sinapsis (Schmidt-Hieber et al. 2004; Ge et al. 2007). De hecho, a diferencia de la mayoría de las neuronas del cerebro, el LTP en estas neuronas puede inducirse en condiciones de inhibición intacta. Estos datos sugieren que las GC de cuatro semanas podrían tener una función importante en los procesos de aprendizaje y memoria.

La madurez de las GC nacidas en el adulto se alcanza a las ocho semanas. En esta instancia las GC nacidas en el adulto presentan características indistinguibles de las GC nacidas durante el desarrollo, en cuanto a su morfología (Zhao et al. 2006) y a sus

características fisiológicas, incluyendo su conectividad con el circuito (Laplagne et al. 2006; Laplagne et al. 2007; Mongiat et al. 2009).

El hecho de que las GC maduras nacidas en el adulto no difieran de las GC nacidas durante el desarrollo, nos lleva a plantear la hipótesis de que la función de la neurogénesis adulta radica en las capacidades de procesamiento únicas de las GC inmaduras de cuatro semanas de edad. Estas capacidades únicas estarían dadas por la convergencia de múltiples factores que determinarían un reclutamiento diferencial frente a estímulos aferentes. En particular la secuencia de maduración de los contactos aferentes de las neuronas nacidas en el adulto nos lleva a proponer que existe una ventana temporal en la maduración de las GC durante la cual el balance entre la excitación y la inhibición que reciben es diferente al de las GC maduras. Un balance distinto entre la excitación y la inhibición puede tener numerosas consecuencias a nivel de procesamiento de información de los circuitos, tal como detallaremos a continuación.

Circuitos inhibitorios y regulación de la actividad neuronal temporal y espacialmente

Numerosos estudios que analizan la función de los circuitos inhibitorios en relación a los excitatorios demuestran que un balance diferencial entre la excitación y la inhibición puede afectar la función de los circuitos de diversas maneras. En muchas regiones del cerebro, incluido el hipocampo, existen distintos tipos de interneuronas inhibitorias (IN) que se activan formando circuitos de inhibición *feed-forward* y *feed-back*.

En los circuitos con inhibición *feed-forward* (IFF), la activación de una vía aferente produce, además de la excitación directa de las neuronas postsinápticas, la excitación en paralelo de IN que contactan a las mismas neuronas postsinápticas (Fig. I.5 y Fig. I.3A). Esto produce, como consecuencia, una excitación mono-sináptica seguida de una inhibición di-sináptica en las neuronas blanco. Esta inhibición IFF, se observa en numerosos circuitos, no solo del hipocampo sino también de la corteza o de la vía tálamo cortical (Isaacson & Scanziani 2011). En el hipocampo, y probablemente también en otras regiones del cerebro, la IFF controla tanto la ventana temporal de activación de las neuronas postsinápticas (Pouille & Scanziani 2001), como el grado de excitabilidad de la población de las neuronas en respuesta a una estimulación aferente (Pouille et al. 2009). La IFF es muy rápida, tal que llega antes del pico de la excitación y por lo tanto

tiene la posibilidad de influenciar la probabilidad de disparo de las neuronas blanco (Fig. I.5B). Como la IFF crece con la intensidad de los estímulos, puede ajustar dinámicamente la excitabilidad de la población de las neuronas blanco de manera de poder representar estímulos débiles y no saturar ante estímulos fuertes. Este ajuste de la excitabilidad en función de la fuerza del estímulo permite aumentar el rango dinámico de la representación de estímulos de la población neuronal (Pouille et al. 2009).

En los circuitos con inhibición de tipo *feed-back* (IFB), la activación de una población de neuronas excitatorias produce la activación de IN que inhiben su propia actividad (Fig. I.3A). La IFB está por un lado relacionada a la terminación de la respuesta evitando estados de reverberación en el circuito (Kullmann 2011; Roux & Buzsáki 2014), pero por otro lado, la oscilación de distintas IN que ejercen IFB puede generar patrones rítmicos en la población de neuronas excitatorias (Sohal et al. 2009; Cardin et al. 2009). En el giro dentado estas oscilaciones se dan en el rango de las frecuencias theta y gama principalmente, al igual que en su región aferente, la capa II de la EC (Chapak et al. 1995; Csicsvari et al. 1999; Bragin et al. 1995; Chrobak & Buzsáki 1998). En muchos casos la activación de las neuronas está acoplada a estas frecuencias, lo cual revela la importancia de las oscilaciones del potencial de campo, y la necesidad de estudiar la variación temporal de los circuitos excitatorios e inhibitorios.

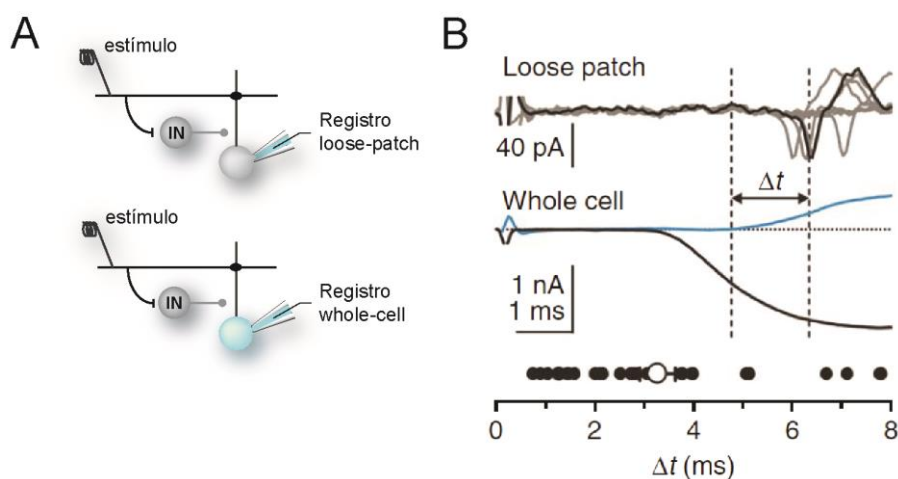


Figura I.5. Relación temporal entre las corrientes postsinápticas y la activación. **A.** Esquema de los registros en B. La estimulación de la vía aferente activa a las células principales y a interneuronas inhibitorias locales. Los potenciales de acción se registran en configuración loose-patch. Las corrientes postsinápticas se registran en la misma célula en whole-cell. La estimulación de la vía aferente evoca en la célula principal, una corriente excitatoria directa y una corriente inhibitoria indirecta. **B.** Tomado de Poullie y col., 2009 (Pouille et al. 2009). Relación temporal entre la corriente postsináptica excitatoria (negro) e inhibitoria (azul) registradas en whole-cell, y los potenciales de acción registrados en loose-patch, evocados en una célula principal por el estímulo de la vía aferente. La inhibición crece antes de la ocurrencia del potencial de acción y por lo tanto influye la determinación de que este se produzca o no.

Los estímulos fisiológicos activan ambos circuitos inhibitorios, que están constituidos por diversas poblaciones de IN, varias de las cuales se pueden activar tanto de forma feed-forward como feed-back (Kullmann 2011; Sambandan et al. 2010; Roux & Buzsáki 2014). Es de la interacción entre las neuronas excitatorias e inhibitorias, y de su dinámica de reclutamiento, de donde surge finalmente la respuesta poblacional.

Además del reclutamiento de interneuronas inhibitorias de forma *feed-forward* o *feed-back*, distintos tipos de interneuronas inervan distintas regiones de las neuronas excitatorias, regulando espacialmente la influencia de entradas sinápticas. Por ejemplo, la inhibición dendrítica puede generar el apagado de conexiones aferentes excitatorias específicas, mientras que la inhibición perisomática ignora la especificidad de las aferencias dendríticas puesto que actúa río debajo de los mismos, pero resulta totalmente determinante a la hora de “decidir” si una neurona va a activarse o no (Paulsen & Moser 1998; Roux & Buzsáki 2014). Se ha propuesto que la inhibición perisomática disminuye los máximos niveles de activación posibles, en cambio la inhibición dendrítica aumenta la cantidad de excitación necesaria para alcanzar los mismos niveles de activación que ocurren en su ausencia (Pouille et al. 2013). Además, la inhibición dendrítica y la perisomática podrían actuar de forma antagónica, por ejemplo activándose la dendrítica e inactivándose la perisomática, actuando como un filtro acoplado a un amplificador de señales (Paulsen & Moser 1998).

Por lo tanto, para estudiar bajo qué condiciones se activan las neuronas que se generan en el hipocampo adulto, es necesario comprender cómo se estructuran los circuitos excitatorios en concierto con los inhibitorios, enfatizando su dinámica y variabilidad determinada por estímulos de diversa distribución temporal y espacial. En este contexto, la dinámica de maduración de las aferencias sinápticas excitatorias e inhibitorias, y en particular, la maduración tardía de la inhibición perisomática respecto a la maduración de la excitación que ocurre en las GC nuevas, podría tener importantes implicancias a nivel funcional.

En este trabajo de tesis nos focalizamos, por lo tanto, en el estudio del procesamiento de estímulos de diversa complejidad en poblaciones de neuronas granulares inmaduras y maduras, enfatizando los mecanismos sinápticos excitatorios e inhibitorios que determinan dicho procesamiento.

Hipótesis y Objetivos

El giro dentado del hipocampo es una de las dos regiones del cerebro de los mamíferos donde se generan neuronas durante toda la vida. Se ha demostrado que la neurogénesis adulta hipocampal cumple una función, sin embargo no se conoce cómo las neuronas nuevas contribuyen con el procesamiento de información del hipocampo. **En la hipótesis principal de esta tesis proponemos que las neuronas nacidas en el hipocampo adulto proveen una función al procesamiento de estímulos del circuito durante el proceso de maduración.** Proponemos que la secuencia de maduración de los contactos aferentes determina en las neuronas inmaduras una ventana temporal donde existe un balance diferencial de la excitación y la inhibición reclutada por los estímulos aferentes. El balance diferencial daría lugar a diferencias en la activación de las neuronas inmaduras en comparación al resto de las células granulares maduras, y por ende aportaría capacidades de procesamiento únicas al circuito del giro dentado del hipocampo.

El **objetivo general** de este trabajo es estudiar la activación de las células granulares inmaduras nacidas en el adulto en comparación con la activación de las células granulares maduras nacidas durante el desarrollo en respuesta a distintas condiciones de estimulación de la vía aferente principal al giro dentado (la vía perforante medial - mPP), y su determinación por la interacción entre los circuitos excitatorios e inhibitorios reclutados por el estímulo. Particularmente, planteamos tres objetivos:

Objetivo 1: Estudiar la participación de las neuronas inmaduras y maduras del giro dentado en la respuesta poblacional a la estimulación de la vía aferente mPP, comprendiendo los mecanismos sinápticos excitatorios e inhibitorios que la determinan.

Objetivo 2: Estudiar la capacidad de las neuronas inmaduras y maduras de integrar o asociar inputs independientes de la vía aferente mPP, evaluando el papel de los circuitos inhibitorios en la modulación del grado de integración.

Objetivo 3: Estudiar la activación de las neuronas inmaduras y maduras frente a estímulos complejos compuestos por trenes de estimulación a distintas frecuencias, evaluando los mecanismos sinápticos excitatorios e inhibitorios subyacentes.

Materiales y Métodos

1. Animales y obtención de rodajas agudas de hipocampo con células granulares nuevas marcadas con fluorescencia

1.1. Animales y cirugía

Todos los experimentos de esta tesis fueron realizados sobre hembras C57BL/6J que a las seis semanas de edad fueron sometidas a una cirugía de inyección intra-hipocámpal de un retrovirus que permite marcar con una proteína reportera fluorescente a las células en división (van Praag et al. 2002). Los ratones fueron alojados en jaulas de cuatro y dos días previos a la cirugía se les colocaron dos ruedas para correr por jaula, con la finalidad de aumentar el número de neuronas marcadas (van Praag et al. 1999) y facilitar los estudios electrofisiológicos y de imágenes de calcio.

Durante la cirugía, anestesiábamos a los ratones (150 µg ketamina + 15 µg xilacina en 10 µl de solución salina por g), realizamos una craneotomía sobre el hipocampo dorsal, e inyectamos 1 µl de retrovirus a 0.15 µl/min (referencias estereotáxicas, coordenadas desde el bregma: -2 mm anteroposterior, lateral -1.5 mm, -1,9 mm ventral) utilizando microcapilares estériles calibrados (Sigma). Luego de cuatro semanas de la cirugía, sacrificamos a los ratones para realizar las rodajas agudas de hipocampo, sobre las cuales podemos reconocer por fluorescencia a las neuronas nacidas el día de la inyección.

Los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité del Cuidado y Uso de Animales institucional de la Fundación Instituto Leloir de acuerdo con los Principios para la Investigación Biomédica en animales del Consejo de Organizaciones Internacionales para las ciencias médicas y las disposiciones establecidas en la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio.

1.2. Preparación del retrovirus

Para la expresión de proteínas reporteras fluorescentes en las neuronas nacidas en el adulto utilizamos un vector viral no replicativo basado en el virus Moloney de la leucemia murina. Las partículas virales fueron ensambladas en células HEK 293T a partir de la transfección con PEI (Invitrogen) de tres plásmidos conteniendo las secuencias codificantes para la cápside (CMV-vsfg), las proteínas virales (CMV-gag/pol) y la proteína reportera *Red-fluorescent protein* o *Green-fluorescent protein* bajo el promotor constitutivo CAG (CAG-RFP o CAG-GFP, respectivamente). El sobrenadante conteniendo partículas virales fue recolectado 48 hs después de la transfección y concentrado en dos rondas de ultracentrifugación. El título del virus típicamente fue de $\sim 10^5$ partículas/µl.

1.3. Preparación de las rodajas agudas de hipocampo

Los ratones fueron anestesiados y decapitados cuatro semanas después de la inyección para reconocer las neuronas nacidas en el adulto inmaduras de cuatro semanas de edad (4wpiGC). En algunos experimentos, los ratones fueron sacrificados luego de ocho semanas de la cirugía, para reconocer a las neuronas nacidas en el adulto ya maduras (8wpiGC). Removimos los cerebros en una solución fría de composición (mM): 110 colina-Cl⁻; 2.5 KCl, 2.0 NaH₂PO₄, 25 NaHCO₃, 0.5 CaCl₂, 7 MgCl₂, 20 dextrosa, 1.3 Na⁺-ascorbato, 3.1 Na⁺-piruvato y 4 ácido quinurénico. Aislamos el hipocampo derecho y cortamos la región dorsal en rebanadas de 400 µm de grosor con un vibrátomo Leica VT 1200S. Transferimos las rodajas a una cámara con una solución de líquido cefalorraquídeo artificial (ACSF) de composición (mM): 125 NaCl, 2.5 KCl, 2.3 NaH₂PO₄, 25 NaHCO₃, 2 CaCl₂, 1.3 MgCl₂, 1.3 Na⁺-ascorbato, 3.1 Na⁺-piruvato y 10 dextrosa (315 mOsm). Las rodajas fueron burbujeadas con carbógeno (95% O₂/5% CO₂) y mantenidas a 30° C por 1 hora antes de realizar los registros. Para los registros, mantuvimos a las rodajas en un sistema de perfusión de ACSF burbujeada con carbógeno, a temperatura ambiente, bajo un microscopio de contraste de interferencia diferencial (DIC) Olympus BX61WI montado con una cámara CCD Hamamatsu (*Hamamatsu electron multiplier CCD camera* modelo C9100-13).

2. Registros de imágenes de Calcio

2.1. Detalle del experimento

Para estudiar la activación de las GC con imágenes de calcio, utilizamos un objetivo de inmersión de agua 40X, N.A. 0.8. Elegimos una región de la GCL que contuviera al menos tres GC RFP+ en un mismo foco superficial. Con una pipeta de vidrio colocada sobre la superficie de la rodaja inyectamos con pulsos de presión positiva el colorante sensible a Ca²⁺ Oregon Green ácido 1,2-bis(2-aminofenoxy)etano-N,N',N'-tetra acético (BAPTA)-1 AM (OGB-1 AM, Invitrogen, 400 µM, disuelto en 98% DMSO, Sigma, y 2% ácido pluronic F-127, Invitrogen) cada 30-50 µm a lo largo del GCL dentro del campo de visión. Las grabaciones comenzaron al menos 30 minutos después de la carga.

Estimulamos la mPP colocando un electrodo monopolar en la MML, aplicando pulsos de corriente cubriendo el rango de intensidades de 5 a 150 µA (TTLs de duración 200 µs). Para cada intensidad del estímulo realizamos cinco ensayos. Las estimulaciones se repitieron en presencia del antagonista de los receptores de GABA_A, picrotoxina (PTX, 100 µM, Sigma). Al final de cada experimento aplicamos a la solución de baño ACSF

ácido quinurénico (KYN, 6 mM, Sigma), para bloquear los receptores de ácido α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionico (AMPA) y ácido N-Metil-D-aspartico (NMDA) con el fin de descartar que la activación de las GC se debiera a su estimulación directa.

2.2 Adquisición y procesamiento de las imágenes de calcio

La emisión y la excitación de fluorescencia del colorante fueron filtradas por los filtros duales de 470-495/510-550 nm para OGB-1 AM y 535-555/570-625 nm para RFP. Las imágenes se adquirieron utilizando el software pro-Xcellence (exposición de 20 ms a 10 Hz). Las oscilaciones de calcio fueron supervisadas por el campo de visión completo y los cambios de fluorescencia después de la estimulación de la vía perforante medial (mPP) fueron calculados como $\Delta F/F_0$, donde F_0 es el fluorescencia en el reposo y ΔF es el cambio en la fluorescencia en el tiempo (Fig. M.1A). Debido a la corta duración de cada ensayo individual, no realizamos ningún tipo de corrección por el *bleaching*. Para el análisis, seleccionamos las imágenes correspondientes al máximo $\Delta F/F_0$. Para cada intensidad del estímulo promediamos la $\Delta F/F_0$ pico de cinco ensayos. Entre los ensayos de imágenes de calcio captamos imágenes de fluorescencia de las células RFP+, para luego superponer las imágenes y reconocer a las neuronas nuevas.

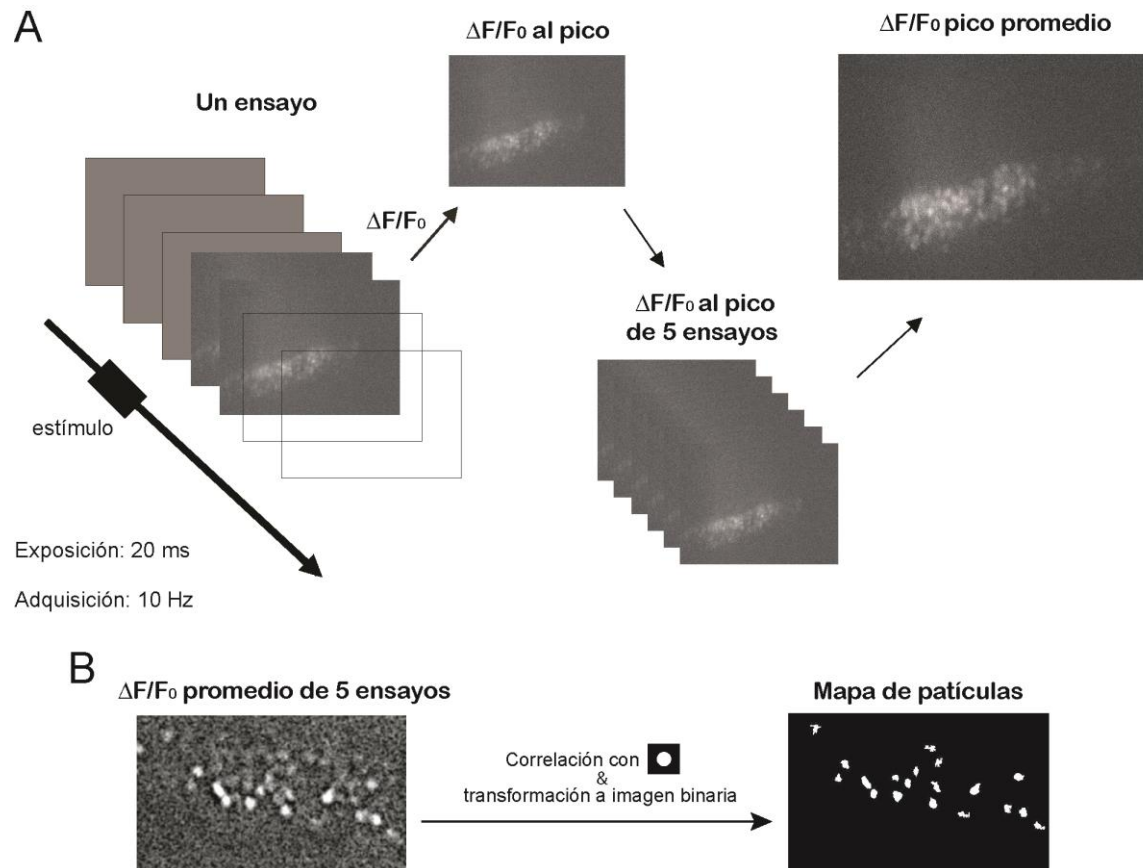


Figura M.1. Adquisición y procesamiento de las imágenes de calcio. A. Secuencia de adquisición de las imágenes. De cada ensayo se toman las dos imágenes consecutivas al estímulo, en las que la señal de

aumento de fluorescencia respecto al basal es máxima ($\Delta F/F_0$ pico). La resolución de la imagen se mejora realizando un promedio de las imágenes correspondientes al pico de cinco ensayos ($\Delta F/F_0$ pico promedio).

B. Para identificar las células individuales que se activan con el estímulo la imagen promedio se transforma a una imagen de correlación con una figura de círculo blanco en fondo negro de un diámetro aproximado al de una célula activada que, mediante la imposición de un umbral de correlación y de un número mínimo de píxeles adyacentes, luego se convierte a una imagen binaria de partículas que representan, cada una, a una célula activada (mapa de partículas).

Las imágenes promediadas del $\Delta F/F_0$ pico fueron analizadas con el software Image J NIH (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) en un proceso de tres etapas (Yuan et al. 2011). En primer lugar, la imagen fue correlacionada con una plantilla circular de 5.6 μm de diámetro clara sobre fondo oscuro (Fig. M.1B). En segundo lugar, la imagen resultante se transformó en una imagen binaria mediante la imposición de un umbral de grado de correlación y de tamaño ajustado para cada experimento. Por último, cada célula reclutada se definió como un cúmulo de un número mínimo de los píxeles adyacentes (~ 50 píxeles de las imágenes capturadas con el objetivo de 40 x, ajustado para cada experimento). Las 4wpiGC activadas fueron identificadas por la superposición de la imagen de fluorescencia de las células RFP+ y los mapas de calcio. En los experimentos de imágenes de calcio, las GC RFP- fueron consideradas como matGC.

En los experimentos de análisis de la variación del $\Delta F/F_0$ en el tiempo en células individuales, tomamos la fluorescencia en ROIS circulares que rodearan a cada célula y calculamos el basal a partir de todo el campo de visión.

2.3. Cálculo del porcentaje de células activadas por imágenes de calcio

El porcentaje de activación de GC en los experimentos de imágenes de calcio se calculó como el número de células activadas de una población (RFP+ o RFP-) a una fuerza particular del estímulo relativizado al máximo número de GC activadas de la población, obtenido a la intensidad máxima, en presencia de PTX (100 μM , Sigma) (Fig. M.2). Los datos fueron agrupados (*binning*) de a intervalos del 20% de la intensidad del estímulo.

2.4. Calibración del estímulo en los experimentos de integración de inputs

Para agrupar los datos de diferentes secciones hipocampales, la fuerza del estímulo en este caso fue normalizada, para cada intensidad del estímulo particular, al porcentaje de células activadas del total de células que se activaron en la rebanada (Fig. M.2). El número total de GC que respondieron en la rodaja fue obtenido al final del experimento después de aplicar picrotoxina (100 μM , Sigma) y ejercer un estímulo fuerte de la mPP (100-150 μA).

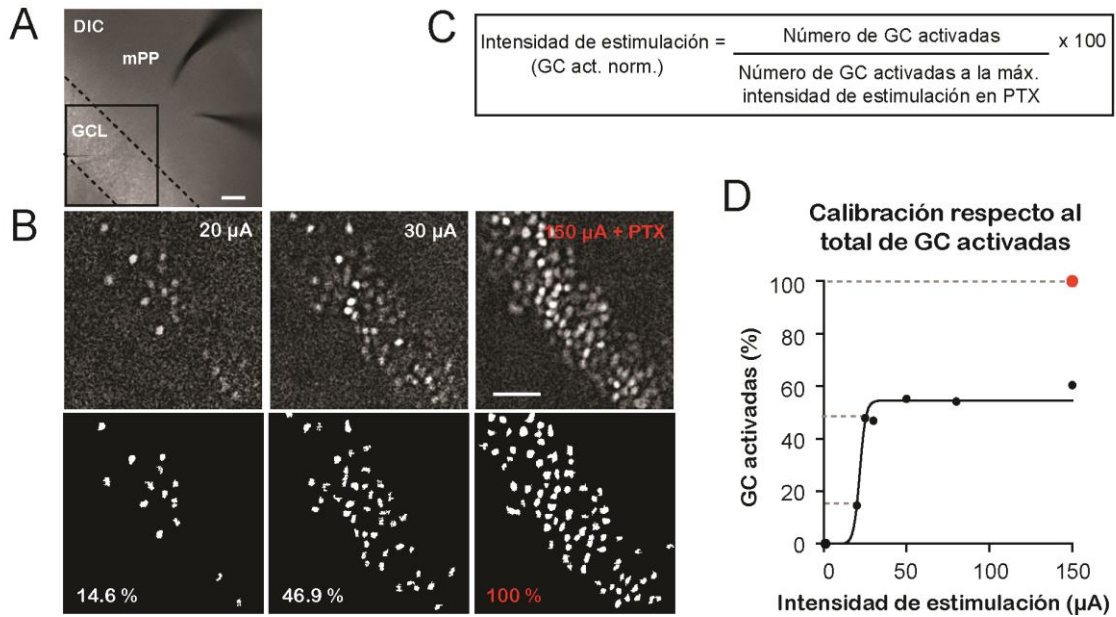


Figura M.2. Cálculo del porcentaje de células activadas en los experimentos de imágenes de calcio: calibración del estímulo en los experimentos de integración de inputs. **A.** Imagen de DIC de una rodaja de hipocampo en la que se marca la capa de células granulares (GCL) y los dos electrodos de estimulación (EE1 y EE2) colocados en la vía perforante medial (mPP). El recuadro marca la región cargada con Oregon Green Bapta 1-AM. **B.** Imagen del aumento de la fluorescencia (arriba) y mapas de partículas (abajo) de las neuronas que se activan con la estimulación a distintas intensidades en µA. Se indica el porcentaje de neuronas activadas en el ejemplo a cada una de las intensidades, y en presencia del bloqueante de inhibición, picrotoxina (PTX). **C.** Fórmula de cálculo de la intensidad de estimulación en los experimentos de integración de inputs. **D.** Ejemplo de una rodaja del porcentaje de células activadas en función de la intensidad de estimulación (puntos negros), relativo al máximo porcentaje de células activadas con PTX (punto rojo). Barra de calibración: 50 µm.

3. Registros electrofisiológicos

3.1. Consideraciones generales

Los registros fueron obtenidos usando el amplificador Axopatch 200B y el amplificador Multiclamp700B (Molecular Devices), digitalizados con una Digidata 1440A (Molecular Devices) y adquiridos a 10-20 kHz en una computadora personal usando el software pClamp10 (Molecular Devices). El análisis se realizó con el software pClamp10 y Matlab. Las estimulaciones de la mPP fueron realizadas con electrodos monopares de acero (Frederick Haer Company) controlado mediante un Master8 (A.M.P.I., TTLs de duración 200 µs) a través de un estimulador Iso-Flex (A.M.P.I.). Para los registros de célula única de las matGC, las GC fueron elegidas dentro del último tercio de la GCL, dado que las GC generadas en el adulto permanecen en los dos primeros tercios (Mathews et al. 2010).

3.2. *Electrodos de registro*

Para los registros electrofisiológicos utilizamos microelectrodos estirados de vidrio de borosilicato (KG-33, King Precision). Los registros de campo se realizaron utilizando microelectrodos de 4–5 M Ω con solución de NaCl 3 M. Para los registros en modo loose-patch utilizamos microelectrodos de 5–7 M Ω con ACSF. Para los registros de whole-cell utilizamos microelectrodos de 4-5 M Ω con una solución interna con Cs (mM): 130 CsOH, 130 ácido D-glucónico, 2 MgCl₂, 0.2 EGTA, 5 NaCl, 10 HEPES, 4 ATP-tris, 0.3 GTP-tris, 10 fosfocreatina, Alexa Flúor 488 o 594 (10 μ g/ml; Invitrogen), a pH 7,3 y 290 mOsm; o con solución interna de gluconato de potasio (mM): 120 K-gluconato, 10 Hepes, 0,1 EGTA, 4 MgCl₂, 5 NaCl, 20 KCl, 4 Tris-ATP, 0,3 Tris-GTP, 10 fosfocreatina y Alexa Flúor 488 (10 μ g/ml; Invitrogen), a pH 7,3 y 290 mOsm; o con una solución con Cs y Cl⁻ simétrico (mM): 140 CsCl, 2 MgCl₂, 0.1 EGTA, 5 NaCl, 10 HEPES, 4 ATP-tris, 0.3 GTP-tris, 10 fosfocreatina, a pH 7,3 y 290 mOsm.

3.3. *Calibración de la fuerza del estímulo en los experimentos de activación de las GC*

La intensidad del estímulo es proporcional al número de axones mPP activados. La pendiente del potencial de campo postsináptico excitatorio (fEPSP) aumenta linealmente con el número de axones activados (Pouille et al. 2009). Por lo tanto, para poder comparar la fuerza del estímulo entre rodajas, evaluamos la fuerza de estimulación como el porcentaje de la pendiente del fEPSP (Fig. M.3). Para registrar el fEPSP y el pop-spike en respuesta al estímulo de la mPP, al comenzar los experimentos colocamos un electrodo de registro de campo en la GCL. Estimulamos a intensidades crecientes con 2 pulsos distanciados a 50 ms (de 0 a 160 μ A, cada 10 μ A). Tomando la respuesta al primer pulso, realizamos curvas del porcentaje de la pendiente del fEPSP y del porcentaje del pop spike en función de la corriente de estimulación, considerando como 100% la respuesta a la intensidad que evoca la máxima amplitud del pop spike (Fig. M.3B,C). La fuerza del estímulo siempre se evaluó y calibró en ausencia de bloqueantes. Así, para una determinada intensidad de estimulación dentro de una rebanada, el número de axones de la mPP estimulados en condiciones de control o en presencia de picrotoxina (100 μ M, Sigma) fue el mismo. La respuesta al segundo pulso se utilizó para verificar que hubiera depresión del pop spike estimulando la mPP al rango de intensidades utilizado en el experimento, dado que la mPP, a diferencia de la LPP, deprime en respuesta a 20 Hz (McNaughton 1980).

