



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Dinámica de circuitos excitatorios e inhibitorios y su modulación en la  
neurogénesis adulta del hipocampo

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

Lic. Mora Belén Ogando

Directora de tesis: Dra. Antonia Marín Burgin

Consejero de estudios: Dr. Pablo Schilman

Lugar de trabajo: Instituto de Investigación en Biomedicina de Buenos Aires (IBioBA) -  
CONICET-Instituto Partner de la Sociedad Max Planck

Buenos Aires, Argentina, 2019

## Resumen

---

**Título:** *“Dinámica de circuitos excitatorios e inhibitorios y su modulación en la neurogénesis adulta del hipocampo”*

**Palabras clave:** *Hipocampo, circuitos neuronales, neurogénesis adulta, neuromoduladores, acetilcolina.*

El objetivo general de la tesis es estudiar cómo las células granulares (GC) del giro dentado (DG) del hipocampo procesan la información aferente y cómo cambia el procesamiento en presencia de neuromoduladores, enfocándonos particularmente en la neuromodulación colinérgica.

Las GC comprenden una población heterogénea de neuronas, debido a la existencia de neurogénesis adulta. Las neuronas inmaduras que nacen en el hipocampo adulto procesan los estímulos aferentes de manera diferencial, siendo más excitables, más susceptibles a producir plasticidad a largo plazo (LTP) y capaces de responder a un rango más alto de frecuencias en comparación con las neuronas maduras. Ambas poblaciones de neuronas podrían entonces codificar distintos aspectos de la información aferente. Sin embargo, estas diferencias en el procesamiento podrían no ser fijas sino adaptarse ante distintos requerimientos comportamentales o estados del circuito. El hipocampo recibe, además de las aferencias provenientes de la corteza entorhinal (EC) que conforman el circuito canónico del hipocampo, proyecciones neuromodulatorias. En particular, la neuromodulación colinérgica está implicada en la navegación espacial, el aprendizaje de nuevas memorias episódicas y la atención. Nuestra hipótesis es que las capacidades de procesamiento pueden adaptarse según distintos estados neuromodulatorios. Empleando técnicas tanto farmacológicas como optogenéticas combinadas con electrofisiología demostramos que la Ach es capaz de reconfigurar las propiedades de procesamiento de información aferente en el DG, en particular actuando fuertemente sobre la población de neuronas maduras. El estado neuromodulatorio colinérgico favorece la activación de las GC frente a estímulos aferentes y permite la codificación de frecuencias más altas. El mecanismo circuital involucra la reconfiguración de los circuitos inhibitorios, modificando la contribución relativa de distintas subpoblaciones de neuronas inhibitorias que da como resultado la desinhibición de las GC. Como consecuencia de esta desinhibición, la activación coincidente de la vía aferente proveniente de la EC y la vía colinérgica proveniente del septum produce una potenciación a largo término. Estos fenómenos podrían ser cruciales para la formación de nuevas memorias. Los resultados de esta tesis aportan al entendimiento de los mecanismos que utiliza el sistema nervioso para reconfigurar los circuitos y puede contribuir a comprender cómo los animales adaptan el procesamiento cerebral según el estado comportamental en el que se encuentran.

## Abstract

---

*Title: "Dynamics of excitatory and inhibitory neuronal circuits and their modulation during adult neurogenesis"*

*Keywords: Hippocampus, neuronal circuits, adult neurogenesis, neuromodulators, acetylcholine.*

The general objective of the thesis is to study how the granular cells (GC) of the dentate gyrus (DG) of the hippocampus process the afferent information and how the processing changes in the presence of neuromodulators, focusing particularly on cholinergic neuromodulation.

GCs comprise a heterogeneous population of neurons, due to the existence of adult neurogenesis. Immature neurons that are born in the adult hippocampus process the afferent stimuli in a differential way, being more excitable, more susceptible to producing long-term plasticity (LTP) and capable of responding to a higher frequency range compared to mature neurons. Both populations of neurons could then encode different aspects of afferent information. However, these differences in processing may not be fixed but rather adapt to different behavioral requirements or circuit states. The hippocampus receives, in addition to the afferents coming from the entorhinal cortex (EC) that form the canonical hippocampal circuit, neuromodulatory projections. In particular, cholinergic neuromodulation is involved in spatial navigation, learning new episodic memories and attention. Our hypothesis is that the processing capacities can be adapted according to different neuromodulatory states. Using both pharmacological and optogenetic techniques combined with electrophysiology we have demonstrated that Ach is able to reconfigure afferent information processing properties in DG, particularly by acting strongly on the population of mature neurons. The cholinergic neuromodulatory state favors the activation of the GCs against afferent stimuli and allows the codification of higher frequencies. The circuit mechanism involves the reconfiguration of the inhibitory circuits, modifying the relative contribution of different subpopulations of inhibitory neurons that results in the disinhibition of the GCs. As a consequence of this disinhibition, the coincident activation of the afferent pathway from EC and the cholinergic pathway from the septum produces a long term potentiation. These phenomena could be crucial for the formation of new memories. The results of this thesis contribute to the understanding of the mechanisms used by the nervous system to reconfigure circuits and can contribute to understanding how animals adapt brain processing according to the behavioral state in which they are found.

## Agradecimientos

A Anto, por tu increíble generosidad y apoyo incondicional. Infinitamente agradecida de por vida por estos años compartidos, muy disfrutados y de enorme aprendizaje. Ha sido realmente un placer. Todo lo que me llevo de este labo seguirá multiplicándose.

A Belu, por tu paciencia y enseñanzas, y también por tu hermosa compañía. Aprender de vos es un espectáculo. Gracias también por todos tus consejos de vida.

Al grupo Marín-Burgin-Refojo-Muraro, que es todo un mismo grupo: Noe, primer compa de mates y set up, y con la risa más contagiosa del labo. Quién nos quita lo patcheado! A Seba Romano, por tu ayuda salvadora con MATLAB, y por tu fundamental aporte al ministerio de tortas. Al abrumado Dieguito, y la ITS Olilla, siempre low profile. A Seba Giusti, por tu infinita paciencia y optimismo, y tus enseñanzas moleculares que fueron clave. A Raquelita, por traer las arepas y la alegría venezolana al grupo. A Flor Fernández-Chiappe, mi frenemy #1 de la vida y digna sucesora. A Jero, por tantos asaditos compartidos y esos chistazos de tremenda sofisticación. A Ivuchi, por tantos matuchis dentro y fuera del labo. A Anita, te heredo el ministerio de la joda. A Pedrito, el estresado del grupo. A la chiqui que ya es el segundo labo que compartimos. A Narita, por tu ternura y tu empatía electrofisiológica. A Damián, por.... Por ser **Damián**. Por darlo todo para que el grupo crezca y salga adelante.

Y a la reciente y más hermosa incorporación del grupo: Lulú, que me tolera más que nadie. Gracias por embarcarte en este programa chino transoceánico conmigo.

A Dami Giacomini, por tu enorme ayuda en las primeras rondas de preps de retrovirus, por tu generosidad y buena onda infinitas, sos una ídola.

A Guille Lanuza, por las líneas transgénicas que hicieron este trabajo posible, y por los experimentos aportados al proyecto.

A Pablo Schilman, mi consejero de estudios, siempre salvándome de la burocracia y cuidando los detalles.

A Dani y Jime, porque todo lo que me enseñaron fue fundamental en esta etapa, y lo seguirá siendo en el resto de mi vida científica. Son dos grosos.

A mi hermosa familia: Mamá, Papá, Sofi y Glori, tías, tíos, primos y abuelita. Por estos 30 años llenos de amor.

Gracias a CONICET, a la UBA y al IBioBA-CONICET-MPSP

# Índice

---

<b>Resumen .....</b>	<b>2</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>3</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>8</b>
<b>El Hipocampo .....</b>	<b>9</b>
Estructura .....	9
Función.....	10
<b>El Giro Dentado .....</b>	<b>12</b>
Estructura .....	12
Función.....	14
<b>Neurogénesis Adulta .....</b>	<b>16</b>
Maduración de las GC nacidas durante la adultez.....	18
<b>Circuitos inhibitorios y regulación de la actividad neuronal temporal y espacialmente .....</b>	<b>21</b>
Poblaciones inhibitorias genéticamente definidas y su influencia sobre los patrones de actividad del giro dentado .....	25
<b>Neuromoduladores y su rol en el control de la actividad hipocampal .....</b>	<b>27</b>
Acetilcolina y sus efectos en el hipocampo.....	27
Receptores de acetilcolina y reconfiguración del circuito hipocampal .....	28
<b>Hipótesis y Objetivos .....</b>	<b>31</b>
<b>Materiales y Métodos.....</b>	<b>33</b>
<b>Animales y cirugías .....</b>	<b>34</b>
Preparación del retrovirus .....	37
Preparación de las rodajas agudas de hipocampo.....	37
<b>Registros electrofisiológicos.....</b>	<b>38</b>
Consideraciones generales.....	38
Electrodos de registro .....	38
Estudio de la activación de neuronas individuales con estimulación en forma de trenes .....	38
Experimentos de activación poblacional de las GC mediante registros de campo: .....	39
Registro de las corrientes postsinápticas.....	41
Registro de las corrientes inhibitorias feedforward y feedback .....	42

Registro de propiedades intrínsecas.....	43
<b>Experimentos de optogenética.....</b>	<b>44</b>
Consideraciones generales.....	44
<b>Análisis Estadístico .....</b>	<b>46</b>
<b>Resultados.....</b>	<b>47</b>
<b>Parte 1: Modulación de la actividad evocada de las neuronas del giro dentado en presencia de acetilcolina.....</b>	<b>48</b>
Introducción: Parte 1.....	48
Resultados: Parte 1.1 .....	50
Perfiles de activación de neuronas granulares maduras e inmaduras ante activación de la vía perforante medial a distintas frecuencias y su modulación en presencia de carbacol .....	50
Resultados: Parte 1.2 .....	51
Activación poblacional en el giro dentado y en la región CA3 frente a trenes de estimulación a 10Hz de la vía perforante medial e influencia del carbacol .....	51
Modulación de la actividad evocada en el giro dentado por liberación endógena de acetilcolina..	53
Conclusiones: Parte 1.....	55
Discusión: Parte 1.....	56
Figuras Resultados Parte 1 .....	58
<b>Parte 2: Mecanismo sináptico que genera las diferencias de activación de las células granulares maduras frente a la modulación colinérgica .....</b>	<b>65</b>
Introducción: Parte 2.....	65
Resultados: Parte 2 .....	66
Modulación de las corrientes postsinápticas excitatorias e inhibitorias evocadas en neuronas granulares maduras por liberación endógena de acetilcolina .....	66
Conclusiones: Parte 2.....	67
Discusión: Parte 2.....	67
Figuras Resultados Parte 2 .....	69
<b>Parte 3: Modulación colinérgica de los circuitos inhibitorios en el giro dentado.....</b>	<b>72</b>
Introducción: Parte 3.....	72
Resultados: Parte 3.1 .....	73
La acetilcolina reduce específicamente el componente feedforward de la inhibición evocada en neuronas granulares maduras .....	73
Resultados: Parte 3.2 .....	74

La acetilcolina reduce la inhibición reclutada por la población de neuronas inhibitorias que expresan parvalbumina, pero no la inhibición reclutada desde interneuronas de tipo SOM .....	74
Resultados: Parte 3.3 .....	75
La acetilcolina modula de manera opuesta el balance excitación inhibición de interneuronas de tipo PV vs interneuronas de tipo SOM.....	75
Conclusiones: Parte 3 .....	77
Discusión: Parte 3.....	77
Figuras Resultados Parte 3 .....	81
<b>Parte 4: Consecuencias funcionales de la modulación colinérgica.....</b>	<b>85</b>
Introducción: Parte 4.....	85
Resultados: Parte 4.1 .....	86
Conclusiones: Parte 4.1 .....	87
Discusión: Parte 4.1.....	87
Figuras Resultados Parte 4 .....	89
<b>Conclusiones finales.....</b>	<b>92</b>
<b>Abreviaturas.....</b>	<b>97</b>
<b>Referencias .....</b>	<b>99</b>

# Introducción

---



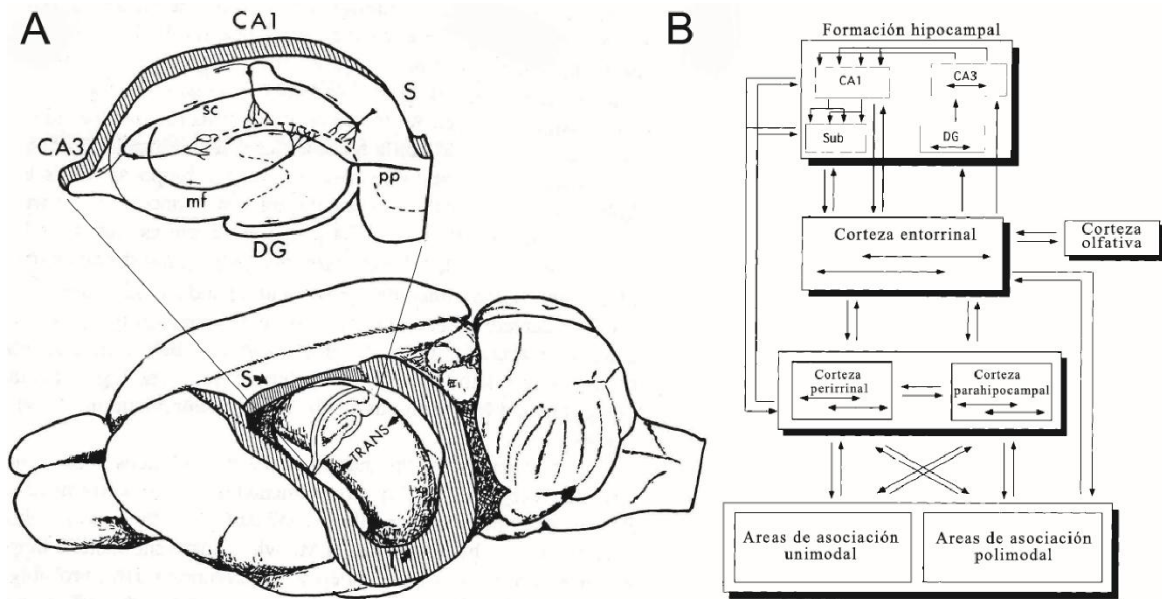
# El Hipocampo

## Estructura

Ubicado en el 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 (EC), región considerada de “procesamiento asociativo polisensorial” (Fig. I.1) (Lavenex and Amaral, 2000). Además, a través del giro dentado, el hipocampo recibe aferencias del núcleo septal, del hipotálamo y del tallo neuronal (Johnston, 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, 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 (Lomo, 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 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.1).

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 “*feedforward*”, es decir, hacia adelante. Las neuronas granulares (GC) del DG reciben las aferencias de la EC y mandan sus axones, conocidos como “*mossy fibers*”, hacia CA3, dónde contactan las dendritas de las células piramidales (Fig. I.1A). 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*.



**Figura 1.1. 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 (EC), 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 EC. 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).

## 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. (Dossani et al., 2015), 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 EC) 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 and 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 et al., 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 and 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 podría 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 and 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 (Buzsaki and 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 memoria. Un ejemplo es la representación de experiencias que ocurren en distintos contextos espaciales a través de 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 DG del hipocampo, por su escasa y dispersa actividad, realiza *pattern separation* y la región de CA3, mediante sus conexiones recurrentes, realiza *pattern completion* (Marr, 1971, Olton and Paras, 1979, Gilbert et al., 2001, Rolls and Kesner, 2006, Treves et al., 2008, Rolls, 2010).

Así, para comprender los mecanismos por los cuales el hipocampo lleva a cabo sus funciones es fundamental el estudio de la funcionalidad de las distintas sub-regiones del hipocampo, teniendo en cuenta la conectividad y los componentes de los circuitos, su actividad poblacional y dinámica temporal, así como 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.

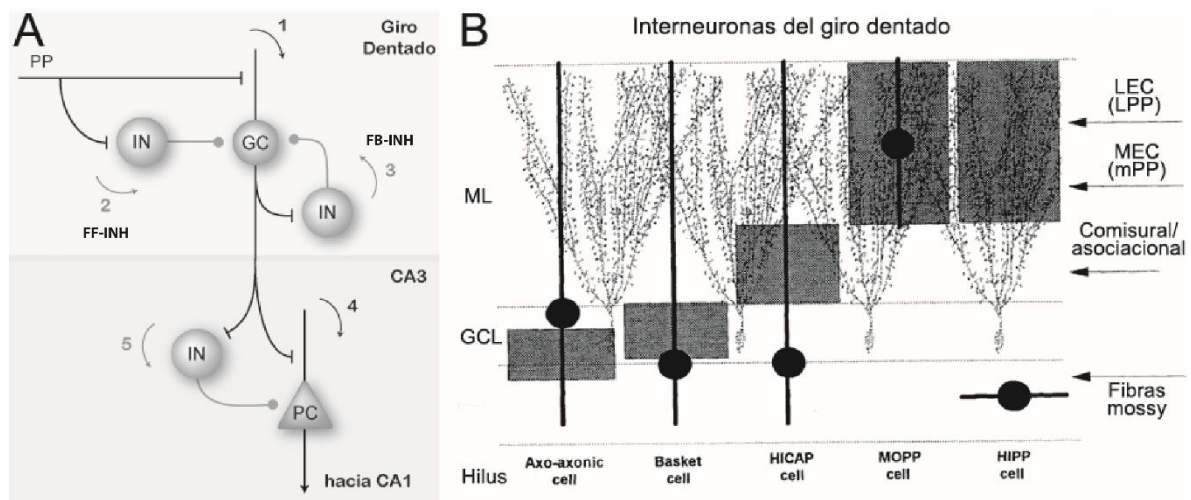
## El Giro Dentado

### Estructura

El 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, las 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. 1.2).

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 *feedback* y aferencias provenientes del lado contralateral del hipocampo (Johnston, 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 “*feedforward*” (Fig. I.2).



**Figura I.2. Microcircuitos del DG.** **A.** Esquema de las conexiones principales aferentes y eferentes de las células granulares (GC) del DG. 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 *feedforward* (FF-INH) 3: Las GC estimulan IN que luego hacen sinapsis inhibitorias sobre las GC. Esta inhibición se denomina *feedback* (FB-INH). 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 DG. Se indican las tres capas del DG: 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 DG. 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 (*mossy fibers*) 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 “*feedback*” (Fig. I.2A) (Ribak and Seress, 1983, Acsady et al., 1998). En CA3 las *mossy fibers* 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.2B) (Freund and Buzsaki, 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 la eferencia de estas células. 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 zona sub-granular (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 al circuito (Toni and Schinder, 2015). 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 1,5 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 and Gallagher, 1996). Esto muestra que 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 DG 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 and 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. La baja actividad de las GC puede deberse a la fuerte inhibición *feedforward* y *feedback* que se recluta en el DG frente la estimulación aferente. De hecho, en el laboratorio se ha demostrado que

los circuitos inhibitorios son los responsables de generar las bajas tasas de activación de las neuronas maduras del GC, así como de filtrar estímulos que llegan a altas frecuencias (Pardi et al., 2015). Sin embargo, en un escenario de fuerte predominancia de los circuitos inhibitorios, ¿cómo logran las GC liberarse de dicha inhibición para producir ráfagas de potenciales de acción a altas frecuencias?

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 estaba 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 and 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 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. El empleo de estrategias moleculares para reactivar engramas de GC que expresaron el marcador de actividad c-Fos durante la exploración de un contexto determinado ha permitido demostrar que estos engramas son necesarios y suficientes para la expresión de nuevas memorias de miedo contextual (Liu et al., Poo et al., 2016). Por lo tanto, las GC del DG cumplen un rol central en la formación de nuevas memorias. Resulta difícil imaginar que en este escenario de quiescencia de las GC se produzcan fenómenos de plasticidad sináptica como LTP necesarios para la formación de memorias, que normalmente requieren activación a alta frecuencia. Una hipótesis que puede ayudar a conciliar esta aparente contradicción, es que dependiendo del estado del cerebro, las neuronas de un mismo circuito pueden llevar a cabo distintas funciones en el procesamiento de información. De esta manera, se podría adaptar el tipo de codificación a los requerimientos comportamentales de una tarea determinada.

Debido a la existencia de la neurogénesis adulta, la población de GC del DG 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 (Espósito et al., 2005, Ge et al., 2007, Mongiat et al., 2009). Sus características fisiológicas únicas y la secuencia de maduración de sus contactos sinápticos aferentes explican por qué las mismas muestran patrones de actividad diferentes a los del resto de las GC del circuito. Además, debido a estas mismas características, las propiedades de procesamiento de ambas poblaciones podrían ser alteradas independientemente por sistemas neuromodulatorios. En esta tesis estudiamos la capacidad de poblaciones de GC de distintas edades madurativas de participar de la actividad global del DG frente a distintos tipos de estimulación, y en distintos estados neuromodulatorios del circuito. A continuación, detallaremos la función de la neurogénesis adulta y la secuencia de maduración de las GC nacidas en el adulto.

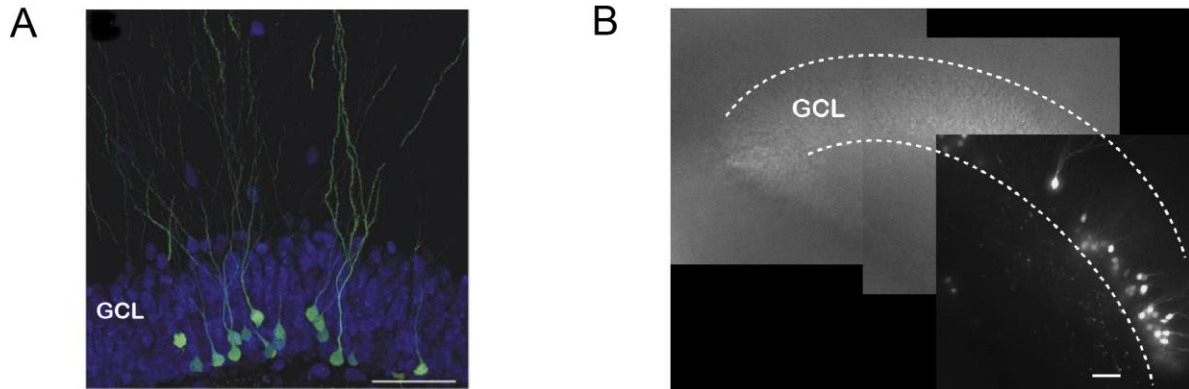
## Neurogénesis Adulta

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; SGZ del DG del hipocampo que da lugar a nuevas GC, neuronas principales de proyección del DG (Gage, 2000). Cabe resaltar que en humanos se han encontrado neuronas nacidas en el adulto en el estriado (Bergmann et al., 2015) y en el hipocampo (Eriksson et al., 1998, Boldrini et al., 2018). Sin embargo, recientemente se ha despertado cierta controversia respecto de la presencia de neurogenesis hipocampal en humanos adultos (Kempermann et al., 2018, Lee and Thuret, 2018, Snyder, 2018, Sorrells et al., 2018).

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 1.3. 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 anticuerpos 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 DG. Barra de calibración: 50  $\mu$ 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 and Lim, 2004). En el DG del hipocampo, la neurogénesis ocurre a una tasa de 9000 neuronas por día en una rata adulta (Cameron and McKay, 2001) y representa un 3-6% del total de las GC por mes. Entre un 50% y 75% muere entre los 6 y 28 días de maduración (Cameron and 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), 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). 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, Marin-Burgin and Schinder, 2012). Además, más recientemente se demostró que su silenciamiento mediante técnicas optogenéticas impide la adquisición de memorias contextuales (Danielson et al., 2016), lo que demuestra que estas neuronas nacidas en la adultez cumplen una función.

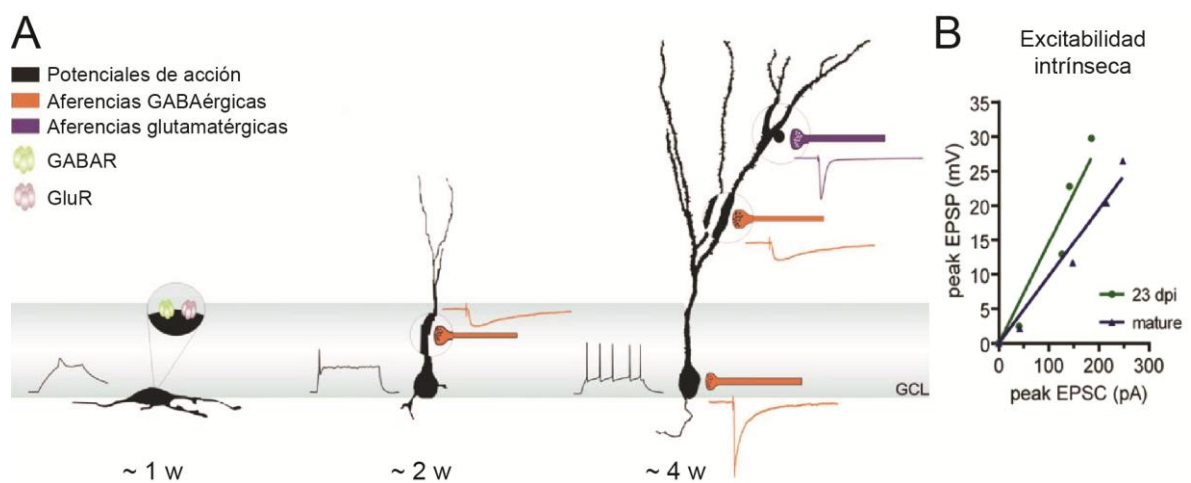
Al considerarse a la neurogénesis adulta como un fenómeno que otorga plasticidad al circuito del DG, resulta relevante el hecho de que la tasa de nacimiento y de supervivencia de neuronas nuevas sea modificable por factores que pudieran requerir su incremento o su decrecimiento (Kempermann et al., 1997, 1998, van Praag et al., 1999, Kronenberg et al., 2003, Tashiro et al., 2007).

### Maduración de las GC nacidas durante la adultez

La marcación con retrovirus ha permitido la visualización detallada de la morfología de las neuronas nuevas (Fig. 1.3), así como la caracterización de su fisiología y conectividad a distintos tiempos, a lo largo de su maduración (van Praag et al., 2002, Ming and 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 GCL (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<sub>A</sub> (Espósito et al., 2005). En esta instancia el GABA es excitatorio porque el potencial de reversión del Cl<sup>-</sup> está despolarizado (-35 mV) debido a la expresión del co-transportador de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup>, NKCC1 (Ge et al., 2007).

Entre la segunda y la tercera semana de edad, las GC 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., 2007); por ende se registran corrientes inhibitorias post-sinápticas espontáneas lentas, correspondientes a las sinapsis GABAérgicas dendríticas. Además, entre las dos y las tres semanas de madurez, los axones de las GC nuevas ya se encuentran extendidos sobre CA3 (Toni et al., 2008, Sun et al., 2013).



**Figura 1.4. 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 y cuatro semanas de edad aproximadamente (1 w, 2 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 potencial postsináptico excitatorio (EPSP) que las células granulares maduras nacidas durante el desarrollo (azul). Adaptado de Mongiat y col., 2009 (Mongiat et al. 2009).

A las cuatro semanas las GC nacidas en el adulto poseen ya la morfología característica de las GC 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 (Espósito et al., 2005, Mongiat et al., 2009, Pardi et al., 2015). 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 neuronas inhibitorias del DG se establecerían con posteridad (Gu et al., 2012, Temprana et al., 2015).

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. 1.4B). 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 del resto de las neuronas del cerebro, el LTP en estas neuronas puede inducirse en condiciones de inhibición intacta, sugiriendo que las GC de cuatro semanas podrían tener una función importante en los procesos de aprendizaje y memoria.

En nuestro y otros laboratorios se ha demostrado que las GC de cuatro semanas de edad poseen características únicas de procesamiento de estímulos. Debido a la secuencia de maduración de los contactos aferentes, durante esta ventana temporal las GC presentan una menor inhibición perisomática comparada con la GC maduras, lo que produce que la inhibición que reciben sea más lenta. Esto genera un mayor balance excitación/inhibición (E/I) en el momento de la producción del potencial de acción, y por lo tanto las GC inmaduras de cuatro semanas tienen una mayor probabilidad de disparo en comparación con las GC maduras. Además, estas neuronas presentan menos especificidad de inputs comparada con las neuronas maduras, es decir que son capaces de responder con mayor facilidad a diversos inputs dentro de una misma vía, integrando información aferente (Marín-Burgin et al., 2012).

Como hemos mencionado, la principal vía de entrada aferente al hipocampo es desde la EC, a través de la vía perforante. Se ha observado que en animales despiertos la actividad de la EC está sincronizada, oscilando a distintas frecuencias, y los potenciales de acción de las neuronas principales de esta región están acoplados a estas frecuencias. Por lo tanto, nuestro grupo ha estudiado cómo las distintas poblaciones

de GC procesan estímulos más complejos, en particular, trenes de estimulación a distintas frecuencias. De esta manera, se ha demostrado que las neuronas inmaduras de cuatro semanas son capaces de seguir un rango más amplio de frecuencias en comparación con las neuronas maduras (Pardi et al., 2015).

De hecho, estudios posteriores en ratones despiertos han corroborado muchas de estas propiedades: Se ha observado que *in vivo* las neuronas nacidas en el adulto son más activas y menos específicas, exhibiendo *place fields* amplios con menor información espacial, y que a lo largo de su maduración las mismas disminuyen su frecuencia de activación y codifican información espacial más precisa (Danielson et al., 2016).

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, Mongiat et al., 2009).

¿Son las capacidades de procesamiento de estímulos fijas en estas dos poblaciones de neuronas? ¿O pueden variar durante distintos estados del cerebro o distintos desafíos cognitivos? La demostración de que diferencias en el balance E/I, como el que ocurre entre neuronas maduras e inmaduras en el DG, producen cambios importantes en la manera en que las neuronas procesan actividad aferente abre la posibilidad de estudiar los mecanismos que usa el cerebro para modificar dicho balance, como manera de adaptar las respuestas en función de los requerimientos de procesamiento. 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.

