



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular

Remodelado de circuitos del giro dentado por neurogénesis adulta: procesamiento de información

Tesis presentada para optar al Título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires
en el área: Ciencias Biológicas

Lic. Ayelén Ivana Groisman

Director de Tesis: Dr. Alejandro Fabián Schinder.

Consejera de estudios: Dra. Lidia Szczupak.

Lugar de trabajo: Laboratorio de Plasticidad Neuronal,

Fundación Instituto Leloir.

Buenos Aires, 2 de abril del 2020.

Remodelado de circuitos del giro dentado por neurogénesis adulta: procesamiento de información

El giro dentado del hipocampo posee un intenso remodelado, producto de la neurogénesis adulta. Esta región está controlada por un alto tono inhibitorio que mantiene silenciada la capa granular. Sin embargo, la neurogénesis adulta altera estos niveles adicionando de forma continua células granulares nuevas (CGs) que presentan elevada excitabilidad durante su desarrollo e integración con el circuito preexistente. Esto le confiere a las CGs nuevas la capacidad de procesar estímulos novedosos que involucran procesos de memoria y aprendizaje. Para entender los mecanismos fisiológicos por los cuales las CGs nuevas reclutan circuitos de inhibición, sería preciso caracterizar las poblaciones de interneuronas y su rol en la integración de nuevas CGs. Conocer en detalle la conectividad entre CGs nuevas y los microcircuitos inhibitorios proveerá una base sólida sobre la cual poder estudiar el procesamiento de información de la red. Utilizamos la técnica de electrofisiología combinada con optogenética para estudiar la conectividad aferente y eferente entre CGs y dos grupos principales de interneuronas GABAérgicas: parvalbúmina (PV-INs) y somatostatina (SOM-INs). Nuestros resultados muestran que las CGs reciben inhibición perisomática provenientes de PV-INs a través contactos que se mantuvieron inmaduros hasta su crecimiento abrupto en la semana 6 de desarrollo. Esta transición se vio acelerada por exposición a un ambiente enriquecido (AE). Los contactos provenientes de las SOM-INs son principalmente dendríticos y se desarrollan lentamente hasta alcanzar la maduración en la semana 8. Por otra parte, las eferencias de las CGs reclutan eficientemente a las PV-INs pero en menor medida a las SOM-INs que tienen un desarrollo sináptico demorado. Por último, se evaluó el rol de cada población de interneurona en la actividad global del giro dentado maduro. Las PV-INs ejercen un fuerte control de los circuitos inhibitorios de tipo *feedback* y *feedforward*, mientras que las SOM-INs participan principalmente en el circuito de *feedback*. Los resultados obtenidos muestran que la formación de sinapsis inhibitorias es un proceso lento que prolonga la dinámica de desarrollo de las CGs nuevas. Esta transición de largo plazo mantiene a las CGs nuevas débilmente acopladas a la red inhibitoria lo que contribuye a generar niveles de plasticidad aumentados en la red local del giro dentado.

Palabras claves: Redes inhibitorias - Plasticidad - Sinaptogénesis - Neurogénesis adulta - Optogenética

Dentate gyrus circuits remodeling by adult neurogenesis: information processing

The dentate gyrus of the hippocampus has an intense remodeling, product of adult neurogenesis. This region is controlled by a high inhibitory tone that keeps the granular layer silenced. However, adult neurogenesis alters these levels by continuously adding new granular cells (CGs) that exhibit high excitability during their development and integration with the pre-existing circuit. This gives new CGs the ability to process novel stimuli that involve memory and learning processes. To understand the physiological mechanisms by which new CGs recruit inhibition circuits, it would be necessary to characterize the interneuron populations and their role in the integration of new GCs. Knowing in detail the connectivity between new CGs and inhibitory microcircuits will provide a solid basis on which to study the information processing of the network. We use electrophysiology techniques combined with optogenetics to study afferent and efferent connectivity between CGs and two main groups of GABAergic interneurons: parvalbumin (PV-INs) and somatostatin (SOM-INs). Our results show that the CGs receive perisomatic inhibition from PV-INs through contacts that remained immature until their abrupt growth in week 6 of development. This transition was accelerated by exposure to an enriched environment (AE). Inputs coming from SOM-INs are mainly dendritic and develop slowly until they reach maturation at week 8. On the other hand, the CGs outputs efficiently recruit PV-INs but to a lesser extent SOM-INs and its synaptic development is delayed. Finally, the role of each interneuron population in the global activity of the mature dentate gyrus was evaluated. PV-INs exert a strong control of feedback and feedforward inhibitory circuits, while SOM-INs mainly participate in feedback circuit. The results obtained show that the formation of inhibitory synapses is a slow process that prolongs the dynamics of development of new CGs. This long-term transition keeps the new CGs weakly coupled to the inhibitory network, which contributes to increased levels of plasticity in the local network of the dentate gyrus.

Key words: Inhibitory networks - Plasticity - Synaptogenesis - Adult neurogenesis - Optogenetics

Agradecimientos

- A Ale Schinder, por guiarme todos estos años. Por la confianza que puso sobre mi y los estímulos que me dio para crecer dentro y fuera del laboratorio.
- A Sung Yang, por sus enseñanzas durante mi primer año de doctorado. También por trabajar conmigo en este proyecto.
- A Silvio, por transmitirme sus conocimientos en la técnica de electrofisiología y por sus recomendaciones en el comienzo de mis estudios de doctorado.
- A todo el laboratorio 307. En particular a Dami, Vero, Marie, Nati S, Nati R, Luciana, Magui, Andre, Mati, Cris y Diego. A todos ellos por estar siempre dispuestos a discutir resultados y ayudar en el día a día.
- Al grupo 308, Guille, Dani, Abel, Lucía, Lucho y Carla por sus discusiones enriquecedoras
- Al grupo 212, Emilio, Yanni y Mati
- A los integrantes del Comité de Seguimiento: Juan Goutman, Julio Caramelo y Joaquín Piriz.
- A la Fundación Instituto Leloir. A todo el personal de FIL, bioterio, administrativos, soporte informático, microscopía, biblioteca y periodismo científico.
- A toda mi familia y amigos
- A Fernando, mi papá, por dejarme sus enseñanzas, guiarme durante mis estudios y ayudarme a elegir mi futuro académico y profesional. También por escucharme y aconsejarme.
- A Marcela, mi mamá, por el amor y apoyo incondicionales, por escucharme y darme la fortaleza a lo largo de este trayecto.
- A Leandro, mi hermano, por acompañarme, estimularme a elegir mi camino en la ciencia y por el enorme afecto que me da cada día.
- A mis abuelos Berta y Bernardo por todo el cariño que me brindan.
- A Adri, por el amor y compañerismo de todos estos años.

INDICE

Introducción	1
I.1 Neurogénesis adulta	1
I.2. Hipocampo: función y circuito	2
I.3 Giro dentado: función y circuito	4
I.3.1 Procesamiento de información en el giro dentado.....	6
I.4 Interneuronas del giro dentado	8
I.4.1 Células mossy	8
I.4.2 Interneuronas GABAérgicas	9
I.4.2.1 Interneuronas de tipo parvalbúmina (PV-INs):.....	10
I.4.2.2 Interneuronas de tipo somatostatina (SOM-INs).....	10
I.4.2.3 Interneuronas que expresan el receptor serotoninérgico 5HT3aR	11
I.5 Inhibición proximal versus inhibición distal	12
I.6 Circuitos <i>feedforward</i> y <i>feedback</i> en el giro dentado	14
I.6.1 <i>Feedforward</i>	14
I.6.2 <i>Feedback</i>	15
I.7 El giro dentado, una red dinámica	16
I.8 Neurogénesis: relevancia funcional	17
I.8.1 Desarrollo e integración de CGs.....	18
I.8.2 Principales aferencias de las CGs nuevas	18
I.8.3 Principales eferencias de las CGs nuevas	22
I.8.4 Evidencia de neurogénesis adulta en el hipocampo humano.....	23
I.9 Regulación del circuito.....	24
I.10 Objetivos e hipótesis.....	25
Métodos	27
M.1 Modelo animal y líneas modificadas genéticamente.....	27
M.2 Detalles experimentales	27

M.2.1	Mantenimiento de animales e inyección de partículas retrovirales.....	27
M.2.2	Vectores retrovirales.....	28
M.3	Electrofisiología	28
M.3.1	Preparación de tejido <i>ex vivo</i> : rebanadas agudas de cerebro	28
M.3.2	Registros electrofisiológicos	29
M.3.2.1	Registros postsinápticos	29
M.3.2.2	Registros de campo	30
M.3.3	Optogenética	31
M.3.4	Potencial de reversión de corrientes GABAérgicas sobre CGs	31
M.4	Ensayos <i>in vivo</i> . Exposición a ambiente enriquecido (AE)	32
M.5	Inmunofluorescencia.....	32
M.6	Microscopía Confocal	32
M.7	Cuantificación y análisis estadístico	33
M.7.1	Análisis de Datos.....	33
M.7.1.1	Propiedades Intrínsecas	33
M.7.1.2	Corrientes postsinápticas.....	33
M.7.1.3	Respuesta a la estimulación repetitiva.....	34
M.7.2	Análisis Estadístico.....	34
	Resultados.....	37
R.1	Mapeo de la integración de neuronas nuevas en el hipocampo adulto.....	37
R.2	Estudio de la integración sináptica aferente.....	38
R.2.1	Estrategia experimental	38
R.2.2	Caracterización de PV-INs y SOM-INs	39
R.2.2.1	Análisis de la localización de PV-INs en el giro dentado	39
R.2.2.2	Propiedades de las PV-INs en el giro dentado.....	43
R.2.2.3	Análisis de la localización de SOM-INs en el giro dentado.....	45
R.2.2.4	Propiedades de SOM-INs del giro dentado	48

R.2.3 Aferencias de CGs provenientes de circuitos locales inhibitorios	51
R.2.3.1 Integración de las CGs en el circuito inhibitorio de PV-INs	53
R.2.3.2 Integración de las CGs en el circuito inhibitorio de SOM-INs	57
R.3 Localización subcelular de las sinapsis formadas por PV-INs y SOM-INs..	61
R.4 Plasticidad a corto plazo de las respuestas GABAérgicas provenientes de PV-INs	67
R.5 Plasticidad a corto plazo de las respuestas GABAérgicas provenientes de SOM-INs	69
R.6 PV- y SOM-INs regulan la actividad de las células principales de la capa granular	70
R.7 Modulación de la sinaptogénesis perisomática por exposición a ambiente enriquecido	73
R.8 Estudio de la integración sináptica eferente.....	75
R 8.1 Integración de la sinapsis CGs→PV-INs.....	77
R 8.2. Integración de la sinapsis CGs→SOM-INs	80
R.9 Integración en la fisiología del circuito inhibitorio: PV-INs.....	83
R.10 Integración en la fisiología del circuito inhibitorio: SOM-INs.....	85
Discusión.....	89
D.1 Mapa temporal de conectividad	89
D.2 Plasticidad del circuito.....	91
D.3 Efectos del AE en el desarrollo de la conectividad GABAérgica	92
D.4 Impacto de las interneuronas GABAérgicas en la fisiología del giro dentado	94
D.5 Perspectivas.....	96
Conclusiones.....	99
Abreviaturas	101
Bibliografía	103

Introducción

I.1 Neurogénesis adulta

Se puede definir a la neurogénesis adulta como el nacimiento de neuronas nuevas que forman conexiones dentro de un circuito preexistente maduro a partir de la diferenciación de progenitores neurales (van Praag et al., 2002). La neurogénesis está presente durante toda la vida y en todos los mamíferos incluyendo los humanos. Este proceso ocurre en una región cortical del cerebro, el hipocampo, específicamente en la zona subgranular del giro dentado (DG) (Gage, 2002). Por otra parte, la región subventricular (SVZ) de los ventrículos laterales puede también generar neuronas nuevas que migran hacia el bulbo olfatorio, área muy desarrollada en roedores. Si bien hay estudios que sugieren que las neuronas nacidas en la SVZ podrían migrar hacia el cuerpo estriado, la misma dependería de la generación de daños de la región (Ernst et al., 2014). Es decir que el giro dentado del hipocampo y el bulbo olfatorio son las únicas regiones del cerebro donde la neurogénesis se da de forma ininterrumpida durante toda la vida del individuo.

Este proceso le confiere al hipocampo una plasticidad exacerbada debido a la integración continua de neuronas nuevas que generan un remodelado en el circuito preexistente mediante la aparición de contactos estables con la red (Esposito et al., 2005; Laplagne et al., 2007; Mongiat and Schinder, 2011). Se entiende a la plasticidad neuronal como el proceso por el cual se producen cambios a nivel estructural y funcional sobre la red. El proceso de neurogénesis adulta produce no sólo cambios estructurales, ya que se desarrollan unidades neuronales nuevas que se conectan al circuito, sino también cambios funcionales ya que las células granulares (CGs) se conectan con la red preexistente relevante en funciones cognitivas incluyendo la codificación, formación y evocación de memoria espacial, y discriminación de contextos similares, como se verá más adelante (Clelland et al., 2009; Creer et al., 2010; Nakashiba et al., 2012; Sahay et al., 2011). Si bien hay estudios que muestran la relevancia de la neurogénesis adulta para muchos procesos cognitivos, sus funciones aún no han sido completamente dilucidadas.

I.2. Hipocampo: función y circuito

El hipocampo es una estructura cortical ubicada en la allocorteza de todos los mamíferos y en particular en humanos en el lóbulo medio temporal, parte del sistema límbico (Figura i.1). Los primeros estudios acerca de la función hipocampal y la formación de memorias datan de mediados de la segunda mitad del s. XX, en donde un paciente conocido como H.M. (por Henry G. Molaison) que sufría de severos episodios epilépticos, fue intervenido retirando de forma bilateral parte del lóbulo medio temporal. Si bien la operación aminoró los episodios epilépticos, el paciente tuvo problemas para recordar los eventos ocurridos con fecha posterior al día de la cirugía. Asimismo, presentaba amnesia anterógrada desde al menos 3 años antes de la cirugía (Eichenbaum et al., 1996; Scoville and Milner, 1957). Estudios *post mortem* confirmaron que la región del cerebro retirada correspondía a la región del hipocampo septal, afectando principalmente su conectividad con la corteza entorrinal y también parte de la amígdala. A partir de este paciente y de trabajos posteriores se han obtenido evidencias que vinculan al hipocampo con la formación de memorias explícitas. Es decir, las memorias asociadas a eventos, personas, objetos, lugares que requieren del uso de la conciencia en humanos (Eichenbaum et al., 1999; Eichenbaum et al., 1996; Squire and Zola-Morgan, 1991). Mientras que las memorias implícitas son aquellas asociadas a las habilidades motoras y de percepción que se realizan de forma inconsciente y se originan principalmente en cerebelo, cuerpo estriado y amígdala (Kandel et al., 2014).

Por otra parte, estudios realizados recientemente en humanos y animales demostraron que el hipocampo está involucrado en las memorias episódicas. Estas son un tipo de memorias explícitas que contienen experiencias autobiográficas y responden a cuatro preguntas clave: cuándo, dónde, quién y qué. Asimismo, este tipo de memoria se encuentra especialmente afectada en enfermedades tales como Alzheimer, esquizofrenia y autismo, enfermedades estrechamente asociadas a alteraciones de la función hipocampal. Como otros tipos de memorias, la formación de las mismas contiene 3 etapas esenciales: codificación, consolidación y evocación (Carr et al., 2011; Dumas et al., 2005). Diferentes estudios han probado la relevancia de la función hipocampal en cada una de estas etapas (Burgess et al., 2002; Dumas et al., 2005; Deng et al., 2019). Se ha propuesto que, durante la formación de memorias, grupos reducidos de neuronas conocidos como “ensambles neuronales”

se activan. Durante esta activación, los grupos de interneuronas se encargarían de reprimir la actividad global, quedando activas solo las neuronas que fueron fuertemente reclutadas formando dichos ensambles (Holtmaat and Caroni, 2016; Hu et al., 2014). En este sentido, se reportó un grupo de interneuronas GABAérgicas conocido como Parvalbumina-basket que potencia la actividad de la red mediante la sincronización de neuronas principales generando oscilaciones (Stark et al., 2015). También se ha reportado la relevancia de la participación de las interneuronas GABAérgicas de tipo Parvalbúmina (PV-INS) en la plasticidad del circuito durante el aprendizaje (Donato et al., 2013) y de interneuronas GABAérgicas de tipo Somatostatina (SOM-INS) en un modelo de aprendizaje asociado al miedo (Lovett-Barron et al., 2014). Es decir que la función hipocampal estaría estrechamente asociada a la regulación de al menos algunos grupos de neuronas con identidad GABAérgica.

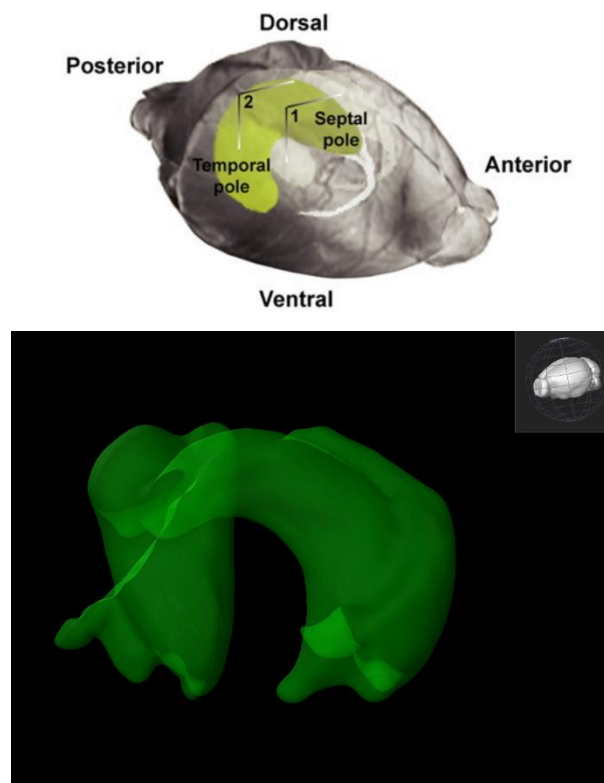


Figura i.1: Estructura del hipocampo. Arriba: Vista esquemática del cerebro de ratón que muestra la anatomía tridimensional del hipocampo. Se visualiza en verde el hipocampo y se muestran las regiones septal y temporal. Figura tomada de Piatti et al., 2011. Abajo: Vista tridimensional obtenida del software Brain Explorer, Allen Mouse Brain Atlas que permite visualizar la estructura hipocampal correspondiente a ambos hemisferios en el cerebro de

ratón. Arriba a la derecha se muestra la orientación del cerebro entero utilizado para generar la imagen.

La red hipocampal contiene el llamado circuito trisináptico excitatorio. Este circuito está formado por la corteza entorrinal (EC), principal aferencia excitatoria que llega al giro dentado, allí contacta a las células granulares que a través de sus axones denominados “mossy fibers” reclutan neuronas piramidales en CA3, cuyos axones, las “vías colaterales de schaffer” llegan hasta CA1. Por último, las eferencias de CA1 cierran el circuito contactando nuevamente a la corteza entorrinal en su capa más profunda (capa Vb) a través del subículum (Witter et al., 2017) (figura i.2). Además de este circuito, el hipocampo alberga otra población de células excitatorias, conocidas como interneuronas: las células mossy. Las mismas se extienden a lo largo del eje longitudinal del giro dentado y contactan a nivel ipsi y contralateral las neuronas principales del giro dentado e interneuronas GABAérgicas (Scharfman, 2018).

I.3 Giro dentado: función y circuito

El giro dentado no sólo es la primera instancia de procesamiento de los estímulos externos provenientes de la corteza entorrinal, sino que también es la región donde se desarrolla la neurogénesis adulta. Las células principales de la corteza entorrinal (EC) proyectan sus axones sobre la región lateral y medial (capas 1-3) a través de la vía perforante, alcanzando la capa molecular del giro dentado (Dolorfo and Amaral, 1998; Ruth et al., 1982; Witter et al., 1989). Allí las CGs están densamente empaquetadas en la capa granular (GCL). El giro dentado se ubica entre la capa molecular y la capa polimórfica conocida como hilus. Las CGs extienden su árbol dendrítico a través de la capa molecular y sus axones llamados “mossy fibers” atraviesan el hilus y alcanzan la región CA3 (Figura i.2). En el hilus se distribuyen interneuronas GABAérgicas y glutamatérgicas (células mossy). Las células mossy representan el 30% de las células del hilus, y conforman un grupo de interneuronas excitatorias que reciben aferencias de las CGs, así como de las interneuronas locales y proyecciones comisurales. Por otra parte, las mismas reclutan interneuronas, así como CGs en el hemisferio contralateral (Gottlieb and Cowan, 1973; Laurberg and Sørensen, 1981; Zimmer, 1971). Si bien estas neuronas contactan tanto células excitatorias como inhibitorias, su principal acción sería de tipo inhibitoria a través del

contacto disináptico sobre CGs, en donde la neurona intermediaria es una interneurona GABAérgica (Acsády et al., 1998).

Otro grupo de interneuronas presente en el hilus corresponde a las interneuronas GABAérgicas (INs). Las INs presentan una amplia diversidad en cuanto a su función, morfología, localización y proyección axonal (Booker and Vida, 2018; Freund and Buzsáki, 1996; Hosp et al., 2014; Tremblay et al., 2016) Las funciones de este grupo sumamente diverso en la integración de CGs no ha sido completamente dilucidado (Figura i.2).

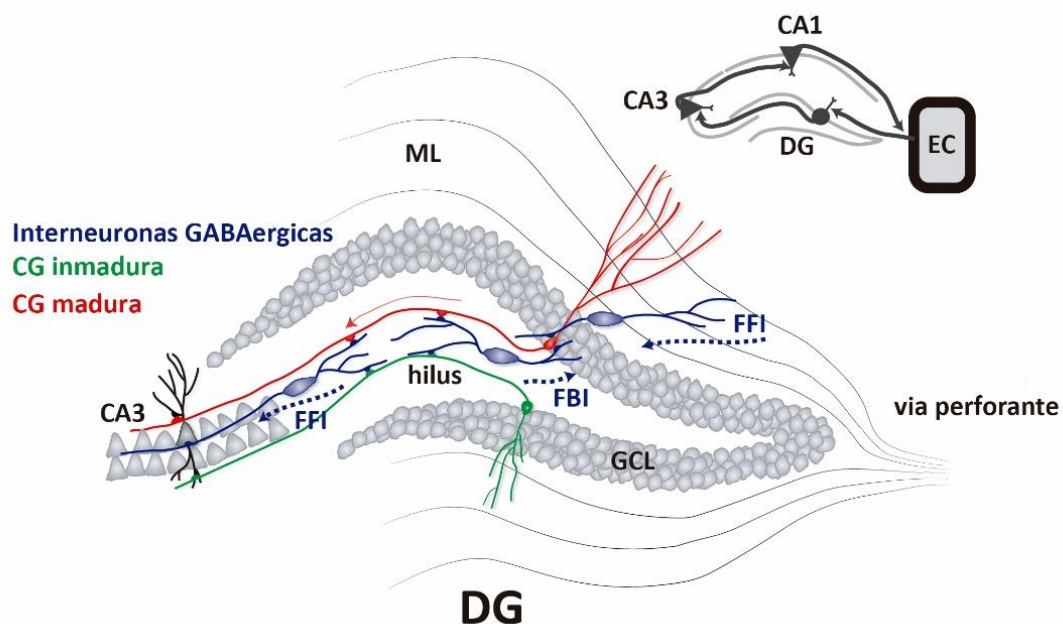


Figura i.2: Circuito local del giro dentado. CGs (rojo, madura; verde, inmadura) reciben aferencias glutamatérgicas que contactan las dendritas en la capa molecular (ML). Las aferencias provienen de la corteza entorrinal, axones de las células principales forman la vía perforante. Los axones de las CGs proyectan a través del hilus y allí contactan interneuronas y células piramidales en la región CA3. Los axones de la vía perforante también contactan interneuronas que controlan la actividad de las CGs mediante inhibición *feedforward* (FFI). Las mossy fibers también reclutan inhibición en este caso FFI sobre la capa piramidal en CA3 y *feedback* (FBI) sobre las CGs como se verá más adelante. Arriba derecha: Circuito trisináptico excitatorio del hipocampo muestra el flujo de información que sale y vuelve a la EC y recorre las distintas regiones (Figura modificada de (Mongiat and Schinder, 2011)).

I.3.1 Procesamiento de información en el giro dentado

Distintos trabajos han demostrado la contribución del DG a la formación de memoria espacial y episódica actuando como un “separador de patrones” (Bakker et al., 2008; Leutgeb et al., 2007; Nakashiba et al., 2012), lo cual se entiende como la formación de representaciones distintas a partir de estímulos aferentes que son muy similares entre sí (Marr, 1971; Treves and Rolls, 1994). Teniendo en cuenta la alta densidad de CGs, los estímulos provenientes de la corteza entorrinal activarán con una alta probabilidad ensambles neuronales no coincidentes. Las CGs a su vez, presentan baja probabilidad de conectividad con la región CA3, esto hace que los ensambles activos difícilmente recluten las mismas células en CA3, y por consiguiente la representación en el hipocampo será distinta. De esta forma, aún estímulos muy similares tendrán alta probabilidad de reclutar distintos ensambles de CGs que a su vez reclutarán distintos grupos de neuronas principales de CA3 (Figura i.3). Si bien aún no está del todo resuelto el procesamiento de información en el giro dentado, su función como separador de patrones ha permitido explicar la discriminación de determinados estímulos.

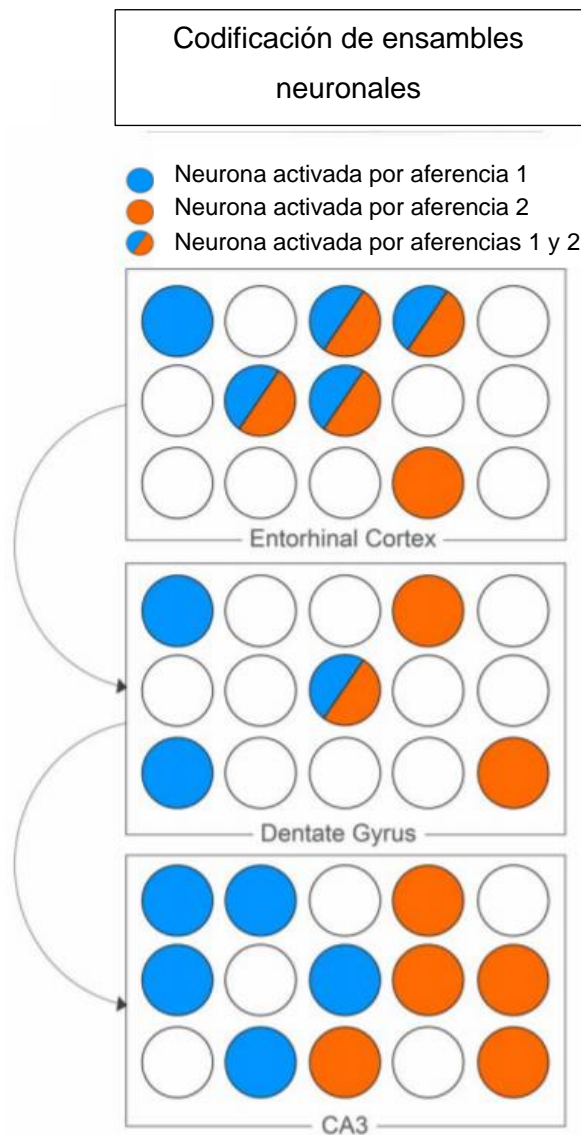


Figura i.3: Separación de patrones en el giro dentado. Codificación de ensambles. Dos estímulos aferentes (azul y naranja) activan las neuronas de la corteza entorrinal (EC) que por su baja probabilidad de conectividad generan escasa actividad sobre las CGs del giro dentado. Asimismo, la baja probabilidad de contacto entre las mossy fibers de CGs y CA3, genera activación de ensambles neuronales distintos a partir de estímulos similares transmitidos por la EC. Los círculos azules representan células activadas por estímulo 1, en naranja, las células activadas por un estímulo 2. En naranja y azul se representan las células que se activaron por ambos estímulos. Figura tomada y modificada de (Santoro, 2013).

I.4 Interneuronas del giro dentado

I.4.1 Células mossy

Las células mossy (MCs) son un grupo importante de interneuronas del giro dentado, representando más del 30% de las células del hilus (Buckmaster and Jongen-Rêlo, 1999; Jiao and Nadler, 2007; Morgan et al., 2007), las mismas extienden sus procesos de forma longitudinal por la vía asociativa / comisural abarcando la región ipsilateral y el hemisferio contralateral respectivamente. Este grupo de interneuronas tiene la particularidad de ser glutamatérgicas. Las MCs se encuentran localizadas exclusivamente en el hilus y presentan lo que se conoce como “thorny excrescences”. Esta estructura comprende un conjunto de espinas que reciben las principales aferencias glutamatérgicas provenientes de las CGs, que forman terminales inusualmente grandes. Por otra parte, las MCs serían a su vez capaces de reclutar CGs. Sin embargo, se ha reportado como principal blanco de las MCs, a las interneuronas de tipo GABAérgicas, con especial preferencia por las células “basket” (Scharfman, 2016, 2018). En línea con esto, algunos estudios han logrado manipular de forma selectiva a las células mossy, observando que la eliminación de las mismas mediante la administración de la toxina de la difteria genera desinhibición sobre las CGs en respuesta a un estímulo proveniente de la vía perforante (Jinde et al., 2012; Jinde et al., 2013). De esta forma, las aferencias provenientes de MCs sugieren un principal efecto inhibitorio sobre la capa granular, que estaría sumamente regulado por la actividad de las CGs. Cabe destacar que un estudio reciente ha demostrado que la sinapsis MCs-CGs formada por axones de MCs provenientes de la vía comisural (hemisferio contralateral) presenta potenciación a largo plazo (LTP) (Hashimoto et al., 2017). Este descubrimiento retoma la relevancia de la sinapsis directa MCs-CGs excitatoria generando especial interés en el rol de MCs en procesos cognitivos en donde la plasticidad del circuito está estrechamente involucrada. Si bien la sinapsis MCs-CGs ha sido reportada como una sinapsis sumamente débil (Scharfman, 1995), su capacidad de generar LTP sería clave para aumentar la comunicación en el eje septo-temporal, teniendo en cuenta que las MCs son las

únicas neuronas del DG cuyos axones se extienden en el eje longitudinal del DG (Amaral et al., 2007; Buckmaster et al., 1996). Esto generaría una potenciación en la actividad de CGs que contribuiría durante procesos de aprendizaje y memoria.

I.4.2 Interneuronas GABAérgicas

Las interneuronas GABAérgicas (INs) regulan la excitabilidad de las células principales en todo el cerebro. Esto es relevante para mantener la homeostasis en la red (Isaacson and Scanziani, 2011). Los distintos subtipos de interneuronas GABAérgicas presentan distintas propiedades que contribuyen con el procesamiento de información. Se entiende por procesamiento de información a la transformación de señales aferentes en respuestas neuronales que generan un patrón o actividad específico en el circuito en estudio.