3.4. Construcción de las curvas de frecuencia acumulada de la activación de las células granulares

Estimulamos la mPP con un electrodo monopolar y registramos el disparo de potenciales de acción en modo loose-patch. Realizamos una curva *input-output* para cada GC registrada, estimulando de 5 a 10 veces a distintas intensidades. Con los datos graficamos la probabilidad de disparo en función de la intensidad del estímulo y los datos se ajustaron a una curva sigmoidea, función $y = 100 \div (1 + 10^{(x_0 - x)p})$, donde x_0 es la intensidad que evoca el disparo de potenciales de acción con una probabilidad del 50%, que llamamos “intensidad umbral”, y p la pendiente en x_0 . De cada célula tomamos el valor de la intensidad umbral y realizamos una curva de activación poblacional como la frecuencia acumulada de las intensidades umbrales de todas las células registradas.

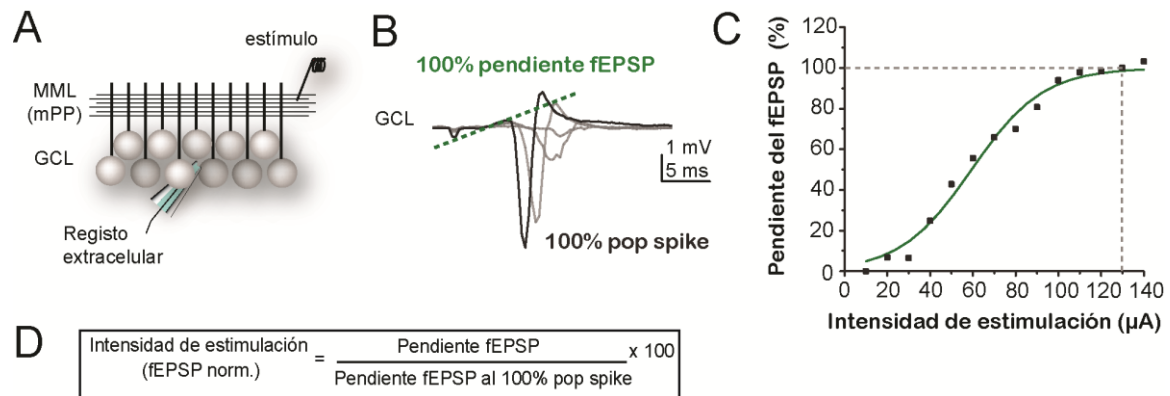


Figura M.3. Calibración del estímulo en los experimentos de activación de las células granulares. A. Esquema del registro. El electrodo de estimulación se coloca en la capa molecular medial (MML) para estimular la vía perforante medial (mPP), es decir, los axones provenientes de la corteza entorrinal medial. Un electrodo de registro extracelular se coloca en la capa de células granulares (GCL) para registrar la variación del potencial de campo en respuesta a la estimulación. **B.** Trazos del potencial de campo en respuesta a la estimulación a intensidades crecientes. El pico hacia abajo corresponde al *population spike* (pop spike). Se señala la pendiente de potencial de campo postsináptico excitatorio (fEPSP) en verde. El 100% de la pendiente del fEPSP corresponde al pop spike máximo (100%). El artefacto de los trazos ha sido borrado para facilitar la visualización. **C.** La intensidad del estímulo en μA se relativiza al porcentaje de la pendiente del fEPSP con la finalidad de comparar entre rodajas. Ejemplo de dicha relación en un experimento con ajuste de una función sigmoidea. **D.** Fórmula de cálculo de la intensidad de estimulación en los experimentos de activación de las células granulares.

3.5. Estudio de la activación con estimulación en forma de trenes

Estimulamos la mPP con un electrodo monopolar y registramos el disparo de potenciales de acción en modo loose-patch. Estimulamos la mPP con trenes de 10 pulsos a 1 Hz, 10 Hz, 20 Hz y 40 Hz, y registramos a las GC a una intensidad fija correspondiente al 50% del fEPSP, que hipotéticamente activa al 50% de la población total de neuronas. A lo largo del experimento las frecuencias de estimulación fueron distribuidas al azar y las estimulaciones fueron realizadas cada 30 segundos, 5 veces con cada frecuencia. Todas

las células vivas registradas (que fueron capaces de disparar potenciales de acción a alguna intensidad de estimulación) fueron incluidas en el análisis, aún las GC que no dispararon ningún potencial de acción al 50% del fEPSP.

La eficiencia de representación de las frecuencias se cuantificó como la eficiencia de reproducir los 9 intervalos de tiempo incluidos en el tren de 10 pulsos, es decir como la proporción de intervalos representados por los perfiles de disparo de las GC a lo largo del tren. Para cada célula se calculó la eficiencia de cada ensayo y se promedió entre ensayos. De este modo, tanto una respuesta nula, como una respuesta sin potenciales de acción sucesivos representaron una eficiencia igual a cero.

En algunos casos, en ausencia de inhibición por la aplicación de PTX (100 μ M, Sigma) se registraron más de un potencial de acción evocados por un único pulso de estimulación. En estos casos ambos potenciales de acción fueron contemplados en el análisis.

3.6. Registro de las corrientes postsinápticas

Las corrientes postsinápticas fueron registradas tras la estimulación de la mPP (Fig. M.4A). En cada registro se monitoreó la resistencia de acceso con un pulso hiperpolarizante de 10 mV. La resistencia de acceso fue típicamente 10 – 30 M Ω , y los experimentos fueron descartados si superaba los 30 M Ω . Las corrientes postsinápticas excitatorias (EPSC) fueron registradas al potencial de reversión de las corrientes postsinápticas inhibitorias (IPSC) ($\sim$ -60 mV) y las IPSC fueron registradas al potencial de reversión de la EPSC ($\sim$ 0 mV) (Fig. M.4B). Al final de los experimentos aplicamos KYN (6 mM, Sigma), para descartar que la IPSC registrada estuviese mediada por la estimulación directa de los axones inhibitorios. Sólo consideramos los experimentos en los que el KYN bloqueó >70% de la IPSC. Cuando estuvieron presentes, las IPSC mono sinápticas directas registradas en presencia del KYN (siempre < 30% de la amplitud del IPSC pico) se substrajeron de la IPSC total. Las conductancias inhibitorias y excitatorias se calcularon como las corrientes excitatorias o inhibitorias divididas por la fuerza impulsora (*driving force*) a la cual se registraron las corrientes sinápticas.

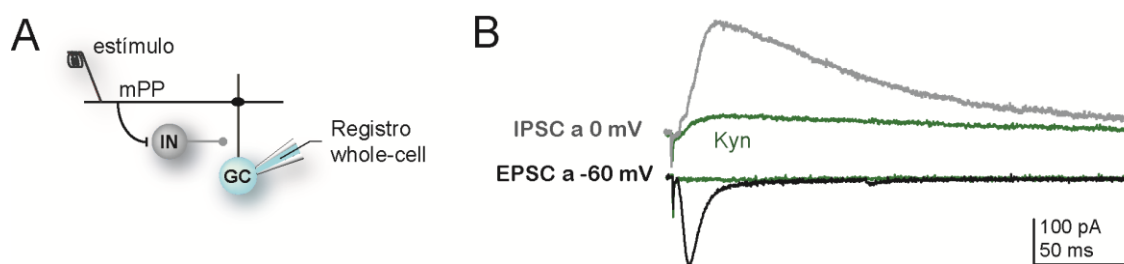


Figura M.4. Registro de las corrientes postsinápticas excitatorias e inhibitorias. A. Esquema del registro. La estimulación de la vía perforante medial (mPP) recluta neuronas inhibitorias (IN) que hacen sinapsis sobre las células granulares (GC). Las corrientes que recibe la GC en respuesta a la estimulación se

registran en whole-cell con una solución interna con Cs^+ . **B.** Las corrientes postsinápticas excitatorias (EPSC) se registran al potencial de reversión de las corrientes postsinápticas inhibitorias (IPSC), a un potencial cercano a -60 mV. Las IPSC se registran al potencial de reversión de las EPSC, a un potencial cercano a 0 mV. El bloqueo de la excitación con ácido quinurénico (Kyn) revela la inhibición reclutada directamente con el electrodo de estimulación, que se substrahe *off-line* de los trazos de inhibición total.

En los experimentos en los que estimulamos con trenes de 10 pulsos, realizamos las estimuciones cada 30 segundos, distribuyendo las frecuencias de estimulación al azar y realizando 3-5 estimuciones por frecuencia. Las cuantificaciones se realizaron sobre el promedio de los trazos obtenidos con cada frecuencia. Las corrientes de tipo NMDA fueron bloqueadas con ácido 2-Amino-5-fosfonovaleriánico (AP5, 50 mM, Tocris) para evitar la contaminación de las IPSC.

3.7. Registro de las corrientes inhibitorias dendríticas y perisomáticas

Para estimular la inhibición dendrítica colocamos un electrodo de estimulación en la MML. Para estimular la inhibición perisomática colocamos un electrodo de estimulación en la GCL (Fig. M.5A). Los experimentos se realizaron en presencia de KYN (6 mM, Sigma), de manera de bloquear las corrientes excitatorias y que la inhibición registrada fuese directa monosináptica. La intensidad de estimulación utilizada fue baja tal que sólo se reclutasen axones locales. Las corrientes postsinápticas registradas en estas condiciones corresponden a la inhibición dendrítica o perisomática según la ubicación del electrodo de estimulación, cuya naturaleza pudo verificarse utilizando una solución interna con Cs y Cl^- simétrico. Las corrientes inhibitorias dendríticas fueron registradas a 0 mV. A este potencial no hay corrientes perisomáticas de Cl^- porque la neurona está a su potencial de reversión, pero sí se registran las corrientes inhibitorias dendríticas evocadas con el estímulo en la MML, gracias al gradiente de concentración del Cl^- en las dendritas (Fig. M.5B). Las corrientes perisomáticas fueron registradas a -70 mV.

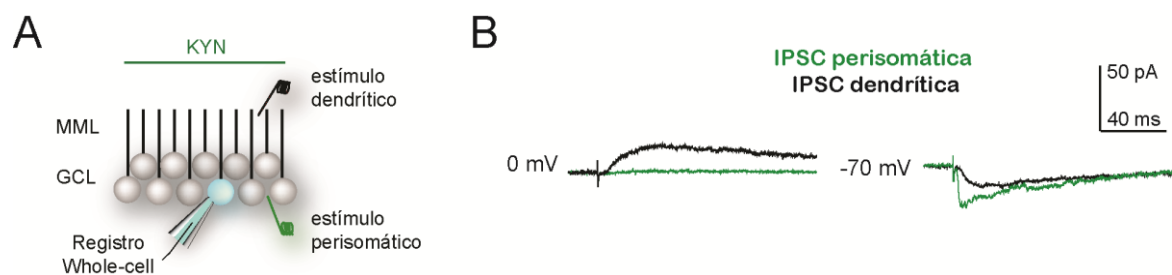


Figura M.5. Registro de las corrientes inhibitorias dendríticas y perisomáticas. **A.** Esquema del registro. La excitación se bloquea con ácido quinurénico (KYN). La inhibición dendrítica se estimula directamente con un electrodo de estimulación colocado en la capa molecular medial (MML) y la inhibición perisomática se estimula directamente con un electrodo colocado en la capa de células granulares (GCL). Las corrientes inhibitorias evocadas se registran en las células granulares en configuración whole-cell con una solución interna de Cl^- simétrico. **B.** Verificación del origen de la inhibición estimulada. Con Cl^- en el electrodo de registro, la estimulación de la inhibición perisomática no evoca corrientes a 0 mV porque el Cl^- se

encuentra a su potencial de reversión, pero el gradiente de Cl^- en las dendritas permite visualizar las corrientes de inhibición dendrítica. La inhibición perisomática, por consiguiente, se registra a -70 mV.

3.8. Registro de las corrientes inhibitorias feed-forward y feed-back

Para diseccionar la contribución de la inhibición feed-forward y feed-back de la inhibición total, estimulamos la mPP al 50% del fEPSP, registramos la IPSC total al potencial de reversión de la EPSC (~ 0 mV), y luego aplicamos el agonista de los receptores metabotrópicos de glutamato tipo 2, DCG4 (1 μM , Tocris) (Fig. M.6). Este inhibe las sinapsis eferentes de las GC (Kamiya et al. 1996) y por ende bloquea la inhibición feed-back. En estas condiciones registramos la inhibición feed-forward. La contribución de la inhibición feed-back se calculó a partir de la sustracción *off-line* de la inhibición total y la inhibición feed-forward. Cuando estuvieron presentes, las IPSC mono sinápticas directas registradas en presencia del KYN al final del experimento se substrajeron de la IPSC feed-forward. En experimentos paralelos controlamos el efecto del DCG4 sobre las interneuronas inhibitorias, registrado el cambio de umbral de activación de interneuronas parvalbumina positivas (PV+, en ratones *PV-Cre⁺/tomato⁺*). Los umbrales de activación de las interneuronas se mantuvieron siempre al menos 20 μA por debajo de la intensidad a la cual se realizaron los experimentos, la intensidad correspondiente al 50% del fEPSP, no presentando cambios en su respuesta a la estimulación luego de la aplicación de DCG4.

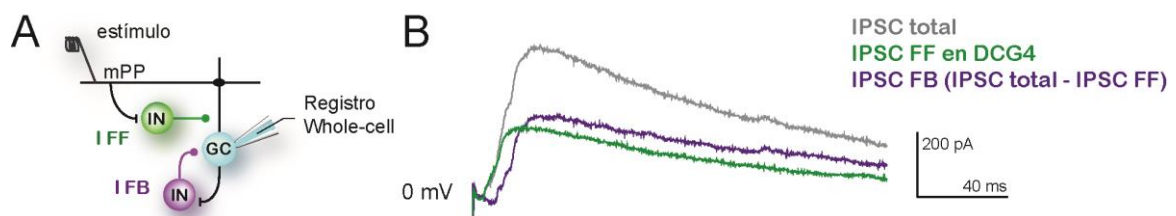


Figura M.6. Registro de las corrientes inhibitorias feed-forward y feed-back. **A.** Esquema del registro. Se muestra el circuito reclutado con la estimulación de la vía perforante medial (mPP). La estimulación de la mPP activa neuronas inhibitorias (IN) que hacen sinapsis sobre las células granulares (GC) ejerciendo inhibición feed-forward (I FF). La activación de las GC estimula IN que luego ejercen inhibición en las GC de tipo feed-back (I FB). **B.** Trazos de la corriente postsináptica inhibitoria total (IPSC total), la corriente postsináptica inhibitoria feed-forward (IPSC-FF) y la corriente postsináptica inhibitoria feed-back (IPSC-FB) evocadas por un estímulo de la mPP, registradas al potencial de reversión de la corriente excitatoria. El bloqueo de las sinapsis eferentes de las células granulares con DCG4 permite registrar la IPSC-FF aisladamente. La IPSC-FB se calcula *off-line* substrayendo la IPSC-FF a la IPSC total.

3.9. Registro de capacidad intrínseca de activación a frecuencias altas

Las GC fueron registradas en modo whole-cell con microelectrodos con solución interna de gluconato de potasio. Se aplicó KYN (6 mM, Sigma) y PTX (100 μM , Sigma) al baño de perfusión para evitar cualquier influencia de los circuitos en la determinación de la

capacidad de disparar potenciales de acción. Registrando a la GC en I-clamp, inyectamos 10 pulsos cuadrados de corriente de duración 2 ms distanciados entre sí por 1 s, o sea a 1 Hz. Aumentamos la amplitud de la corriente de manera tal que todos los pulsos evocaran un potencial de acción. Con esta misma amplitud repetimos el experimento aumentando la frecuencia de pulsos de a 20 Hz hasta la aparición de fallas. Se estimularon 5 veces con cada frecuencia de pulsos. La amplitud de la corriente fue ajustada para cada célula registrada. Se cuantificó el número de potenciales de acción sobre 10, promediado de los 5 ensayos de cada frecuencia.

4. Análisis Estadístico

Las diferencias significativas fueron evaluadas, según se indica en cada caso, con las siguientes pruebas: prueba de t de dos colas, con corrección de Welch cuando fue necesario; prueba de ANOVA de una vía o ANOVA de dos vías con prueba a posteriori de Bonferroni; prueba de Kolmogorov-Smirnov de bondad de ajuste; prueba D'Agostino & Pearson ómnibus para evaluar normalidad; prueba de Barlett para evaluar homogeneidad de varianzas. Los datos fueron transformados para realizar el análisis cuando fue necesario para cumplir con los supuestos.

Resultados

Parte 1: Participación de las neuronas inmaduras en la actividad del giro dentado evocada por la estimulación de la vía perforante medial.

Introducción: Parte 1

El GD del hipocampo recibe sus aferencias principales desde la capa II de la corteza entorrinal (EC) a través de la vía perforante (PP) (Johnston & Amaral 1998). La EC medial (MEC) procesa información multisensorial y espacial, y se conecta con el giro dentado en la zona media de la capa molecular (MML) a través de la PP medial (mPP). Estos axones contactan tanto a las GC maduras nacidas durante el desarrollo (matGC) como a las GC inmaduras de cuatro semanas de edad nacidas en la adultez (4wpiGC) e interneuronas inhibitorias locales. Se ha demostrado que tanto las matGC como las 4wpiGC se activan in vivo (Tashiro et al. 2007; Sandoval et al. 2011; Kee et al. 2007; Trouche et al. 2009) y que ambas tienen la capacidad de ser activadas por un estímulo aferente (van Praag et al. 2002; Mongiat et al. 2009). No obstante, antes del comienzo de esta tesis aún no se conocía la contribución de las 4wpiGC y las matGC a la activación poblacional evocada por la estimulación de la mPP.

Las 4wpiGC son intrínsecamente más excitables debido a la expresión reducida de canales de K^+ *inward rectifying*, pero presentan una menor conectividad excitatoria aferente en relación a las matGC, equilibrando la respuesta de ambas poblaciones de neuronas a la excitación aferente (Mongiat et al. 2009). Sin embargo, la activación de la vía aferente mPP no produce únicamente excitación monosináptica sobre las GC, sino que también activa en paralelo interneuronas inhibitorias que generan inhibición disináptica (feed-forward). Consecuentemente, la respuesta de las GC ante la estimulación de la mPP va a depender de la interacción entre la aferencia monosináptica excitatoria y la inhibición disináptica reclutada por la misma aferencia. Experimentos de registros en otras regiones del cerebro como CA1 y corteza han demostrado que la inhibición feed-forward llega lo suficientemente temprano como para poder compensar a la excitación y evitar que la célula se active (Pouille et al. 2009). Por lo tanto, ¿Cómo es la activación de las 4wpiGC frente a un estímulo aferente en comparación con la activación de las matGC? Las 4wpiGC, al igual que las matGC, reciben contactos excitatorios e inhibitorios sobre sus dendritas, y contactos inhibitorios sobre sus somas (Espósito et al. 2005); sin embargo, estos últimos son incipientes a esta edad de

maduración. En consecuencia, proponemos que este desfase en el establecimiento de los contactos excitatorios e inhibitorios en la maduración genera diferencias en el balance excitación/inhibición que las 4wpiGC reciben frente a un estímulo respecto a las matGC, y de este modo, genera diferencias en la activación entre estas células. En esta parte de la tesis ponemos a prueba esta hipótesis, estudiando el reclutamiento poblacional de las 4wpiGC y las matGC frente a la estimulación de la vía aferente, analizando la influencia de los circuitos inhibitorios y estudiando los mecanismos sinápticos subyacentes.

Resultados: Parte 1.1

Activación poblacional de las células granulares maduras e inmaduras frente a un pulso de estimulación de la vía perforante medial e influencia de los circuitos inhibitorios.

El reclutamiento poblacional de las 4wpiGC y las matGC frente a la estimulación de la mPP fue estudiado mediante dos estrategias diferentes. Para ambas, realizamos rodajas agudas del hipocampo de ratones adultos que habían sido inyectados en el hipocampo, con cuatro semanas de anterioridad, con el retrovirus conteniendo la secuencia CAG-RFP (ver materiales y métodos 1- m&m1) y colocamos un electrodo monopolar en la MML para estimular la mPP con un pulso breve.

La primera estrategia consistió en el estudio de la activación poblacional de las GC con la técnica de imágenes de calcio. Para ello, elegimos una región de la GCL con GC RFP+ y la cargamos con un colorante sensible a Ca⁺, Oregon Green BAPTA 1- AM (OGB1-AM) (Fig. R.1-1A-C; ver m&m2.1). La estimulación de la mPP evoca un aumento de la fluorescencia en los somas de las GC que se activan con la entrada de calcio (Fig. R.1-1D). Captamos el aumento de la fluorescencia ($\Delta F/F_0$) con fotografías a alta velocidad, y de estas películas tomamos las imágenes del pico del aumento de la fluorescencia y las procesamos de modo tal de obtener mapas dónde visualizar individualmente cada célula activada (Fig. R.1-1E, ver m&m2.2). Superponiendo las imágenes de calcio con las imágenes de fluorescencia de las células RFP+ podemos reconocer cuáles de las células activadas corresponden a 4wpiGC.

Para corroborar que el aumento de fluorescencia correspondiera a la activación de las GC, en una serie de experimentos realizamos registros de loose-patch de las GC en simultáneo con registros de imágenes de calcio (Fig. R.1-2A-D). Los registros de loose-

patch nos permiten registrar potenciales de acción en la célula registrada, sin alterar su composición intracelular. Estimulamos la mPP con intensidades tales que evocasen fallas y aciertos en la célula registrada en loose-patch. Para el procesamiento de las imágenes de calcio, promediamos cinco imágenes correspondientes a los ensayos donde hubo fallas y cinco imágenes correspondientes a los ensayos donde se detectó un potencial de acción (Fig. R.1-2C-D). De este modo, únicamente se observó un aumento de la fluorescencia en la célula registrada en las imágenes obtenidas de los ensayos correspondientes al disparo de potenciales de acción. Asimismo, siempre que una matGC o una 4wpiGC se activó lo hizo disparando un único potencial de acción, sin excepción. Por lo tanto, el aumento de fluorescencia de las GC evocado por un estímulo breve de la mPP representa la activación de las GC mediante el disparo de un potencial de acción.

Por otro lado, seleccionamos áreas correspondientes a los somas de 4wpiGC y de matGC y analizamos la amplitud máxima de las señales de calcio evocadas por la estimulación en cada GC (Fig. R.1-2E). Los datos muestran que no hay diferencias entre los picos del $\Delta F/F_0$ de las 4wpiGC y las matGC. Además, comparamos la cinética de las señales de calcio, que tampoco reveló diferencias (Fig. R.1-2F). Estos resultados muestran que las señales de calcio de 4wpiGC y matGC son similares y por lo tanto es válido analizar y comparar la activación de ambas poblaciones celulares con esta técnica.

Por lo tanto, estudiamos la activación poblacional de las 4wpiGC y las matGC con imágenes de calcio. Antes de comenzar el experimento, calibramos el estímulo respecto a la actividad de la rodaja, colocando un electrodo de registro de campo extracelular en la región de la GCL cargada con OGB1-AM y estimulando a intensidades crecientes para obtener una curva *input-output* (ver m&m3.3). Estímulos más fuertes reclutan más axones de la mPP y por ende evocan potenciales de campo postsinápticos excitatorios (fEPSP) y disparos poblacionales (pop-spike) mayores. De este modo, el estímulo se relativizó al máximo pop-spike en cada rodaja. Luego de calibrar el estímulo, adquirimos las imágenes de calcio en respuesta a la estimulación de la mPP a distintas intensidades, alternadamente (Fig. R.1-3). De cada rodaja obtuvimos mapas de las células activadas a las distintas intensidades donde podemos reconocer qué células corresponden a las 4wpiGC RFP+ (Fig. R.1-3A-C). El resto de las GC, enriquecidas en GC maduras, fueron consideradas matGC.

A partir de estos mapas calculamos el porcentaje de 4wpiGC y de matGC activadas a cada intensidad de estimulación (ver m&m2.3). Los resultados muestran que mayores intensidades del estímulo reclutan mayores porcentajes de GC, tanto de 4wpiGC, como de matGC (Fig. R.1-3D). No obstante, se recluta un mayor porcentaje de 4wpiGC que de matGC a todas las intensidades de estimulación estudiadas. Es decir, que un mismo

estímulo recluta un mayor porcentaje de 4wpiGC que de matGC. Por ejemplo, un estímulo de intensidad del 20% activa aproximadamente a un 20 % de la población de matGC y aproximadamente un 30% de la población de 4wpiGC.

La segunda estrategia utilizada para estudiar la activación poblacional consistió en el estudio de los umbrales de activación de las 4wpiGC y las matGC. En esta serie de experimentos que fueron realizados por Lucas Mongiat, la activación de las poblaciones de 4wpiGC y matGC se evaluó mediante registros electrofisiológicos de loose-patch de célula única (Fig. R.1-4). El estímulo evocado por el electrodo en la mPP fue calibrado antes de comenzar el experimento, con un electrodo de registro de campo colocado en la GCL, del mismo modo que en el experimento anterior. Luego, estimulamos la mPP con un pulso y registramos la evocación de potenciales de acción de una 4wpiGC o una matGC (Fig. R.1-4B). Para cada célula registrada estimulamos varias veces a distintas intensidades buscando la intensidad de estimulación que evocase el disparo de un potencial de acción con una probabilidad del 50% (intensidad umbral) (Fig. R.1-4C, ver m&m3.4). La frecuencia acumulada de las intensidades umbral de las distintas células 4wpiGC y matGC revela la activación poblacional de las 4wpiGC y las matGC, respectivamente (Fig. R.1-4D).

Los resultados muestran que las matGC requieren estímulos más fuertes para ser activadas que las 4wpiGC (Fig. R.1-4D). Al igual que con las imágenes de calcio, se recluta un mayor porcentaje de 4wpiGC que de matGC frente a todas las intensidades de estimulación. Por ejemplo, el reclutamiento del 50% de la población de matGC requiere una intensidad de aproximadamente 60%, mientras que el 50% de 4wpiGC se recluta con una intensidad de aproximadamente 40%. Notablemente, las intensidades menores, sólo reclutan 4wpiGC. Estos datos, en conjunto con los obtenidos con las imágenes de calcio, demuestran que las 4wpiGC se activan con estímulos más débiles de la mPP que las matGC, indicando que tienen una alta participación en la activación de la población total de GC.

A continuación, estudiamos la contribución de los circuitos inhibitorios en la determinación del reclutamiento de las GC. Para ello realizamos los mismos experimentos de activación de las GC con imágenes de calcio y con registros de loose patch, en condiciones de bloqueo de la inhibición, agregando picrotoxina (PTX) al baño de perfusión. Notablemente, en estas condiciones los porcentajes de activación de las 4wpiGC y las matGC no difieren, y esto se observa con ambas estrategias experimentales (Fig. R.1-5A y Fig. R.1-6A). Si comparamos las curvas de activación de las matGC en presencia y en ausencia de PTX, observamos que el porcentaje de matGC activadas aumenta con el bloqueo de la inhibición (Fig. R.1-5B y Fig. R.1-6B). Contrariamente, el porcentaje de activación de las 4wpiGC es igual en ausencia de inhibición que en

condiciones de inhibición intacta (Fig. R.1-5C y Fig. R.1-6B). Estos resultados demuestran que los circuitos inhibitorios generan las diferencias en activación observadas entre las 4wpiGC y las matGC en condiciones donde el circuito se encuentra intacto. Los mayores niveles de activación de las 4wpiGC en estas condiciones indican que el reclutamiento de las 4wpiGC no está bajo la influencia de la inhibición que sí afecta el reclutamiento de las matGC.

Resultados: Parte 1.2

Mecanismo sináptico que genera las diferencias de activación entre las células granulares maduras e inmaduras

La inhibición cumple un papel fundamental en la determinación de las diferencias de reclutamiento entre las 4wpiGC y las matGC. Para entender cómo la inhibición genera estas diferencias, estudiamos las corrientes postsinápticas inhibitorias (IPSC) y las corrientes postsinápticas excitatorias (EPSC) que subyacen la activación de las GC al umbral, es decir las IPSC y las EPSC evocadas a la intensidad umbral de estimulación. En experimentos en colaboración con Lucas Mongiat, colocamos un electrodo de estimulación en la MML para estimular la mPP y calibramos el estímulo con registros extracelulares de campo. Luego, realizamos registros en configuración de loose-patch y en configuración de whole-cell en una misma 4wpiGC o matGC (Fig. R.1-7). Así, determinamos la intensidad umbral de estimulación de cada célula en loose-patch y luego estudiamos las corrientes evocadas en la misma célula por el estímulo a la intensidad umbral en whole-cell (Fig. R.1-7A). Registramos la EPSC al potencial de reversión de la IPSC, y viceversa (ver m&m3.6). La estimulación de la mPP evoca una excitación directa y una inhibición indirecta en las GC. De este modo, analizamos cómo la relación entre la inhibición y la excitación evocadas por el estímulo determina la activación de las 4wpiGC y las matGC.

Los registros revelan que las 4wpiGC reciben IPSC y EPSC de menor amplitud que las matGC- corrientes cuantificadas como la conductancia postsináptica inhibitoria (IPSG) y la conductancia postsináptica excitatoria (EPSG), respectivamente (Fig. R.1-7B), indicando que las matGC tienen una mayor densidad de contactos sinápticos excitatorios e inhibitorios, característicos de las neuronas maduras (Laplagne et al. 2006; Espósito et al. 2005). Interesantemente, tal como se observa en los trazos y en la cuantificación de la latencia al 20% del pico de la corriente, la IPSC de las 4wpiGC es

significativamente más lenta que la de las matGC (Fig. R.1-7D). La latencia al 20% de la EPSC en cambio, presenta diferencias menores.

Luego calculamos qué valores de corrientes subyacen el disparo del potencial de acción, cuantificando la IPSG y la EPSG al momento de ocurrencia del potencial de acción (Fig. R.1-7E). Notablemente, si bien las matGC presentan mayores valores de EPSG y IPSG, hay una mayor relación excitación/inhibición en las 4wpiGC que en las matGC. Las 4wpiGC presentan una relación excitación/inhibición de 4:1, mientras que las matGC presentan una relación de 2:1. Estos resultados indican que las 4wpiGC tienen mayores niveles de activación que las matGC porque reciben una inhibición más lenta, tal que no alcanza a compensar a la excitación. La 4wpiGC genera el potencial de acción antes de que la inhibición crezca lo suficiente, como podemos observar al comparar la latencia al 20% de la inhibición con la latencia al disparo de potenciales de acción (Fig. R.1-7C,D). En cambio en las matGC la inhibición crece antes de que se produzca un potencial de acción. Estos resultados explican porque la activación de las 4wpiGC es igual en presencia y en ausencia de inhibición, y porque, de manera contraria, los niveles de activación de las matGC están determinados por la inhibición.

En la secuencia de desarrollo de las GC nacidas en el adulto, los contactos sinápticos aferentes de inhibición dendrítica anteceden a los contactos de inhibición perisomática (Espósito et al. 2005). La inhibición dendrítica registrada en el soma es lenta, en cambio la perisomática es rápida (Harney & Jones 2002). Por lo tanto, una posible causa de la inhibición lenta en las 4wpiGC es que esta esté enriquecida en inhibición dendrítica. De este modo, estudiamos específicamente la inhibición dendrítica y perisomática que contacta a las 4wpiGC y a las matGC (Fig. R.1-8). Para ello, estimulamos directamente los axones que contactan a las dendritas colocando un electrodo en la MML, y los axones que contactan a los somas colocando otro electrodo en la GCL (Fig. R.1-8A). Aplicamos KYN en el baño para bloquear las corrientes excitatorias. A intensidades bajas, sólo se recluta la inhibición local dendrítica o perisomática, según la ubicación del electrodo (ver m&m3.7). Empleando Cl^- simétrico en la pipeta de patch en configuración whole-cell, registramos a -70 mV las corrientes perisomáticas y a 0 mV las corrientes dendríticas (Fig. R.1-8B).