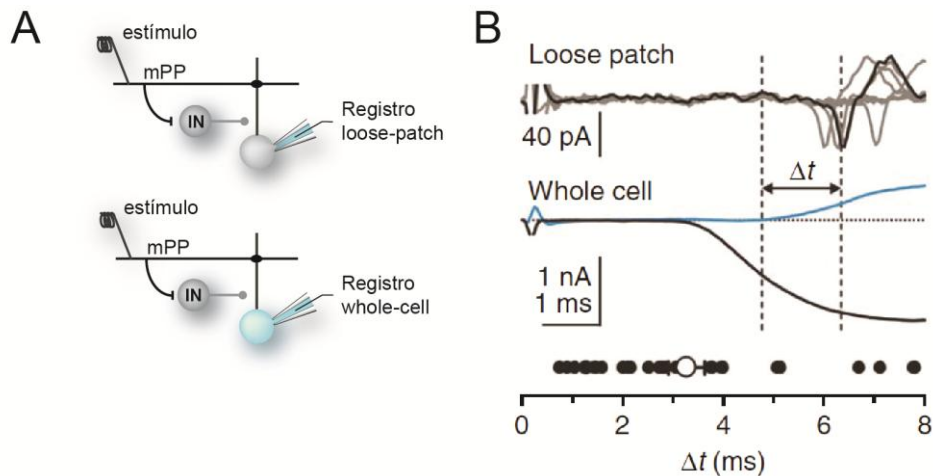
## Circuitos inhibitorios y regulación de la actividad neuronal temporal y espacialmente

Numerosos estudios que analizan la función de los circuitos inhibitorios en relación a los excitatorios demuestran que un balance diferencial de la E/I puede afectar la

función de los circuitos de diversas maneras. En muchas regiones del cerebro, incluido el hipocampo, existen distintos tipos de interneuronas inhibitorias que se activan formando circuitos de inhibición *feedforward* y *feedback*.

En los circuitos con inhibición *feedforward* (FF-INH), la activación de una vía aferente produce además de la excitación directa de las neuronas postsinápticas, la excitación en paralelo de interneuronas que contactan a las mismas neuronas postsinápticas (Fig. I.5 e I.6 A). Esto produce, como consecuencia, una excitación mono-sináptica seguida de una inhibición di-sináptica en las neuronas blanco. Esta FF-INH, se observa en numerosos circuitos no solo del hipocampo sino también de la corteza o de la vía tálamo cortical (Isaacson and Scanziani, 2011). En el hipocampo, y probablemente también en otras regiones del cerebro, la FF-INH controla tanto la ventana temporal de activación de las neuronas postsinápticas (Pouille and Scanziani, 2001), como el grado de excitabilidad de la población de las neuronas en respuesta a una estimulación aferente (Pouille et al., 2009). La FF-INH es muy rápida, 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.5A). Como la FF-INH crece con la intensidad de los estímulos, puede ajustar dinámicamente la excitabilidad de la población de 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 representación de estímulos en la población neuronal (Pouille et al., 2009).

En los circuitos con inhibición de tipo *feedback* (FB-INH), la activación de una población de neuronas excitatorias produce la activación de interneuronas que inhiben su propia actividad (Fig. I.6 B). La FB-INH está por un lado relacionada a la terminación de la respuesta evitando estados de reverberación en el circuito (Kullmann, 2011, Roux and Buzsaki, 2015), pero por otro lado, la oscilación de distintas interneuronas que ejercen FB-INH puede generar patrones rítmicos en la población de neuronas excitatorias (Cardin et al., 2009, Sohal et al., 2009). En el DG 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 (Bragin et al., 1995, Charpak et al., 1995, Chrobak and Buzsaki, 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.



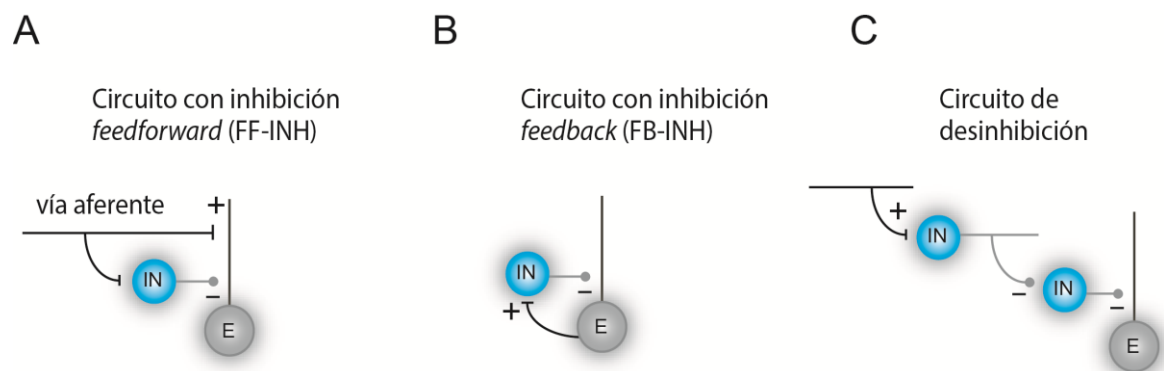
**Figura 1.5. Relación temporal entre las corrientes postsinápticas y la activación.** **A.** Esquema de los registros en B. La estimulación de la vía aferente activa a las células principales y a interneuronas inhibitorias locales, produciendo inhibición en forma *feedforward* (FF-INH). Los potenciales de acción se registran en configuración *loose patch*. Las corrientes postsinápticas se registran en la misma célula en configuración *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 (Poullie 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 de potenciales de acción y por lo tanto influye la generación o no de potenciales de acción.

Los estímulos fisiológicos activan ambos circuitos inhibitorios, que están constituidos por diversas poblaciones de interneuronas, algunas de las cuales se pueden activar tanto de forma *feedforward* como *feedback* (Sambandan et al., 2010, Kullmann, 2011, Roux and Buzsaki, 2015). 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 *feedforward* o *feedback*, distintos tipos de interneuronas inervan distintas regiones de las neuronas excitatorias, regulando espacialmente la influencia de entradas sinápticas, como se mostró en la Figura 1.2. Por ejemplo, la inhibición dendrítica puede generar el apagado de sinapsis excitatorias específicas, mientras que la inhibición perisomática ignora la especificidad de las aferencias dendríticas puesto que actúa río debajo de las mismas, pero resulta totalmente determinante a la hora de “decidir” si una neurona va a activarse o no (Paulsen and Moser, 1998, Roux and Buzsaki, 2015). 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 and Moser, 1998).

Por último, la mayor parte de los distintos tipos de interneuronas inhibitorias tienen cierto grado de conectividad entre ellas, es decir que se inhiben mutuamente tanto de manera homotípica (entre neuronas iguales) como heterotípica (entre distintos tipos neuronales). Sin embargo, estas conexiones representan generalmente una parte minoritaria de sus eferencias (5-15%), comparada con la inervación a neuronas principales. En cambio, existe una familia de interneuronas que inhiben preferencialmente a otras interneuronas (ISI, por sus siglas en inglés *interneuron selective interneuron*), siendo especializadas en la desinhibición de la red (Fig. I.6 C). En la siguiente sección profundizaremos sobre las distintas familias de neuronas inhibitorias en el DG (Pelkey et al., 2017).



**Figura I.6. Tipos de circuitos inhibitorios en el DG.** **A.** En el circuito inhibitorio de tipo *feedforward*, la activación de la vía aferente recluta en paralelo inhibición disináptica sobre la neurona principal. **B.** En el circuito inhibitorio de tipo *feedback*, la activación de una neurona principal produce inhibición reclutada sobre ella misma. **C.** En el circuito desinhibitorio, la activación de la vía aferente produce la activación de una población de interneuronas que inhibe a otra población de interneuronas, que a su vez inhibe a la neurona principal. El efecto neto es, por lo tanto, la desinhibición de la neurona principal.

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. Además, estas diferencias de conectividad con circuitos inhibitorios específicos podrían permitir la modulación independiente de ambas poblaciones de neuronas excitatorias, siendo unas más sensibles que otras a variaciones en diversos subcircuitos inhibitorios.

### Poblaciones inhibitorias genéticamente definidas y su influencia sobre los patrones de actividad del giro dentado

En contraste con el repertorio de tipos neuronales excitatorios, existe una enorme heterogeneidad morfológica, fisiológica y anatómica de tipos neuronales inhibitorios, que permiten que patrones de circuitos relativamente simples logren reproducir una gran cantidad de patrones de actividad, adaptables a distintas condiciones. En un intento por comprender el rol que cumplen las distintas subpoblaciones de neuronas inhibitorias, en los últimos años se han desarrollado técnicas que permiten manipularlas individualmente, mediante marcadores moleculares específicos. ¿Cuál es la identidad genética de las interneuronas responsables de llevar a cabo los distintos tipos de inhibición en el DG del hipocampo?

En esta región, existen principalmente dos grandes poblaciones de interneuronas que expresan marcadores moleculares exclusivos: Las interneuronas de tipo “*fast spiking*” (en español “de disparo rápido”, por sus altas frecuencias de disparo) también llamadas *basket cells*, que expresan la proteína parvalbumina (PVI), y las que expresan la proteína somatostatina (SOMI). Su rol funcional en el giro dentado depende de sus propiedades funcionales, morfológicas, y de la localización de sus proyecciones. Las PVI reciben excitación convergente tanto de la PP en sus dendritas apicales como de las *mossy fibers* en sus dendritas basales, y dado que sus axones proyectan al soma de las GC, las mismas proveen una fuerte inhibición tanto de tipo *feedforward* como de tipo *feedback*. Como se mencionó anteriormente, esta inhibición resulta clave para controlar el tiempo de disparo de las neuronas, así como para controlar la ganancia y el rango dinámico del circuito.

Por su parte, las SOMI del DG están mucho menos estudiadas, siendo normalmente agrupadas en una sola población llamada HIPP (SOMI del hilus asociadas a la vía perforante) (Freund and Buzsaki, 1996, Savanthrapadian et al., 2014). Las mismas proyectan hacia la capa molecular externa, y reciben contactos excitatorios por parte de las *mossy fibers*. Por lo tanto, esta subpoblación de neuronas estaría en una posición óptima para ejercer una inhibición de tipo dendrítica y *feedback*. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que existe una segunda subpoblación de SOMI. Las interneuronas llamadas HIL (interneuronas asociadas al hilus), con axones que proyectan hacia el hilus. Las mismas ejercen una fuerte inhibición perisomática sobre otras interneuronas en el hilus (principalmente PVI), y además presentan proyecciones de largo alcance hacia el septum medial. Se ha propuesto que estas interneuronas pueden ser capaces de regular los patrones de actividad en el DG, sincronizando la actividad del circuito con la actividad theta dirigida desde el septum medial. Es interesante mencionar que las dos subpoblaciones de interneuronas SOMI presentan formas opuestas de plasticidad de largo término cuando se activan las GC. Mientras que las HIPP exhiben LTD cuando son despolarizadas en simultáneo con la estimulación de GCs, lo opuesto ocurre con las HILs. Cabe destacar que ambos mecanismos serían capaces de producir un aumento neto en la excitabilidad del DG: ya sea por disminución de la inhibición de tipo *feedback*, como por el aumento de la inhibición reclutada sobre otras interneuronas (desinhibición), respectivamente (Yuan et al., 2017).

Existe creciente evidencia que muestra que los circuitos inhibitorios del hipocampo están finamente regulados por mecanismos múltiples. Las distintas clases de interneuronas inhibitorias están interconectadas formando una red interactiva. Se ha propuesto que estas redes inhibitorias proveen al circuito de un contexto de oscilaciones coordinadas, sobre el cual las neuronas principales codificarían el contenido (Freund and Buzsaki, 1996).

¿Por qué existe una clase específica de interneuronas, especializada en inhibir a otras interneuronas exclusivamente? Una posibilidad es que estas neuronas sean las encargadas de comunicar al circuito cambios específicos en el estado de la red, por ejemplo, a través de sistemas neuromodulatorios. Esto permitiría un rápido control del tipo de codificación de toda la red, proveyendo ventanas temporales que favorecen ciertos mecanismos de plasticidad. En el presente trabajo exploraremos esta hipótesis.

## Neuromoduladores y su rol en el control de la actividad hipocampal

Existen diversos sistemas neuromodulatorios incluyendo el colinérgico, noradrenérgico, serotoninérgico y dopaminérgico, que se activan en respuesta a momentos de incerteza en los cuales se requiere enfocar la atención en eventos en los que la realidad observada difiere de la expectativa (Lee and Dan, 2012, Palacios-Filardo and Mellor, 2018). En estas situaciones, las representaciones internas necesitan actualizarse, proceso que requiere de cambios sinápticos de largo término. A través de una variedad de mecanismos, se ha demostrado que estos neuromoduladores facilitan la inducción y/o expresión de plasticidad a largo término en el hipocampo. En condiciones fisiológicas esto puede ser crítico para la actualización de las memorias con información relevante para mejorar la precisión de futuras predicciones (Prince et al., 2016, Palacios-Filardo and Mellor, 2018).

Sin embargo, la gran mayoría de los eventos son ignorados y por lo tanto es necesario un filtro que opere para asegurar que solo los eventos más importantes/relevantes sean recordados. En este sentido, numerosos estudios muestran que un incremento en la incertidumbre/sorpresa normalmente involucra la liberación de neuromoduladores y resulta por lo tanto en alteraciones en la prominencia del evento (Prince et al., 2016).

Los neuromoduladores pueden modificar distintos aspectos de la transmisión sináptica y propiedades intrínsecas de las neuronas. Normalmente es difícil predecir el efecto neto de un neuromodulador debido a que suelen activarse en simultáneo distintos tipos de receptores en distintos tipos neuronales que pueden producir efectos opuestos, o suceder en distintas escalas temporales. Es por eso que es importante estudiar, no solo los componentes individuales del circuito, sino también el efecto global en el procesamiento de estímulos. En este trabajo investigaremos en particular el rol de la acetilcolina (ACh) en el procesamiento de estímulos aferentes provenientes de la EC en el DG del hipocampo.

### Acetilcolina y sus efectos en el hipocampo

Además de su rol en el sistema nervioso periférico, la ACh actúa en el sistema nervioso central como un neuromodulador, modificando la excitabilidad neuronal, la probabilidad de liberación a nivel de la presinapsis, la plasticidad sináptica, entre otros

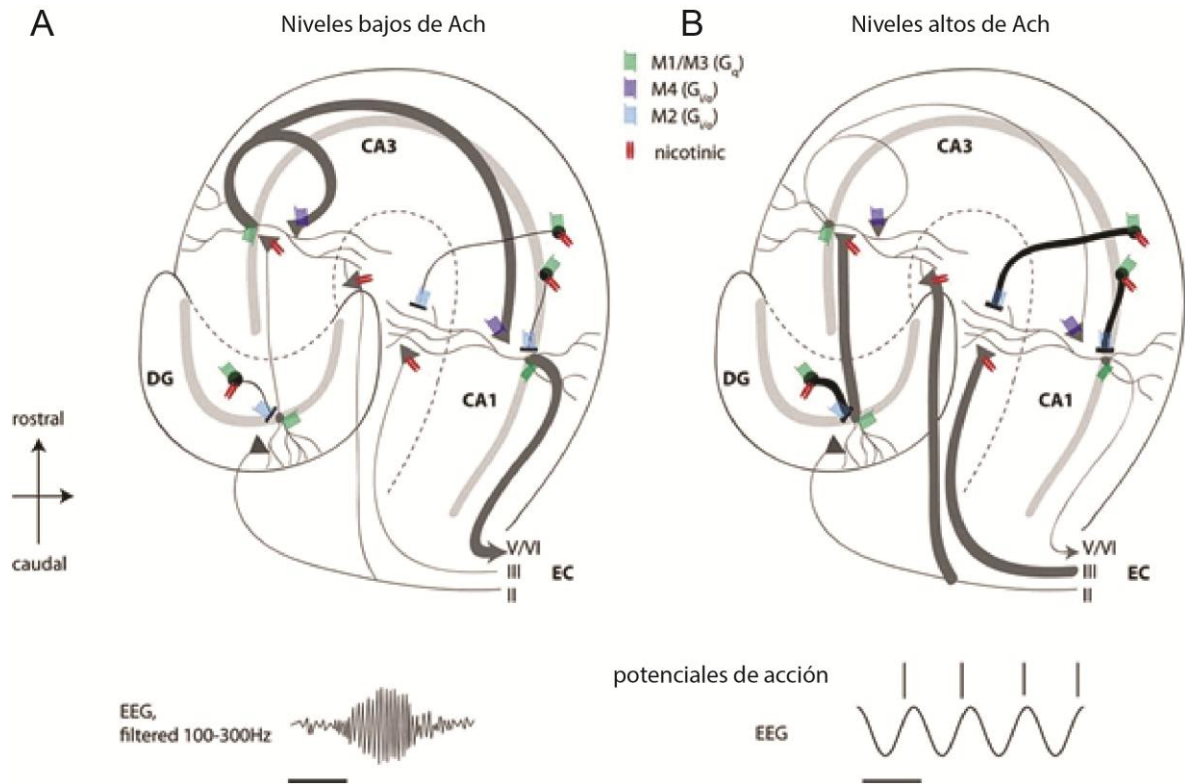
procesos. Existe evidencia empírica que vincula a este neuromodulador con funciones cognitivas incluyendo atención a estímulos sensoriales (Sarter et al., 2005, Pinto et al., 2013, Bloem et al., 2014), codificación de localización y velocidad de movimiento, aprendizaje y memoria, así como un rol sustancial regulando las transiciones entre el sueño y la vigilia (Xu et al., 2015). Se cree que la Ach aumenta el cociente señal/ruido, mejorando la atención, aunque también modifica la dinámica del circuito hipocampal, lo cual podría explicar su rol en el aprendizaje y la memoria observado en estudios con humanos y roedores. El hipocampo recibe aferencias colinérgicas desde el septum medial y la banda de Broca (Mesulam et al., 1983, Wainer et al., 1985). La conectividad entre estas dos regiones es compleja, involucrando bidireccionalmente a varios tipos neuronales: glutamatergicos, gabaérgicos y colinérgicos. Los niveles de Ach aumentan durante la vigilia activa y la exploración/presentación de estímulos o ambientes novedosos, y están asociados a una dominación de oscilaciones theta en registros de campo hipocampales (Dannenberg et al., 2015). De hecho, se ha propuesto que el septum actúa como marcapasos de estas oscilaciones, ya que su actividad antecede a la actividad en el hipocampo. Las oscilaciones están temporalmente estructuradas y coordinan la actividad a diferentes niveles, desde la sincronización hasta la organización de la plasticidad sináptica. De hecho, el mismo estímulo a frecuencia theta puede inducir tanto LTP como LTD dependiendo en qué fase de la oscilación se aplique (Hyman et al., 2003).

Se sabe que la administración de antagonistas colinérgicos, tanto muscarínicos como nicotínicos, produce amnesia en humanos y roedores debido a problemas de aprendizaje pero no evocación (Ohno et al., 1993, 1994, Atri et al., 2004). En cambio, aumentar los niveles de Ach mediante la aplicación de inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) produce problemas en la evocación, pero no en el aprendizaje.

### Receptores de acetilcolina y reconfiguración del circuito hipocampal

La mayoría de las terminales colinérgicas en el hipocampo, al igual que en otras regiones corticales, no presentan estructuras postsinápticas especializadas, lo cual sugiere una neurotransmisión volumétrica, liberando ACh directamente al espacio extracelular. Existen dos clases principales de receptores de ACh: Muscarínicos y nicotínicos. Los mismos se encuentran expresados tanto en neuronas principales como en interneuronas inhibitorias e incluso en astrocitos, por lo que predecir el efecto global de la modulación colinérgica resulta muy complejo (Teles-Grilo Ruivo and Mellor, 2013). La gran mayoría de los estudios clásicos que evalúan la modulación

colinérgica del circuito hipocampal se basan en enfoques farmacológicos, mientras que los cambios producidos por la liberación de Ach endógena están menos estudiados. Resumiremos a continuación las principales observaciones encontradas a partir de estudios farmacológicos: En primer lugar, los receptores muscarínicos pueden incrementar la excitabilidad intrínseca de diversos tipos neuronales, incluyendo GC, neuronas piramidales e interneuronas inhibitorias. Se ha demostrado, además, que los mismos pueden disminuir la neurotransmisión específicamente en sinapsis recurrentes excitatorias, así como en ciertos tipos de sinapsis inhibitorias. Tanto agonistas muscarínicos como nicotínicos pueden favorecer la inducción de LTP en el hipocampo (Prince et al., 2016). Finalmente, la activación de receptores nicotínicos en terminales axonales puede producir la liberación de neurotransmisores de manera independiente de potencial de acción, tanto en *mossy fibers* como en axones de PVI (MacDermott et al., 1999, Tang et al., 2011). A partir de todos estos estudios se ha postulado un modelo (explicado en detalle en la Figura I.7) para explicar los efectos globales de la modulación colinérgica en el hipocampo. Brevemente, niveles elevados de actividad colinérgica tiene como principal efecto promover la influencia de entradas aferentes en el sentido directo o *feedforward* del circuito, mientras que simultáneamente suprime la influencia de las conexiones de tipo *feedback*. De esta manera, se ha demostrado que la activación de receptores nicotínicos produce un aumento en la señal *feedforward*, mientras que la inhibición presináptica de las conexiones de tipo *feedback* es causada por receptores muscarínicos. Si bien este modelo describe con gran nivel de detalle los efectos de la Ach en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo, sus consecuencias en el microcircuito del DG, y en particular del circuito EC-DG están mucho menos exploradas. En particular, la vía que parte desde la capa II de la EC hacia el DG del hipocampo aparece idéntica en ambos estados neuromodulatorios. El objetivo de esta tesis es explorar más profundamente el rol de la Ach en la modulación de entradas aferentes provenientes de la EC en el DG del hipocampo.



**Figura 1.7. Niveles altos de Ach aumentan la respuesta a estímulos aferentes y suprimen la dinámica de consolidación en el hipocampo.** Dibujo esquemático de una rodaja de hipocampo transversal con las principales conexiones del circuito y la localización de receptores muscarínicos y nicotínicos **A**. Cuando la liberación de ACh es baja, la recurrencia excitatoria en el hipocampo es alta, lo cual permite la consolidación de memorias en engramas autoasociativos, así como la recuperación de memorias previamente almacenadas (*retrieval*), durante los momentos de actividad de tipo “*Sharp wave ripples*”. **B**. Niveles altos de Ach resultan en un aumento en transmisión desde las *mossy fibers* y la PP, potenciando entradas aferentes al hipocampo, lo cual favorece la codificación de nueva información sensorial, y por lo tanto el aprendizaje. Al mismo tiempo, la despolarización muscarínica de interneuronas y la inhibición presináptica en conexiones recurrentes y en la vía Shaffer colateral, resultan en supresión de excitación recurrente asociada a la recuperación de información. Asimismo, la activación de interneuronas resulta en una mayor precisión en la activación de neuronas piramidales durante las oscilaciones theta. Barra de escala del EEG 125 ms. Neuronas principales con dendritas esquemáticamente dibujadas en gris, círculos negros representan interneuronas, los triángulos representan terminales sinápticas. Ach, acetilcolina; DG, giro dentado; CA, cornu ammoni; EC, corteza entorhinal; EEG electroencefalograma. Adaptado de Hasselmo et al., 2017.

## Hipótesis y Objetivos

---

El giro dentado es la principal vía de entrada de información al hipocampo desde la corteza entorrinal. Debido a la existencia de neurogénesis adulta, el mismo presenta una población heterogénea desde el punto de vista madurativo de neuronas principales. Además, las neuronas maduras e inmaduras procesan estímulos aferentes en forma distinta: Las neuronas inmaduras generadas en el cerebro adulto se activan con estímulos más débiles, responden a un rango de frecuencias mayor y tienen umbrales de potenciación más bajos que las neuronas maduras. Por lo tanto, la información que llega al giro dentado es procesada en paralelo por poblaciones de neuronas que codifican distintos aspectos de la misma. ¿Son estas propiedades de procesamiento fijas?

Además de las aferencias provenientes de la corteza entorrinal, el giro dentado recibe aferencias neuromodulatorias que provienen de distintos centros del cerebro. En particular, las proyecciones colinérgicas se originan en el septum medial y la banda de Broca, y están fuertemente involucradas en las funciones hipocampales, como la adquisición de nuevas memorias, los procesos de atención y aprendizaje, los ciclos de sueño y vigilia, etc.

**En la hipótesis general de esta tesis proponemos que el procesamiento de estímulos aferentes en el giro dentado del hipocampo cambia frente a la activación del sistema neuromodulatorio colinérgico.**

En el laboratorio se demostró que las propiedades funcionales de las neuronas inmaduras de cuatro semanas están dictadas principalmente por el desarrollo tardío de sus aferencias inhibitorias perisomáticas. Esto produce en las mismas un mayor balance excitación/inhibición que, junto con sus propiedades intrínsecas, explica su mayor excitabilidad ante estímulos aferentes. Los circuitos inhibitorios frecuentemente son blanco de sistemas neuromodulatorios. Por lo tanto, **nuestra hipótesis específica es que la acetilcolina modula diferencialmente a poblaciones de neuronas de distintas edades madurativas.**

Por otro lado, distintas poblaciones de neuronas excitatorias e inhibitorias presentan un repertorio específico de receptores de acetilcolina en distintos compartimientos

subcelulares. **Por lo tanto, nuestra segunda hipótesis específica es que la acetilcolina ejerce efectos heterogéneos en cada una de estas poblaciones, modificando sus propiedades de procesamiento de manera diferencial, y produciendo así, una reconfiguración funcional del circuito.** De esta manera, un mismo circuito puede adaptar sus propiedades de procesamiento a distintos estados de la red.

El **objetivo general** de este trabajo es estudiar cómo la acetilcolina reconfigura los microcircuitos del giro dentado, cambiando la contribución de distintas subpoblaciones de neuronas excitatorias e inhibitorias a la respuesta evocada frente a estímulos aferentes.

Específicamente, planteamos cuatro objetivos:

**Objetivo 1:** Estudiar cómo cambian los perfiles de activación de neuronas maduras e inmaduras en el giro dentado del hipocampo en presencia de modulación colinérgica.

**Objetivo 2:** Evaluar los mecanismos sinápticos que producen los diferentes patrones de actividad en distintos estados de neuromodulación colinérgica.

**Objetivo 3:** Establecer el rol de los circuitos inhibitorios en la reconfiguración de la red y la contribución de distintas poblaciones de neuronas inhibitorias a dichos cambios.

**Objetivo 4:** Evaluar las consecuencias funcionales de la modulación colinérgica en la codificación de estímulos aferentes en el giro dentado del hipocampo, y su rol en los procesos de plasticidad a largo término.



# Materiales y Métodos

---

## Animales y cirugías

Todos los experimentos de esta tesis fueron realizados sobre ratones wild type o transgénicos en fondo genético (*background*) C57BL/6J. Las líneas transgénicas empleadas fueron las siguientes:

Para generar la línea PvalbCre;CAGFloxStopTom (PV-Cre-Tom), ratones B6.129P2-Pvalbtm1(cre)Arbr/J (PV-Cre) (Hippenmeyer et al., 2005) fueron cruzados con condicionales reporteros B6.Cg-Gt(ROSA)26Sortm14(CAG-tdTomato)Hze/J (Ai14). Únicamente animales heterocigotas para Cre fueron usados. Esta línea fue utilizada en la sección R.3-3.

Para generar la línea SOMCre;CAGFloxStopTom (SOM-Cre-Tom), ratones Ssttm2.1(cre)Zjh/J (SOM-Cre), fueron cruzados con condicionales reporteros B6.Cg-Gt(ROSA)26Sortm14(CAG-tdTomato)Hze/J (Ai14). Únicamente animales heterocigotas para Cre fueron usados. Esta línea fue utilizada en la sección R.3-3.

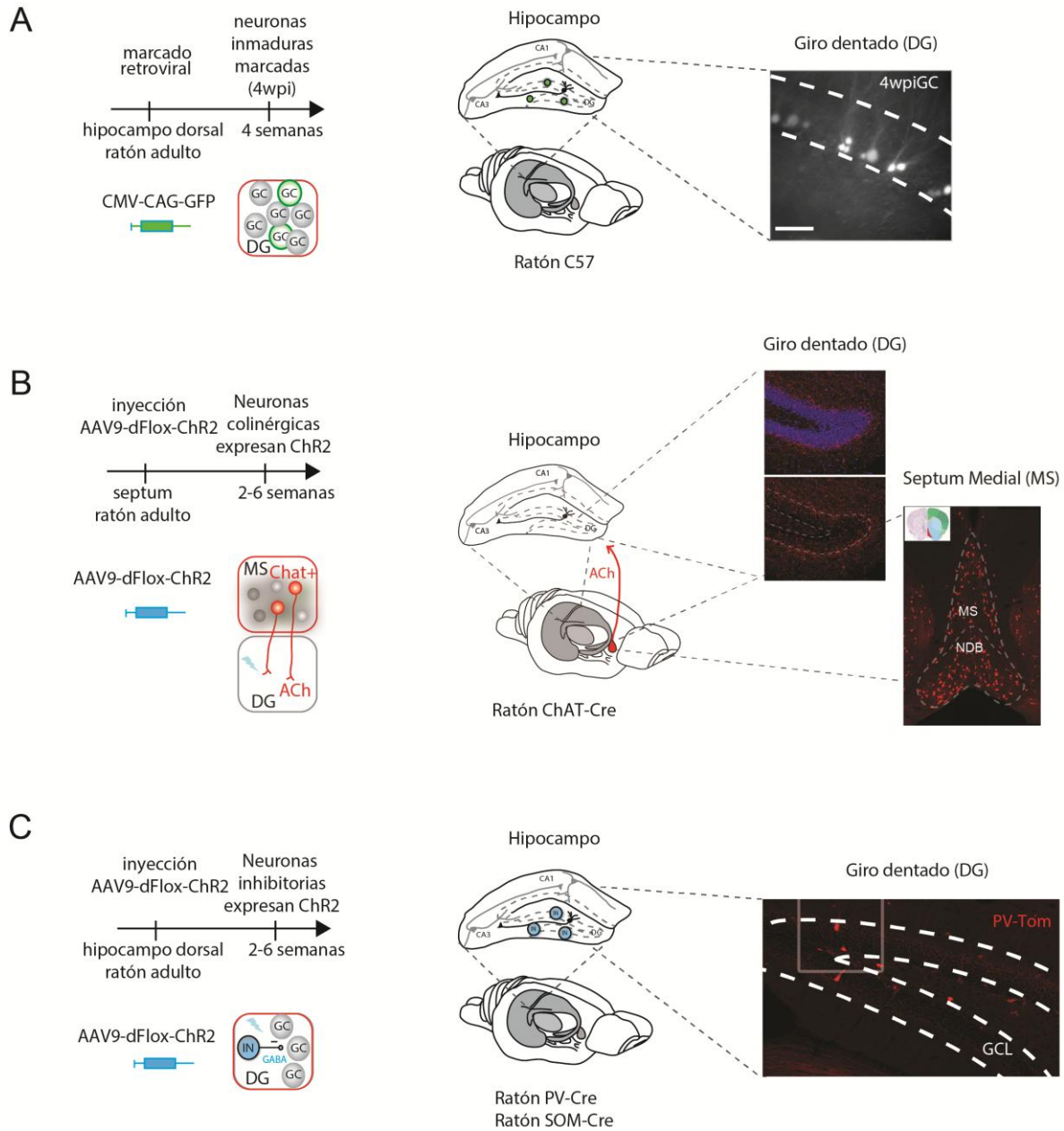
Para generar la línea ChATCre;Ai27FloxStopTom (ChAT-Cre-ChR2), ratones B6;129S6-Chattm2(cre)Lowl/J (ChAT-Cre), fueron cruzados con condicionales channelrhodopsin (ChR2) B6.Cg-Gt(ROSA)26Sortm27.1(CAG-COP4\*H134R/tdTomato)Hze/J (Ai27). Únicamente animales heterocigotas para Cre fueron usados. Esta línea fue utilizada en las secciones R.1-3, R.2-1, R.3-1 y R.4-1.