La población de INs representa un 10-15% del número total de neuronas del hipocampo (Pelkey et al., 2017). La misma contiene una enorme variedad de subtipos que aún se encuentran en estudio. Además, el número reducido de INs que representa cada subtipo dificulta enormemente su caracterización (Meyer et al., 2011). Si bien se pueden utilizar distintos parámetros para la clasificación de las interneuronas GABAérgicas, la clasificación más comúnmente utilizada está basada en la expresión de marcadores moleculares (Freund and Buzsáki, 1996; Tremblay et al., 2016). Esta clasificación será útil para nuestro trabajo, en donde se emplea a la recombinasa Cre bajo un promotor específico de genes que se utilizan como marcadores moleculares de interneuronas, en ratones transgénicos (Sección M.1), y será complementada por estudios morfológicos, anatómicos y fisiológicos y tendrá en cuenta estudios realizados en corteza e hipocampo. Los marcadores moleculares permitieron desglosar las poblaciones de interneuronas en subgrupos obteniendo dentro de cada uno, análisis morfológicos y electrofisiológicos que revelaron patrones claros, así como el tipo de conectividad y el blanco post sináptico. En los últimos años, se han clasificado las INs en tres grupos principales que no se superponen entre sí y que fueron estudiados principalmente en corteza: Parvalbúmina (PV), Somatostatina (SOM) y la expresión del receptor serotoninérgico 5HT_{3aR} (Hosp et al., 2014; Kepecs and Fishell, 2014; Tremblay et al., 2016). Cabe destacar que cada uno de estos grupos muestra características funcionales diferentes, así como un perfil de expresión genético específico (Tasic et al., 2016; Zeisel et al., 2015). Si bien esta

clasificación separa tres poblaciones con al menos un perfil de expresión molecular distinto y abarca casi el 100% de las interneuronas GABAérgicas, no es suficiente para explicar la alta variabilidad, por ello se complementará el estudio con otros parámetros esenciales. Esta caracterización nos proveerá una base sólida a partir de la cual elaborar el estudio de conectividad de las CGs nuevas con dos grupos principales de INs del giro dentado.

I.4.2.1 Interneuronas de tipo parvalbúmina (PV-INs): Las PV-INs son llamadas así por la expresión de la proteína de unión a calcio que lleva dicho nombre. Abarcan el 30% del total de las interneuronas del hipocampo (Freund, 2003; Freund and Buzsáki, 1996). Este grupo incluye a células que fueron clasificadas según la morfología de sus arborizaciones axonales en células “basket” y “chandelier”, estas últimas también conocidas como neuronas de contacto axo-axónicas, fácilmente reconocibles en términos de morfología, debido a la forma del terminal sináptico que contacta el segmento inicial del axón de las células principales. Están representadas en su mayoría por las células “basket” que presentan un perfil de disparo rápido con una frecuencia de disparo mayor a los 100 Hz. Contactan células principales y también interneuronas en dominios perisomático y proximal. Esta inhibición es capaz de influenciar la actividad de las células blanco mediante hiperpolarización o inhibición de tipo “*shunting*”, ya que contactan muy cerca del sitio donde se origina el potencial de acción (Fishell and Rudy, 2011). Cabe destacar que dentro del subgrupo de interneuronas PV-células “basket” se pueden reconocer otros subgrupos asociados a la diversa arborización dendrítica y axonal y su localización en las distintas regiones (Kisvárdy, 1992; Lee et al., 2014; Markram et al., 2004; Somogyi et al., 1983). Estas diferencias morfológicas encontradas dentro del subtipo PV-INs corresponden también a diferencias funcionales. Las PV-células “basket” han sido en los últimos años el subgrupo de interneuronas más estudiado debido a su alta representatividad dentro del subtipo PV-INs, a su perfil de disparo claramente distinguible, la importancia funcional y la existencia de buenas herramientas genéticas.

I.4.2.2 Interneuronas de tipo somatostatina (SOM-INs): Este grupo representa casi la mitad de las interneuronas GABAérgicas del hipocampo (Abbas et al., 2018; Yuan

et al., 2017). Expresan el péptido Somatostatina (SOM), también involucrado en la regulación del calcio intracelular. A diferencia de las PV-INs, las SOM-INs contactan las células postsinápticas principalmente a nivel dendrítico (Freund and Buzsáki, 1996; Maccaferri, 2005; Miles et al., 1996; Rudy et al., 2011). Cada vez más reportes evidencian a SOM-INs como un grupo altamente diverso en cuanto a sus propiedades morfológicas, electrofisiológicas y moleculares. Sin embargo, este grupo tiene en común la facilitación en la respuesta proveniente de aferencias excitatorias y despolarización mediada por receptores muscarínicos (Kapfer et al., 2007; Silberberg and Markram, 2007; Xu et al., 2013). Originalmente las células conocidas como HIPP (por asociado a la vía perforante) han sido sinónimo de SOM-INs (Freund and Buzsáki, 1996; Mott et al., 1997), estas células proyectan sus axones a la capa molecular externa, en línea con la vía perforante. Estudios de microscopia electrónica muestran que estas células contactan CGs en su dendrita apical, así como también a otras interneuronas del DG. Recientemente, se identificó un nuevo subgrupo de SOM-INs, asociado a las interneuronas del hilus (HILs), con axones colaterales en dicha región. Las mismas ejercen una fuerte inhibición perisomática en interneuronas GABAérgicas (Yuan et al., 2017). Además, las células HILs, formarían conexiones de largo rango con el medial septum. Esto es relevante ya que las mismas no solo participan del circuito local, sino que podrían ser un nexo con otras regiones más alejadas. Por otra parte, SOM-INs también muestran heterogeneidad a nivel molecular. En corteza, un 15-30% de las SOM-INs expresan también calretinina (CR), mientras que otras expresan un marcador molecular secundario nNOS (óxido nítrico sintetasa) y este último representaría a las SOM-INs de proyección de largo rango (Tamamaki and Tomioka, 2010). Si bien la relación entre expresión de marcadores moleculares y diversidad electrofisiológica no está clara aún, estudios recientes de expresión transcripcional por análisis de célula única (scRNA-seq), sugieren que SOM-INs contiene subtipos genéticamente discretos (Tasic et al., 2016).

I.4.2.3 Interneuronas que expresan el receptor serotoninérgico 5HT3aR: Este grupo al momento se lo considera el grupo más heterogéneo, más aún que SOM-INs. Tienen en común la expresión del receptor funcional serotoninérgico 5HT3aR y también receptores colinérgicos (Lee et al., 2010). Son fuertemente despolarizadas por agonistas para dichos receptores. Esto sugiere que la actividad en centros de

neuromodulación podría activar efectivamente y exclusivamente a este grupo de interneuronas. Dentro de este grupo se han clasificado subtipos de INs utilizando otros marcadores moleculares: péptido intestinal vasoactivo (VIP), Colicistokinina, (CCK), células neurogliaforme, Calretinina (CR), e incluso un subgrupo de SOM-INs provenientes exclusivamente de la eminencia ganglionar caudal (CGE) (Pelkey et al., 2017) (Figura i.4).

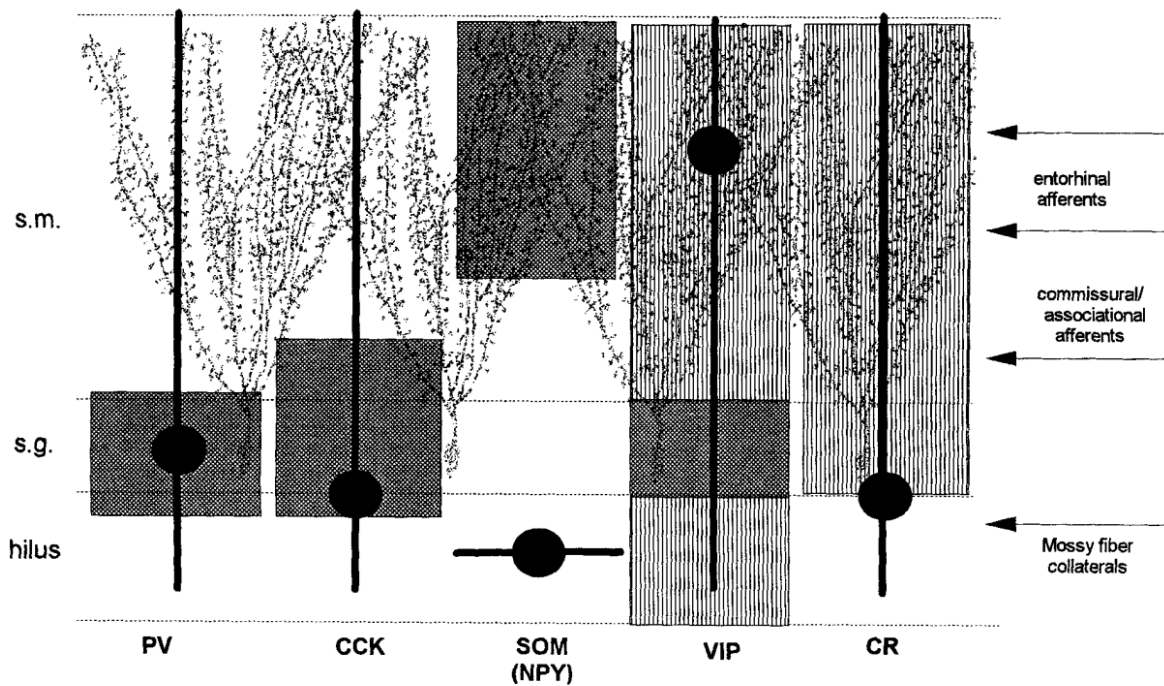


Figura i.4: Distribución laminar de las arborizaciones de los distintos grupos de INs en el DG. Los círculos llenos muestran la ubicación del cuerpo celular correspondiente a cada grupo de INs, la línea horizontal/vertical muestra la orientación laminar predominante de la distribución del árbol dendrítico. Se puede ver en las ventanas rellenas, la región laminar donde el axón típicamente se arboriza. Las ventanas con líneas verticales muestran que el blanco de dichas células son INs y no neuronas principales. Las células granulares que se muestran en el fondo ayudan a notar las principales aferencias que reciben a través de los axones de las interneuronas PV, CCK y SOM (recuadro relleno). Figura tomada de (Freund and Buzsáki, 1996).

I.5 Inhibición proximal versus inhibición distal

Las sinapsis GABAérgicas se distribuyen en el eje longitudinal de las células principales (Hioki et al., 2013; Megías et al., 2001). En particular, las CGs presentan largas distancias que separan la región dendrítica de la zona de inicio del potencial de acción, el cono axónico. Estudios han revelado que mientras que la inhibición dendrítica genera una hiperpolarización relativa, la inhibición proximal genera una

inhibición directa sobre la respuesta de las CGs que si es suficiente, inhibirá de forma absoluta el potencial de acción (Cobb et al., 1995; Miles et al., 1996; Royer et al., 2012). Es decir que la inhibición proximal genera una inhibición en un factor constante, independiente de la fuerza de excitación que reciben las CGs si la misma superó el umbral de disparo. Por otra parte, la inhibición distal reduce la despolarización en compartimentos dendríticos, evitando la saturación de la excitación y generando así, distintos niveles de despolarización. De esta forma la información que llega a través de las dendritas presentará distintos niveles dependiendo del balance excitación/inhibición en cada rama dendrítica. La inhibición proximal entonces, tiende a reducir la tasa máxima de disparo de las células, mientras que la inhibición distal reduce la saturación de la despolarización, aumentando así la resolución, lo que generaría despolarizaciones intermedias que no necesariamente implican una reducción en la tasa de disparo pero pueden afectar la sumación temporal y la integración de las aferencias excitatorias (Liu, 2004; Vu and Krasne, 1992).

Hemos visto en la clasificación previa que las INs, forman contactos sinápticos en compartimentos subcelulares especializados. Las PV-INs se especializan en la inhibición de tipo perisomática mientras que SOM-INs se especializan en inhibición dendrítica. ¿Cual es la relevancia de que dos grupos distintos de INs proyecten sobre distintos compartimentos subcelulares?

Por un lado, al ser dos grupos distintos, pueden ser reclutadas diferencialmente por las aferencias e incluso ser reguladas por distintas identidades neuronales. Se ha reportado que las INs que ejercen inhibición perisomática (PV-INs) son fuertemente reclutadas por los axones de la mPP mientras que las INs que ejercen inhibición dendrítica (HIPPs) son reclutadas principalmente por las CGs (Lee et al., 2016; Sambandan et al., 2010). Si bien no se ha demostrado aún la participación directa de SOM-INs, teniendo en cuenta la localización dendrítica de sus proyecciones podemos hipotetizar que SOM-INs son reclutadas por CGs consistente con el reporte realizado en HIPPs.

Las SOM-INs se encargarían principalmente de integrar las respuestas generadas en las dendritas que llegan al soma. Se ha reportado que potenciales de acción dependientes de la entrada de calcio a través de receptores del tipo NMDA, son modulables por inhibición dendrítica, logrando que la información que arriba al soma

haya sido filtrado previamente por dichos contactos (Spruston, 2008). En cambio, las PV-INs serían capaces de afectar el rango dinámico de actividad de la célula que inhiben. Esto tiene especial influencia en la salida de información de las CGs lo que daría lugar a cambios en la temporalidad y sincronía de la actividad neuronal (Gabernet et al., 2005; Pouille and Scanziani, 2001; Pouille et al., 2013)

Por último, cabe destacar que las SOM-INs contactan a las PV-INs (Xu et al., 2013). mientras que las PV-IN prácticamente no reclutan SOM-INs (Savanthrapadian et al., 2014). Es decir que la inhibición distal y proximal generada por SOM- y PV-INs respectivamente, no son eventos aislados e independientes. La comunicación entre ambos grupos genera sincronización relevante para integrar las aferencias distales y proximales. De esta forma PV- y SOM-INs aportarían a la formación de oscilaciones en la red sumamente involucradas en procesos cognitivos (Abbas et al., 2018; Andrews-Zwilling et al., 2012; Engel et al., 2001; Fries, 2009, 2015; Varela et al., 2001; Wang, 2010).

I.6 Circuitos *feedforward* y *feedback* en el giro dentado

I.6.1 *Feedforward*

El circuito de *feedforward* (FFI) en el giro dentado se origina a partir de la activación de los axones provenientes de la corteza entorrinal a través de la vía media perforante. Allí los mismos son capaces de reclutar no solo excitación sino también interneuronas de la red local que a su vez contactan las células granulares generando inhibición sobre las mismas (Figura i.5) (Sloviter, 1991). Este circuito ha estado fuertemente asociado a inhibición de tipo perisomática (Pouille and Scanziani, 2001). Por otra parte, en consistencia con este reporte, un estudio reciente ha demostrado que las PV-INs están involucradas en la FFI del giro dentado (Lee et al., 2016). Se ha demostrado que FFI limita la ventana de sumación temporal de los potenciales excitatorios postsinápticos que reciben las CGs. Esto obliga a que solo haya sumación temporal si los estímulos excitatorios llegan prácticamente de forma coincidente sobre las CGs. Es decir que FFI regula de forma precisa la ganancia del circuito. Cabe destacar que si bien esta ventana de sumación temporal está sumamente acotada en la región del soma, en las dendritas, la ventana es más ancha, ya que FFI tiene preferencia inhibitoria a nivel del soma. La activación de las interneuronas genera FFI

que afectará principalmente la ventana temporal de integración a nivel del soma. Esto genera que la ganancia de las células principales se vea afectada por el tiempo de integración regido por FFI que puede estar modulado por el estado comportamental del animal (Pouille and Scanziani, 2001).

I.6.2 Feedback

En la inhibición de tipo *feedback* (FBI), las CGs activadas reclutan interneuronas locales que contactarán a CGs de la misma capa granular (Figura i.5). Se ha reportado que tanto las INs de disparo rápido e inhibición de tipo perisomática como las INs de invasión dendrítica participan de este circuito (Sambandan et al., 2010). La activación de las interneuronas por parte de las CGs puede generar inhibición sobre ellas mismas y este tipo de inhibición se denomina inhibición recurrente (Figura i.5). Sin embargo en el giro dentado se ha reportado que debido a la alta densidad de conectividad local que presentan las interneuronas del circuito, la inhibición lateral se da con una mayor probabilidad que la recurrente, es decir que es más probable que las interneuronas locales contacten CGs vecinas distintas de las CGs que las reclutaron (Espinoza et al., 2018). Aún queda pendiente dilucidar las identidades GABAérgicas que forman parte de este circuito, teniendo en cuenta los marcadores moleculares que expresan (Figura i.5).

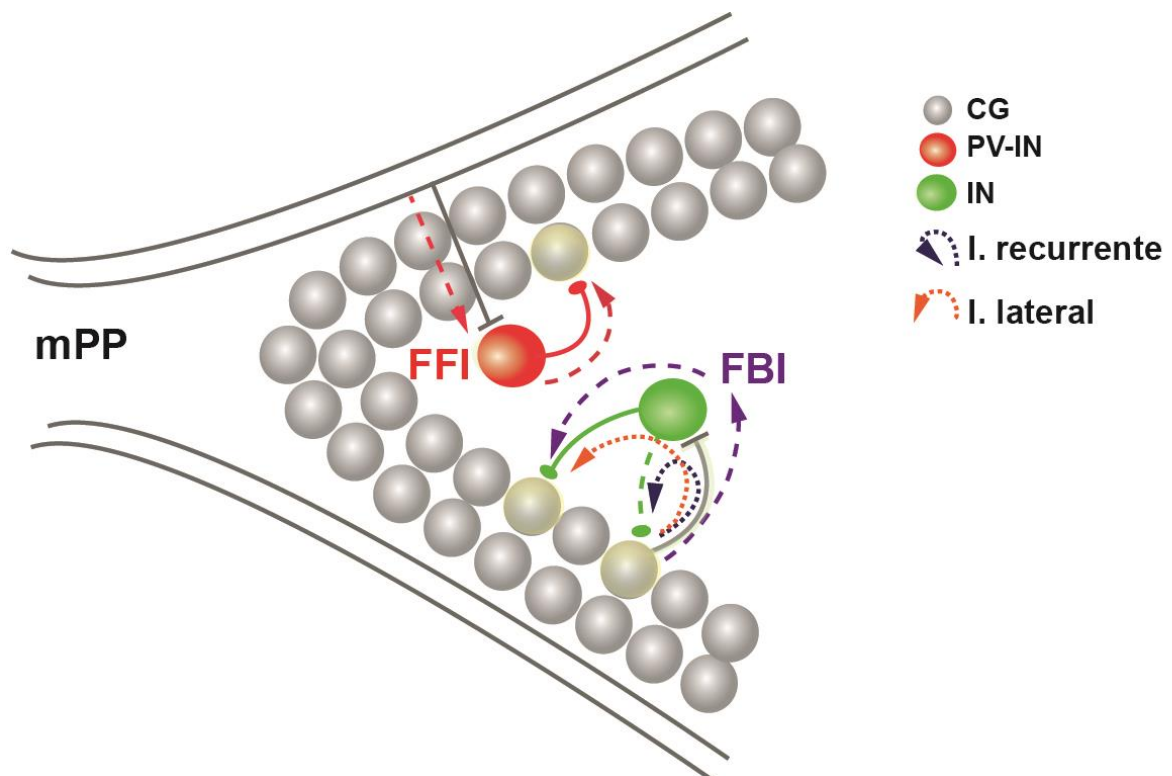


Figura i.5: Microcircuitos FBI y FFI del giro dentado. En el esquema se muestra con flechas rojas el circuito de feedforward. En este circuito, las PV-IN son activadas por la mPP proveniente de la corteza entorrinal, y a su vez las mismas generan inhibición perisomática sobre las CGs (CGs en amarillo). El circuito feedback se muestra con flechas violetas. En este circuito aún queda pendiente por dilucidar las identidades GABAérgicas, se ha demostrado que tanto la inhibición perisomática como dendrítica participa en este circuito. El circuito feedback puede generar inhibición recurrente (flecha punteada azul), si bien se ha reportado que mayormente se genera inhibición lateral (flecha punteada naranja). Las CGs inhibidas se muestran en amarillo.

I.7 El giro dentado, una red dinámica

Altos niveles de inhibición controlan la actividad de las CGs. Sin embargo, estos niveles no son estáticos, sino que varían teniendo en cuenta la heterogeneidad de las poblaciones de CGs que conforman la capa granular del giro dentado. El balance excitación/inhibición se ve alterado por la adición continua de CGs que inicialmente presentan alta excitabilidad (Esposito et al., 2005; Laplagne et al., 2006; Marín-Burgin et al., 2012). Para entender los mecanismos fisiológicos por los cuales las CGs reclutan circuitos de inhibición, sería preciso caracterizar las poblaciones de interneuronas y su rol en la integración de las CGs nuevas. Conocer en detalle la

conectividad entre CGs nuevas y los microcircuitos inhibitorios proveerá una base sólida sobre la cual poder estudiar el procesamiento de información de la red.

I.8 Neurogénesis: relevancia funcional

¿Participa la neurogénesis adulta en el proceso de separación de patrones? Miles de neuronas nacen cada mes en el giro dentado del cerebro de una rata adulta, representando un ~3% del total de las CGs presentes (Cameron and McKay, 2001). Una fracción sustancial de las mismas sobreviven, se integran funcionalmente, y persisten a lo largo de la vida del individuo (Drew et al., 2013; Piatti et al., 2013). Es decir que la capa de células granulares del giro dentado está compuesta por una población heterogénea de CGs. Las CGs que se desarrollaron durante el estadio embrionario y postnatal temprano, se encuentran posicionadas en la zona más externa de la CGL, la región más cercana a la capa molecular. Por otra parte, hay un gradiente de poblaciones acotadas de CGs, nacidas en el estadio adulto, que se ubican en la región más interna, cercana al hilus (Figura i.2). Se han realizado varios estudios en donde se muestra que, en ausencia de neuronas nuevas, el desempeño de tareas de comportamiento relacionadas con la discriminación de estímulos se ve afectado, mientras que un aumento de la neurogénesis puede mejorarla (Clelland et al., 2009; Creer et al., 2010; Nakashiba et al., 2012; Sahay et al., 2011). Las CGs nuevas son necesarias para llevar a cabo la discriminación de estímulos similares y esto sería posible por su participación a nivel de circuito en la separación de patrones descrita en la sección I.3.1. Por otra parte, el rol de las CGs nuevas parecería disminuir sustancialmente si los estímulos son suficientemente disímiles. La coexistencia de distintas edades poblacionales de CGs le suma complejidad al circuito, pero también le confiere la plasticidad necesaria para adaptarse y procesar nuevas experiencias y aprendizajes (Fuchs and Flügge, 2014; Gage, 2002; Toda et al., 2019). Esto genera una dinámica en la conectividad que lleva a pensar que el procesamiento de información no es estático. Teniendo en cuenta esto, en este trabajo nos proponemos realizar un estudio detallado de la conectividad de las CGs nuevas, haciendo especial hincapié en el curso temporal de la formación de las conexiones inhibitorias.

I.8.1 Desarrollo e integración de CGs

Las CGs nuevas se diferencian a partir de células madre neurales (NSCs) localizadas en la región subgranular, ubicada debajo de la capa granular. Por otra parte, la capa granular contiene una población heterogénea de CGs densamente empaquetadas. Las NSCs pueden permanecer quiescentes por un período prolongado y la activación de las mismas produce progenitores intermediarios con expresión de genes específicos que le confieren el compromiso a desarrollar el fenotipo neuronal (Ghosh, 2019; Zhang and Jiao, 2015). En contraste con la neurogénesis embrionaria, la neurogénesis adulta es un proceso dinámico que está regulado por la actividad neuronal (Lledo et al., 2006; Zhao et al., 2008). Un ejemplo de ello se puede ver en un estudio reciente en donde la actividad elevada proveniente de las células mossy incrementa la activación de las NSCs mediante conexiones directas, mientras que poca actividad las mantiene quiescentes, afectando directamente al proceso de neurogénesis adulta (Yeh et al., 2018). Por otra parte, estudios previos de nuestro laboratorio han mostrado que efectos del ambiente enriquecido generan mayor actividad de las PV-INs, produciendo una aceleración en la integración de las CGs nuevas en un estadio temprano (Alvarez et al., 2016).

Realizaremos un resumen con los principales estadios de las CGs teniendo en cuenta la sinaptogénesis aferente y eferente y los efectos de la plasticidad en la dinámica de de las conexiones.

I.8.2 Principales aferencias de las CGs nuevas

Fase I: Sinaptogénesis GABAérgica

Durante la primera semana de desarrollo, las CGs reciben inicialmente aferencias GABAérgicas en las dendritas distales (Figura i.6). Estas aferencias generan corrientes postsinápticas tónicas de GABA, de cinética lenta que son similares a las que reciben las NSCs previo a su diferenciación neuronal (Song et al., 2016; Song et al., 2012). Recientemente también se han reportado a las MCs como las principales aferencias glutamatérgicas que regulan la quiescencia de NSCs durante la neurogénesis adulta (Yeh et al., 2018). En este estadio, las corrientes GABAérgicas ejercen un efecto despolarizante debido a la alta relación en la expresión del cotransportador Na-K-Cl de tipo 1 (NKCC1), que promueve la entrada de Cl⁻ al

citoplasma, y el cotransportador de K-Cl de tipo 2 (KCC2), que extruye Cl⁻. Allí NKCC1, produce una entrada de Cl⁻ neta que lleva a un potencial despolarizado la reversión de las corrientes GABAérgicas (Kaila et al., 2014; Rivera et al., 1999). GABA genera apertura de los receptores ionotrópicos de GABA (GABAR) produciendo una salida neta de Cl⁻ y por ende una despolarización. En este primer estadio, se han descrito como principales aferencias a las interneuronas de tipo neurogliaforme, el grupo de interneuronas GABAérgicas que generaría el primer contacto con las CGs (Markwardt et al., 2011). Esta fase inicial en que GABA es despolarizante es crítica para el desarrollo de las CGs. Estudios han mostrado que modificando el potencial de reversión GABA, de forma tal de que pase a ser hiperpolarizante, el desarrollo morfológico y la integración funcional de las CGs se ve afectada (Ge et al., 2006; Overstreet-Wadiche et al., 2006). Esta primera etapa la definimos hasta alrededor de la semana 1.5 edad en la que comienzan a aparecer los primeros contactos glutamatérgicos (Esposito et al., 2005; Ge et al., 2006; Overstreet Wadiche et al., 2005).

Fase II: Sinaptogénesis glutamatérgica

Como se muestra en la figura i.6, durante la segunda semana de desarrollo comienzan a formarse las primeras aferencias glutamatérgicas que contactan las dendritas de las CGs (Toni et al., 2007; Zhao et al., 2006). En esta etapa, las dendritas están en continuo desarrollo, extendiéndose a través de la capa molecular. Allí llegan las principales aferencias glutamatérgicas provenientes de la corteza entorrinal (a través de la vía perforante medial y lateral) y de las células mossy (vía comisural y asociativa). Se ha reportado que las principales aferencias glutamatérgicas provienen de las MCs, mientras que el resto de los contactos se forma en la tercera semana (Chancey et al., 2014). Estos contactos son inicialmente silentes ya que inicialmente solo expresan receptores N-metil-D-aspartato (NMDAR) y no α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico (AMPA) (Chancey et al., 2013). De esta manera, la despolarización generada por las aferencias GABAérgicas es clave para liberar el magnesio del NMDAR, activando así los contactos glutamatérgicos.

La despolarización de CGs no solo libera el Mg²⁺ desbloqueando los NMDAR, además desencadena una señalización intracelular que produce la inserción de

AMPAAR llevando a la formación de sinapsis glutamatérgicas completamente funcionales (Isaac et al., 1997; Isaac et al., 1995; Liao et al., 1995).

Fase III: período de alta excitabilidad

En este estadio la expresión de KCC2 aumenta y esto genera que el potencial de reversión del Cl⁻ se hiperpolarice, similarmente a lo que ocurre durante el desarrollo prenatal (Ge et al., 2006; Overstreet Wadiche et al., 2005). Al mismo tiempo, las aferencias glutamatérgicas provenientes tanto de las MCs como de la PP medial y lateral, forman sinapsis funcionales generando un balance excitación/inhibición elevado, que sumado a que la resistencia de membrana es todavía inmadura, genera que incluso estímulos débiles sean capaces de activarlas (Mongiati et al., 2009). Además, estudios previos del laboratorio han demostrado que la alta excitabilidad que genera una mayor probabilidad de disparo en CGs inmaduras se debe al retardo que presenta el tiempo de inicio de la corriente inhibitoria proveniente principalmente de FFI. Allí los contactos perisomáticos inhibitorios que participan, presentan características inmaduras (Marín-Burgin et al., 2012).

Fase IV: Maduración de las aferencias GABAérgicas

Esta etapa fue estudiada en CGs de al menos 8 semanas. Las mismas ya alcanzaron el desarrollo máximo de su árbol dendrítico, alcanzando una longitud total de 1.5 mm dando lugar a >3000 sinapsis glutamatérgicas (Sailor et al., 2017; Sun et al., 2013; Toni et al., 2007; van Praag et al., 2002; Zhao et al., 2006). A esta edad las propiedades fisiológicas son funcionalmente las mismas a las detectadas en CGs maduras nacidas durante el desarrollo (CGm) (Laplagne et al., 2006; Laplagne et al., 2007) por lo que el nicho neurogénico puede llegar a ser uno muy similar o conservado desde el desarrollo perinatal. En esta etapa, la inhibición perisomática y dendrítica han alcanzado su máximo desarrollo, disminuyendo la excitabilidad de las CGs

(Figura i.6). Por otra parte, en este estadio maduro los distintos patrones de estimulación son capaces de reclutar específicamente distintos tipos de interneuronas. En un ejemplo de ello, la estimulación por alta frecuencia recluta inhibición dendrítica que se potencia y se vuelve más confiable a lo largo del tren, mientras que las interneuronas de inhibición perisomática son eficientemente reclutadas inicialmente y en los estímulos posteriores, la probabilidad de disparo baja significativamente (Liu et al., 2014). Aquel trabajo muestra que el procesamiento de información es diferente sobre las distintas INs, generando distintos tipos de inhibición sobre las CGs.

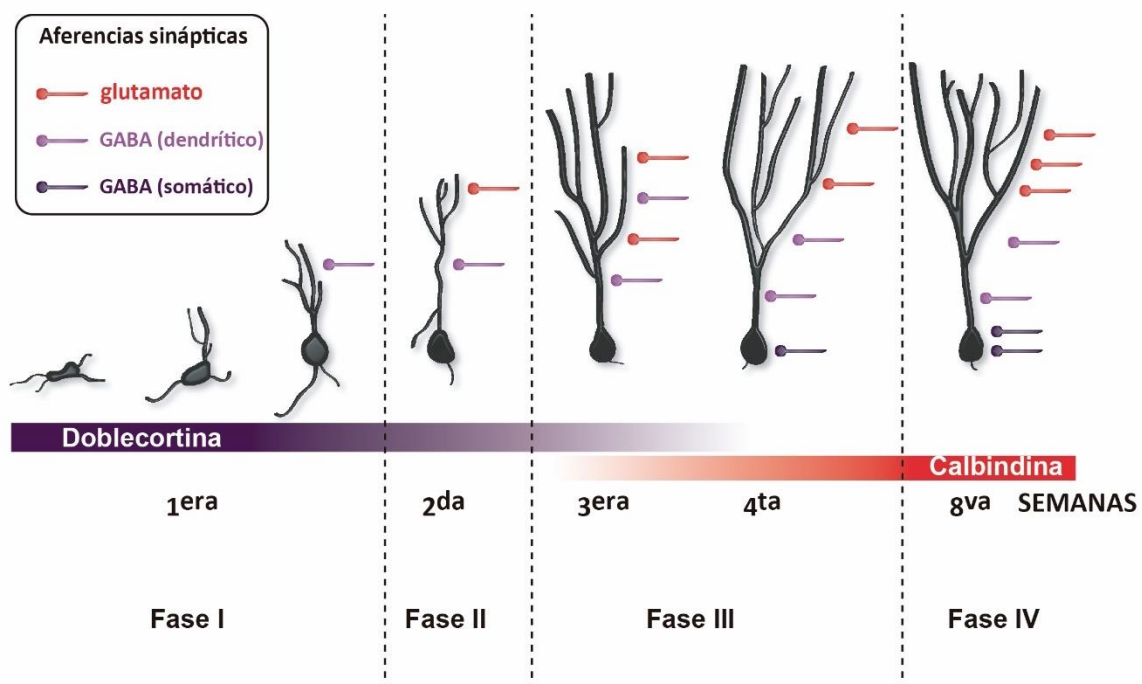


Figura i.6: Sinaptogénesis y desarrollo de CGs. Representación esquemática del desarrollo funcional de las CGs. Inicialmente las neuronas reciben aferencias GABAérgicas dendríticas. Con el desarrollo, adquieren contactos glutamatergicos generando un balance de alta excitación /inhibición. Por último, maduran los contactos perisomáticos GABAérgicos. Las barras muestran el gradiente de expresión de dos marcadores moleculares del desarrollo de CGs, Doblecortina, Calbindina. Figura modificada de Espósito et al., 2005.