Utilizando esta estrategia observamos que las 4wpiGC presentan una inhibición perisomática más lenta y de menor amplitud que las matGC (Fig. R.1-8C,E). No obstante, la inhibición dendrítica evocada en matGC y 4wpiGC no presenta diferencias (Fig. R.1-8D,F). Estos resultados revelan que la diferencia entre las 4wpiGC y las matGC en la inhibición evocada por la estimulación de la mPP se debe específicamente a diferencias en la inhibición perisomática. Además, estos resultados indican que la inhibición reclutada en las 4wpiGC de forma indirecta por un estímulo de la mPP es más lenta

porque las IPSC directas son más lentas, no porque haya un reclutamiento tardío de interneuronas inhibitorias. De este modo, la inhibición de las 4wpiGC está compuesta por una inhibición dendrítica lenta y un menor componente de inhibición perisomática lenta. La inhibición evocada en matGC, en cambio, tiene un alto componente de inhibición perisomática rápida.

Conclusiones: Parte 1

Los resultados presentados en esta primera parte de la tesis demuestran que el DG del hipocampo comprende una población heterogénea de GC de distintas edades madurativas, dónde la población de neuronas inmaduras de 4 semanas de edad (4wpiGC) presenta propiedades únicas en su respuesta a la activación aferente. Las 4wpiGC tienen menores umbrales de activación que las matGC frente a la estimulación de la mPP, y por lo tanto se reclutan o activan en una mayor proporción. Las diferencias en la activación entre las GC están generadas por diferencias en la inhibición que las contacta. La inhibición reclutada por la estimulación de la mPP reduce sustancialmente los niveles de activación de la matGC, en cambio las 4wpiGC no son afectadas por la inhibición que reciben, ya que ésta crece lentamente después de la generación del potencial de acción. De este modo, al momento de ocurrencia del potencial de acción las 4wpiGC presentan un mayor balance excitación/inhibición que las matGC explicando su reclutamiento diferencial. Las diferencias de inhibición entre 4wpiGC y matGC radican en diferencias en la inhibición perisomática. La inhibición perisomática es incipiente a esta edad de maduración y por lo tanto las 4wpiGC carecen de la inhibición perisomática amplia y rápida característica de las matGC.

Discusión: Parte 1

El giro dentado constituye la vía principal de entrada al hipocampo desde la EC. La información que llega al DG es procesada por el circuito local y luego continúa su curso hacia CA3. El circuito local comprende a las GC, que son las neuronas de proyección, y a interneuronas locales, en su mayoría inhibitorias. Las GC presentan in vivo una actividad escasa y dispersa, que se considera está causada por la fuerte inhibición local (Ewell &

Jones 2010; Temprana et al. 2015). Sin embargo, la composición de las GC del DG es heterogénea. La neurogénesis adulta le provee al DG del hipocampo continuamente *pools* de GC nuevas, por lo tanto un 3-6% de las GC del DG corresponde a GC en proceso de maduración que muestran características particulares. Los mayores niveles de LTP y mayor excitabilidad intrínseca de las 4wpiGC dieron lugar a la hipótesis de que la función de la neurogénesis adulta podría residir en las GC inmaduras (Aimone et al. 2006; Alme et al. 2010; Schinder & Gage 2004; Aasebø et al. 2011).

En esta parte de la tesis demostramos que la mayoría de las GC del giro dentado, compuesta por las GC maduras, presenta umbrales de activación altos debido a que la estimulación de la mPP recluta una fuerte y rápida inhibición en forma paralela. Estos resultados podrían explicar los escasos niveles de activación observados *in vivo* y apoyan la hipótesis de que la baja actividad del DG está generada por los circuitos inhibitorios (Coulter et al. 2011). Notablemente, los resultados aquí expuestos revelan que las 4wpiGC son reclutadas con estímulos más débiles de la vía aferente mPP que las matGC. Estos datos han sido confirmados posteriormente por otro laboratorio (Dieni et al. 2013). Estos resultados sugieren que las neuronas inmaduras podrían ser preferencialmente activadas por un estímulo aferente *in vivo*, teniendo una participación importante en la activación del DG. Congruentemente, registros *in vivo* de la activación poblacional evocada por la estimulación de la PP en ratones sin GC nuevas (de 0-10 semanas de edad) muestran una disminución del potencial postsináptico excitatorio en comparación con ratones con niveles normales de neurogénesis (Lacefield et al. 2010). Cabe destacar que las GC nacidas en el adulto de cuatro semanas de edad ya están comunicadas con CA3 (Gu et al. 2012; Temprana et al. 2015), es decir que su mayor activación podría tener consecuencias a nivel funcional.

A pesar de estar inmersas en un circuito con alta inhibición, las 4wpiGC se muestran inmunes a la inhibición reclutada con un estímulo de la mPP. Al igual que los contactos excitatorios, los contactos inhibitorios no se encuentran maduros y esto hace que las corrientes evocadas en estas células sean menores que las evocadas en las células maduras. Sin embargo, la inhibición es además considerablemente más lenta que en las matGC. Una diferencia de unos pocos milisegundos hace que al momento del disparo del potencial de acción las 4wpiGC reciban un mayor balance excitación/inhibición que las matGC. Es decir que la carga excitatoria ya determina si la célula se va a activar o no, y la carga inhibitoria llega demasiado tarde como para compensarla. De este modo, la secuencia de maduración de los contactos aferentes habilita la existencia de una ventana de tiempo en la cual las GC nuevas son más susceptibles a ser activadas por estímulos aferentes. El hecho de que la activación de las 4wpiGC sea independiente de la inhibición, podría explicar por qué, a diferencia del resto de las neuronas del cerebro,

la inducción de LTP en estas células puede realizarse con los circuitos inhibitorios intactos (Ge et al. 2007). En el contexto del bajo umbral de activación aquí descripto, la plasticidad aumentada de las 4wpiGC proveería un modo eficiente de reforzamiento de los contactos aferentes sinápticos débiles que se activen repetidamente durante una ventana de tiempo de la maduración restringida.

El hecho de que la inhibición dendrítica no presente diferencias entre las 4wpiGC y las matGC indica que a las cuatro semanas de edad este tipo de inhibición ya alcanza características maduras. De forma contraria, la inhibición perisomática más lenta y menor en las 4wpiGC revela que este tipo de inhibición aún se encuentra inmadura y por ende coincide con las evidencias que indican que este tipo de inhibición comienza a establecerse entre la tercera y la cuarta semana de maduración (Espósito et al. 2005). Los experimentos demuestran que la lentitud de la corriente se debe a características propias de las sinapsis y no a un reclutamiento tardío de interneuronas. Por qué las sinapsis evocan corrientes más lentas aún queda por ser estudiado. Una posible causa, sería una expresión diferencial de subtipos específicos de receptores GABA_A en el soma durante el estadio inmaduro.

Cada vez son más las evidencias que demuestran que la inhibición perisomática cumple un papel fundamental en la determinación de la activación de las células principales (Roux & Buzsáki 2014; Pouille et al. 2013; Isaacson & Scanziani 2011). Se ha observado que la activación frente a un estímulo aferente depende en gran medida de la inhibición perisomática reclutada en forma feed-forward. Los tiempos de ocurrencia de la corriente inhibitoria reclutada por el estímulo en las matGC coincide con los tiempos de ocurrencia de la inhibición feed-forward reportados en la bibliografía (Pouille & Scanziani 2001; Pouille et al. 2009). En cambio, la ausencia de estas corrientes en rápidas en las 4wpiGC sugiere que la menor inhibición perisomática podría corresponder a una menor inhibición feed-forward específicamente. Este punto será abordado en la parte 3 de esta tesis.

Registros de la activación de las 4wpiGC *in vivo* no han sido posibles debido a limitaciones técnicas. Sin embargo, experimentos en los que se estudia la expresión de iEG sugieren una posible activación preferencial de las neuronas inmaduras en determinados tipos de comportamiento. Por ejemplo, Tashiro y col. Observaron una mayor expresión de c-Fos y Zif268 en GC de tres semanas de edad luego de la exploración de un ambiente (Tashiro et al. 2007). Sandoval y col. en cambio observaron una mayor expresión de Arc luego de la exploración espacial en GC de cuatro y seis semanas de edad (Sandoval et al. 2011). Por otra parte, también existen evidencias de la activación de las neuronas maduras (Trouche et al. 2009; Kee et al. 2007), sugiriendo

que tanto las matGC como las 4wpiGC cumplen una función en el procesamiento de información del DG. Nuestros datos muestran que en ausencia de inhibición las matGC alcanzan altos niveles de activación, y por ende sugieren que una modulación de los circuitos inhibitorios podría generar el reclutamiento preferencial de estas neuronas *in vivo*.

La actividad registrada con iEG así como la registrada electrofisiológicamente en el DG *in vivo* revelan que un porcentaje muy bajo de GC se activa frente a la exploración de un ambiente (Alme et al. 2010; Chawla et al. 2005; Tashiro et al. 2007; Jung & McNaughton 1993; Leutgeb et al. 2007). Este porcentaje, notablemente, es un porcentaje similar al de la tasa de neurogénesis adulta (Dayer et al. 2003; Cameron & McKay 2001). Algunos trabajos sugieren que la actividad registrada *in vivo* en el DG podría provenir en varios casos de las GC inmaduras (Leutgeb et al. 2007; Neunuebel & Knierim 2012). En el año 2012 Neunuebel y col. describieron a dos grupos de neuronas provenientes de la GCL que presentan actividad neuronal diferente. Por un lado, células que se ubican en la parte inferior de la GCL, que se activan en distintas regiones del campo exploratorio, que tienden a estar más activas durante la exploración y que representan un porcentaje pequeño del total; por otro lado, células que se ubican en la parte superior de la GCL, que se activan en una única región del espacio, que tienden a estar más silentes durante la exploración y que representan a la población mayoritaria de células detectadas. Los autores proponen que las primeras podrían corresponder a GC inmaduras y las segundas a GC maduras. Nuestros resultados apoyan esta hipótesis, dado que muestran que las 4wpiGC tienen bajos umbrales de activación y por ende podrían ser activadas con mayor facilidad por estímulos diversos. Este punto ha sido desarrollado en la parte 2 de esta tesis.

En conclusión, los datos revelados en esta parte de la tesis revelan que las 4wpiGC "escapan" de la inhibición del circuito y se reclutan preferencialmente frente a un estímulo aferente, indicando que podrían cumplir una función importante en el procesamiento de información del DG del hipocampo.

Figuras Resultados Parte 1

Figura R.1.1

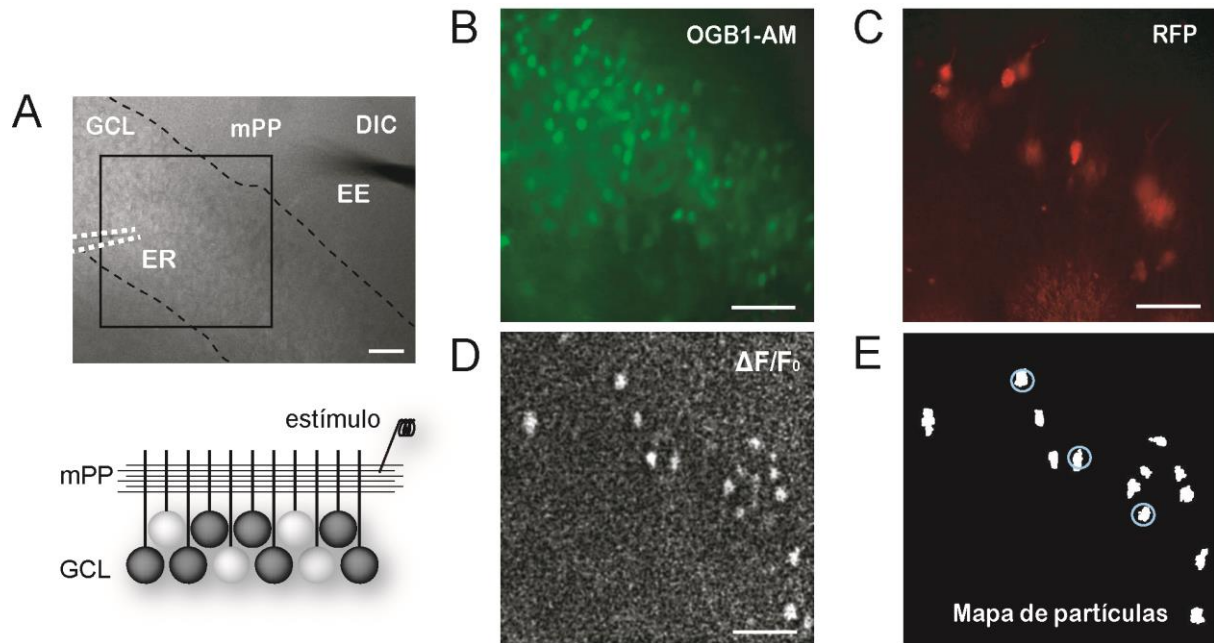


Figura R.1-1. Activación poblacional con imágenes de calcio. **A.** Imagen de DIC de una rodaja de hipocampo en la que se marca la capa de células granulares (GCL), el electrodo de estimulación (EE) colocado en la vía perforante medial (mPP) y un electrodo de registro extracelular (ER). El recuadro marca la región cargada con Oregon Green Bapta 1-AM correspondiente a las imágenes de B-E. Abajo: esquema del registro mostrando el electrodo de estimulación colocado en la vía perforante medial (mPP), la capa de células granulares (GCL) cargada con Oregon Green Bapta 1-AM con las células granulares activadas en blanco. **B.** Imagen de fluorescencia de la región de la capa de células granulares cargada con Oregon Green Bapta 1-AM (OGB1-AM) **C.** Imagen de fluorescencia de células granulares que expresan *Red Fluorescent Protein* (RFP) de 4 semanas de edad (4wpiGC). **D.** Imagen del aumento de la fluorescencia ($\Delta F/F_0$) de las neuronas que responden a la estimulación. **E.** Mapa de las neuronas que se activan frente a la estimulación. Los círculos azules indican la identidad RFP+. Barra de calibración: 50 μm .

Figura R.1.2

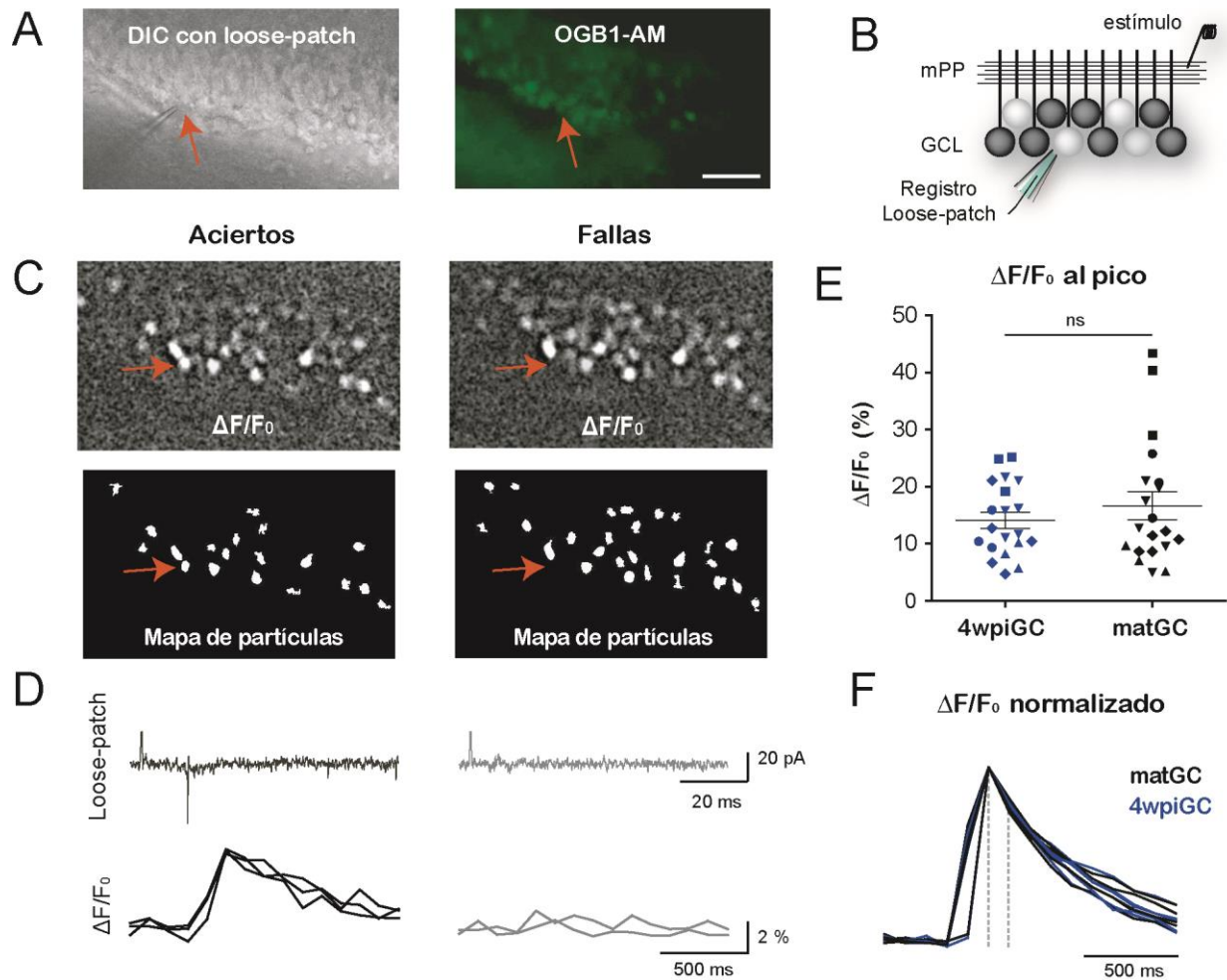


Figura R.1-2. Caracterización del aumento de fluorescencia de las imágenes de calcio. **A.** Izq.: Imagen de DIC de una rodaja de hipocampo señalando una célula granular registrada en loose-patch (flecha). Der.: imagen de fluorescencia del Oregon Green Bapta 1-AM (OGB1-AM) cargado en la rodaja. **B.** Esquema del registro mostrando el electrodo de estimulación colocado en la vía perforante medial (mPP), la capa de células granulares (GCL) cargada con OGB1-AM con las células granulares activadas en blanco, y el electrodo de registro de loose-patch. **C.** Imágenes del aumento de la fluorescencia respecto al basal ($\Delta F/F_0$, arriba) y mapa partículas (abajo) de las neuronas que responden a la estimulación, correspondientes a los aciertos (izquierda) o fallas (derecha) de evocación de potenciales de acción en la célula registrada en loose-patch. **D.** Trazos ejemplo de registros de loose-patch de la célula registrada (arriba), y trazos superpuestos de la variación de su $\Delta F/F_0$ en el tiempo (abajo), correspondientes al acierto o a la falla de evocación de un potencial de acción. **E.** Máximo $\Delta F/F_0$ ($\Delta F/F_0$ pico) en las 4wpiGC y las células matGC. Se muestra el promedio $\pm$ SEM y las células individuales. Los símbolos iguales corresponden a células de una misma rodaja. El $\Delta F/F_0$ pico no difiere entre 4wpiGC y matGC (ns, $p > 0,05$ prueba de t, $N = 20$ células para ambas GC). **F.** Variación del $\Delta F/F_0$ en el tiempo normalizada al $\Delta F/F_0$ pico para las 4wpiGC y las matGC ($N = 5$ células para ambas GC). Barra de calibración: 50 μm .

Figura R.1.3

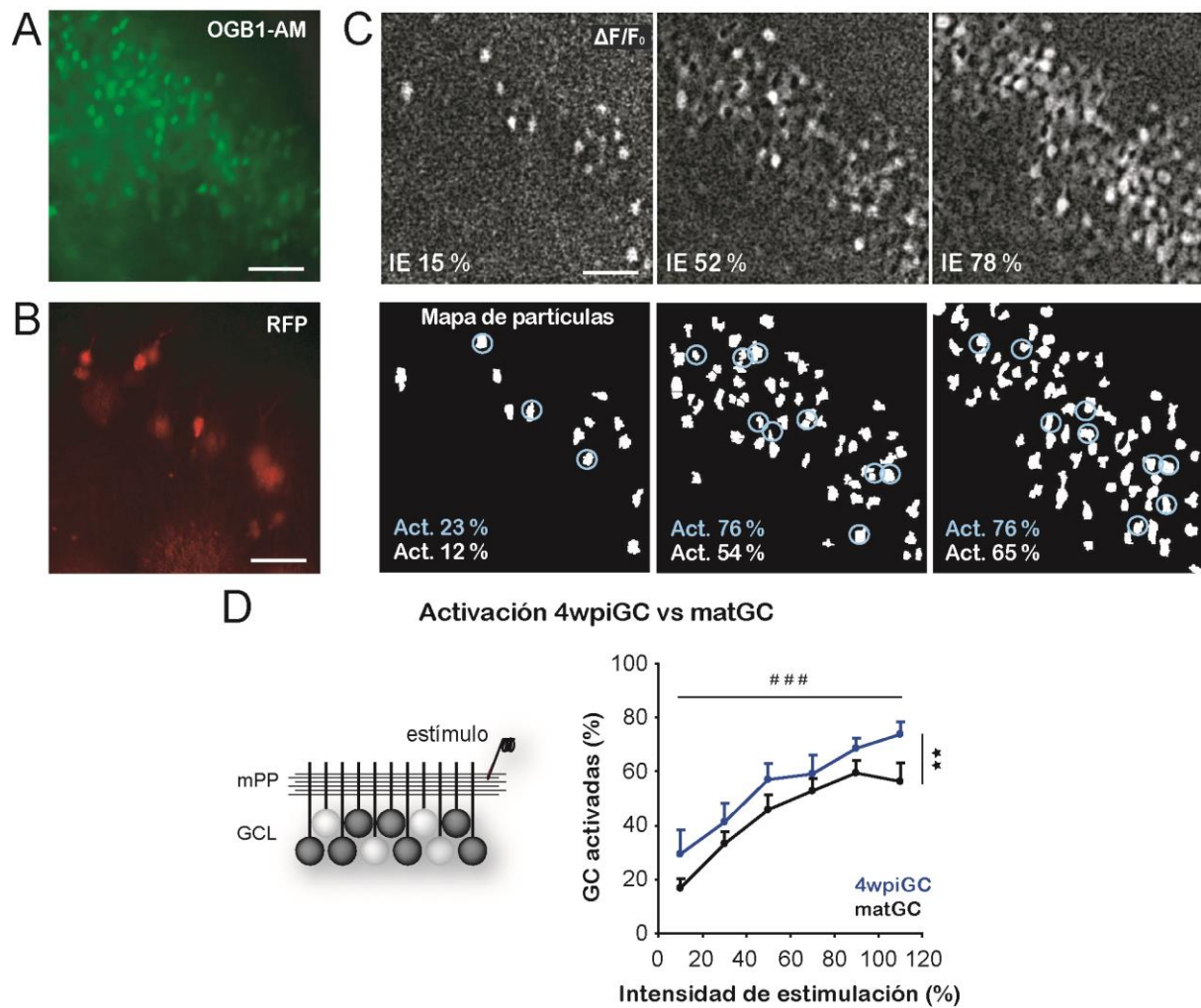


Figura R.1-3. Activación poblacional frente a la estimulación de la vía perforante medial con imágenes de calcio. A-C. Ejemplo de un experimento. **A.** Imagen de fluorescencia de la región de la capa de células granulares registrada cargada con Oregon Green Bapta 1-AM (OGB1-AM). **B.** Imagen de fluorescencia de células granulares de las 4wpiGC que expresan *Red Fluorescent Protein* (RFP). **C.** Imagen del aumento de la fluorescencia ($\Delta F/F_0$) (arriba) y mapas de partículas (abajo) de las neuronas que se activan con la estimulación a tres distintas intensidades (IE). Se indica el porcentaje de neuronas activadas en el ejemplo (Act.). En azul se indican las 4wpiGC. **D.** Izq.: Esquema del registro mostrando el electrodo de estimulación colocado en la vía perforante medial (mPP), la capa de células granulares (GCL) cargada con OGB1-AM y las células granulares activadas en blanco. Der.: Promedio $\pm$ SEM del porcentaje de 4wpiGC y matGC activadas a las distintas intensidades de estimulación (datos agrupados- binning- de a 20% de la intensidad de estimulación). El porcentaje activación aumenta con la intensidad de estimulación y es mayor en las 4wpiGC que en las matGC a todas las intensidades de estimulación (ANOVA de 2 vías. Variación entre GC: ** $p < 0,01$; variación entre intensidades: *** $p < 0,001$; interacción: ns, $p > 0,05$. $N(4wpiGC)$ = 4 a 14 rodajas por bin; $N(matGC)$ = 5 a 18 rodajas por bin). Barra de calibración: 50 μm .

Figura R.1-4

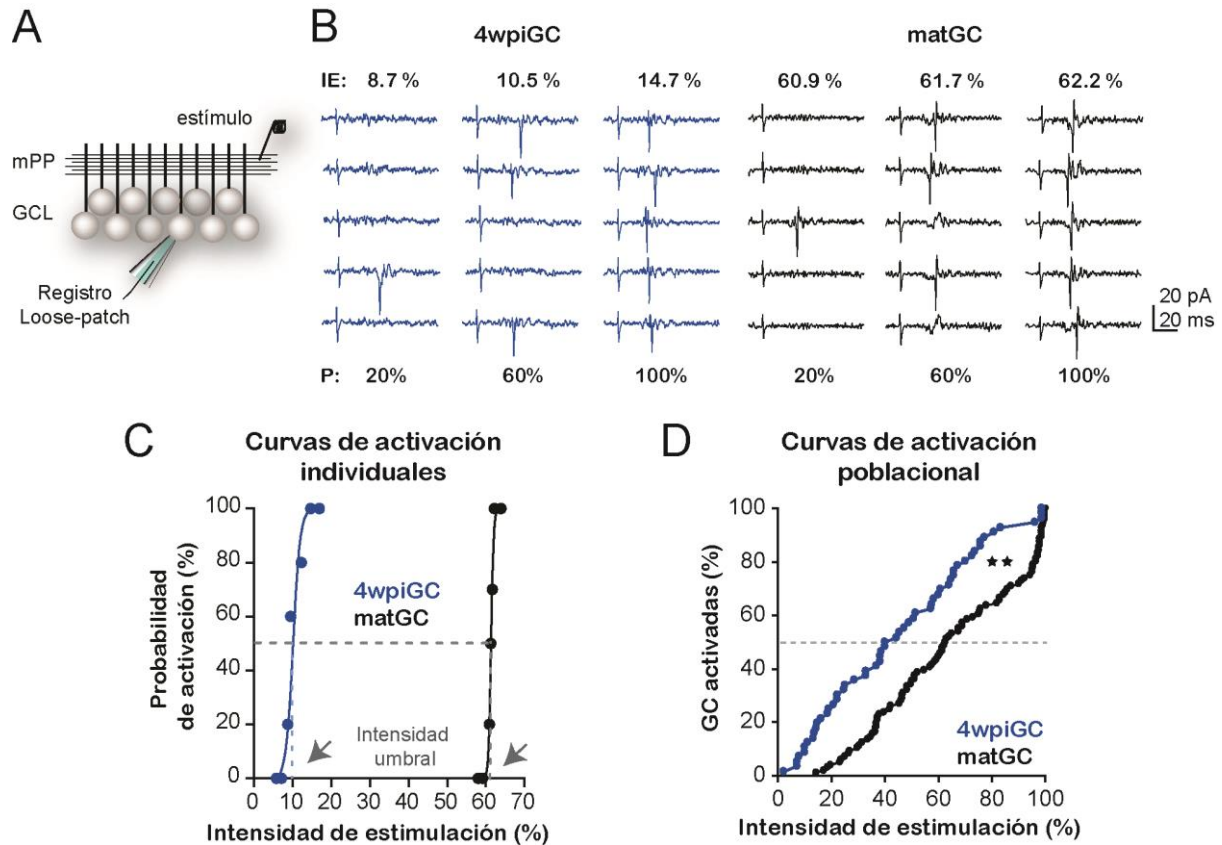


Figura R.1-4. Activación poblacional con registros de loose-patch. **A.** Esquema del registro mostrando el electrodo de estimulación colocado en la vía perforante medial (mPP), la capa de células granulares (GCL) y el electrodo de registro de loose-patch. **B.** Trazos de cinco ensayos de una 4wpiGC y una matGC a tres intensidades de estimulación (IE) que evocan potenciales de acción con una probabilidad (P) del 20%, 60% y 100%. **C.** Curvas de activación individuales de una 4wpiGC y una matGC, con ajuste sigmoideo (ver m&m3.4). A partir de las curvas se calcula la intensidad umbral (flechas). **D.** Frecuencia acumulada de las intensidades umbral de las células individuales para la población de 4wpiGC y de matGC. Las 4wpiGC se activan a intensidades menores que las matGC (** $p < 0,01$, prueba de Kolmogorov-Smirnov). La línea punteada señala el 50% de células activadas. $N(4wpiGC) = 56$ células; $N(matGC) = 96$ células. Experimentos realizados por Lucas Mongiat.