Para los experimentos que involucran neuronas inmaduras de cuatro semanas (sección R.1-1), los ratones de seis semanas de edad fueron sometidos a una cirugía de inyección intra-hipocampal 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 a cuatro y dos días previos a la cirugía se les colocó 1 rueda para correr por jaula, con la finalidad de aumentar el número de neuronas marcadas (van Praag et al., 1999) y facilitar los estudios electrofisiológicos. Durante la cirugía, anestesiamos 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 (Fig. M.1 A).

Para los experimentos que implican la activación de neuronas colinérgicas con luz (sección R.1-3), el procedimiento quirúrgico fue idéntico, a excepción de que los ratones utilizados fueron animales transgénicos ChAT-Cre. Se inyectó en el septum medial (referencias estereotáxicas, coordenadas desde el bregma: 0.9 mm anteroposterior, lateral 0.0 mm, -3,6 mm ventral) 1ul de adenovirus conteniendo la region codificante de la proteína channelrhodopsin floxeada. Es, decir, que la misma se encuentra interrumpida por un codón de stop (que interrumpe la transcripción) flanqueado por secuencias loxP: AAV9-EF1a-double floxed-hChR2(H134R)-mCherry-WPRE-HGHpA (AAV9-dFlox-ChR2). La enzima Cre reconoce las secuencias loxP y remueve el codón stop, de forma que la transcripción y traducción de la proteína ChR puede completarse únicamente en presencia de dicha enzima. Luego de 2-6 semanas de la cirugía, sacrificamos a los ratones para realizar las rodajas agudas de hipocampo, sobre las cuales podemos activar mediante luz los axones de las neuronas que incorporaron el vector adenoviral, y que además expresan la recombinasa Cre, y por lo tanto expresan ChR2 (Fig. M.1 B).

Para los experimentos de activación por ChR2 de interneuronas inhibitorias (Sección R.3-2), el procedimiento quirúrgico fue idéntico, a excepción de que los ratones utilizados fueron animales transgénicos SOM-Cre y PV-Cre. Se inyectó en el hipocampo dorsal (referencias estereotáxicas, coordenadas desde el bregma: -2 mm anteroposterior, lateral -1.5 mm, -1,9 mm ventral) 0.5µl de adenovirus conteniendo la versión floxeada de la proteína channelrhodopsin: AAV9-dFlox-ChR2. Luego de 2-6 semanas de la cirugía, sacrificamos a los ratones para realizar las rodajas agudas de hipocampo, sobre las cuales podemos activar mediante luz azul a las neuronas que incorporaron el vector adenoviral, y que además expresan la recombinasa Cre, y por lo tanto expresan ChR2 (Fig. M.1 C).

Los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité del Cuidado y Uso de Animales institucional de la Facultad de Ciencias Exactas 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.



**Figura M.1. Esquema experimental.** **A.** Izquierda, la línea indica el momento de la inyección del vector retroviral en ratones C57. Derecha, la foto muestra un ejemplo de una rodaja hipocampal obtenida cuatro semanas después de la inyección, con neuronas inmaduras que expresan GFP. **B.** Izquierda, la línea indica el momento de la inyección del vector adenoviral en ratones ChAT-Cre. Centro, esquema del cerebro de ratón indicando la zona inyectada y un corte transversal del hipocampo. Las líneas punteadas indican las regiones correspondientes a los dos paneles de fotos. Derecha, la foto de arriba muestra un ejemplo de una rodaja hipocampal obtenida dos a seis semanas después de la inyección, con axones colinérgicos expresando mCherry. La foto de abajo muestra una rodaja de la parte anterior basal del cerebro donde se encuentra el septum y la banda diagonal de broca, que contiene somas de neuronas colinérgicas que expresan mCherry. **C.** Izquierda, la línea indica el momento de la inyección del vector adenoviral en ratones PV-Cre o SOM-Cre.

Derecha, la foto muestra un ejemplo de una rodaja hipocampal obtenida dos a seis semanas después de la inyección, con somas de interneuronas expresando mCherry.

## 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-vsrg), 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/ $\mu$ l. Todo el procedimiento se realizó en condiciones de esterilidad y con reactivos libres de endotoxinas.

## Preparación de las rodajas agudas de hipocampo

Para los experimentos en los que se estudió a la población de neuronas inmaduras nacidas en el adulto, los ratones fueron anestesiados y decapitados cuatro semanas después de la inyección retroviral para reconocer las neuronas de cuatro semanas de edad (4wpiGC).

En los experimentos que involucraron expresión condicional de la proteína ChR2 mediante la inyección de vectores adenovirales, los ratones fueron decapitados de dos a seis semanas después de la cirugía, a fin de permitir expresión suficiente de las proteínas virales tanto en los somas como en los axones neuronales.

En todos los casos, removimos los cerebros en una solución fría de composición (mM): 110 colina-Cl<sup>-</sup>; 2.5 KCl, 2.0 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 0.5 CaCl<sub>2</sub>, 7 MgCl<sub>2</sub>, 20 dextrosa, 1.3 Na<sup>+</sup>-ascorbato, 0.6 Na<sup>+</sup>-piruvato y 4 ácido quinurénico. Aislamos el hipocampo derecho y cortamos la región dorsal en rebanadas de 400  $\mu$ m 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 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1.3 MgCl<sub>2</sub>, 1.3 Na<sup>+</sup>-ascorbato, 3.1 Na<sup>+</sup>-piruvato y 10 dextrosa (315 mOsm). Las rodajas fueron burbujeadas con carbógeno (95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>) 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).

## Registros electrofisiológicos

### Consideraciones generales

Los registros fueron obtenidos usando 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 monopolares de acero (Frederick Haer Company) 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).

### Electrodos de registro

En 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 $\Omega$  con solución de NaCl 3 M. Para los registros en modo *loose patch* utilizamos microelectrodos de 5–7 M $\Omega$  con ACSF. Para los registros de *whole cell* utilizamos microelectrodos de 4-5 M $\Omega$  con una solución interna con Cs (mM): 130 CsOH, 130 ácido D-glucónico, 3 MgCl<sub>2</sub>, 0.2EGTA, 1 NaCl, 10 HEPES, 4 ATP-tris, 0.3 GTP-tris, 10 fosfocreatina, 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 MgCl<sub>2</sub>, 5 NaCl, 20 KCl, 4 Tris-ATP, 0,3 Tris-GTP y 10 fosfocreatina, a pH 7,3 y 290 mOsm.

### Estudio de la activación de neuronas individuales 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 cuadrados de

corriente de polaridad positiva a 1 Hz, 10 Hz, 20 Hz y 40 Hz, y registramos a las GC a una intensidad fija correspondiente al umbral de dicha neurona, es decir, en la cual la neurona tiene un 50% de probabilidad de disparo dando estímulos individuales. En todos los protocolos de estimulación eléctrica se emplearon pulsos cuadrados de 0,2 ms de duración. A lo largo del experimento las frecuencias de estimulación fueron distribuidas al azar y las estimulaciones fueron realizadas cada 60 segundos, 5 veces con cada frecuencia. Luego de estimular a todas las frecuencias en la situación basal, el agonista colinérgico carbamilcolina (CBC) fue perfundido en la ACSF que baña las rodajas. Diez minutos después de la llegada de esta droga, se estimuló nuevamente a todas las frecuencias de estimulación a fin de obtener el perfil de activación de cada neurona en presencia de la misma. La concentración de CBC empleada en estos experimentos fue de 20  $\mu$ M en la ACSF, lo que supone una concentración efectiva en el interior del tejido de aproximadamente un tercio (Müller et al., 1988).

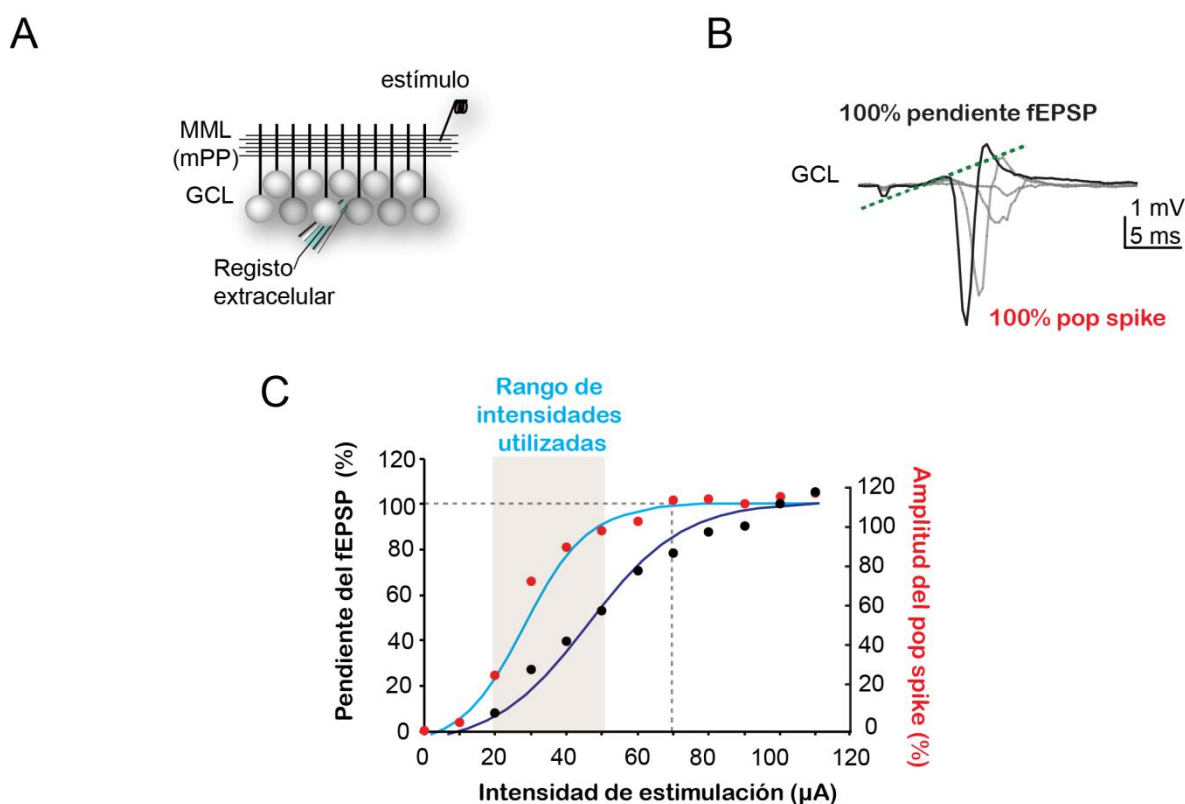
Experimentos control en los que no se agregó la droga fueron realizados, a fin de evaluar el efecto del paso del tiempo *per se* sobre el perfil de activación de las GC. En los mismos, los perfiles no cambiaron significativamente luego del paso del tiempo.

Para cada célula se calculó la cantidad de disparos de cada ensayo, que varían entre 0 y 10, y se promedió entre ensayos. De este modo, se calculó el perfil de activación de cada neurona, es decir, la cantidad promedio de disparos a cada frecuencia, en la situación control o en presencia de CBC.

#### Experimentos de activación poblacional de las GC mediante registros de campo:

Para poder comparar la respuesta poblacional de las neuronas en ausencia y en presencia de CBC, al comenzar los experimentos un electrodo de registro de campo fue colocado en la GCL para registrar el fEPSP y el pop spike en respuesta al estímulo de la mPP. La pendiente del potencial de campo excitatorio postsináptico (fEPSP) aumenta linealmente con el número de axones activados (Pouille et al., 2009), y en cierto rango con la intensidad del estímulo (Fig. M.2). A su vez, la amplitud del pop spike aumenta proporcionalmente con el número de neuronas cercanas al electrodo de registro que disparan un potencial de acción, y por lo tanto también aumenta con la intensidad del estímulo. Al alcanzar la amplitud máxima, la respuesta deja de crecer frente a estímulos de mayor fuerza, por lo que se llega a la saturación. Se estimuló a intensidades crecientes con 2 pulsos distanciados a 50 ms a fin de buscar una intensidad en la cual la amplitud del

pop spike estuviera entre 0 y 2mV. En todos los casos, se estimuló a intensidades estén fuera del rango de saturación del pop spike (Fig. M.2). 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 CBC eran las mismas. 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 IPP, deprime en respuesta a 20 Hz (McNaughton, 1980). Estimulamos la mPP con trenes de 10 pulsos a 10 Hz, espaciados cada 60 segundos y registramos la amplitud de los pop spikes evocados para cada uno de los pulsos del tren. Se promedió entre 5 ensayos tanto en la situación control o en presencia de CBC 5 $\mu$ M.



**Figura M.2. 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 postsináptico excitatorio de campo (fEPSP) en verde. El 100% de la pendiente del fEPSP corresponde al pop spike máximo (100%). **C.** Tanto la amplitud del pop spike como la pendiente del fEPSP crecen con la intensidad del estímulo en  $\mu$ A. Ejemplo de dicha relación en un experimento con ajuste de una función sigmoidea. La línea punteada indica la zona de saturación del pop



spike. Para todos los experimentos realizados en esta tesis, la intensidad del estímulo fue ajustada de forma de estar dentro de rango dinámico de respuestas.

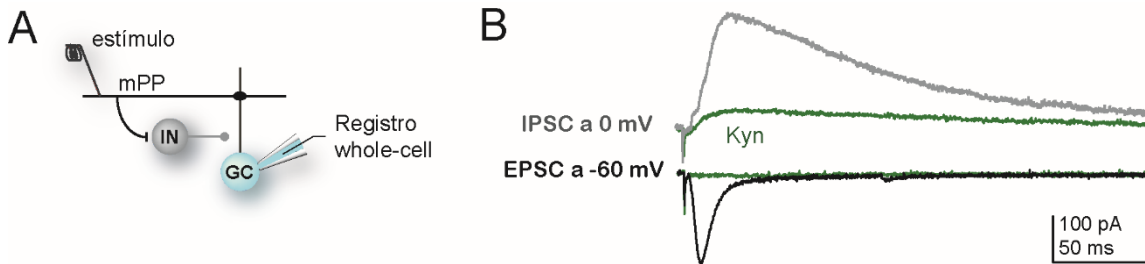
Experimentos control en los que no se agregó la droga fueron realizados, a fin de evaluar el efecto del paso del tiempo *per se* sobre el perfil de activación poblacional del DG. En los mismos, los perfiles no cambiaron significativamente luego del paso del tiempo.

Para los experimentos de la sección 4, se registró la pendiente del fEPSP mediante un electrodo extracelular ubicado en el centro de la ML, a fin de detectar esta señal con mayor fidelidad. En los mismos, la vía aferente fue estimulada con trenes a alta frecuencia, según el protocolo de la figura M.5. La respuesta basal fue registrada mediante un pulso único cada 20 segundos (0.05Hz), durante un mínimo de 15 minutos o hasta lograr una línea de base estable. Los trazos de respuesta a los últimos 10 pulsos previos a la estimulación de alta frecuencia (HFS por sus siglas en inglés *high frequency stimulation*) fueron promediados para cuantificar la respuesta basal. Posteriormente, se estimuló con el protocolo HFS: 4 trenes de 500 ms a 100Hz fueron enviados cada 30 segundos (Snyder et al., 2001). Luego de esto, se estimuló nuevamente a 0.05Hz, durante un mínimo de 30 minutos. Los últimos 10 trazos fueron promediados a fin de registrar la respuesta luego de la estimulación de alta frecuencia. Realizamos, además, experimentos control en los que el protocolo de HFS fue omitido, continuando la estimulación basal a 0.05Hz a lo largo de todo el experimento (Fig. R.4 E).

### Registro de las corrientes postsinápticas

Las corrientes postsinápticas fueron registradas mediante la técnica de *patch clamp* en configuración *whole cell*, tras la estimulación de la mPP (Fig. M.3 A). En cada registro se monitoreó la resistencia de acceso con un pulso hiperpolarizante de 10 mV. La resistencia de acceso fue típicamente 10 – 30 MΩ, y los experimentos fueron descartados si superaba 30 MΩ. Las EPSC fueron registradas al potencial de reversión de la IPSC (~ -60 mV) y las IPSC fueron registradas al potencial de reversión de la EPSC (~ 0 mV) (Fig. M.3 B). 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 se consideraron los experimentos en los que el KYN bloqueó >70% 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. En todos los experimentos las cuantificaciones se realizaron sobre el promedio de al menos 3 trazos obtenidos.

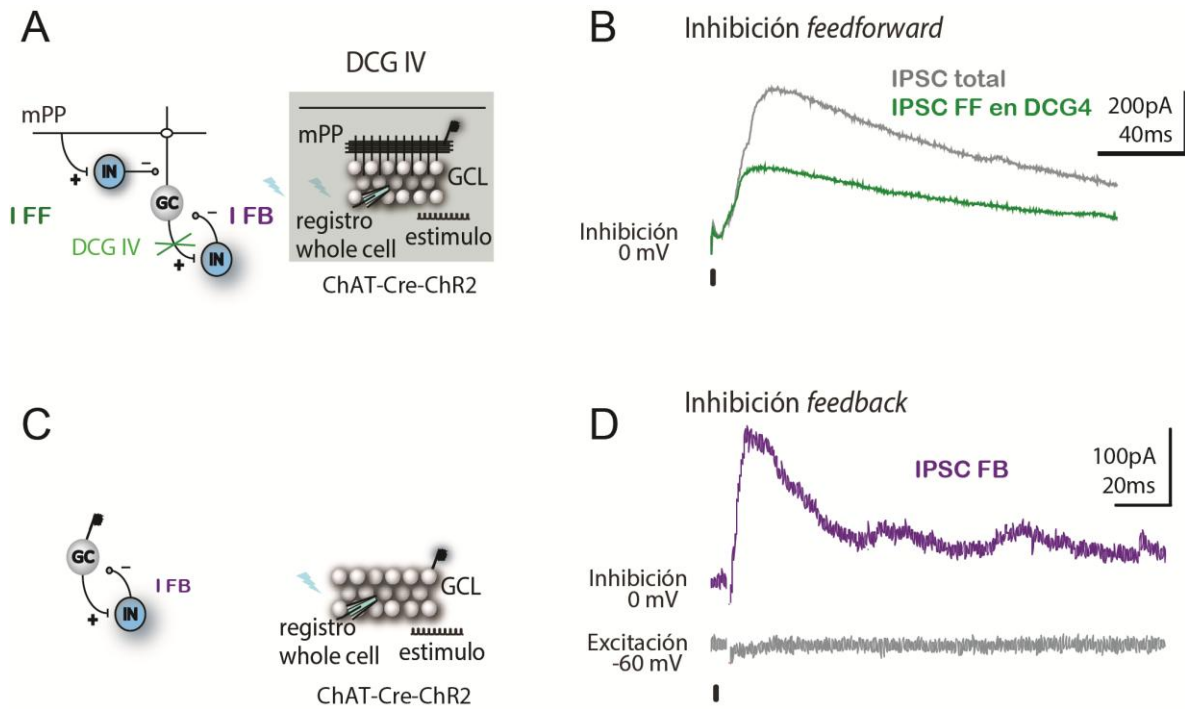


**Figura M.3. Registro de las corrientes postsinápticas excitatorias e inhibitorias.** **A.** Esquema del registro. La estimulación de la vía perforante medial (mPP) recluta neuronas inhibitorias (IN) que hacen sinapsis sobre las células granulares (GC). Las corrientes que recibe la GC en respuesta a la estimulación se registran en *whole cell* con una solución interna con Cs<sup>+</sup>. **B.** Las corrientes postsinápticas excitatorias (EPSC) se registran al potencial de reversión de las corrientes postsinápticas inhibitorias (IPSC), a un potencial cercano a -60mV. Las IPSC se registran al potencial de reversión de las EPSC, a un potencial cercano a 0mV. El bloqueo de la excitación revela la inhibición reclutada directamente con el electrodo de estimulación, que se substraee off-line de los trazos de inhibición total.

### Registro de las corrientes inhibitorias feedforward y feedback

Para diseccionar la modulación específica de la inhibición *feedforward*, estimulamos la mPP registramos la IPSC total al potencial de reversión de la EPSC ( $\sim 0\text{mV}$ ), en presencia del agonista de los receptores metabotrópicos de glutamato tipo 2, DCG4 (1  $\mu\text{M}$ , Tocris) (Fig. M.4 A). Este inhibe las sinapsis eferentes de las GC (Kamiya et al., 1996) y por ende bloquea la inhibición *feedback*. En estas condiciones registramos la inhibición *feedforward*.

Para registrar la inhibición de tipo *feedback*, un electrodo de estimulación fue colocado en la GCL a fin de estimular directamente a las GC del DG, sin estimular a los axones de la mPP. De esta manera, se estimuló una población de GC y se registró la inhibición reclutada sobre otra GC alejada de la zona estimulada. Dada la baja recurrencia excitatoria de las GC en el DG, únicamente se observaron corrientes inhibitorias evocadas en esta configuración (Fig. M.4 D). Cuando estuvieron presentes, las IPSC mono sinápticas directas registradas en presencia del KYN al final del experimento se substrajeron de la IPSC *feedback* y *feedforward*.



**Figura M.4. Registro de las corrientes inhibitorias *feedforward* y *feedback*.** **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 *feedforward* (FF-INH). La activación de las GC estimula IN que luego ejercen inhibición en las GC de tipo *feedback* (FB-INH). El bloqueo de las sinapsis eferentes de las GC con DCG4 permite registrar la IPSC-FF aisladamente. **B.** Trazos de la corriente postsináptica inhibitoria total (IPSC total) y la corriente postsináptica inhibitoria *feedforward* (IPSC-FF) evocada por un estímulo de la mPP, registrada al potencial de reversión de la corriente excitatoria. **C.** Esquema del registro. Se muestra el circuito reclutado con la estimulación de la GCL. El estímulo directo de GC permite registrar la IPSC-FB. **D.** Trazos de la corriente postsináptica inhibitoria *feedback* (IPSC-FB) evocada por un estímulo de la GCL, registrada al potencial de reversión de la corriente excitatoria. Dado que la recurrencia excitatoria en el DG es muy baja, la estimulación de la GCL no evoca una corriente excitatoria (medida al potencial de reversión de la corriente inhibitoria) en la GC registrada.

### Registro de propiedades intrínsecas.

Para determinar las propiedades intrínsecas, las GC fueron registradas en modo *whole cell* con microelectrodos con solución interna de gluconato de potasio. Para medir el potencial de reposo de la neurona, en modo V-clamp ajustamos el potencial hasta encontrar el valor al cual la corriente inyectada sea igual a 0mV. Luego de esto, para medir la resistencia de membrana ( $R_m$ ), en modo V-clamp aplicamos con un pulso hiperpolarizante de 10mV durante 500ms. La amplitud del cambio en el potencial de membrana es proporcional a la

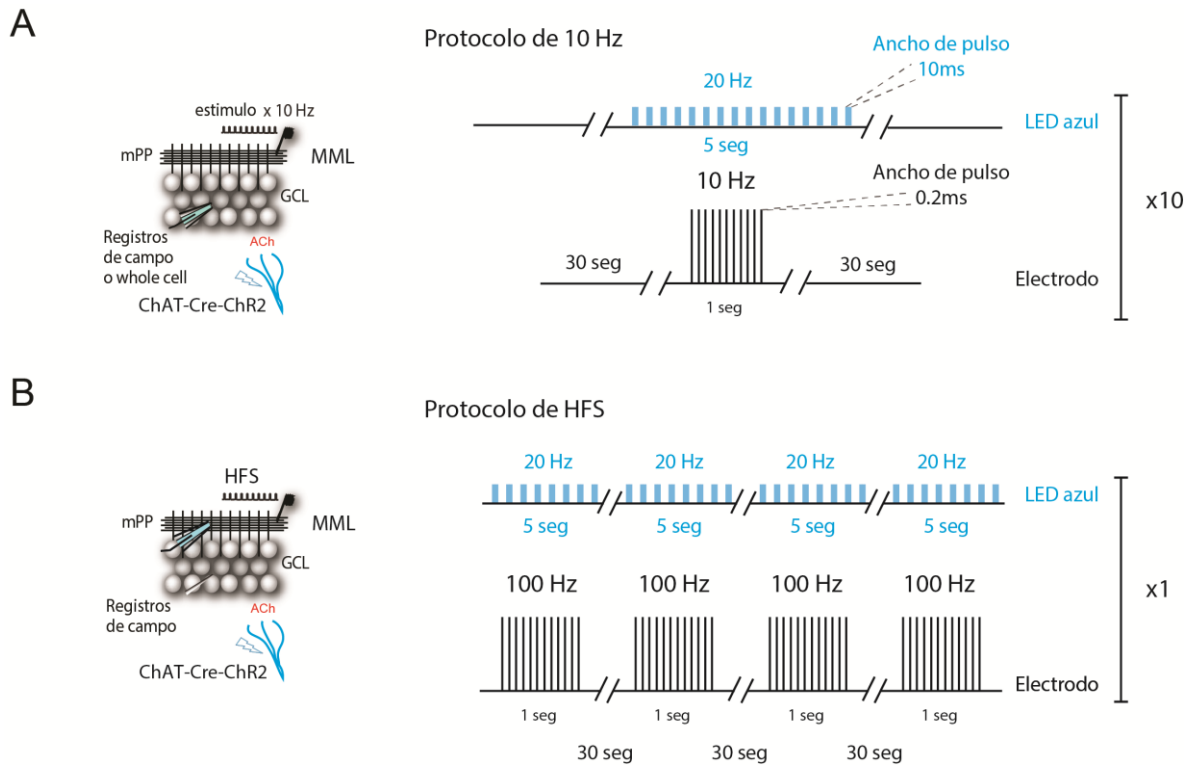
intensidad de la corriente inyectada. Su magnitud es el producto entre la resistencia de entrada de la célula y la intensidad de la corriente inyectada. Por lo tanto, al realizar el cociente entre la diferencia de voltaje y la diferencia en la corriente aplicada, obtuvimos la medición de la  $R_m$ . Para medir el umbral intrínseco de disparo, se registró a la GC en I-clamp, aplicamos pulsos cuadrados de 100 ms de corriente despolarizante de amplitud creciente desde 10pA. Aumentamos la amplitud de a 10pA hasta evocar un potencial de acción. Registramos el voltaje al cual se produce el primer potencial de acción en la neurona. Luego de medir todas las propiedades, agregamos al baño de perfusión CBC y esperamos 10 minutos, a fin de determinar el umbral de activación, la  $R_m$  y el potencial de reposo en su presencia. En otros experimentos, utilizamos ratones ChAT-Cre-ChR2 y activamos con luz azul (Fig. M.5) la liberación de Ach desde los terminales colinérgicos del DG (reemplazando el agregado de CBC) mediante un protocolo idéntico al empleado para los experimentos de respuestas evocadas a 10Hz.

## Experimentos de optogenética

### Consideraciones generales

La activación de ChR2 en rodajas se realizó utilizando un LED de longitud de onda de 470nm. En el laboratorio contamos con una fuente de luz con LEDs de alta potencia en los que se pueden generar pulsos de luz cuadrada, en rampa u oscilante (Tolket). En los experimentos en los que se empleó el doble transgénico ChAT-Cre-ChR2, utilizamos un protocolo de 5 segundos a 20 Hz con un ancho de pulso de 10 ms (ver figura M.5). Para los experimentos en los que la expresión de ChR2 provenía de un vector adenoviral inyectado en el septum de ratones ChAT-Cre (de la Fig. R.1-4), únicamente una porción de las neuronas colinérgicas del septum incorporaron el vector y por lo tanto expresaron ChR2. En los mismos, se probaron estímulos de distinta frecuencia y duración, a fin de encontrar cambios claros en los patrones de actividad de las GC. El protocolo empleado consistió en un tren de estimulación lumínica prolongado de 50 segundos de duración, con una frecuencia de 10Hz y un ancho de pulso de 20ms, a fin de lograr una liberación suficiente de Ach. Durante el segundo 23 del tren de estimulación lumínica, se estimuló eléctricamente la mPP con un tren de 10 pulsos a 10Hz. Para los experimentos en los que se expresó ChR2 en interneuronas inhibitorias (sección R.3-2) y se midió la corriente evocada en GC, se utilizaron trenes de 10 (de 1 a 2 ms de ancho) pulsos de luz a 10Hz.

Para los experimentos de la parte R.4 en los que estudiamos la inducción de LTP en ratones ChAT-Cre-ChR2 se repitió la estimulación a alta frecuencia (HFS, Fig. M.5) empleando un protocolo idéntico al descrito más arriba, pero simultáneamente a la estimulación eléctrica de los axones en la mPP, se estimuló con luz la liberación de Ach durante 5 segundos a 20 Hz con un ancho de pulso de 10 ms un total de 4 veces (Fig. M.5).