Herramientas de marcación por virus de la rabia *in vitro*, han permitido detectar las principales identidades neuronales de las interneuronas que participan en la integración de las CGs (Deshpande et al., 2013; Vivar et al., 2012). Además, se ha logrado caracterizar la fisiología de cada tipo de inhibición (Liu et al., 2014; Marín-

Burgin et al., 2012; Pardi et al., 2015). Sin embargo, aún queda pendiente determinar la identidad de las interneuronas que proveen las distintas funciones en el circuito.

I.8.3 Principales aferencias de las CGs nuevas

Los axones de las CGs (“mossy fibers”) crecen de forma transversal a la estructura hipocampal. Sus terminales sinápticos están especializados, detectándose tres estructuras que contactan de forma especializada distintas identidades neuronales: 1) Terminales mossy gigantes cuyo principal blanco son las células mossy como se vio anteriormente y células principales de CA3; 2) extensiones filopodiales, cuyo principal blanco son INs de CA3, y 3) varicosidades pequeñas de tipo “en passant” que contactan principalmente INs locales del hilus. Este desarrollo ha sido descrito tanto para CGs nacidas durante el desarrollo perinatal como durante la neurogénesis adulta (Acsády et al., 1998; Faulkner et al., 2008; Restivo et al., 2015; Toni et al., 2008). Durante la neurogénesis adulta, la extensión de los axones de CGs alcanza su mayor longitud a las 3-4 semanas, momento en que llega a CA3a (la región más distal respecto al giro dentado). Por otra parte, la maduración de los terminales sinápticos de tipo 3 se alcanza recién a las 8 semanas, coincidente con la maduración detectada para las aferencias. Cabe destacar que a las 4 semanas se observa un incremento de extensiones filopodiales y varicosidades pequeñas que contactan la región de CA3, mientras que estos contactos no aumentan en la región del hilus. Esto fue confirmado a nivel funcional, en donde se observó que efectivamente la inhibición que reciben las CGs de 4 semanas por feedback es mucho menor que la inhibición feedforward que generan sobre CA3 (Temprana et al., 2015). A partir de estos resultados se puede concluir que los terminales sinápticos de CGs reclutan inicialmente blancos postsinápticos localizados en CA3 durante el desarrollo. Al igual que para el desarrollo de las aferencias, las principales identidades de las células blanco que las CGs contactan quedan por ser dilucidadas. Esto es sumamente relevante, teniendo en cuenta que se han descrito funciones específicas para cada grupo de INs que participan en procesos cognitivos así como en la formación de memorias en la estructura hipocampal (Gupta et al., 2000, Deng et al., 2019, Abbas et al., 2018).

I.8.4 Evidencia de neurogénesis adulta en el hipocampo humano

La existencia de neurogénesis adulta en humanos ha sido reportada en varios trabajos utilizando diversas técnicas para su detección. En 1998, en un trabajo realizado en pacientes que recibieron infusiones de un análogo de timidina, bromodesoxiuridina (BrdU) para detectar estadios tumorales, se elaboró un análisis con marcadores neuronales (NeuN, calbindina o enolasa específica neuronal (NSE) demostrando que algunas de las neuronas detectadas por estos marcadores, expresaban también BrdU. Detectar neuronas BrdU-positivas indica la presencia de neuronas generadas a partir de progenitores celulares que se encontraban en división en el momento en el que se aplicó BrdU, ya que el mismo presenta un tiempo de vida medio reducido (Bauer and Patterson, 2005). A partir de este trabajo se comprueba que el hipocampo humano retiene la habilidad de generar neuronas durante toda la vida (Eriksson et al., 1998).

Mediante otra técnica de marcación se ha obtenido además información acerca de la dinámica de la neurogénesis y la estabilidad de las neuronas nuevas. Esto fue posible, aprovechando los altos niveles de carbono radiactivo (C^{14}) atmosférico generado durante la guerra fría (De Vries, 1958; Nydal and Lövseth, 1965). El carbono atmosférico reacciona con oxígeno formando $C^{14}O_2$ que se incorpora a la cadena alimenticia a través de la fotosíntesis. Así, cuando los progenitores se dividen, integran C^{14} al genoma con una concentración equivalente a la de la atmósfera en ese momento. Esto permite medir y estimar la edad de las neuronas de forma retrospectiva a partir de la curva de decaimiento para el isótopo radiactivo (Bergmann et al., 2015, Spalding et al., 2013). Este estudio es otra prueba de la presencia de neurogénesis adulta en humanos obtenida a partir de una técnica completamente independiente a la del reporte anterior. Esta técnica ha permitido cuantificar la incorporación de alrededor de 700 neuronas por día en cada hemisferio y este número es comparable a la neurogénesis reportada en ratones.

Se han utilizado marcadores neuronales de estadios tempranos tales como Doblecortina (DCX) o ácido poliacílico y la molécula de adhesión que lo transporta NCAM (PSA-NCAM). Sin embargo, esta técnica puede presentar dificultades para detectar la expresión de marcadores dependiendo del estado del tejido *post mortem* utilizado. En los últimos años se han reportado resultados difíciles de comparar o reproducir. Un trabajo reciente, realizado con muestras de pacientes adultos con

epilepsia, no detectó la expresión de marcadores moleculares específicos para estadios neuronales tempranos, y por lo tanto no pudo corroborar la presencia de neuronas inmaduras en el hipocampo de humanos (Sorrells et al., 2018). Sin embargo, no se puede descartar la presencia de neurogénesis adulta que quizás no fue detectada con la metodología utilizada. De hecho, recientemente salió otro trabajo en donde utilizando muestras de pacientes que no presentaban enfermedades neurodegenerativas, se detectaron neuronas inmaduras en la región del giro dentado mientras que en pacientes con Alzheimer se observó una disminución sustancial de la misma (Moreno-Jiménez et al., 2019). Se puede concluir que si bien ha sido complejo y es aún un reto trabajar y reproducir resultados en tejido *post mortem*, al día de hoy existe una base sólida de trabajos que demuestran mediante variadas técnicas la presencia de neurogénesis adulta en humanos.

I.9 Regulación del circuito

El giro dentado del hipocampo presenta circuitos que están en constante remodelado debido al proceso de neurogénesis adulta que genera una continua integración de neuronas nuevas. Por otra parte, factores externos son capaces generar cambios en la neurogénesis adulta, principalmente aumentando o disminuyendo la tasa de proliferación o supervivencia de las CGs nuevas (Abrous et al., 2005; Gould et al., 1999; Parent and Lowenstein, 2002; van Praag et al., 1999; Zhao et al., 2008). El ejercicio físico incrementa la proliferación de progenitores neurales, llevando a un aumento de la neurogénesis (van Praag et al., 1999). Además, ratones que habitan en jaulas más grandes con “enriquecimiento” que estimula la exploración muestran una potenciación de la neurogénesis. En este caso si bien el resultado obtenido es similar al del ejercicio físico, la potenciación se debe a un aumento en la tasa de supervivencia de las neuronas nuevas generadas (Kempermann et al., 1997). Los estímulos externos pueden generar modificaciones a nivel del remodelado de circuito, afectando el proceso de neurogénesis adulta. En el trabajo de Piatti et al., 2011, se ha demostrado que la actividad intrínseca determina la dinámica temporal de la maduración neuronal durante el proceso de neurogénesis, en donde factores externos como el ejercicio físico (correr) potencian la actividad neuronal acelerando la maduración en las zonas menos activas (región temporal del giro dentado). Por otra parte, la exposición aguda a un ambiente enriquecido en un estadio temprano

correspondiente a la fase I de desarrollo de CGs, acelera su integración, y este proceso está mediado por la actividad de las PV-INs (Alvarez et al., 2016). Estos resultados muestran que el giro dentado del hipocampo es un lugar con intenso remodelado, producto de la neurogénesis adulta y su regulación por estímulos comportamentales en los que están involucrados no solo las CGs nuevas sino también PV-INs y probablemente otros tipos neuronales aun no identificados.

I.10 Objetivos e hipótesis

El **objetivo general** de este trabajo consiste en comprender los detalles del proceso de integración funcional de las CGs nuevas nacidas en el hipocampo adulto y su participación en el procesamiento de información de la red hipocampal.

El **objetivo específico** del proyecto de tesis consiste en identificar los microcircuitos inhibitorios locales, trazando un mapa temporal de la conectividad, para luego estudiar los mecanismos que controlan el desarrollo de la conectividad aferente y eferente de las CGs nuevas.

- Para ello se estudiará la integración de CGs y dos poblaciones principales de INs del giro dentado: PV- y SOM-INs
- Se estudiará cómo impacta el desarrollo sináptico en la fisiología de las CGs a nivel de sus aferencias, eferencias e integración en el circuito.

La hipótesis que se propuso a partir de los antecedentes introducidos previamente fue que **el desarrollo de las CGs nuevas está acompañado por cambios en las sinapsis que dependen de la identidad del circuito inhibitorio que participa**. En este sentido, la inhibición perisomática que controla el disparo de las CGs seguramente aparece al final del período crítico de alta excitabilidad.

En particular, se estudiarán las **aferencias** formadas por:

PV-INs → CGs

SOM-INs → CGs

y las **eferencias**:

CGs → PV-INs

CGs → SOM-INs

El estudio de los circuitos inhibitorios específicos nos permitirá conocer la función de cada población de INs en el desarrollo e integración de las CGs, procesos relevantes para entender el procesamiento de información de las CGs nuevas que se adicionan a diario en el giro dentado del hipocampo.

Métodos

M.1 Modelo animal y líneas modificadas genéticamente

Todos los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Cuidado y Uso de Animales del instituto Leloir de acuerdo a los Principios de Investigación Biomédica involucrando animales del Consejo para Organizaciones Internacionales de Ciencias Médicas y recomendaciones estipuladas en la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio.

Se trabajó con ratones genéticamente modificados $Pvalb^{tm1(cre)Arbr}$ (Hippenmeyer et al., 2005), $Sst^{tm2.1(cre)Zjh/J}$ (Taniguchi et al., 2011) y $CAG^{floXstop-tdTomato}$ (Ai14) (B6;129S6- $Gt(ROSA)26Sor^{tm14(CAG-tdTomato)Hze/J}$) como reportero condicional (Madisen et al., 2010), fueron cruzados para generar ratones PV^{Cre} ; $CAG^{FloXStop-tdTomato}$ y ratones SOM^{Cre} ; $CAG^{floXstop-tdTomato}$ con el objetivo de marcar las interneuronas GABAérgicas PV- y SOM-IN respectivamente. Ratones $Pvalb^{tm1(cre)Arbr}$ y $Sst^{tm2.1(cre)Zjh/J}$ fueron también cruzados con ratones de la línea $CAG^{floXstopChR2-EYFP}$ (Ai32) ($Gt(ROSA)26Sor^{tm32(CAGCOP4*H134R/EYFP)Hze/J}$) de laboratorios Jackson, para generar ratones PV^{Cre} ; $CAG^{floXstopChR2-EYFP}$ y SOM^{Cre} ; $CAG^{floXstopChR2-EYFP}$. Todos los ratones se mantuvieron en el soporte genético de la cepa C57Bl/6J. En estas líneas la recombinación se produce desde el desarrollo embrionario y en cualquier momento de la vida que las células expresen PV o SOM.

M.2 Detalles experimentales

M.2.1 Mantención de animales e inyección de partículas retrovirales

Ratones genéticamente modificados de ambos sexos fueron mantenidos en jaulas de 2-4 animales. Se agregó una rueda cada dos ratones dos días antes de la cirugía (realizada a las 6-7 semanas de edad) y la misma se mantuvo hasta el día de la preparación de rodajas. Esto permitió el ejercicio voluntario, generando un aumento en la tasa de proliferación neuronal y por consiguiente un aumento en el número de neuronas transducidas por la inyección retroviral (van Praag et al., 1999). Para la cirugía, los ratones se anestesiaron (150 μ g ketamina/15 μ g xylazina en 10 μ l solución salina/g), y el virus (1 – 1.2 μ l a 0.15 μ l/min) se inyectó en el área dorsal del giro dentado derecho. Se utilizaron microcapilares estériles calibrados y alargados utilizando un estirador vertical. Se utilizaron las referencias estereotáxicas

correspondientes al hipocampo septal (coordenadas desde bregma: -2 mm anteroposterior, -1.5 mm lateral, -1.9 mm ventral).

M.2.2 Vectores retrovirales

Se utilizó un vector retroviral con deficiencia replicativa, basado en el virus de la leucemia murina Moloney. El mismo fue utilizado para transducir específicamente CGs nacidas en el hipocampo adulto como se hizo previamente (Marín-Burgin et al., 2012; Piatti et al., 2011). Las partículas retrovirales se ensamblaron utilizando tres plásmidos separados conteniendo la cápside (CMV-vsrg), proteínas virales (CMV-gag/pol) y los transgenes: CAG-GFP, CAG-RFP o channelrhodopsin-2 (ChR2; Ubi-ChR2-EGFP gentilmente provisto por S. Ge, SUNY Stony Brook), que se utilizaron según se indica en resultados. Los plásmidos se transfectaron en células HEK 293T utilizando polyethylenimina deacilada. El sobrenadante que contiene las partículas retrovirales fue incubado 48hs luego de la transfección y concentrado por dos rondas de ultracentrifugación. El título viral fue típicamente de $\sim 10^5$ partículas/ μ l. Las partículas retrovirales (RV) fueron inyectadas en ratones PV^{Cre};CAG^{floxstop}ChR2-EYFP o SOM^{Cre}; CAG^{floxstop}ChR2-EYFP para obtener CGs que expresen GFP/RFP, y PV- o SOM- INs expresando ChR2 (PV- o SOM-ChR2). De forma inversa, RV Ubi-ChR2-EGFP se inyectó en ratones PV^{Cre};CAG^{floxstop}-tdTomato o SOM^{Cre};CAG^{floxstop}-tdTomato con el objetivo de obtener CGs con expresión de ChR2 (CG-ChR2) y PV- o SOM-INs con expresión de tdTomato (PV- o SOM-Tom).

M.3 Electrofisiología

M.3.1 Preparación de tejido ex vivo: rebanadas agudas de cerebro

Los ratones se anestesiaron y decapitaron a distintas semanas post inyección. Se prepararon rodajas agudas de cerebro a partir de cortes transversales como se describió previamente (Marín-Burgin et al., 2012). Los cerebros se removieron y se introdujeron en una solución de disección enfriada conteniendo en (mM): 110 colina-Cl⁻, 2.5 KCl, 2.0 NaH₂PO₄, 25 NaHCO₃, 0.5 CaCl₂, 7 MgCl₂, 20 glucosa, 1.3 Na⁺-ascorbato, 0.6 Na⁺-piruvato y 4 ácido kynurénico. Allí se disectó el hipocampo y consecuentemente, se cortaron en un vibrátomo (Leica VT1200 S, Nussloch, Germany) rodajas transversales del polo septal de 400 μ m de espesor y se transfirieron a una cámara conteniendo fluido artificial cerebroespinal (ACSF; en mM):

125 NaCl, 2.5 KCl, 2 NaH₂PO₄, 25 NaHCO₃, 2 CaCl₂, 1.3 MgCl₂, 1.3 Na⁺-ascorbato, 3.1 Na⁺-piruvato, y 10 glucosa (315 mOsm). Las rodajas fueron burbujeadas con 95% O₂/5% CO₂ y mantenidas a 30°C por al menos 45 minutos previo al comienzo de los experimentos.

M.3.2 Registros electrofisiológicos

Registros de *whole-cell* y *cell-attached* se elaboraron a temperatura ambiente (23 ± 2 °C) utilizando microelectrodos (4-6 MΩ para CGs y 3-5 MΩ para INs). Los mismos fueron llenadas con solución interna. Todas las soluciones internas contienen en común (en mM): 0.1 EGTA, 10 HEPES, 4 ATP-tris y 10 fosfocreatina, a un pH 7.3 y 290 mOsm. Para registrar INs o CGs-ChR2, se utilizó una solución interna con los siguientes compuestos adicionales (mM): 150 K-gluconato, 1 NaCl y 4 MgCl₂. Para las mediciones de IPSCs en CGs-RFP/GFP, las pipetas de registros fueron llenadas con (en mM): 110 K-gluconato, 5 NaCl, 30 KCl and 4 MgCl₂. Los registros de campo se obtuvieron utilizando pipetas de registro (2-4 MΩ) llenadas con 3 M NaCl. Todos los registros fueron obtenidos utilizando amplificadores Axopatch 200B (Molecular Devices, Sunnyvale, CA), filtrados (filtro pasabajos: 2 – 10 KHz), digitalizados (Digidata 1322A, Molecular Devices) y adquiridos a 10-20 KHz en una computadora mediante el software pClamp 9 (Molecular Devices).

Los registros de *whole-cell* en configuración *voltage-clamp* fueron realizados fijando el potencial de membrana (V_h) a -70 mV, con excepción de los experimentos en donde se estudió el potencial de reversión de las corrientes GABAérgicas sobre CGs y las componentes GABAérgicas provenientes de SOM-INs (Figuras r.12,r.13,r.15,r.16). Para las CGs, las resistencias en serie fue típicamente 10-20 MΩ y los experimentos fueron descartados si fue mayor a 25 MΩ. Para las INs, la resistencia en serie fue de 5–10 MΩ y los experimentos se descartaron si era mayor a 15 MΩ.

M.3.2.1 Registros postsinápticos

Las CGs nacidas en adultez que fueron marcadas mediante inyección de RV (RFP o ChR2) fueron divididas en los siguientes grupos etarios: 13-14 dpi (días post inyección) (2 semanas), 20-22 dpi (3 semanas), 27-30 dpi (4 semanas), 40-44 dpi (6 semanas), 54-60 dpi (8 semanas) y 75-77 dpi (11 semanas). En trabajo previo de

nuestro laboratorio se compararon CGm nacidas en el día 15 de estadio embrionario (E15), con CGs nacidas en ratones de 7 días (P7) (ambas se localizan en el tercio más externo de la GCL) y CGs nacidas en animales adultos. No se han reportado diferencias entre dichos grupos cuando las CGs alcanzan la madurez (Laplagne et al., 2006). Por ello, en este trabajo, neuronas sin marca localizadas específicamente en el tercio externo de la capa granular fueron seleccionadas como control de CGs nuevas en el estadio maduro (CGm). Las neuronas registradas fueron identificadas visualmente en la capa de células granulares por fluorescencia (FITC óptica fluorescente; DMLFS, Leica) y/ o video microscopía DIC infrarroja. Los criterios para incluir células en el análisis fueron la confirmación visual de proteína fluorescente y/o video microscopía DIC infrarroja, (RFP, Tom, GFP o EYFP) en la punta de la pipeta y el soma adjuntado a la misma, luego de la toma del registro y una vez aplicada presión negativa para realizar la validación. Además, la corriente de fuga para registros de *voltage-clamp* debió ser <100pA para CGs y <250pA para INs. Este límite es menor para CGs debido a que al presentar una mayor resistencia de entrada (R_{input}), una corriente de fuga producirá un error mayor en el potencial de membrana fijado de acuerdo con la ley de Ohm. Teniendo en cuenta que las INs se encuentran distribuidas diferencialmente a través de áreas del DG distintivas, hemos intentado mantener esta proporción en el número de INs registradas en cada región para CGs e INs, respectivamente (Figuras r.5,r.8). Los registros que se muestran en las figuras r.8,r.26 y r.27 fueron obtenidos a partir de SOM-Tom localizadas en el hilus o GCL.

M.3.2.2 Registros de campo

La estimulación de la vía media perforante (mPP) fue realizada a partir de ubicar un electrodo monopolar de acero en la región media de la capa molecular y pulsos de corriente en el rango de 10 a 150 μ A (0.2 ms) fueron aplicados a 0.07 Hz. El microelectrodo de registro fue ubicado en la GCL para registrar el cambio de potencial eléctrico poblacional (*pop-spike*) en respuesta a la estimulación de mPP (Marín-Burgin et al., 2012). Se calibró la intensidad del estímulo eléctrico de forma tal de evocar el 30 – 55 % de la amplitud *pop-spike* máxima y evitar la saturación de la respuesta para poder evaluar el efecto inhibitorio de las INs que contactan las CGs. La actividad poblacional fue registrada en abundantes y repetidos ensayos hasta que se obtuviera una amplitud del *pop-spike* estable. En ese momento, un pulso láser (0.2

ms) fue pareado a la estimulación mPP en diferentes tiempos (como fue indicado), alternando 5 ensayos consecutivos de láser presente con 5 ensayos ausente.

M.3.3 Optogenética

Registros de *patch-clamp* fueron realizados en CGs o en INs a partir de rodajas de hipocampo que contenían abundantes INs o CGs expresando ChR2 (PV-ChR2, SOM-ChR2 o CG-ChR2). Estas últimas fueron visualizadas por su expresión de EGFP como fue descrito previamente (Toni et al., 2008). Las neuronas expresando ChR2 fueron estimuladas usando una fuente láser de 447 nm que fue enviada a través del recorrido de epifluorescencia en el microscopio (filtro FITC, objetivo 63X para registros de célula única y 20X para registros de campo) comandados por el software de adquisición. Los pulsos de láser (1 ms sobre CGs-ChR2 y 0.2ms sobre INs-ChR2) fueron enviados con una frecuencia de 0.7 Hz mientras que las corrientes postsinápticas fueron registradas en la configuración de voltage-clamp. Se utilizó una potencia de láser que genere la máxima respuesta postsináptica. Esta potencia fue de alrededor de 100-130 mW (~80% de la potencia máxima del láser utilizado). En el caso de los registros de campo un 10% de la potencia máxima del láser fue suficiente para generar el máximo de inhibición de la actividad global de la GCL. Las corrientes postsinápticas excitatorias (EPSCs) registradas en INs fueron aisladas llevando el potencial de membrana al potencial de reversión de la corriente GABAérgica ($V_h = -70$ mV). Cuando analizamos las espigas evocadas en INs luego de estimular CG-ChR2 o activar la vía aferente, se partió de un potencial de membrana de -60mV. Para estudiar IPSCs unitarios a partir de la estimulación de INs-ChR2, se reguló la intensidad de láser para alcanzar una condición donde las CGs mostraron fallas en al menos 10% de los ensayos y pequeños IPSCs unitarios. Las corrientes glutamatérgicas fueron bloqueadas por ácido kynurénico (KYN) 4 mM y las corrientes GABAérgicas fueron bloqueadas por picrotoxina (PTX) 100 μ m.

M.3.4 Potencial de reversión de corrientes GABAérgicas sobre CGs

La estimulación en la capa molecular externa (OML) fue realizada colocando un electrodo monopolar de acero en el tercio exterior de la capa molecular, manteniendo una distancia mínima de 300 μ m respecto al sitio de registro de forma tal de evitar la estimulación directa de las CGs. Se aplicaron pulsos de corriente de una intensidad

que abarcó desde 40 a 100 μA (0.2 ms) en pulsos aplicados a 0.05 Hz para reclutar corriente GABAérgica de origen dendrítico. Además, se registraron IPSCs evocados sobre CGs en respuesta a la estimulación optogenética de INs-ChR2. Este estudio fue realizado en presencia de KYN para bloquear las aferencias excitatorias provenientes de la OML que se puedan reclutar con la estimulación eléctrica.

M.4 Ensayos in vivo. Exposición a ambiente enriquecido (AE)

Tras dos semanas a partir de la infusión del RV, los ratones fueron expuestos a dos semanas de AE que consistió en una jaula grande (80 cm x 40 cm x 20 cm) con túneles de distinto largo, juguetes coloridos y dos ruedas para correr. La ubicación de los objetos durante el AE fue cambiada tras la primera semana de exposición. Los ratones control fueron conservados en jaulas regulares con dos ruedas de correr (consistente con nuestros experimentos). Los animales fueron preparados para registros electrofisiológicos 4 semanas después a la infusión del RV.

M.5 Inmunofluorescencia

La tinción inmunológica se hizo en secciones coronales libre-flotantes de 60 μm abarcando todo el cerebro a partir de las seis semanas de edad en ratones PV^{Cre} y $\text{SOM}^{\text{Cre}}; \text{CAG}^{\text{floxedstopChR2-EYFP}}$. Se aplicaron anticuerpos disueltos en TBS con 3% de suero de burro y 0.25% de Tritón X-100. La triple marca de inmunofluorescencia fue hecha usando los siguientes anticuerpos primarios: GFP (policlonal de pollo 1:500, Aves Labs Inc.), PV (monoclonal de ratón, 1:3000, Swant) y SOM (monoclonal de rata 1:250, Millipore). Los siguientes anticuerpos secundarios fueron utilizados: burro anti-pollo Cy2, burro anti-ratón Cy5 y burro anti-rata Cy3 (1:250; Jackson ImmunoResearch Laboratories). Se realizó una incubación con DAPI (10 minutos) a fines de evitar el blanqueo fluorescente durante la caracterización de las rodajas.

M.6 Microscopía Confocal

Secciones del hipocampo (antero-posterior, -0.94 a -3.4 mm del bregma) de acuerdo al atlas cerebral de ratón (Paxinos and Franklin, 2004) fueron incluidas. Se adquirieron imágenes usando un microscopio Zeiss LSM 510 Meta (Carl Zeiss, Jena, Alemania). El análisis de expresión de anticuerpo fue restringido a células con fluorescencia en niveles de intensidad que permitieron la clara identificación de sus somas. Las

imágenes fueron adquiridas (40X, NA 1.3, oil-immersion) y se evaluó la colocalización de los tres marcadores en z-stacks usando múltiples planos por cada célula. La colocalización se definió como positiva si todos los marcadores fueron encontrados en el mismo plano focal.

M.7 Cuantificación y análisis estadístico

M.7.1 Análisis de Datos

El análisis de los registros fue realizado aparte usando rutinas desarrolladas en Matlab y en algunos casos también se utilizó el software Clampfit.

M.7.1.1 Propiedades Intrínsecas

La capacitancia de la membrana y el R_{input} se obtuvieron a partir de trazos de corriente evocadas por un escalón hiperpolarizante (10 mV, 100 ms). Por otra parte, el perfil de disparo fue registrado en la configuración de *current-clamp* (el potencial de membrana se llevó a -70 mV inyectando corriente de sostén) y el valor umbral de corriente para los picos fue evaluado usando escalones sucesivos de corriente despolarizante (escalones de 10 pA para CGs y 50 pA para INs; 500 ms) para conducir el potencial de membrana (V_m) de reposo a 0 mV.

El umbral del potencial de acción se definió como el punto en que la derivada del potencial de membrana dV_m/dt fue de aproximadamente 5 mV/ms. La amplitud del potencial de acción (PA) se midió desde el umbral hasta el pico positivo; y la amplitud tras la hiperpolarización, desde el umbral hasta el pico negativo durante la repolarización. El tiempo entre picos consecutivos (intervalo inter-espiga, ISI) se midió de pico a pico. La frecuencia instantánea fue calculada a partir de ISI; y la tasa de adaptación fue definida como la tasa de ISI entre los picos tercero y último. Para la caracterización completa de picos, se midió la intensidad de la corriente umbral y la intensidad del estímulo tres veces mayor que el umbral se usó para evaluar todos los parámetros.

M.7.1.2 Corrientes postsinápticas

Se utilizaron métodos estadísticos para diferenciar las células con respuesta a láser y los eventos evocados por láser de la actividad espontánea usando rutinas de

Matlab. Los eventos fueron identificados como picos en la corriente que pasó por el filtro pasa-bajos (<250 Hz) cuando excedieron 4 desvíos estándar del nivel del ruido (medido en corriente que pasó por filtro pasa-alto >500 Hz). El comienzo de un evento se definió como el tiempo en alcanzar el 10% de la amplitud máxima en la señal sin filtrar. Una vez que todos los eventos fueron identificados, una célula fue clasificada con respuesta a la estimulación por láser si presentó una tendencia mayor que el azar para que se acumularan eventos dentro de una ventana temporal de 12 ms tras la estimulación con láser. Con el fin de obtener dicha clasificación, la probabilidad de distribución de una acumulación similar de eventos espontáneos ocurriendo sólo por azar fue determinada usando un procedimiento de mezclado de 2000 escalones. Una vez que una célula fue clasificada como respondedora al láser, los eventos evocados fueron distinguidos de los espontáneos.

En todos los casos, los valores de PSCs reportados para la amplitud máxima corresponden al producto entre el valor medio de los ensayos positivos y la probabilidad de éxito, definida como la fracción de ensayos en los que una respuesta evocada fue observada. El tiempo de subida se calculó desde el 20% de la amplitud pico a 80% en EPSC o 70% en IPSC y el tiempo de decaimiento se calculó desde 80% (EPSC) o 70% (IPSC) hasta 30%.

M.7.1.3 Respuesta a la estimulación repetitiva

La carga de eventos evocados por láser durante la estimulación repetitiva fue medida dentro de una ventana temporal igual a la distancia entre dos pulsos consecutivos de láser, comenzando desde el pulso correspondiente. Para analizar la plasticidad de corto término, se calculó el cociente de carga durante la estimulación repetitiva. Para realizar esta normalización, se usó la respuesta evocada por el primer pulso para INs sobre sinapsis de CGs y la carga relacionada con el último pulso para CGs sobre sinapsis de INs.

M.7.2 Análisis Estadístico

Salvo que se especifique de otro modo, los datos son presentados como media \pm error estándar. La normalidad se evaluó usando test de Shapiro-Wilk, test de D'Agostino & Pearson y test de Kolmogorov-Smirnov; a niveles de significancia de p valor < 0.05. Una distribución se consideró normal si todos los tests fueron pasados.

Cuando un set de datos no satisfizo los criterios de normalidad, se aplicó estadística no paramétrica. El test a dos colas de Mann-Whitney se usó para las comparaciones individuales y el test de dos colas de Wilcoxon en datos pareados. El test de Kruskal-Wallis para rangos fue utilizado para comparar múltiples grupos independientes y el test de Friedman seguido del test post-hoc de Dunn fue usado para comparar múltiples grupos emparejados. Para las distribuciones normales se evaluó la homocedasticidad usando test de Bartlett y F-test. Para varianzas homogéneas, el test de t a dos colas se usó en comparaciones individuales, y el test ANOVA seguido por el test post-hoc de Bonferroni fue usado en comparaciones múltiples. El test de Kolmogorov-Smirnov entre dos muestras fue aplicado para comparar las distribuciones acumulativas. El test exacto de Fisher a dos colas (pequeño tamaño muestral) o el test de Chi-cuadrado fueron usados en los análisis de las tablas de contingencia.