Figura R.1-5

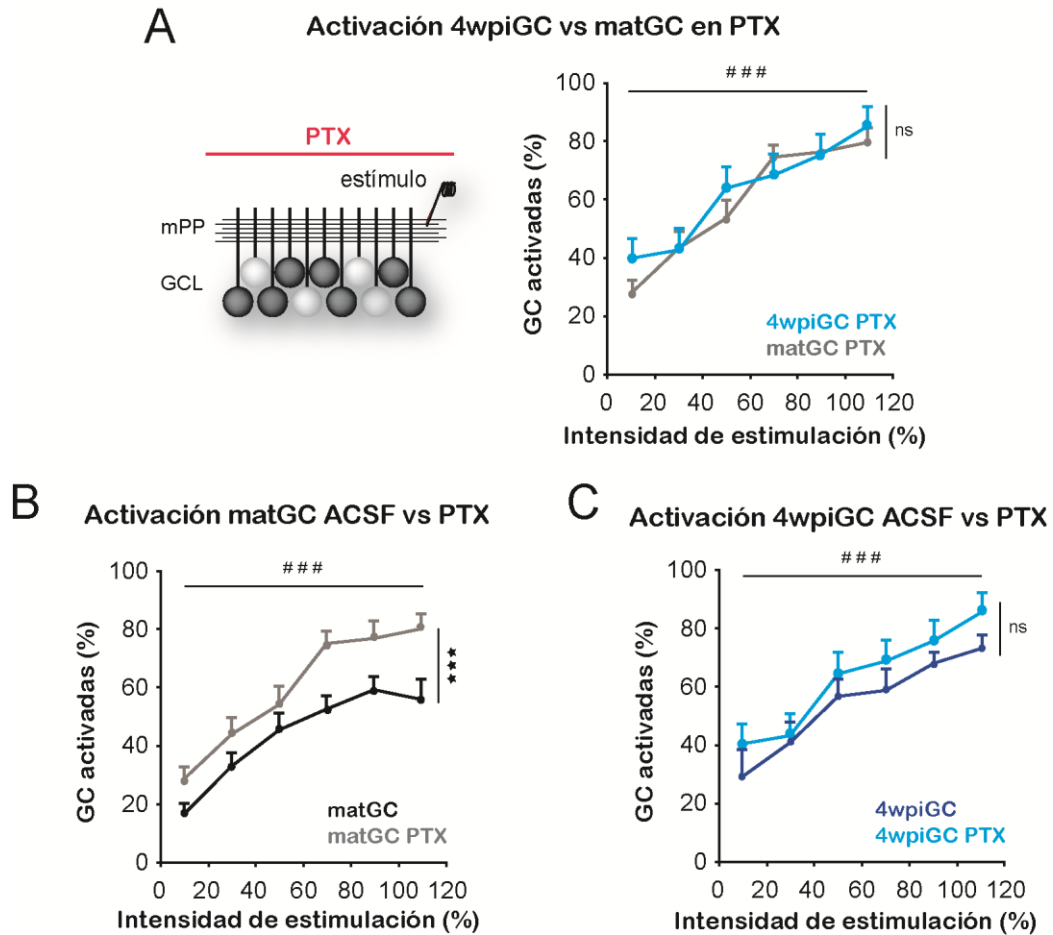


Figura R.1-5. Activación poblacional en ausencia de inhibición con imágenes de calcio. A. Izq.: Esquema del registro mostrando el electrodo de estimulación colocado en la vía perforante medial (mPP), la capa de células granulares (GCL) cargada con Oregon Green Bapta 1-AM (OGB1-AM), las células granulares activadas en blanco, y la aplicación de picrotoxina (PTX). Der.: Promedio entre rodajas $\pm$ SEM del porcentaje de 4wpiGC y matGC activadas a las distintas intensidades de estimulación en ausencia de inhibición (datos agrupados - binning- de a 20% de la intensidad de estimulación). El porcentaje activación en PTX aumenta con la intensidad de estimulación pero no difiere entre las 4wpiGC y las matGC a ninguna intensidad de estimulación (ANOVA de 2 vías. Variación entre GC: ns, $p>0,05$; variación entre intensidades: ### $p<0,001$; interacción: ns, $p>0,05$. N= 5 a 18 rodajas por bin para ambas GC). B. Comparación entre la activación de las matGC en ausencia (PTX) y en presencia de inhibición (ACSF). El bloqueo de la inhibición aumenta la activación de las matGC a todas las intensidades de estimulación (ANOVA de 2 vías. Variación entre tratamientos: *** $p<0,001$; variación entre intensidades: ### $p<0,001$; interacción: ns, $p>0,05$). C. Comparación entre la activación de las 4wpiGC en ausencia y en presencia de inhibición. El bloqueo de la inhibición no modifica la activación de las 4wpiGC a ninguna intensidad de estimulación (ANOVA de 2 vías. Variación entre tratamientos: ns, $p>0,05$; variación entre intensidades: ### $p<0,001$; interacción: ns, $p>0,05$).

Figura R.1-6

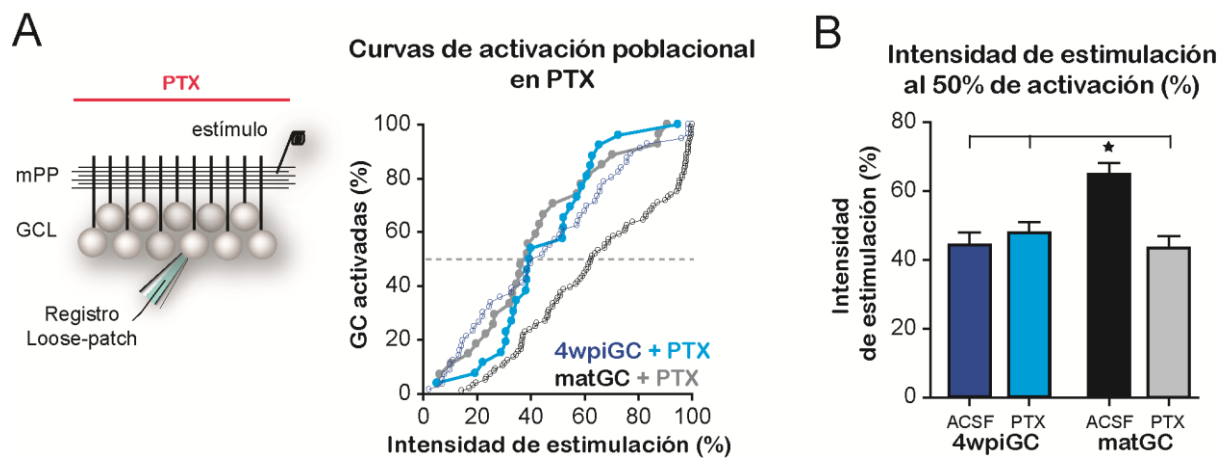


Figura R.1-6. Activación poblacional en ausencia de inhibición con registros de loose-patch. **A.** Izq.: Esquema del registro mostrando el electrodo de estimulación colocado en la vía perforante medial (mPP), la capa de células granulares (GCL) y el electrodo de registro de loose-patch, en ausencia de inhibición por la aplicación de picrotoxina (PTX). Der.: Frecuencia acumulada de las intensidades umbral de las células individuales para la población de 4wpiGC y de matGC registradas en ausencia de inhibición ($N(4wpiGC) = 26$ células; $N(matGC) = 27$ células). Se muestran las curvas con la inhibición intacta a modo de comparación. La línea punteada señala el 50% de células activadas. **B.** Intensidad del estímulo promedio con la cual se activa el 50% de las poblaciones en presencia o ausencia de inhibición. Se requiere una mayor intensidad de estimulación para activar el 50% de la población de las matGC en presencia de inhibición (ACSF) que en ausencia de inhibición (PTX), y que las 4wpiGC en ambas condiciones (* $p < 0,05$, ANOVA de una vía con prueba posterior de Bonferroni). Experimentos realizados por Lucas Mongiat.

Figura R.1-7

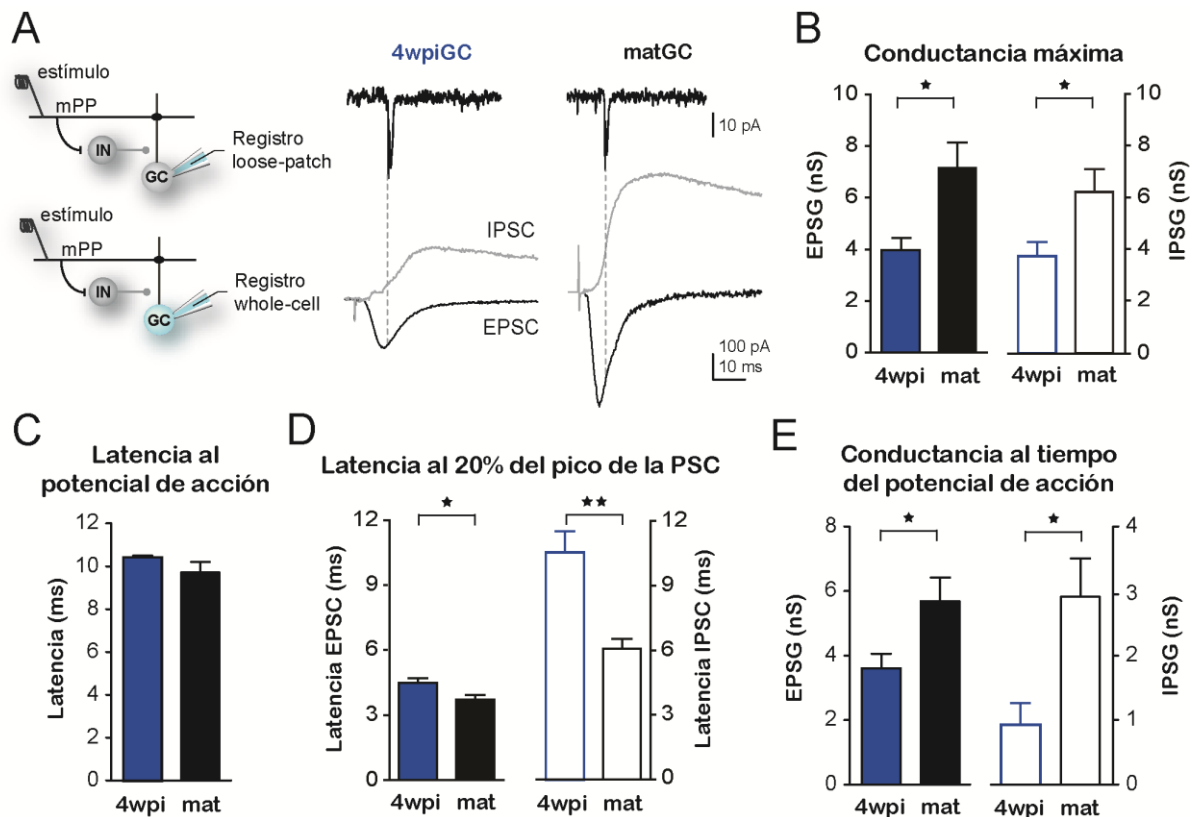


Figura R.1-7. Corrientes excitatorias e inhibitorias evocadas por el estímulo a intensidad umbral. **A.** Arriba: Registro en configuración loose-patch. Izq.: Esquema del registro mostrando el microcircuito reclutado por la estimulación de la mPP. En paralelo a las sinapsis excitatorias sobre las células granulares (GC), la estimulación de la vía perforante medial (mPP) recluta neuronas inhibitorias (IN) que luego hacen sinapsis inhibitorias sobre las células granulares- por ende la excitación evocada en las GC es directa y la inhibición es indirecta. Der.: Trazos ejemplo de un potencial de acción registrado a intensidad umbral en una 4wpiGC y una matGC. Abajo: Registro en configuración whole-cell de las GC anteriormente registradas en loose-patch. Izq.: Esquema del registro. Der.: Trazos ejemplo de las corrientes postsinápticas excitatorias (EPSC) y las corrientes postsinápticas inhibitorias (IPSC) evocadas en la 4wpiGC y la matGC del ejemplo a sus intensidades umbral. Los artefactos de estimulación de los trazos fueron borrados para facilitar la visualización. **B.** Conductancia postsináptica excitatoria (EPSC) máxima y conductancia postsináptica inhibitoria (IPSC) máxima evocadas en las 4wpiGC y las matGC. Se muestra el promedio $\pm$ SEM. La EPSC y la IPSC máximas son mayores en las matGC que en las 4wpiGC (* $p < 0,05$, prueba de t). **C.** La latencia del potencial de acción promedio $\pm$ SEM, medida desde el artefacto de estimulación, presenta valores similares en matGC y 4wpiGC. **D.** Latencia al 20% de la IPSC y la EPSC máximas en las 4wpiGC y las matGC. Se muestra el promedio $\pm$ SEM. Las corrientes evocadas en las 4wpiGC son más lentas que en las matGC (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, prueba de t). **E.** EPSC y IPSC calculadas al tiempo de ocurrencia del potencial de acción de cada célula en las 4wpiGC y las matGC. Se muestra el promedio $\pm$ SEM. Las matGC muestran mayores conductancias que las 4wpiGC (* $p < 0,05$, prueba de t) pero la relación excitación/inhibición es mayor en las 4wpiGC. (N= 4 células en todos los experimentos para ambas GC). Experimentos realizados por Lucas Mongiat.

Figura R.1-8

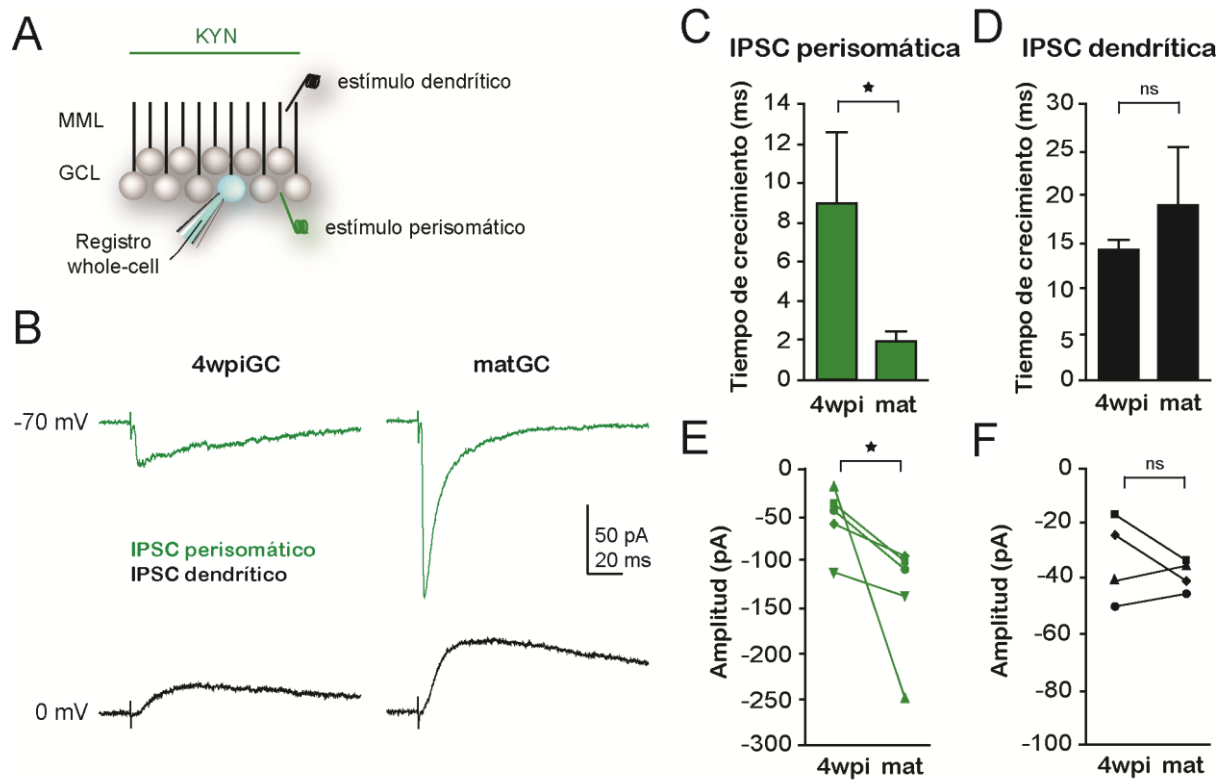


Figura R.1-8. Caracterización de las corrientes inhibitorias perisomáticas y dendríticas directas. **A.** Esquema del registro mostrando un electrodo de estimulación colocado en la capa molecular medial (MML) para estimular la inhibición dendrítica, un electrodo de estimulación colocado en la capa de células granulares (GCL) para estimular la inhibición perisomática y el electrodo de registro de whole-cell. La excitación se bloquea con ácido quinurénico (KYN). **B.** Trazos de la corriente IPSC perisomática registrada a -70 mV (arriba) y la IPSC dendrítica registrada a 0 mV (abajo) en una 4wpiGC y una matGC. Los artefactos de estimulación fueron borrados para facilitar la visualización. **C.** Tiempo de crecimiento promedio $\pm$ SEM de la IPSC perisomática evocada en las 4wpiGC y las matGC. La corriente perisomática es más lenta en las 4wpiGC que en las matGC (* $p < 0,05$, prueba de t, $N=6$ para ambas). **D.** El tiempo de crecimiento promedio $\pm$ SEM de la IPSC dendrítica evocada en las 4wpiGC y las matGC no presenta diferencias (ns, $p > 0,05$, prueba de t, $N=5$ para ambas). **E.** Amplitud máxima promedio $\pm$ SEM de la IPSC perisomática en 4wpiGC y matGC. Las IPSC perisomáticas son más amplias en las matGC que en las 4wpiGC (* $p < 0,05$, prueba de t pareada, $N=5$ para ambas). **F.** La amplitud máxima promedio $\pm$ SEM de la IPSC dendrítica en las 4wpiGC y las matGC no presenta diferencias significativas (ns, $p > 0,05$, prueba de t pareada, $N=4$ para ambas).

Parte 2: Capacidad de integración de inputs independientes de la vía perforante medial.

Introducción: Parte 2

Los resultados anteriores revelan que ante la llegada de un estímulo proveniente de la mPP las 4wpiGC se activan con mayor facilidad que las matGC. ¿Es esto válido para cualquier estímulo de la mPP? ¿Cómo es el reclutamiento de las GC frente a la activación de dos grupos de axones independientes de la misma vía? En esta parte de la tesis asumimos que distintos grupos independientes de axones de la mPP proveerán información proveniente de distintas fuentes, y por ende los llamamos “inputs” independientes. Los mayores niveles de actividad de las 4wpiGC podrían ser específicos del input o bien ocurrir frente a la estimulación con inputs diversos. El hecho de que los altos niveles de activación estén dados por una menor inhibición y no una mayor excitación, sugiere que las 4wpiGC tendrán mayores niveles de activación independientemente del input de la mPP que se estimule. La posibilidad de que una misma célula se active con inputs independientes implica que la célula tendrá la capacidad de integrar la información proveniente de ambos estímulos. De modo contrario, una célula que se recluta únicamente con un input estará restringida a procesar dicho input aisladamente, separando su información.

La actividad del DG *in vivo* es dispersa (Chawla et al. 2005; Tashiro et al. 2007; Alme et al. 2010). Se ha propuesto que distintos estímulos activan distintas poblaciones de GC, y esto conforma las bases mecánicas de la capacidad de separar patrones (O'Reilly & McClelland 1994). No obstante, algunos trabajos de registros *in vivo* de la actividad de las GC muestran que las mismas GC se activan en ambientes similares, sugiriendo que, contrariamente a los que se pensaba, distintos estímulos activan a una misma población de GC (Leutgeb et al. 2007). ¿Cómo se explican estas discrepancias? Como vemos en esta tesis, la población de GC del DG no es homogénea. Es posible que en distintas condiciones experimentales se detecte la actividad de distintas sub-poblaciones del GC; por ejemplo, en un caso la actividad de las matGC y en otro caso la actividad de las 4wpiGC. En esta parte de la tesis, estudiamos la capacidad de las GC inmaduras y maduras de ser activadas por dos inputs independientes de la mPP y la influencia de los

circuitos inhibitorios en determinar dicha capacidad. Los mayores niveles de activación de las 4wpiGC frente a la estimulación de un input nos conducen a proponer que las 4wpiGC tendrán una mayor probabilidad de ser activadas por dos estímulos independientes de la mPP que las matGC.

Resultados: Parte 2.1

Activación de las células granulares inmaduras y maduras frente a la estimulación de dos inputs independientes de la vía perforante medial e influencia de los circuitos inhibitorios

En esta serie de experimentos, realizamos rodajas agudas del hipocampo de ratones que habían sido inyectados cuatro semanas antes con el retrovirus conteniendo la secuencia CAG-RFP (ver m&m1) y colocamos en la MML dos electrodos monopolares distanciados por 100 μm , para estimular dos inputs independientes de la mPP con un pulso breve (Fig. R.2-1A). Estudiamos la activación de las GC frente a la estimulación con ambos electrodos mediante la adquisición de imágenes de calcio. Para ello, elegimos una región de la GCL con GC RFP+ que estuviese equidistante a los dos electrodos de estimulación y cargamos a las GC con el colorante sensible a Ca^{+} OGB1-AM (ver m&m2.1).

Antes de comenzar la secuencia de estimulación, verificamos que los electrodos no estuvieran estimulando a los mismos axones, es decir que los dos inputs fuesen independientes a lo largo del rango de intensidades utilizadas (Fig. R.2-1). Con tal fin, colocamos un electrodo de registro de campo extracelular en la región de la GCL equidistante a los dos electrodos y registramos la respuesta frente a la estimulación con un electrodo u el otro, y con ambos en simultáneo (Fig. R.2-1A-C). La pendiente del fEPSP es una medida de la cantidad de axones estimulados, por ende comparamos la suma de las pendientes de fEPSP obtenidos con cada input individualmente con la pendiente del fEPSP obtenida con ambos inputs activados a la vez. La relación 1:1 entre estos valores medidos a las distintas intensidades indica la independencia entre los inputs (Fig. R.2-1D). Por lo tanto, evitamos las intensidades de estimulación fuertes que provocan una disminución de la independencia, y descartamos los registros dónde la superposición de inputs superase el 30%.

A continuación estudiamos la activación de las GC frente a los dos inputs, estimulando la mPP con un electrodo o el otro, alternadamente, a distintas intensidades (Fig. R.2-2; ver m&m2.4). Así, obtuvimos mapas de partículas de las GC activadas con un electrodo y

mapas de partículas de las GC activadas con el otro electrodo (Fig. R.2-2D,E). Mediante la superposición de estos mapas a una misma intensidad revelamos qué neuronas se activan con ambos inputs. La superposición de estas imágenes con las imágenes de las GC RFP+ nos permite reconocer cuáles de la GC activadas corresponden a 4wpiGC. Las GC que se activan con ambos inputs, tienen la capacidad de integrarlos. Por lo tanto cuantificamos el porcentaje de GC activadas con los dos inputs como el “porcentaje de integración de inputs” (Fig. R.2-2F). Éste se calculó sobre el total de GC activadas a cada intensidad, dentro de cada población de 4wpiGC y matGC independientemente.

Los resultados muestran que el porcentaje de integración de inputs aumenta para las 4wpiGC y las matGC con la intensidad del estímulo (Fig. R.2-2F). Es decir que estímulos más fuertes pueden generar que una GC pase de tener una respuesta selectiva al input a tener la capacidad de integrar ambos estímulos. Notablemente, las 4wpiGC presentan un mayor porcentaje de integración de inputs que las matGC a todas las intensidades del estímulo estudiadas. Esto indica que un mayor porcentaje de 4wpiGC se activa con ambos inputs independientemente de la intensidad de estimulación utilizada. De este modo, las 4wpiGC son más integradoras de la información proveniente de distintos orígenes, mientras que las matGC son más selectivas pudiendo separar patrones de información.

El hecho de que las diferencias en los niveles de activación de las 4wpiGC y las matGC radiquen en la inhibición sugiere que también las diferencias observadas en los niveles de integración de inputs están generadas por la inhibición. Por ende, analizamos la contribución de la inhibición a la capacidad de integración de inputs de las 4wpiGC y las matGC (Fig. R.2-3). Para tal fin, estimulamos ambos inputs de la mPP a varias intensidades alternadamente en condiciones de bloqueo de la inhibición, aplicando PTX en el baño. Los mapas de partículas obtenidos a partir de las imágenes de calcio en esta situación, nos permiten calcular el porcentaje de integración de inputs de las 4wpiGC y las matGC en ausencia de inhibición (Fig. R.2-3A).

El porcentaje de integración de inputs de las matGC es significativamente mayor en ausencia de inhibición que en condiciones de inhibición intacta (Fig. R.2-3B). Esto indica que la inhibición le otorga selectividad de respuesta a las matGC. De manera contraria, el porcentaje de integración de inputs de las 4wpiGC no presenta diferencias en ausencia o en presencia de inhibición, probablemente debido a que la inhibición no afecta los niveles de activación de estas células (Fig. R.2-3C). Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con el porcentaje de activación frente a un input, la integración de inputs de las matGC es menor a la de las 4wpiGC aún en ausencia de inhibición (Fig. R.2-3A). Efectivamente, los circuitos inhibitorios generan diferencias en la capacidad de integración de inputs entre 4wpiGC y matGC, pero no representa el único mecanismo

subyacente. El mayor porcentaje de integración de inputs de las 4wpiGC podría deberse además a una mayor convergencia de los inputs excitatorios, pero este punto no ha sido abordado en esta tesis, por lo que requerirá mayor investigación.

Resultados: Parte 2.2

Variación de la integración de inputs con la maduración neuronal

La mayor integración de inputs observada en las 4wpiGC podría ser una característica permanente propia de las GC nacidas en el adulto o una característica transitoria, propia de las GC inmaduras. Al cabo de ocho semanas de su maduración, las GC nacidas en el adulto alcanzan propiedades fisiológicas indistinguibles de las propiedades de las GC nacidas durante el desarrollo embrionario (Laplagne et al. 2006). Por lo tanto, proponemos que la capacidad de integración de inputs varía con la maduración. Para poner a prueba esta hipótesis estudiamos la activación de GC nacidas en el adulto maduras de ocho semanas de edad (8wpiGC) frente a dos inputs independientes (Fig. R.2-4). En esta serie de experimentos, sacrificamos a los ratones ocho semanas luego de la inyección del retrovirus, de modo tal de que las GC marcadas con RFP fuesen 8wpiGC.

Al igual que en el experimento anterior, colocamos dos electrodos en la MML para estimular dos inputs independientes de la mPP y corroboramos la independencia de los inputs con registros electrofisiológicos de campo. Mediante imágenes de calcio estudiamos la capacidad de las 8wpiGC de ser activadas por ambos inputs a distintas intensidades de estimulación, y calculamos el porcentaje de integración de inputs de las 8wpiGC RFP+ a partir de los mapas de partículas (Fig. R.2-4). Los resultados revelan que las 8wpiGC presentan iguales porcentajes de integración de inputs que las neuronas maduras nacidas durante el desarrollo (Fig. R.2-4B). Asimismo, su capacidad de integración de inputs es menor que la de las 4wpiGC (Fig. R.2-4C). Esto indica que la capacidad de integración de inputs disminuye con la maduración de la neurona. Las GC nacidas en el adulto presentan una mayor integración de inputs únicamente en su estadio inmaduro, y al madurar modifican su respuesta al estímulo hacia una respuesta más selectiva.

Conclusiones: Parte 2

Los resultados de esta parte de la tesis revelan que un mayor porcentaje de 4wpiGC que de matGC se activa con dos input independientes de la mPP. Esto indica que las 4wpiGC tienen una mayor capacidad de integrar inputs independientes que las matGC, las cuales resultan más selectivas en su respuesta. La mayor capacidad de integración de inputs es una característica propia de las GC inmaduras, dado que las GC nacidas en el adulto de ocho semanas de edad presentan los mismos niveles de integración que las GC maduras nacidas durante el desarrollo. Por último, revelamos que las diferencias de integración de inputs entre las GC inmaduras y las GC maduras se debe parcialmente a diferencias en los circuitos inhibitorios, que únicamente afectan a las GC maduras.

Discusión: Parte 2

En esta parte de la tesis suponemos que grupos de axones independientes de la mPP proveerán al DG información proveniente de distintas fuentes. Un ejemplo de tal situación podría estar dado frente a la exploración de dos ambientes diferentes, de tal manera que cada ambiente provoque una activación diferente en las neuronas de la MEC que proyectan hacia el DG. Nuestros resultados revelan que las 4wpiGC pueden ser activadas con inputs independientes en mayor medida que las matGC. En la situación hipotética que planteamos aquí, los resultados sugieren que ante la exploración de dos ambientes diferentes las 4wpiGC podrían activarse en ambos ambientes, o bien activarse en diferentes locaciones de un mismo espacio, en cambio las matGC se activarían en locaciones específicas en un ambiente u otro.

En los últimos años algunos grupos han estudiado como la actividad de la EC y el hipocampo varían con la variación del ambiente. Leutgeb y col. registraron la variación de los patrones de activación de las células del DG con la modificación gradual de la forma del arena de exploración conocido como “morphing” (Leutgeb et al. 2007). La mayoría de las células que registraron presentaban locaciones de activación múltiples dentro del mapa, que variaban con el *morphing*. Sin embargo, las mismas células se activaban en los distintos ambientes, demostrando que un pequeño porcentaje de GC está preferencialmente activado por estímulos diferentes en el DG *in vivo*. En estos experimentos, así como en otros registros del DG realizados anteriormente (Jung &

McNaughton 1993), se hallaron además neuronas con menor actividad y una única locación de activación en el espacio. Años más tarde Neunuebel y col. describieron a estos dos grupos de neuronas en mayor detalle y sugirieron que las células con múltiples locaciones podrían corresponder a GC inmaduras, y las GC con activación específica a una única locación del espacio, a GC maduras (Neunuebel & Knierim 2012). Los resultados presentados en esta parte de la tesis revelan que inputs independientes activan a una mayor proporción de GC inmaduras que maduras. Esto significa que las GC inmaduras tienen una mayor capacidad de ser activadas por estímulos diferentes que las GC maduras. Por lo tanto, los resultados aquí presentados apoyan la hipótesis que sostiene que las GC mayormente registradas en condiciones de exploración espacial podrían corresponder a GC inmaduras.

Por otro lado, el hecho de que las 4wpiGC tengan una mayor capacidad de integración de inputs y las GC maduras una mayor capacidad de separar inputs, sugiere que ambas tienen una función diferente en el procesamiento de la información proveniente de diversos estímulos que arriban al DG. En su trabajo, Leutgeb y col. proponen que la activación de una misma célula frente a distintos ambientes podría aportar a la función de *pattern separation* del DG, debido a que cada ambiente está representado por un mapa espacial diferente. Estos resultados proponen un mecanismo diferente al propuesto anteriormente, donde el *pattern separation* es llevado a cabo por la activación de distintas células dispersas frente a distintos estímulos. Si consideramos la posibilidad de que las neuronas registradas en estos experimentos sean GC inmaduras, entonces podríamos plantear la posibilidad de que éstas sean las neuronas responsables de la función de *pattern separation*.

Recientemente, Nakashiba y col. estudiaron qué función cumplen las GC nuevas inmaduras - de hasta cuatro semanas de edad- en comparación con GC las maduras en la discriminación de ambientes similares (Nakashiba et al. 2012). Sus resultados revelan que las GC inmaduras son suficientes y necesarias para llevar a cabo la separación de patrones espaciales similares, en cambio las GC maduras son necesarias para completar patrones espaciales incompletos. De este modo, adjudican la función de *pattern separation* a las GC inmaduras y la función de *pattern completion* a las GC maduras. Este trabajo se complementa con trabajos anteriores que sugieren que la neurogénesis adulta contribuye a la separación de contextos y espacios similares (Clelland et al. 2009; Sahay, Scobie, et al. 2011; Sahay, Wilson, et al. 2011).

En el año 2006 Aimone col. propusieron una hipótesis en la cual que le adjudican a las neuronas nuevas un papel en establecer asociaciones de experiencias que ocurren cercanas en el tiempo (Aimone et al. 2006). Nuestros resultados confirman el supuesto

de esta hipótesis que plantea que al ser más excitables las GC inmaduras serían preferencialmente activadas por diversos estímulos que ocurrieran cercanos en el tiempo. En cambio estímulos que ocurrieran distanciados en el tiempo activarían al *pool* de GC que fuesen inmaduras al momento del estímulo, reclutando cada uno distintos grupos de GC. De este modo, Aimone col. propusieron que la activación diferencial de distintos grupos de GC por eventos cercanos o alejados en el tiempo podría constituir un sustrato mecanístico de la memoria temporal. Las evidencias de que las GC nacidas en el adulto se activan con diversos inputs de manera transitoria únicamente en el estadio inmaduro sugieren que tal mecanismo podría ocurrir. Cabe destacar en este contexto, que la renovación constante de los *pooles* de neuronas con características únicas podría proveerle al circuito una alta plasticidad.

La observación de que el bloqueo de la inhibición afecta a las neuronas maduras, convirtiéndolas en más integradoras revela que, además de generar una activación dispersa de las neuronas maduras, los circuitos inhibitorios evitan la superposición de las neuronas maduras que se activan frente a distintos estímulos. Experimentos donde se cuantifica la expresión de iEG luego de la exploración de ambientes diferentes, muestran que un mayor número de neuronas se activan con ambientes diferentes que con ambientes iguales (Alme et al. 2010; Chawla et al. 2005; Ramirez-Amaya et al. 2006). De este modo, proponen que distintos grupos de GC se activan frente a los distintos ambientes. Nuestros resultados sugieren que estos experimentos estarían revelando la activación de neuronas maduras. De este modo, tanto las 4wpiGC como las matGC podrían participar de la codificación de la información en el DG, pero ambas cumplirían funciones diferentes.