**Figura M.5. Protocolos de estimulación optogenética. A.** El esquema de la izquierda muestra la configuración del registro. Rodajas hipocámpicas fueron obtenidas de ratones en los que la proteína ChR2 es expresada en las neuronas colinérgicas. Un electrodo de estimulación fue colocado en la MML a fin de estimular la mPP, mientras que se empleó un electrodo de registro colocado en la GCL para medir distintos tipos de respuesta evocada. Derecha, protocolo de estimulación a 10Hz: Se utilizaron trenes de pulsos cuadrados de estimulación lumínica de 5 segundos de duración, con una frecuencia 20Hz (ancho de pulso de 10ms) espaciados cada 60 segundos. En el tercer segundo del tren lumínico, se estimuló eléctricamente la mPP durante 1 segundo con un tren de 10 pulsos cuadrados a 10Hz. Este protocolo se repitió 10 veces. **B.** La configuración del registro fue similar a la mostrada en A, excepto que el electrodo de registro fue colocado en la MML para medir la respuesta de fEPSP. Derecha, protocolo HFS: Se utilizaron trenes de pulsos cuadrados de estimulación lumínica de 5 segundos de duración, con una frecuencia 20Hz (ancho de pulso de 10ms) espaciados cada 30 segundos. En el tercer segundo de cada tren de estimulación lumínica, se estimuló eléctricamente la mPP durante 1 segundo con un tren de 100 pulsos cuadrados a 100Hz. Este protocolo se repitió 4 veces.

## Análisis Estadístico

Las diferencias significativas fueron evaluadas, según se indica en cada caso, con las siguientes pruebas: Prueba de t (T-test) de dos colas, con corrección de Welch cuando fue necesario; prueba de ANOVA de una vía o ANOVA de dos vías. Para los experimentos en los que se midieron respuestas en cada pulso de un tren de estimulación, se empleó la prueba de ANOVA de medidas repetidas. Se utilizó la 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: Modulación de la actividad evocada de las neuronas del giro dentado en presencia de acetilcolina

---

### Introducción: Parte 1

---

El DG del hipocampo recibe sus aferencias principales desde la capa II de la corteza entorrinal (EC) a través de la vía perforante (PP) (Johnston, 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 GC maduras (matGC) como a GC inmaduras de cuatro semanas de edad (4wpiGC) e interneuronas inhibitorias. Se ha demostrado que tanto las matGC como las 4wpiGC se activan *in vivo* (Kee et al., 2007, Tashiro et al., 2007, Trouche et al., 2009, Sandoval et al., 2011) y que ambas tienen la capacidad de ser activadas por un estímulo aferente (van Praag et al., 2002, Mongiat et al., 2009). Sin embargo, hasta hace poco tiempo se desconocía la contribución específica de las neuronas inmaduras al procesamiento de información aferente. 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 multisináptica (*feedforward* y *feedback*). 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 multisináptica reclutada por la misma aferencia. Recientemente se ha demostrado que las 4wpiGC son más excitables, es decir que son reclutadas (activadas) con estímulos más débiles. Esto quiere decir que los estímulos aferentes son capaces de reclutar una mayor proporción de 4wpiGC, por lo que se dice que esta población lleva a cabo un tipo de codificación de estímulos aferentes más densa. Como se ha demostrado en nuestro laboratorio, estas propiedades de procesamiento diferenciales se deben no solamente a sus propiedades intrínsecas, sino a una contribución diferencial de los circuitos inhibitorios en el control del disparo de potenciales de acción de las mismas (Marín-Burgin et al., 2012). Debido a esta diferencia en los circuitos inhibitorios, se produce un aumento en el balance excitación inhibición (E/I), responsable de las diferencias observadas.

Dado que los potenciales de acción que llegan al giro dentado desde la capa II de la MEC ocurren a frecuencias de 1 Hz a 50 Hz (Chrobak and Buzsaki, 1998, Fyhn et al., 2004, Hafting et al., 2005, Bonnevie et al., 2013), en el laboratorio se estudió cómo responden



estas dos poblaciones de neuronas a estímulos más complejos (Pardi et al., 2015). En trabajos previos, se estimuló la mPP con trenes de estimulación de 10 pulsos a distintas frecuencias (1, 10, 20 y 40 Hz), y se observó en todas ellas, que las 4wpiGC respondían evocando una mayor cantidad de potenciales de acción. Por lo tanto, se concluye que las mismas presentan un filtro de frecuencias diferente al de las matGC, que sólo son capaces de ser activadas a frecuencias bajas, filtrando las altas (Pardi et al., 2015). De esta manera, las neuronas inmaduras utilizan un código más denso no solo espacialmente (es decir, que una mayor proporción de la población se activa), sino también temporalmente, es decir, que en la dimensión del tiempo las mismas pueden activarse a mayor frecuencia.

Por otro lado, además de los axones provenientes de la EC, el hipocampo recibe una serie de aferencias neuromodulatorias, provenientes de distintos centros del cerebro. Dentro de ellas, destacamos en este trabajo a la proyección colinérgica proveniente del septum medial y la banda diagonal de Broca. La acetilcolina (ACh), desempeña un papel importante en la modulación de distintos procesos cognitivos asociados a la función hipocampal, como aprendizaje y atención, adquisición de memorias, ciclos de sueño y vigilia, etc. (Dannenberg et al., 2017). Históricamente se cree que la ACh actúa mediante un mecanismo de transmisión volumétrica, dado que algunos trabajos mostraban la ausencia de densidades postsinápticas claras asociadas a los terminales colinérgicos. Nuevos estudios indican que existe una alta tasa de “derrame” (*spillover*) de este neurotransmisor al espacio extrasináptico, aumentando su concentración en el espacio extracelular, si bien también existe transmisión sináptica (Takacs et al., 2018). De hecho, estudios de microdiálisis han demostrado variaciones en los niveles de ACh en el hipocampo que oscilan en una escala temporal de minutos, y se asocian a estados atencionales y de exploración activa (Hironaka et al., 2001). Los niveles máximos de ACh encontrados en el hipocampo se encuentran en el rango micromolar bajo (Sarter et al., 2009). Por lo tanto, para comenzar, evaluamos los efectos de la modulación colinérgica del DG mediante un enfoque farmacológico, perfundiendo en la ACSF el agonista carbamilcolina (CBC), también llamado carbacol. El mismo es un agonista colinérgico del tipo éster de colina que actúa uniéndose y activando todos los receptores de acetilcolina de manera inespecífica. La farmacología de la acetilcolina (y de neuromoduladores en general) es compleja. Existe una gran diversidad de receptores con efectos que pueden ser opuestos según el compartimiento sub-celular en el que se encuentren, las subunidades de las cuales se componen, el tipo celular que los exprese, etc. Como se mencionó en la introducción, existen dos familias de receptores de acetilcolina: Nicotínicos, que son de tipo ionotrópico, y muscarínicos, que son de tipo

metabotrópico. Dado que estudiaremos los mecanismos circuitales y no moleculares de las acciones de la Ach, emplearemos únicamente CBC para simular un estado en el cual la Ach es alta. Mediante esta estrategia, estudiaremos cómo la modulación colinérgica altera el procesamiento de estímulos aferentes por GC maduras e inmaduras en el DG del hipocampo, y los mecanismos circuitales y sinápticos que subyacen dicha modulación.

## Resultados: Parte 1.1

---

### *Perfiles de activación de neuronas granulares maduras e inmaduras ante activación de la vía perforante medial a distintas frecuencias y su modulación en presencia de carbacol*

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 (Fig. M.1 A). Colocamos un electrodo de estimulación en la MML y dimos trenes de 10 pulsos a 1 Hz, 10 Hz, 20 Hz y 40 Hz, alternadamente, cinco ensayos con cada frecuencia. 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 y no modifican el contenido intracelular de la neurona registrada (Fig. R.1-1 A). Empleamos una intensidad de estimulación tal que la neurona registrada tenga una probabilidad de disparo del 50% aproximadamente (umbral), a fin de poder observar tanto un aumento como una disminución de la activación luego del agregado de CBC.

De este modo, obtuvimos perfiles de activación de cada 4wpiGC y cada matGC para las distintas frecuencias de estimulación (Fig. R.1-1 B). 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 potencial 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.1-1 C).

Los resultados corroboran estudios previos realizados en el laboratorio en los cuales se mostró 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.1-1 C). Luego de obtener el perfil de activación de una neurona dada, profundimos en la ACSF que baña las rodajas el agonista colinérgico inespecífico CBC en una concentración 20  $\mu$ M.

Seleccionamos esta concentración ya que está en el orden de magnitud de los niveles fisiológicos máximos de Ach presentes en el hipocampo (Sarter et al., 2009), y al mismo tiempo produce efectos estables y robustos en las GC. Obtuvimos, entonces, un segundo perfil de activación para cada GC en presencia de esta droga, que simula un estado de alta Ach en el hipocampo. De esta manera, para cada neurona registramos dos perfiles de activación, uno en ausencia y otro en presencia de CBC. Para las matGC, observamos mediante esta estrategia un aumento en la cantidad de potenciales de acción en respuesta a estimulación de la vía aferente en presencia de CBC, en comparación con la situación control, particularmente a altas frecuencias de estimulación. Llamativamente, no observamos diferencias significativas en el perfil de activación de 4wpiGC (Fig. R.1-1 C), por lo que concluimos que la Ach es capaz de modular específicamente el perfil de activación de matGC, haciéndolas más activables y ampliando el rango de frecuencias que las mismas son capaces de codificar.

Dado que las matGC componen más del 90% de las GC del DG, hipotetizamos que los cambios en el perfil de activación serían también observables a nivel poblacional, registrando la actividad colectiva de las mismas mediante un electrodo extracelular. Además, dado que en el circuito hipocampal canónico la información fluye desde el DG hacia la región CA3, y luego a CA1, quisimos evaluar simultáneamente si los efectos observados en el DG se propagan hacia su región postsináptica.

## Resultados: Parte 1.2

---

### *Activación poblacional en el giro dentado y en la región CA3 frente a trenes de estimulación a 10Hz de la vía perforante medial e influencia del carbacol*

Al igual que en la sección anterior, se obtuvieron rebanadas agudas de hipocampo y se colocó un electrodo de estimulación en la MML. En estos experimentos, se registró la respuesta extracelular de campo con un electrodo de registro en la GCL (Fig. M.2), que refleja la activación colectiva de la población de neuronas cercanas al mismo (Fig. R.1-2 A). En esta configuración, al estimular la vía aferente se obtiene una señal bifásica en la GCL, con una primera parte ascendente llamada potencial de campo excitatorio postsináptico (fEPSP) y una segunda parte descendiente y más rápida conocida como el potencial de acción poblacional (pop spike). La pendiente del fEPSP aumenta linealmente con el número de axones activados (Pouille et al., 2009), mientras que la amplitud del pop spike (medida en mV) es proporcional al número de neuronas que disparan potenciales de

acción. Para todos los experimentos se seleccionaron intensidades de estimulación intermedias, tales que la amplitud del pop spike en el primer pulso del tren en la situación basal estuviera entre 0.5 y 2 mV y fuera de la saturación (es decir, que la misma siga creciendo ante estímulos más fuertes, ver Fig. M.2).

En este experimento, estimulamos la mPP con trenes de 10 pulsos a 10 Hz, promediando entre cinco ensayos para cada condición. Estos trenes fueron espaciados entre sí un minuto, a fin de evitar depresión de las sinapsis típicamente observada en el DG frente a estimulaciones repetidas (O'Mara et al., 1995). Seleccionamos esta frecuencia en particular para continuar profundizando sobre los mecanismos de acción de la modulación colinérgica debido a que es la que presenta mayores diferencias frente a la modulación colinérgica a nivel de neuronas individuales. Además, *in vivo*, la actividad del DG se da, en mayor medida, en frecuencias cercanas a 10 Hz (Jung and McNaughton, 1993, Leutgeb et al., 2007, Neunuebel and Knierim, 2012), por lo que esta frecuencia resulta fisiológicamente relevante. Finalmente, el septum medial está involucrado en el procesamiento temporal de la región hipocámpal, actuando como un marcapasos de las oscilaciones teta (6-10Hz) (Carpenter et al., 2017).

De forma análoga a nuestros registros en neuronas individuales, se midió la amplitud del pop spike para cada pulso del tren, promediada entre cinco ensayos. La amplitud del pop spike mostró variabilidad entre rodajas, pero la dinámica temporal de la misma respeta lo observado en los experimentos de *loose patch*: la activación de las GC (y por lo tanto la amplitud del pop spike) disminuye a lo largo de los pulsos del tren (Fig. R.1-2 B).

Luego de medir la respuesta poblacional en la situación control, agregamos al baño el agonista colinérgico CBC en una concentración 5  $\mu$ M. Seleccionamos esta concentración ya que es compatible con los niveles fisiológicos máximos de acetilcolina presentes en el hipocampo (Sarter et al., 2009) y al mismo tiempo produce efectos estables y robustos. Dado que se midieron respuestas poblacionales, la variabilidad fue menor que para los experimentos de la sección anterior. Luego de 10 minutos desde el agregado de esta droga, medimos nuevamente la respuesta poblacional promedio en el DG para cada uno de los pulsos del tren. Observamos que, de acuerdo a lo esperado, en presencia de CBC la amplitud de la respuesta poblacional aumenta, por lo que las GC se activan con más facilidad (Fig. R.1-2 B y C)

Dado que el giro dentado proyecta hacia CA3 a través del circuito hipocámpal canónico, quisimos evaluar si el aumento en la actividad poblacional evocada por las GC, se corresponde con un aumento en la activación de las neuronas piramidales de CA3. Para

ello se utilizó un segundo electrodo de registro extracelular, posicionado en la capa piramidal proximal de CA3, a fin de registrar simultáneamente la activación en el DG y CA3 frente a la estimulación de la mPP. Las respuestas basales en CA3 resultaron mucho menores que en el DG, ya que la probabilidad de que las conexiones entre la región estimulada y la región registrada se encuentren intactas disminuye con la distancia. Sin embargo, en estas condiciones observamos que el aumento en la respuesta poblacional en el DG en presencia de CBC está acompañado por un aumento en la activación de neuronas piramidales en la región CA3 (Fig. R.1-2 D y E).

## Resultados: Parte 1.3

---

### *Modulación de la actividad evocada en el giro dentado por liberación endógena de acetilcolina*

Si bien el enfoque farmacológico resulta muy útil para describir las variaciones observadas en el hipocampo ante un estado de alta concentración de acetilcolina, *in vivo* es esperable que exista un gradiente colinérgico que va desde el terminal presináptico hacia regiones más alejadas, ya que la enzima AchE degrada rápidamente la Ach libre en el tejido extracelular (Sarter et al., 2009). Por lo tanto, los receptores colinérgicos cercanos a la zona de liberación tienen mayor probabilidad de activación frente a una descarga de la presinapsis que los que se encuentran más alejados. Además, *in vivo* la liberación de Ach en el hipocampo depende del grado de activación de las neuronas colinérgicas del septum y la banda diagonal de Broca, las cuales pueden presentar variaciones rápidas asociadas a situaciones novedosas y nuevos aprendizajes (Teles-Griolo Ruivo et al., 2017). En este sentido, la estrategia farmacológica presenta limitaciones en cuanto al control espaciotemporal del estímulo colinérgico. Por último, dado que el CBC es incapaz de ser hidrolizado por la enzima AchE, la duración y el alcance efectivo de su señalización podrían diferir de lo que ocurre a nivel fisiológico. Por lo tanto, a fin de evaluar el efecto de la liberación endógena de Ach en el microcircuito del DG del hipocampo, se utilizó una estrategia optogenética mediante el empleo de ratones transgénicos que permiten la activación específica de las neuronas que producen Ach utilizando proteínas activables por luz como channelrhodopsin (ChR2). De esta manera se puede controlar la actividad neuromodulatoria endógena y evaluar su efecto sobre diversos blancos neuronales.

Como se describió en Materiales y Métodos, utilizamos animales transgénicos knockin ChAT-Cre-ChR2. En estos animales la expresión de ChR2 solamente ocurre luego de la recombinación mediada por Cre, que se expresa en las neuronas colinérgicas. Por lo tanto, únicamente las neuronas colinérgicas expresan la proteína fotoactivable ChR2.

Utilizando esta herramienta de doble transgénico, obtuvimos rebanadas hipocampales y medimos la actividad poblacional a partir de registros de campo, estimulando la vía mPP con trenes de 10 pulsos a 10Hz, a fin de evaluar si la liberación endógena de Ach produce efectos similares a los observados de manera farmacológica (Fig. R.1-3 A). Para simular una situación de liberación de Ach en rodajas hipocampales, buscamos reproducir una situación en la cual los estímulos que llegan al giro dentado coinciden temporalmente con niveles altos de Ach (Fig. M.5). Brevemente, estimulamos con un tren de luz azul de 5 segundos a 20Hz, cada 60 segundos. Por lo tanto, la frecuencia promedio de estimulación optogenética fue de 1.6Hz, compatible con los niveles de activación de neuronas colinérgicas en el septum, usualmente menores a 4Hz (Zhang et al., 2011). En estas condiciones, observamos una gradual potenciación de la respuesta poblacional a lo largo de sucesivas repeticiones del protocolo. En promedio, para alcanzar una potenciación superior al 15% y estable, fueron necesarios entre 5 y 10 ensayos. Luego de 10 ensayos, estimulamos la vía aferente en ausencia de luz, para medir la activación poblacional luego de la neuromodulación (Fig. R.1-3 B). Como observamos en los experimentos de farmacología, la liberación endógena de ACh también produjo una potenciación de la respuesta a estímulos aferentes (Fig. R.1-3. C).

Para verificar que el efecto modulador observado es mediado por una señalización colinérgica, aplicamos antagonistas de amplio espectro de receptores de acetilcolina tanto nicotínicos (mecamilamina) como muscarínicos (atropina). En presencia de ambos antagonistas, el efecto modulador de la liberación de acetilcolina sobre la activación de GC desaparece, confirmando que el mismo está mediado por una señalización colinérgica (Fig R.1-3 D). Cabe destacar que la aplicación del antagonista muscarínico atropina no es suficiente para prevenir el efecto de potenciación de Ach, sino que se requirió el bloqueo de la señal nicotínica.

Si bien se sabe que las aferencias colinérgicas en el hipocampo provienen del septum medial y la banda de Broca, ubicadas en la parte anterior basal del cerebro, empleamos una estrategia alternativa para restringir la expresión de ChR2 únicamente en las neuronas colinérgicas de esta región. Para ello, empleamos animales Chat-Cre adultos a los que se les inyectó el adenovirus AAV9-dFlox-ChR2 en el septum medial (Fig. R.1-4 A), y

luego de un mínimo de dos semanas, rebanadas hipocampales fueron obtenidas a partir de estos ratones. Se realizaron registros de campo idénticos a los de la sección anterior, estimulando la mPP con trenes a 10Hz. Mediante esta técnica, confirmamos que la liberación endógena de ACh proveniente del septum medial produce una potenciación de la respuesta a estímulos aferentes, al igual que los resultados obtenidos a partir de ratones ChAT-Cre-ChR2 (Fig. R.1-4 B y C).

Para comenzar a indagar en el mecanismo de acción de la Ach sobre la actividad de GC, estudiamos si el aumento en la amplitud del pop spike en respuesta a estimulación aferente se debe a un aumento en la excitación, una disminución en la inhibición, o un cambio en propiedades intrínsecas de esas neuronas. Como la activación de la PP no solo genera excitación de GC sino que también recluta circuitos inhibitorios que regulan la activación de las mismas (Marín-Burgin et al., 2012) comenzamos por bloquear farmacológicamente los circuitos inhibitorios utilizando el antagonista de GABA A picrotoxina (Fig. R.1-5 A). En estas condiciones, la activación de los terminales colinérgicos en el DG no produjo una potenciación de la respuesta poblacional, lo que indica que la modulación colinérgica requiere de circuitos inhibitorios intactos (Fig. R.1-5 B-D).

Finalmente, se sabe que el CBC puede modificar las propiedades intrínsecas de neuronas debido principalmente a la activación de receptores muscarínicos (Muller et al., 1988, Dannenberg et al., 2017). Por lo tanto, evaluamos el efecto de la liberación endógena de Ach sobre las propiedades intrínsecas de las GC. A diferencia de lo observado para el CBC, la liberación endógena de Ach no produjo cambios significativos en las propiedades intrínsecas de las GC (Ver Tabla R.1).

## Conclusiones: Parte 1

---

Los resultados presentados en esta primera parte de la tesis demuestran que la activación de la vía colinérgica modifica los perfiles de respuesta de GC maduras en el giro dentado, sin alterar las respuestas de 4wpiGC. Las matGC aumentan sus niveles de activación frente a estímulos aferentes en respuesta tanto al agregado de un agonista colinérgico como a la liberación endógena de acetilcolina, lo cual permite una codificación más densa de los estímulos que llegan a esta región desde la MEC. Además, como se observa en los registros de neurona única en modo *loose patch*, las matGC son capaces de aumentar el rango de frecuencias para el cual pueden codificar. Esto hace que el procesamiento de estímulos aferentes de las mismas sea más parecido al de las 4wpiGC, ya que se vuelven

más activables y tienen un filtro de frecuencia más amplio. El bloqueo de los circuitos inhibitorios impide estos cambios en el procesamiento, lo que implica que los mismos están involucrados en el mecanismo de acción de la Ach. Finalmente, el agregado del antagonista muscarínico atropina no es capaz de bloquear las acciones colinérgicas, mientras que una combinación de antagonistas muscarínico y nicotínico previene los efectos registrados, lo que indica que la Ach actúa a través de receptores nicotínicos. En la siguiente sección profundizaremos sobre esta hipótesis. Estos experimentos demuestran que los modos de procesamiento de estímulos aferentes no son fijos sino que pueden adaptarse frente a distintos estados del cerebro.

## Discusión: Parte 1

---

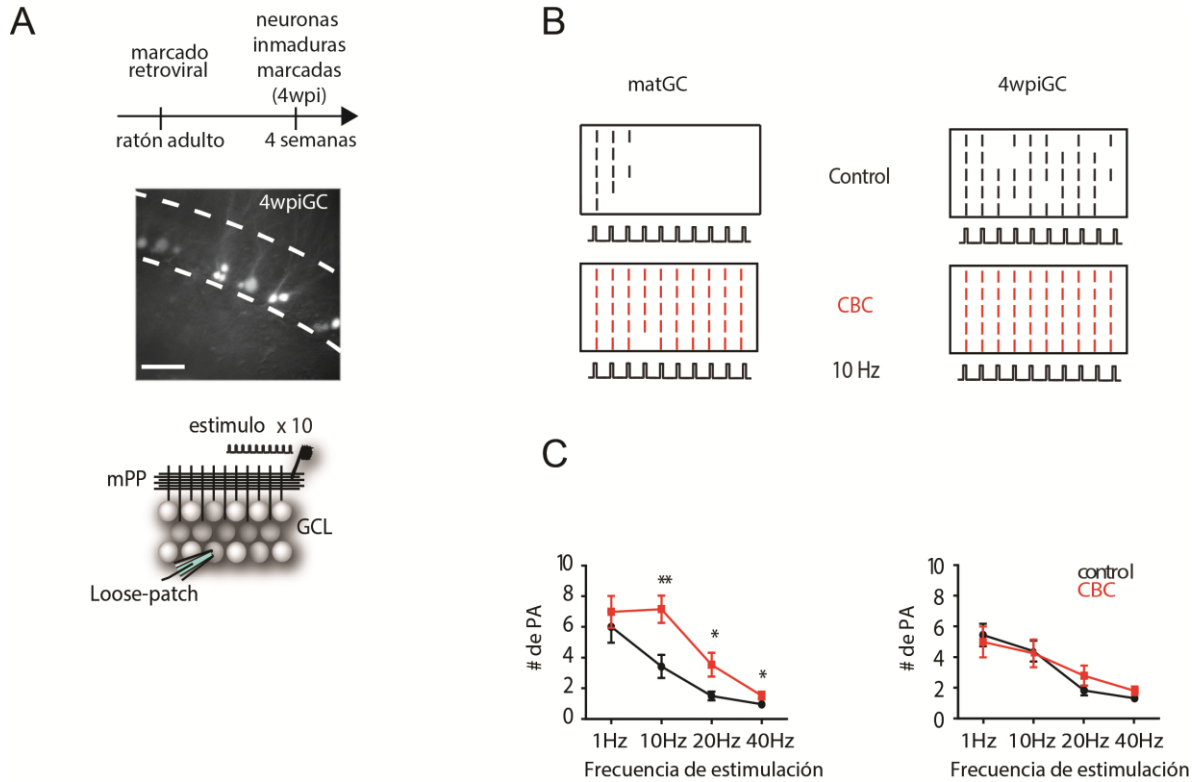
El giro dentado constituye la vía principal de entrada al hipocampo desde la EC. La información que llega al DG es procesada por el circuito local y luego continúa su curso hacia CA3. El circuito local comprende a las GC, que son las neuronas de proyección, y a interneuronas locales, en su mayoría inhibitorias. *In vivo*, se ha observado que la mayor parte de las GC presentan una distribución bimodal en su frecuencia de activación, con largos períodos de quiescencia interrumpidos por trenes de disparos a alta frecuencia (Jung and McNaughton, 1993, Mistry et al., 2011). En contraste, existe evidencia de una subpoblación de GC que disparan con una distribución más unimodal de frecuencias de disparo relativamente bajas, con diferencias electrofisiológicas y funcionales entre poblaciones que correlacionan con la madurez, debido a la existencia de neurogénesis adulta (Marín-Burgin et al., 2012, Nakashiba et al., 2012, Danielson et al., 2016). Es interesante destacar que para la primer población de neuronas (de distribución bimodal), los períodos de mayor actividad en los que las GC logran escapar de la inhibición predominante, frecuentemente ocurren durante exploración activa de claves comportamentalmente relevantes (Mistry et al., 2011). El sistema colinérgico es capaz de alterar la actividad de la población de matGC sin alterar el perfil de activación de las 4wpiGC. Este sistema, por lo tanto, es capaz de modular independientemente las propiedades de procesamiento de estímulos de la población de matGC, sin interferir con el procesamiento paralelo de la subpoblación de neuronas inmaduras. El mismo podría ser el responsable del aumento en la frecuencia de activación de GC que normalmente se encuentran en estado de quiescencia, y que usualmente se observa en los momentos en los cuales se activa el sistema colinérgico (durante la exploración activa). Se ha visto que



distintos niveles de acetilcolina en el hipocampo pueden producir efectos diversos sobre el procesamiento de estímulos aferentes en CA3 y CA1 (ver Fig. 1.6). De hecho, se ha propuesto que altos niveles de acetilcolina, disminuyen la recurrencia del circuito propiciando la transferencia de información en el sentido *feedforward* (en el caso del hipocampo: EC→DG→CA3→CA1) de forma que se prioriza la codificación de estímulos nuevos provenientes de la EC (Dannenberg et al., 2017). Los resultados obtenidos en esta primera parte son compatibles con esta hipótesis, y proporcionan evidencia adicional respecto de la subregión del DG del hipocampo, que ha sido menos explorada.

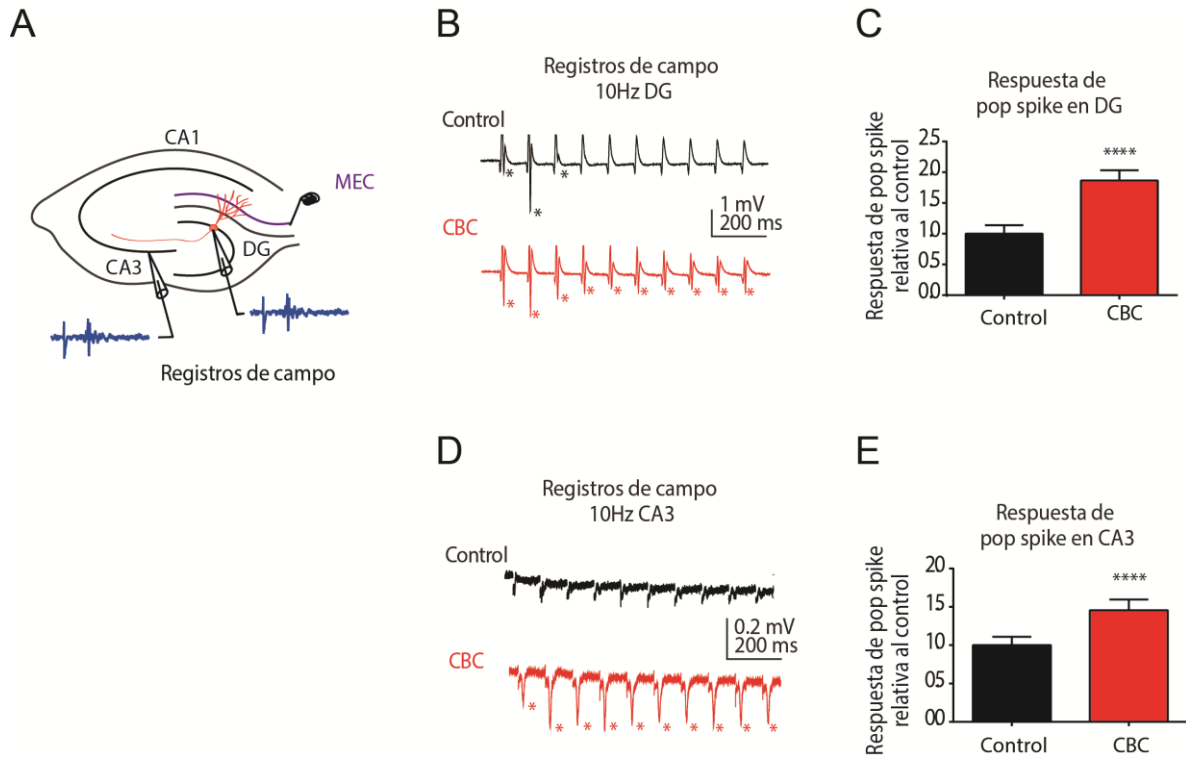


**Figura R.1-1**



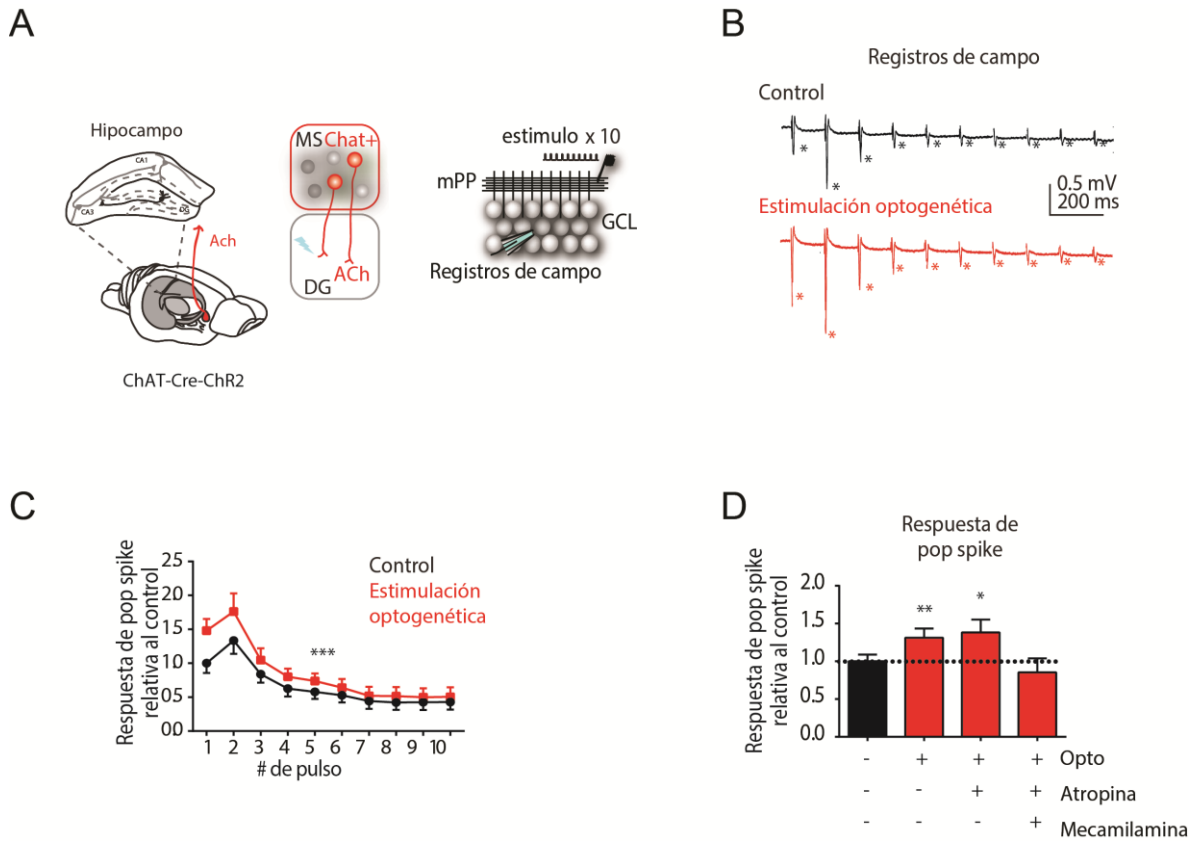
**Figura R.1-1. La modulación colinérgica aumenta la respuesta de disparo de GC maduras.** **A** Esquema experimental. La imagen muestra una rebanada de hipocampo con GC de 4 semanas de edad (4wpiGC) expresando un fluoróforo. Barra de escala 50µm. La línea de tiempo indica el momento de la inyección retroviral. El esquema de abajo muestra la configuración del registro: un electrodo de estimulación fue posicionado en la MML para estimular los axones de la mPP con trenes de 10 pulsos cuadrados a distintas frecuencias. La intensidad del estímulo fue fijada al umbral de disparo de cada neurona (50% de probabilidad de disparo). Registros de loose patch fueron obtenidos de matGC y 4wpiGC para detectar potenciales de acción. **B** Ejemplo de un raster plot para una matGC (izquierda) y una 4wpiGC (derecha) a 10 Hz en la situación control (paneles superiores, negro) o luego del agregado de CBC (paneles inferiores, rojo). Cada barra de color denota un potencial de acción. **C** Promedio de la suma de los potenciales de acción evocados por trenes de estimulación a 1, 10, 20 y 40 Hz en matGC (izquierda) y 4wpiGC (derecha). El CBC produjo un aumento en la respuesta de disparo de matGC, pero no 4wpiGC. (matGC: ANOVA de dos vías, variación entre control vs CBC: \*\*\*  $p < 0.0001$ ; variación entre frecuencias: \*\*\* $p < 0.001$ ; interacción: \* $p < 0.05$ . 4wpiGC: ANOVA de dos vías, variación entre control vs CBC: ns,  $p > 0.05$ ; variación entre frecuencias: \*\*\* $p < 0.001$ ; interacción: ns,  $p > 0.05$ .)