Resultados

R.1 Mapeo de la integración de neuronas nuevas en el hipocampo adulto

Las CGs tienen la capacidad de integrarse al circuito preexistente de manera estable y, durante su desarrollo, se caracterizan por su elevada excitabilidad, debido a que reciben conexiones débiles por parte de las interneuronas inhibitorias (Marín-Burgin et al., 2012; Pardi et al., 2015; Temprana et al., 2015). Cuando las neuronas nuevas alcanzan el estadio maduro, el balance excitación/inhibición se invierte, siendo la inhibición responsable de la baja actividad del giro dentado. Estudios previos muestran que las CGs nuevas tienen un papel protagónico en la codificación de estímulos novedosos (Clelland et al., 2009; Kropff et al., 2015; Nakashiba et al., 2012; Sahay et al., 2011). Sin embargo, se conoce muy poco acerca de la transición de las neuronas nuevas hacia un estadio maduro a nivel fisiológico y su relevancia en el procesamiento de información. Existen varias poblaciones de interneuronas que podrían estar involucradas en la integración de las CGs nuevas en el hipocampo adulto. En la figura r.1, se muestran los principales circuitos inhibitorios FFI y FBI que regulan la actividad de la capa granular. Se desconoce cuáles son los grupos de INs que participan en estos circuitos y su relevancia en el control de la actividad neuronal. En este trabajo, nos propusimos identificar las poblaciones de INs que participan en la integración de las CGs nuevas y realizar un seguimiento detallado de su desarrollo en las redes inhibitorias locales. Para ello, se realizó un estudio enfocado en la fisiología de la sinaptogénesis que puede dividirse en tres partes:

- **Estudio de la integración sináptica aferente**
- **Estudio de la integración sináptica eferente**
- **Integración en la fisiología del circuito**

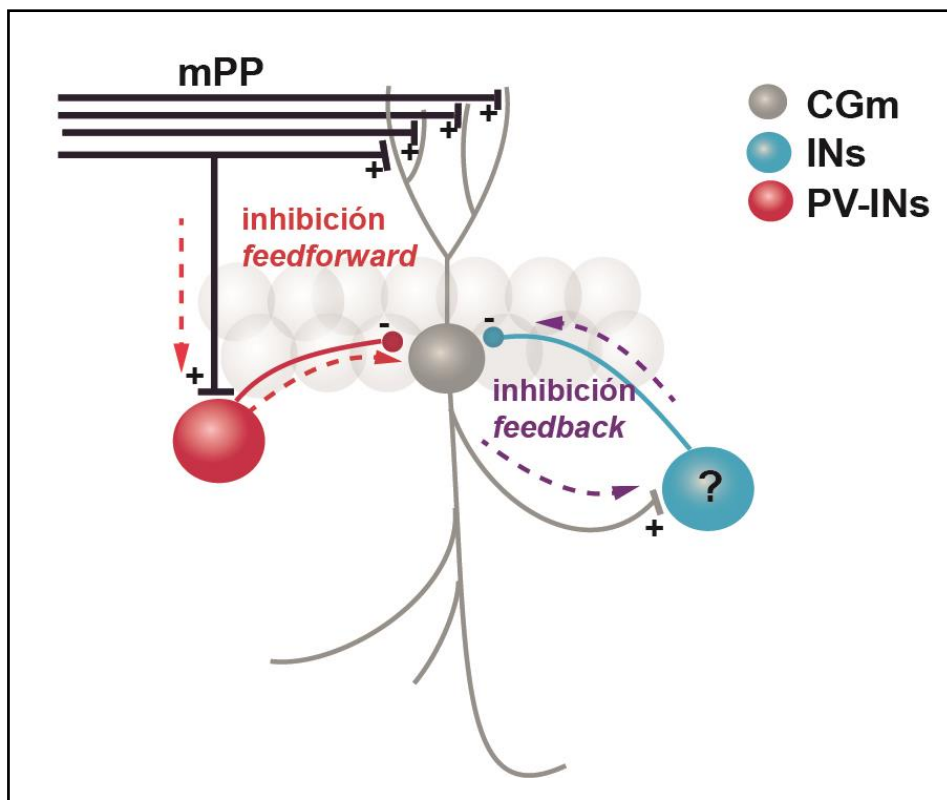


Figura r.1. Fisiología del circuito del giro dentado. Axones de la vía media perforante (mPP) contactan a las CGm (gris) e interneuronas PV (rojo) que a su vez generan inhibición de tipo *feedforward* (FFI, flechas rojas) sobre la capa granular. Asimismo, las CGm son capaces de contactar otras INs cuyas identidades aún no se han identificado (celeste), que a su vez pueden inhibirlas formando el circuito *feedback* (FBI, flechas violetas).

R.2 Estudio de la integración sináptica aferente

R.2.1 Estrategia experimental

En esta primera etapa, estudiaremos las aferencias provenientes de dos grupos de interneuronas principales (Sección I.4.2). Nos enfocaremos en el desarrollo sináptico, que acompaña al desarrollo morfológico de las CGs nuevas ya descrito por Espósito et al., 2005. Para abordar este estudio se podrían realizar registros de electrofisiología pareados, con el objetivo de estudiar la fisiología de una única sinapsis. Sin embargo se ha descrito que el éxito en encontrar el par conectado es sumamente bajo (Espinoza et al., 2018). En el presente trabajo, utilizamos optogenética para controlar la actividad de las neuronas mediante estimulación por láser. Para ello expresamos en las interneuronas ChR2, canal catiónico inespecífico acoplado a una opsina que

cambia su conformación y se abre frente a la activación por luz (488 nm) en el orden de μ s. Este cambio produce una despolarización rápida y por consiguiente una espiga en neuronas que expresen dicha opsina (Boyden et al., 2005; Zemelman et al., 2002). Esta técnica resultó ser muy poderosa y específica al combinarla con la herramienta genética que utiliza la recombinasa Cre constitutiva bajo un promotor neuronal específico para cada interneurona en este caso PV^{Cre} y SOM^{Cre} (Madisen et al., 2012). Se realizaron cruces con líneas de ratones que portan la secuencia de ChR2 fusionada al reportero *Enhanced Yellow Fluorescent Protein* (EYFP), con un sitio *stop* flanqueado por sitios *loxP* (CAG^{flxstop}ChR2-EYFP). De esta forma, obtuvimos dos grupos de INs según la expresión específica de las moléculas PV y SOM, activables por luz de forma tal de estudiar las aferencias de CGs a nivel poblacional y específica a cada población de interneuronas. En esta sección, se describen las sinapsis formadas por aferencias inhibitorias INs→CGs nuevas, en donde la variable es la edad de la CG postsináptica, que permite medir el curso temporal de la sinaptogénesis aferente (Sección R.2.3).

R.2.2 Caracterización de PV-INs y SOM-INs

Con el fin de validar el sistema de marcación de interneuronas (sistema Cre loxp descrito) para PV- y SOM-INs y controlar la especificidad de esta herramienta, se realizó un estudio de colocalización de cada grupo de interneuronas marcadas con su reportero fluorescente CAG^{flxstop}-tdTomato o CAG^{flxstop}ChR2-EYFP. Para completar la validación de los modelos genéticos que se usaron, se realizó una caracterización completa de ambos grupos de interneuronas evaluando sus propiedades biofísicas y la distribución anatómica de sus somas y procesos.

R.2.2.1 Análisis de la localización de PV-INs en el giro dentado

Ratones PV^{Cre} fueron cruzados con reporteros CAG^{flxstop}ChR2-EYFP (Ai32) (Hippenmeyer et al., 2005; Madisen et al., 2012; Taniguchi et al., 2011). Se utilizaron ratones jóvenes adultos PV^{Cre};CAG^{flxstop}ChR2-EYFP. Se obtuvieron secciones hipocampales de 60 μ m de espesor obtenidas de ratones de 6 semanas de edad, a partir de las cuales se realizó una triple inmunotinción con anticuerpo anti-GFP (para EYFP) seguido de un anticuerpo secundario para revelar la señal de las neuronas

marcadas y el anticuerpo correspondiente anti-PV y anti-SOM para estudiar la colocalización con las mismas (Figura r.2). Se realizó este estudio con la finalidad de determinar si las poblaciones neuronales marcadas por el promotor de PV y el promotor de SOM son homogéneas, o si alguna de ellas expresa marcadores de otros tipos neuronales (expresión ectópica de alguno de los marcadores estudiados). Al mismo tiempo se determinó qué fracción de la población de PV- y SOM-INs adulta está representada en los modelos transgénicos. Esto es relevante ya que teniendo en cuenta que PV es una molécula involucrada en el buffer de calcio, su expresión en el tiempo podría ser dinámica y por lo tanto un ratón con marca indeleble de PV-INs desde el desarrollo podría no representar la población de PV-INs en el adulto.

El análisis muestra que más de un 90% de las interneuronas PV-EYFP colocaliza con PV. Por otra parte, no se encontró expresión de SOM en las PV-INs (Figura r.2).

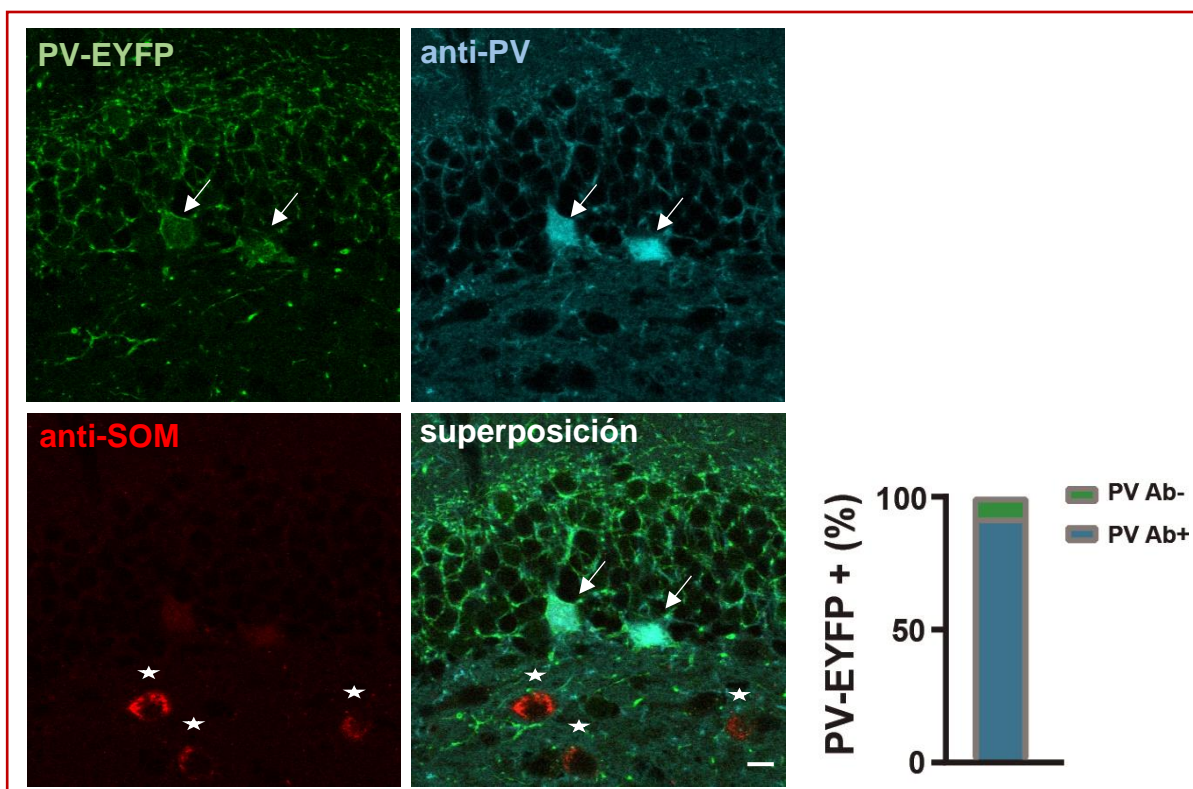


Figura r.2. Caracterización del ratón $PV^{Cre};CAG^{floxstop}ChR2-EYFP$. Izquierda: Imagen confocal de un único plano óptico correspondiente a las PV-INs (indicadas por flechas) expresando inmunofluorescencia para ChR2-EYFP (verde), PV (azul), SOM (rojo) y la superposición de los mismos. Escala, 10 μ m. Derecha: Proporción de neuronas PV-EYFP+ que son marcadas por anti-PV. n = 90 células, 3 ratones. Colocalización = 92%. No se encontró colocalización entre PV-EYFP y anti-SOM (n = 142 células).

Con el objetivo de analizar la distribución anatómica de las PV-INS en el giro dentado, analizamos la localización de sus somas y estudiamos en forma cualitativa la anatomía de sus procesos, asignándose la ubicación en capa molecular (ML), capa granular (GCL) y hilus. Se observó que la mayor proporción de somas se encuentra en la GCL y, en menor medida, en hilus y ML (Figura r.3).

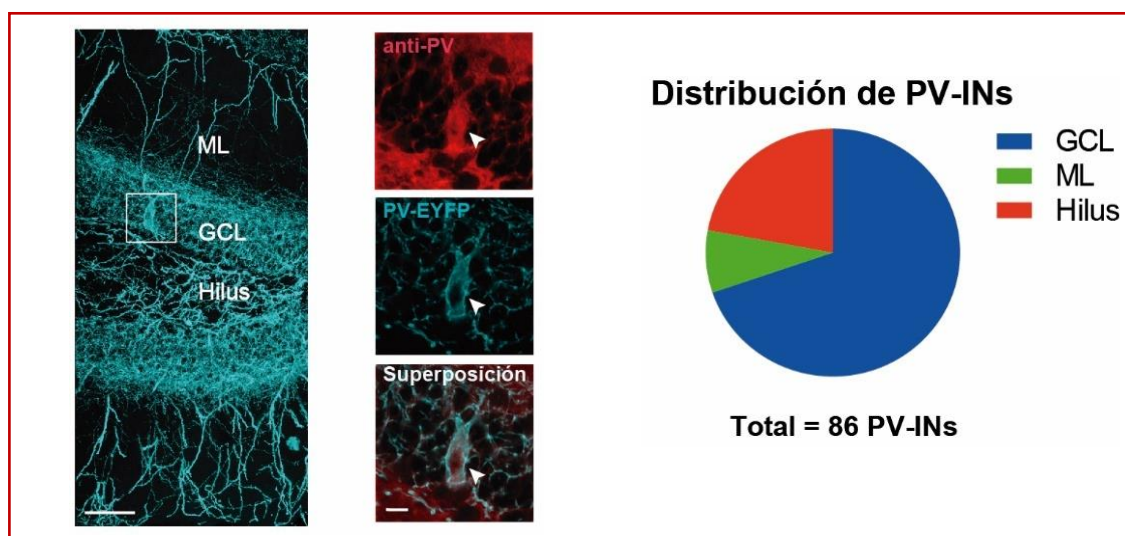


Figura r.3. Distribución de PV-INS. Izquierda: Imagen confocal de una sección hipocámpal de 60 µm de espesor muestra PV-INS en un ratón PV^{Cre};CAG^{floxstop}ChR2-EYFP (GCL: capa granular; ML: capa molecular). Escala, 50 µm. El inset muestra la expresión de PV y PV-ChR2-EYFP. La flecha señala la expresión de PV (rojo), PV-EYFP (azul) y la superposición (rojo+azul). Escala, 20 µm. Derecha: Distribución de los cuerpos celulares en las distintas áreas del giro dentado, n=86.

Se realizó un análisis cualitativo de los procesos (axón y dendritas) para este grupo de interneuronas. Las dendritas han sido descritas como las más gruesas de todas las clases de interneuronas de hasta 2.7 µm (The hippocampus book, 2006). En las figuras r.3 y r.4 se pueden ver procesos gruesos correspondientes a las dendritas que atraviesan la capa molecular, donde reciben aferencias provenientes de la mPP. La apariencia general del árbol dendrítico es de tipo “bitufted” con ramificaciones en su mayoría cerca del soma y algunas ramificaciones menos frecuentes en sus segmentos más distales (Freund and Buzsáki, 1996). Por otra parte, las dendritas que

se observan en el hilus son blanco principal de las CGs, como ya se ha reportado, lo que las hace candidatas a participar en FBI (Figura r.4 C,D) (Ribak et al., 1993).

Se ha reportado por otra parte, que los axones de PV-INs se distribuyen en la GCL y contactan principalmente a las CGs, mientras que en menor medida contactan a otras PV-INs (Freund and Buzsáki, 1996). En las figuras r.3 y r.4 se puede observar una alta densidad de procesos que alcanzan una densidad máxima en la capa molecular interna y tercio más externo de la GCL, cubriéndola por completo lo que permite incluso detectar la estructura completa de la GCL sin necesidad de utilizar marcadores moleculares (Figura r.4A-D). Esto es consistente con reportes previos que muestran la distribución de los axones de PV-INs en la misma región del DG (Booker and Vida, 2018; Ribak et al., 1993). Por último en la figura r.4, se pueden ver fotos representativas correspondientes al análisis de distribución de la figura r.3. Allí se muestra que la mayoría de los somas de PV-INs se distribuyen preferencialmente en la región más interna de la GCL y solo pocas excepciones se han encontrado en otras regiones.

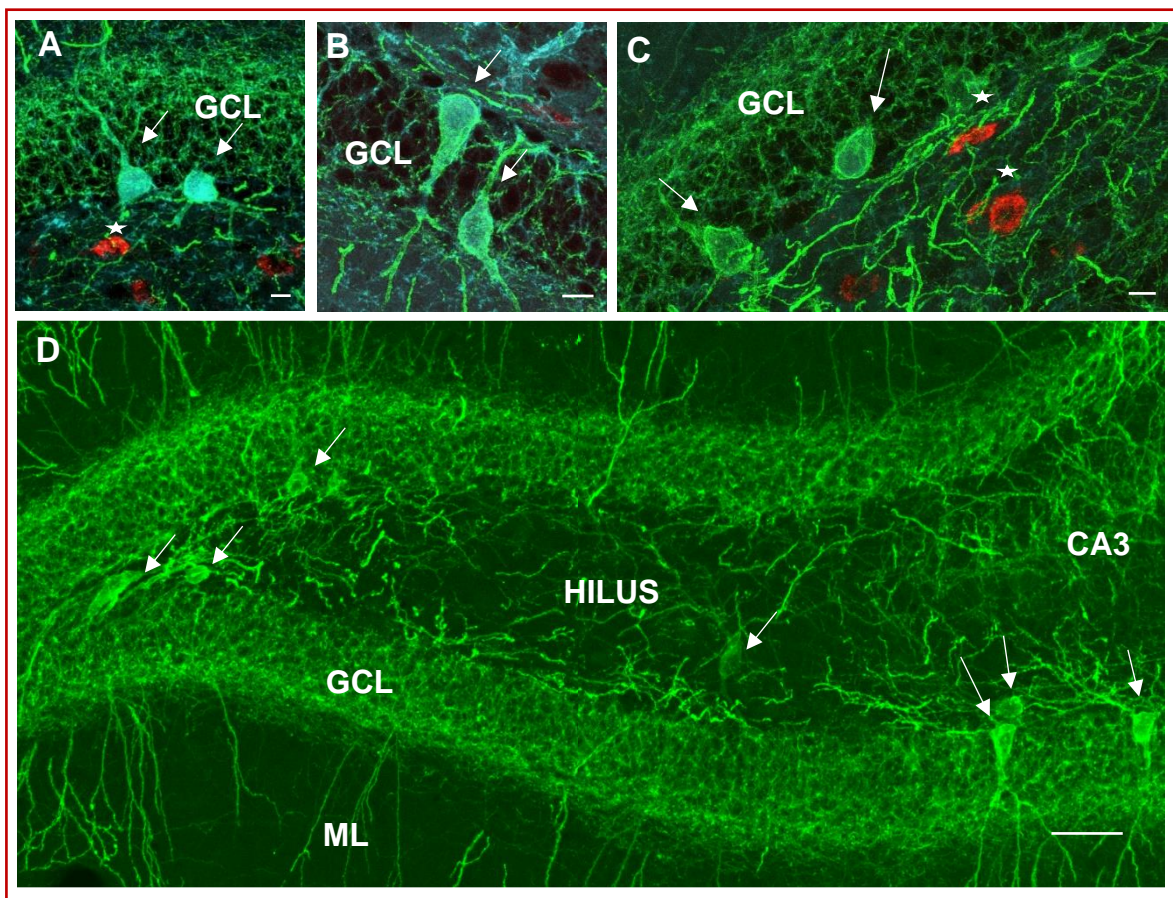


Figura r.4. Distribución anatómica de PV-INS. Imágenes confocales de secciones hipocámpales de 60 μm a partir de las cuales se realizó una proyección en el eje z de forma tal de observar la distribución y densidad de los procesos de PV-INS. (A-C) Triple inmunotinción muestra la expresión de PV (azul), PV-ChR2-EYFP (verde) y la expresión de SOM (rojo). Se puede observar la distribución de los procesos de PV-INS en un ratón $\text{PV}^{\text{Cre}}; \text{CAG}^{\text{floxedstopChR2-EYFP}}$. GCL: capa granular, ML: capa molecular. Escala: 10 μm . (D) Proyección panorámica realizada en el eje z, sobre una rebanada de hipocampo de un ratón transgénico $\text{PV}^{\text{Cre}}; \text{CAG}^{\text{floxedstopChR2-EYFP}}$. Se muestra la expresión de PV-ChR2-EYFP. Notar la alta concentración de axones alrededor de las CGs, haciendo posible la distinción de la GCL. Se indican mediante flechas algunos somas correspondientes a las PV-INS. Escala: 50 μm

R.2.2.2 Propiedades de las PV-INS en el giro dentado

Nos propusimos estudiar las propiedades biofísicas de este grupo de interneuronas con el objetivo de validar si la fisiología de las neuronas marcadas mediante un reportero fluorescente en animales transgénicos PV^{Cre} es consistente con la bibliografía reportada para las PV-INS.

Para ello, se utilizaron registros de *patch-clamp* en configuración *whole-cell* en rebanadas agudas. En primer lugar, se evaluaron las propiedades pasivas de dichas células: potencial de membrana, R_{input} y capacitancia (Figura r.5). Se obtuvo un potencial de reposo promedio de -60 mV, R_{input} de 100 M Ω y la capacitancia de ~50 pF (Figura r.5F-H). Seguidamente, se evaluó el perfil de actividad observando un patrón de tipo *fast-spiking*, es decir que la frecuencia de potenciales de acción evocados por un pulso cuadrado de 500 ms de duración, supera los 100 Hz (Figura r.5A,E). Esto es consistente con la frecuencia típica máxima reportada para PV-INs (Pelkey et al., 2017). Este perfil se observó en todas las células registradas, localizadas principalmente en la capa granular (Figura r.5I). Teniendo en cuenta que, como era esperable, obtuvimos un perfil de disparo similar para todas las neuronas, complementamos el análisis mediante un estudio detallado de las propiedades del potencial de acción, que también permitió controlar la variabilidad de las mediciones en las rodajas obtenidas para las distintas edades de CGs marcadas por (RV). Estudiamos una serie de parámetros muy bien descriptos para poder realizar una comparación con nuestros datos (Hosp et al., 2014; Hu et al., 2014; Pelkey et al., 2017). Analizamos la amplitud máxima del potencial de acción, la amplitud tras la hiperpolarización, la duración de la respuesta (ancho) y la frecuencia máxima registrada. (Figura r.5A-E). Estas características muestran que las interneuronas marcadas en el ratón PV^{Cre} conforman un grupo altamente homogéneo en cuanto a sus propiedades fisiológicas intrínsecas y los parámetros obtenidos son consistentes con los reportados para las PV-INs (Hu et al., 2014).

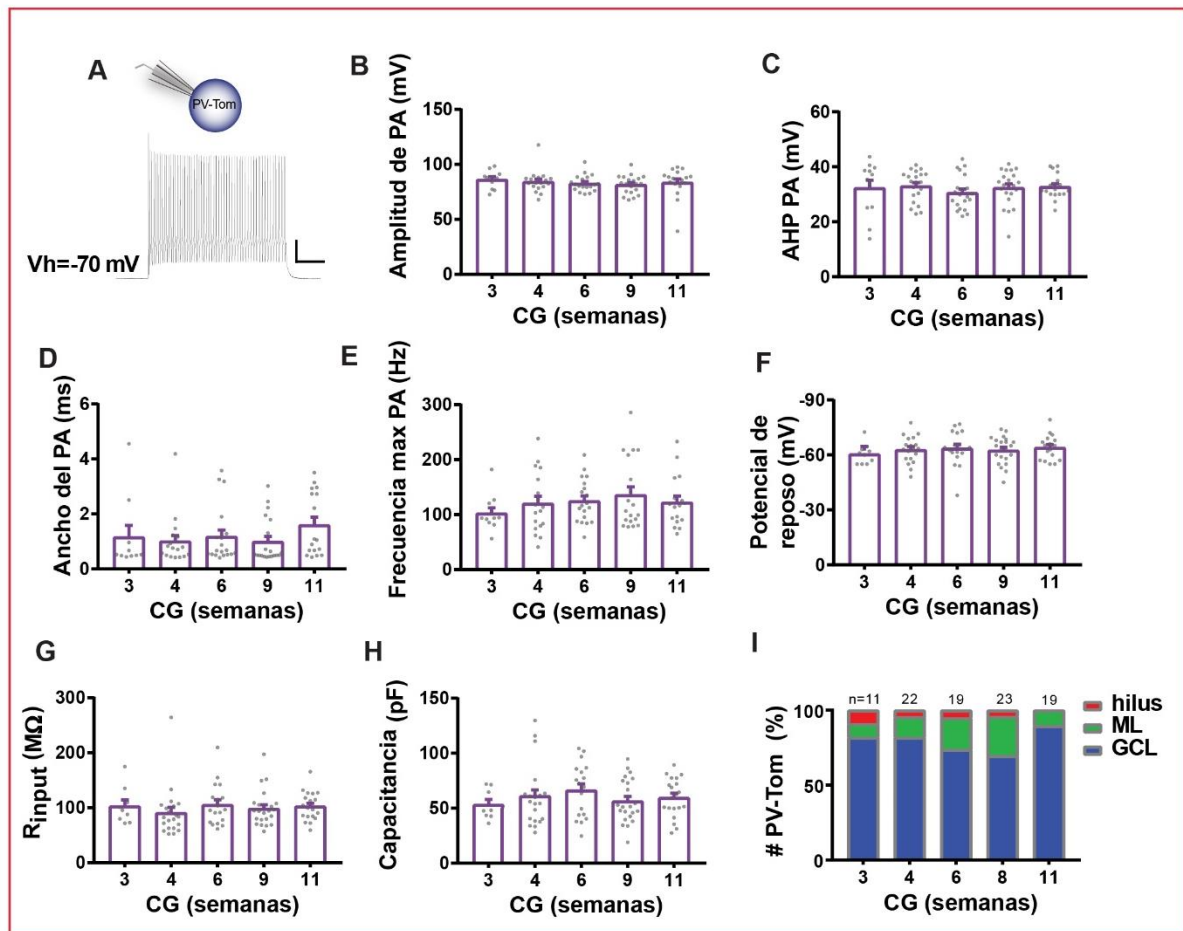


Figura 1.5: Propiedades intrínsecas de las PV-INS. (A, arriba) Esquema experimental que muestra el registro mediante la técnica de *whole-cell* de PV-INS. (A, abajo) Trazo representativo de *current-clamp* que muestra el disparo de alta frecuencia en respuesta a un escalón de corriente de 600 pA. El análisis de perfil de disparo se elaboró teniendo en cuenta los siguientes parámetros: Amplitud del potencial de acción (B), tiempo de hiperpolarización (C), ancho del potencial de acción (D), máxima frecuencia de disparo (E). Comparaciones estadísticas se realizaron mediante el test de Kruskal-Wallis. (F-H) Propiedades pasivas de las PV-INS. Se analizó el potencial de reposo, R_{input} y capacitancia. (I) Localización de las células registradas. Se muestra el análisis distinguiendo la edad de las CGs marcadas de forma de controlar la variabilidad de la respuesta para las distintas rodajas analizadas. $n = 11-23$ células en 5-9 animales. Comparaciones realizadas mediante el test de Kruskal-Wallis, $p > 0.05$. Experimentos realizados con Sung M. Yang.

R.2.2.3 Análisis de la localización de SOM-INS en el giro dentado

Realizamos una caracterización similar para SOM-INS. Evaluamos en este caso mediante doble inmunofluorescencia la especificidad del marcador mediante la expresión de Cre bajo el promotor SOM (ratón SOM^{Cre}). Utilizamos el reportero $CAG^{loxstopChR2-EYFP}$ y obtuvimos el ratón $SOM^{Cre};CAG^{loxstopChR2-EYFP}$ para estudiar la colocalización con anti-SOM (Figura 1.6A-C). Para evaluar si SOM^{Cre} presenta

además un componente inespecífico de expresión de PV se utilizó en este caso el reportero $CAG^{floxstop-tdTomato}$ (Figura r.6D-G). Se cuantificó la colocación con interneuronas con expresión positiva de SOM y PV (Figura r.6). Se observó que el 90% de las interneuronas transgénicas son detectadas por el anti-SOM y se obtuvo cerca de un 9 % de interneuronas SOM-Tom con expresión de PV (Figura r.6H).

La distribución de los cuerpos celulares de las interneuronas SOM fue cuantificada, observando en este caso una distribución homogénea con localización mayoritariamente en el hilus (Figura r.6G,r.7), esto es consistente con la bibliografía (Freund and Buzsáki, 1996). Sin embargo, en este trabajo hemos encontrado una pequeña fracción también representada en las capas molecular y granular (Figura r.7).

Se estudió también la distribución de los procesos de neuronas SOM-ChR2. Esto fue facilitado por el hecho de que ChR2 se localiza en membrana, marcando con muy buen contraste no sólo el contorno de los somas sino también las dendritas y axones. Pudimos observar que los procesos se encuentran en dos regiones principales: el hilus y la capa molecular externa. El axón (proceso más fino) de SOM-INs, se distribuye principalmente en la capa molecular más externa si bien se observa una marca tenue en la capa molecular interna (Figura r.7). Por otra parte, las dendritas (procesos más gruesos) se distribuyen principalmente en el hilus consistente con bibliografía (Freund and Buzsáki, 1996). Los mismos se detectan con mayor facilidad que los axones debido a su mayor grosor, pudiendo observarse tanto en el ratón $SOM^{Cre};CAG^{floxstopChR2-EYFP}$ (Figura r.6A-C,r.7) como en el ratón $SOM^{Cre};CAG^{floxstop-tdTomato}$ (Figura r.6D-G).

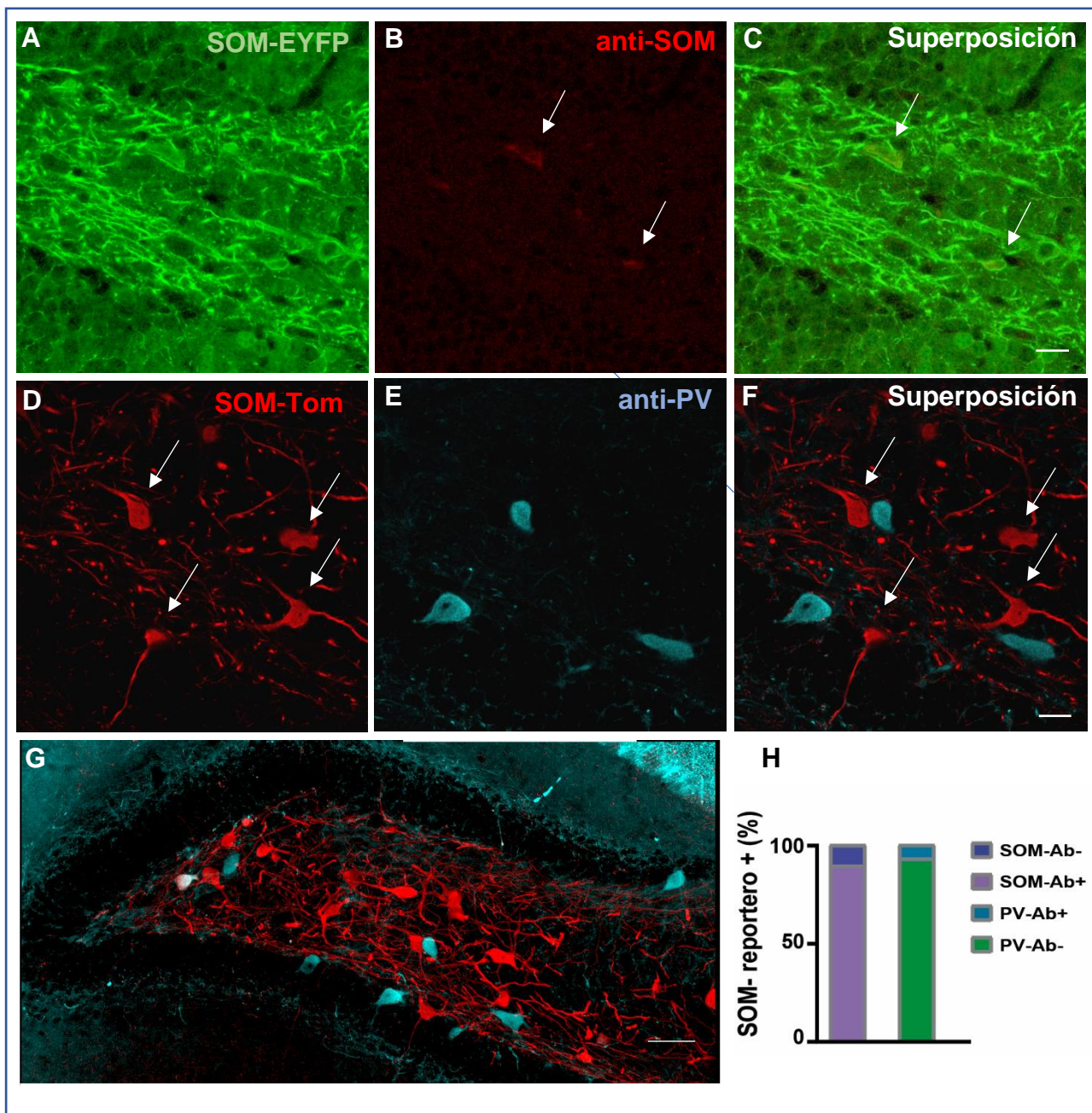


Figura r.6: Cortes histológicas tomados de un ratón $SOM^{Cre};CAG^{floxstopChR2-EYFP}/CAG^{floxstop-tdTomato}$. (A-C): Imagen confocal correspondiente a un único plano óptico, muestra la expresión de SOM-ChR2-EYFP (A), anti-SOM (somatos indicados por flechas) (B) y la superposición de los mismos (C). (D-F) imagen confocal de un único plano óptico que muestra expresión de SOM-Tom (somatos indicados por flechas (D), anti-PV (E) y la superposición de los mismos (F). Escala, 20 μm . (G) Proyección en el eje z, a partir de una inmunofluorescencia realizada en un ratón $SOM^{Cre};CAG^{floxstop-tdTomato}$ muestra la distribución de SOM-Tom (rojo) y de neuronas marcadas con anti-PV (azul). Escala, 50 μm . (H) Cuantificación de las inmunofluorescencias obtenidas a partir del ratón $SOM^{Cre};CAG^{floxstopChR2-EYFP}$ para análisis de colocalización de SOM-ChR2-EYFP (SOM-reportero +) con anti-SOM (indicado como SOM-Ab +). Se muestra también la cuantificación de la inmunotinción con anti-RFP (SOM-reportero +) y anti-PV (indicado como PV-Ab +) en un ratón $Som^{Cre};CAG^{floxstop-tdTomato}$ para estudiar expresión cruzada de SOM y PV. n = 83 y n=103 respectivamente, 2 ratones en cada caso.