Nuestra hipótesis de una mayor integración de inputs por parte de las 4wpiGC se basó en los menores umbrales de activación de estas células, y en el hecho de que estos están determinados por una menor inhibición y no por una mayor excitación. Efectivamente, así como la inhibición no afecta los niveles de activación de las 4wpiGC frente a un pulso de estimulación, tampoco afecta sus niveles de integración de inputs independientes. No obstante, el hecho de que aún en ausencia de inhibición la integración de inputs de las 4wpiGC sea mayor a la de las matGC indica que la diferencia en la inhibición no es el único mecanismo responsable de las diferencias en integración de inputs. La mayor integración de inputs podría darse por una mayor convergencia de las aferencias excitatorias. Las 4wpiGC tienen una menor frecuencia de EPSC espontáneos (Mongiat et al. 2009), sin embargo es posible que las 4wpiGC tengan contactos sinápticos excitatorios con características inmaduras. Cabe aclarar que aún una pequeña EPSC es capaz de generar una despolarización grande y la activación de una 4wpiGC (Mongiat et al. 2009). Experimentos realizados recientemente por Mariela Trinchero en el

laboratorio revelan un mayor número de espinas dendríticas en las 4wpiGC en comparación con las matGC, sugiriendo que posiblemente las 4wpiGC tengan un mayor número de contactos excitatorios. Estos datos en conjunto con el hecho de que las 4wpiGC tienen menores umbrales de inducción de LTP (Ge et al. 2007) sugieren un mecanismo mediante el cual las neuronas nuevas podrían estar seleccionando y reforzando sus contactos aferentes.

En varios sistemas en desarrollo, inclusive el del DG, se ha descripto un proceso que se conoce con el nombre de “pruning”, en el cual neuronas en maduración establecen muchos contactos sinápticos, y luego refuerzan los que se activan perdiendo el resto, refinando su respuesta (Trommer et al. 1996; Garst-Orozco et al. 2014; Hata et al. 1999). La mayor integración de inputs transitoria en las GC inmaduras nacidas en el adulto, sugiere que las 4wpiGC podrían tener un mayor número de contactos que sufren un refinamiento hacia madurez. Recientemente, se ha demostrado que también las neuronas inmaduras nacidas en el adulto de cuatro semanas que migran hacia el bulbo olfatorio se activan con estímulos olfativos diversos y especifican su respuesta con la maduración, hacia las ocho semanas (Livneh et al. 2014). Por lo tanto, la mayor integración de inputs de las 4wpiGC aparenta ser una característica emergente de la propia secuencia de maduración de las neuronas en desarrollo.

En conclusión, los datos de esta parte de la tesis revelan que el DG comprende una población de GC que procesa estímulos independientes de modo diferente. Por un lado, la población mayoritaria, comprendida por las GC maduras, tiene una respuesta selectiva al input; por otro lado, la población minoritaria pero constantemente renovable es fácilmente activada con múltiples inputs, y por lo tanto tiene la capacidad de integrarlos. De este modo, la neurogénesis adulta, a través de la continua provisión de 4wpiGC, le estarían proveyendo al circuito del DG con capacidades de procesamiento únicas.

Figuras Resultados Parte 2

Figura R.2-1

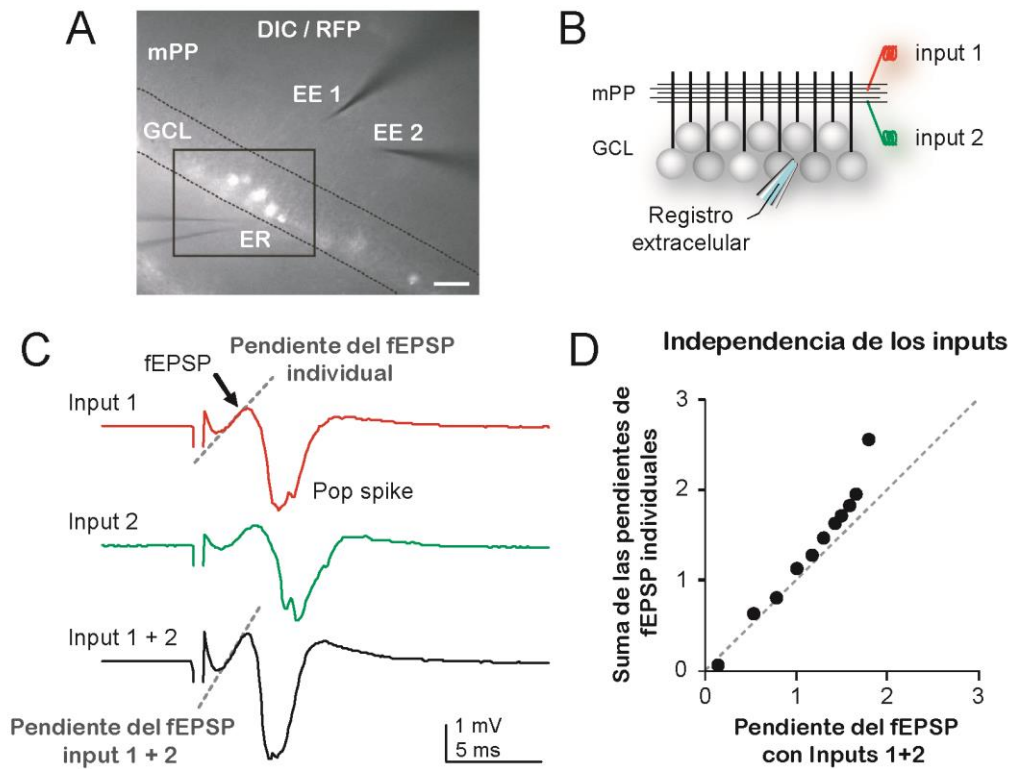


Figura R.2-1. Verificación de la independencia de los inputs de la vía perforante medial. **A.** Imagen de DIC de una rodaja de hipocampo en la que se marca la capa de células granulares (GCL), dos electrodos de estimulación (EE1 y EE2) colocados en la vía perforante medial (mPP) y un electrodo de registro extracelular (ER). El recuadro marca la región cargada con Oregon Green Bapta 1-AM con neuronas RFP+. **B.** Esquema del registro mostrando los electrodos de estimulación colocados para estimular dos inputs independientes de la vía perforante medial (mPP), la capa de células granulares (GCL) cargada con Oregon Green Bapta 1-AM y el electrodo de registro extracelular. **C.** Trazos del potencial de campo registrado en una rodaja en respuesta a la estimulación de la mPP con un electrodo u el otro (trazos rojo y verde), o con ambos a la vez (trazo negro). En línea punteada se indican las pendientes del potencial de campo postsináptico excitatorio (fEPSP) y se señala el *population spike* (pop spike). **D.** La relación entre la suma de las pendientes del fEPSP individuales y la pendiente del fEPSP evocada con ambos electrodos en simultáneo a distintas intensidades se aleja de 1:1 (línea punteada) a intensidades altas. Barra de calibración: 50 μ m.

Figura R.2-2

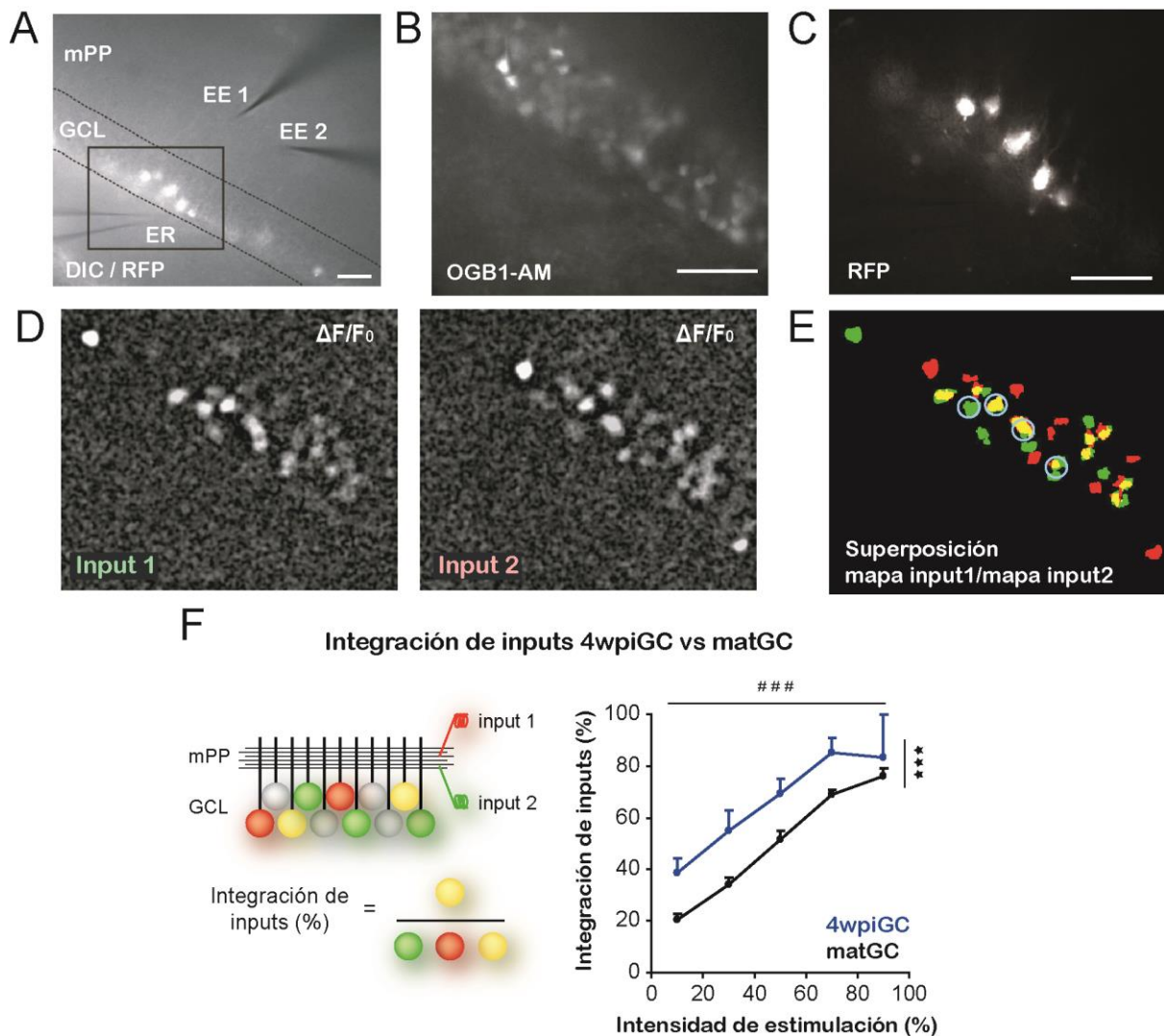


Figura R.2-2. Integración de inputs independientes de la vía perforante medial. **A.** Imagen de DIC de una rodaja de hipocampo en la que se marca la capa de células granulares (GCL), los dos electrodos de estimulación (EE1 y EE2) colocados en la vía perforante medial (mPP) y un electrodo de registro extracelular (ER). El recuadro marca la región cargada con Oregon Green Bapta 1-AM (OGB1-AM) con neuronas RFP+ del ejemplo en B-E. **B.** Imagen de fluorescencia de la región de la capa de células granulares cargada con OGB1-AM. **C.** Imagen de fluorescencia de células granulares 4wpiGC que expresan *Red fluorescent Protein* (RFP). **D.** Imágenes del aumento de la fluorescencia ($\Delta F/F_0$) de las neuronas que se activan frente a la estimulación con el electrodo 1 o con el electrodo 2 a una misma intensidad. **E.** Mapa de las neuronas que se activan frente a la estimulación con el electrodo uno únicamente (verde), con el electrodo 2 únicamente (rojo), o con el electrodo 1 y el electrodo 2 (amarillo). Los círculos azules indican la identidad RFP+. **F.** Izq.: Esquema del registro; fórmula de cálculo del porcentaje de integración de inputs: número de neuronas que se activan con un input u otro en verde o rojo y número de neuronas que se activan con ambos inputs en amarillo. Der.: Porcentaje de integración de inputs promedio $\pm$ SEM de las 4wpiGC y las matGC a distintas intensidades de estimulación. La integración de inputs aumenta con la intensidad de estimulación y es mayor en las 4wpiGC que en las matGC a todas las intensidades estudiadas (ANOVA de dos vías. Variación entre GC: *** $p < 0,001$; variación entre intensidades: ### $p < 0,001$; interacción: ns, $p > 0,05$. $N(4wpi) = 3$ a 16 rodajas por bin; $N(matGC) = 8$ a 34 rodajas por bin). Barra de calibración: 50 μ m.

Figura R.2-3

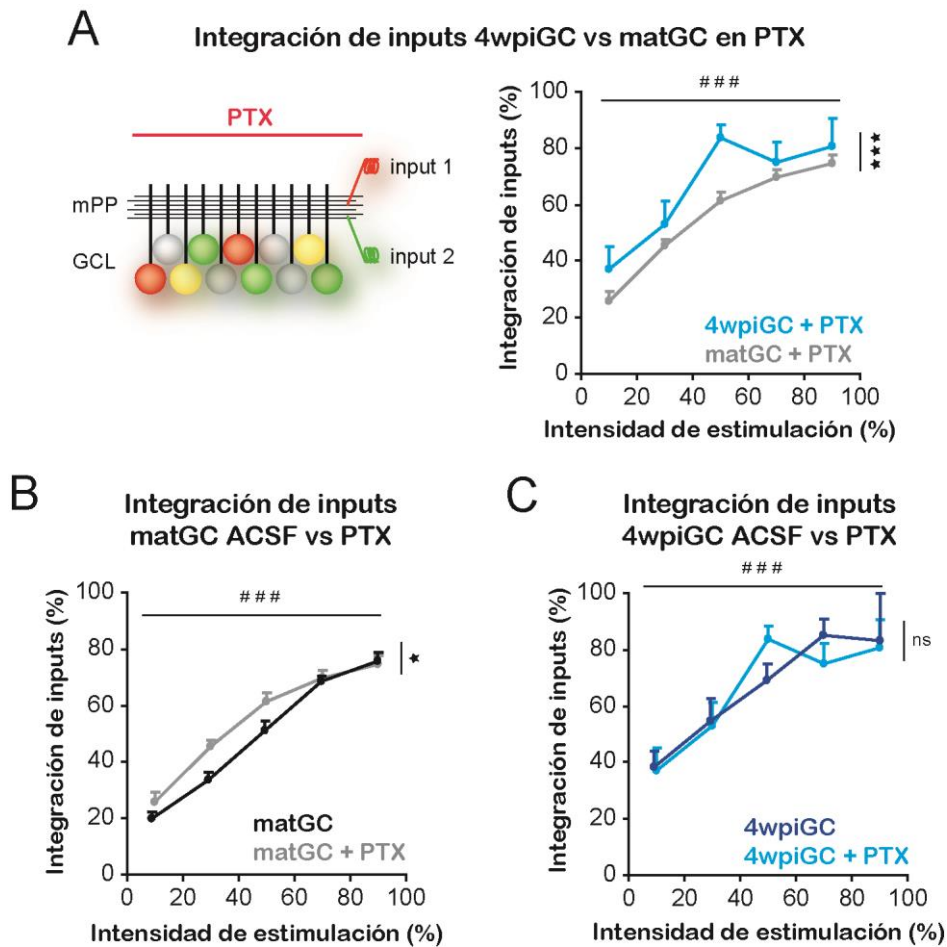


Figura R.2-3. Integración de inputs en ausencia de inhibición. **A.** Izq.: Esquema del registro mostrando los electrodos de estimulación en la vía perforante medial (mPP), la capa de células granulares (GCL) cargada con Oregon Green Bapta 1-AM y las neuronas que se activan con uno (verde o rojo) o ambos electrodos (amarillo); la inhibición se bloquea con picrotoxina (PTX). Der.: Porcentaje de integración de inputs promedio $\pm$ SEM de las 4wpiGC y las matGC a distintas intensidades de estimulación en ausencia de inhibición. La integración de inputs aumenta con la intensidad de estimulación y es mayor en las 4wpiGC que en las matGC a todas las intensidades estudiadas (ANOVA de dos vías. Variación entre GC: *** $p < 0,001$; variación entre intensidades: ## $p < 0,001$; interacción: ns, $p > 0,05$. $N(4wpi) = 3$ a 17 rodajas por bin; $N(matGC) = 11$ a 34 rodajas por bin). **B.** Comparación del porcentaje de integración de inputs promedio $\pm$ SEM de las matGC a distintas intensidades de estimulación en presencia (ACSF) y ausencia de inhibición (PTX). El bloqueo de la inhibición aumenta el porcentaje de integración de inputs de las matGC (ANOVA de dos vías. Variación entre tratamientos: * $p < 0,05$; variación entre intensidades: ### $p < 0,001$; interacción: ns, $p > 0,05$). **C.** Comparación del porcentaje de integración de inputs promedio $\pm$ SEM de las 4wpiGC a distintas intensidades de estimulación en presencia y ausencia de inhibición. El bloqueo de la inhibición no modifica el porcentaje de integración de inputs de las 4wpiGC (ANOVA de dos vías. Variación entre tratamientos: ns, $p > 0,05$; variación entre intensidades: ### $p < 0,001$; interacción: ns, $p > 0,05$).

Figura R.2-4

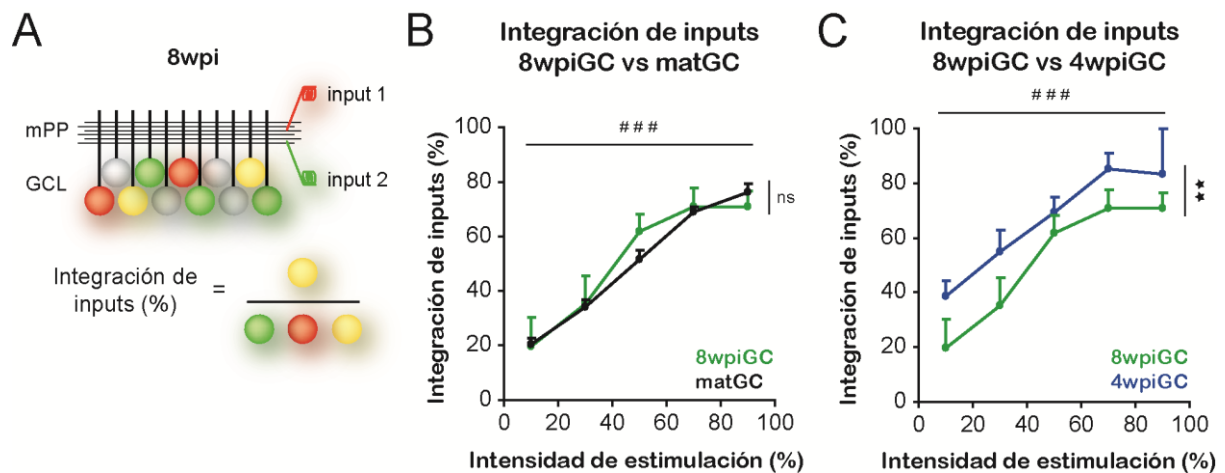


Figura R.2-4. Variación de la integración de inputs con la maduración. **A.** Esquema del registro mostrando los electrodos de estimulación en la vía perforante medial (mPP), la capa de células granulares (GCL) cargada con Oregon Green Bapta 1-AM y las neuronas que se activan con uno (verde o rojo) o ambos electrodos (amarillo), a ocho semanas luego de la inyección del retrovirus (8wpi). **B.** Porcentaje de integración de inputs promedio $\pm$ SEM de las GC de ocho semanas de edad (8wpiGC) y las matGC a distintas intensidades de estimulación. La integración de inputs aumenta con la intensidad de estimulación y no presenta diferencias entre las 8wpiGC y las matGC (ANOVA de dos vías. Variación entre GC: ns, $p > 0,05$; variación entre intensidades: *** $p < 0,001$; interacción: ns, $p > 0,05$. $N(8wpiGC) = 5$ a 13 rodajas por bin). **C.** Comparación del porcentaje de integración de inputs de las 8wpiGC y las 4wpiGC a distintas intensidades de estimulación. Las 4wpiGC presentan un mayor porcentaje de integración de inputs que las 8wpiGC a todas las intensidades de estimulación estudiadas (ANOVA de dos vías. Variación entre GC: ** $p < 0,01$; variación entre intensidades: *** $p < 0,001$; interacción: ns, $p > 0,05$).

Parte 3: Participación de las células granulares inmaduras en el procesamiento de estímulos complejos provenientes de la vía perforante medial

Introducción: Parte 3

Los resultados presentados en la *parte 1* muestran que un estímulo breve de la mPP recluta un mayor porcentaje de 4wpiGC que de matGC. ¿Cómo es la activación de las 4wpiGC y las matGC con estímulos de mayor complejidad temporal? La capa II de la MEC presenta *in vivo* oscilaciones gamma acopladas a oscilaciones theta (Chrobak & Buzsáki 1998). Las neuronas de esta región, que proyectan hacia el DG a través de la mPP, se activan en fase con estas oscilaciones. Así, los potenciales de acción registrados *in vivo* en la capa II de la MEC ocurren a frecuencias de 1 Hz a 50 Hz (Bonnievie et al. 2013; Hafting et al. 2005; Fyhn et al. 2004; Chrobak & Buzsáki 1998). Estos datos indicarían que los estímulos que contactan a las GC *in vivo* arriban en un orden temporal dentro de este rango de frecuencias. La estimulación de la mPP con trenes de pulsos a estas frecuencias representa, por lo tanto, una estimulación con significado fisiológico relevante.

Estímulos de distintas frecuencias pueden generar patrones de actividad diversos, ya sea debido a los fenómenos de sumación o depresión de la corrientes postsinápticas, o debido al reclutamiento dependiente de frecuencia de distintos componentes del circuito (Ito & Schuman 2008; Henze et al. 2002; Pouille & Scanziani 2004). Por ejemplo, frente a un pulso de estimulación la inhibición feed-forward reclutada puede ser lo suficientemente rápida como para afectar la activación de la célula, en cambio, la inhibición feed-back, al requerir la activación de las células principales, ocurrirá demasiado tarde (Roux & Buzsáki 2014). Sin embargo, si a un intervalo corto de tiempo arriba un nuevo estímulo, éste sí será afectado por la inhibición feed-back evocada con el pulso anterior. De este modo, los patrones de activación de las células dependen de la frecuencia de la estimulación.

En esta parte de la tesis estudiamos cómo distintas frecuencias de estimulación dentro del rango fisiológico activan a las 4wpiGC y las matGC. Asimismo, estudiamos cómo los perfiles de activación en estas condiciones son afectados por la inhibición, y analizamos los mecanismos sinápticos subyacentes, diseccionando específicamente la contribución de la

inhibición feed-forward y feed-back. Basados en los resultados anteriores, proponemos que las 4wpiGC procesan los estímulos en forma de trenes de modo diferente a las matGC, debido a las diferencias en la inhibición que reciben.

Resultados: Parte 3.1

Activación de las células granulares inmaduras y maduras frente a trenes de estimulación de la vía perforante medial e influencia de la inhibición.

Para estudiar la activación de las 4wpiGC y las matGC, inyectamos el retrovirus conteniendo la secuencia CAG-RFP o CAG-GFP en el hipocampo de ratones adultos, y luego de cuatro semanas realizamos rodajas agudas del hipocampo (ver m&m1). Colocamos un electrodo de estimulación en la MML y calibramos el estímulo registrando la respuesta extracelular de campo con un electrodo de registro en la GCL (ver m&m3.3). Durante el experimento, estimulamos la mPP al 50% del fEPSP con trenes de 10 pulsos a 1 Hz, 10 Hz, 20 Hz y 40 Hz, alternadamente, cinco ensayos con cada frecuencia (Fig. R.3-1, ver m&m3.5). Evaluamos la activación de las 4wpiGC RFP+ o GFP+ y de las matGC con registros de loose-patch, ya que ofrecen una buena resolución temporal.

De este modo, obtuvimos perfiles de la activación de cada 4wpiGC y cada matGC para las distintas frecuencias de estimulación (Fig. R.3-1B). La activación de las 4wpiGC y las matGC mostró variabilidad entre ensayos y entre células. De cada célula obtuvimos, para todas las frecuencias de estimulación, un promedio entre ensayos de los potenciales de acción evocados a cada pulso de estimulación. Cada pulso de estimulación evocó cero o un potenciales de acción, nunca más, por ende los valores promediados oscilan entre 0 y 1. Estos valores fueron promediados entre todas las 4wpiGC y todas las matGC, obteniendo un valor de activación promedio para cada pulso de estimulación de los trenes a las distintas frecuencias (Fig. R.3-1C).

Los resultados revelan que la activación de las 4wpiGC y las matGC disminuye a lo largo de los pulsos del tren, y esta disminución se acrecienta con la frecuencia de estimulación (Fig. R.3-1D). Además, las 4wpiGC muestran mayores niveles de activación que las matGC, que se hacen máximas al segundo pulso de estimulación con trenes de 10 Hz, 20 Hz y 40 Hz (Fig. R.3-1E). Estos datos reflejan que la estimulación de la mPP en forma de trenes a distintas frecuencias evoca perfiles de activación variables dentro de la población de GC.

Para comparar cuantitativamente la activación entre las 4wpiGC y las matGC, y entre las distintas frecuencias de estimulación, calculamos, para cada célula, el promedio entre ensayos de la suma de potenciales de acción evocados por un tren de estímulos (Fig. R.3-2). Así, 10 potenciales de acción es el máximo valor posible de la suma de potenciales de acción promedio de la población evocada por un tren de 10 pulsos de estimulación (Fig. R.3-2B). Los resultados indican que la activación de las GC disminuye drásticamente con la frecuencia. No obstante, las 4wpiGC se activan con un mayor número de potenciales de acción que las matGC a las cuatro frecuencias de estimulación estudiadas.

La estimulación a 1 Hz es una estimulación muy lenta y por ende representa una situación similar a la situación en la que estimulamos con un único pulso. Consistentemente, los valores de activación de las 4wpiGC y las matGC a 1 Hz representan una proporción similar a la obtenida en los experimentos de imágenes de calcio y en los experimentos de loose-patch con un único pulso al 50% de la intensidad de estimulación (ver Fig. R.1-3D y Fig. R.1-4D). La intensidad del 50% del fEPSP putativamente activa al 50% de la población de GC. Congruentemente, los valores de activación a 1 Hz de las matGC, que representan a la población mayoritaria, son cercanos al 50 % (~5 de 10 potenciales de acción en promedio, Fig. R.3-2A). Entre los 10 Hz y los 20 Hz se observa la mayor disminución de la activación de las 4wpiGC y las matGC. La disminución con la frecuencia es tal que a 40 Hz ninguna GC registrada disparó más de 2 potenciales de acción dentro del tren de 10 estímulos.

La diferencia de activación entre las 4wpiGC y las matGC ocurre a 1 Hz, 10 Hz, 20 Hz y 40 Hz. Los estímulos a 1 Hz y 10 Hz activan a las 4wpiGC en una proporción de un tercio mayor que a las matGC. Los estímulos a 20 Hz, por otro lado, evocan el doble de potenciales de acción en una 4wpiGC que en una matGC. Aun considerando que la activación a 40 Hz es muy baja, la diferencia entre las 4wpiGC y las matGC es notable: frente a un estímulo de 40 Hz, el promedio de disparo de potenciales de acción de las 4wpiGC es cercano a dos, mientras que el promedio de disparo de potenciales de acción de las matGC es cercano a uno. Esto indica que las 4wpiGC en promedio son capaces de reproducir la frecuencia de estimulación mediante su activación con dos potenciales de acción separados por 25 ms. Contrariamente, al activarse en promedio con un único potencial de acción, las matGC fallan en disparar potenciales de acción a 40 Hz.

La capacidad de las GC de disparar potenciales de acción a la frecuencia dada por la estimulación representa la capacidad de re-transmitir la información temporal del estímulo a sus células blanco. Para analizar este aspecto, calculamos la eficiencia de reproducir la frecuencia de estimulación. Esta fue calculada como el promedio de la probabilidad de ocurrencia de potenciales de acción a un intervalo de igual frecuencia

que el dado por el estímulo (ver m&m3.5). De este modo una GC que dispare 5 potenciales de acción seguidos en respuesta al tren de 10 pulsos, tendrá una eficiencia de 4/9 (4 intervalos representados de los 9 intervalos del tren), mientras que una GC que dispare 5 potenciales de acción discontinuos, y nunca dos continuos, tendrá una eficiencia de 0/9.

Los resultados muestran que las 4wpiGC presentan una mayor eficiencia de reproducir las frecuencias de estimulación que las matGC a todas las frecuencias estudiadas (Fig. R.3-2C). Esto significa que las 4wpiGC tienen una mayor capacidad que las matGC de transmitir la información temporal de estímulos de 1 Hz, 10 Hz, 20 Hz y 40 Hz a sus células blanco. Sin embargo, la eficiencia de reproducir el intervalo de estimulación disminuye notablemente con la frecuencia tanto en las 4wpiGC como en las matGC, revelando que ambas actúan como filtros pasa bajos.

La disminución de la activación frente a trenes de frecuencia creciente podría deberse a las características de circuito o simplemente a restricciones fisiológicas intrínsecas de las GC. Por lo tanto, realizamos una serie de experimentos para estudiar la capacidad intrínseca de las 4wpiGC y las matGC de disparar potenciales de acción a distintas frecuencias (Fig. R.3-3). Realizamos registros de whole-cell en 4wpiGC y matGC utilizando una solución interna de gluconato de K^+ , bloqueando las sinapsis excitatorias e inhibitorias (con ácido quinurénico y picrotoxina, respectivamente; ver m&m3.9). En lugar de estimular la mPP, la célula registrada fue estimulada directamente en *I-clamp* con trenes de pulsos cuadrados de corriente, a una amplitud tal que 10 pulsos a 1 Hz evocasen 10 potenciales de acción (Fig. R.3-3A). Incrementamos la frecuencia de los pulsos cuadrados cada 20 Hz hasta la ocurrencia de fallas. Todas las GC comenzaron a fallar a frecuencias cercanas a los 100 Hz, es decir, tanto las 4wpiGC como las matGC dispararon consistentemente 10 potenciales de acción a 20 Hz y 40 Hz (Fig. R.3-3B,C). Estos resultados indican que la disminución de la activación con la frecuencia de estimulación no se debe a una incapacidad intrínseca de las GC sino a propiedades del circuito.

A continuación, estudiamos qué componentes del circuito afectan los perfiles de activación frente a la estimulación en forma de trenes. Los resultados obtenidos en condiciones de estimulación de la mPP con un único pulso sugieren que los perfiles de activación frente a trenes pueden estar afectados por la inhibición. De este modo evaluamos la influencia de la inhibición estimulando la mPP al 50% del fEPSP con trenes de pulsos a 1 Hz, 10 Hz, 20 Hz y 40 Hz, y registrando la activación de las GC con registros de loose-patch en ausencia de inhibición, por la aplicación de PTX en el baño de perfusión (Fig. R.3-4).