Figura R.1-2



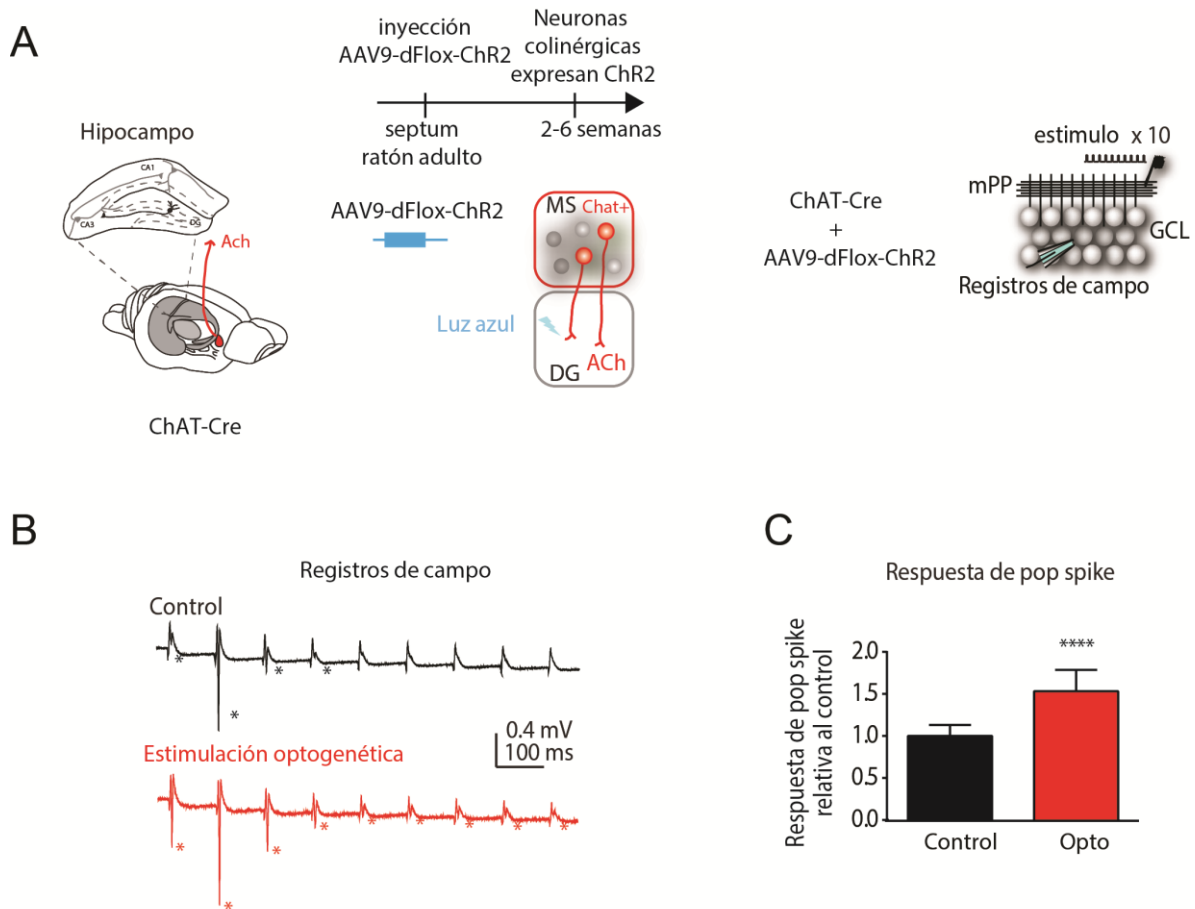
**Figura R.1-2. La modulación colinérgica aumenta la respuesta poblacional evocada en el DG y CA3.** **A** El esquema muestra la configuración del registro: un electrodo de estimulación fue posicionado en la MML para estimular los axones de la mPP con trenes de 10 pulsos cuadrados a 10 Hz. Registros de campo fueron obtenidos de poblaciones de GC (altamente enriquecidos en matGC) en la GCL y neuronas piramidales de la región proximal de CA3. **B** Ejemplo de un registro extracelular obtenido en el DG frente a la estimulación de la vía aferente en la situación control (negro, arriba), o luego del agregado de CBC (rojo, abajo). Los asteriscos indican la amplitud máxima de los disparos de potenciales de acción coordinados por parte de una población de GC (pop spikes). **C** Promedio de la suma de pop spikes evocados por un tren de estimulación a 10 Hz. El CBC produjo un aumento en la respuesta poblacional evocada en el DG. (T-test, control vs CBC: \*\*\* $p < 0.001$ ). **D** Ejemplo de un registro extracelular obtenido en CA3 frente a la estimulación de la vía aferente en la situación control (negro, arriba), o luego del agregado de CBC (rojo, abajo). Los asteriscos indican disparos coordinados de potenciales de acción por parte de una población de neuronas piramidales (pop spikes). **E** Promedio de la suma de pop spikes evocados por un tren de estimulación a 10 Hz. El CBC produjo un aumento en la respuesta poblacional evocada en CA3. (T-test, control vs CBC: \*\*\* $p < 0.001$ ).

Figura R.1-3.



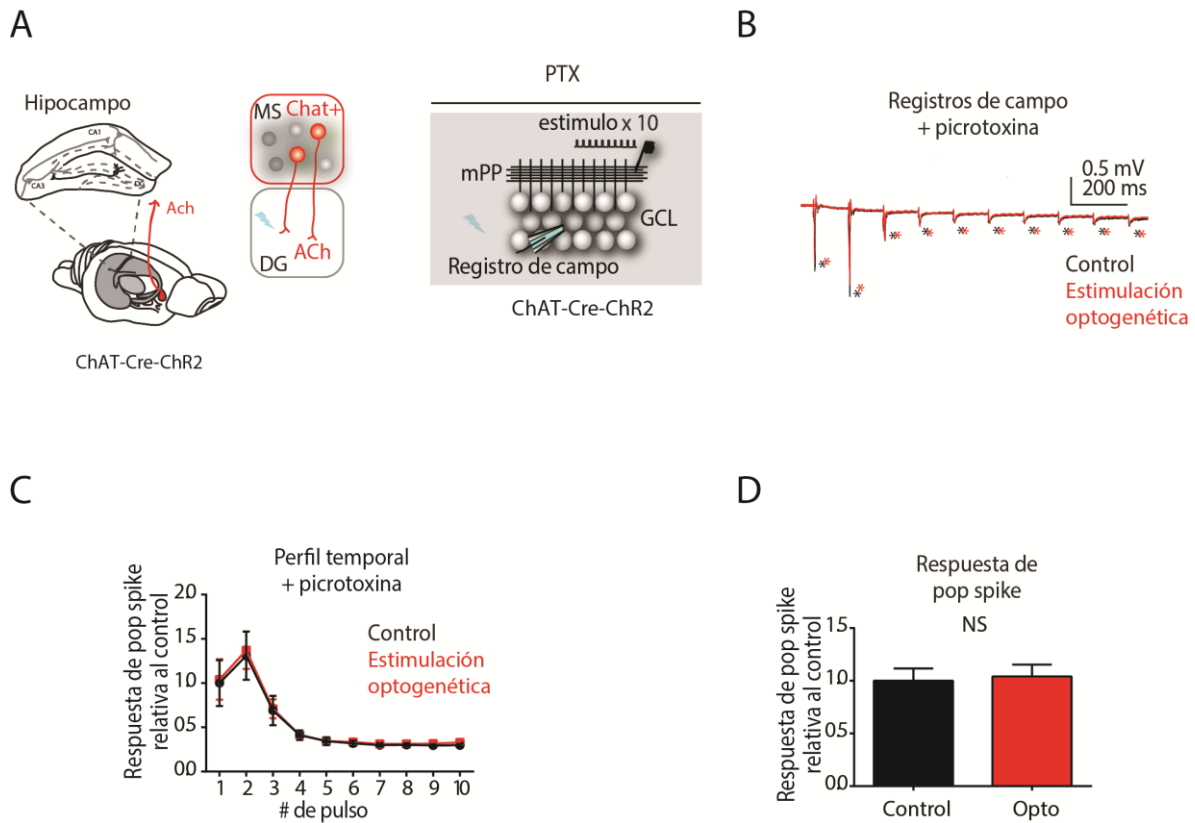
**Figura R.1-3. La acetilcolina endógenamente liberada aumenta la respuesta poblacional en el DG.** **A** Diseño experimental. Rebanadas hipocámpales fueron obtenidas a partir de ratones ChAT-Cre-ChR2. Los axones de neuronas colinérgicas que proyectan al DG fueron estimulados mediante un LED azul. El esquema de la derecha muestra la configuración del registro: un electrodo de estimulación fue posicionado en la MML para estimular los axones de la mPP con trenes de 10 pulsos cuadrados a 10 Hz. Registros de campo fueron obtenidos de poblaciones de GC (altamente enriquecidos en matGC) en la GCL. **B** Ejemplo de un registro extracelular obtenido frente a la estimulación de la vía aferente en la situación control (negro, arriba), o luego de la estimulación optogenética (ver MM.1, rojo, abajo). Los asteriscos la presencia de pop spikes. **C** Dinámica temporal de la amplitud del pop spike a lo largo de los pulsos del tren, antes (negro) y después (rojo) de la estimulación optogenética, relativizado a la amplitud promedio del primer pulso. Las barras de error indican el error estándar de cada punto. La respuesta poblacional disminuye con los pulsos del tren y liberación de acetilcolina endógena aumenta dicha respuesta poblacional. (ANOVA de medidas repetidas, variación control vs opto: \*\*\* $p < 0.001$ ; variación entre pulsos: \*\*\* $p < 0.0001$ ; interacción: \*\*\* $p < 0.0001$ ). **D** Promedio de la suma de pop spikes evocados por un tren de estimulación a 10 Hz, relativo al control. La estimulación optogenética (Opto) produjo un aumento en la respuesta poblacional evocada. (T-test, control vs Opto: \*\* $p < 0.01$ ). En presencia de atropina, la estimulación optogenética produjo un aumento en la respuesta poblacional evocada (T-test, control vs Opto + Atropina: \* $p < 0.05$ ). En presencia de una atropina y mecamilamina, la estimulación optogenética no produjo cambios en la activación poblacional en el DG. (T-test, control vs Opto + Atropina + Mecamilamina:  $p > 0.05$ ).

Figura R.1-4.



**Figura R.1-4. La acetilcolina septal endógenamente liberada aumenta la respuesta poblacional en el DG. A** Diseño experimental. La línea temporal indica el momento de la inyección. Diseño experimental. Ratones ChAT-Cre fueron inyectados en el septum medial con el vector AAV9-dFlox-ChR2. Dos a seis semanas más tarde, rebanadas hipocampales fueron obtenidas a partir de los mismos. Los axones de neuronas colinérgicas que incorporaron el vector y que proyectan al DG fueron estimulados mediante un LED azul. El esquema de la derecha muestra la configuración del registro: un electrodo de estimulación fue posicionado en la MML para estimular los axones de la mPP con trenes de 10 pulsos cuadrados a 10 Hz. Registros de campo fueron obtenidos de poblaciones de GC (altamente enriquecidos en matGC) en la GCL. **B** Ejemplo de un registro extracelular obtenido frente a la estimulación de la vía aferente en la situación control (Negro, arriba), o luego de la estimulación optogenética (ver MyM.1, Rojo, abajo). Los asteriscos indican la presencia de pop spikes. **C** Promedio de la suma de pop spikes evocados por un tren de estimulación a 10Hz, relativo al control. La estimulación optogenética (opto) produjo un aumento en la respuesta poblacional evocada. T-test, control vs opto: \*\*\*\*p < 0.001.

Figura R.1-5.



**Figura R.1-5. La modulación colinérgica requiere de circuitos inhibitorios intactos.** **A** Diseño experimental. Rebanadas hipocámpales fueron obtenidas a partir de ratones ChAT-Cre-ChR2. Los axones de neuronas colinérgicas que proyectan al DG fueron estimulados mediante un LED azul. El esquema de la derecha muestra la configuración del registro: un electrodo de estimulación fue posicionado en la MML para estimular los axones de la mPP con trenes de 10 pulsos cuadrados a 10 Hz. Registros de campo fueron obtenidos de poblaciones de GC (altamente enriquecidos en matGC) en la GCL. Todos los registros fueron obtenidos en presencia del antagonista de GABA A picrotoxina. **B** Ejemplo de un registro extracelular obtenido frente a la estimulación de la vía aferente en la situación control (Negro), o luego de la estimulación optogenética (ver MyM.1, Rojo). Los asteriscos indican la presencia de pop spikes. **C** Dinámica temporal de la amplitud del pop spike a lo largo de los pulsos del tren, antes (Negro) y después (Rojo) de la estimulación optogenética, relativizado a la amplitud promedio del primer pulso. Las barras de error indican el error estándar de cada punto. En presencia de picrotoxina, la estimulación optogenética no produce cambios en la respuesta poblacional del DG. (ANOVA de medidas repetidas, variación control vs opto: ns  $p > 0,5$ ; variación entre pulsos:  $***p < 0.0001$ ; interacción: ns  $p > 0,5$ ;) **D** Promedio de la suma de pop spikes evocados por un tren de estimulación a 10Hz, relativo al control. La estimulación optogenética (opto) no produjo cambios en la respuesta poblacional evocada. (T-test, control vs opto:  $p > 0,05$ ).

Propiedades intrínsecas			
	V <sub>m</sub> (mV)	R <sub>m</sub> (mOhm)	Umbral
Control	-76.53 ± 2.03	522.3 ± 58.46	-40.2 ± 2.05
Opto	-76.13 ± 3.37	579.4 ± 42.59	-42.2 ± 1.67
CBC	-68.91 ± 3.74	635.7 ± 46.54	-40.7 ± 3.88

**Tabla R2-1. Modulación colinérgica de las propiedades intrínsecas de matGC.** matGC fueron registradas mediante la técnica de patch clamp a fin de medir distintas propiedades intrínsecas. Una de ellas, V<sub>m</sub> o voltaje de reposo (medido en mV) es la diferencia de voltaje que existe entre el interior y el exterior de la neurona, producida por las distintas concentraciones iónicas a ambos lados de la membrana en una situación en la que la neurona no está excitada. La R<sub>m</sub> (medida en mOhm) es la resistencia de membrana, que es inversamente proporcional a la conductancia de iones a través de la misma. Según la ley de Ohm, la R<sub>m</sub> indica la relación entre el paso de corriente a través de la membrana celular y la variación en el potencial (o voltaje) de la misma. Finalmente, el umbral de disparo (medido en mV), indica el voltaje mínimo al cual se produce un potencial de acción en la neurona. La estimulación optogenética no modifica las propiedades intrínsecas de las GC (T-test, V<sub>m</sub> control vs opto: p>0.05, R<sub>m</sub> control vs opto: p>0.05, Umbral control vs Opto: p>0.05). El CBC despolariza el potencial de membrana de las GC (T-test, V<sub>m</sub> control vs opto: \*p<0.05, R<sub>m</sub> control vs opto: p>0.05, Umbral control vs Opto: p>0.05).



## Parte 2: Mecanismo sináptico que genera las diferencias de activación de las células granulares maduras frente a la modulación colinérgica

---

### Introducción: Parte 2

---

Los resultados presentados en la parte 1 muestran que la activación colinérgica tanto endógena como farmacológica produce un aumento en la activación en las GC en respuesta a estímulos aferentes de la mPP. Además, esta modulación requiere de circuitos inhibitorios y actúa a través de receptores nicotínicos. La inhibición cumple un papel fundamental en la determinación de las diferencias de reclutamiento de las GC. Estudios previos en nuestro laboratorio demuestran que la activación de las GC ante estímulos aferentes depende en gran medida de la integración entre las corrientes postinápticas excitatorias e inhibitorias (EPSC y IPSC, respectivamente) reclutadas (Marín-Burgin et al., 2012, Pardi et al., 2015). La activación a 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 (y por lo tanto, se acumulen) a lo largo del tren, en cambio las corrientes excitatorias deprimen de un pulso al otro y la depresión aumenta con la frecuencia. Existe creciente evidencia que muestra que los circuitos inhibitorios del hipocampo están finamente regulados por mecanismos múltiples (Teles-Grilo Ruivo and Mellor, 2013). Se ha propuesto que estas redes inhibitorias proveen al circuito de un contexto de oscilaciones coordinadas, sobre el cual las neuronas principales codificarían el contenido (Freund and Buzsaki, 1996). Una posibilidad es que estas neuronas sean las encargadas de comunicar al circuito cambios específicos en el estado de la red (motivación, atención, etc.), por ejemplo, a través de sistemas neuromodulatorios (Varga et al., 2009). Esto permitiría un rápido control del tipo de codificación de toda la red. En esta parte de la tesis estudiamos cómo la modulación colinérgica modifica el reclutamiento de corrientes postinápticas excitatorias e inhibitorias evocadas ante trenes de estimulación aferente a 10Hz.

## Resultados: Parte 2

---

### *Modulación de las corrientes postsinápticas excitatorias e inhibitorias evocadas en neuronas granulares maduras por liberación endógena de acetilcolina*

Para estudiar de qué modo la inhibición reclutada afecta los perfiles de activación de las matGC antes y después de la modulación colinérgica, estudiamos las corrientes excitatorias e inhibitorias subyacentes a la activación frente a trenes de estimulación aferente. Para ello, colocamos un electrodo de estimulación en la MML y realizamos registros de *whole cell* en modo *voltage clamp* en matGC para medir las EPSC y IPSC evocadas frente a estímulos aferentes, utilizando una solución interna con Cs<sup>+</sup>; la EPSC fue registrada al potencial de reversión de la inhibición (-60mV), y la IPSC fue registrada al potencial de reversión de la excitación (0mV) (Fig. R.2-1 A; Fig. M.3). Calibramos el estímulo para que la EPSC evocada se encuentre entre 50 y 200 uA en el primer pulso del tren en la situación control.

Tal como se observa en los trazos, la IPSC que es lenta se suma a lo largo de los pulsos del tren, mientras que la EPSC es rápida por lo que no presenta sumación, sino que deprime (Fig. R.2-1 B). Esto genera que la carga inhibitoria acumulada en los sucesivos pulsos sea mucho mayor a la carga excitatoria, lo que explica el perfil de activación de las matGC, como se había mostrado previamente en nuestro laboratorio (Pardi et al., 2015).

Cuantificamos la conductancia excitatoria e inhibitoria (EPSC y IPSC, respectivamente) máxima a cada uno de los pulsos de los trenes de estimulación para cada matGC en la situación control (basal) y luego de la liberación de acetilcolina endógena (empleando el mismo protocolo de estimulación optogenética usado en la sección anterior). Notoriamente, las IPSC medidas luego de la liberación de Ach son sustancialmente menores que en la situación basal, mientras que las EPSC no presentan diferencias (Fig. R.2-1 C y D). Esto indica que la Ach efectivamente actúa sobre los circuitos inhibitorios, generando una disminución en la corriente postsináptica evocada por la estimulación aferente y produciendo un aumento en el balance E/I que explica el mayor grado de activación de las matGC (Fig. R.2-1 E). De acuerdo con los resultados de la sección anterior, además, se encontró que la modulación actúa a través de receptores nicotínicos, ya que la disminución en la corriente inhibitoria producida por la liberación optogenética de Ach es bloqueada en presencia de mecamilamina (Fig. R.2-1 F-H).

## Conclusiones: Parte 2

---

En esta parte de la tesis hemos profundizado sobre el mecanismo de acción de la modulación colinérgica. A partir de los resultados de la sección anterior surgió la hipótesis de que la Ach actúa modulando principalmente los circuitos inhibitorios, ya que al bloquearlos se anulan los efectos de este neuromodulador sobre el perfil de activación de matGC. En esta sección, confirmamos que el principal efecto que la Ach ejerce sobre las corrientes evocadas en matGC es una fuerte disminución de la carga inhibitoria reclutada mediante la activación de la vía aferente. Dado que la modulación colinérgica no produjo cambios significativos en la corriente excitatoria evocada, el resultado neto es un aumento en el balance E/I que las neuronas integran ante estímulos aferentes provenientes de la MEC, lo cual explica los mayores niveles de activación en respuesta a la estimulación de esta vía. Además, en concordancia con los experimentos realizados en la primera parte, los resultados farmacológicos de esta sección muestran que la señalización nicotínica es necesaria para producir esta disminución en la inhibición reclutada sobre las matGC.

## Discusión: Parte 2

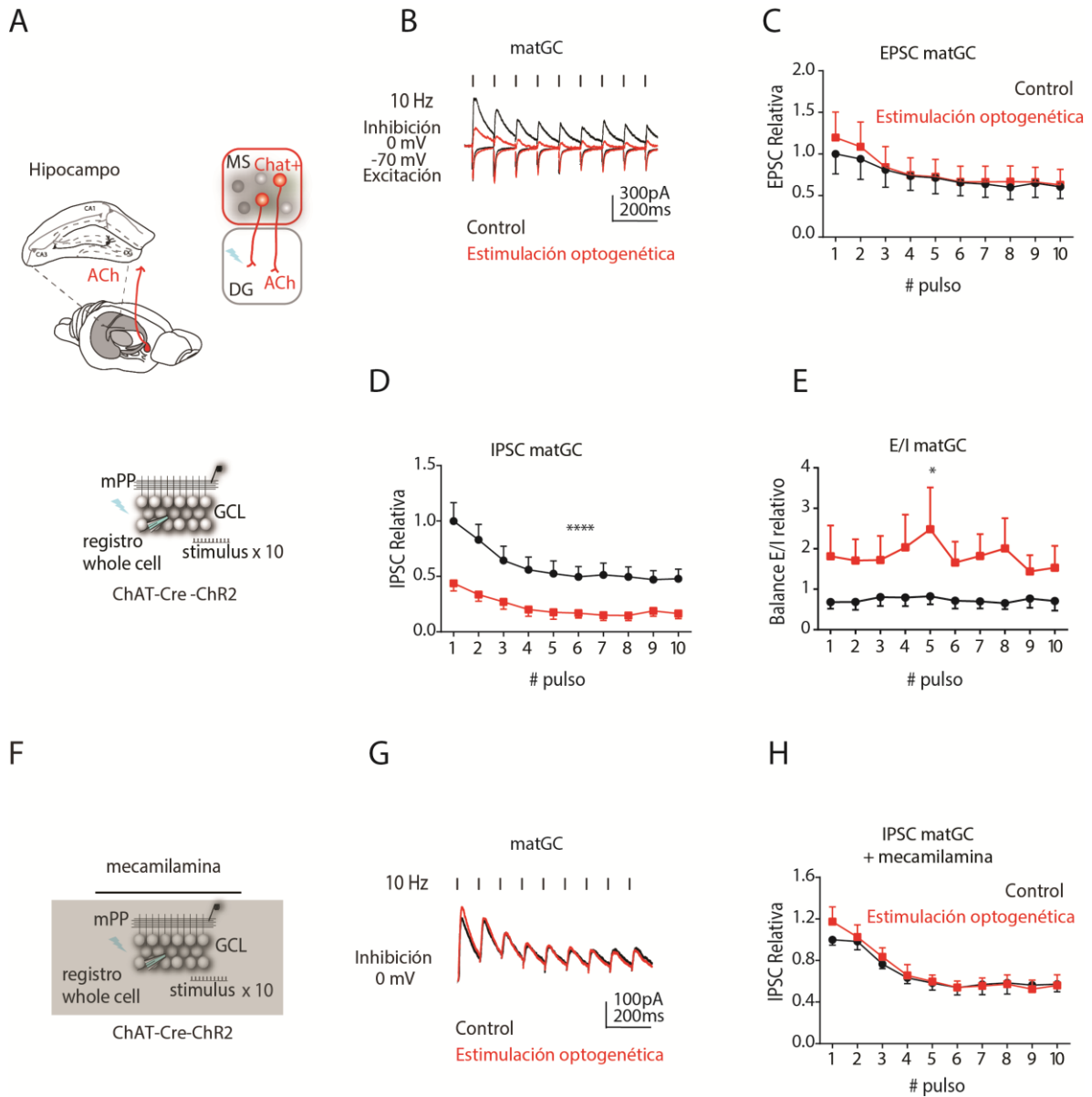
---

La mayoría de las neuronas del DG son GC maduras, que presentan umbrales de activación altos debido a que la estimulación de la mPP recluta una fuerte y rápida inhibición en forma paralela. Estos resultados apoyan la hipótesis de que la baja actividad del DG está generada por los circuitos inhibitorios (Coulter et al., 2011), junto con resultados previos de nuestro laboratorio. Nuestros resultados sugieren que, en presencia de Ach, las matGC podrían ser preferencialmente activadas por un estímulo aferente, debido a una reconfiguración de los circuitos inhibitorios. Resultados previos en nuestro laboratorio muestran que las 4wpiGC reciben menos inhibición y que eso genera una mayor excitabilidad (Marín-Burgin et al., 2012). Debido a que las neuronas inmaduras se encuentran menos restringidas por los circuitos inhibitorios, las mismas son a su vez menos modulables a través de este tipo de mecanismos. Eso explica por qué las 4wpiGC no modifican su perfil de activación en presencia de Ach en comparación con las matGC. Existe creciente evidencia que demuestra que sistema neuromodulatorio colinérgico puede modificar la contribución de distintas subpoblaciones de interneuronas al procesamiento de estímulos en diferentes regiones del cerebro. ¿De qué manera se produce la disminución de la inhibición reclutada sobre GC frente a estímulos aferentes?

¿Cuál es la población de neuronas inhibitorias implicadas en este proceso? En la siguiente sección exploraremos en mayor profundidad cómo la Ach modula los distintos subcircuitos inhibitorios en el DG.



Figura R.2-1.