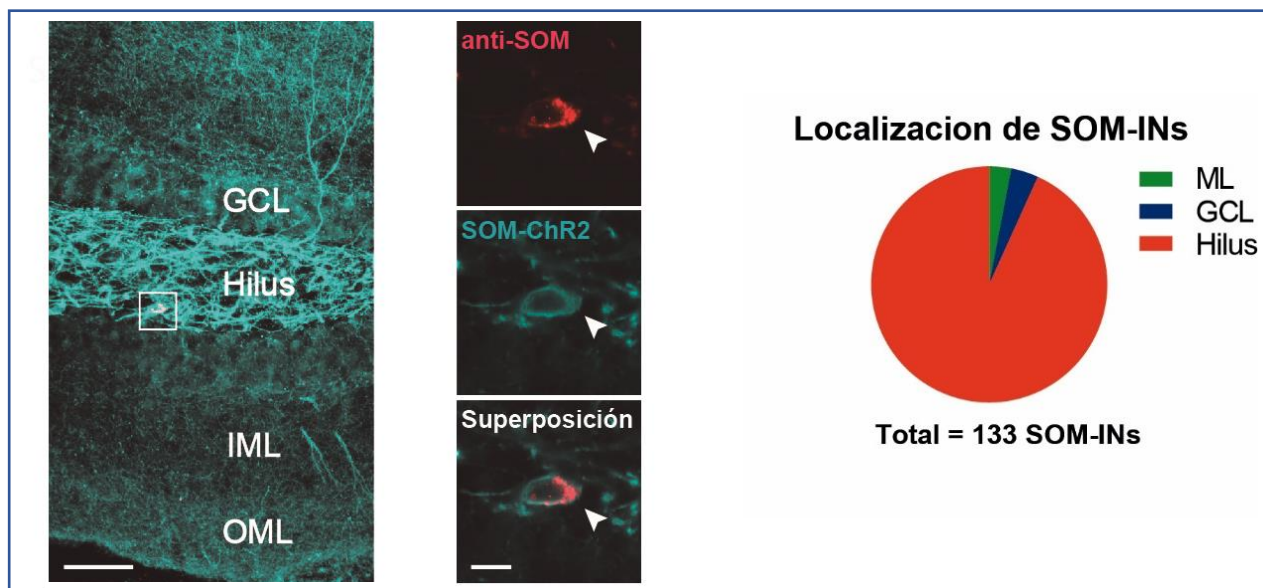


Figura r.7: Distribución de SOM-INs. Izquierda: Imagen confocal de una sección coronal de 60 μm de un ratón $\text{SOM}^{\text{Cre}};\text{CAG}^{\text{floxedstopChR2-EYFP}}$, donde se pueden visualizar los procesos de SOM-INs. (GCL: capa granular; OML: capa molecular externa, IML: capa molecular interna). Escala 50 μm . El inset muestra un único plano óptico de una neurona marcada por anti- SOM (rojo), ChR2-EYFP (azul) y la superposición. Escala, 20 μm . Derecha: Distribución de los somas de SOM-INs en las distintas regiones del giro dentado, $n=133$.

R.2.2.4 Propiedades de SOM-INs del giro dentado

Evaluamos las propiedades intrínsecas de SOM-INs para compararlas con la bibliografía y validar los animales transgénicos SOM^{Cre} utilizados. Teniendo en cuenta la forma y los intervalos de disparo, detectamos 4 perfiles distintos: *Fast spiking (FS)*, *Accommodating (Ac)*, *Stuttering (St)* y *Single spike (SS)* (Figura r.8). Se estudió la representación de cada uno de los perfiles en cada estadio neuronal de CGs, con el objetivo de conocer los principales subgrupos estudiados en este trabajo que son potencial blanco de las CGs nuevas estudiadas (Sección R.8.2). Se observó que la mayoría de los perfiles se encuentran representados en cada estadio de CGs, por lo que si existiese alguna diferencia en las mediciones de corrientes dependerá principalmente del estadio de CGs registrado y no del tipo de perfil de SOM-INs que participe. Teniendo en cuenta la diversidad de los patrones de disparo encontrada en un mismo grupo de neuronas conocidas por la expresión en común del péptido SOM, estudiamos las propiedades intrínsecas de membrana para determinar si contribuyen a la discriminación de 4 subpoblaciones distintas: R_{input} y potencial de reposo. Mientras que el potencial de reposo tiene un valor medio cercano a -55 mV, se puede

ver una tendencia sutil a un potencial de membrana más despolarizado para los dos subtipos St y SS (Figura r.8E,G). Por otra parte, al analizar el R_{input} para estos subtipos se obtuvo un valor medio de 300 M Ω mientras que el fenotipo FS presenta un R_{input} de alrededor de 150M Ω (Figura r.8D,F). Esto es consistente con el R_{input} que observamos anteriormente para las PV-INs cuyo perfil sería similar al FS obtenido para el subgrupo SOM (Figura r.5G).

Se evaluó la distribución de las SOM-INs registradas en las distintas regiones del giro dentado (Figura r.8H,I). Se puede ver que todos los subgrupos presentan una distribución similar a la distribución global descrita por microscopia (Figura r.7), con excepción de las neuronas correspondientes al subgrupo FS, que se encuentran principalmente localizadas en la capa granular (Figura r.8I). Esto agrega otra similitud al subgrupo FS con la población de PV-INs (Figura r.3). Con el objetivo de distinguir si las neuronas del subgrupo FS en las SOM-INs también muestran un perfil de disparo similar a la población PV-INs, se comparó su frecuencia máxima de disparo. La frecuencia máxima para las PV-INs supera los 100Hz mientras que el subgrupo FS de SOM-INs está por debajo de 70 Hz (Figura r.8J). En conclusión, las SOM-INs conforman un grupo heterogéneo, consistente con estudios previos (Rudy et al., 2011; Yuan et al., 2017), que no se superpone con el perfil FS de las PV-INs, si bien presentan localización y R_{input} similares.

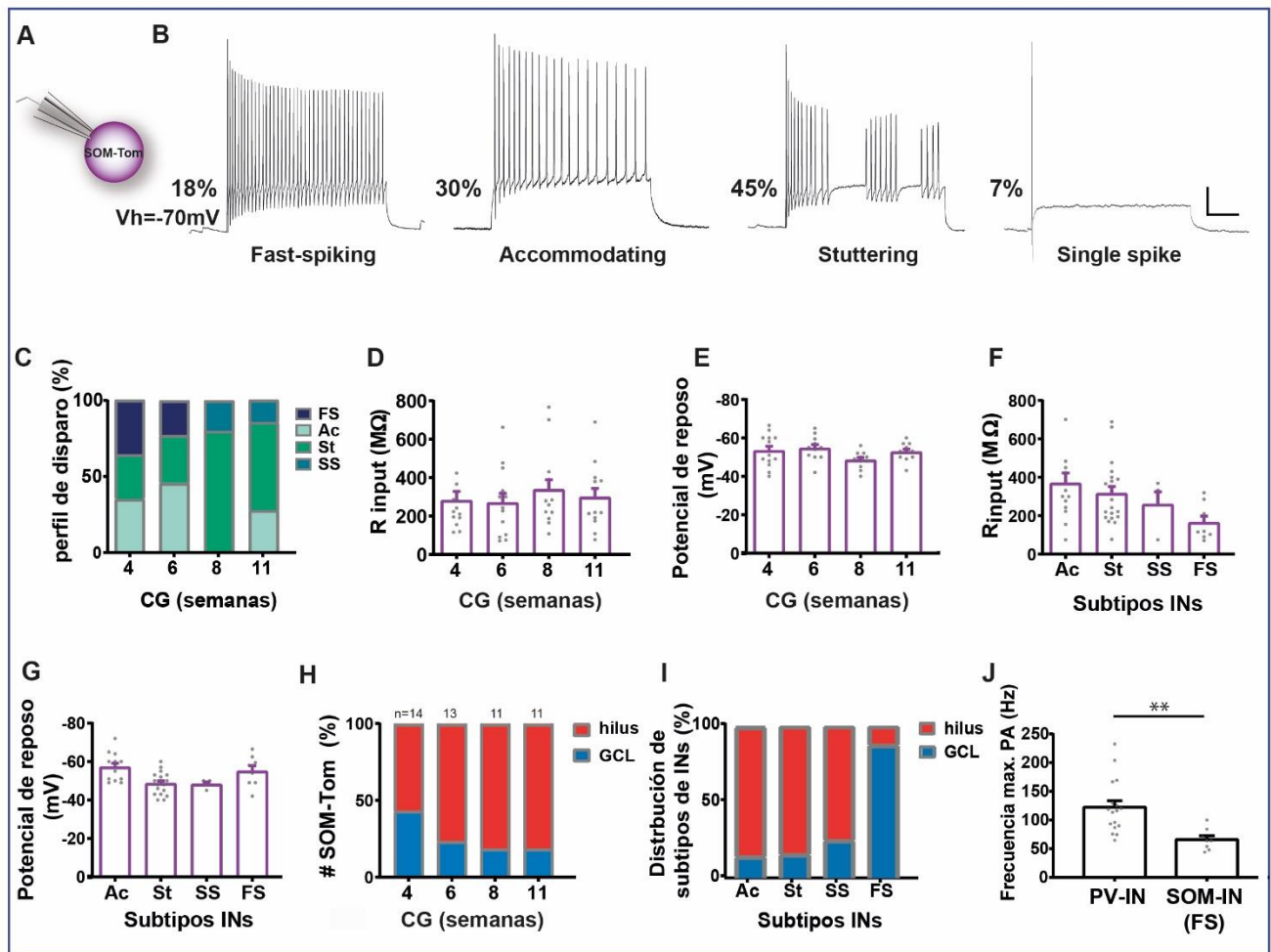


Figura r.8: Caracterización fisiológica de SOM-INS (A) Esquema experimental. (B) Registros de *current clamp* de SOM-INS mostraron los distintos patrones de disparo en respuesta a un pulso cuadrado de 510 pA. Observamos 4 perfiles distintos de spiking: *Fast spiking* (FS), *Accommodating* (Ac), *Stuttering* (St), *Single spike* (SS). Se indica la proporción (%) correspondiente a cada perfil. Escala 100 ms, 20 mV. (C) Proporción de cada perfil de disparo de SOM-INS registrado para cada estadio de desarrollo de las neuronas nuevas. (D-G): Propiedades pasivas de membrana se analizaron teniendo en cuenta el potencial de reposo y el R_{input} . En ambos casos se realizó el análisis de forma global y discriminando por perfil de disparo. En el caso del análisis global, se distinguieron las rebanadas con CGs nuevas marcadas en distintos estadios de forma de controlar la variabilidad de las mismas. (H) Distribución de SOM-INS registradas en el giro dentado para cada estadio del desarrollo de CGs nuevas, consistente con la cuantificación por inmunofluorescencia (Figura r.7). El número total de células se indica sobre cada columna. (I) Distribución de las interneuronas registradas según su perfil de disparo. Observar que la distribución es similar en todos los casos a excepción del perfil FS que se encuentra principalmente localizado en la capa granular. $n = 11-14$ células en 2-7 ratones. (J) Frecuencia máxima de disparo en PV-INS y el subgrupo de SOM-INS correspondiente al perfil FS. Se utilizó un subgrupo de PV-INS (correspondiente a la columna 11 semanas, Figura r.5E) para comparar muestras balanceadas. t-test $p < 0.01^{**}$. $n = 8-19$ células.

R.2.3 Aferencias de CGs provenientes de circuitos locales inhibitorios

Se estudió cuáles son los componentes del circuito que participan del desarrollo de la inhibición de las CGs nuevas. Para ello, construimos un mapa temporal de conectividad. El estudio se realizó en CGs en un período de desarrollo comprendido entre la segunda y octava semana, para abarcar la mayor cantidad posible de cambios funcionales. Se eligió inicialmente este intervalo asumiendo que el mismo incluye los principales eventos de formación y maduración de la conectividad aferente (Esposito et al., 2005; Laplagne et al., 2006; Laplagne et al., 2007). Como se verá luego, esta ventana debió extenderse para arribar al final de la formación de algunas de estas conexiones en el caso de la conectividad eferente (Sección R.3).

Ratones jóvenes adultos de 6-7 semanas fueron inyectados con partículas retrovirales para marcar CGs y las características de dichas neuronas fueron estudiadas a distintos tiempos de forma tal de obtener un gradiente temporal de CGs atravesando diversos estadios de desarrollo (Figura r.9A). Se utilizaron registros electrofisiológicos para estudiar las corrientes inhibitorias postsinápticas (IPSCs) luego de estimular mediante la aplicación de un pulso de láser lo más corto posible (0.2 ms) para reclutar de forma sincronizada a las interneuronas en estudio que expresan ChR2 (Figura r.9B). Se utilizó una potencia de láser para la cual se obtuvo una respuesta saturante de la corriente postsináptica registrada (alrededor de 130 mW). En la Figura r.9C se puede ver en una imagen confocal de una rebanada de hipocampo, el resultado del sistema de marcación utilizado.

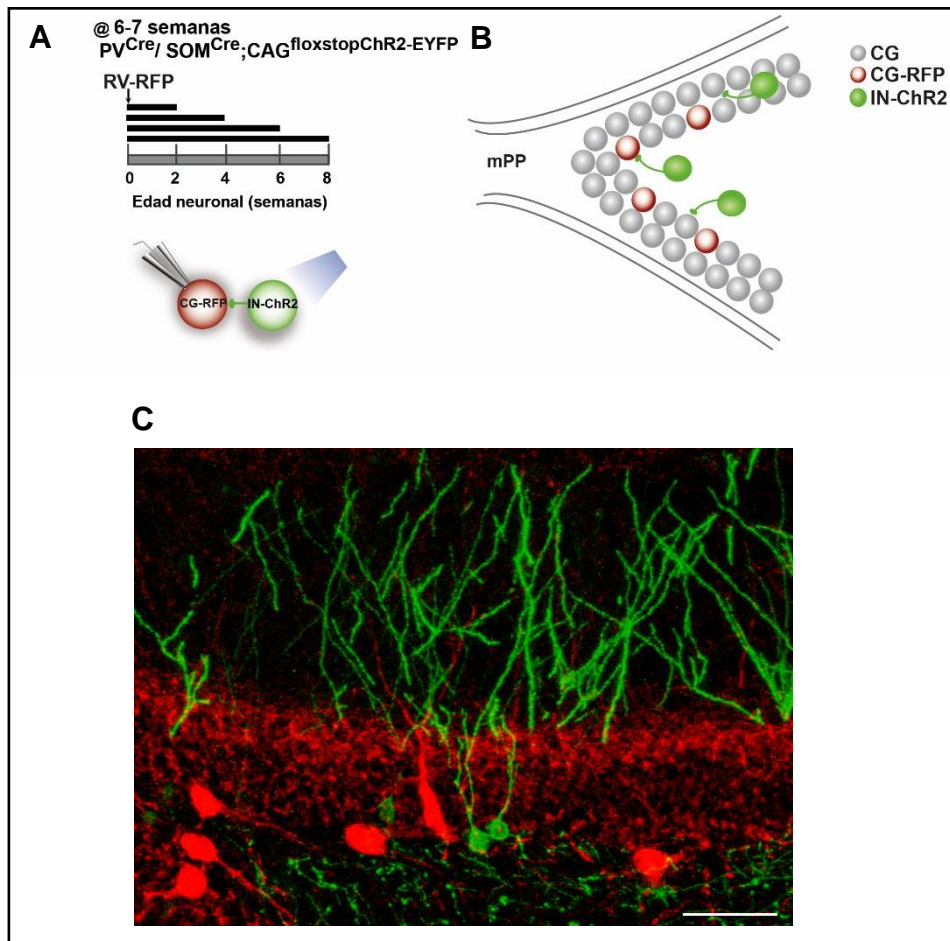


Figura r.9: Diseño experimental (A) Se muestran los tiempos desde la inyección retroviral en ratones de 6-7 semanas para obtener los distintos estadios de neuronas nuevas marcadas por RFP en ratones transgénicos $PV^{Cre}/SOM^{Cre};CAG^{floxstop}ChR2-EYFP$. Estimulación mediante pulsos de láser generan corrientes postsinápticas en neuronas nuevas de una cohorte específica. (B) Esquema de la capa granular del giro dentado donde se aprecian en gris las CGs nacidas en el estadio perinatal. En rojo se observa una cohorte marcada con RV-RFP de CGs nuevas y en verde se representa una población de interneuronas que expresan ChR2 acoplado a EYFP. (C) Imagen confocal que muestra el sistema de marcación en una rebanada de hipocampo. Se ven PV-INS marcadas por un reportero (rojo) en un ratón transgénico y una cohorte de CGs nuevas marcadas mediante RV (verde). Escala: 50 μm .

Con el objetivo de caracterizar la respuesta de las PV- y SOM-INS por activación de ChR2, se realizaron registros en la configuración *cell-attached*. En ambos grupos, el número de potenciales de acción evocados por láser fue mayor a 1, siendo aún más elevado en las PV-INS con un valor promedio cercano a 3 espigas por pulso (Figura r.10).

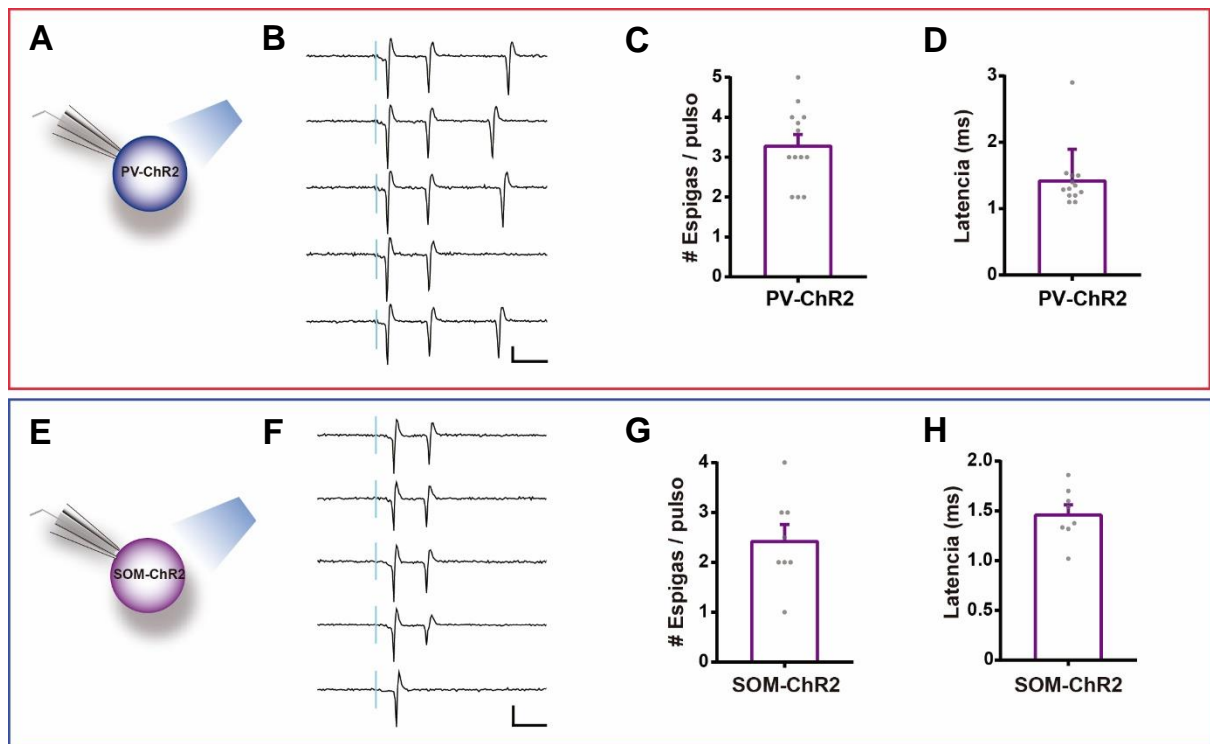


Figura r.10: Actividad de PV- y SOM-INs a partir de estimulación optogenética. (A) Esquema experimental. (B) Trazos representativos muestran el potencial de acción de PV-INs luego de estimulación por pulso único (0,2ms, 0,07Hz). Se muestran 5 trazos para una misma neurona. Escala 20 pA, 5 ms. (C) Número total de espigas por pulso. Se aplicó una intensidad de láser saturante, que genere la máxima amplitud en la respuesta postsináptica. Todas las células registradas respondieron al menos con un potencial de acción a dicho protocolo. $n = 13$ células / 9 ratones. (D) Latencia de la respuesta registrada. (E) Esquema experimental para SOM-INs (F) Registros representativos SOM-INs luego de estimulación por pulso único (0.2 ms, 0.07 Hz, línea azul). Escala, 20 pA, 5 ms. (G) número total de espigas y (H) latencia de la respuesta registrada en SOM-INs bajo el mismo protocolo que PV-INs. Todas las mediciones respondieron a dicho protocolo. $n = 8$ células / 5 ratones. Experimentos realizados en colaboración con Sung M. Yang.

R.2.3.1 Integración de las CGs en el circuito inhibitorio de PV-INs

Al estimular PV-ChR2, se registraron IPSCs en CGs nuevas a distintas edades y se construyó una curva temporal desde la semana 2 hasta la 8. Las IPSCs registradas en CGs de 2 semanas presentan amplitud pequeña y cinética lenta, si se la compara con IPSCs registradas en CGs de estadios avanzados. Un incremento pronunciado en la amplitud y una aceleración en la cinética fueron los principales cambios observados que acompañaron la maduración de la sinapsis PV-INs→CGs. Este cambio es significativo entre la semana 4 y la 6, edad en donde la respuesta se

estabiliza y presenta características similares a la de una CGm (Figura r.11). Los registros fueron reproducibles, obteniendo un éxito en la conectividad del 100% en todas las edades, a excepción del estadio más inmaduro (semana 2) cuyo éxito en la conectividad ha sido un poco menor, < 80% (Figura r.11C). En todos los casos, se utilizaron las mismas condiciones de registro (Sección M.3). Debido a las condiciones de registro y a la técnica empleada no intentamos evaluar si esta respuesta es despolarizante y en qué momento pasa a ser hiperpolarizante como se vio en la sección I.8.2. Se registró un número elevado de casos para cada estadio de CGs (Figura r.11).

Se estudió el pico máximo de amplitud de la respuesta para conocer la fuerza sináptica en cada estadio de desarrollo de CGs, observando un incremento notable en la magnitud de esta respuesta a partir de la semana 6 (Figura r.11A,B). Por otra parte, se evaluaron los parámetros cinéticos de la respuesta (tiempo de crecimiento y decaimiento, y ancho de la respuesta) ya que las sinapsis maduras presentan respuestas rápidas mientras que las sinapsis inmaduras suelen mostrar cinéticas lentas. Cambios en los parámetros cinéticos podrían evidenciar además un cambio anatómico o de las propiedades intrínsecas que acompaña la maduración de las neuronas por ejemplo cambios en subunidades del receptor GABA (Esposito et al., 2005; Laplagne et al., 2006; Pearce, 1993; Soltesz et al., 1995). El tiempo de crecimiento y el ancho de la respuesta se redujeron significativamente en la semana 6, mientras que el tiempo de decaimiento sigue la misma tendencia, si bien los cambios son más suaves (Figura r.11D-G). Por último, se midió la latencia. Este parámetro da información del número de sinapsis involucradas entre las PV-INs activadas por láser y las CGs registradas. Teniendo en cuenta que la latencia al inicio de IPSC en una monosinapsis es de alrededor de 4 ms se realizó este análisis en todas las edades de CGs para evaluar la presencia de más de una sinapsis inhibitoria (Figura r.11H). En todas las edades estudiadas la latencia fue suficientemente corta, lo cual indica que la respuesta caracterizada es monosináptica. Esto fue chequeado mediante farmacología (Figura r.11K).

Con el objetivo de estudiar si el incremento en la amplitud medida durante la maduración se debe a un cambio postsináptico en la densidad de receptores o a

cambios estructurales mientras la sinapsis se va formando, se midió la corriente unitaria a partir de estimulación mínima y se calculó el cociente entre la corriente máxima y la corriente unitaria (Figura r.11I). A partir de estos resultados se puede ver que hay un incremento en el tamaño del cuanto, reflejado en el histograma representativo del IPSC unitario y no en el contenido cuántico ya que el cociente no cambia (Figura r.11I,J). Este resultado nos lleva a pensar que el número de contactos funcionales se mantiene estable durante el desarrollo. El aumento observado en el tamaño del cuanto podría deberse a un aumento en el tamaño de las vesículas por un mayor contenido de neurotransmisor, o a cambios en la densidad de receptores postsinápticos. Teniendo en cuenta que las CGs atraviesan un período de maduración, pensamos que es probable que haya mayores cambios a nivel postsináptico. Por otra parte, cambios en la maquinaria postsináptica como modificaciones en las subunidades de los receptores GABA podrían explicar la aceleración de la cinética en las IPSCs registradas.

Por último, se realizó farmacología para caracterizar la identidad de la sinapsis. Se activaron PV-ChR2 por estimulación lumínica y se registraron neuronas nuevas de 4 semanas que fueron marcadas utilizando RV-RFP. Se aplicó KYN, antagonista de receptores ionotrópicos glutamatérgicos, y no se observaron cambios en la respuesta IPSC. Al aplicar PTX, antagonista de receptores GABA de tipo A ($GABA_A$), se observó un bloqueo total de la respuesta. A partir de este experimento se puede corroborar que la respuesta postsináptica es de tipo GABAérgica mediada por $GABA_A$ (Figura r.11K).

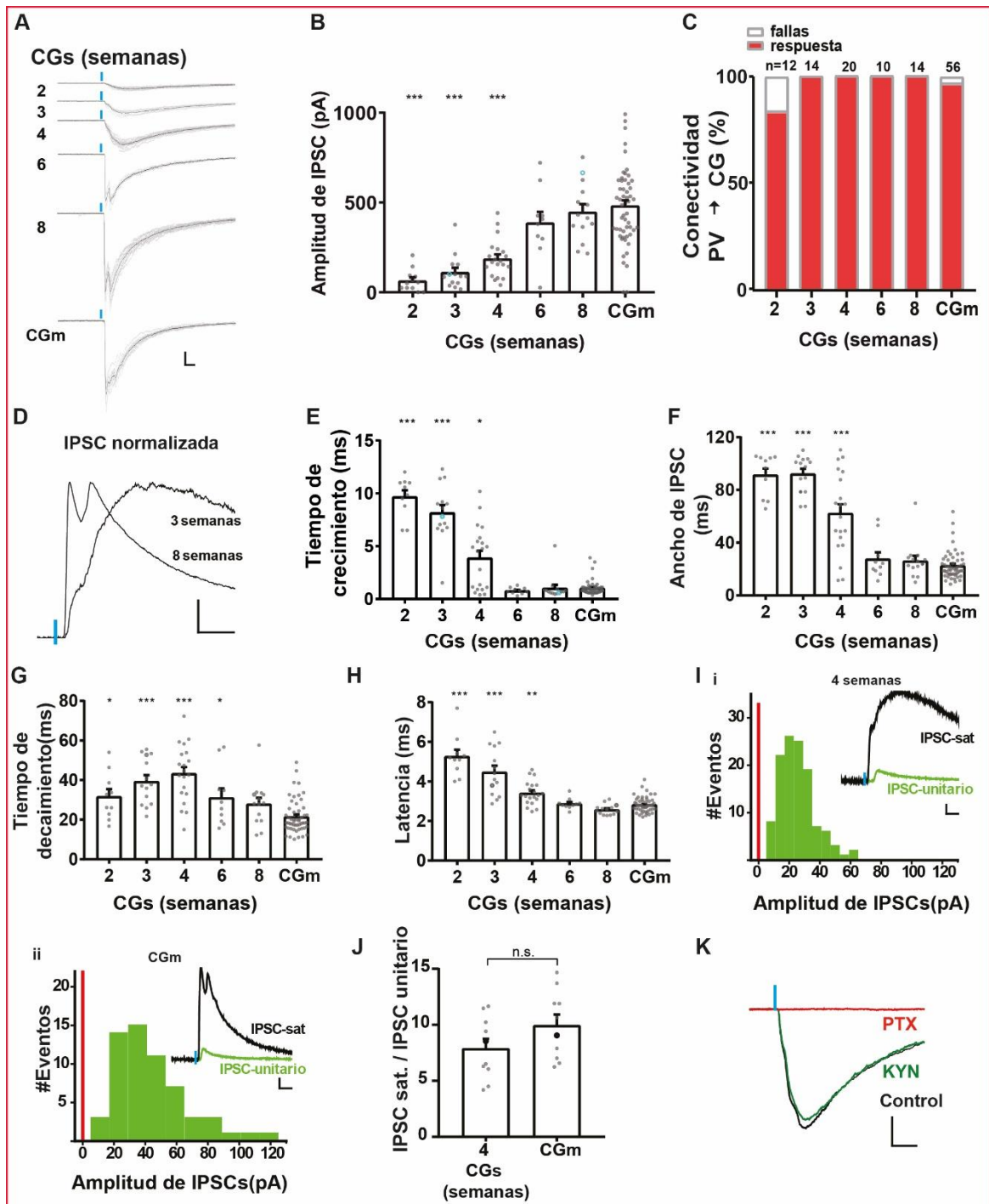


Figura r.11: Sinaptogénesis proveniente de PV-INs (A) Trazos representativos de IPSCs a distintos estadios de desarrollo de CGs. (B) Amplitud máxima registrada en cada estadio de CGs. (C) Éxito en la conectividad, definido como el porcentaje de CGs que responden luego de estimular PV-INs. Sobre cada columna se expresa el n total de células registradas. (D) Trazos normalizados a la amplitud máxima para comparar la diferencia en cinética de respuestas registradas en CGs de 3 y 8 semanas. Escala 10 ms, 0.2 au (unidades arbitrarias). (E-H) Se registraron tiempo de crecimiento, ancho, tiempo de decaimiento y latencia de IPSCs. Los puntos grises indican células individuales y el promedio está representado por las barras con su error estándar. (I) Histograma representativo de la amplitud de IPSCs evocada por estimulación mínima. Para estudiar IPSCs unitarias, la intensidad de láser utilizada se

reduce hasta alcanzar una condición en donde se obtienen al menos un 10% de fallas del total de los estímulos e IPSCs pequeñas cuya corriente unitaria corresponde al valor medio del histograma realizado en CGs de 4 semanas (i) y CGm (ii). Inset muestra los trazos representativos normalizados correspondientes a IPSCs unitarios y a IPSCs evocados por estimulación máxima. Escalas, 10 ms, 0.1 au. (J) El número de IPSCs unitarios contenido en IPSCs máxima no difiere entre neuronas de 4 semanas y CGm. Los círculos negros representan los ejemplos mostrados en los insets de (I i-ii). $n = 10$ (CGs 4 semanas) y 10 (CGs madura). Comparaciones estadísticas se realizaron mediante t test de dos colas. ($p=0.128$). (K) Trazos representativos muestran IPSCs de una CG de 4 semanas (negro), la misma corriente en presencia de KYN, 6 mM (verde) y en presencia de PTX 100 μ M (rojo). Escala 50 pA, 20 ms. Experimentos realizados con Sung M. Yang.