Notablemente, en ausencia de inhibición las diferencias de activación entre las 4wpiGC y las matGC, y las diferencias entre las frecuencias, se diluyen (Fig. R.3-4A). Tal como ocurre frente a un pulso único de estimulación, en ausencia de inhibición no hay diferencias entre la activación de las 4wpiGC y las matGC a ninguna frecuencia de estimulación. Los niveles de activación de las matGC en ausencia de inhibición aumentan respecto a las condiciones control, de modo que alcanzan los niveles de activación de las 4wpiGC. Este aumento se observa con todas las frecuencias de estimulación (Fig. R.3-4B).

Al igual que con un único pulso de estimulación los niveles de activación de las 4wpiGC a 1 Hz no se ven alterados por el bloqueo de la inhibición (Fig. R.3-4C). Curiosamente, tampoco se afecta la activación frente a los estímulos de 10 Hz. Sin embargo, la activación de las 4wpiGC está limitada por la inhibición a 20 Hz y a 40 Hz, dado que aumenta en presencia de PTX en comparación con las condiciones control. El aumento de la activación en ausencia de inhibición de las GC a 20 Hz y 40 Hz provoca una disminución en la diferencia de activación entre las frecuencias en las 4wpiGC y las matGC (Fig. R.3-4A). Sin embargo, aún en ausencia de inhibición, la activación de las GC disminuye levemente con la frecuencia de estimulación.

Estos resultados revelan que los circuitos inhibitorios generan variabilidad de respuesta en la población de GC, dado que son los responsables de las diferencias de activación entre las 4wpiGC y las matGC, y las diferencias de activación principales entre frecuencias de estimulación.

Resultados: Parte 3.2

Mecanismo sináptico que genera las diferencias en la activación evocada por trenes de estimulación

Los resultados expuestos revelan una función importante de la inhibición en generar diferencias de activación entre las 4wpiGC y las matGC frente a estímulos en forma de trenes. Para estudiar de qué modo la inhibición reclutada afecta los perfiles de activación de las 4wpiGC y las matGC a las distintas frecuencias de estimulación, estudiamos las corrientes excitatorias e inhibitorias subyacentes a la activación frente a los trenes de estimulación de distintas frecuencias.

Para ello, colocamos un electrodo de estimulación en la MML y calibramos el estímulo registrando la respuesta extracelular de campo con un electrodo de registro en la GCL (ver m&m3.3). Durante el experimento, estimulamos la mPP al 50% del fEPSP con trenes de 10 pulsos a 1 Hz, 10 Hz, 20 Hz y 40 Hz, alternadamente. Registramos las EPSC y las IPSC evocadas en las 4wpiGC y las matGC en modo whole-cell, utilizando una solución interna con Cs⁺; la EPSC fue registrada al potencial de reversión de la IPSC, y viceversa (Fig. R.3-5A,B; ver m&m3.6).

Tal como se observa en los trazos, al igual que con la estimulación con un pulso, la estimulación con trenes de pulsos evoca EPSC y IPSC de mayor amplitud en las matGC que en las 4wpiGC a las cuatro frecuencias de estimulación (Fig. R.3-5A,B). Mediciones de la cinética de la IPSC evocada con el primer pulso del tren de 1 Hz muestran que, al igual que las IPSC registradas a la intensidad umbral, las IPSC evocadas por un estímulo del 50% del fEPSP en las 4wpiGC tienen un crecimiento más lento que las evocadas en las matGC- medido como la latencia al 20% del pico de la corriente (Fig. R.3-5C). En este caso además, observamos que las IPSC de 4wpiGC tienen un decaimiento más lento que las IPSC de las matGC.

Con la finalidad de evaluar la contribución de las IPSC y las EPSC a la activación de las GC buscamos analizar la IPSG y la EPSG a un tiempo cercano a la generación de un potencial de acción. La comparación de las latencias de los potenciales de acción y de los picos de las EPSC muestran que estos ocurren a tiempos cercanos (Fig. R.3-5D). Por lo tanto cuantificamos la EPSG pico y la IPSG al pico de la EPSC a cada uno de los pulsos de los trenes de estimulación a las distintas frecuencias, para las 4wpiGC y las matGC (Fig. R.3-6). Notoriamente, las EPSG muestran perfiles análogos a los de la activación de las GC, en cambio las IPSG muestran perfiles opuestos, tanto en las 4wpiGC como en las matGC (Fig. R.3-6B,C; ver Fig. R.3-1C). Es decir, las EPSG deprimen con los pulsos de estimulación y su depresión aumenta con la frecuencia. De manera contraria, las IPSG deprimen levemente a 1 Hz pero a 10 Hz, 20 Hz y 40 Hz, se suman y aumentan cada vez más con la frecuencia. Estos datos muestran que la disminución de activación de las GC a los largo de los pulsos del tren a 10 Hz, 20 Hz y 40 Hz se debe al aumento de la inhibición y a la disminución de la excitación.

Para realizar comparaciones cuantitativas entre las corrientes evocadas en las 4wpiGC y las matGC a las distintas frecuencias, calculamos la suma de las EPSG pico, y la suma de las IPSG al pico de la EPSC, de los 10 pulsos del tren para cada frecuencia. De este modo obtuvimos un único valor de EPSG y un único valor de IPSG para las corrientes evocadas en las 4wpiGC y en las matGC a 1 Hz, 10 Hz, 20 Hz y 40 Hz (Fig. R.3-7). Estos datos muestran que la inhibición total reclutada en las 4wpiGC y en las matGC aumenta enormemente con la frecuencia (Fig. R.3-7B). La excitación total, de modo contrario,

disminuye, aunque en menor magnitud. Esta leve disminución de la excitación total con la frecuencia explica la leve disminución de la activación total observada en condiciones de bloqueo de la inhibición (ver Fig. R.3-4A). Por otro lado, el gran aumento de inhibición total con la frecuencia explica las grandes diferencias de activación total encontradas entre frecuencias en las condiciones en las cuales el circuito está intacto (ver Fig. R.3-2B). Resulta interesante el hecho de que la inhibición crece mucho particularmente a 20 Hz y a 40 Hz, y esto coincide con la mayor disminución de la activación de las GC.

Al comparar las EPSG y las IPSG totales entre las 4wpiGC y las matGC, tal como hemos mencionado, ambas son mayores en las matGC para todas las frecuencias estudiadas (Fig. R.3-7B). Sin embargo, al igual que con un pulso de estimulación, la relación entre la excitación y la inhibición es mayor en las 4wpiGC que en las matGC (Fig. R.3-7C). A 1 Hz el balance excitación/inhibición de las 4wpiGC es aproximadamente 4:1, en cambio el balance de las matGC es aproximadamente 2:1. Estas relaciones coinciden con las observadas con un pulso de estimulación a la intensidad umbral de la célula (ver Fig. R.1-7E). A 10 Hz el balance excitación/inhibición de las 4wpiGC es 2:1, mientras que el balance de las matGC es 3:2 (Fig. R.3-7C).

A 20 Hz y a 40 Hz la suma de la EPSG y la IPSG total presentan un balance similar en las 4wpiGC y las matGC. Sin embargo, a estas frecuencias la inhibición crece tanto que la suma de la conductancia de todos los pulsos no resulta el mejor parámetro para comparar el efecto de las corrientes entre las 4wpiGC y las matGC. De hecho, en los últimos pulsos del tren ninguna GC dispara potenciales de acción a 20 Hz y 40 Hz, con lo cual las diferencias en activación entre 4wpiGC y matGC a estas frecuencias radican en diferencias de las corrientes evocadas con los primeros pulsos del tren (ver Fig. R.3-1C). Analizando las conductancias evocadas a 20 Hz y a 40 Hz pulso a pulso, observamos que efectivamente existe una mayor relación excitación/inhibición en las 4wpiGC en comparación a las matGC, en los primeros pulsos del tren y no en los últimos (Fig. R.3-8). El gran aumento de la inhibición a 20 Hz y 40 Hz en los pulsos tardíos del tren de las 4wpiGC puede explicarse por la caída lenta de la IPSC (Fig. R.3-5C) y explica por qué la activación de las 4wpiGC no depende de la inhibición a 1 Hz y 10 Hz, pero sí se ve afectada por ella a 20 y 40 Hz (ver Fig. R.3-4C). Estos resultados revelan que, al igual que con un pulso de estimulación, la mayor activación de las 4wpiGC en comparación a las matGC frente a la estimulación en forma de trenes radica en su mayor balance excitación/inhibición.

Habiendo determinado que la inhibición genera las diferencias de activación entre las 4wpiGC y las matGC, a continuación estudiamos qué componentes del circuito inhibitorio son los responsables de estas diferencias. Tal como hemos mencionado, asumimos que frente a la estimulación en forma de trenes los circuitos de inhibición

feed-forward y feed-back pueden afectar de modo diferente la activación a distintas frecuencias entre las 4wpiGC y las matGC. Por lo tanto, estudiamos la contribución específica de los componentes de inhibición feed-forward y feed-back a la inhibición total reclutada con los trenes de estimulación (Fig. R.3-9). En los experimentos de registros de las EPSC y IPSC evocadas por trenes de estimulación de la mPP, luego de registrar la IPSC total, colocamos en el baño de perfusión DCG4, un agonista de los receptores metabotrópicos de glutamato tipo II que inhibe las sinapsis de las fibras *mossy* (Kamiya et al. 1996) (ver m&m3.8). De este modo, registramos la IPSC remanente, correspondiente a la inhibición feed-forward (IPSC-FF), evocada por trenes de pulsos de estimulación a 1 Hz, 10 Hz, 20 Hz y 40 Hz (Fig. R.3-9A). La contribución de la inhibición feed-back (IPSC-FB) se calculó *off-line* a partir de la sustracción de la IPSC-FF a la IPSC total.

La cuantificación de la cinética de la IPSC-FF y la IPSC-FB reclutadas por el primer pulso de estimulación a 1 Hz revela que la IPSC-FF es más lenta en las 4wpiGC que en las matGC (Fig. R.3-9B). De manera contraria, la IPSC-FB no muestra diferencias significativas. Nótese que la IPSC-FB se recluta luego de la IPSC-FF y luego del pico de la EPSC (Fig. R.3-9B; ver Figura R3-5D).

Para comprar la IPSC-FF y la IPSC-FB entre las 4wpiGC y las matGC, calculamos, al igual que con la IPSC total, la suma de los 10 pulsos de estimulación de las IPSC-FF y las IPSC-FB al pico de la EPSC a 1 Hz, 10 Hz, 20 Hz y 40 Hz (Fig. R.3-9C). Interesantemente, los resultados revelan diferencias entre las 4wpiGC y las matGC únicamente en la IPSC-FF, que resulta mayor en las matGC a las cuatro frecuencias de estimulación estudiadas. Sin embargo, la IPSC-FB no difiere entre las 4wpiGC y las matGC en ningún caso. Estos resultados indican que las diferencias de reclutamiento frente a trenes de estimulación entre las 4wpiGC y las matGC están dictadas por la inhibición de tipo feed-forward específicamente, debido a que la IPSC-FF es más lenta en las 4wpiGC en comparación a las matGC. No obstante, tanto la IPSC-FB como la IPSC-FF aumentan con la frecuencia, indicando que ambas contribuyen a generar diferencias en la activación entre frecuencias.

Conclusiones: Parte 3

En esta parte de la tesis revelamos que la estimulación de la mPP con estímulos en forma de trenes de frecuencias relevantes a nivel fisiológico evoca mayores niveles de

activación en las 4wpiGC que en las matGC, y estas diferencias están gobernadas por los circuitos inhibitorios. Asimismo, las 4wpiGC son más eficientes en reproducir la frecuencia de estimulación en su perfil de activación. Sin embargo, la activación de las 4wpiGC y las matGC disminuye drásticamente con la frecuencia indicando que ambas GC filtran las frecuencias altas. La disminución de la activación con la frecuencia se debe principalmente al aumento de la inhibición feed-forward y feed-back reclutada por la estimulación a lo largo de los pulsos del tren. Las diferencias en la activación entre 4wpiGC y matGC se deben a diferencias en la inhibición feed-forward exclusivamente, que es menor y más lenta en las 4wpiGC. Los circuitos inhibitorios generan una disminución de la activación de las matGC a las cuatro frecuencias de estimulación estudiadas, en cambio afectan a las 4wpiGC únicamente a las frecuencias altas. De este modo, los circuitos inhibitorios reclutados con estímulos a distintas frecuencias generan gran variabilidad de respuestas en las poblaciones de GC del DG del hipocampo.

Discusión: Parte 3

Numerosos trabajos evidencian que la actividad cerebral ocurre con determinados patrones temporales, y se ha propuesto que la temporalidad de las señales constituye en sí misma un código (Ahmed & Mehta 2009; Singer 2009). Los registros de campo extracelular *in vivo* demuestran que el potencial de campo presenta oscilaciones que corren desde el orden de las frecuencias theta (3-10 Hz) a las frecuencias gamma (35-90 Hz) (Womelsdorf et al. 2014). En varios casos, se ha observado que las oscilaciones se encuentran en sincronía entre distintas regiones, lo que sugiere una actividad coordinada entre regiones. Tal es el caso de la capa II de las EC y el DG del hipocampo, que oscilan en las frecuencias theta y gamma (Roux & Buzsáki 2014). Asimismo, la actividad de las neuronas de cada región suele ocurrir en fase a las oscilaciones. Así, la actividad de la capa II de la MEC *in vivo* muestra oscilaciones rápidas de tipo gamma englobada en oscilaciones theta, y estas a su vez están asociadas al disparo de potenciales de acción de las neuronas de proyección. De este modo, estas neuronas se activan con *bursts* breves de frecuencias en el orden gamma espaciados por intervalos en el orden de las frecuencias theta. Como resultado la actividad registrada frente a la exploración de un ambiente *in vivo* ronda entre estos órdenes, registrándose actividades máximas de entre 10 y 50 Hz (Bonnevie et al. 2013; Hafting et al. 2005; Fyhn et al. 2004; Chrobak & Buzsáki 1998).

Los mayores niveles de activación de las 4wpiGC frente a un único pulso de estimulación sugieren que estas neuronas podrían ser reclutadas preferencialmente frente a estímulos provenientes de la MEC. Sin embargo, esto representa una simplificación de la situación real, dado que los estímulos complejos provenientes de la MEC pueden reclutar circuitos que alteren los patrones de activación de las GC. Los resultados de esta parte de la tesis muestran que la activación frente a la estimulación con pulsos en forma de trenes varía considerablemente según la frecuencia de estimulación. Sin embargo, tanto las frecuencias altas como las frecuencias bajas de estimulación activan a las células inmaduras en mayor medida que a las células maduras. Esto sugiere que frente a estímulos complejos provenientes de la MEC las 4wpiGC tendrán una participación importante en la activación poblacional del DG.

El hecho de que las 4wpiGC puedan ser activadas a altas frecuencias con mayor eficiencia que las matGC podría tener consecuencias funcionales relevantes. Trabajos donde se estudia la activación de las células piramidales de CA3 frente a la estimulación directa de las GC demuestran que una única GC es capaz de activar una célula piramidal; sin embargo, no se requiere uno, sino más de un potencial de acción evocados en la GC para provocar la activación de la célula piramidal, y la probabilidad de activación aumenta exponencialmente con la frecuencia de estimulación (Henze et al. 2002). A la luz de estos trabajos, y considerando que la conectividad de las 4wpiGC en CA3 es muy similar a la conectividad de las matGC (Temprana et al. 2015; Gu et al. 2012), nuestros resultados sugieren que las 4wpiGC podrían ser más eficientes en transmitir estímulos de alta frecuencia a CA3 provocando la activación de las células piramidales de forma robusta. Un estímulo que arribe al DG a 40 Hz tendría una mayor probabilidad de evocar la activación de las 4wpiGC a 40 Hz que de las matGC. En este sentido, las 4wpiGC y las matGC podrían tener un efecto muy diferente en la activación de las células piramidales que se hallan río abajo. Además, una mayor probabilidad de activación de sus células eferentes por las 4wpiGC podría tener una función de reforzamiento de estas conexiones, dado que las 4wpiGC también presentan mayores niveles de LTP en estas sinapsis (Gu et al. 2012).

Notablemente, los circuitos inhibitorios locales son los principales responsables de las diferencias de activación generadas por los trenes de estímulos. El gran aumento de la inhibición a las frecuencias altas determina niveles de activación muy bajos. De este modo, los circuitos inhibitorios podrían estar impidiendo la hiperexcitabilidad del circuito. Consistentemente, en modelos de roedores epilépticos, en los que el DG se encuentra hiperexcitado, se observaron alteraciones en el funcionamiento de los circuitos inhibitorios (Cossart et al. 2005). Como hemos visto, incluso frente a un pulso de estimulación o frente a trenes de frecuencias bajas, la inhibición feed-forward

cumple un papel importante en el control de la activación. Por otra parte, la inhibición feed-back reclutada con un tren de pulsos a 1 Hz, registrada al momento cercano al disparo de potenciales de acción, es muy baja, pero crece con la frecuencia. En este sentido, al control de la activación por parte de la inhibición feed-forward a las frecuencias bajas, se le suma el control por parte de la inhibición feed-back a las frecuencias altas.

La activación a las frecuencias altas disminuye en las GC a lo largo de los pulsos del tren debido al movimiento antagónico de las corrientes excitatorias e inhibitorias reclutadas por la estimulación: el decaimiento lento de las corrientes inhibitorias hace que estas se sumen a lo largo del tren, en cambio las corrientes excitatorias deprimen de un pulso al otro y la depresión aumenta con la frecuencia. El desfase entre la corriente inhibitoria evocada en las 4wpiGC y las matGC resulta fundamental en determinar las diferencias de activación entre estas dos poblaciones de células. Como vemos en esta parte de la tesis, este desfase radica específicamente en la lentitud de corrientes inhibitorias de tipo feed-forward evocadas en las 4wpiGC. El intervalo de tiempo entre los pulsos de los trenes de estimulación a 1 Hz y a 10 Hz es tal que las IPSC tardías de las 4wpiGC no llegan a compensar las EPSC, y de este modo la inhibición a estas frecuencias no afecta la activación de estas células. El hecho de que la inhibición no afecte la activación de las 4wpiGC a 10 Hz podría tener importantes implicancias funcionales a la luz de los registros *in vivo* que muestran que la actividad del DG se da, en mayor medida, en frecuencias cercanas a 10 Hz (Jung & McNaughton 1993; Leutgeb et al. 2007; Neunuebel & Knierim 2012). El intervalo de tiempo entre los pulsos de los trenes de estimulación a 20 Hz y a 40 Hz es tal que las IPSC reclutadas pulso a pulso se suman con las anteriores, haciendo que la IPSC supere ampliamente a las EPSC en los pulsos más tardíos del tren, tanto en las 4wpiGC como en las matGC. Sin embargo, en los primeros pulsos del tren, el efecto de la lentitud de las IPSC evocadas en las 4wpiGC prevalece sobre el efecto de la sumación de las corrientes, determinando un mayor balance excitación/inhibición que en las células maduras. Estos datos explican por qué las diferencias de activación entre las 4wpiGC y las matGC están determinadas por los circuitos inhibitorios a todas las frecuencias de estimulación sin distinción.

Además del efecto de la sumación de corrientes, el crecimiento de las corrientes inhibitorias en las 4wpiGC y las matGC a las frecuencias altas, podría ser el resultado del reclutamiento específico de ciertos tipos de inhibición que afecten de igual medida a ambas GC. Tal es el caso de la inhibición feed-back, pero además podría ocurrir un reclutamiento específico de inhibición dendrítica a las frecuencias altas que, como hemos visto, no difiere entre las 4wpiGC y las matGC. Un trabajo publicado recientemente por Liu y col. muestra que la inhibición dendrítica del DG se recluta

preferencialmente con estímulos de frecuencias altas y crece a lo largo de los pulsos del tren (Liu et al. 2014). En cambio la inhibición perisomática del DG se recluta a frecuencias bajas y altas, y decrece con los pulsos del tren. Sería muy interesante, por lo tanto analizar la contribución de la inhibición dendrítica y perisomática a la activación de las 4wpiGC y matGC con estímulos en forma de trenes. Los resultados sugieren que la inhibición feed-forward podría estar principalmente compuesta por inhibición perisomática y la inhibición feed-back, por inhibición dendrítica. Estos experimentos constituyen una línea interesante de continuación del proyecto de esta tesis.

En conclusión, los resultados de esta parte de la tesis, revelan que las 4wpiGC tienen una importante participación en la actividad del DG en condiciones fisiológicas, debido a que reciben una inhibición feed-forward más lenta y menor. Los circuitos inhibitorios son los principales responsables de la variabilidad de respuestas evocadas frente a trenes de estimulación en las GC del DG.

Figuras Resultados Parte 3

Figura R.3-1

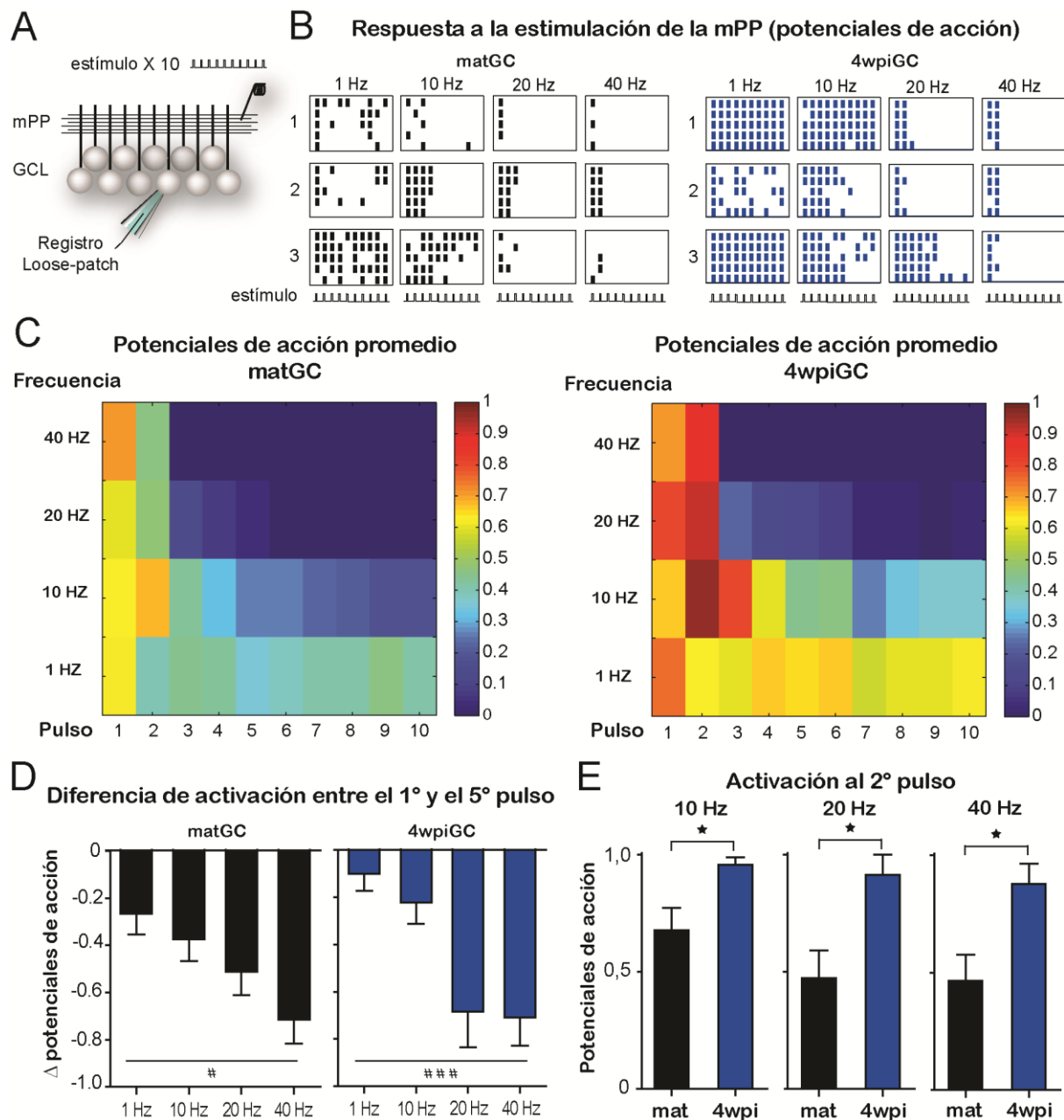


Figura R.3-1. Respuesta de las células granulares a trenes de estímulos de la vía perforante medial. A. Esquema del registro mostrando el electrodo de estimulación colocado en la vía perforante medial (mPP), la capa de células granulares (GCL) y el electrodo de registro de loose-patch. Se estimula al 50% de fEPSP con 10 pulsos a 1 Hz, 10 Hz, 20 Hz y 40 Hz. **B.** Potenciales de acción evocados en tres 4wpiGC y tres matGC (1, 2 y 3) a 1 Hz, 10 Hz, 20 Hz y 40 Hz. Cada recuadro corresponde a una célula a una dada frecuencia. Cada fila dentro del cuadro es un ensayo. Cada raya representa a un potencial de acción evocado por el pulso de estimulación correspondiente; ver abajo. **C.** Promedio de potenciales de acción evocados en las matGC (izquierda) y las 4wpiGC (derecha). Filas: frecuencias de estimulación. Columnas: pulsos del tren. Código de color: 0 a 1 potenciales de acción promedio. **D.** El aumento de la diferencia de activación entre el primer y quinto pulso del tren con la frecuencia refleja que la disminución de la activación con los pulsos del tren se acrecienta a mayores frecuencias. Se muestra el promedio $\pm$ SEM para las 4wpiGC y las matGC (### $p < 0,001$, # $p < 0,05$, ANOVA de una vía). **E.** Potenciales de acción promedio $\pm$ SEM evocados al segundo pulso de los trenes a 10 Hz,

20 Hz y 40 Hz, dónde la diferencia entre las 4wpiGC y las matGC dentro del tren se hace máxima (* $p < 0,05$, prueba de t). N(4wpiGC)= 12, 13, 7 y 11 células y N(matGC)= 15, 16, 11, 14 células para 1 Hz, 10 Hz, 20 Hz y 40 Hz, respectivamente

Figura R.3-2

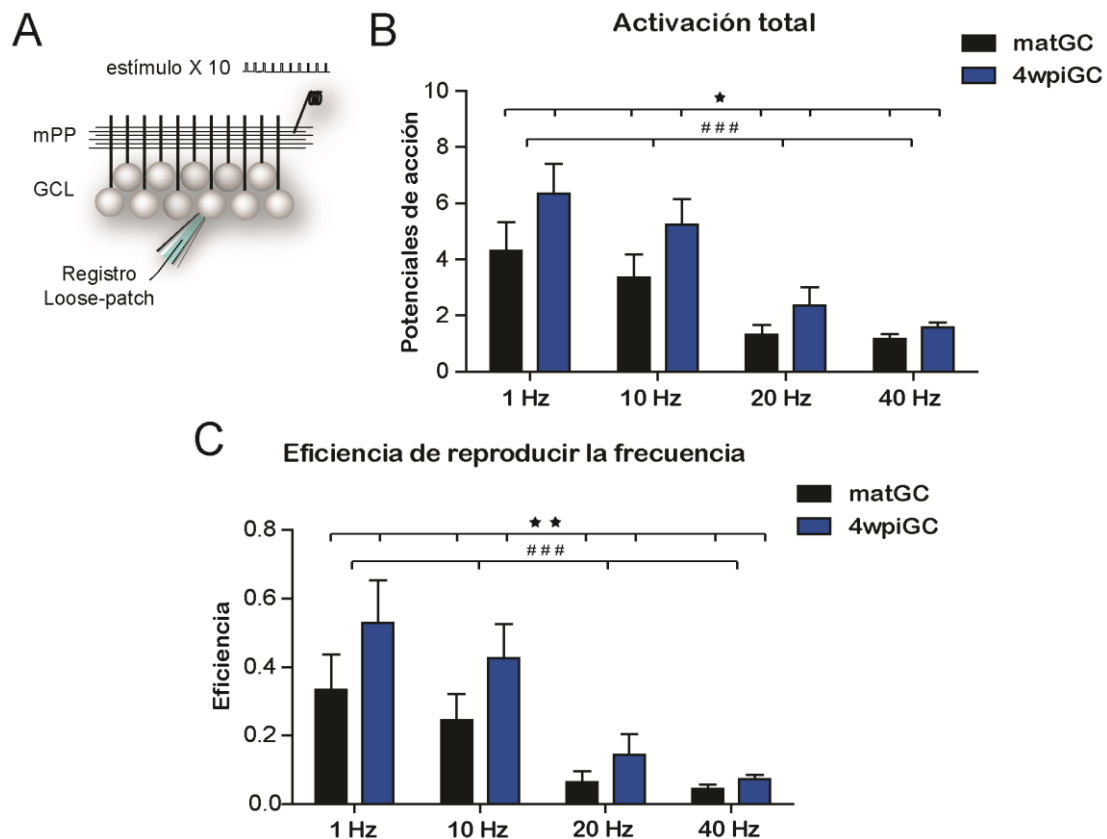


Figura R.3-2. Activación total con trenes de estímulos y eficiencia de reproducir la frecuencia de estimulación. **A.** Esquema del registro mostrando el electrodo de estimulación colocado en la vía perforante medial (mPP), la capa de células granulares (GCL) y el electrodo de registro de loose-patch. Se estimula al 50% del fEPSP con trenes de 10 pulsos. **B.** Promedio $\pm$ SEM de la suma de potenciales de acción evocados por trenes de estimulación de 1 Hz, 10 Hz, 20 Hz y 40 Hz, de las 4wpiGC y las matGC. La activación disminuye con la frecuencia en ambas células y es mayor en las 4wpiGC que en las matGC a todas las frecuencias de estimulación (ANOVA de dos vías. Variación entre GC: * $p < 0,05$; variación entre frecuencias: ### $p < 0,001$; interacción: ns, $p > 0,05$). **C.** Eficiencia de reproducir la frecuencia de estimulación calculada como la probabilidad de ocurrencia potenciales de acción al intervalo de tiempo de la estimulación. La eficiencia disminuye con la frecuencia en ambas células, y es mayor en las 4wpiGC que en las matGC a todas las frecuencias de estimulación (ANOVA de dos vías. Variación entre GC: ** $p < 0,01$; variación entre frecuencias: ## $p < 0,001$; interacción: ns, $p > 0,05$). N(4wpiGC)= 12, 13, 7 y 11 células y N(matGC)= 15, 16, 11, 14 células para 1 Hz, 10 Hz, 20 Hz y 40 Hz, respectivamente.