**Figura R.2-1. La liberación endógena de acetilcolina disminuye la corriente postsináptica inhibitoria evocada en GC a través de receptores nicotínicos. A** Diseño experimental. Rebanadas hipocampales fueron obtenidas a partir de ratones ChAT-Cre-ChR2. Los axones de neuronas colinérgicas que proyectan al DG fueron estimulados mediante un LED azul. El esquema de abajo muestra la configuración del registro: un electrodo de estimulación fue posicionado en la MML para estimular los axones de la mPP con trenes de 10 pulsos cuadrados a 10 Hz. Registros de *whole cell* en modo *voltage clamp* fueron obtenidos a partir de matGC. La estimulación de la vía aferente produce excitación monosináptica (EPSC) que fue medida al potencial de reversión de la inhibición (-60mV) e inhibición multisináptica (IPSC) que fue medida al potencial de reversión de la excitación (0mV). **B** Ejemplo de IPSC y EPSCs evocadas por estimulación de mPP en situación control (Negro) o luego de la estimulación optogenética (Rojo). La línea punteada muestra el

tiempo de cada estímulo. **C** Pico de EPSC relativas al promedio del primer pulso, para cada pulso del tren, en la condición control (Negro) o luego de la estimulación optogenética (Rojo). La activación de las terminales colinérgicas en el DG no produjo cambios en las EPSC evocadas en matGC. (ANOVA de medidas repetidas, control vs opto:  $p > 0.05$ ; variación debida al número de pulso:  $***p < 0.001$ ; interacción:  $p > 0.05$ ). **D** Pico de IPSC relativas para cada pulso en la condición control (Negro) o luego de la estimulación optogenética (Rojo). La activación de las terminales colinérgicas en el DG produjo una fuerte disminución en las IPSC evocadas en matGC (ANOVA de medidas repetidas, control vs opto:  $**p < 0.01$ ; variación debida al número de pulso:  $***p < 0.0001$ ; interacción:  $***p > 0.0001$ ). **E** balance E/I relativo para cada pulso en la condición control (Negro) o luego de la estimulación optogenética (Rojo). La activación de las terminales colinérgicas en el DG produjo un aumento en el balance E/I matGC (ANOVA de medidas repetidas, control vs opto:  $*p < 0.05$ ; variación debida al número de pulso:  $p > 0.05$ ; interacción:  $p > 0.05$ ). **F** La configuración de los registros fue idéntica a la empleada en (**A**), excepto que todos los registros fueron obtenidos en presencia del antagonista nicotínico mecamilamina. **G** Ejemplo de IPSC evocadas por estimulación de mPP en situación control (Negro) o luego de la estimulación optogenética (Rojo). La línea punteada muestra el tiempo de cada estímulo. **H** Pico de IPSC relativas para cada pulso en la condición control (Negro) o luego de la estimulación optogenética (Rojo). La presencia de mecamilamina previene la disminución colinérgica de las IPSC evocadas en matGC. (ANOVA de medidas repetidas, control vs opto:  $p > 0.05$ ; variación debida al número de pulso:  $***p < 0.0001$ ; interacción:  $p > 0.05$ ).

## Parte 3: Modulación colinérgica de los circuitos inhibitorios en el giro dentado

---

### Introducción: Parte 3

---

En las secciones 1 y 2, hemos observado que el principal mecanismo sináptico de modulación colinérgica de la actividad de GC es mediante la disminución de la corriente inhibitoria evocada, que genera un aumento en el balance E/I y por lo tanto una mayor activación de GC. A continuación, buscamos entender con mayor detalle qué poblaciones de neuronas inhibitorias están involucradas en este proceso de potenciación de la actividad en el DG.

Como se mencionó en la introducción, la estimulación de la mPP recluta tanto excitación monosináptica como inhibición disináptica de tipo *feedforward* sobre las GC. A su vez, las GC reclutan inhibición disináptica sobre sí mismas mediante interneuronas de tipo *feedback*. Estos circuitos inhibitorios ejercen una influencia diferencial según el tipo de patrón de activación de la vía aferente. Frente a un único pulso de estimulación la inhibición *feedforward* (FF-INH) reclutada puede ser lo suficientemente rápida como para afectar la activación de la célula, en cambio, la inhibición *feedback* (FB-INH), al requerir la activación de las células principales, ocurrirá demasiado tarde (Roux and Buzsaki, 2015). Sin embargo, si a un intervalo corto de tiempo llega un nuevo estímulo, éste sí será afectado por la FB-INH evocada con el pulso anterior. De este modo, los patrones de activación de las células, así como el grado de reclutamiento de distintos componentes del circuito inhibitorio, dependen de la frecuencia de la estimulación.

Las interneuronas de tipo PV (PVI) son responsables de proveer una fuerte inhibición perisomática a las GC, controlando efectivamente la producción de potenciales de acción. Las mismas reciben contactos excitatorios provenientes de la EC sobre sus dendritas apicales. A su vez reciben contactos excitatorios provenientes de las GC a nivel de sus dendritas basales. Al ser activadas por la mPP, participan de la FF-INH. De la misma manera, dado que reciben contactos excitatorios de las *mossy fibers* provenientes de las GC, forman parte del circuito de FB-INH.



La conectividad y especificidad funcional en la población de interneuronas SOM (SOMI) no está tan caracterizada, pero recientemente se observó la existencia de al menos dos subpoblaciones. Como se mencionó en la introducción, las SOMI de tipo HIPP, reciben contactos excitatorios principalmente provenientes de las *mossy fibers*, y sus axones se distribuyen en la ML, proveyendo FB-INH a las dendritas apicales de las GC. Además, se ha caracterizado una segunda subpoblación de SOMI llamada HILL, cuyo árbol axonal está en gran medida relegado al hilus dentro del DG. Estos axones inervan perisomáticamente a otras interneuronas, siendo capaces de llevar a cabo una desinhibición del DG.

A fin de comprender el mecanismo mediante el cual la Ach modula los microcircuitos inhibitorios en el DG, estudiamos sus efectos sobre diferentes componentes de dichos circuitos. Para ello se han empleado estrategias que permiten diseccionar subcircuitos de acuerdo a criterios tanto funcionales como moleculares. Finalmente, evaluamos el efecto de la Ach sobre las corrientes evocadas en interneuronas individuales, a fin de comprender en mayor profundidad la manera en la cual se reconfigura el circuito.

## Resultados: Parte 3.1

---

### *La acetilcolina reduce específicamente el componente feedforward de la inhibición evocada en neuronas granulares maduras*

En primer lugar, estudiamos el rol de la modulación colinérgica sobre los circuitos inhibitorios de tipo *feedforward* en el giro dentado. Para ello bloqueamos farmacológicamente la salida (*output*) de las GC, utilizando el agonista de autorreceptores metabotrópicos glutamatérgicos tipo II: DCG4 (Fig. R.3-1 A). Estos receptores son mayoritariamente expresados por las *mossy fibers* (los axones de las GC), y cuando se activan impiden en gran medida la transmisión glutamatérgica en esa sinapsis. Por lo tanto, en presencia de DCG4 evaluamos el efecto de la liberación endógena de Ach sobre la inhibición reclutada por la mPP en matGC. Empleamos la técnica de *patch clamp* en modo *whole cell* en matGC de rodajas hipocampales provenientes de ratones ChAT-Cre-ChR2. Utilizamos las mismas condiciones que las empleadas para registrar las IPSC en la sección anterior y cuantificamos carga inhibitoria total acumulada en los 10 pulsos del tren de estimulación de la mPP (IPSQ-FF). La misma fue medida como el área total bajo la curva de la corriente inhibitoria, y es equivalente a la cantidad neta de iones que pasan a través de

la membrana celular frente a los 10 pulsos de estimulación aferente. Registramos, el promedio de la IPSQ-FF para un total de 5 ensayos por neurona, en la situación control (basal) y luego de la liberación de acetilcolina endógena (Fig. R.3-1 B). El protocolo optogenético utilizado fue idéntico al de las secciones R.1-3 y R.2-1. En estas condiciones, observamos una disminución significativa de la IPSQ-FF luego de la modulación colinérgica (Fig. R.3-1 C).

Complementariamente, para evaluar el rol de la modulación colinérgica en la FB-INH, estimulamos las GC de manera directa, evitando la activación de la vía aferente y por lo tanto el reclutamiento de FF-INH (Fig. R.3-1 D). Para ello, colocamos un electrodo de estimulación en la GCL de rebanadas hipocampales provenientes de ratones ChAT-Cre-ChR2. Mediante este método es posible activar eléctricamente los somas de las GC sin inducir la liberación de glutamato en los axones provenientes de la EC, los cuales se encuentran en la ML. De este modo, se activó parte de la población de GC, registrando la FB-INH reclutada sobre las otras, mediante la técnica de *voltage clamp* en modo *whole cell* (Fig. R.3-1 E). Medimos la carga inhibitoria evocada por un tren de 10 pulsos a 10 Hz (IPSQ-FB), en una situación control o luego de la activación colinérgica. Es interesante mencionar que la Ach no modificó significativamente la IPSQ-FB (Fig. R.3-1 F), por lo que concluimos que la modulación colinérgica afecta específicamente a la inhibición de FF-INH.

## Resultados: Parte 3.2

---

### *La acetilcolina reduce la inhibición reclutada por la población de neuronas inhibitorias que expresan parvalbumina, pero no la inhibición reclutada desde interneuronas de tipo SOM*

Se sabe que en el DG del hipocampo existen principalmente dos poblaciones de interneuronas que inervan a las GC. Las PVI, como se explicó en la introducción de esta sección, proveen inhibición fuerte perisomática a las GC, y llevan a cabo la mayor parte de la FF-INH, pudiendo también participar de la FB-INH. La segunda población de neuronas inhibitorias es la SOMI, y en particular la subpoblación SOM-HIPP. Como se explicó en la introducción, esta población provee principalmente FB-INH, e inervan específicamente el árbol dendrítico de las GC. Decidimos investigar la población específica de neuronas inhibitorias responsable de este cambio en el procesamiento de información ante la

liberación de Ach empleando líneas transgénicas que expresan la recombinasa Cre en cada una de estas poblaciones de neuronas inhibitorias.

Para ello, se inyectó un adenovirus condicional para ChR2 (AAV9-dFlox-ChR2) en el DG del hipocampo de ratones PV-Cre o SOM-Cre, a fin de activar específicamente a cada población de neuronas. Dos a seis semanas más tarde, realizamos rodajas de hipocampo provenientes de estos ratones en las que podemos activar con luz azul la liberación de GABA desde las interneuronas que expresan ChR2 (Fig. R.3-2 A). De esta manera, al dar un pulso de luz sobre la rodaja se puede observar una corriente inhibitoria evocada en matGC, que se produce debido a la activación de una población de interneuronas de tipo PVI o SOMI. Realizamos registros de *patch clamp* en modo *voltage clamp* al potencial de reversión de la excitación (0mV). Medimos la corriente inhibitoria evocada por un tren de luz de 10 pulsos a 10 Hz (frecuencia que ChR2 es capaz de seguir) antes y después del agregado al baño de CBC (Fig. R.3-2 B). Observamos que la IPSC recibida por las GC mediante la activación directa de las PVI también disminuye en presencia de CBC (Fig. R.3-2 C). Resultados similares se obtienen si se cuantifica la carga total evocada en los 10 pulsos del tren (IPSQ, datos no mostrados). Esto indica que las PVI disminuyen su participación en el control de la actividad de las GC.

Sorprendentemente, cuando registramos la corriente evocada en las GC por SOMI, la misma no cambió en presencia de CBC (Fig. R.3-2 D-F). Es importante destacar que en estos experimentos únicamente estamos evaluando el efecto de la modulación colinérgica en la subpoblación de neuronas SOM-HIPP, es decir, las que proyectan hacia GC, ya que solo estamos evaluando la corriente inhibitoria en este blanco postsináptico. Estos resultados sugieren que los efectos de la modulación colinérgica son específicos para la conexión PV-GC.

### Resultados: Parte 3.3

---

*La acetilcolina modula de manera opuesta el balance excitación inhibición de interneuronas de tipo PV vs interneuronas de tipo SOM*

Hasta aquí hemos encontrado que la Ach reconfigura los circuitos inhibitorios de una manera altamente específica, afectando en particular la FF-INH, mayoritariamente llevada

a cabo por PVI. Además, consistentemente con esto, hemos observado que la inhibición generada desde las PVI hacia matGC disminuye ante un estado de alta Ach. Por lo tanto, este neuromodulador parece estar afectando de manera específica a esta subpoblación de neuronas inhibitorias. Las PVI reciben a su vez, inhibición de otras interneuronas de su misma clase, y de otras subpoblaciones, es decir que, al igual que las GC, su actividad depende del balance entre las corrientes excitatorias e inhibitorias que las mismas integran. Como se explicó en la introducción al estimular la mPP se activan neuronas inhibitorias que proveen inhibición homotípica o heterotípica a neuronas inhibitorias, formando una compleja red, finamente regulada. En particular, en el DG del hipocampo existe una subpoblación de neuronas SOMI que contactan el soma y las dendritas basales de PVI en el hilus (Yuan et al., 2017). A su vez, las PVI proyectan hacia las SOMI, por lo que estas dos poblaciones de neuronas inhibitorias se inhiben mutuamente, formando un circuito cerrado o *loop*. Decidimos entonces estudiar en mayor profundidad la manera en la que estas neuronas se comunican con el resto del circuito en presencia de Ach. Para ello, realizamos registros de tipo *whole cell* en PVI a fin de medir corrientes excitatorias e inhibitorias evocadas sobre estas neuronas ante un tren de estimulación de la vía aferente (Fig. R.3-3 A). Estimulamos la mPP con trenes de 10 pulsos a 10 Hz, dando 5 ensayos, a fin de registrar la EPSC ajustando el voltaje a -70mV y la IPSC fijando el voltaje en 0mV (Fig. R. 3-3 B). El agregado de CBC produjo sorprendentemente un aumento en la carga inhibitoria que reciben las PVI de la vía aferente (Fig. R. 3-3 C) y por lo tanto una disminución importante en el balance E/I (Fig. R.3-3 D). El aumento de inhibición reclutada en la PVI indica que hay una población de neuronas que inhiben a las PVI que se activan por CBC.

Luego, realizamos experimentos análogos pero esta vez estudiamos la subpoblación de interneuronas SOMI, en el hilus (Fig. R.3-3 E). Registramos en modo *whole cell* las corrientes excitatorias e inhibitorias recibidas por estas neuronas en una situación control y luego del agregado de CBC (Fig. R.3-3 F). Notablemente, el CBC produjo un incremento en el balance E/I de esta subpoblación de neuronas, y en particular, disminuyó la corriente inhibitoria recibida por las mismas ante la estimulación aferente (Fig. R.3-3 G-H). Es decir que la modulación colinérgica produce cambios opuestos en las corrientes inhibitorias recibidas por estas dos subpoblaciones de interneuronas, que a su vez se inhiben mutuamente. Estos resultados demuestran que la Ach en efecto reconfigura los microcircuitos inhibitorios, cambiando la contribución relativa de las distintas subpoblaciones de interneuronas en el control de la actividad de las GC.

### Conclusiones: Parte 3

---

En esta sección hemos profundizado sobre el mecanismo a través del cual ocurre una desinhibición de las matGC durante la modulación colinérgica. En primer lugar, hemos estudiado los diferentes tipos de inhibición funcional recibida por las matGC, y encontramos que la Ach afecta principalmente a FF-INH. Esta inhibición es desempeñada en DG principalmente por la subpoblación de PVI, que poseen parte de su árbol dendrítico en la MML, y por lo tanto reciben contactos directos de la EC. Al estudiar individualmente a esta subpoblación de neuronas inhibitorias encontramos que la corriente que producen en las matGC se ve reducida en presencia de Ach. Además, las mismas se encuentran más inhibidas durante la entrada de estímulos aferentes, lo que sugiere la presencia de otras interneuronas que proyectan hacia las PVI que aumentan su actividad. En efecto, encontramos que las interneuronas de tipo SOMI que se encuentran en el hilus aumentan el balance E/I, lo que las coloca en un lugar privilegiado para mediar estos cambios.

### Discusión: Parte 3

---

El DG del hipocampo presenta una actividad promedio notoriamente baja comparada con las demás regiones del hipocampo, y del cerebro en general, con una frecuencia promedio de 0.5Hz. Esto se debe principalmente a que los circuitos inhibitorios preponderan, ejerciendo un fuerte control de la actividad de las GC, y en particular de las matGC. Sin embargo, se ha observado que *in vivo* las GC presentan breves ráfagas de disparos a mayores frecuencias (Vyleta et al., 2016), que actúan como “detonadores condicionales” ya que logran inducir potenciales de acción de forma consistente en sus blancos postsinápticos. Además, es común observar variaciones de gran amplitud en el potencial de campo, llamados disparos del DG (*dentate spikes*). Es posible que estas fuertes despolarizaciones, así como las ráfagas de disparos de potenciales de acción sean generadas por ventanas temporales en las cuales hay desinhibición. Notablemente, los circuitos inhibitorios locales son los principales responsables de las diferencias de activación generadas por los trenes de estímulos (Pardi et al., 2015). El gran aumento de la inhibición a las frecuencias altas determina niveles de activación muy bajos. Dado el rol predominante de la inhibición en la determinación de los patrones de actividad en el DG,

es importante que existan mecanismos de desinhibición a fin de permitir fenómenos de plasticidad a largo término. 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 (Isaacson and Scanziani, 2011, Pouille et al., 2013, Roux and Buzsaki, 2015). 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 and Scanziani, 2001, Pouille et al., 2009).

Como se mencionó anteriormente, tanto las PVI como las SOMI participan de la inhibición de tipo *feedback*, pero sus blancos subcelulares son diferentes: mientras que las PVI inhiben principalmente el soma y las dendritas basales de las GC, las SOMI proyectan principalmente hacia la porción medial y apical del árbol dendrítico. Resulta importante señalar que la inhibición de tipo *feedback* en los somas de las GC (llevada a cabo a través de PVI) se reduce durante movimientos exploratorios, cuando los niveles de Ach son altos, mientras que la inhibición de tipo *feedback* en las dendritas (mayoritariamente desde SOMI) aumenta (Paulsen and Moser, 1998). Estos estudios señalan una reconfiguración de circuitos inhibitorios en la que una subpoblación aumenta su control de la actividad de las GC en detrimento de otra, y están en perfecta concordancia con los experimentos realizados en esta tesis. Paulsen y Moser especulan que esta aparente contradicción en los cambios observados en la inhibición podría actuar en conjunto como un filtro acoplado a un amplificador, incrementando el contraste entre señales con diferentes relaciones al comportamiento. Cuando los estímulos son débiles, éstos no serían capaces de sobreponerse a la inhibición dendrítica fuerte, mientras que una vez que lo logran (estímulos más fuertes), los mismos serían amplificados por la inhibición perisomática reducida.

Además, los circuitos inhibitorios son esenciales para la generación de oscilaciones en el hipocampo, ya que restringen la actividad de las neuronas principales y por lo tanto sincronizan a la red. Registros de campo extracelular *in vivo* demuestran que el potencial de campo en el DG 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

and Buzsaki, 2015). Además, el septum oscila de manera sincronizada con el hipocampo y se ha demostrado que el mismo es el que promueve las oscilaciones, ya que la actividad de neuronas en esta región antecede la actividad oscilatoria en el hipocampo (Petsche et al., 1962, Buzsaki et al., 1983, Stewart and Fox, 1990, Kang et al., 2017). Sin embargo, en particular durante las oscilaciones theta, se ha observado que tanto la direccionalidad septum-hipocampo como la inversa (hipocampo-septum) están presentes, y por lo tanto las conexiones recíprocas entre ambas regiones son claves en la generación de este tipo de oscilaciones (Kang et al., 2017).

Notablemente, las interneuronas HIL del DG, cumplen con la condición única de inervar tanto neuronas glutamatérgicas en el septum como a neuronas inhibitorias locales en el hilus del DG, permitiendo la sincronización rápida y eficiente de ambas estructuras, necesaria para el aprendizaje (Kang et al., 2017). Dado que la mayor parte de las SOMI que se encuentran en el hilus son de tipo HIL, podemos asumir que al menos una parte de las SOMI registradas en los experimentos en la configuración *whole cell* son en efecto neuronas que proyectan a otras interneuronas localmente en el DG, y en particular, a PVI. Hemos visto en esta sección que las PVI reciben una mayor inhibición durante un estado de neuromodulación colinérgica (mientras que las SOMI aumentan su balance E/I), por lo que las HIL son un buen candidato para mediar este aumento en la inhibición reclutada sobre las PVI, generando desinhibición en el DG. Nuestros resultados son similares a estudios realizados en la región CA1 del hipocampo que muestran que la liberación de Ach endógena produce corrientes inhibitorias dependientes de receptores nicotínicos en PVI (Bell et al., 2015). Esta arquitectura de circuito permite que en estados en los que la Ach es alta, la actividad del septum y el DG se acoplen. Además, la desinhibición del DG puede permitir que ocurran cambios en los pesos de las sinapsis que reciben estímulos durante ese momento. Por ejemplo, las 4wpiGC, que presentan una inhibición inmadura, 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. Existe creciente evidencia que remarca el rol de las SOMI en inhibir neuronas gabaérgicas y promover la activación de neuronas principales. En particular, la activación optogenética de las neuronas SOMI en CA1 promueve la inducción de LTP en la vía procedente de CA3 (*Schaffer collaterals*), por lo que ejercen un rol primario desinhibitorio en esta región. Además, como ya hemos mencionado, en el DG existe una subpoblación de neuronas SOMI que se especializa en inhibir a otras interneuronas. Es destacable al respecto, que estímulos repetitivos de contactos glutamatérgicos en las HIL

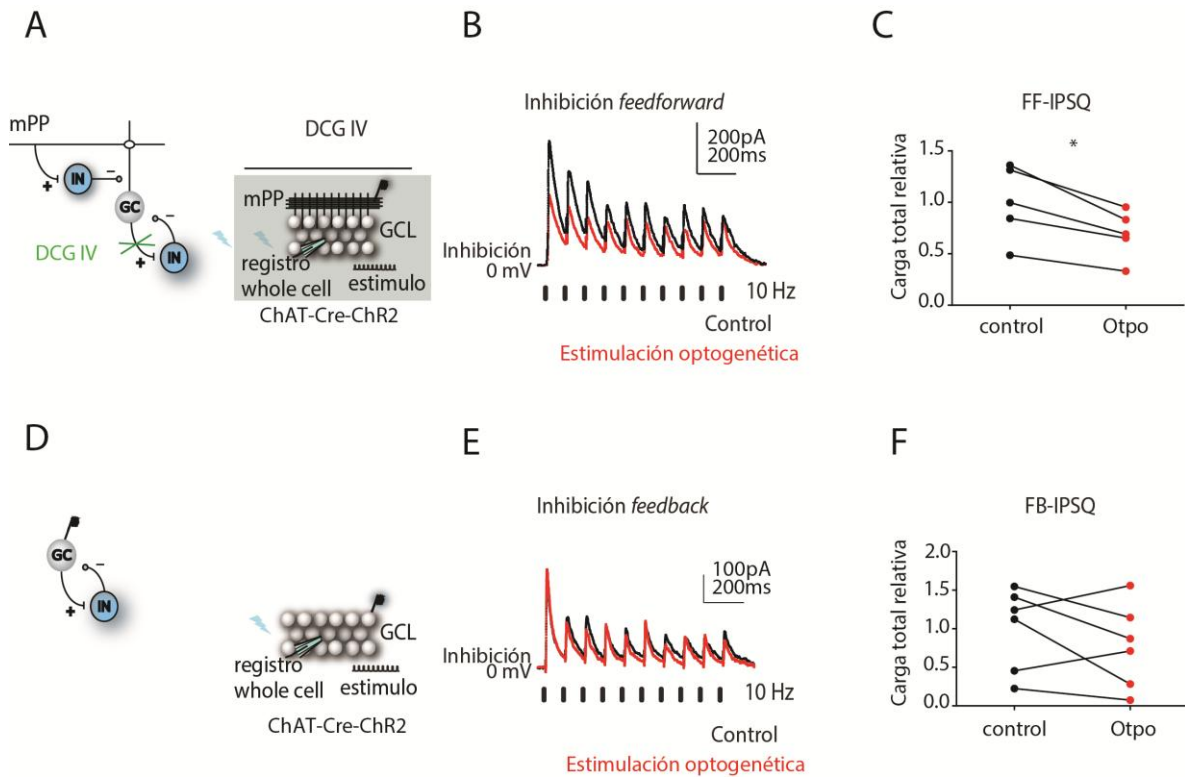
producen LTP en estas neuronas, lo cual aumentaría su poder desinhibitorio (Yuan et al., 2017). Los experimentos realizados demuestran que la acetilcolina reduce el componente *feedforward* de la inhibición, y en particular disminuye la participación de las PVI en el control de la actividad en el DG, y sugieren un mecanismo de desinhibición a través de una subpoblación de neuronas que inhiben a las PVI, posiblemente SOMI. Un segundo mecanismo que podría explicar la disminución de la corriente directa reclutada desde las PVI hacia las GC (Fig. R.3-2) es la activación de receptores nicotínicos expresados en los axones de las mismas. Se ha demostrado que esta activación puede inducir la liberación espontánea de GABA desde los mismos, y al mismo tiempo disminuir la liberación evocada, posiblemente por depleción de las vesículas GABAérgicas en dichos terminales (Tang et al., 2011). De esta manera, ambos mecanismos podrían converger en una menor participación de las PVI en el control de la actividad de GC en el DG.

En situaciones de altos niveles de actividad colinérgica, las matGC podrían, por lo tanto, presentar menores umbrales de inducción de LTP. Exploraremos esta posibilidad en la siguiente sección.



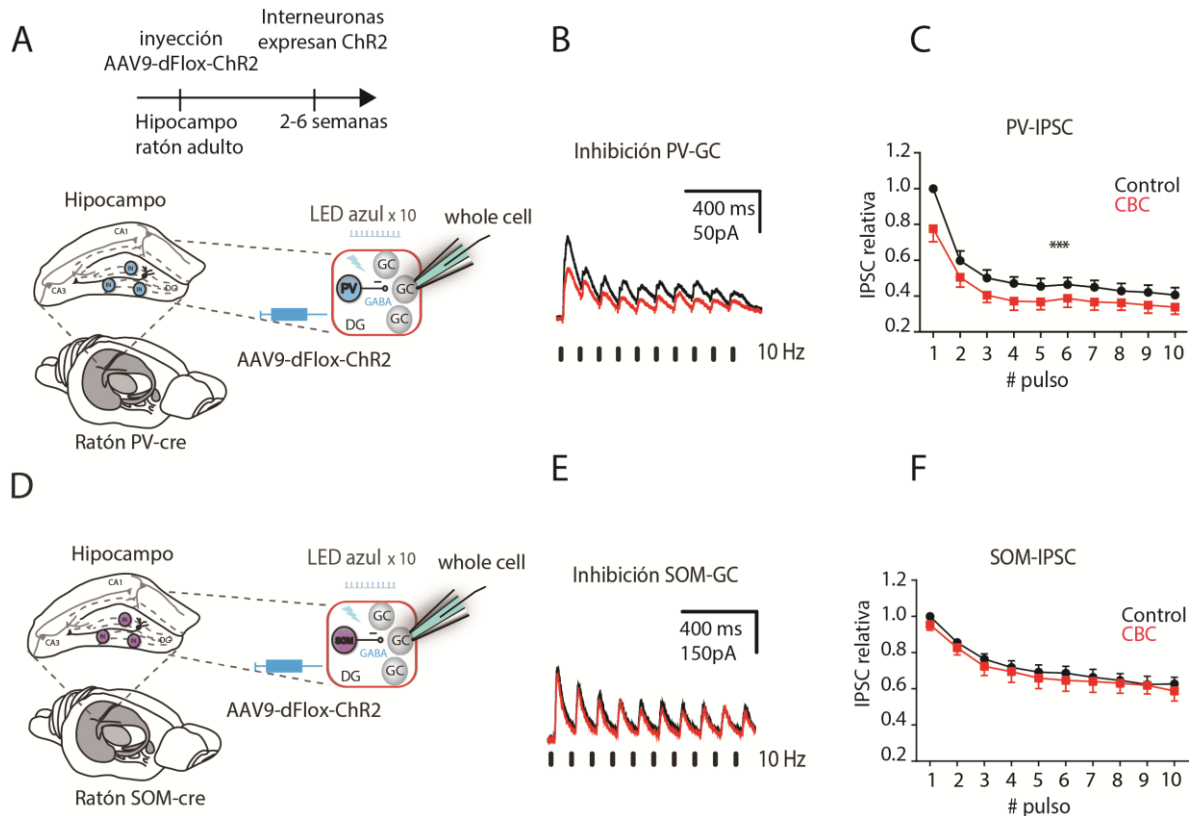


Figura R.3-1.



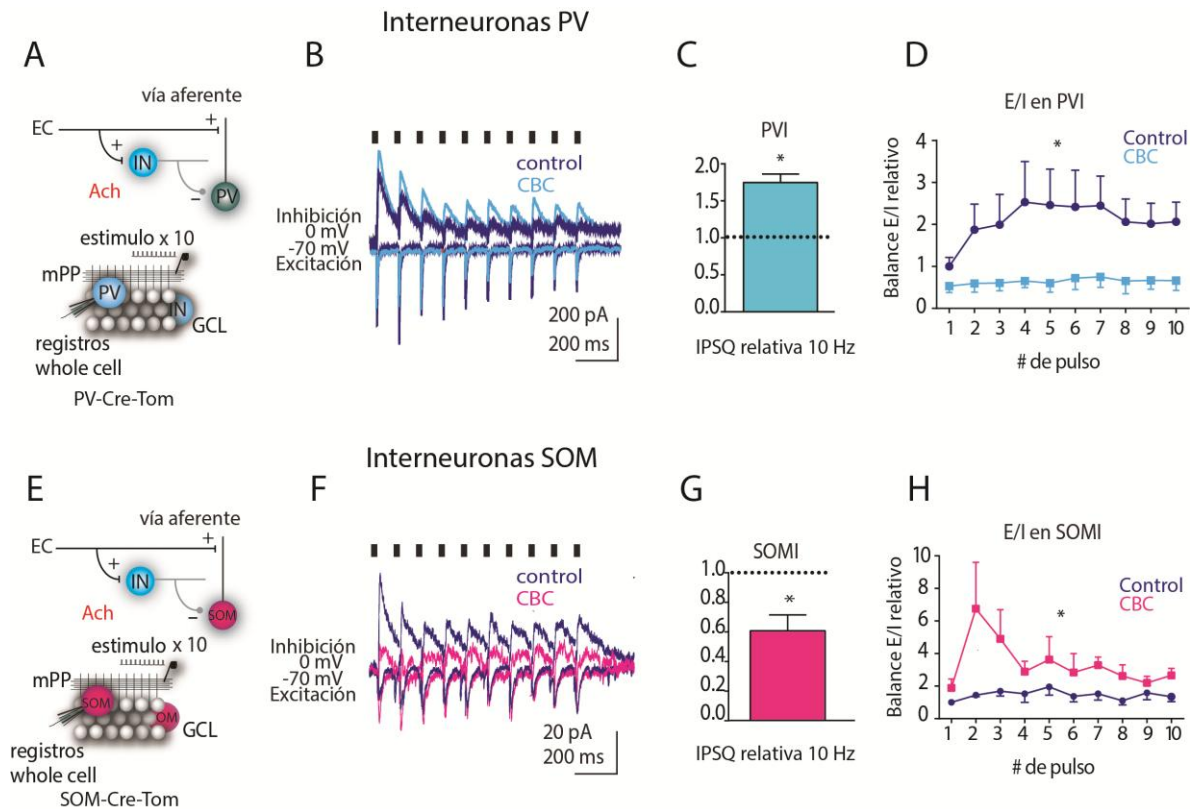
**Figura R.3-1. La liberación de acetilcolina disminuye específicamente el componente feedforward de la IPSC evocada en GC.** **A** Configuración de los registros mostrando el circuito activado. La estimulación de la mPP produce excitación monosináptica e inhibición disináptica de tipo FF-INH. La FB-INH se recluta a través de la actividad de GC. La perfusión de DCG4 en el baño bloquea la FB-INH, dejando únicamente FF-INH. **B** Ejemplo de FF-IPSC evocadas por estimulación de mPP en situación control (Negro) o luego de la estimulación optogenética (Rojo). La línea punteada muestra el tiempo de cada estímulo. **C** Carga inhibitoria total (FF-IPSQ) evocada por un tren de estimulación de 10 pulsos. La liberación de acetilcolina endógena disminuye la FF-IPSQ (T-test control vs opto: \* $p < 0.05$ ). **D** Configuración de los registros mostrando el circuito activado. La estimulación directa de las GC produce FB-INH. El electrodo de estimulación fue colocado en la GCL para evitar el reclutamiento de FF-INH. **E** Ejemplo de FB-IPSC evocadas por estimulación de la GCL en situación control (Negro) o luego de la estimulación optogenética (Rojo). La línea punteada muestra el tiempo de cada estímulo. **F** Carga inhibitoria total (FB-IPSQ) evocada por un tren de estimulación de 10 pulsos. La liberación de acetilcolina endógena no altera la FB-IPSQ (T-test, control vs opto:  $p > 0.05$ ).