R.2.3.2 Integración de las CGs en el circuito inhibitorio de SOM-INs

En respuesta a la estimulación optogenética de SOM-INs, también hemos encontrado contactos funcionales y confiables desde la semana 2. En los estadios tempranos, se registraron IPSCs de poca amplitud y cinética lenta. A partir de la semana 3 fue posible distinguir dos componentes en la respuesta. Para la clasificación se tuvo en cuenta en primer lugar el potencial de reversión, y se estudió la cinética y el coeficiente de variación de la amplitud, obteniendo una componente lenta a un potencial despolarizado, y una componente rápida que fue visualizada a un potencial hiperpolarizado (Figura r.12A,E). En ambos casos se observa que la amplitud de la respuesta varía con el estadio de CGs (Figura r.12B,F). Por otra parte, los parámetros cinéticos permanecieron prácticamente estables a lo largo de la maduración (Figura r.13).

En ambos casos la amplitud máxima de la corriente registrada se alcanzó a las 8 semanas similar a la amplitud de IPSCs obtenida para CGm (Figura r.12 C,G). Se estudió el éxito en la conectividad observando que ambas componentes están presentes y son estables desde las primeras semanas de desarrollo si bien se han registrado algunas CGs no conectadas con las aferencias de respuesta rápida (Figura r.12 D, H). Con el objetivo de estudiar la fisiología de cada componente, se analizó la cinética, cambiando el potencial de membrana hacia el potencial de reversión de la otra componente.

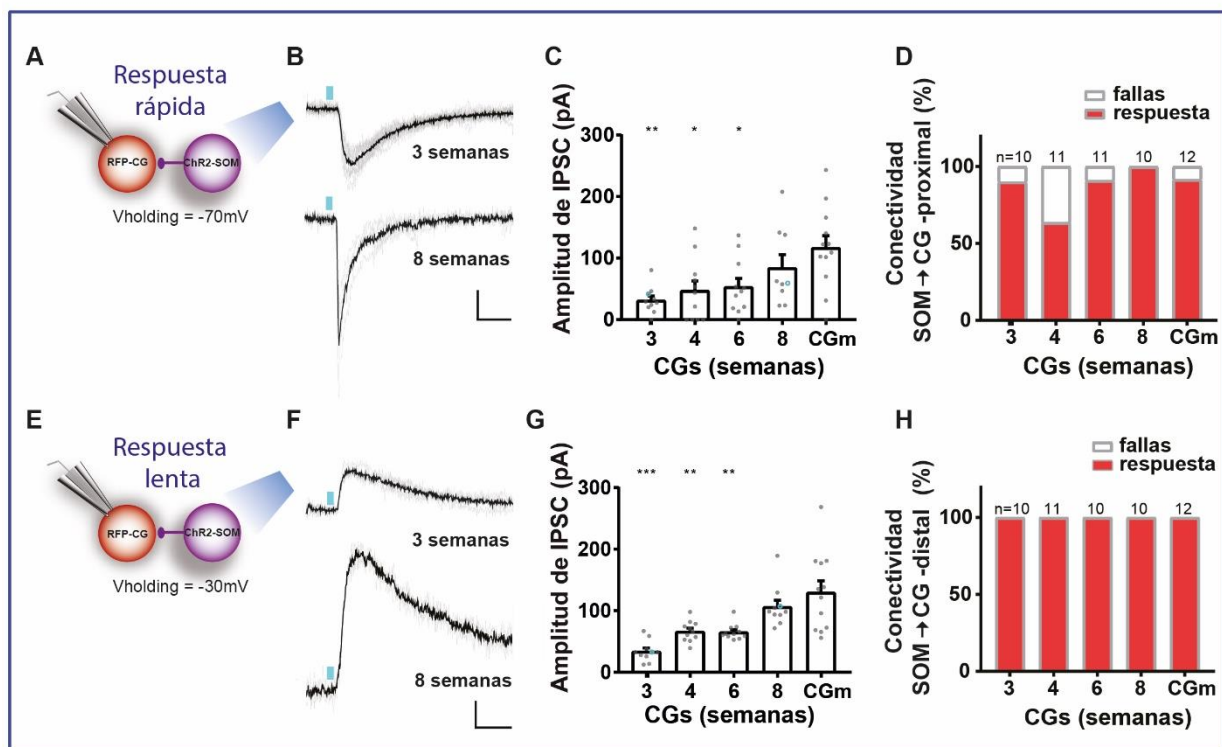


Figura r.12: Sinaptogénesis proveniente de SOM-INs (A) Esquema experimental. (B) Registros representativos obtenidos por estimulación con láser de SOM-INs. Escala 20pA, 10ms. (C) Se evaluó la amplitud máxima. Los datos fueron analizados mediante ANOVA de una vía seguido de un test *post hoc* de Bonferroni para comparaciones múltiples contra la condición madura (CGm). (D) Porcentaje de conectividad encontrada en el total de neuronas registradas. Sobre las columnas se puede ver el n total. La comparación estadística se realizó mediante el test exacto de Fisher. (E) Esquema experimental para los registros de la componente lenta. (F) Trazos representativos, en gris se representa cada ensayo individual y en negro el promedio de los trazos. (G) Amplitud máxima, ver (C) para análisis estadístico. (H) Porcentaje de conectividad de la componente lenta. Se puede ver que en todas las CGs registradas se detectó respuesta. La comparación estadística se realizó mediante el test exacto de Fisher. $n > 9$ neuronas en > 2 ratones. $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) and $p < 0.001$ (***).

Se normalizaron las respuestas postsinápticas de forma tal de comparar específicamente el curso temporal de la respuesta. Para el caso de la componente rápida se puede observar una clara diferencia entre una respuesta inmadura de 3 semanas vs 8 semanas (Figura r.13A-D). Esta diferencia se pudo apreciar de forma cuantitativa al analizar el ancho de IPSCs, donde se ve que a partir de la semana 4 la duración es muy similar a CGm y a CGs nuevas en estadios avanzados. Por otra parte, si bien el tiempo de crecimiento y decaimiento no mostraron diferencias significativas, siguieron la misma tendencia. Por último, se evaluó la latencia, pudiendo corroborar que la corriente registrada es de tipo monosináptica (Figura r.13).

Este resultado era predecible teniendo en cuenta que se han reportado conexiones directas entre distintas poblaciones de INs y CGm así como con CGs nuevas (Esposito et al., 2005; Freund and Buzsáki, 1996; Halasy and Somogyi, 1993a, b; Hosp et al., 2014; Pardi et al., 2015).

Se realizó el mismo análisis para la componente lenta, y no se obtuvieron diferencias en los parámetros cinéticos en cada estadio de las CGs, a excepción del tiempo de decaimiento. En ese caso se obtuvo un tiempo de decaimiento menor a las 3 semanas en comparación al resto de las edades. Esto resulta anti intuitivo, teniendo en cuenta que estadios maduros van acompañados de cinéticas más rápidas. Sin embargo, en el caso de las aferencias distales, se han reportado cinéticas lentas (Miles et al., 1996). Por otra parte, en el estadio de 3 semanas, la composición de los receptores todavía no es madura y los procesos dendríticos continúan desarrollándose lo que podría explicar los cambios en la cinética registrada entre la semana 3 y 4 (Rivera et al., 2000, Kaila et al., 2014). Para concluir, las CGs nuevas reciben dos tipos de aferencias monosinápticas GABAérgicas provenientes de SOM-INs durante el desarrollo, una de cinética rápida y una lenta. En ambos casos la amplitud se incrementa con la maduración de las CGs alcanzando una amplitud máxima a las 8 semanas. Cabe destacar que las IPSCs registradas provenientes de SOM-INs alcanzan una amplitud máxima casi 5 veces menor a la amplitud registrada en IPSCs provenientes de PV-INs (Figuras r.11B,r.12C,G). Este resultado si bien es llamativo, es consistente con un reporte reciente que muestra que la probabilidad de encontrar conexiones funcionales en la sinapsis SOM-INs→CGs es mucho menor que en la sinapsis PV-INs→CGs, 2.8 vs 28.8% respectivamente (Espinoza et al.,2018). Teniendo en cuenta esto, la activación por láser de PV-INs podría estar reclutando un mayor número de terminales presinápticos funcionales en comparación a SOM-INs generando así IPSCs mucho mayores en el primer caso.

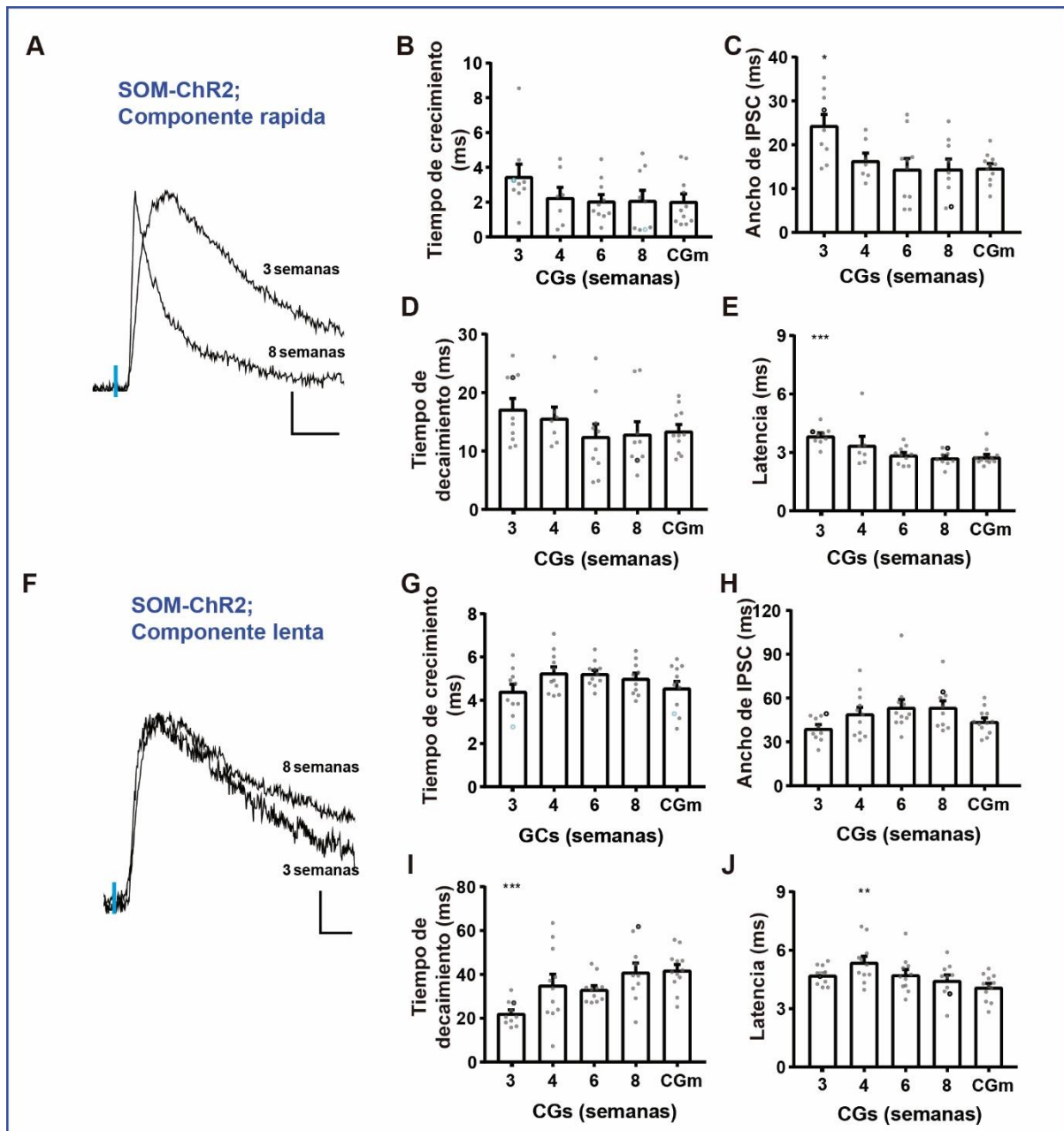


Figura r.13: Cinética de IPSCs provenientes de SOM-INs. (A) Trazos normalizados al pico máximo de corriente postsináptica evaluadas en el potencial de reversión a -70mV a las 3 y 8 semanas. Escala 10 ms, 0.2 u.a. (B-E) Se analizó el tiempo de crecimiento, ancho, tiempo de decaimiento y latencia. Estadística realizada mediante ANOVA de una vía seguido de un test *post hoc* de Bonferroni contra la condición madura (B) y el test de Kruskal-Wallis seguido del test de Dunn para comparaciones múltiples. (C-E). $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) and $p < 0.001$ (***). (F) Trazos normalizados de corrientes postsinápticas evaluadas en el potencial de reversión a -30mV a las 3 y 8 semanas. Escala, 10 ms, 0.2 u.a. (G-J) Análisis ídem (B-E). Se realizó ANOVA de una vía seguido de un test *post hoc* de Bonferroni contra la condición madura. (G,H,J) y Kruskal-Wallis test seguido del test de Dunn para comparaciones múltiples contra la condición madura (I) $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) and $p < 0.001$ (***).

R.3 Localización subcelular de las sinapsis formadas por PV-INs y SOM-INs

El potencial de reversión de las IPSCs mediadas por GABA (E_{GABA}) está determinado por el potencial de equilibrio del Cl^- en los sitios postsinápticos. Por ello, podemos usar el E_{GABA} para determinar el origen subcelular de las aferencias GABAérgicas. Un proceso de transporte activo que mantiene los niveles fisiológicos de $[Cl^-]_i$ podría saturarse más fácilmente en el cuerpo celular en donde el cociente área/volumen es mucho más bajo que en las dendritas (Jarolimek et al., 1999, Khirug et al., 2005). Además, es el sitio blanco donde se posiciona el electrodo de registro. De esta forma, la carga de Cl^- a través de la pipeta de registro produce un cambio de concentración de $[Cl^-]_i$, aumentando el E_{GABA} principalmente en el soma y región proximal, al ser cargada con alta concentración de Cl^- (Laplagne et al., 2007; Pearce, 1993). Dos componentes de IPSCs con diferentes E_{GABA} pueden ser explicados por su naturaleza anatómica de sitios segregados de corriente sináptica. Este concepto está claramente ilustrado en la figura r.14, en donde si se lleva el potencial de membrana (V_h) a -50 mV, un valor intermedio entre E_{GABA} en el soma impuesto por la pipeta y los valores fisiológicos más distales, se registran respuestas con dirección opuesta evocadas por estimulación de terminales que contactan a nivel proximal y distal. Este abordaje permitió calcular el E_{GABA} independientemente para sinapsis proximales y distales (~-30 mV vs. ~-65 mV).

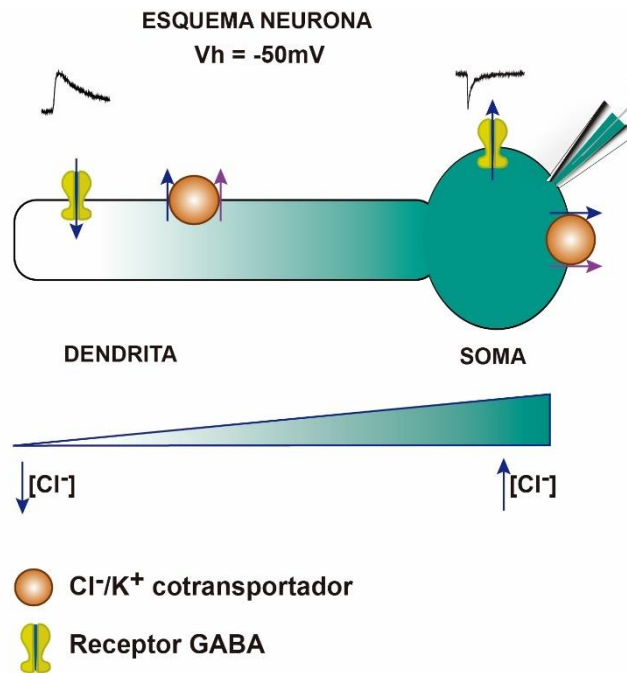


Figura r.14: Diseño experimental utilizado para clasificar la corriente post sináptica de acuerdo a su localización subcelular. Se introduce la pipeta de registro en el soma, modificando la concentración $[Cl^-]_i$. Debido a la baja relación área/volumen, el transporte activo se satura rápidamente, y esta condición se mantiene estable ya que el volumen celular es despreciable frente al volumen que contiene la pipeta. En las dendritas, los cotransportadores de Cl^- y K^+ funcionan normalmente, por lo que la concentración fisiológica en las regiones más distales de las dendritas no se ve alterada. Como la corriente postsináptica GABAérgica depende exclusivamente de Cl^- , es posible conocer la localización subcelular relativa al soma y a la dendrita buscando el potencial de reversión de la corriente postsináptica.

Para evaluar la localización subcelular de las sinapsis formadas por PV-INs en CGs nuevas, monitoreamos el potencial de reversión de la corriente postsináptica evocada por optogenética. Teniendo en cuenta la $[Cl^-]_i$ impuesta por la pipeta de registro, las corrientes evocadas cercanas al soma tendrán un potencial de reversión ~ -30 mV mientras que las más distales presentarán un E_{GABA} en un rango de valores más hiperpolarizados (cercano al valor fisiológico). Para corroborar esto, se estimuló en paralelo la capa molecular externa para reclutar los axones de interneuronas con invasión dendrítica. El experimento se realizó en presencia de KYN para bloquear la transmisión glutamatérgica (Figura r.15A). En la figura r.15B se muestra un trazo representativo obtenido a un potencial de membrana intermedio (-50 mV) donde se puede ver la respuesta dendrítica reclutada por el electrodo extracelular distal y la

respuesta a la estimulación lumínica de PV-INs. En este trazo, se ven respuestas con amplitud comparable y sentido opuesto, lo cual revela la distinta localización subcelular. El trazo con deflexión hacia abajo revela un potencial de reversión mayor y por lo tanto es proximal, mientras que el que muestra deflexión hacia arriba revela un potencial de reversión más negativo y es, por lo tanto, distal. Asimismo, al superponer los trazos normalizados, se observa una cinética más lenta en la respuesta dendrítica (Figura r.15B). Esto fue cuantificado como tiempo de crecimiento, obteniendo una respuesta casi tres veces más lenta para la inervación dendrítica (Figura r.15C). La curva I/V permite separar las corrientes según su localización subcelular, y en este caso podemos apreciar que a -66 mV revierte la corriente obtenida luego de reclutar axones distales mientras que la corriente obtenida por estimulación específica de PV-INs revierte a -34mV, cercana a la reversión teórica del Cl⁻ impuesto en el soma de la neurona (Figura r.15D). Se puede ver que la corriente generada a partir de la activación de PV-INs tiene un potencial de reversión despolarizado en todos los estadios de CGs (Figura r.15E). Teniendo en cuenta que el E_{GABA} en el soma coincide con la reversión de las IPSCs registradas, podemos concluir que los contactos provenientes de PV-INs son perisomáticos desde la semana 2 y esta localización subcelular no cambia a lo largo del desarrollo (Figura r.15 E).

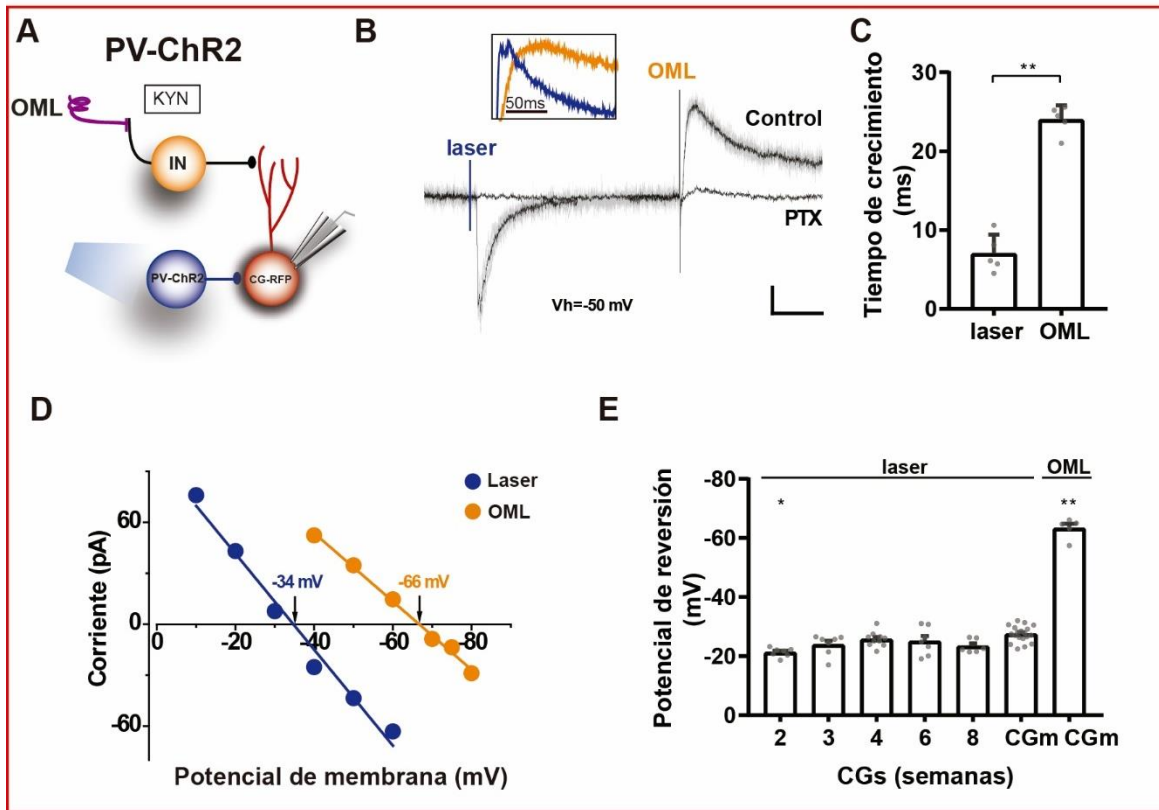


Figura r.15: Localización subcelular de las aferencias provenientes de PV-INs (A) Esquema experimental. muestra el reclutamiento de interneuronas de invasión dendrítica por un electrodo de estimulación en la capa molecular externa, pareado con estimulación por optogenética que recluta específicamente PV-INs. Experimento realizado en presencia de KYN antagonista de receptores glutamatergicos. (B) Trazo representativo de corriente postsináptica inhibitoria generada por pulsos de láser (0.2ms, barra azul) y por estimulación eléctrica. Ambas respuestas fueron bloqueadas por PTX (100 μ M). Escala, 100 ms, 10 pA. El inset muestra las corrientes normalizadas para comparar las diferencias en su cinética. (C) Se analizó el tiempo de crecimiento al pico definido como tiempo desde el estímulo al pico máximo de amplitud registrada en respuestas de CGm evocadas por láser o estímulo eléctrico. Se aplicó el test de Mann-Whitney, n=5 neuronas (5 rodajas). (D) Curva I/V elaborada a partir de las respuestas obtenidas en (B), el potencial de reversión se indica con flechas. (E) Potencial de reversión evaluado en todos los estadios de CGs incluyendo las CGm y la respuesta evocada por estimulación de la OML. Comparaciones estadísticas se realizaron mediante el test de Kruskal-Wallis seguido del test de Dunn para comparaciones múltiples contra las corrientes evocadas por láser en CGm. n = 6 - 18 células. Experimento realizado en colaboración con Sung M. Yang

Seguidamente se estudió la localización subcelular de SOM-INs. La estimulación mediante optogenética de SOM-ChR2 registrando CGs a un potencial de membrana de -50 mV, generó una respuesta compuesta. Es decir que se registró una corriente

entrante y otra saliente, provenientes de contactos sinápticos localizados con distintas distancias al soma (Figura r.16A,B).

Se realizó una curva I/V para caracterizar cada una de las componentes, de lo cual se obtuvo una respuesta con potencial de reversión de -30mV, atribuida a una localización proximal (Figura r.16C). Por otra parte, la componente lenta presenta un potencial de reversión de -65 mV, atribuida a una corriente distal. Por último, se evaluó la localización subcelular de ambas corrientes para cada estadio de desarrollo, siendo posible separarlas desde la semana 3. Se puede ver que el potencial de reversión de la respuesta proximal permanece estable a lo largo del desarrollo, mientras que la corriente distal comienza en los estadios más tempranos con un potencial más despolarizado cercano a -40 mV (Figura r.16D). Esta tendencia a hiperpolarizarse con la edad, puede deberse a que la regulación de $[Cl^-]_i$ se modifica con el desarrollo neuronal (Khirug et al., 2005), pudiendo generar así variaciones en el potencial de reversión como se vio en la sección I.8.2.

La variabilidad de la amplitud de la respuesta depende de distintos factores tales como el número y tamaño de las vesículas liberadas, o el número de receptores postsinápticos activos (Mason et al., 1991; Thomson et al., 1988). Asimismo, un menor número de contactos generaría mayor variabilidad en la respuesta (Allen and Stevens, 1994; Murthy et al., 1997; Stevens and Wang, 1994). Para estudiar la fisiología de cada una de las componentes registradas, se analizó la variación de la amplitud máxima de IPSCs obtenidos a partir de la estimulación de SOM-ChR2 y se registraron CGs en cada estadio de desarrollo. Mientras que hay altos niveles de variabilidad en la respuesta proximal, la respuesta distal es sumamente estable luego de cada pulso de láser aplicado para todos los estadios. En el estadio de 3 semanas la diferencia entre IPSCs proximal y distal no es significativa si bien la tendencia es la misma (Figura r.16E). Es decir que la componente proximal presenta un número reducido de contactos sinápticos, o podría tener menos vesículas así como también menos receptores postsinápticos de CGs en la región proximal, lo cual podría explicar la mayor varianza observada para IPSCs proximales (Figura r.16E).

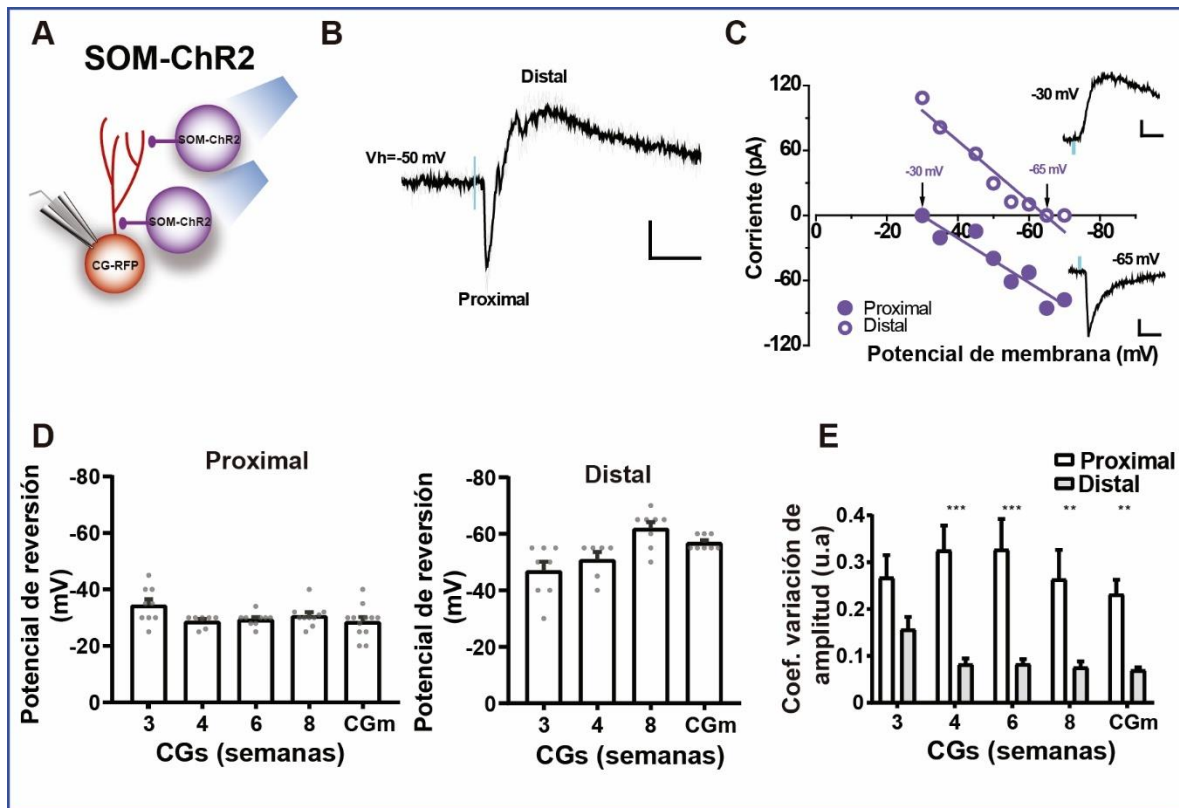


Figura r.16: Localización subcelular de las aferencias de SOM-INs (A) Esquema experimental de la estimulación por láser de SOM-INs para estudiar el destino subcelular de los contactos sinápticos. (B) Trazo representativo de la corriente inhibitoria postsináptica evocada por láser (0.2ms, barra azul). Los registros se realizaron a un potencial de reversión de -50 mV, donde se obtuvieron corrientes bi-fásicas correspondientes a la componente proximal (respuesta rápida) y distal (respuesta lenta). Escala, 20 ms, 20 pA. (C) Curva I/V construida a partir de las respuestas obtenidas en (B). El potencial de reversión para cada componente se indica con una flecha. Inset muestra las componentes aisladas en el potencial de reversión indicado. Escala, 10 ms, 20 pA. (D) Potencial de reversión evaluado en cada estadio de desarrollo de las CGs. n = 5-12 células (IPSCs-proximal) y 6-8 células (IPSCs-distal). Se compararon las respuestas por el test de Kruskal-Wallis seguido del test *post hoc* de Dunn para comparaciones múltiples contra la condición madura. $p < 0.05$ (*) y $p < 0.01$ (**). (E) Coeficiente de variación para IPSCs proximal y distal, de amplitudes de IPSCs registradas en CGs. n = 10-12 células para cada estadio y componente evaluada. La comparación estadística se realizó mediante ANOVA de dos vías seguido por el test *post hoc* de Bonferroni para comparaciones múltiples. $p < 0.001$ (***) y $p < 0.01$ (**)

De estos experimentos se concluye además que SOM-INs establecen contactos con diferente localización subcelular al menos desde la semana 3 en donde tanto la componente proximal como distal forman contactos funcionales estables lo largo del desarrollo de las CGs.