Figura R.3-3

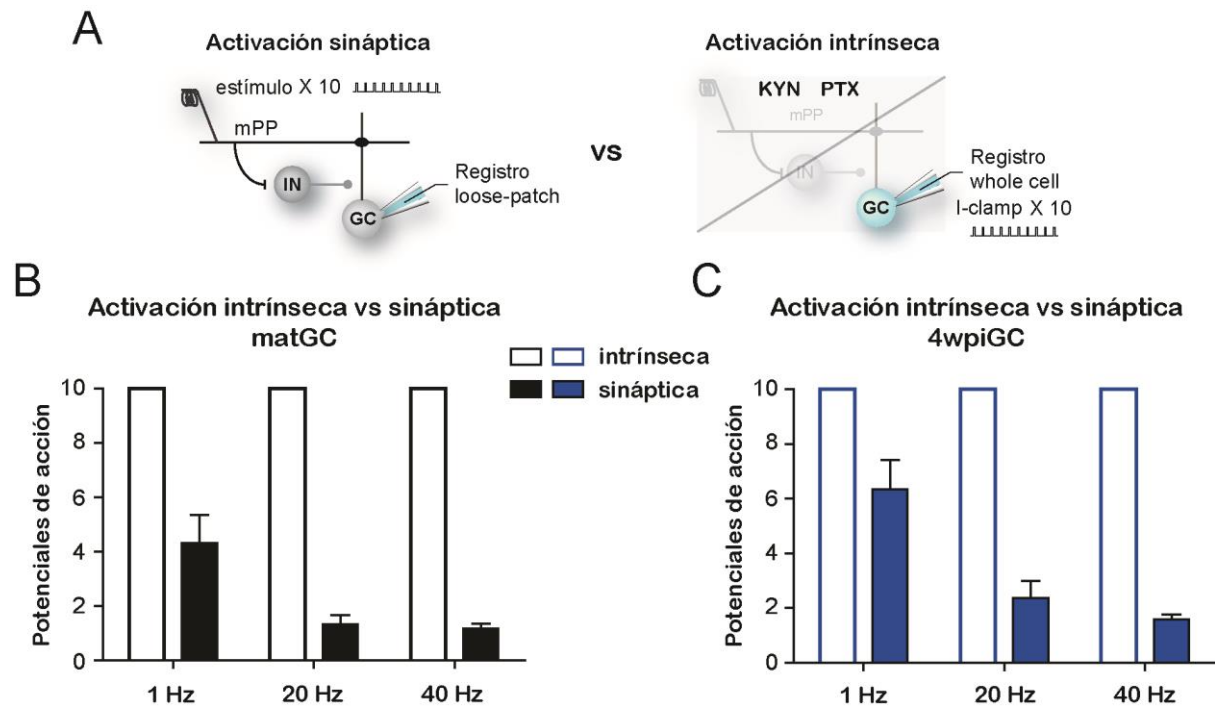
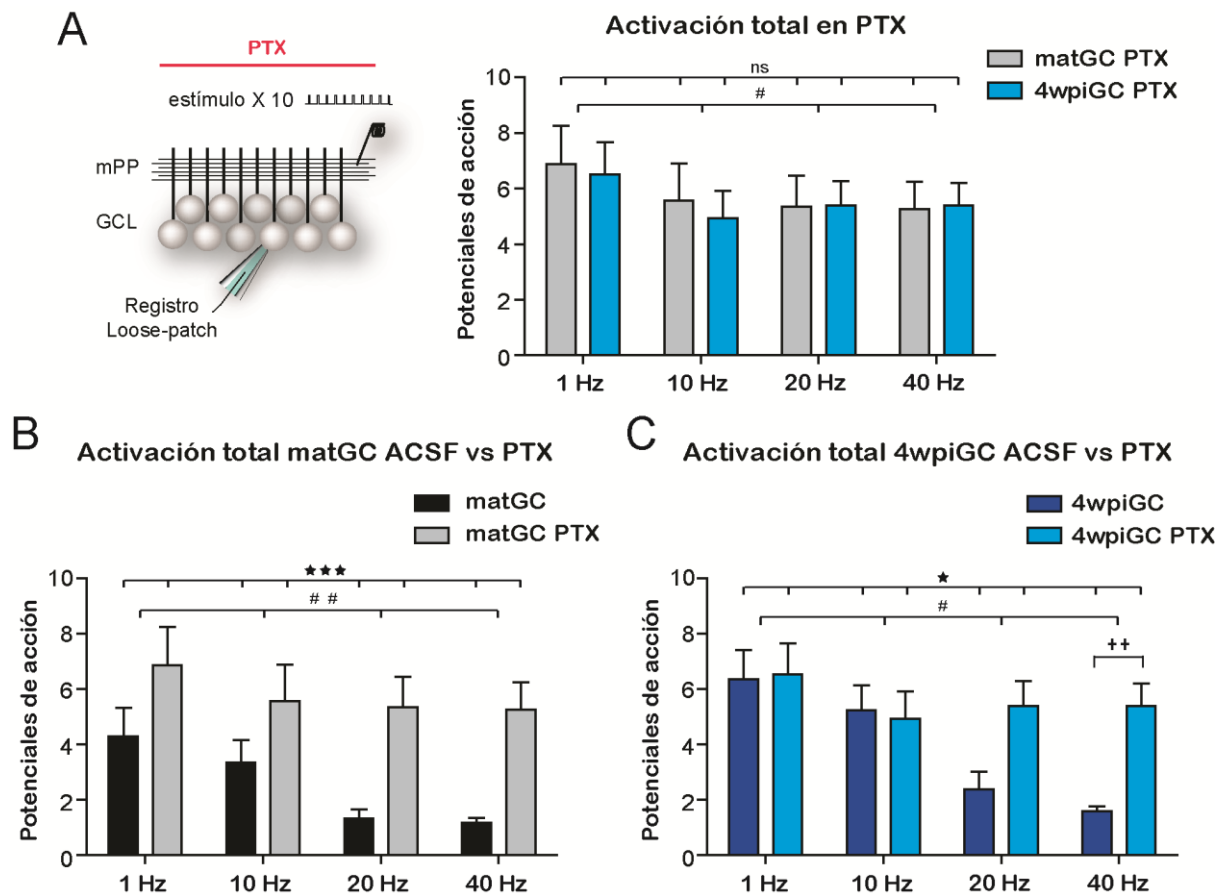


Figura R.3-3. Propiedades intrínsecas de disparo de potenciales de acción a distintas frecuencias. **A.** Izq.: Esquema de registro de la activación de las células granulares en las condiciones de estimulación de la vía perforante medial (mPP) con el circuito completo. Der.: Esquema de registro del experimento actual. La actividad sináptica se bloquea con ácido quinurénico (KYN) y picrotoxina (PTX), la GC se estimula con el electrodo de registro en configuración whole-cell current clamp (I-clamp) con inyección de trenes de 10 pulsos cuadrados de corriente breves, a una intensidad que evoca potenciales de acción en todos los pulsos del tren a 1 Hz. **B, C.** Comparación de la activación con trenes de corriente inyectada en I-clamp y trenes de estimulación de la mPP para las matGC (**B**) y las 4wpiGC (**C**). Todas las células registradas en whole-cell disparan 10 potenciales de acción frente a trenes de 10 pulsos de corriente inyectada a 20 Hz y 40 Hz (N= 4 células para ambas GC).

Figura R.3-4

**Figura R.3-4. Activación total con trenes de estímulos de la vía perforante medial en ausencia de inhibición.**

A. Izq.: Esquema del registro mostrando el electrodo de estimulación colocado en la vía perforante medial (mPP), la capa de células granulares (GCL) y el electrodo de registro de loose-patch. Se estimula al 50% del fEPSP con 10 pulsos a 1 Hz, 10 Hz, 20 Hz y 40 Hz. La inhibición se bloquea con picrotoxina (PTX). Der.: Promedio $\pm$ SEM de la suma de potenciales evocados por trenes de estimulación de 1 Hz, 10 Hz, 20 Hz y 40 Hz en ausencia de inhibición, en las 4wpiGC y las matGC. La activación no presenta diferencias entre las 4wpiGC y las matGC a ninguna frecuencia de estimulación, y disminuye levemente con la frecuencia (ANOVA de dos vías pareado entre frecuencias. Variación entre GC: ns, $p>0,05$; variación entre frecuencias: # $p<0,05$; interacción: ns, $p>0,05$. $N= 23$ células para ambas GC a las cuatro frecuencias). **B.** Comparación de la activación de las matGC frente a trenes de estimulación en ausencia (PTX) y presencia de inhibición (ACSF). La activación de las matGC en PTX es mayor que en presencia de la inhibición a todas las frecuencias de estimulación (ANOVA de dos vías. Variación entre tratamientos: *** $p<0,001$; variación entre frecuencias: # # $p<0,01$; interacción: ns, $p>0,05$). **C.** Comparación de la activación de las 4wpiGC frente a trenes de estimulación en presencia y ausencia de inhibición. El efecto del bloqueo de la inhibición en las 4wpiGC varía con la frecuencia. La activación aumenta únicamente a las frecuencias altas de estimulación (ANOVA de dos vías. Variación entre tratamientos: * $p<0,05$; variación entre frecuencias: # $p<0,05$; interacción positiva $p<0,01$; ** Prueba posterior de Bonferroni).

Figura R.3-5

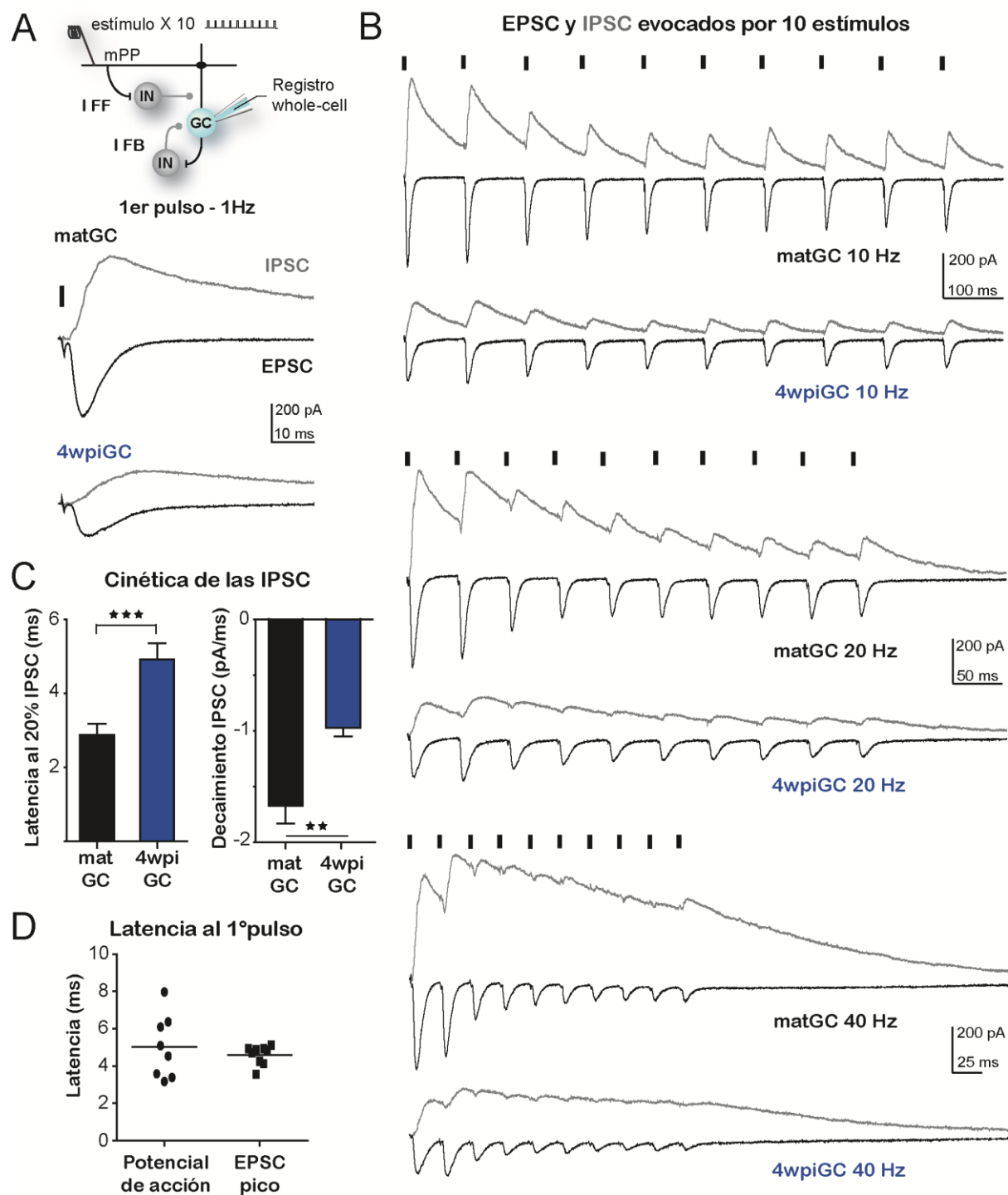


Figura R.3-5. Corrientes excitatorias e inhibitorias evocadas con trenes de estímulos de la vía perforante medial. **A.** Arriba: Esquema del registro. Se muestra el circuito reclutado con la estimulación de la vía perforante medial (mPP) al 50% del fEPSP con trenes de 10 pulsos a 1 Hz, 10 Hz, 20 Hz y 40 Hz. La estimulación de la mPP activa neuronas inhibitorias (IN) que hacen sinapsis sobre las células granulares (GC) ejerciendo inhibición feed-forward (I FF). La activación de las GC estimula IN que luego ejercen inhibición en las GC de tipo feed-back (I FB). Se registra la inhibición total. Abajo: Trazos de la corriente postsináptica inhibitoria (IPSC) y excitatoria (EPSC) evocadas frente al primer pulso del tren de estimulación de la mPP a 1 Hz en una 4wpiGC y una matGC. La raya indica el estímulo. **B.** Trazos de la EPSC (negro) y la IPSC (gris) evocadas en una 4wpiGC y una matGC frente a los 10 pulsos de estimulación de la mPP a 10 Hz, 20 Hz y 40 Hz. Los artefactos de estimulación de los trazos fueron borrados para facilitar la visualización. **C.** Izq.: Promedio $\pm$ SEM de la latencia al 20% del pico de la IPSC evocada por el primer pulso de estimulación a 1Hz en las 4wpiGC y las matGC. La IPSC es más lenta en las 4wpiGC que en las matGC (** $p < 0,001$, prueba de t). Der.: Promedio $\pm$ SEM de la pendiente del decaimiento desde el 90% al 10% del pico de la IPSC evocada por el primer pulso de estimulación a 1Hz en las 4wpiGC y las matGC. La IPSC decae más lentamente en las 4wpiGC que en las matGC (** $p < 0,01$, prueba de t con corrección de Welch). **D.** Latencia del potencial de acción y latencia del pico de la EPSC evocada al primer pulso de estimulación en las matGC, medidas desde el artefacto de estimulación. El potencial de acción y el pico de la EPSC ocurren a tiempos cercanos.

Figura R.3-6

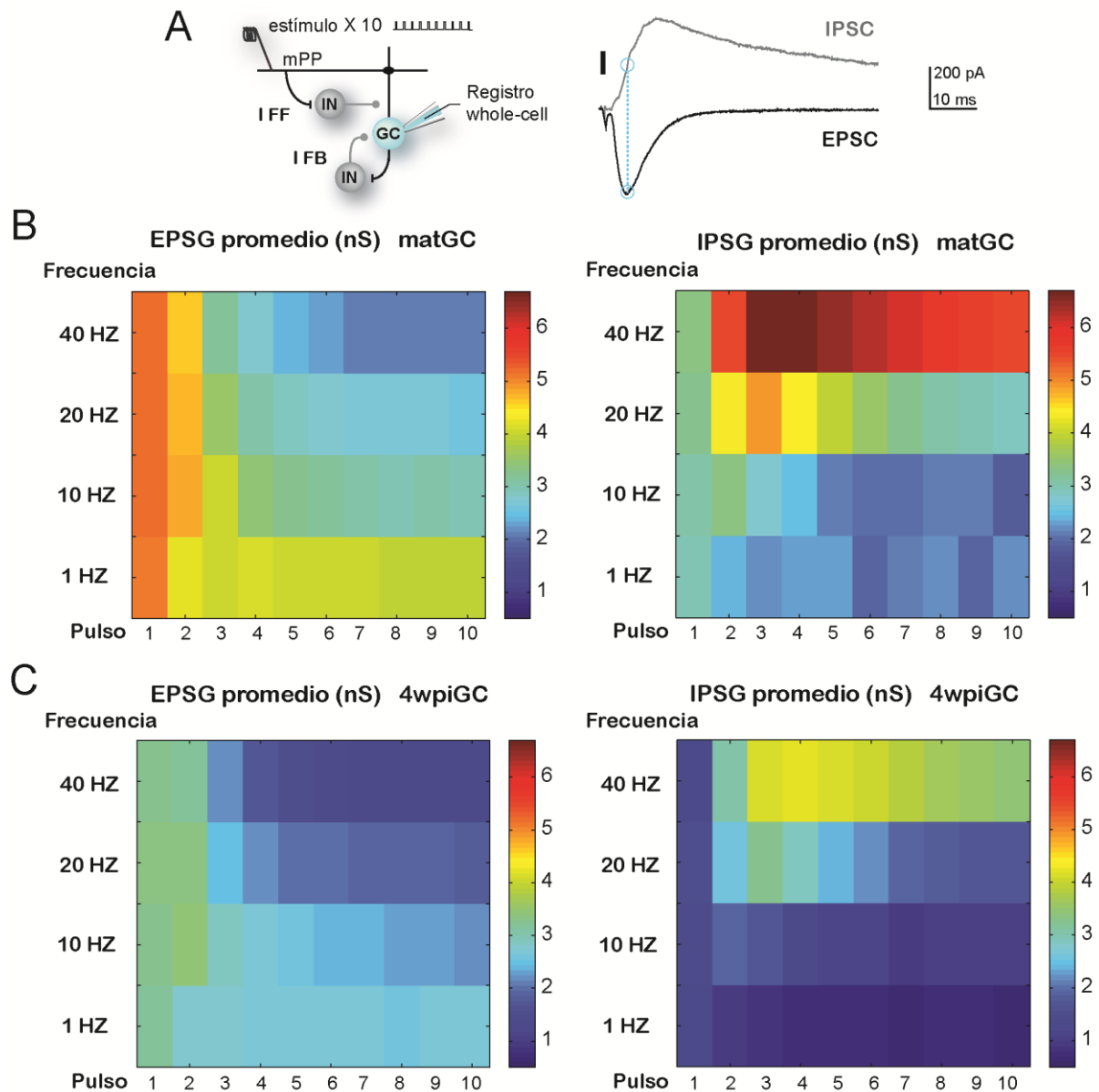


Figura R.3-6. Corrientes excitatorias e inhibitorias reclutadas a lo largo de los trenes de estimulación. **A.** Izq.: Esquema del registro. Se muestra el circuito reclutado con la estimulación de la vía perforante medial (mPP) al 50% del fEPSP con trenes de 10 pulsos a 1 Hz, 10 Hz, 20 Hz y 40 Hz. Der.: Trazos de la corriente postsináptica inhibitoria (IPSC) y excitatoria (EPSC) evocadas frente al primer pulso del tren de estimulación de la mPP a 1 Hz en una matGC. En celeste se indica el pico de la EPSC y la IPSC al pico de la EPSC, cuyas mediciones fueron utilizadas en B y C. La raya negra indica el estímulo. **B y C.** Promedio de la conductancia postsináptica excitatoria (EPSC) pico y conductancia postsináptica inhibitoria (IPSC) medida al pico de la EPSC, evocadas a lo largo de los pulsos de los trenes de estimulación a las distintas frecuencias, en las matGC (B) y las 4wpiGC (C). Filas: frecuencias de estimulación. Columnas: pulsos del tren de estimulación. Código de colores: de 0 a 7 nS. N(4wpiGC)= 17 células y N(matGC)= 14 células para la excitación a las cuatro frecuencias. N(4wpiGC)= 9 células y N(matGC)= 11 células para la inhibición a las cuatro frecuencias.

Figura R.3-7

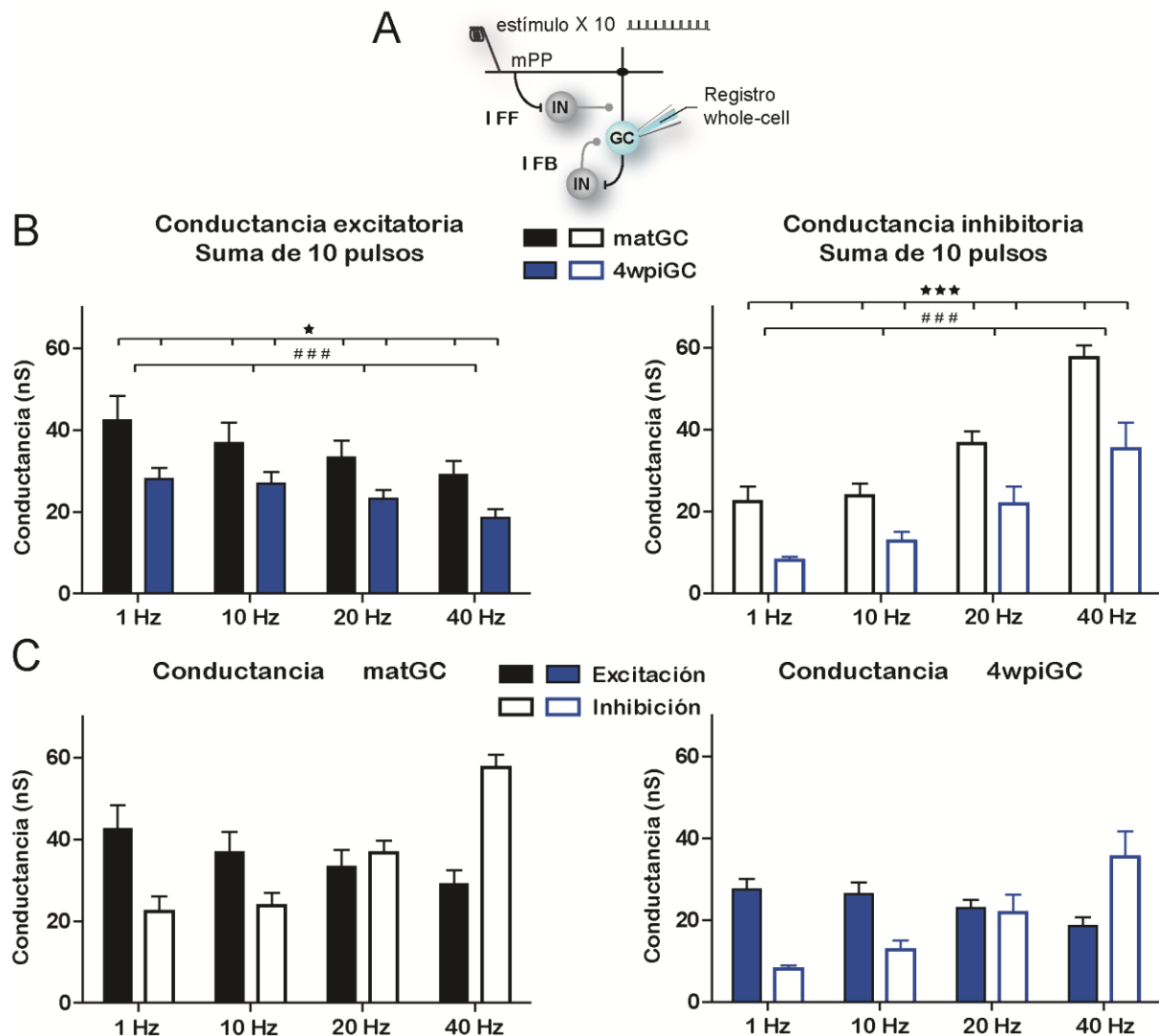


Figura R.3-7. Suma de las corrientes excitatorias e inhibitorias reclutadas por trenes de estimulación de la mPP. **A.** Esquema del registro. Se muestra el circuito reclutado con la estimulación de la vía perforante medial (mPP) al 50% del fEPSP con trenes de 10 pulsos a 1 Hz, 10 Hz, 20 Hz y 40 Hz. **B.** Izq.: Promedio $\pm$ SEM de la suma de las conductancias postsinápticas excitatorias (EPSP) pico evocadas por los 10 pulsos de estimulación de la mPP en las matGC y las 4wpiGC. La excitación disminuye con la frecuencia y es mayor en las matGC que en las 4wpiGC a todas las frecuencias de estimulación (ANOVA de dos vías pareado entre frecuencias. Variación entre GC: * $p < 0,05$; variación entre frecuencias: ### $p < 0,001$; interacción: ns, $p > 0,05$. $N(4wpiGC) = 17$ células y $N(matGC) = 14$ células, en las cuatro frecuencias). Der.: Promedio $\pm$ SEM de la suma de las conductancias postsinápticas inhibitorias (IPSP) evocadas por los 10 pulsos de estimulación de la mPP a las distintas frecuencias, medidas al pico de la EPSP en las matGC y las 4wpiGC. La inhibición aumenta con la frecuencia y es mayor en las matGC que en las 4wpiGC a todas las frecuencias de estimulación (ANOVA de dos vías pareado entre frecuencias. Variación entre GC: *** $p < 0,001$; variación entre frecuencias: ### $p < 0,001$; interacción: ns, $p > 0,05$. $N(4wpiGC) = 9$ células y $N(matGC) = 11$ células, en las cuatro frecuencias). **C.** Comparación entre la suma de conductancias excitatorias e inhibitorias en las matGC (izquierda) y las 4wpiGC (derecha). Las 4wpiGC muestran una mayor relación excitación/inhibición de la suma de conductancias a 1 Hz y 10 Hz que las matGC.

Figura R.3-8

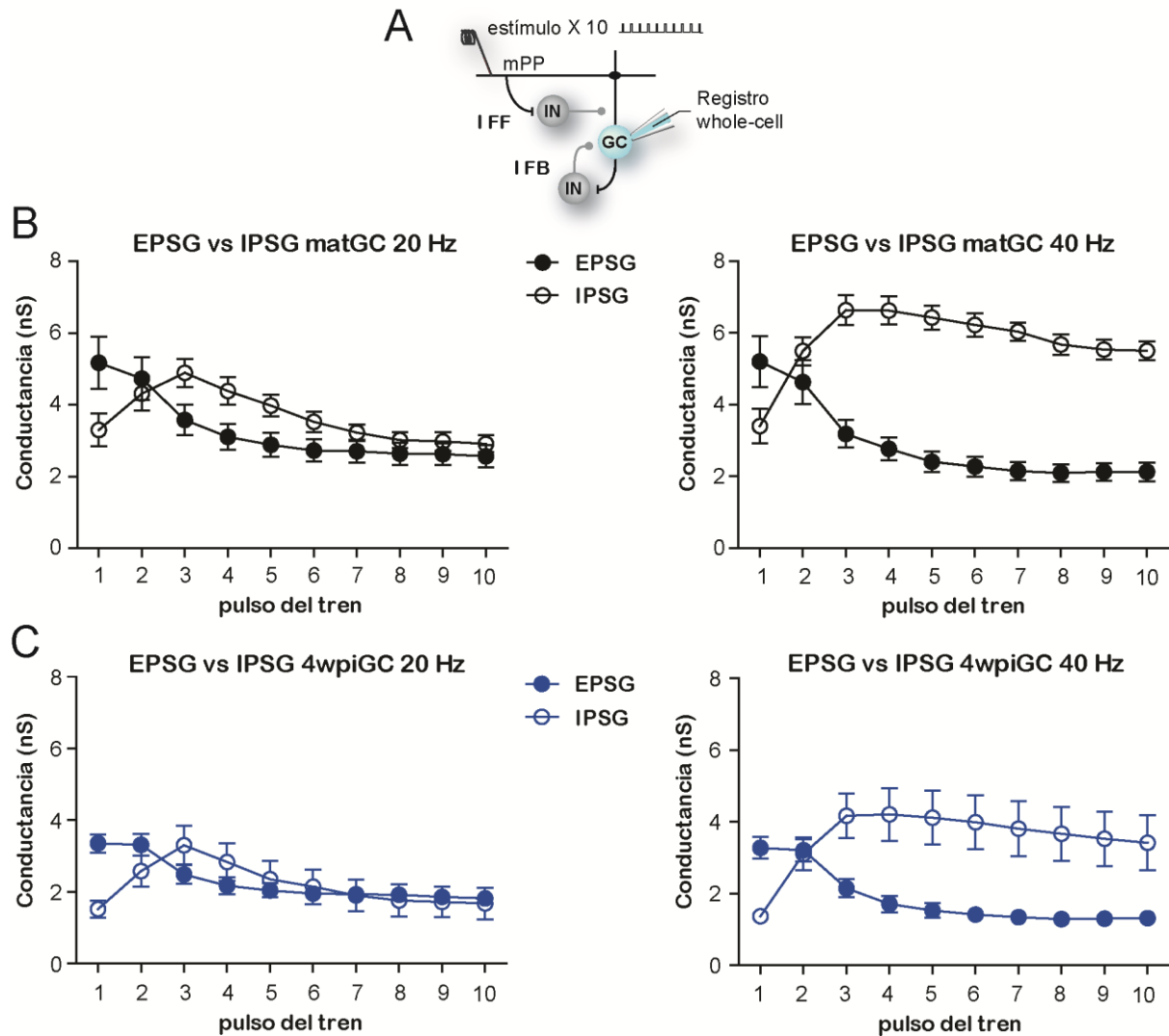


Figura R.3-8. Corrientes excitatorias e inhibitorias reclutadas por pulso con estímulos de 20 Hz y 40 Hz. A. Esquema del registro. Se muestra el circuito reclutado con la estimulación de la vía perforante medial (mPP) al 50% del fEPSP con trenes de 10 pulsos a 20 Hz y 40 Hz. **B.** Promedio $\pm$ SEM de la conductancia postsináptica excitatoria (EPSP) pico, y promedio $\pm$ SEM de la conductancia postsináptica inhibitoria (IPSP) al pico de la EPSP, evocadas en las matGC por cada uno de los pulsos de la estimulación a 20 Hz (izquierda) y 40 Hz (derecha). **C.** Ídem B, para las conductancias evocadas en las 4wpiGC. Las 4wpiGC muestran una mayor relación excitación/inhibición que las matGC en los primeros pulsos del tren. $N(4wpiGC) = 17$ células y $N(matGC) = 14$ células para la excitación. $N(4wpiGC) = 9$ células y $N(matGC) = 11$ células para la inhibición.