Figura R.3-2



**Figura R.3-2. La modulación colinérgica reduce la inhibición evocada a través de PVI pero no SOMI. A** Esquema experimental. Ratones PV-Cre fueron inyectados estereotáxicamente en el hipocampo dorsal con un adenovirus que expresa condicionalmente la proteína Chr2 (AAV-flxStop-ChR2). La línea de tiempo indica el momento de la inyección. Dos a seis semanas más tarde, rebanadas hipocampales fueron obtenidas de estos animales en las que es posible activar a las neuronas PVI mediante pulsos de luz azul. Trenes de estimulación lumínica fueron utilizados para evocar corrientes inhibitorias en las GC. Las corrientes fueron medias en matGC mediante la técnica de *whole cell* en modo *voltage clamp* al potencial de reversión de la excitación (0mV). **B** Ejemplo de PV-IPSC evocadas por estimulación optogenética en situación control (Negro) o en presencia de CBC (Rojo). La línea punteada muestra el tiempo de cada estímulo. **C** Pico de PV-IPSC para cada pulso relativas al primer pulso en la condición control (Negro) o en presencia de CBC (Rojo). El CBC produjo una disminución en las PV-IPSC evocadas en matGC (ANOVA de medidas repetidas, control vs opto: \*\* $p < 0.01$ ; variación debida al número de pulso: \*\*\*\* $p < 0.0001$ ; interacción: \*\*\*\* $p > 0.0001$ ). **D** El esquema experimental fue idéntico a (A) pero se partió de animales SOM-Cre, a fin de poder activar las SOMI mediante pulsos de luz azul. **E** Ejemplo de SOM-IPSC evocadas por estimulación optogenética en situación control (Negro) o en presencia de CBC (Rojo). La línea punteada muestra el tiempo de cada estímulo. **F** Pico de SOM-IPSC para cada pulso relativas al primer pulso en la condición control (Negro) o en presencia de CBC (Rojo). El CBC no produjo cambios en las SOM-IPSC evocadas en matGC (ANOVA de medidas repetidas, control vs opto:  $p > 0.05$ ; variación debida al número de pulso: \*\*\*\* $p < 0.0001$ ; interacción:  $p > 0.05$ ).

Figura R.3-3.



**Figura R.3-3. La modulación colinérgica produce cambios opuestos en el balance E/I de PVI y SOMI. A** Esquema experimental. Rebanadas hipocámpicas fueron obtenidas a partir de animales PV-Cre-Tom, en los cuales las PVI expresan la proteína fluorescente Td-tomato. La estimulación de la mPP produce excitación monosináptica (EPSC, medida a -70mV) e inhibición multisináptica (IPSC, medida a 0mV) en PVI. Abajo, esquema e la configuración el registro. Registros de *whole cell* en modo *voltage clamp* fueron obtenidos a partir de PVI. **B** Trazos representativos de corrientes postsinápticas evocadas ante la estimulación de la mPP con un tren de 10 pulsos a 10Hz en la situación control (Azul) o luego del agregado de CBC (Celeste). **C** Promedio de la IPSQ reclutada en PVI relativa al control, con su error estándar. El CBC produjo un aumento en la carga total inhibitoria (IPSC) reclutada sobre las PVI relativa al control (T-test, control vs CBC \* $p < 0.05$ ). **D** Balance E/I para cada pulso relativo al primer pulso en la condición control (Azul) o luego de la perfusión de CBC (Celeste) al baño. El CBC disminuye significativamente el balance E/I en PVI (ANOVA de medidas repetidas, control vs CBC, \* $p < 0.05$ ; variación debida al número de pulso: \*\* $p < 0.01$ ; interacción: \*\* $p < 0.01$ ). **E** El esquema experimental fue idéntico al utilizado en (A) excepto que se partió de ratones SOM-Cre-Tom, en los cuales las SOMI expresan la proteína fluorescente Td-tomato. **F** Registros representativos de corrientes postsinápticas evocadas ante la estimulación de la mPP con un tren de 10 pulsos a 10Hz en la situación control (Violeta) o luego del agregado de CBC (Fucsia). **G** Promedio de la IPSQ reclutada en SOMI relativa al control, con su error estándar. El CBC produjo una disminución en la carga total inhibitoria (IPSC) reclutada sobre las SOMI relativa al control (T-test, control vs CBC \* $p < 0.05$ ). **H** Balance E/I para cada pulso relativo al primer pulso en la condición control (Violeta) o luego de la perfusión de CBC (Fucsia) al baño. El CBC aumenta significativamente el balance E/I en SOMI (ANOVA de medidas repetidas, control vs CBC, \* $p < 0.05$ ; variación debida al número de pulso: \*\* $p < 0.01$ ; interacción: \*\* $p < 0.01$ ).

## Parte 4: Consecuencias funcionales de la modulación colinérgica

---

### Introducción: Parte 4

---

Los resultados presentados en la parte 1 muestran que frente a un estado neuromodulatorio de alta Ach, las GC del DG son capaces de cambiar sus propiedades de codificación de la información aferente, aumentando su probabilidad de activación. En las secciones 2 y 3 se demostró que el mecanismo a través del cual actúa este neuromodulador es mediante una reconfiguración específica de los circuitos inhibitorios. ¿Cuáles son las consecuencias funcionales de esta reconfiguración? Las neuronas colinérgicas que proyectan al hipocampo aumentan sus niveles de actividad durante la exploración activa o asociada a eventos novedosos. Se cree que en estos momentos el hipocampo debe optimizar la adquisición de información aferente desde las cortezas sensoriales a fin de actualizar los engramas que representan ese contexto (Prince et al., 2016). El almacenamiento de memorias a largo plazo requiere de cambios prolongados en la fuerza de conexiones sinápticas en el hipocampo, como el LTP o LTD. En particular, la plasticidad Hebbiana se basa en la coincidencia de liberación de neurotransmisor desde la presinapsis y el disparo de potenciales de acción en la postsinapsis (Hebb, 1949). Los potenciales de acción se producen en el segmento inicial del axón, pero pueden ser retropropagados hacia la dendrita. Estos potenciales de acción retropropagados pueden inducir LTP en sinapsis activas, presumiblemente a través de la activación de receptores de tipo NMDA, que sirven como un detector de coincidencia molecular (Prince et al., 2016). Se ha demostrado que los mecanismos involucrados en la inducción de LTP también son esenciales para el aprendizaje de memorias espaciales, condicionamiento de miedo, etc (Paulsen and Moser, 1998, Koranda et al., 2008). Se sabe que los circuitos inhibitorios llevan a cabo un rol fundamental en la inducción de potenciación. De hecho, gran parte de los estudios de este proceso en rodajas de cerebro se lleva a cabo en presencia de antagonistas de receptores de GABA, debido a la enorme dificultad de inducir estos cambios en presencia de circuitos inhibitorios intactos (Sarvey et al., 1989). Dado que la Ach modula el reclutamiento de circuitos inhibitorios en el DG del hipocampo, estudiamos la modulación colinérgica sobre la inducción de plasticidad a largo término en esta área. Nuestra hipótesis es que la Ach puede producir una ventana temporal en la cual se permite la plasticidad a largo término en una región que en condiciones basales se encuentra fuertemente dominada por los circuitos inhibitorios.

## Resultados: Parte 4.1

---

Para evaluar las consecuencias funcionales de la modulación colinérgica, decidimos estudiar cómo la Ach modifica la probabilidad de inducción de LTP en el DG. Este tipo de potenciación es generalmente muy difícil de obtener en circuitos con inhibición intacta. En cambio, generalmente al bloquear los circuitos inhibitorios la potenciación se puede lograr. De hecho, existen estudios realizados en el DG que proponen que las únicas neuronas que son capaces de potenciar sus sinapsis ante una estimulación tetánica son las GC inmaduras, ya que las mismas tienen circuitos inhibitorios aún poco desarrollados. Basados en este trabajo, empleamos un protocolo de estimulación tal que es incapaz de producir LTP en matGC, a no ser que se bloqueen los circuitos inhibitorios (Snyder et al., 2001). Para ello, obtuvimos rebanadas hipocampales a partir de animales ChAT-Cre-ChR2, en las que realizamos mediciones del potencial de campo excitatorio postsináptico (fEPSP), mediante la colocación de un electrodo de registro la MML. Como hemos mencionado, el fEPSP es proporcional a la corriente postsináptica reclutada en el árbol dendrítico de las GC. Estimulamos la mPP dando trenes de alta frecuencia (estimulación tetánica o HFS por sus siglas en inglés, *high frequency stimulation*). El protocolo de estimulación utilizado consistió en 4 trenes de 500 ms a 100 Hz con un ancho de pulso de 0.2ms fueron enviados cada 30 segundos (Fig. M.5). Comparamos la pendiente promedio del fEPSP evocada antes y después de la estimulación tetánica, a fin de evaluar si hubo o no potenciación (Fig. R.4-1 A). Para obtener la pendiente basal del fEPSP, estimulamos la vía aferente con un pulso cada 20 segundos, hasta obtener una medición estable (generalmente durante 15 minutos). A continuación, estimulamos a alta frecuencia y, 60 segundos después, volvimos a estimular con un pulso cada 20 segundos a fin de obtener la medición de la pendiente del fEPSP luego de la estimulación tetánica o HFS. En estas condiciones, no observamos un cambio en la pendiente del fEPSP. Para evaluar el rol de la Ach en la inducción de LTP, pareamos el protocolo de estimulación HFS con la activación de los terminales colinérgicos de manera optogenética. Sorprendentemente, en las mismas rodajas en las que no observamos potenciación mediante estimulación tetánica en ausencia de luz, al parear la estimulación de la vía aferente con la activación de los axones colinérgicos, se produjo un aumento significativo y a largo plazo (más de 30 minutos) de la pendiente del fEPSP, indicando LTP en la sinapsis mPP-DG (Fig. R.4-1 A-C). Es llamativo observar que en una misma rodaja se puede repetir la estimulación tetánica sola o pareada con la luz, y únicamente en presencia de luz se produce un incremento en

la pendiente del fEPSP incluso repitiendo más de una vez el protocolo (Fig. R.4-1 D). Esto indica que la Ach puede actuar a modo de detector de coincidencias, permitiendo que los estímulos de alta frecuencia que ingresan al DG en presencia de altos niveles de Ach produzcan fenómenos de plasticidad a largo término, siendo más fuertemente almacenados en esta región del hipocampo. Finalmente, realizamos experimentos similares excepto que mantuvimos una frecuencia baja de estimulación (1 pulso cada 20 segundos, es decir, 0.05Hz) durante todo el período de registro (Fig. R.4 E y F). En los mismos, la liberación de Ach no produce cambios en la pendiente del fEPSP (Fig. R.4 G), por lo que la potenciación colinérgica requiere de estímulos de mayor frecuencia.

### Conclusiones: Parte 4.1

---

Los resultados presentados en esta sección muestran que estímulos de alta frecuencia que en condiciones basales son incapaces de producir plasticidad a largo término, logran inducir LTP cuando coinciden temporalmente con la liberación de Ach endógena. De acuerdo a estudios previos, el protocolo de estimulación tetánica empleado para los experimentos de esta sección únicamente logra inducir potenciación en matGC cuando los circuitos inhibitorios se encuentran bloqueados. En efecto, en nuestras condiciones, este protocolo no produjo LTP en ninguna de nuestras réplicas experimentales. Sin embargo, breves pulsos de liberación de Ach endógena que en su totalidad duran solo 20 segundos, son suficientes para permitir potenciación aún con los circuitos inhibitorios intactos. Además, la coincidencia temporal entre la liberación de Ach y el estímulo tetánico es necesaria para permitir que estos procesos de plasticidad sináptica ocurran, ya que una estimulación que es posterior a la liberación de Ach no produce cambios en la respuesta del fEPSP. Finalmente, la liberación de Ach no produce potenciación de estímulos a frecuencias bajas (Fig. R.4 E y F). De esta manera, la Ach puede actuar a modo de detector de coincidencias y al mismo tiempo como un filtro, permitiendo que estímulos de alta frecuencia que co-ocurren con su liberación sean potenciados.

### Discusión: Parte 4.1

---

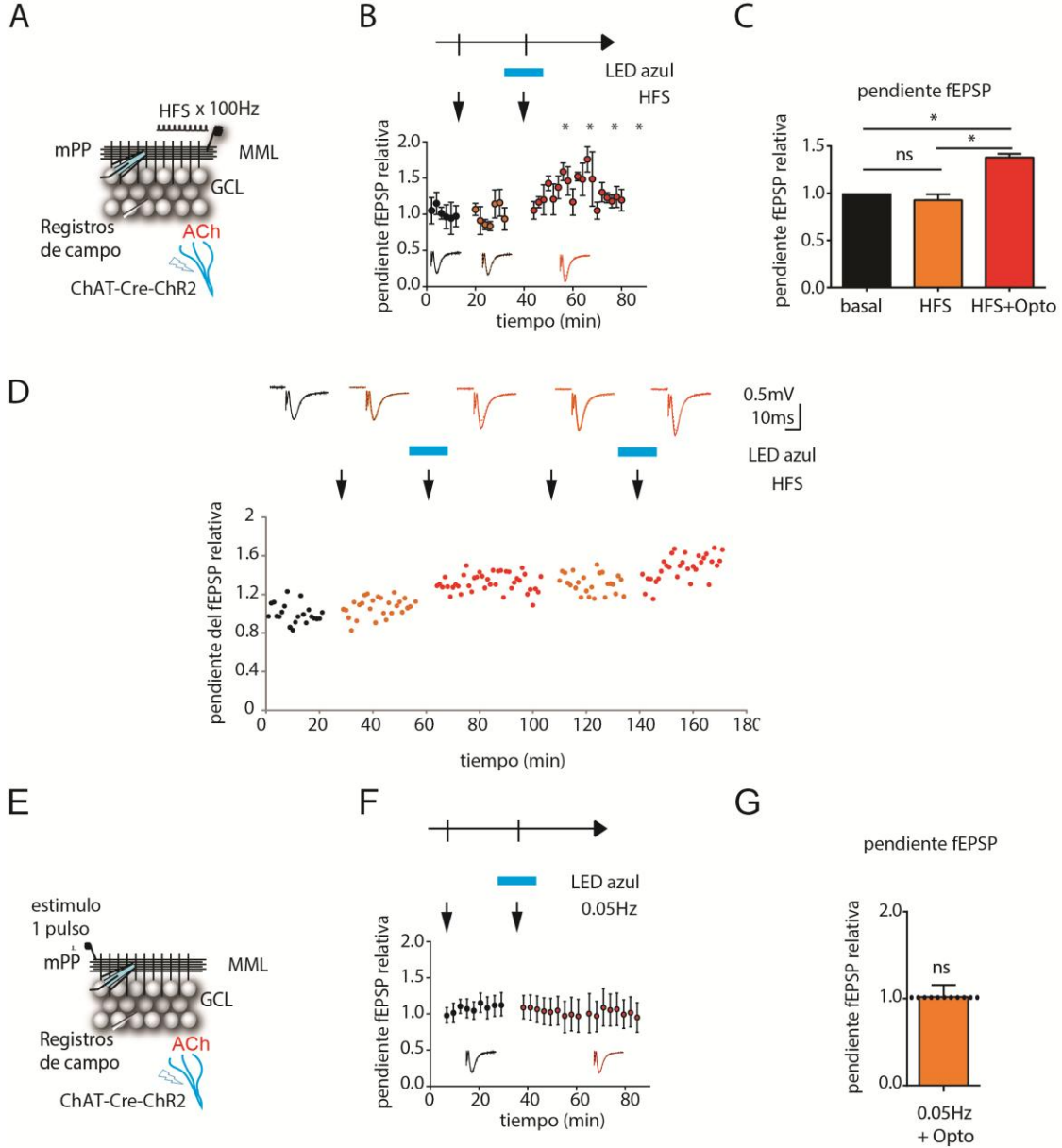
El hecho de que la activación de las 4wpiGC sea independiente de la inhibición, podría explicar por qué, a diferencia del resto de las neuronas del cerebro, la inducción de LTP en estas células puede realizarse con los circuitos inhibitorios intactos (Ge et al., 2007). Interesantemente, en presencia de Ach el umbral de inducción de LTP de neuronas maduras disminuye, haciendo que esta población de GC adquiriera características de

codificación más similares a las de las 4wpiGC. Observamos que pulsos muy cortos de Ach enviados en solo un minuto fueron suficientes para permitir la inducción de LTP en el DG cuando se combinan con estimulación de alta frecuencia de la vía aferente. Esta corta liberación de Ach desde los terminales en el hipocampo es compatible con la activación fásica de las neuronas septales encontrada durante el desarrollo de tareas que involucran memoria de trabajo, en las que la actividad colinérgica se asocia fuertemente a la codificación de recompensa en el hipocampo (Teles-Grilo Ruivo et al., 2017). Como ya mencionamos, la plasticidad hebbiana se basa en la coincidencia temporal de liberación presináptica de glutamato y el disparo de un potencial de acción postsináptico. Los potenciales de acción siempre comienzan en el segmento inicial del axón, río debajo de las dendritas, aunque pueden ser retropropagados hacia el árbol dendrítico, e inducir LTP en las sinapsis que se encuentran activas (Paulsen and Moser, 1998). Como habíamos explicado en la sección anterior, una disminución transitoria de la inhibición perisomática puede servir como un amplificador de las señales que son capaces de sobrepasar la inhibición dendrítica. Estos resultados son compatibles con los de la sección anterior, en la que observamos que las PVI (principales responsables de la inhibición perisomática en el DG) disminuyen su participación en el control de la actividad de matGC. En este escenario, las probabilidades de inducción de LTP por potenciales de acción retropropagados aumentan. Por lo tanto, estos resultados sugieren que la desinhibición producida por la liberación de Ach proveniente del septum abre una ventana temporal en la cual la información proveniente de la EC es más fuertemente codificada y logra inducir fenómenos de plasticidad a largo término, fundamentales para la adquisición de nuevas memorias.





Figura R.4-1.



**Figura R.4-1. La estimulación a alta frecuencia produce LTP en el DG únicamente cuando es pareada con la activación optogenética de terminales colinérgicos.** **A** Diseño experimental. Rebanadas hipocámpicas fueron obtenidas a partir de ratones ChAT-Cre-ChR2. Los axones de neuronas colinérgicas que proyectan al DG fueron estimulados mediante un LED azul. El esquema muestra la configuración del registro: un electrodo de estimulación fue posicionado en la MML para estimular los axones de la mPP con 4 trenes de 500 ms a 100 Hz, repetidos cada 30 segundos (HFS) con o sin estimulación de los terminales colinérgicos. Un electrodo de registro extracelular fue posicionado en la MML a fin medir la pendiente del fEPSP. **B** Evolución temporal de la pendiente del fEPSP (promedio de 5 experimentos). La flecha negra indica el momento en el

cual se estimuló mediante HFS. La barra azul indica el momento en el cual se indujo la liberación de Ach endógena mediante la activación de un LED azul. **C** Pendiente promedio del fEPSP antes (basal, Negro), 10 minutos luego del protocolo de HFS, o 10 minutos luego del protocolo de estimulación optogenética con HFS (HFS + Opto). Las barras de error indican el error estándar. La HFS fue insuficiente para producir potenciación de la vía aferente, a menos que esté pareada con la activación optogenética de terminales colinérgicos. (One-way ANOVA: \*\*\* $p < 0.001$ , Tukey's multiple comparisons: baseline vs HFS  $p > 0.05$ , baseline vs HFS + Light \* $p < 0.05$ , HFS vs HFS + Light \*\* $p < 0.01$ ). **D** Ejemplo de la evolución temporal de la pendiente del fEPSP en un experimento en el cual se realizaron sucesivas estimulaciones con y sin luz. Únicamente la coincidencia temporal de la estimulación aferente y la liberación de Ach produce potenciación de la vía. **E** El diseño experimental fue similar al mostrado en **(A)** excepto que la estimulación eléctrica se mantuvo a constante a una frecuencia de 0,06Hz durante todo el experimento. **F** Evolución temporal de la pendiente del fEPSP (promedio de 6 experimentos). La barra azul indica el momento en el cual se indujo la liberación de Ach endógena mediante la activación de un LED azul **G** Pendiente promedio del fEPSP luego de parear la estimulación de baja frecuencia con el protocolo de estimulación optogenética idéntico al empleado en **(B)**. La estimulación optogenética no produjo potenciación de la vía estimulada a baja frecuencia (T-Test, control vs Opto  $p > 0.05$ ).

# Conclusiones finales

---

Los resultados presentados en esta tesis muestran que las propiedades de procesamiento de estímulos en neuronas del DG cambian drásticamente en presencia de neuromoduladores. Resultados previos del laboratorio mostraron que las neuronas maduras e inmaduras nacidas en el adulto procesan estímulos aferentes en forma distinta. Las neuronas inmaduras se activan con estímulos más débiles y responden a un rango de frecuencias mayor que las neuronas maduras. Además, otros grupos han demostrado que las mismas tienen menores umbrales de inducción de potenciación a largo término, siendo capaces de producir LTP aún en presencia de circuitos inhibitorios intactos (Snyder et al., 2001, Schmidt-Hieber et al., 2004, Ge et al., 2007, Marín-Burgin et al., 2012, Pardi et al., 2015).

Sin embargo, la neuromodulación colinérgica aumenta específicamente el perfil de activación de las matGC frente a la actividad aferente. En presencia de este neuromodulador, el tipo de codificación de las neuronas maduras se vuelve espacialmente más denso, ya que un mismo estímulo recluta una proporción mayor de neuronas. Además, las matGC son capaces de disparar más potenciales de acción frente a un tren de estimulación aferente y representar un rango de frecuencias más amplio (Fig. R.1-1). Es decir, que el procesamiento de estímulos aferentes de las matGC se vuelve similar al de las neuronas inmaduras (particularmente las 4wpiGC) (Fig. C.1. A).

Estas respuestas aumentadas de las GC son el resultado de una fuerte reducción en la inhibición evocada en respuesta a estímulos aferentes, con el correspondiente incremento en el balance E/I que estas neuronas integran para producir potenciales de acción (Fig. R.2-1). Llamativamente, las principales diferencias en las propiedades de codificación de neuronas maduras e inmaduras están dictadas por los circuitos inhibitorios. Los mismos se desarrollan tardíamente en las neuronas nacidas en el adulto, y por lo tanto ejercen poco control sobre la actividad de 4wpiGC. Es esperable entonces que la Ach sea menos eficaz en modular a la población de neuronas inmaduras.

Se ha demostrado que los circuitos inhibitorios son en gran medida los responsables de la baja frecuencia de actividad en el DG (Fig. C.1 B). De hecho, en nuestro laboratorio se observó que al bloquearlos farmacológicamente se suprimen las diferencias en los patrones de actividad de las neuronas maduras e inmaduras, así como las propiedades de filtro de las neuronas en esta región (Marín-Burgin et al., 2012, Pardi et al., 2015). Muchos estudios indican que los circuitos inhibitorios son blancos de neuromoduladores, y que los mismos podrían comunicar al resto del circuito cambios de estado de la red (Prince et al., 2016, Palacios-Filardo and Mellor, 2018). Por lo tanto, indagamos sobre los mecanismos circuitales subyacentes a los cambios en la inhibición reclutada en las GC, empleando distintas estrategias para disecar los subcircuitos involucrados en este fenómeno.

Encontramos que la Ach produce una respuesta diferencial de distintos tipos de interneuronas inhibitorias que da como resultado una desinhibición.

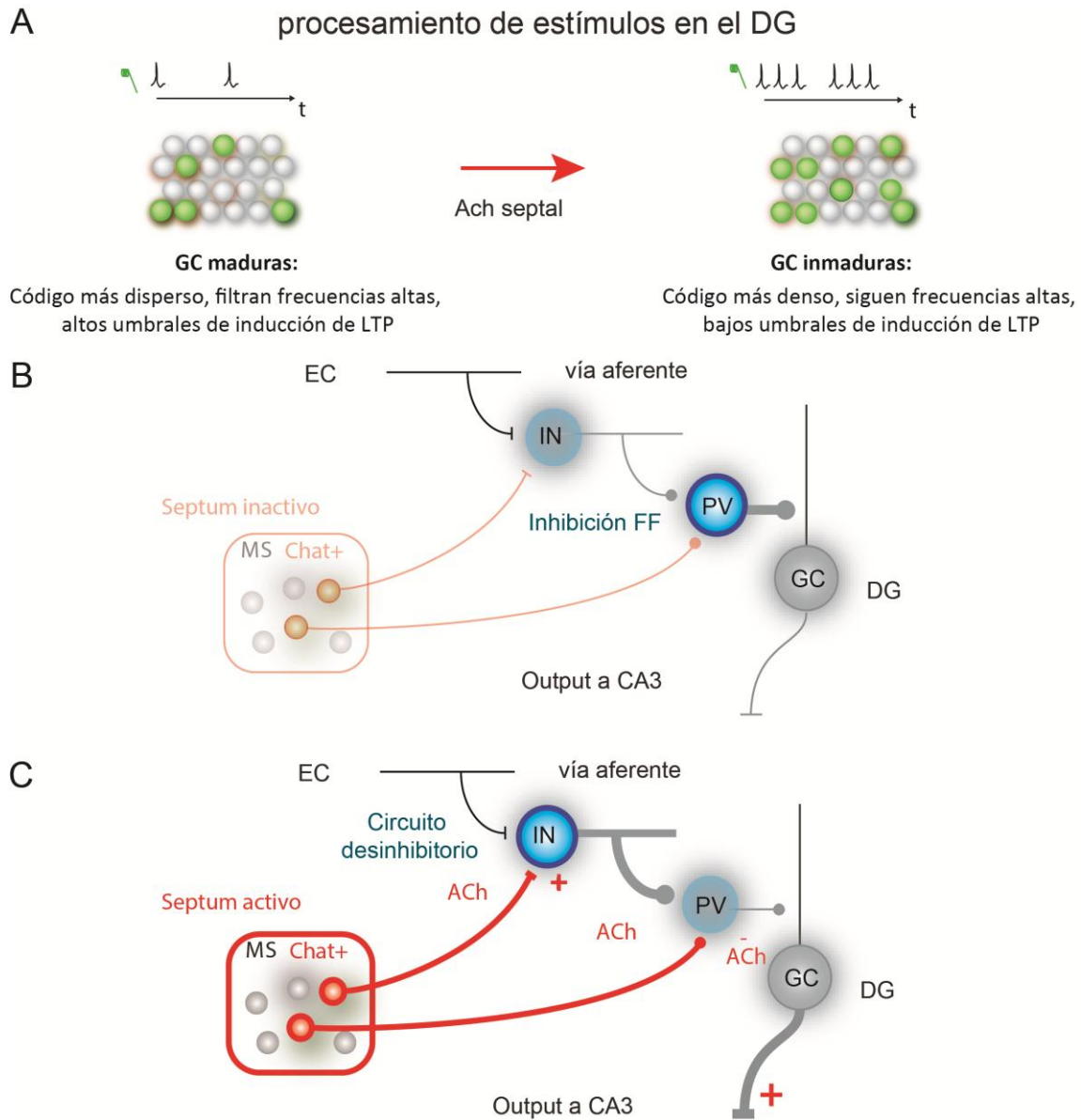
En particular, estudiamos las dos principales poblaciones de interneuronas en el DG: las PVI y las SOMI (Freund & Buzsáki 1996). Las mismas se inhiben mutuamente, formando un circuito cerrado que se regula estrechamente. Es decir, que un cambio en la activación de alguna de estas dos subpoblaciones, supondría una modulación antagónica en la otra. Sorprendentemente, encontramos que la Ach produce efectos opuestos en las dos subpoblaciones de interneuronas registradas: Disminuye el balance E/I en las PVI, a la vez que aumenta el balance E/I en SOMI (Fig. R.3-3). Además, la neuromodulación colinérgica disminuye la FF-INH (Fig. R.3-1), llevada a cabo mayormente por PVI, así como la inhibición parvalbuminérgica directamente reclutada sobre las GC (Fig. R.3-2 y Fig. C.1. C).

Existe cada vez más evidencia que resalta el rol de las SOMI en inhibir neuronas gabaérgicas y promover la activación de neuronas principales (Artinian and Lacaille, 2018). En particular, la activación optogenética de SOMI en CA1 promueve la inducción de LTP en la sinapsis desde CA3 (SC), por lo que ejercen un rol primariamente desinhibitorio (Leao et al., 2012). Además, recientemente se caracterizó en el DG una subpoblación de SOMI, llamadas HIL que inhibe fuertemente a PVI en el hilus (Yuan et al., 2017). Dado que hemos observado un aumento significativo en el balance E/I de neuronas SOMI en el hilus en presencia de Ach, nuestros resultados sugieren que la desinhibición neta de GC se produce al menos parcialmente a través de SOMI que proyectan hacia las PVI. Además, estudios recientes muestran que la activación repetitiva de la subpoblación de neuronas HIL en el DG produce LTP en las mismas, lo que permitiría mediar cambios a largo plazo en el estado del circuito (Yuan et al., 2017).