R.4 Plasticidad a corto plazo de las respuestas GABAérgicas provenientes de PV-INs

Si bien los pulsos aislados permiten realizar una buena caracterización de las propiedades sinápticas, en términos fisiológicos el disparo de las PV-INs se produce en forma de ráfagas y esto podría generar cambios en las respuestas registradas. Con el fin de estudiar si las aferencias de CGs provenientes de PV-INs presentan plasticidad a corto plazo en condiciones fisiológicas, se realizaron trenes cortos (5 pulsos a 20 Hz) (Hsu et al., 2016; Lee et al., 2016; Pardi et al., 2015). Se estimuló con láser PV-ChR2 y se realizaron registros en CGs en desarrollo. En la figura r.17A,B se puede ver el protocolo de estimulación y las respuestas IPSCs obtenidas para neuronas de 3 semanas y CGm. En los estadios más avanzados de CGs, la cinética es más rápida y la depresión más pronunciada similar a la CGm (Figura r.17C,D). Se estudió la carga de cada pico, calculada como el área bajo la curva correspondiente a la respuesta IPSCs en una ventana temporal de 50 ms. Se analizó este parámetro ya que tiene en cuenta no solo la fuerza sináptica sino también la temporalidad de la respuesta. También se cuantificó el cociente entre el área de los picos $p4-5/p1$, con el fin de evaluar la plasticidad a corto plazo durante la integración de las CGs (Figura r.17C,D). Se observó un incremento en la depresión cuantificada en el cociente, es decir que las sinapsis cambian su comportamiento luego de varios estímulos repetitivos en los estadios avanzados. Estos resultados revelan posibles modificaciones en la maquinaria de liberación presináptica a lo largo del desarrollo, que generaría una disminución de la inhibición ejercida por PV-INs frente a patrones de disparo repetitivos.

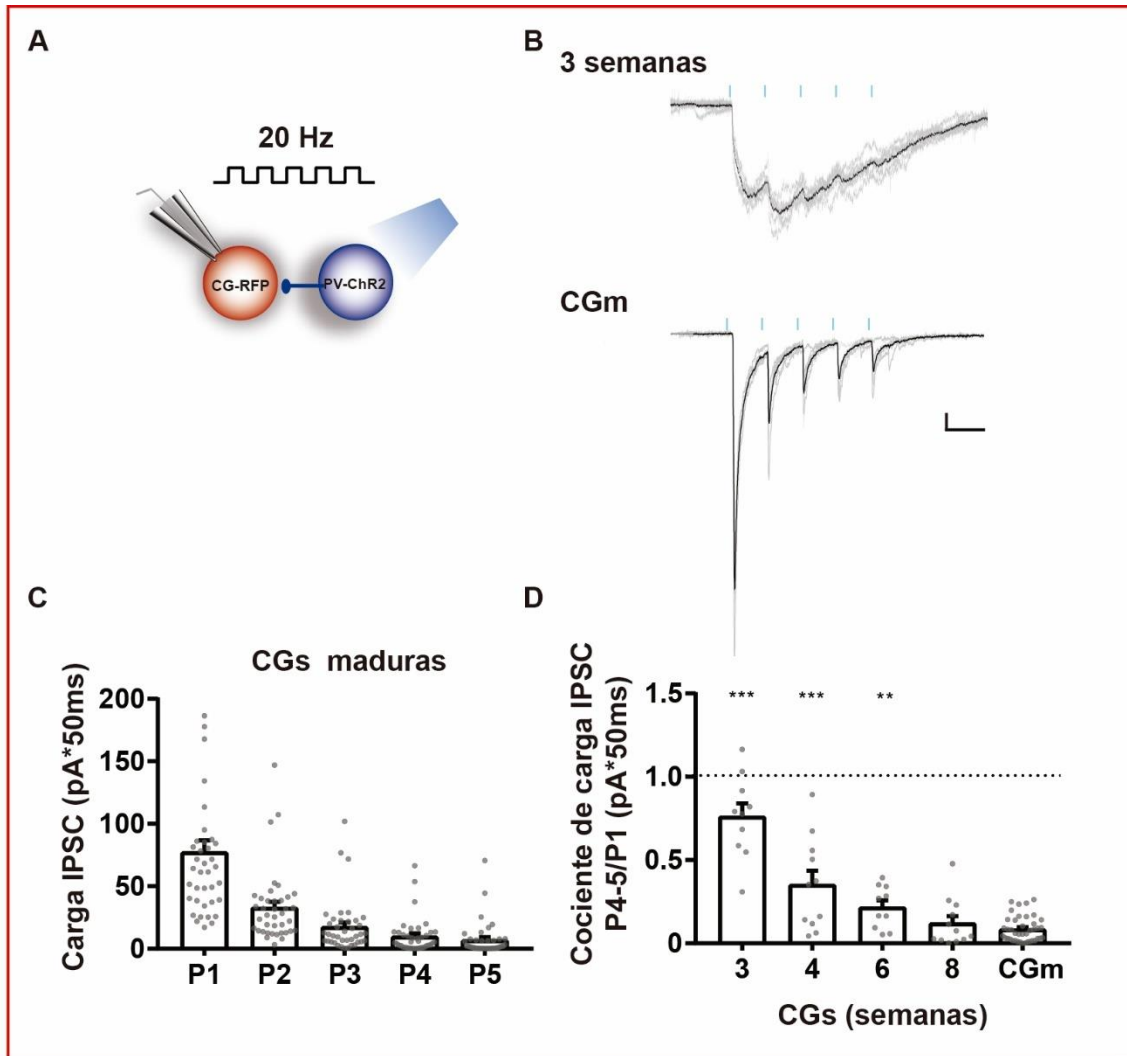


Figura r.17: Plasticidad a corto plazo en la sinapsis PV-INs→CGs. (A) Esquema experimental del registro de corrientes postsinápticas inhibitorias reclutadas por estimulación repetitiva de PV-INs (5 pulsos, 0,2ms, 20Hz). (B) Trazos ejemplo de las respuestas evocadas por trenes aplicados a baja frecuencia (0,07Hz). Los trazos grises muestran la respuesta de cada tren de estimulación y en negro la respuesta promedio de la célula registrada a 3 semanas y en CGm. Escala, 50ms, 20pA (C) Carga de la respuesta de pulsos individuales del tren (P1-P5), en CGm. (D) Cociente de la carga de IPSCs de pulsos 4 y 5 normalizados a la carga del pulso 1. n (CGs/ratones): 8-41/4-20. Se aplicó ANOVA de una vía seguido de un test *post hoc* de Bonferroni para comparaciones múltiples contra la condición madura. $p < 0.01$ (**), y $p < 0.001$ (***). Experimento realizado en colaboración con Sung M. Yang

R.5 Plasticidad a corto plazo de las respuestas GABAérgicas provenientes de SOM-INs

Teniendo en cuenta que las SOM-INs contactan a las CGs a nivel proximal y distal, discriminamos su localización mediante el E_{GABA} y efectuamos el mismo protocolo de estimulación repetitiva por trenes de 20 Hz (Figura r.17). La activación de SOM-ChR2 genera una marcada depresión en sinapsis proximales que se vuelve más pronunciada con la maduración de las CGs (Figura18A-C). En cambio, las corrientes distales mostraron una amplitud estable en cada uno de los pulsos durante toda la curva de desarrollo (Figura r.18D-F). Estos resultados muestran diferencias en la fisiología de las componentes encontradas correspondientes a las aferencias de SOM-INs.

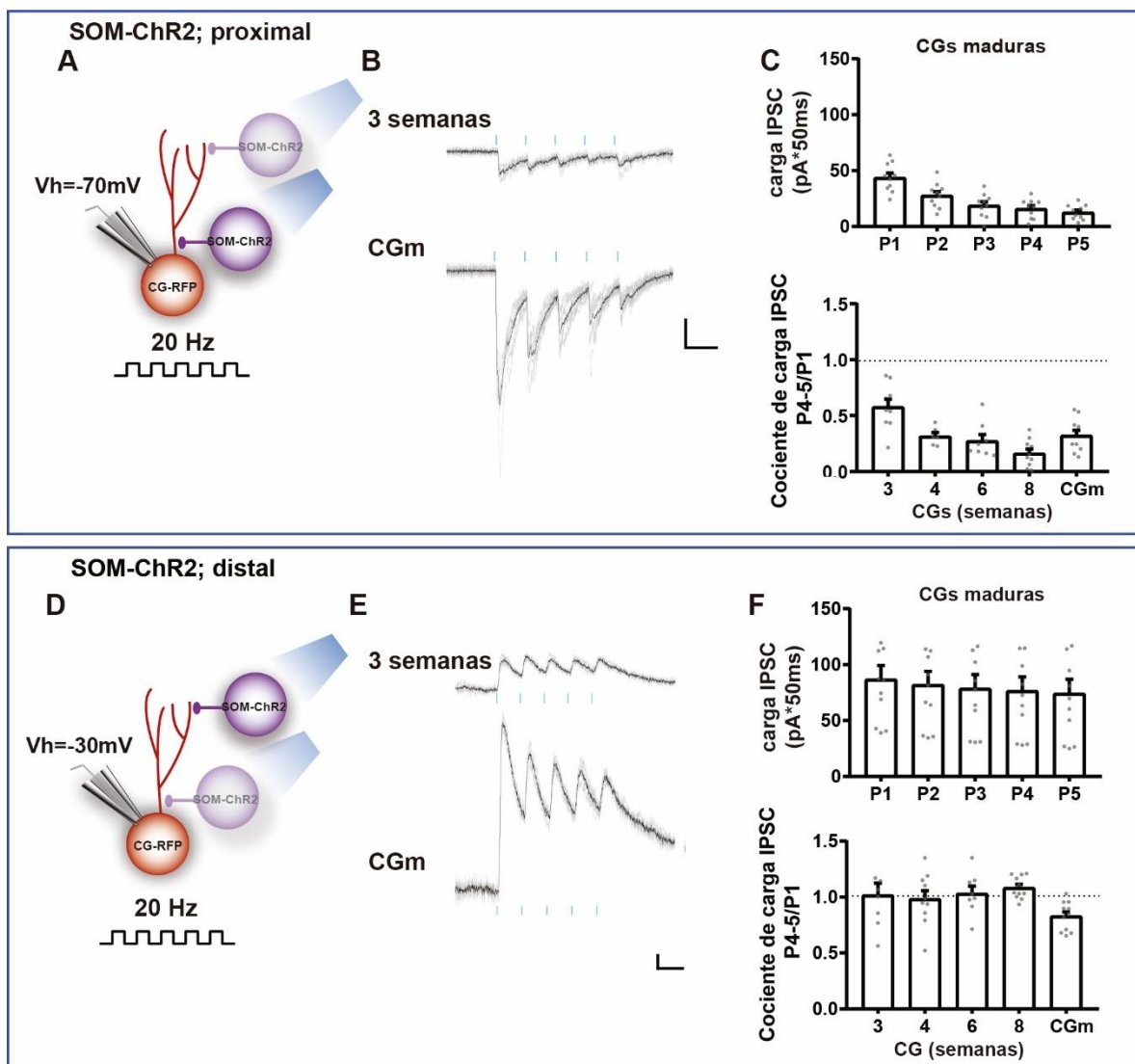


Figura r.18: Plasticidad a corto plazo en la sinapsis SOM-INs→CGs. (A) Esquema experimental del protocolo de estimulación por trenes de SOM-ChR2 y el registro de IPSCs

proximales (CGs $V_{\text{holding}} = -70$ mV). (B) Trazos representativos de IPSCs proximales, escala 50 ms, 20 pA. (C) Arriba: Cuantificación de carga medida como el área de cada pico, en una ventana temporal de 50 ms. Abajo: Cociente de carga calculado como la media de la carga de los picos 4, 5 normalizada al pico 1 en cada estadio de CGs (D) Esquema de registro de IPSCs distales (CG $V_{\text{holding}} = -30$ mV). (E) Trazos representativos de las IPSCs distales en CGs de 3 semanas y CGm. Escala 50, 20 pA. (F) Mismo análisis realizado en (C) para la componente distal. n presentado como CGs/ratones: 6-11/2-5. Se aplicó un ANOVA de una vía seguido de un test *post hoc* de Bonferroni para comparaciones múltiples contra CGm (C y F). $p < 0.01$ (**), and $p < 0.001$ (***)).

R.6 PV- y SOM-INS regulan la actividad de las células principales de la capa granular

Hemos visto que, del mismo modo en que inhiben CGm, tanto PV- como SOM-INS son capaces de inhibir CGs nuevas y mantener estables estos contactos. Nos preguntamos cuál es la relevancia de estas conexiones en el control de la actividad de la GCL del giro dentado, teniendo en cuenta que es una de las regiones menos activas del hipocampo. Para responder a esta pregunta, pareamos el estímulo lumínico para activar cada grupo de interneuronas PV/SOM-ChR2 con la estimulación eléctrica de la mPP. Se insertó un electrodo de estimulación en la mPP para estimular los axones provenientes de la corteza entorrinal, activando de esta manera la capa granular, pudiendo medir la actividad global de las CGs. Se realizaron registros de campo de potencial postsináptico excitatorio (fEPSP) de forma tal de evaluar el disparo poblacional (*pop-spike*), que representa la actividad sincronizada de las CGs que fueron reclutadas por la vía aferente. La pendiente inicial de la respuesta fEPSP está asociada a la magnitud de despolarización sináptica en las dendritas de las CGs (Figura r.19A). Se calibró la intensidad de láser para obtener una inhibición máxima del *pop-spike*. Utilizando sólo un 10% de la intensidad máxima de láser se alcanzó una inhibición casi total de la respuesta (Figura r.19B). Es interesante que esta intensidad alcanza para lograr la casi total inhibición del disparo, mientras que las corrientes inhibitorias saturan si se aplica al menos un 80% de la potencia máxima de láser (métodos), es decir que el reclutamiento de solo una proporción de interneuronas es suficiente para poder controlar casi la totalidad de la actividad global de las CGs.

Se realizó un barrido temporal en donde se pareó la estimulación eléctrica con la estimulación de láser a una potencia suficientemente elevada como para generar la inhibición máxima (20-60% de la potencia máxima). Se utilizaron distintos intervalos de tiempo (Figura r.19C), obteniendo una curva de inhibición de la GCL en función del tiempo. Se puede apreciar que las PV-INs ejercen una fuerte inhibición sobre la respuesta de pop-spike (Figura r.19 D,E). Además, la eficiencia con la que las PV-INs inhiben neuronas granulares es alta dado que un reclutamiento de PV-INs 20 ms previo al reclutamiento de CGs, es suficiente para generar una inhibición mayor a un 50%. Las SOM-INs en cambio, inhiben en un 60% la actividad de la GCL y este control inhibitorio está mucho más acotado en el tiempo (Figura r.19E). Ambas interneuronas ejercen su inhibición máxima cuando se estimulan en simultaneo con la activación de la mPP (Figura r.19F). Esto podría explicarse, si se tiene en cuenta que el mayor número de CGs activadas (la amplitud máxima del *pop-spike*) tiene cierto retraso con respecto al inicio del *pop-spike*. Esto haría más eficiente una inhibición simultánea e incluso unos milisegundos después de la llegada del estímulo excitatorio como se puede ver en la figura r.19E.

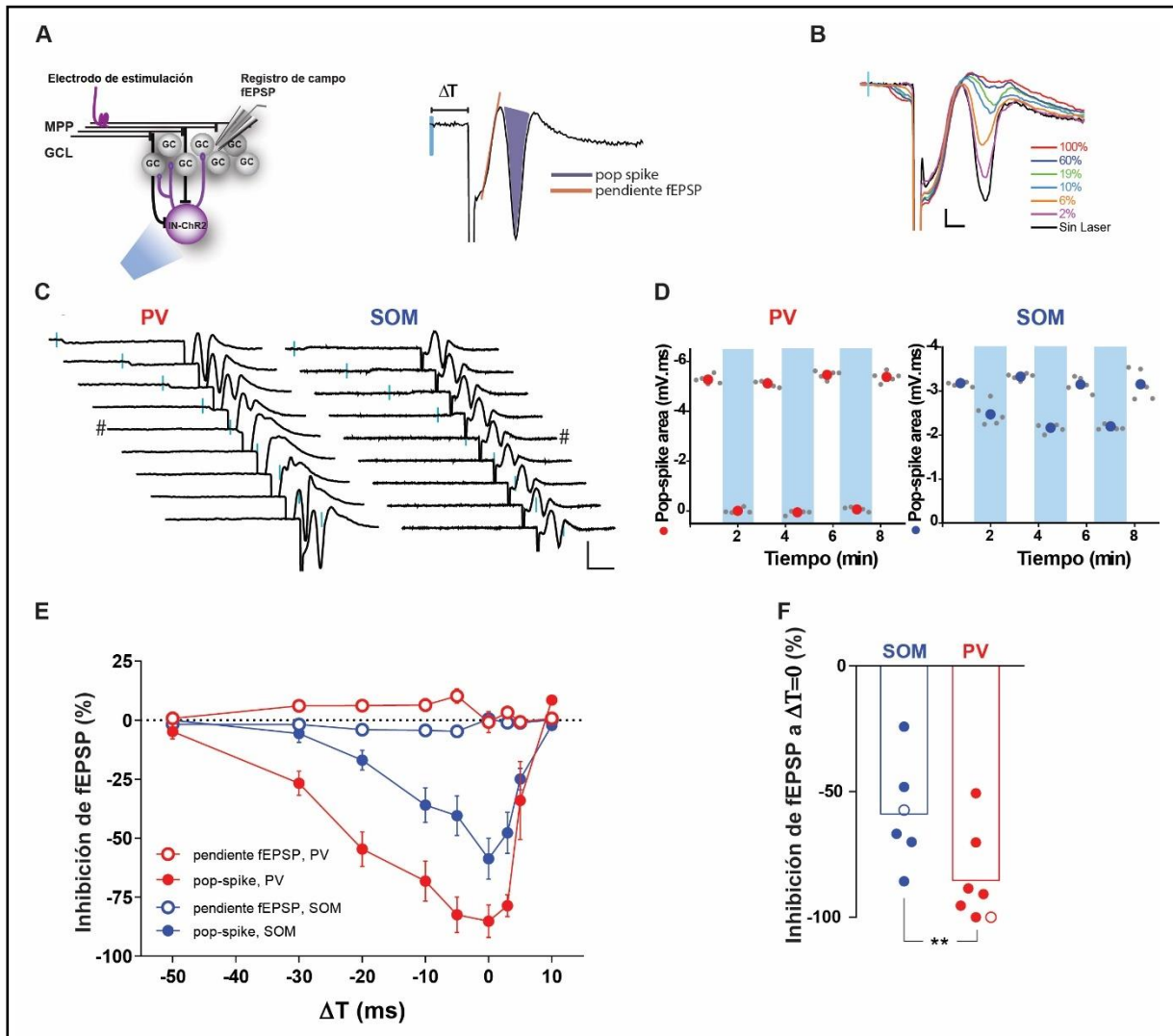


Figura r.19: Control de la GCL por PV- y SOM-INS (A) Diseño experimental para el registro de potenciales de campo. El trazo ejemplo a la derecha muestra la respuesta de campo generada por activación de los axones de mPP pareados a distintos tiempos (ΔT) con estimulación por láser para activar las interneuronas que expresan ChR2. El área sombreada es proporcional al número de neuronas activadas en la GCL (*pop-spike*). (B) Activación de PV-ChR2 mediante distintas intensidades de láser a un $\Delta T = -5$ ms. Se puede ver la inhibición del *pop-spike* reclutado por la estimulación de mPP. Escala: 0.2 mV, 2 ms. (C) Trazos representativos de registros de campo utilizando intervalos progresivos (ΔT) (desde -50 hasta +10 ms) entre la estimulación de mPP y activación de PV-ChR2 (izquierda) o SOM-ChR2 (derecha) por láser. Escala, 10 ms, 1 mV. (D) Área del *pop-spike* obtenida mediante estímulos únicos a baja frecuencia de estimulación de mPP (0.07 Hz) (columnas blancas) o mPP precedido por estimulación por láser ($\Delta T = -5$ ms; columnas azules). Los círculos coloreados representan los valores medios. (E) Cambio de la respuesta de campo inducida por estimulación por láser, se define como $100 \cdot (fEPSP_{mPP} - fEPSP_{mPP+laser}) / fEPSP_{mPP}$. $n = 7$ rodajas/6 ratones (PV-INS) y 6 rodajas/3 ratones (SOM-INS). (F) Cambio de la respuesta de campo inducida por estimulación por láser en el punto de máxima inhibición ($\Delta T = 0$). Los círculos vacíos corresponden a los trazos ejemplos marcados con # en (C). Comparaciones estadísticas se realizaron mediante el test de Mann-Whitney, $p < 0.01$ (**). Experimento realizado en colaboración con Sung M. Yang.

R.7 Modulación de la sinaptogénesis perisomática por exposición a ambiente enriquecido

La exposición aguda a un ambiente enriquecido (AE) en estadios iniciales de CGs acelera su integración mediada por PV-INs (Alvarez et al., 2016). Asimismo, el giro dentado es una región sumamente plástica que presenta cambios en la neurogénesis adulta frente a estímulos externos tales como el ejercicio físico (correr) o exposición a un AE (Bergami et al., 2015; Vivar et al., 2013). En este trabajo, hemos visto que las PV-INs ejercen una fuerte inhibición perisomática. Nos preguntamos si esta inhibición puede ser modulada por factores externos tales como exposición a AE en un estadio de desarrollo avanzado en donde las conexiones ya son funcionales. Las CGs de 4 semanas fueron registradas para estudiar las corrientes postsinápticas provenientes de PV-INs en animales control y animales expuestos a un AE durante las semanas 3 y 4 de desarrollo de las CGs (Figura r.20A,B). Se caracterizaron las respuestas IPSCs mediante dos parámetros principales: amplitud y tiempo de decaimiento. Mientras que no vemos diferencia en la amplitud, el tiempo de decaimiento es significativamente menor luego de la exposición a un AE (Figura r.20 D, E). Esto es consistente con una aceleración de la maduración de la sinapsis. Se graficó la frecuencia acumulada del tiempo de decaimiento para control y AE, obteniendo una distribución distinta para las IPSCs, consistente con una maduración funcional acelerada (Figura r.20F).

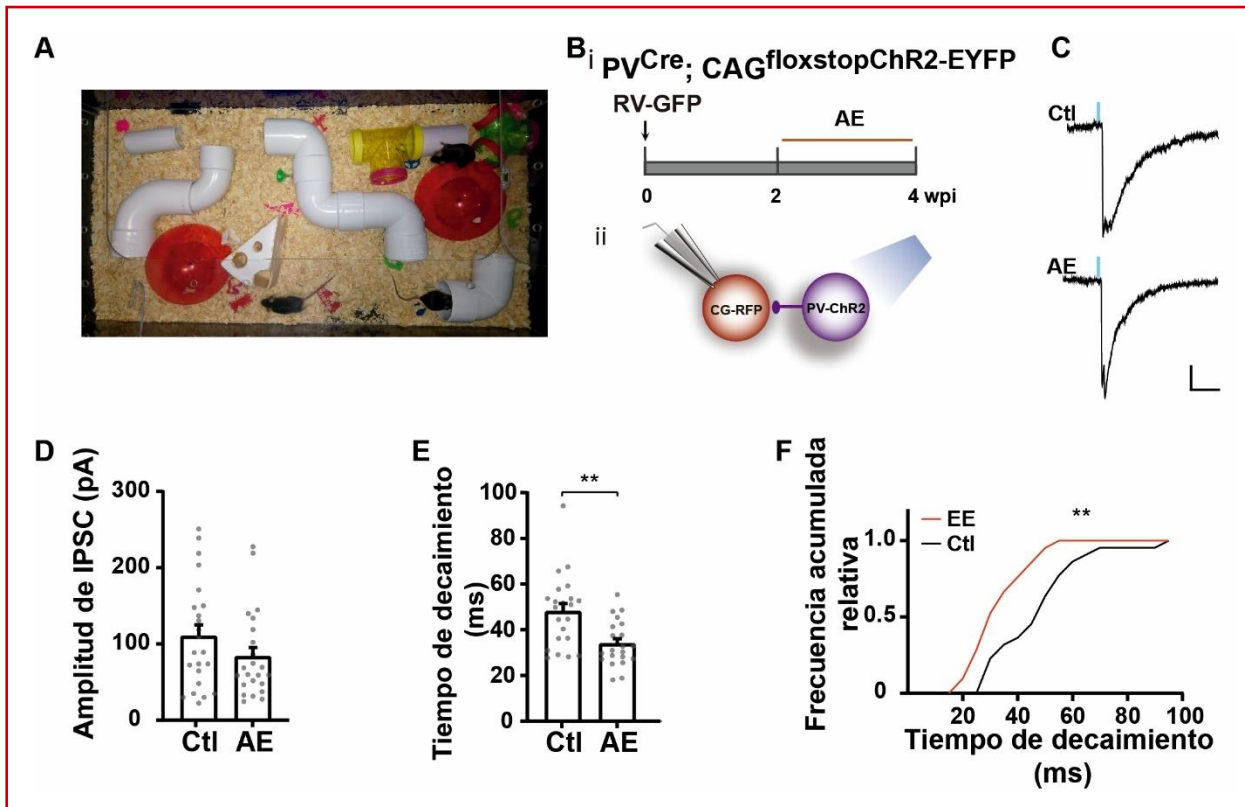


Figura r.20: Modulación de la inhibición perisomática GABAérgica por AE. (A) Foto del AE. (B) Diseño experimental. (i) RV-GFP se inyectó en ratones adultos control y expuestos a AE entre las semanas 2-4. (línea roja). (ii) Estimulación mediada por láser de PV-INS y registros de IPSCs en CGs-RFP de 4 semanas. (C) Trazos representativos de IPSCs promediados para una neurona CG de 4 semanas control o tratada, a partir de estímulos por láser (0.2ms, barra azul) aplicados a 0.07Hz. Escala, 50 pA, 50 ms. (D-E) Amplitud y cinética de IPSCs evocadas. Puntos grises corresponden a neuronas individuales. (F) Frecuencia relativa correspondiente al tiempo de decaimiento. n=13-23 células en >5 animales para control y AE. Comparaciones estadísticas se realizaron mediante el test de Mann-Whitney (D,E), $p=0.0018$ (**) y el test de Kolmogorov-Smirnov en (F), $p=0.01$ (**).

En los experimentos previos, hemos visto que la sinapsis PV-INS→CGs presenta depresión a corto plazo. Para estudiar los efectos del AE sobre la plasticidad de esta sinapsis, estudiamos mediante estimulación repetitiva a alta frecuencia, la respuesta en animales control y expuestos a AE. A partir de la respuesta obtenida por aplicación de 5 pulsos a 50 Hz, se analizó la carga total normalizada obteniendo una reducción significativa de la misma para los animales expuestos a AE (Figura r.21A,B). Se analizó también el cociente para cada uno de los picos respecto al pico 1 observando una depresión mucho más pronunciada en AE (Figura r.21C). Estos niveles de depresión mayores, son consistentes con una sinapsis más madura, lo que demuestra una aceleración en la sinaptogénesis cuando los ratones experimentan un AE.

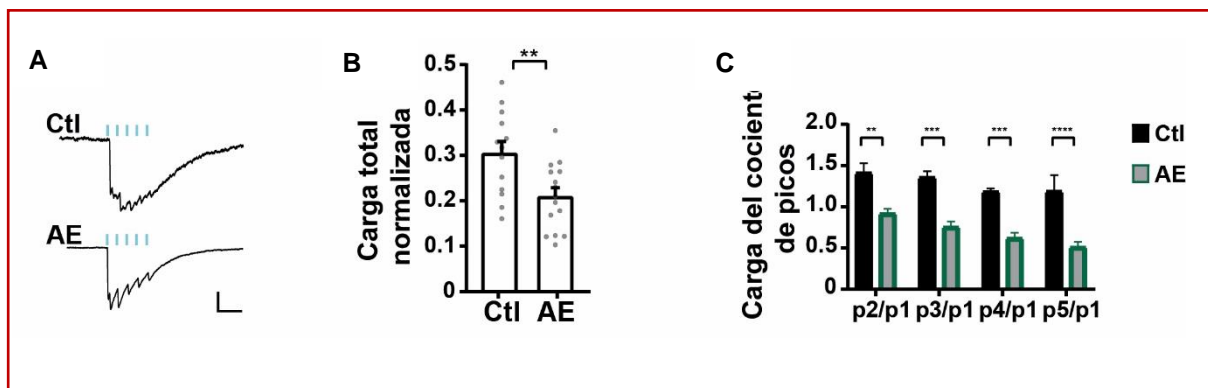


Figura r.21: Efectos del AE sobre la plasticidad de la sinapsis perisomática. (A-C) IPSCs evocados por estímulo de pulsos de láser aplicados en trenes de 5 pulsos de 50 Hz (cada tren se aplicó a baja frecuencia, 0.035 Hz). (A) Trazos ejemplo en grupo control y tratamiento. Escala, 50 ms, 50 pA. (B) Carga total medida en una ventana temporal de 340 ms, normalizada al pico máximo de amplitud de la respuesta. (C) Carga de pulsos individuales dentro de cada tren normalizados al primer pico. $n = 13-23$ células en >5 ratones para control y para AE. Estadística realizada mediante t-test (B) con $p=0.0055$ (**) y ANOVA de dos vías seguido de comparaciones múltiples por el test de Tukey (C), $p<0.01$ (**), $p<0.001$ (***) y $p<0.0001$ (****).

R.8 Estudio de la integración sináptica eferente

Las CGs no solo reciben aferencias inhibitorias, sino que también son capaces de reclutar inhibición (Henze et al., 2014). En los últimos años se han estudiado a las CGs nacidas en el hipocampo adulto, observando que las eferencias de las mismas también forman contactos funcionales con interneuronas GABAérgicas (Temprana et al., 2015, Restivo et al., 2015, Laplagne et al., 2006). Sin embargo, se desconoce la identidad de las interneuronas inhibitorias que las mismas reclutan y su desarrollo temporal. Con el objetivo de estudiar si las PV- y SOM-INs que participan en la integración aferente de CGs son también reclutadas por las CGs nuevas, utilizamos en este caso un RV-ChR2-GFP en cohortes de neuronas nuevas que se estudiaron en diferentes estadios (3-11 semanas). La activación de las neuronas nuevas se realizó mediante optogenética. Para calibrar la estimulación por láser ejercida sobre las CGs nuevas, se partió del tiempo mínimo de estimulación (0.2ms) en el cual se encontró respuesta para las interneuronas (Figura r.10). Como en estas condiciones no se obtuvieron respuestas reproducibles, se incrementó la duración del estímulo hasta obtener respuestas confiables con pulsos de 1 ms a una intensidad de láser que genere una respuesta postsináptica saturante (Figuras r.22,r.24).

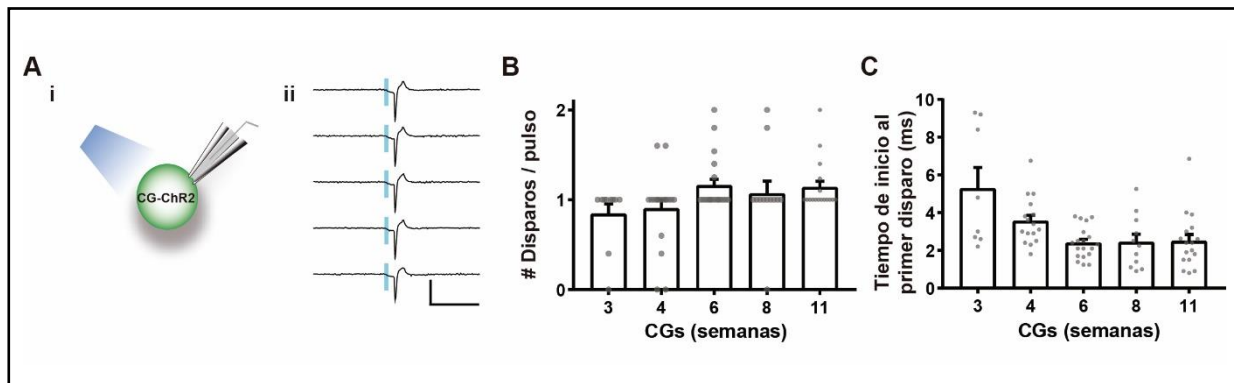


Figura r.22: Activación de CGs por optogenética (A) (i) Esquema experimental muestra el registro de CGs-ChR2 que son estimuladas por optogenética. (ii) Trazos representativos obtenidos mediante *cell-attached* en CGs-ChR2 muestran la actividad de CGs a partir de pulsos únicos de láser (1ms, 0.07Hz, barras azules). Cada trazo representa un ensayo de pulso de láser aplicado a una CG de 4 semanas. Escala, 10 ms, 50 pA. (B) Número total de disparos en cada estadio de CGs. (C) Tiempo de inicio al primer disparo generado en CGs-ChR2. Círculos grises corresponden a neuronas. n= 10-19 neuronas en 5-9 ratones.