Figura R.3-9

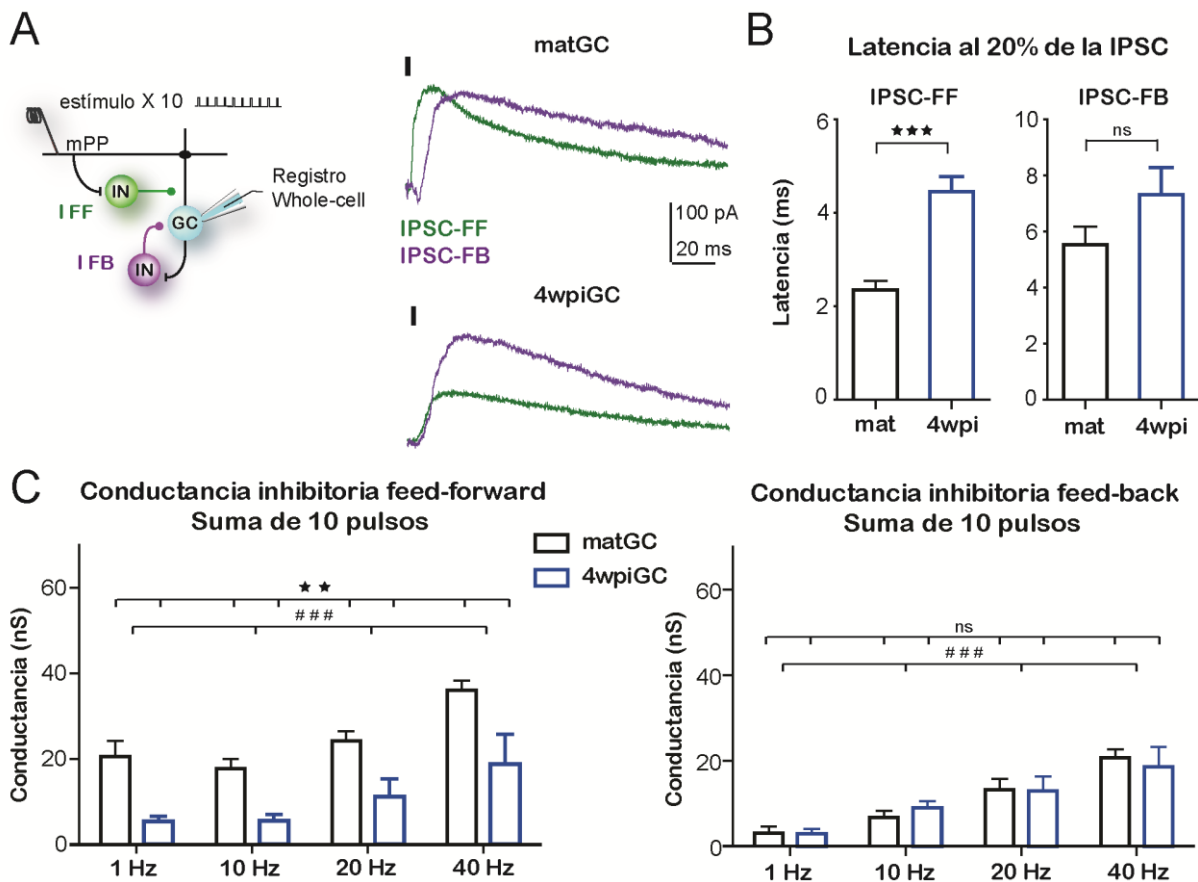


Figura R.3-9. Corrientes inhibitorias feed-forward y feed-back reclutadas por trenes de estimulación de la mPP. **A.** Izq.: Esquema del registro. Se muestra el circuito reclutado con la estimulación de la vía perforante medial (mPP) al 50% del fEPSP con trenes de 10 pulsos a 1 Hz, 10 Hz, 20 Hz y 40 Hz. La estimulación de la mPP activa neuronas inhibitorias (IN) que hacen sinapsis sobre las células granulares (GC) ejerciendo inhibición feed-forward (I FF). La activación de las GC estimula IN que luego ejercen inhibición en las GC de tipo feed-back (I FB). Las componentes inhibitorias FF y FB se separan empleando DCG4 (ver m&m3.8). Der.: Trazos de la corriente postsináptica inhibitoria feed-forward (IPSC-FF) y la corriente postsináptica inhibitoria feed-back (IPSC-FB) evocadas frente al primer pulso del tren de estimulación de la mPP a 1 Hz en una matGC (arriba) y una 4wpiGC (abajo). **B.** Promedio $\pm$ SEM de la latencia al 20% del pico de la IPSC-FF (izquierda) y la latencia al 20% del pico de la IPSC-FB (derecha) evocadas frente al primer pulso del tren de estimulación de la mPP a 1 Hz en las matGC y las 4wpiGC. La IPSC-FF es más lenta en las 4wpiGC que en las matGC (*** $p < 0.001$, prueba de t). La latencia de la IPSC-FB no presenta diferencias entre las 4wpiGC y las matGC (ns, $p > 0.05$, prueba de t). **C.** Izq.: Promedio $\pm$ SEM de la suma de las conductancias postsinápticas inhibitorias FF (IPSG-FF) evocadas por los 10 pulsos de estimulación de la mPP medidas al pico de la EPSC en las matGC y las 4wpiGC. La IPSG-FF aumenta con la frecuencia y es mayor en las matGC que en las 4wpiGC a todas las frecuencias de estimulación (ANOVA de dos vías pareado entre frecuencias. Variación entre GC: ** $p < 0.01$; variación entre frecuencias: *** $p < 0.001$; interacción: ns, $p > 0.05$). Der.: Promedio $\pm$ SEM de la suma de las conductancias postsinápticas inhibitorias FB (IPSG-FB) evocadas por los 10 pulsos de estimulación de la mPP medidas al pico de la EPSC en las matGC y las 4wpiGC. La IPSG-FB no presenta diferencias entre las matGC y las 4wpiGC, pero aumenta en ambas GC con la frecuencia (ANOVA de dos vías. Variación entre GC: ns, $p > 0.05$; variación entre frecuencias: ## $p < 0.001$; interacción: ns, $p > 0.05$). N(4wpiGC)= 6 a 7 células y N(matGC)= 10 a 11 células, en las cuatro frecuencias.

Conclusiones finales

Los resultados presentados en esta tesis muestran que las células granulares nacidas en el hipocampo adulto tienen capacidades distintas de procesamiento de los estímulos aferentes que el resto de las células granulares maduras nacidas durante el desarrollo. Nuestros resultados revelan que las células granulares inmaduras muestran mayores niveles de activación frente a la estimulación de la vía aferente perforante medial en distintas condiciones. Tanto estímulos simples como estímulos complejos en forma de trenes de distintas frecuencias, activan un mayor porcentaje de células granulares inmaduras que de células granulares maduras. Asimismo, las células inmaduras tienen una mayor capacidad de ser activadas por estímulos diversos. Estos datos sugieren que la información proveniente de la vía aferente principal al giro dentado podría ser procesada en paralelo por dos poblaciones de neuronas con respuesta diferente, correspondientes a las células granulares inmaduras y a las células granulares maduras.

Nuestros resultados demuestran un papel fundamental de los circuitos inhibitorios en generar distintos perfiles de activación de las células granulares. Así, las principales diferencias en la activación de las células granulares maduras e inmaduras se deben a mecanismos inhibitorios. La activación aferente que llega a las neuronas granulares recluta una inhibición que es más lenta y menor en las neuronas inmaduras, generando un balance entre la excitación y la inhibición mayor que en las neuronas maduras. Esta diferencia en la inhibición genera diferencias sustanciales en la activación de las células granulares inmaduras y maduras frente a estímulos simples y complejos de baja y alta frecuencia.

Las células maduras están fuertemente afectadas por la inhibición reclutada por el estímulo, pero son capaces de activarse a altos niveles en ausencia de inhibición. Estos datos sugieren que el giro dentado comprende una población de células granulares con niveles basales de activación altos y otra población con niveles basales de activación bajos, pero con la capacidad de ser ampliamente modulada por mecanismos neuronales que modulen la inhibición. De este modo, unas u otras neuronas podrían ser activadas en situaciones diferentes.

No obstante, las células inmaduras y maduras son afectadas de igual modo por una parte de los circuitos inhibitorios. Los resultados muestran que ambas reciben iguales niveles de inhibición dendrítica y que la inhibición feed-back las afecta en igual medida. Sería interesante estudiar en un futuro si estos dos tipos de inhibición radican en un mismo sustrato neuronal. La madurez de la inhibición dendrítica indica que las células granulares inmaduras tendrían la capacidad de filtrar estímulos en sus dendritas, pero estos podrían ser amplificados en el soma por carecer de la inhibición perisomática rápida y fuerte característica de las neuronas maduras. La falta de diferencias entre las

células inmaduras y maduras en inhibición feed-back podría implicar que ambas estén acopladas a las oscilaciones hipocampales, las cuales estarían principalmente gobernadas por este tipo de inhibición (Hájos & Paulsen 2009).

De manera contraria, las diferencias entre las células inmaduras y maduras en la inhibición perisomática y la inhibición feed-forward resulta fundamental en la determinación de los niveles de activación diferenciales de ambas poblaciones de células. También en este sentido, sería interesante estudiar si ambos tipos de inhibición radican en un mismo sustrato neuronal.

Por otra parte, los circuitos inhibitorios generan especificidad de respuesta al input en las neuronas maduras. Las células inmaduras, en cambio, responden a diversos estímulos y por ende tienen la capacidad de integrarlos. Esto sugiere que diversos estímulos tendrán una mayor probabilidad de reclutar distintas neuronas maduras pero las mismas neuronas inmaduras. La mayor integración de inputs de las células nuevas se pierde con la maduración, con lo cual estímulos que ocurran lejanos en el tiempo, podrían activar distintas poblaciones de neuronas inmaduras. De este modo, nuestros datos sugieren que las neuronas inmaduras y maduras podrían tener una función diferencial en el procesamiento de estímulos diversos, y que, de forma análoga, un único estímulo tendrá una probabilidad alta de activar a la mayoría de las neuronas inmaduras pero tan solo a un porcentaje menor de las neuronas maduras.

Por último, la mayor capacidad de las células inmaduras de activarse a frecuencias altas de estimulación podría generar patrones de activación muy distintos en CA3. En esta región la inhibición reclutada por la estimulación de las células granulares deprime, en cambio la excitación facilita (Henze et al. 2002). Estos cambios son mayores a mayores frecuencias de estimulación. Por ende la mayor activación de las células granulares inmaduras a frecuencias altas podría generar un mayor balance excitación/inhibición en CA3 y por ende mayores niveles de activación en comparación con la activación de células granulares maduras. Una mayor capacidad de activarse frente a estímulos aferentes y de activar sus blancos eferentes, podría estar relacionado con la necesidad de establecer las conexiones sinápticas en el proceso de maduración neuronal. No obstante, estas características sugieren fuertemente un papel diferencial de las neuronas inmaduras en procesamiento de información aferente al giro dentado.

En conclusión, los datos presentados en la tesis demuestran que las células inmaduras comprenden una población con capacidad de procesamiento de los estímulos aferentes diferente al de las células maduras, que está determinada por una inhibición perisomática feed-forward lenta, y que podría proveerle al hipocampo con funciones únicas.

Abreviaturas

4wpiGC	Célula Granular de cuatro semanas de edad (ídem en plural)
8wpiGC	Célula Granular de ocho semanas de edad (ídem en plural)
ACSF	Solución de Líquido Cefalorraquídeo Artificial
DG	Giro Dentado
DIC	Microscopía de Contraste Diferencial interferencial
EC	Corteza Entorrinal
EE	Electrodo de Estimulación
EPSC	Corriente Postsináptica Excitatoria (ídem en plural)
EPSCG	Conductancia Postsináptica Excitatoria (ídem en plural)
ER	Electrodo de Registro
FB	<i>Feed-Back</i>
fEPSP	Potencial de Campo Postsináptico Excitatorio
FF	<i>Feed-Forward</i>
GC	Célula Granular (ídem en plural)
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
I-clamp	<i>Current Clamp</i>
IE	Intensidad de Estimulación
iEG	<i>Immediate Early Genes</i>
IN	Interneurona inhibitoria (ídem en plural)
IPSC	Corriente Postsináptica Inhibitoria (ídem en plural)
IPSCG	Conductancia Postsináptica Inhibitoria (ídem en plural)
KYN	Ácido quinurénico
LTP	Potenciación a Largo Plazo
m&m	Materiales y Métodos
matGC	Célula Granular madura nacida durante el desarrollo (ídem en plural)
MEC	Corteza Entorrinal Medial
ML	Capa Molecular
MML	Capa Molecular Medial
mPP	Vía Perforante medial
OGB1-AM	<i>Oregon Green Bapta 1- AM</i>
pop spike	Population Spike
PP	Vía Perforante
PTX	Picrotoxina
RFP	<i>Red Fluorescent Protein</i>
SGZ	Zona Subventricular
SVZ	Zona Subgranular

Bibliografía

- Aasebø, I.E.J., Blankvoort, S. & Tashiro, A., 2011. Critical maturational period of new neurons in adult dentate gyrus for their involvement in memory formation. *European Journal of Neuroscience*, 33(September 2010), pp.1094–1100.
- Acsády, L. et al., 1998. GABAergic cells are the major postsynaptic targets of mossy fibers in the rat hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 18(9), pp.3386–3403.
- Ahmed, O.J. & Mehta, M.R., 2009. The hippocampal rate code: anatomy, physiology and theory. *Trends in Neurosciences*, 32(May), pp.329–338.
- Aimone, J.B., Wiles, J. & Gage, F.H., 2006. Potential role for adult neurogenesis in the encoding of time in new memories. *Nature neuroscience*, 9(6), pp.723–727.
- Alme, C.B. et al., 2010. Hippocampal granule cells opt for early retirement. *Hippocampus*, 20, pp.1109–1123.
- Altman, J. & Das, G.D., 1965. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *The Journal of Comparative Neurology*, 124(3), pp.319–335.
- Alvarez-Buylla, A. & Lim, D.A., 2004. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron*, 41(5), pp.683–6.
- Barnes, C.A. et al., 1990. Comparison of spatial and temporal characteristics of neuronal activity in sequential stages of hippocampal processing. *Progress in brain research*, 83, pp.287–300.
- Bonnevie, T. et al., 2013. Grid cells require excitatory drive from the hippocampus. *Nature neuroscience*, 16(3), pp.309–17.
- Bragin, a et al., 1995. Gamma (40-100 Hz) oscillation in the hippocampus of the behaving rat. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 15(January), pp.47–60.
- Brown, J. et al., 2003. Enriched environment and physical activity stimulate hippocampal but not olfactory bulb neurogenesis. *The European journal of neuroscience*, 17(10), pp.2042–6.
- Buzsáki, G. & Moser, E.I., 2013. Memory, navigation and theta rhythm in the hippocampal-entorhinal system. *Nature neuroscience*, 16(2), pp.130–8.
- Cameron, H. a. & McKay, R.D.G., 2001. Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *Journal of Comparative Neurology*, 435(January), pp.406–417.
- Cardin, J.A. et al., 2009. Driving fast-spiking cells induces gamma rhythm and controls sensory responses. *Nature*, 459(7247), pp.663–7.

- Cayre, M. et al., 2002. The common properties of neurogenesis in the adult brain: From invertebrates to vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 132, pp.1–15.
- Charpak, S., Paré, D. & Llinás, R., 1995. The entorhinal cortex entrains fast CA1 hippocampal oscillations in the anaesthetized guinea-pig: role of the monosynaptic component of the perforant path. *The European journal of neuroscience*, 7(7), pp.1548–57.
- Chawla, M.K. et al., 2005. Sparse, environmentally selective expression of Arc RNA in the upper blade of the rodent fascia dentata by brief spatial experience. *Hippocampus*, 15(May), pp.579–586.
- Chrobak, J.J. & Buzsáki, G., 1998. Gamma oscillations in the entorhinal cortex of the freely behaving rat. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 18(1), pp.388–398.
- Clelland, C.D. et al., 2009. A functional role for adult hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation. *Science (New York, N.Y.)*, 325(2009), pp.210–213.
- Cossart, R., Bernard, C. & Ben-Ari, Y., 2005. Multiple facets of GABAergic neurons and synapses: multiple fates of GABA signalling in epilepsies. *Trends in neurosciences*, 28(2), pp.108–15.
- Coulter, D.A. et al., 2011. Hippocampal microcircuit dynamics probed using optical imaging approaches. *The Journal of physiology*, 589(Pt 8), pp.1893–903.
- Creer, D.J. et al., 2010. Running enhances spatial pattern separation in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(5), pp.2367–72.
- Csicsvari, J. et al., 1999. Oscillatory coupling of hippocampal pyramidal cells and interneurons in the behaving Rat. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 19(1), pp.274–87.
- Dayer, A.G. et al., 2003. Short-term and long-term survival of new neurons in the rat dentate gyrus. *The Journal of comparative neurology*, 460(4), pp.563–72.
- Dieni, C. V et al., 2013. Distinct determinants of sparse activation during granule cell maturation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 33(49), pp.19131–42.
- Döbrössy, M.D. et al., 2003. Differential effects of learning on neurogenesis: learning increases or decreases the number of newly born cells depending on their birth date. *Molecular psychiatry*, 8(12), pp.974–82.
- Duman, R.S., 2004. Depression: A case of neuronal life and death? *Biological Psychiatry*, 56, pp.140–145.
- Dupret, D. et al., 2007. Spatial learning depends on both the addition and removal of new hippocampal neurons. *PLoS biology*, 5(8), p.e214.
- Dupret, D. et al., 2008. Spatial relational memory requires hippocampal adult neurogenesis. *PLoS ONE*, 3(4), p.e1959.

- Eriksson, P.S. et al., 1998. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature medicine*, 4(11), pp.1313–1317.
- Ernst, A. et al., 2014. Neurogenesis in the striatum of the adult human brain. *Cell*, 156(5), pp.1072–83.
- Espósito, M.S. et al., 2005. Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 25(44), pp.10074–10086.
- Ewell, L.A. & Jones, M. V, 2010. Frequency-tuned distribution of inhibition in the dentate gyrus. *J Neurosci*, 30(38), pp.12597–12607.
- Farioli-Vecchioli, S. et al., 2008. The timing of differentiation of adult hippocampal neurons is crucial for spatial memory. *PLoS biology*, 6(10), p.e246.
- Freund, T.F. & Buzsáki, G., 1996. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*, 6, pp.347–470.
- Fukuda, S. et al., 2003. Two distinct subpopulations of nestin-positive cells in adult mouse dentate gyrus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 23(28), pp.9357–66.
- Fyhn, M. et al., 2004. Spatial representation in the entorhinal cortex. *Science (New York, N.Y.)*, 305(August), pp.1258–1264.
- Gage, F.H., 2000. Mammalian neural stem cells. *Science (New York, N.Y.)*, 287(2000), pp.1433–1438.
- Garst-Orozco, J., Babadi, B. & Olveczky, B.P., 2014. A neural circuit mechanism for regulating vocal variability during song learning in zebra finches. *eLife*, 3.
- Garthe, A., Behr, J. & Kempermann, G., 2009. Adult-generated hippocampal neurons allow the flexible use of spatially precise learning strategies. *PloS one*, 4(5), p.e5464.
- Ge, S. et al., 2007. A critical period for enhanced synaptic plasticity in newly generated neurons of the adult brain. *Neuron*, 54(4), pp.559–566.
- Ge, S. et al., 2006. GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature*, 439(7076), pp.589–593.
- Gilbert, P.E., Kesner, R.P. & Lee, I., 2001. Dissociating hippocampal subregions: double dissociation between dentate gyrus and CA1. *Hippocampus*, 11(6), pp.626–36.
- Gould, E. et al., 1999. Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nature neuroscience*, 2(3), pp.260–5.
- Gross, C.G., 2000. Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. *Nature reviews. Neuroscience*, 1(October), pp.67–73.

- Gu, Y. et al., 2012. Optical controlling reveals time-dependent roles for adult-born dentate granule cells. *Nature neuroscience*, 15(November), pp.1700–6.
- Hafting, T. et al., 2005. Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. *Nature*, 436(August), pp.801–806.
- Hájos, N. & Paulsen, O., 2009. Network mechanisms of gamma oscillations in the CA3 region of the hippocampus. *Neural networks : the official journal of the International Neural Network Society*, 22(8), pp.1113–9.
- Harney, S.C. & Jones, M. V., 2002. Pre- and postsynaptic properties of somatic and dendritic inhibition in dentate gyrus. *Neuropharmacology*, 43, pp.584–594.
- Hata, Y., Tsumoto, T. & Stryker, M.P., 1999. Selective pruning of more active afferents when cat visual cortex is pharmacologically inhibited. *Neuron*, 22(2), pp.375–81.
- Henze, D. a, Wittner, L. & Buzsáki, G., 2002. Single granule cells reliably discharge targets in the hippocampal CA3 network in vivo. *Nature neuroscience*, 5(8), pp.790–795.
- Imayoshi, I. et al., 2008. Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. *Nature neuroscience*, 11(10), pp.1153–61.
- Isaacson, J.S. & Scanziani, M., 2011. How inhibition shapes cortical activity. *Neuron*, 72(2), pp.231–243.
- Ito, H.T. & Schuman, E.M., 2008. Frequency-dependent signal transmission and modulation by neuromodulators. *Frontiers in neuroscience*, 2(2), pp.138–144.
- Johnston, D. & Amaral, D.G., 1998. Hippocampus. *The Synaptic Organization of the Brain*, pp.417–458.
- Jung, M.W. & McNaughton, B.L., 1993. Spatial selectivity of unit activity in the hippocampal granular layer. *Hippocampus*, 3(2), pp.165–82.
- Kamiya, H., Shinozaki, H. & Yamamoto, C., 1996. Activation of metabotropic glutamate receptor type 2/3 suppresses transmission at rat hippocampal mossy fibre synapses. *The Journal of physiology*, 493 (Pt 2, pp.447–55.
- Kee, N. et al., 2007. Preferential incorporation of adult-generated granule cells into spatial memory networks in the dentate gyrus. *Nat.Neurosci.*, 10(3), pp.355–362.
- Kempermann, G. et al., 2003. Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development (Cambridge, England)*, 130, pp.391–399.
- Kempermann, G., Kuhn, H.G. & Gage, F.H., 1998. Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 18(9), pp.3206–12.
- Kempermann, G., Kuhn, H.G. & Gage, F.H., 1997. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*, 386(6624), pp.493–5.

- Kokaia, Z. & Lindvall, O., 2003. Neurogenesis after ischaemic brain insults. *Current opinion in neurobiology*, 13(1), pp.127–32.
- Kronenberg, G. et al., 2003. Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli. *The Journal of comparative neurology*, 467(4), pp.455–63.
- Kullmann, D.M., 2011. Interneuron networks in the hippocampus. *Current opinion in neurobiology*, 21(5), pp.709–16.
- Lacefield, C.O. et al., 2010. Effects of adult-generated granule cells on coordinated network activity in the dentate gyrus. *Hippocampus*.
- Laplagne, D. a. et al., 2006. Functional convergence of neurons generated in the developing and adult hippocampus. *PLoS Biology*, 4(12), pp.2349–2360.
- Laplagne, D. a. et al., 2007. Similar GABAergic inputs in dentate granule cells born during embryonic and adult neurogenesis. *European Journal of Neuroscience*, 25(March), pp.2973–2981.
- Lavenex, P. & Amaral, D.G., 2000. Hippocampal-neocortical interaction: a hierarchy of associativity. *Hippocampus*, 10(4), pp.420–30.
- Leuner, B. et al., 2004. Learning enhances the survival of new neurons beyond the time when the hippocampus is required for memory. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 24(34), pp.7477–81.
- Leutgeb, J.K. et al., 2007. Pattern separation in the dentate gyrus and CA3 of the hippocampus. *Science*, 315(5814), pp.961–966.
- Lewis, P.F. & Emerman, M., 1994. Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus. *Journal of virology*, 68(1), pp.510–6.
- Liu, Y.-C., Cheng, J.-K. & Lien, C.-C., 2014. Rapid dynamic changes of dendritic inhibition in the dentate gyrus by presynaptic activity patterns. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 34(4), pp.1344–57.
- Livneh, Y., Adam, Y. & Mizrahi, A., 2014. Odor processing by adult-born neurons. *Neuron*, 81(5), pp.1097–1110.
- Lømo, T., 2003. The discovery of long-term potentiation. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 358(1432), pp.617–20.
- Marr, D., 1971. Simple memory: a theory for archicortex. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 262(841), pp.23–81.
- Mathews, E. a. et al., 2010. A distinctive layering pattern of mouse dentate granule cells is generated by developmental and adult neurogenesis. *Journal of Comparative Neurology*, 518(22), pp.4479–4490.

- McNaughton, B.L., 1980. Evidence for two physiologically distinct perforant pathways to the fascia dentata. *Brain research*, 199(1), pp.1–19.
- McNaughton, B.L., Barnes, C.A. & O'Keefe, J., 1983. The contributions of position, direction, and velocity to single unit activity in the hippocampus of freely-moving rats. *Experimental brain research*, 52(1), pp.41–9.
- Ming, G.L. & Song, H., 2011. Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain: Significant Answers and Significant Questions. *Neuron*, 70(4), pp.687–702.
- Mirescu, C. & Gould, E., 2006. Stress and adult neurogenesis. *Hippocampus*, 16(3), pp.233–8.
- Mongiat, L. a. et al., 2009. Reliable activation of immature neurons in the adult hippocampus. *PLoS.ONE.*, 4(4), p.e5320.
- Morgenstern, N. a, Lombardi, G. & Schinder, A.F., 2008. Newborn granule cells in the ageing dentate gyrus. *The Journal of physiology*, 586, pp.3751–3757.
- Nakashiba, T. et al., 2012. Young dentate granule cells mediate pattern separation, whereas old granule cells facilitate pattern completion. *Cell*, 149(1), pp.188–201.
- Neunuebel, J.P. & Knierim, J.J., 2012. Spatial Firing Correlates of Physiologically Distinct Cell Types of the Rat Dentate Gyrus. *Journal of Neuroscience*, 32(11), pp.3848–3858.
- O'Keefe, J., 1976. Place units in the hippocampus of the freely moving rat. *Experimental neurology*, 51(1), pp.78–109.
- O'Keefe, J. & Dostrovsky, J., 1971. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain research*, 34(1), pp.171–5.
- O'Reilly, R.C. & McClelland, J.L., 1994. Hippocampal conjunctive encoding, storage, and recall: Avoiding a trade-off. *Hippocampus*, 4(6), pp.661–682.
- Olariu, A. et al., 2005. A natural form of learning can increase and decrease the survival of new neurons in the dentate gyrus. *Hippocampus*, 15(6), pp.750–62.
- Olton, D.S. & Papas, B.C., 1979. Spatial memory and hippocampal function. *Neuropsychologia*, 17(6), pp.669–82.
- Parent, J.M. & Lowenstein, D.H., 2002. Seizure-induced neurogenesis: are more new neurons good for an adult brain? *Progress in brain research*, 135, pp.121–31.
- Paton, J.A. & Nottebohm, F.N., 1984. Neurons generated in the adult brain are recruited into functional circuits. *Science (New York, N.Y.)*, 225(4666), pp.1046–8.
- Paulsen, O. & Moser, E.I., 1998. A model of hippocampal memory encoding and retrieval: GABAergic control of synaptic plasticity. *Trends in Neurosciences*, 21, pp.273–278.
- Pouille, F. et al., 2009. Input normalization by global feedforward inhibition expands cortical dynamic range. *Nature neuroscience*, 12(12), pp.1577–85.

- Pouille, F. et al., 2013. The contribution of synaptic location to inhibitory gain control in pyramidal cells. *Physiological Reports*, 1, p.n/a–n/a.
- Pouille, F. & Scanziani, M., 2001. Enforcement of temporal fidelity in pyramidal cells by somatic feed-forward inhibition. *Science (New York, N.Y.)*, 293(2001), pp.1159–1163.
- Pouille, F. & Scanziani, M., 2004. Routing of spike series by dynamic circuits in the hippocampus. *Nature*, 429(June), pp.717–723.
- Van Praag, H. et al., 2002. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature*, 415(February), pp.1030–1034.
- Van Praag, H. et al., 1999. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(23), pp.13427–13431.
- Van Praag, H., Kempermann, G. & Gage, F.H., 2000. Neural consequences of environmental enrichment. *Nature reviews. Neuroscience*, 1(3), pp.191–8.
- Ramirez-Amaya, V. et al., 2006. Integration of new neurons into functional neural networks. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(47), pp.12237–12241.
- Rapp, P.R. & Gallagher, M., 1996. Preserved neuron number in the hippocampus of aged rats with spatial learning deficits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(18), pp.9926–30.
- Ribak, C.E. & Seress, L., 1983. Five types of basket cell in the hippocampal dentate gyrus: a combined Golgi and electron microscopic study. *Journal of Neurocytology*, 12, pp.577–597.
- Rolls, E.T., 2010. A computational theory of episodic memory formation in the hippocampus. *Behavioural Brain Research*, 215(2), pp.180–196.
- Rolls, E.T. & Kesner, R.P., 2006. A computational theory of hippocampal function, and empirical tests of the theory. *Progress in Neurobiology*, 79, pp.1–48.
- Roux, L. & Buzsáki, G., 2014. Tasks for inhibitory interneurons in intact brain circuits. *Neuropharmacology*, 88(September), pp.10–23.
- Sahay, A., Scobie, K.N., et al., 2011. Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. *Nature*, 472, pp.466–470.
- Sahay, A., Wilson, D. a. & Hen, R., 2011. Pattern Separation: A Common Function for New Neurons in Hippocampus and Olfactory Bulb. *Neuron*, 70, pp.582–588.
- Sambandan, S. et al., 2010. Associative plasticity at excitatory synapses facilitates recruitment of fast-spiking interneurons in the dentate gyrus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 30(35), pp.11826–11837.
- Samuels, B.A. & Hen, R., 2011. Neurogenesis and affective disorders. *The European journal of neuroscience*, 33(6), pp.1152–9.

- Sandoval, C.J. et al., 2011. When are new hippocampal neurons, born in the adult brain, integrated into the network that processes spatial information? *PLoS ONE*, 6(3).
- Schinder, A.F. & Bischofberger, J., 2008. Maturation and Functional Integration of New Granule Cells into the Adult Hippocampus. *Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor, (Adult neurogenesis (Gage FH, Kempermann G, Song H, eds))*, pp.299–319.
- Schinder, A.F. & Gage, F.H., 2004. A hypothesis about the role of adult neurogenesis in hippocampal function. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 19, pp.253–261.
- Schmidt-Hieber, C., Jonas, P. & Bischofberger, J., 2004. Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature*, 429(6988), pp.184–187.
- Schultheiss, Nathan W.; Hinman, James R.; Hasselmo, M.E., 2015. *Models and Theoretical Frameworks for Hippocampal and Entorhinal Cortex Function in Memory and Navigation, Analysis and Modeling of Coordinated Multi-neuronal Activity* M. Tatsuno, ed., New York, NY: Springer New York.
- Scoville, W.B. & Milner, B., 1957. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 20(1), pp.11–21.
- Singer, W., 2009. Distributed processing and temporal codes in neuronal networks. *Cognitive Neurodynamics*, 3, pp.189–196.
- Sohal, V.S. et al., 2009. Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. *Nature*, 459(7247), pp.698–702.
- Squire, L.R., 2004. Memory systems of the brain: A brief history and current perspective. *Neurobiology of Learning and Memory*, 82, pp.171–177.
- Sun, G.J. et al., 2013. Seamless reconstruction of intact adult-born neurons by serial end-block imaging reveals complex axonal guidance and development in the adult hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 33(28), pp.11400–11.
- Tashiro, A., Makino, H. & 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(12), pp.3252–3259.
- Temprana, S.G. et al., 2015. Delayed Coupling to Feedback Inhibition during a Critical Period for the Integration of Adult-Born Granule Cells Article Delayed Coupling to Feedback Inhibition during a Critical Period for the Integration of Adult-Born Granule Cells. *Neuron*, 85, pp.116–130.
- Toni, N. et al., 2008. Neurons born in the adult dentate gyrus form functional synapses with target cells. *Nature neuroscience*, 11(8), pp.901–907.
- Tozuka, Y. et al., 2005. GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells. *Neuron*, 47, pp.803–815.

- Treves, A. et al., 2008. What is the mammalian dentate gyrus good for? *Neuroscience*, 154(4), pp.1155–1172.
- Trommer, B.L., Liu, Y.-B. & Pasternak, J.F., 1996. Long-term depression at the medial perforant path-granule cell synapse in developing rat dentate gyrus. *Developmental Brain Research*, 96(1-2), pp.97–108.
- Trouche, S. et al., 2009. Recruitment of adult-generated neurons into functional hippocampal networks contributes to updating and strengthening of spatial memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, pp.5919–5924.
- West, M.J., Slomianka, L. & Gundersen, H.J., 1991. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *The Anatomical record*, 231(4), pp.482–97.
- Womelsdorf, T. et al., 2014. Dynamic circuit motifs underlying rhythmic gain control, gating and integration. *Nature Neuroscience*, 17(8), pp.1031–1039.
- Yuan, Q., Isaacson, J.S. & Scanziani, M., 2011. Linking neuronal ensembles by associative synaptic plasticity. *PLoS ONE*, 6(6).
- Zhao, C. et al., 2006. Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(1), pp.3–11.