De hecho, como consecuencia de esta desinhibición, la activación a alta frecuencia de la vía aferente proveniente de la EC en coincidencia con la vía colinérgica proveniente del septum permite la inducción de una potenciación en la respuesta (Fig. R.4-1). Es interesante destacar que esta potenciación no ocurre en presencia de estímulos débiles, sino que se requieren una activación tetánica. Existen numerosos estudios que muestran que durante la exploración de nuevos ambientes, vigilia activa y atención en tareas cognitivas los niveles de Ach en el hipocampo aumentan (Sarter et al., 2005, Pinto et al., 2013, Bloem et al., 2014). El sistema colinérgico del DG puede servir, por lo tanto, como un amplificador de estímulos fuertes (posiblemente con información sensorial relevante) que coincidan temporalmente con la liberación de Ach, pudiendo ser selectivamente codificados de manera más densa. En resumen, los experimentos presentados en esta tesis proveen un mecanismo a través del cual la Ach reconfigura los microcircuitos del DG favoreciendo la activación de GC frente a estímulos provenientes de la MEC y permite la

inducción de cambios sinápticos a largo plazo en esta región. El entendimiento de los mecanismos que utiliza el sistema nervioso para reconfigurar los circuitos puede contribuir a comprender cómo los animales adaptan al procesamiento cerebral según el estado comportamental en el que se encuentran.

Figura C.1.



**Figura C.1. Modelo: La acetilcolina reconfigura los microcircuitos del DG del hipocampo.** (A) La acetilcolina modifica las propiedades de procesamiento de estímulos en matGC del DG. Basalmente (Izquierda) las matGC muestran una codificación de estímulos aferentes dispersa, filtran frecuencias altas y tienen altos umbrales de potenciación a largo plazo. Frente a la activación del sistema colinérgico septal (Derecha) las matGC muestran una codificación más densa de estímulos aferentes, logran seguir mayores frecuencias y poseen umbrales más bajos de potenciación a largo plazo. (B) En ausencia de ACh la FF-INH impartida a través de PVI es dominante y disminuye el balance E/I de las matGC en el DG. (C) La liberación de ACh activa un circuito desinhibitorio y produce una disminución de la contribución de las PVI al control de la actividad de matGC, permitiendo que las mismas sean más activas y aumentando por lo tanto su output hacia CA3.



## Abreviaturas

<b>4wpiGC</b>	Células granulares inmaduras de 4 semanas de edad
<b>Ach</b>	Acetilcolina
<b>AChE</b>	Acetilcolinesterasa
<b>CBC</b>	Carbamilcolina o carbacol
<b>ChR2</b>	Channelrhodopsin
<b>DG</b>	Giro dentado
<b>E/I</b>	Balance excitación/inhibición
<b>EC</b>	Corteza entorrinal
<b>EPSC</b>	Corriente excitatoria post sináptica
<b>EPSCG</b>	Conductancia excitatoria post sinápticas
<b>FB-INH</b>	Inhibición feedback o de retroalimentación
<b>FF-INH</b>	Inhibición feedforward o para adelante
<b>GC</b>	Neuronas o células granulares
<b>GCL</b>	Capa de células granulares
<b>HIL</b>	Interneuronas asociadas al hilus
<b>HIPP</b>	SOMI del hilus asociadas a la vía perforante
<b>iML</b>	Capa molecular interna
<b>IPSC</b>	Corriente inhibitoria post sináptica
<b>IPSCG</b>	Conductancia inhibitoria post sináptica
<b>IPSQ</b>	Carga inhibitoria post sináptica
<b>LEC</b>	Corteza entorrinal lateral
<b>LPP</b>	Vía perforante lateral

<b>LTD</b>	<i>Long term depression</i> o depresión a largo plazo
<b>LTP</b>	<i>Long term potentiation</i> o potenciación a largo plazo
<b>matGC</b>	Células granulares maduras
<b>MEC</b>	Corteza entorrinal medial
<b>ML</b>	Capa molecular
<b>MML</b>	Capa molecular medial
<b>mPP</b>	Vía perforante medial
<b>OML</b>	Capa molecular externa
<b>PP</b>	Vía perforante
<b>PVI</b>	Interneuronas que expresan parvalbumina
<b>SC</b>	Colaterales de "Schaffer"
<b>SGZ</b>	Zona sub-granular
<b>SVZ</b>	Zona sub-ventricular
<b>SOMI</b>	Interneuronas que expresan somatostatina

## Referencias

- Acsady L, Kamondi A, Sik A, Freund T, Buzsaki G (1998) GABAergic cells are the major postsynaptic targets of mossy fibers in the rat hippocampus. *J Neurosci* 18:3386-3403.
- Alme CB, Buzzetti RA, Marrone DF, Leutgeb JK, Chawla MK, Schaner MJ, Bohanick JD, Khoboko T, Leutgeb S, Moser EI, Moser MB, McNaughton BL, Barnes CA (2010) Hippocampal granule cells opt for early retirement. *Hippocampus* 20:1109-1123.
- Alvarez-Buylla A, Lim DA (2004) For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron* 41:683-686.
- Artinian J, Lacaille JC (2018) Disinhibition in learning and memory circuits: New vistas for somatostatin interneurons and long-term synaptic plasticity. *Brain Res Bull* 141:20-26.
- Atri A, Sherman S, Norman KA, Kirchoff BA, Nicolas MM, Greicius MD, Cramer SC, Breiter HC, Hasselmo ME, Stern CE (2004) Blockade of central cholinergic receptors impairs new learning and increases proactive interference in a word paired-associate memory task. *Behav Neurosci* 118:223-236.
- Barnes CA, McNaughton BL, Mizumori SJ, Leonard BW, Lin LH (1990) Comparison of spatial and temporal characteristics of neuronal activity in sequential stages of hippocampal processing. *Prog Brain Res* 83:287-300.
- Bell LA, Bell KA, McQuiston AR (2015) Acetylcholine release in mouse hippocampal CA1 preferentially activates inhibitory-selective interneurons via alpha4beta2\* nicotinic receptor activation. *Front Cell Neurosci* 9:115.
- Bergmann O, Spalding KL, Frisen J (2015) Adult Neurogenesis in Humans. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7.
- Bloem B, Poorthuis RB, Mansvelder HD (2014) Cholinergic modulation of the medial prefrontal cortex: the role of nicotinic receptors in attention and regulation of neuronal activity. *Front Neural Circuits* 8:17.
- Boldrini M, Fulmore CA, Tartt AN, Simeon LR, Pavlova I, Poposka V, Rosoklija GB, Stankov A, Arango V, Dwork AJ, Hen R, Mann JJ (2018) Human Hippocampal Neurogenesis Persists throughout Aging. *Cell Stem Cell* 22:589-599.
- Bonnevie T, Dunn B, Fyhn M, Hafting T, Derdikman D, Kubie JL, Roudi Y, Moser EI, Moser MB (2013) Grid cells require excitatory drive from the hippocampus. *Nature neuroscience* 16:309-317.
- Bragin A, Jando G, Nadasdy Z, Hetke J, Wise K, Buzsaki G (1995) Gamma (40-100 Hz) oscillation in the hippocampus of the behaving rat. *J Neurosci* 15:47-60.
- Buzsaki G, Leung LW, Vanderwolf CH (1983) Cellular bases of hippocampal EEG in the behaving rat. *Brain Res* 287:139-171.
- Buzsaki G, Moser EI (2013) Memory, navigation and theta rhythm in the hippocampal-entorhinal system. *Nature neuroscience* 16.
- Cameron HA, McKay RD (2001) Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J Comp Neurol* 435:406-417.
- Cardin JA, Carlen M, Meletis K, Knoblich U, Zhang F, Deisseroth K, Tsai L-H, Moore CI (2009) Driving fast-spiking cells induces gamma rhythm and controls sensory responses. *Nature* 459:663-667.
- Carpenter F, Burgess N, Barry C (2017) Modulating medial septal cholinergic activity reduces medial entorhinal theta frequency without affecting speed or grid coding. *Sci Rep* 7:14573.

- Coulter DA, Yue C, Ang CW, Weissinger F, Goldberg E, Hsu FC, Carlson GC, Takano H (2011) Hippocampal microcircuit dynamics probed using optical imaging approaches. *J Physiol* 589:1893-1903.
- Charpak S, Pare D, Llinas R (1995) The entorhinal cortex entrains fast CA1 hippocampal oscillations in the anaesthetized guinea-pig: role of the monosynaptic component of the perforant path. *Eur J Neurosci* 7:1548-1557.
- Chawla MK, Guzowski JF, Ramirez-Amaya V, Lipa P, Hoffman KL, Marriott LK (2005) Sparse, environmentally selective expression of Arc RNA in the upper blade of the rodent fascia dentata by brief spatial experience. *Hippocampus* 15.
- Chrobak JJ, Buzsaki G (1998) Gamma oscillations in the entorhinal cortex of the freely behaving rat. *J Neurosci* 18:388-398.
- Danielson NB, Kaifosh P, Zaremba JD, Lovett-Barron M, Tsai J, Denny CA, Balough EM, Goldberg AR, Drew LJ, Hen R, Losonczy A, Kheirbek MA (2016) Distinct Contribution of Adult-Born Hippocampal Granule Cells to Context Encoding. *Neuron* 90:101-112.
- Dannenberg H, Pabst M, Braganza O, Schoch S, Niediek J, Bayraktar M, Mormann F, Beck H (2015) Synergy of direct and indirect cholinergic septo-hippocampal pathways coordinates firing in hippocampal networks. *J Neurosci* 35:8394-8410.
- Dannenberg H, Young K, Hasselmo M (2017) Modulation of Hippocampal Circuits by Muscarinic and Nicotinic Receptors. *Front Neural Circuits* 11:102.
- Dayer AG, Ford AA, Cleaver KM, Yassaee M, Cameron HA (2003) Short-term and long-term survival of new neurons in the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol* 460:563-572.
- Dossani RH, Missios S, Nanda A (2015) The Legacy of Henry Molaison (1926-2008) and the Impact of His Bilateral Mesial Temporal Lobe Surgery on the Study of Human Memory. *World neurosurgery* 84:1127-1135.
- Dupret D, Revest JM, Koehl M, Ichas F, De Giorgi F, Costet P, Abrous DN, Piazza PV (2008) Spatial relational memory requires hippocampal adult neurogenesis. *PLoS One* 3:0001959.
- Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4.
- Espósito MS, Piatti VC, Laplagne DA, Morgenstern NA, Ferrari CC, Pitossi FJ, Schinder AF (2005) Neuronal Differentiation in the Adult Hippocampus Recapitulates Embryonic Development. *The Journal of Neuroscience* 25:10074-10086.
- Farioli-Vecchioli S, Saraulli D, Costanzi M, Pacioni S, Cina I, Aceti M, Micheli L, Bacci A, Cestari V, Tirone F (2008) The timing of differentiation of adult hippocampal neurons is crucial for spatial memory. *PLoS Biol* 6:e246.
- Freund TF, Buzsaki G (1996) Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6:347-470.
- Fukuda S, Kato F, Tozuka Y, Yamaguchi M, Miyamoto Y, Hisatsune T (2003) Two distinct subpopulations of nestin-positive cells in adult mouse dentate gyrus. *J Neurosci* 23:9357-9366.
- Fyhn M, Molden S, Witter MP, Moser EI, Moser MB (2004) Spatial representation in the entorhinal cortex. *Science* 305:1258-1264.
- Gage FH (2000) Mammalian neural stem cells. *Science* 287:1433-1438.
- Garthe A, Behr J, Kempermann G (2009) Adult-generated hippocampal neurons allow the flexible use of spatially precise learning strategies. *PLoS One* 4:e5464.
- Ge S, Yang CH, Hsu KS, Ming GL, Song H (2007) A critical period for enhanced synaptic plasticity in newly generated neurons of the adult brain. *Neuron* 54:559-566.
- Gilbert PE, Kesner RP, Lee I (2001) Dissociating hippocampal subregions: double dissociation between dentate gyrus and CA1. *Hippocampus* 11.

- Gu Y, Arruda-Carvalho M, Wang J, Janoschka S, Josselyn S, Frankland P, Ge S (2012) Optical controlling reveals time-dependent roles for adult-born dentate granule cells. *Nature neuroscience* 15:1700-1706.
- Hafting T, Fyhn M, Molden S, Moser MB, Moser EI (2005) Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. *Nature* 436:801-806.
- Hebb DO (1949) *The organization of behavior; a neuropsychological theory*. New York: Wiley.
- Hironaka N, Tanaka K, Izaki Y, Hori K, Nomura M (2001) Memory-related acetylcholine efflux from rat prefrontal cortex and hippocampus: a microdialysis study. *Brain Res* 901:143-150.
- Hyman JM, Wyble BP, Goyal V, Rossi CA, Hasselmo ME (2003) Stimulation in Hippocampal Region CA1 in Behaving Rats Yields Long-Term Potentiation when Delivered to the Peak of Theta and Long-Term Depression when Delivered to the Trough. *The Journal of Neuroscience* 23:11725.
- Isaacson Jeffrey S, Scanziani M (2011) How Inhibition Shapes Cortical Activity. *Neuron* 72:231-243.
- Johnston DA, D.G. (1998) *Hippocampus. The Synaptic Organization of the Brain*.
- Jung MW, McNaughton BL (1993) Spatial selectivity of unit activity in the hippocampal granular layer. *Hippocampus* 3.
- Kang D, Ding M, Topchiy I, Kocsis B (2017) Reciprocal Interactions between Medial Septum and Hippocampus in Theta Generation: Granger Causality Decomposition of Mixed Spike-Field Recordings. *Frontiers in neuroanatomy* 11:120.
- Kee N, Teixeira CM, Wang AH, Frankland PW (2007) Preferential incorporation of adult-generated granule cells into spatial memory networks in the dentate gyrus. *Nature neuroscience* 10:355-362.
- Kempermann G, Gage FH, Aigner L, Song H, Curtis MA, Thuret S, Kuhn HG, Jessberger S, Frankland PW, Cameron HA, Gould E, Hen R, Abrous DN, Toni N, Schinder AF, Zhao X, Lucassen PJ, Frisen J (2018) Human Adult Neurogenesis: Evidence and Remaining Questions. *Cell Stem Cell* 23:25-30.
- Kempermann G, Gast D, Kronenberg G, Yamaguchi M, Gage FH (2003) Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development (Cambridge, England)* 130:391-399.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH (1997) More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386:493-495.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH (1998) Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *J Neurosci* 18:3206-3212.
- Koranda JL, Masino SA, Blaise JH (2008) Bidirectional synaptic plasticity in the dentate gyrus of the awake freely behaving mouse. *J Neurosci Methods* 167:160-166.
- Kronenberg G, Reuter K, Steiner B, Brandt MD, Jessberger S, Yamaguchi M, Kempermann G (2003) Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli. *J Comp Neurol* 467:455-463.
- Kullmann DM (2011) Interneuron networks in the hippocampus. *Current Opinion in Neurobiology* 21:709-716.
- Laplagne DA, Espósito MS, Piatti VC, Morgenstern NA, Zhao C, van Praag H, Gage FH, Schinder AF (2006) Functional Convergence of Neurons Generated in the Developing and Adult Hippocampus. *PLoS Biol* 4:e409.
- Lavenex P, Amaral DG (2000) Hippocampal-neocortical interaction: a hierarchy of associativity. *Hippocampus* 10:420-430.
- Leao RN, Mikulovic S, Leao KE, Munguba H, Gezelius H, Enjin A, Patra K, Eriksson A, Loew LM, Tort AB, Kullander K (2012) OLM interneurons differentially modulate CA3 and entorhinal inputs to hippocampal CA1 neurons. *Nature neuroscience* 15:1524-1530.

- Lee H, Thuret S (2018) Adult Human Hippocampal Neurogenesis: Controversy and Evidence. *Trends in Molecular Medicine* 24:521-522.
- Lee SH, Dan Y (2012) Neuromodulation of brain states. *Neuron* 76:209-222.
- Leutgeb JK, Leutgeb S, Moser MB, Moser EI (2007) Pattern separation in the dentate gyrus and CA3 of the hippocampus. *Science* 315:961-966.
- Liu X, Ramirez S, Tonegawa S Inception of a false memory by optogenetic manipulation of a hippocampal memory engram. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 369:20130142-20130142.
- Lomo T (2003) The discovery of long-term potentiation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358:617-620.
- MacDermott AB, Role LW, Siegelbaum SA (1999) Presynaptic ionotropic receptors and the control of transmitter release. *Annu Rev Neurosci* 22:443-485.
- Marín-Burgin A, Mongiat LA, Pardi MB, Schinder AF (2012) Unique Processing During a Period of High Excitation/Inhibition Balance in Adult-Born Neurons. *Science* 335:1238-1242.
- Marin-Burgin A, Schinder AF (2012) Requirement of adult-born neurons for hippocampus-dependent learning. *Behav Brain Res* 227:391-399.
- Marr D (1971) Simple memory: a theory for archicortex. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 262:23-81.
- Mathews EA, Morgenstern NA, Piatti VC, Zhao C, Jessberger S, Schinder AF, Gage FH (2010) A distinctive layering pattern of mouse dentate granule cells is generated by developmental and adult neurogenesis. *J Comp Neurol* 518:4479-4490.
- McNaughton BL, Barnes CA, O'Keefe J (1983) The contributions of position, direction, and velocity to single unit activity in the hippocampus of freely-moving rats. *Exp Brain Res* 52:41-49.
- Mesulam MM, Mufson EJ, Wainer BH, Levey AI (1983) Central cholinergic pathways in the rat: An overview based on an alternative nomenclature (Ch1-Ch6). *Neuroscience* 10:1185-1201.
- Ming GL, Song H (2011) Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron* 70:687-702.
- Mistry R, Dennis S, Frerking M, Mellor JR (2011) Dentate gyrus granule cell firing patterns can induce mossy fiber long-term potentiation in vitro. *Hippocampus* 21:1157-1168.
- Mongiat LA, Esposito MS, Lombardi G, Schinder AF (2009) Reliable activation of immature neurons in the adult hippocampus. *PLoS One* 4:28.
- Muller W, Misgeld U, Heinemann U (1988) Carbachol effects on hippocampal neurons in vitro: dependence on the rate of rise of carbachol tissue concentration. *Exp Brain Res* 72:287-298.
- Nakashiba T, Cushman JD, Pelkey KA, Renaudineau S, Buhl DL, McHugh TJ (2012) Young dentate granule cells mediate pattern separation, whereas old granule cells facilitate pattern completion. *Cell* 149.
- Neunuebel JP, Knierim JJ (2012) Spatial firing correlates of physiologically distinct cell types of the rat dentate gyrus. *J Neurosci* 32:3848-3858.
- O'Keefe J (1976) Place units in the hippocampus of the freely moving rat. *Exp Neurol* 51:78-109.
- O'Keefe J, Dostrovsky J (1971) The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res* 34:171-175.
- O'Mara SM, Rowan MJ, Anwyl R (1995) Metabotropic glutamate receptor-induced homosynaptic long-term depression and depotentiation in the dentate gyrus of the rat hippocampus in vitro. *Neuropharmacology* 34:983-989.
- O'Reilly RC, McClelland JL (1994) Hippocampal conjunctive encoding, storage, and recall: avoiding a trade-off. *Hippocampus* 4.

- Ohno M, Yamamoto T, Watanabe S (1993) Blockade of hippocampal nicotinic receptors impairs working memory but not reference memory in rats. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 45:89-93.
- Ohno M, Yamamoto T, Watanabe S (1994) Blockade of hippocampal M1 muscarinic receptors impairs working memory performance of rats. *Brain Res* 650:260-266.
- Olton DS, Paras BC (1979) Spatial memory and hippocampal function. *Neuropsychologia* 17:669-682.
- Palacios-Filardo J, Mellor JR (2018) Neuromodulation of hippocampal long-term synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 54:37-43.
- Pardi MB, Ogando MB, Schinder AF, Marin-Burgin A (2015) Differential inhibition onto developing and mature granule cells generates high-frequency filters with variable gain. *eLife* 11:08764.
- Paulsen O, Moser EI (1998) A model of hippocampal memory encoding and retrieval: GABAergic control of synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 21:273-278.
- Pelkey KA, Chittajallu R, Craig MT, Tricoire L, Wester JC, McBain CJ (2017) Hippocampal GABAergic Inhibitory Interneurons. *Physiol Rev* 97:1619-1747.
- Petsche H, Stumpf C, Gogolak G (1962) [The significance of the rabbit's septum as a relay station between the midbrain and the hippocampus. I. The control of hippocampus arousal activity by the septum cells]. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 14:202-211.
- Pinto L, Goard MJ, Estandian D, Xu M, Kwan AC, Lee SH, Harrison TC, Feng G, Dan Y (2013) Fast modulation of visual perception by basal forebrain cholinergic neurons. *Nature neuroscience* 16:1857-1863.
- Poo M-M, Pignatelli M, Ryan TJ, Tonegawa S, Bonhoeffer T, Martin KC, Rudenko A, Tsai L-H, Tsien RW, Fishell G, Mullins C, Gonçalves JT, Shtrahman M, Johnston ST, Gage FH, Dan Y, Long J, Buzsáki G, Stevens C (2016) What is memory? The present state of the engram. *BMC Biology* 14:40-40.
- Pouille F, Marin-Burgin A, Adesnik H, Atallah BV, Scanziani M (2009) Input normalization by global feedforward inhibition expands cortical dynamic range. *Nature neuroscience* 12:1577-1585.
- Pouille F, Scanziani M (2001) Enforcement of Temporal Fidelity in Pyramidal Cells by Somatic Feed-Forward Inhibition. *Science* 293:1159-1163.
- Pouille F, Watkinson O, Scanziani M, Trevelyan AJ (2013) The contribution of synaptic location to inhibitory gain control in pyramidal cells. *Physiological reports* 1:e00067.
- Prince LY, Bacon TJ, Tigaret CM, Mellor JR (2016) Neuromodulation of the Feedforward Dentate Gyrus-CA3 Microcircuit. *Frontiers in Synaptic Neuroscience* 8:32-32.
- Ramirez-Amaya V, Marrone DF, Gage FH, Worley PF, Barnes CA (2006) Integration of new neurons into functional neural networks. *J Neurosci* 26:12237-12241.
- Rapp PR, Gallagher M (1996) Preserved neuron number in the hippocampus of aged rats with spatial learning deficits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:9926-9930.
- Ribak CE, Seress L (1983) Five types of basket cell in the hippocampal dentate gyrus: a combined Golgi and electron microscopic study. *Journal of neurocytology* 12:577-597.
- Rolls ET (2010) A computational theory of episodic memory formation in the hippocampus. *Behav Brain Res* 215:180-196.
- Rolls ET, Kesner RP (2006) A computational theory of hippocampal function, and empirical tests of the theory. *Progress in neurobiology* 79:1-48.
- Roux L, Buzsáki G (2015) Tasks for inhibitory interneurons in intact brain circuits. *Neuropharmacology* 88:10-23.

- Sambandan S, Sauer JF, Vida I, Bartos M (2010) Associative plasticity at excitatory synapses facilitates recruitment of fast-spiking interneurons in the dentate gyrus. *J Neurosci* 30:11826-11837.
- Sandoval CJ, Martinez-Claros M, Bello-Medina PC, Perez O, Ramirez-Amaya V (2011) When are new hippocampal neurons, born in the adult brain, integrated into the network that processes spatial information? *PloS one* 6:e17689.
- Sarter M, Hasselmo ME, Bruno JP, Givens B (2005) Unraveling the attentional functions of cortical cholinergic inputs: interactions between signal-driven and cognitive modulation of signal detection. *Brain research Brain research reviews* 48:98-111.
- Sarter M, Parikh V, Howe WM (2009) Phasic acetylcholine release and the volume transmission hypothesis: time to move on. *Nat Rev Neurosci* 10:383-390.
- Sarvey JM, Burgard EC, Decker G (1989) Long-term potentiation: studies in the hippocampal slice. *J Neurosci Methods* 28:109-124.
- Savanthrapadian S, Meyer T, Elgueta C, Booker SA, Vida I, Bartos M (2014) Synaptic properties of SOM- and CCK-expressing cells in dentate gyrus interneuron networks. *J Neurosci* 34:8197-8209.
- Scoville WB, Milner B (1957) Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 20:11-21.
- Schmidt-Hieber C, Jonas P, Bischofberger J (2004) Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature* 429.
- Schultheiss N, Hinman J, Hasselmo M (2015) Models and Theoretical Frameworks for Hippocampal and Entorhinal Cortex Function in Memory and Navigation. pp 247-268.
- Snyder JS (2018) Questioning human neurogenesis. *Nature* 555:315-316.
- Snyder JS, Kee N, Wojtowicz JM (2001) Effects of adult neurogenesis on synaptic plasticity in the rat dentate gyrus. *J Neurophysiol* 85:2423-2431.
- Sohal VS, Zhang F, Yizhar O, Deisseroth K (2009) Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. *Nature* 459:698-702.
- Sorrells SF, Paredes MF, Cebrian-Silla A, Sandoval K, Qi D, Kelley KW, James D, Mayer S, Chang J, Auguste KI, Chang EF, Gutierrez AJ, Kriegstein AR, Mathern GW, Oldham MC, Huang EJ, Garcia-Verdugo JM, Yang Z, Alvarez-Buylla A (2018) Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults. *Nature* 555:377.
- Squire LR (2004) Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. *Neurobiol Learn Mem* 82:171-177.
- Stewart M, Fox SE (1990) Do septal neurons pace the hippocampal theta rhythm? *Trends Neurosci* 13:163-168.
- Sun GJ, Sailor KA, Mahmood QA, Chavali N, Christian KM, Song H, Ming GL (2013) Seamless reconstruction of intact adult-born neurons by serial end-block imaging reveals complex axonal guidance and development in the adult hippocampus. *J Neurosci* 33:11400-11411.
- Takacs VT, Cserep C, Schlingloff D, Posfai B, Szonyi A, Sos KE, Kornyei Z, Denes A, Gulyas AI, Freund TF, Nyiri G (2018) Co-transmission of acetylcholine and GABA regulates hippocampal states. *Nature communications* 9:2848.
- Tang AH, Karson MA, Nagode DA, McIntosh JM, Uebele VN, Renger JJ, Klugmann M, Milner TA, Alger BE (2011) Nerve terminal nicotinic acetylcholine receptors initiate quantal GABA release from perisomatic interneurons by activating axonal T-type (Cav3) Ca<sup>2+</sup>(+) channels and Ca<sup>2+</sup>(+) release from stores. *J Neurosci* 31:13546-13561.
- Tashiro A, Makino H, Gage FH (2007) Experience-specific functional modification of the dentate gyrus through adult neurogenesis: a critical period during an immature stage. *J Neurosci* 27:3252-3259.



- Teles-Griolo Ruivo L, Mellor J (2013) Cholinergic modulation of hippocampal network function. *Frontiers in Synaptic Neuroscience* 5.
- Teles-Griolo Ruivo LM, Baker KL, Conway MW, Kinsley PJ, Gilmour G, Phillips KG, Isaac JTR, Lowry JP, Mellor JR (2017) Coordinated Acetylcholine Release in Prefrontal Cortex and Hippocampus Is Associated with Arousal and Reward on Distinct Timescales. *Cell Rep* 18:905-917.
- Temprana SG, Mongiat LA, Yang SM, Trinchero MF, Alvarez DD, Kropff E, Giacomini D, Beltramone N, Lanuza GM, Schinder AF (2015) Delayed coupling to feedback inhibition during a critical period for the integration of adult-born granule cells. *Neuron* 85:116-130.
- Toni N, Laplagne DA, Zhao C, Lombardi G, Ribak CE, Gage FH, Schinder AF (2008) Neurons born in the adult dentate gyrus form functional synapses with target cells. *Nature neuroscience* 11:901-907.
- Toni N, Schinder AF (2015) Maturation and Functional Integration of New Granule Cells into the Adult Hippocampus. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8:a018903.
- Treves A, Tashiro A, Witter MP, Moser EI (2008) What is the mammalian dentate gyrus good for? *Neuroscience* 154:1155-1172.
- Trouche S, Bontempi B, Rouillet P, Rampon C (2009) Recruitment of adult-generated neurons into functional hippocampal networks contributes to updating and strengthening of spatial memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:5919-5924.
- van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage FH (1999) Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:13427-13431.
- van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH (2002) Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 415:1030-1034.
- Varga V, Losonczy A, Zemelman BV, Borhegyi Z, Nyiri G, Domonkos A, Hangya B, Holderith N, Magee JC, Freund TF (2009) Fast Synaptic Subcortical Control of Hippocampal Circuits. *Science (New York, NY)* 326:449-453.
- Vyleta NP, Borges-Merjane C, Jonas P (2016) Plasticity-dependent, full detonation at hippocampal mossy fiber-CA3 pyramidal neuron synapses. *Elife* 5.
- Wainer B, Levey A, Rye D, Mesulam M, Mufson E (1985) Cholinergic and non-cholinergic septohippocampal pathways. *Neurosci Lett* 54:45-52.
- West MJ, Slomianka L, Gundersen HJ (1991) Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *The Anatomical Record* 231:482-497.
- Womelsdorf T, Valiante TA, Sahin NT, Miller KJ, Tiesinga P (2014) Dynamic circuit motifs underlying rhythmic gain control, gating and integration. *Nature neuroscience* 17:1031-1039.
- Xu M, Chung S, Zhang S, Zhong P, Ma C, Chang WC, Weissbourd B, Sakai N, Luo L, Nishino S, Dan Y (2015) Basal forebrain circuit for sleep-wake control. *Nature neuroscience* 18:1641-1647.
- Yuan M, Meyer T, Benkowitz C, Savanthrapadian S, Ansel-Bollepalli L, Foggetti A, Wulff P, Alcami P, Elgueta C, Bartos M (2017) Somatostatin-positive interneurons in the dentate gyrus of mice provide local- and long-range septal synaptic inhibition. *eLife* 3:21105.
- Zhang H, Lin SC, Nicolelis MA (2011) A distinctive subpopulation of medial septal slow-firing neurons promote hippocampal activation and theta oscillations. *J Neurophysiol* 106:2749-2763.
- Zhao C, Teng EM, Summers RG, Jr., Ming GL, Gage FH (2006) Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *J Neurosci* 26:3-11.