Las respuestas postsinápticas se registraron en PV- y SOM-INs que expresan el reportero tomato, en ratones $PV^{Cre};CAG^{floxstop-tdTomato}$ y $SOM^{Cre};CAG^{floxstop-tdTomato}$. En la figura r.23 se puede ver el sistema de marcación utilizado para estudiar la sinaptogénesis eferente de CGs. Se inyectó RV-ChR2 en CGs (verde) en este caso de 6 semanas y la expresión de tomato en PV- y SOM-INs permite detectarlas (rojo).

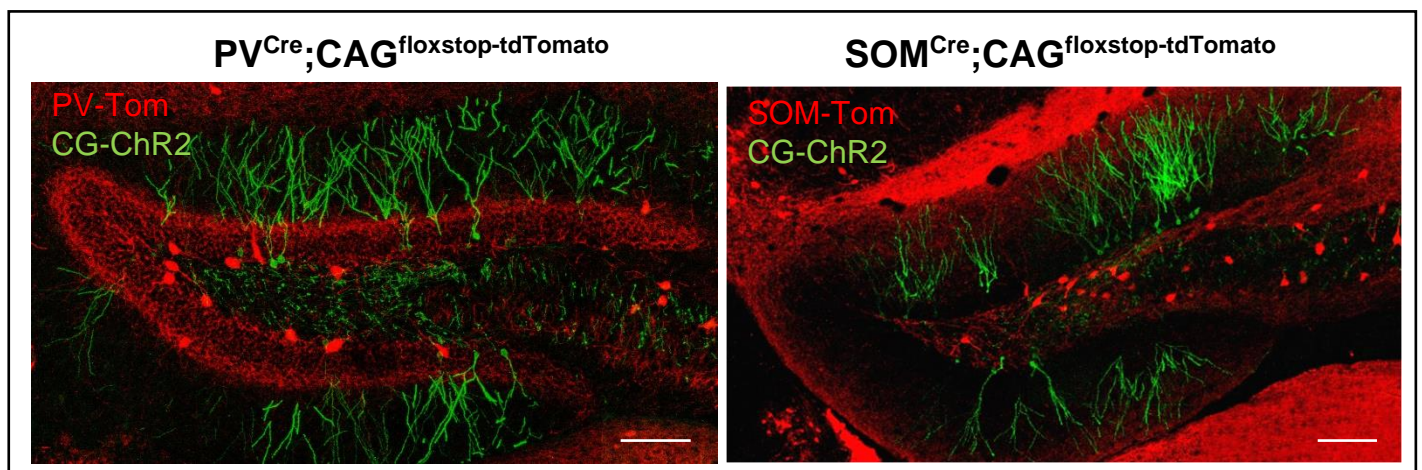


Figura r.23: Marcación de CGs e interneuronas PV- y SOM-INs Izquierda: Imagen confocal de una sección hipocámpal de 60µm, muestra las PV-INs (rojo) y CGs de 6 semanas expresando GFP-ChR2 (verde) en un ratón $PV^{Cre};CAG^{floxstop-tdTomato}$ (ML: capa molecular; H: hilus). Escala, 100 µm. Derecha, Imagen confocal correspondiente en este caso a un ratón $SOM^{Cre};CAG^{floxstop-tdTomato}$. Escala, 100 µm.

R 8.1 Integración de la sinapsis CGs→PV-INs

Realizamos un mapa temporal de las eferencias de las CGs sobre las PV-INs para estudiar la función de las CGs nuevas y el control de la inhibición local a medida que se desarrollan e integran. La activación de las CGs se realizó mediante pulsos de láser (Figura r.22) y se registraron corrientes postsinápticas excitatorias (EPSCs).

Las respuestas postsinápticas registradas en PV-INs se observaron recién a partir de la semana 4 (Figura r.24). Dado que las primeras conexiones funcionales eferentes se desarrollan más tarde que las conexiones aferentes, extendimos el estudio hasta la semana 11, para dar lugar a que se llegue a un plateau de conectividad de mayor eficacia a tiempos tardíos. Sin embargo, a la semana 6 se alcanzó el máximo de conectividad para esta sinapsis, coincidente con lo analizado para las aferencias de CGs provenientes de PV-INs. Se obtuvo así un máximo de probabilidad de conexión de CGs a PV-INs de aproximadamente 70 % (Figura r.25E). En la figura r.24A,B, se muestran el esquema experimental y los trazos representativos de EPSCs obtenidos en CGs de 4 y 8 semanas. Se analizó la amplitud de la respuesta obteniendo un pico máximo a la semana 6, coincidente con la máxima conectividad (Figura r.24C). Se analizaron los parámetros cinéticos tiempo de crecimiento, tiempo de decaimiento, ancho y latencia de la respuesta. La cinética de la respuesta no varía entre los distintos estadios de CGs lo que indica que la maquinaria sináptica no cambia a lo largo de la maduración (Figura r.24D-F). Esto puede deberse a que las neuronas postsinápticas (PV- y SOM-INs) son neuronas maduras, con lo cual su maquinaria sináptica podría estar completamente desarrollada. La latencia es de alrededor de 5 ms por lo que se puede considerar una respuesta de tipo monosináptica (Figura r.24G). Se utilizó un protocolo de estimulación repetitiva por trenes de 20 Hz y se evaluó la respuesta. Este protocolo se aplicó para estudiar la sinapsis en condiciones fisiológicas, teniendo en cuenta que las CGs pueden generar distintos patrones de actividad. En las figura r.25A,B se puede ver el esquema experimental y los trazos representativos correspondientes a cohortes de CGs de 4 y 11 semanas. Se cuantificó la carga para obtener información acerca de la fuerza sináptica y la temporalidad de la respuesta correspondiente a cada pico, como se muestra en la figura r.25C para la cohorte de 11 semanas. A partir del estudio de la carga de cada uno de los picos, se cuantificó el cociente entre los mismos: P1, P2-3 y P4-5 en relación al pico 5 (P5) de

forma tal de evaluar la plasticidad de la sinapsis a corto plazo. El cociente obtenido es menor a uno, lo que indica que la sinapsis facilita frente a estímulos de 20 Hz, a excepción de la cohorte más joven (CGs de 4 semanas) en donde las respuestas postsinápticas muestran depresión (Figura r.25D). Esta diferencia en la plasticidad a corto plazo puede deberse a la fisiología de la maquinaria presináptica, en donde en un estadio de 4 semanas, las CGs son todavía inmaduras lo que podría verse reflejado en un menor pool vesicular disponible, llevando a una depresión sináptica frente a estimulación repetida.

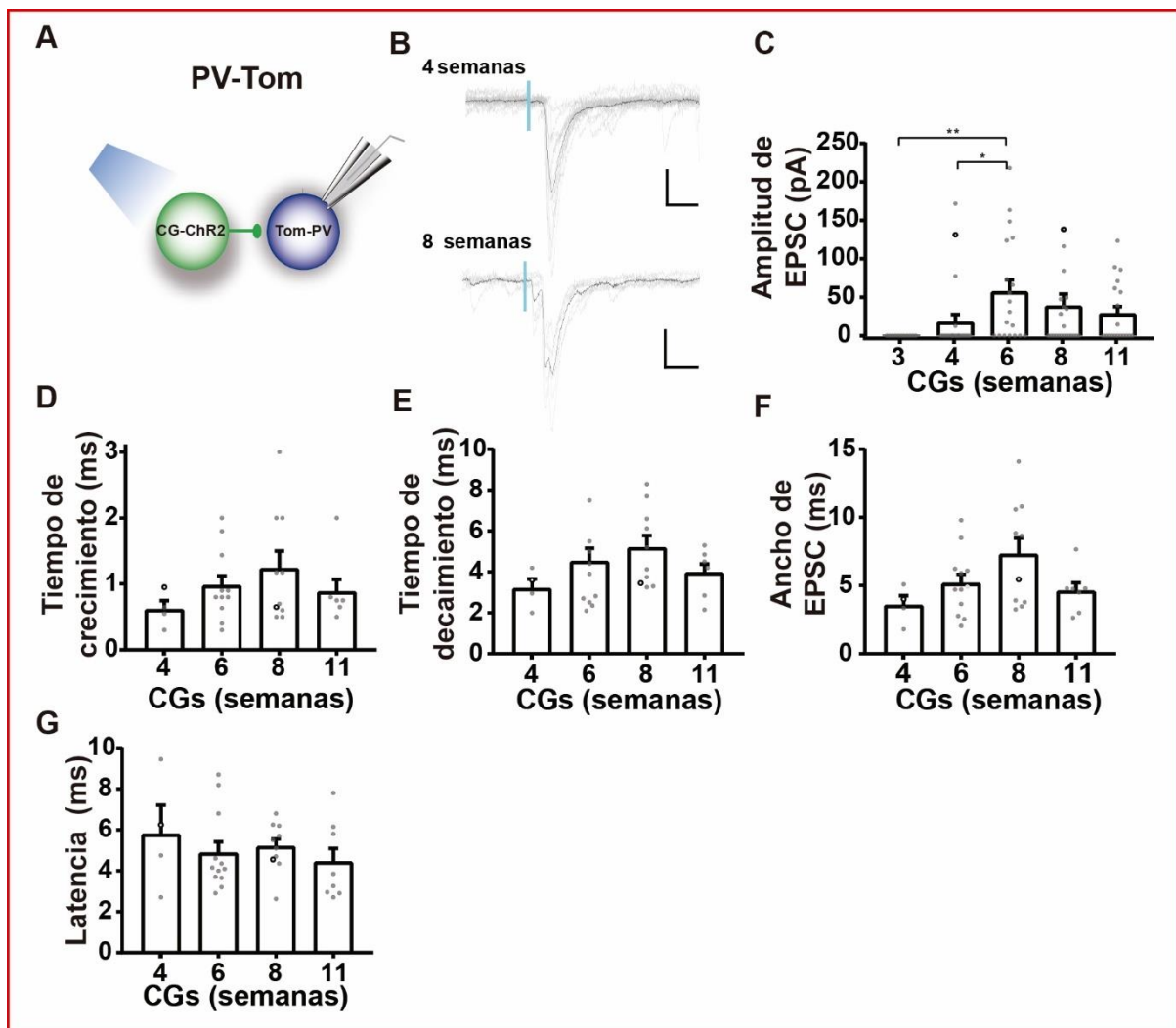


Figura r.24: EPSCs evocadas en PV-INs por activación de CGs-ChR2 (A) Esquema experimental muestra la estimulación de CGs-ChR2 y el registro de interneuronas PV-Tom (B) Registros de corrientes postsinápticas excitatorias de PV-INs, evocados por láser en CGs de 4 y 8 semanas. En gris se representan todos los trazos y en negro el promedio correspondiente a una neurona. Escala, 10 ms, 50 pA. (C) Amplitud máxima de corriente medida en cada estadio de CGs. Los círculos negros corresponden a los trazos ejemplo. Se realizó el test de Kruskal-Wallis seguido del test de múltiples comparaciones de Dunn. $p < 0.05$ (*) y $p < 0.01$ (**). (D-G) Análisis de la cinética de las corrientes excitatorias evocadas

por pulso único, registradas en PV-INs para cada estadio de desarrollo. Se muestra (D) tiempo de crecimiento, (E) tiempo de decaimiento, (F) ancho de EPSC, (G) latencia. N= 11-23 neuronas en 5-9 ratones.

Teniendo en cuenta que se detectaron eferencias funcionales de CGs recién a la 4^{ta} semana, se analizó el éxito en la conectividad que podría correlacionarse con un incremento en el número de sinapsis funcionales durante la maduración. Se puede observar que la conectividad se incrementa sustancialmente a partir de la semana 6 y en algunos casos neuronas silentes para un pulso único son capaces de responder a trenes (barras rayadas), posiblemente debido a mecanismos de facilitación mencionados previamente (Figura r.25E).

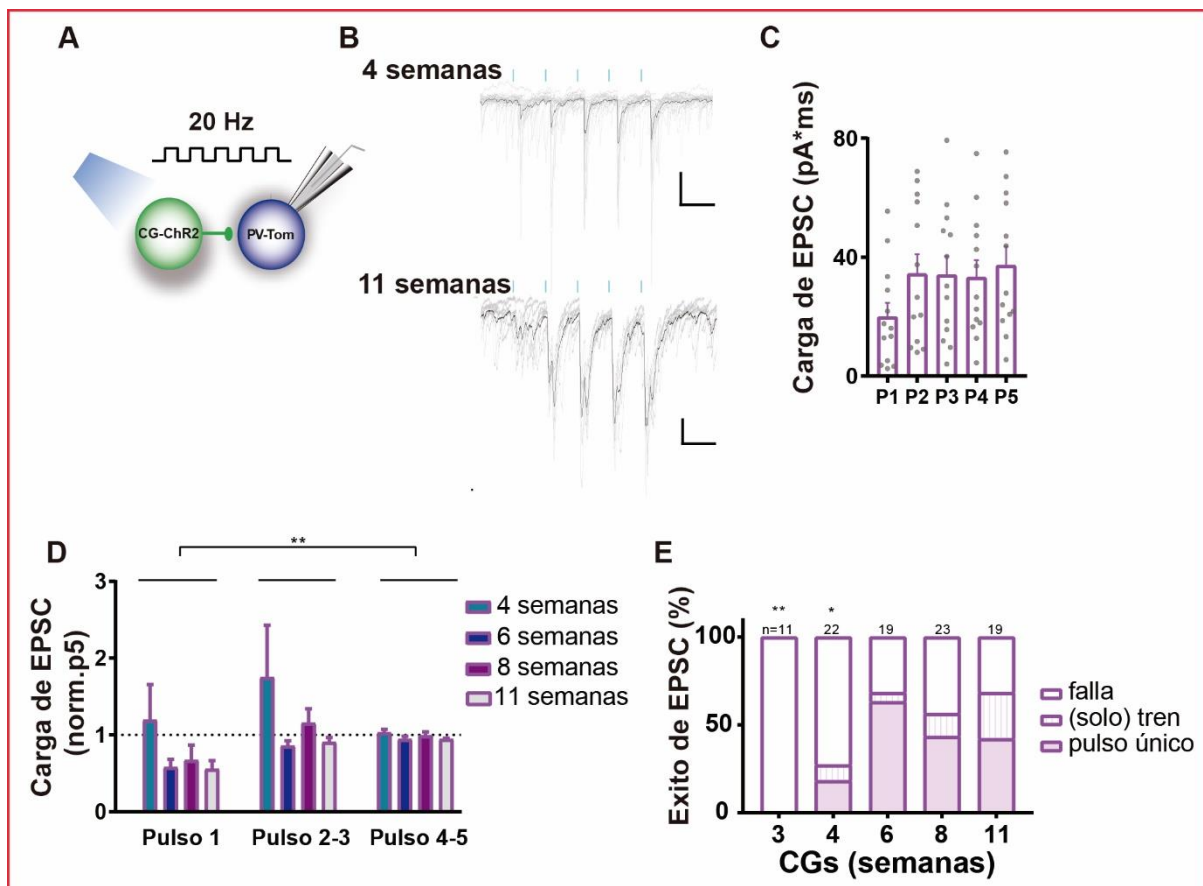


Figura r.25: Plasticidad a corto plazo en la sinapsis CG→PV-INs (A) Esquema experimental muestra la estimulación por optogenética de CGs-ChR2 y el registro de EPSCs en interneuronas PV-Tom. (B) Trazos de EPSCs obtenidas en PV-INs luego de estimulación por trenes de CGs de 4 y 11 semanas. (tren de 5-pulsos a 0.07 Hz, 1 ms, 20 Hz). En gris se representan los trazos individuales mientras que en negro se representa el promedio de los trazos para una neurona individual. Escala 50 ms, 50 pA. (C) Carga de EPSC para cada pulso individual (P1-P5) aplicado sobre CGs de 11 semanas. Los círculos corresponden a neuronas individuales. (D) Carga de la corriente postsináptica en los pulsos (p1, p2-3, p4-5) normalizada

al 5^{to} pulso (P5) para cada estadio de CGs reclutadas mediante optogenética. (E) Proporción de PV-INs que presentan respuestas postsinápticas luego de activar a las CGs por pulso único (barra rellena) o por trenes (barra rayada). Se puede ver que en algunos casos las sinapsis solo responden a la estimulación por trenes y no por pulso único. El número total de PV-INs registradas se muestra sobre cada columna ($n = 5 - 9$ ratones). Estadística realizada por ANOVA de dos vías seguido del test de Tukey (D) y el test exacto de Fisher contra el grupo de 11 semanas. (E). $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) y $p < 0.001$ (***). Experimento realizado en colaboración con Sung M. Yang.

R 8.2. Integración de la sinapsis CGs→SOM-INs

Se encontraron sinapsis funcionales CGs→SOM-INs a partir de la semana 4, coincidente con la sinapsis funcional que forman las eferencias de CGs sobre PV-INs. Sin embargo, la eficiencia de conectividad en el reclutamiento de SOM-INs está muy reducida, alcanzando recién a la semana 8 una conectividad máxima que se vio sustancialmente incrementada por sinapsis silentes a pulso único que fueron activadas por estimulación por trenes (mas del 50% de las neuronas, Figura r.27E). En la figura r.26A se puede ver el esquema experimental en donde CGs que expresan ChR2 se activan mediante pulsos de láser y se registran EPSCs en SOM-INs. Los trazos representativos muestran la respuesta postsináptica frente a pulso único para neuronas de 6 y 8 semanas (Figura r.26B). Se evaluó la amplitud de la respuesta obteniendo valores en su mayoría menores a 50 pA (Figura r.26C). Esto puede deberse por un lado, a que mediante la técnica de marcación, se obtiene una pequeña cohorte de CGs de una edad determinada que además podría estar subrepresentada por la eficiencia de infectividad de las partículas retrovirales del RV-Ubi-ChR2 generando respuestas chicas. Sin embargo, la misma técnica se ha utilizado para estudiar la sinapsis CGs→PV-INs obteniendo EPSCs del doble de amplitud. Las CGs podrían presentar diferencias en los pools de vesículas disponibles para cada blanco de INs así como diferencias en el número de contactos que forman sobre cada identidad de INs. En línea con esto, se ha reportado que la probabilidad de conectividad funcional entre CGs→PV-INs es de un 11 % mientras que la probabilidad de encontrar conexiones entre CGs→SOM-INs es sustancialmente menor, 1,4% (Espinoza et al., 2018). Nuestros resultados son consistentes con este reporte en donde un menor número de conexiones podría explicar la menor amplitud de EPSCs detectadas en SOM-INs.

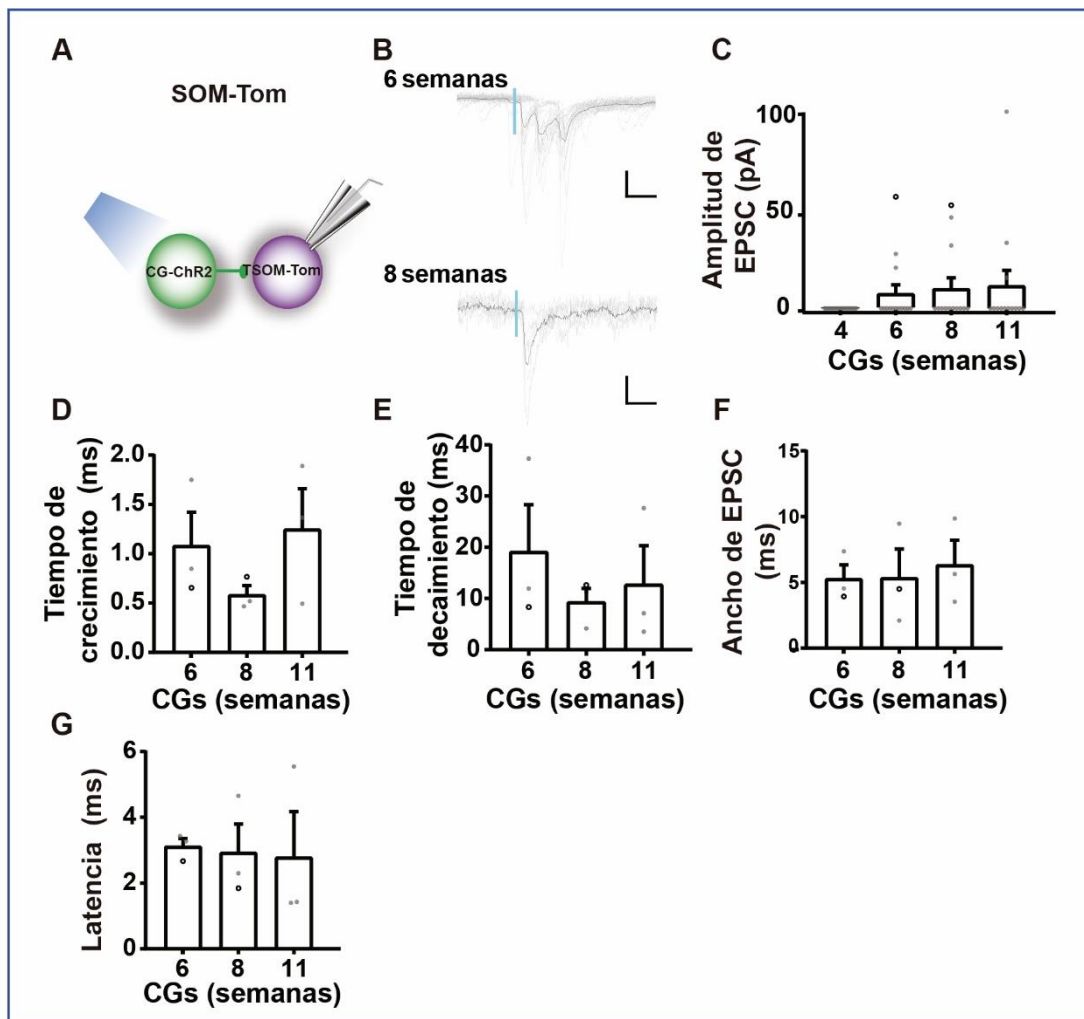


Figura r.26: EPSCs evocadas en SOM-INs por activación de CGs-ChR2 (A) Esquema experimental muestra el registro de EPSCs en interneuronas SOM-Tom. (B) Trazos de SOM-INs muestran EPSCs luego de la estimulación de CGs a 6 y 8 semanas. Escala, 10 ms, 50 pA (arriba) y 25 pA (abajo). (C) Amplitud máxima obtenida para EPSCs en cada estadio de CGs. Círculos negros corresponden a los trazos ejemplos en (B). (D-G) Se analizaron los parámetros cinéticos de las EPSCs registradas en interneuronas SOM-Tom. (D) Tiempo de crecimiento, (E) tiempo de decaimiento, (F) ancho, (G) latencia de EPSCs. $n = 12-17$ células en 2-7 ratones.

Se estudió la cinética de la respuesta a partir de las respuestas normalizadas. Se analizó el tiempo de crecimiento, el tiempo de decaimiento, el ancho y la latencia de EPSCs (Figura r.26D-F). A partir de los primeros tres parámetros estudiados se puede ver que la cinética no cambia, esto es consistente con el hecho de que la maquinaria

postsináptica presente en las SOM-IN está completamente madura siendo que las mismas son de origen embrionario. Al igual que las eferencias formadas con PV-INS no esperábamos obtener cambios en los parámetros cinéticos ya que típicamente las sinapsis glutamatérgicas establecen una cinética casi madura cuando se forman. Esto fue reportado en el trabajo de Hsia et al., 1998, en donde el grado de conectividad entre los pares de células CA3→CA1 se incrementa con la maduración mientras que no involucra modificaciones en cada sinapsis individual. Por otra parte, la latencia es de alrededor de 3 ms y esto sería consistente con la formación de contactos monosinápticos entre CGs y SOM-INS (Figura r.26G).

Teniendo en cuenta que en condiciones fisiológicas la actividad neuronal no se presenta a modo de espigas únicas sino en forma de trenes de disparos con patrones no repetitivos, se realizó el mismo protocolo de estimulación por trenes aplicado anteriormente (Figura r.25) de forma tal de estudiar la plasticidad en la sinapsis CGs→SOM-INS. En la figura r.27A,B se pueden ver el esquema experimental y los trazos representativos para dos estadios distintos (4 y 11 semanas). Se cuantificó la carga para cada pulso normalizada a una ventana temporal de 50 ms, como se muestra para el estadio de 11 semanas (Figura r.27C). Utilizando ese parámetro fue posible calcular el cociente entre los picos P1, P2-3 y P4-5 en relación al pico 5 (P5) pudiendo detectar que estas sinapsis presentan facilitación al menos desde la semana 8 (Figura r.27D).

Por otra parte, se analizó el éxito en la conectividad para cada estadio de las CGs. En este caso se consideró la respuesta evocada por pulso único o las respuestas generadas solamente si se aplica una estimulación repetitiva en trenes. Como se puede ver, el éxito en la respuesta a pulso único se mantiene baja y no varía con el desarrollo mientras que crece sustancialmente durante la estimulación por trenes de CGs de estadios avanzados (Figura r.27E). A partir de nuestros resultados podemos concluir que las SOM-INS son reclutadas de forma eficiente por CGs de al menos 8 semanas frente a estímulos repetitivos mientras que una actividad aislada no es capaz de reclutarlas al menos en las condiciones experimentales del presente trabajo.

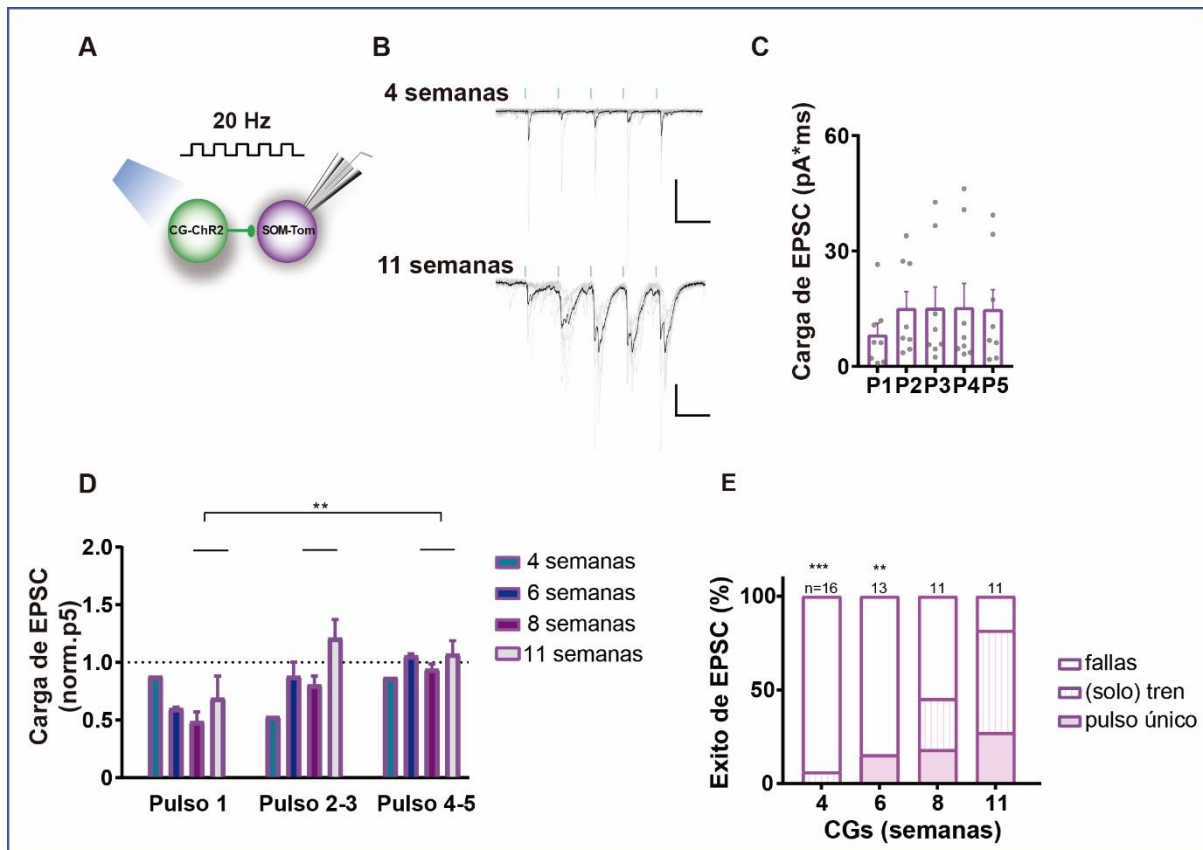


Figura r.27: Plasticidad a corto plazo en la sinapsis CGs→SOM-INS (A) Esquematación de la activación de CGs-ChR2 mediante optogenética y el registro de las corrientes postsinápticas en interneuronas SOM-Tom. (B) Trazos representativos de las corrientes postsinápticas registradas. En gris se muestran los trazos individuales y en negro el promedio correspondiente a una neurona. Escala, 50 ms, 50 pA. (C) Carga de los pulsos individuales obtenidos a partir de la estimulación por trenes en CGs de 11 semanas. (D) Carga de las respuestas de EPSC para los pulsos (p1, p2-3 y p4-5) normalizadas a la carga del pulso 5 (P5). (E) Proporción de SOM-INS que responden frente a la activación de CGs (n = 2 - 7 ratones). Teniendo en cuenta que la sinapsis CGs-SOM-INS presenta facilitación, se puede ver que en algunos casos las sinapsis solo responden a la estimulación por trenes y no por pulso único incrementando significativamente la proporción de neuronas con respuesta. Estadística realizada mediante ANOVA de dos vías seguido del test *post hoc* de Tukey (D) y se aplicó el test exacto de Fisher contra el grupo de 11 semanas (E). $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) y $p < 0.001$ (***)

R.9 Integración en la fisiología del circuito inhibitorio: PV-INS

Hemos visto que las CGs nuevas no solo reciben aferencias de dos grupos principales de INs sino que también contactan a las interneuronas durante el proceso de integración. Teniendo en cuenta esto, nos propusimos caracterizar a nivel más global la inhibición de cada población de interneuronas, en el contexto de los circuitos inhibitorios locales conocidos como inhibición FBI y FFI (Andersen et al., 1966,

Sloviter 1991, Cobb et al., 1995, Pouille y Scanziani 2001, Lawrence y McBain 2003). Con el fin de disectar los componentes que integran los circuitos FBI y FFI, se aplicó un estímulo eléctrico sobre la mPP y se registró el *pop-spike* pareado con el registro intracelular de PV-INs. En la figura r.28, se puede ver el esquema experimental y los trazos representativos con la correspondiente escala temporal y la cuantificación total. Todas las PV-INs registradas se activan dos veces (Figura r.28A-C), ya que generan una espiga antes del *pop-spike* y después del mismo. Esto podría interpretarse de dos maneras. La primera sería que las PV-INs tienden a disparar de manera múltiple frente a un único estímulo. La segunda alternativa sería que la actividad de CGs sea capaz de reclutar PV-INs, provocando el segundo disparo. Para testear esto, se suministró en el baño DCG-IV, un agonista de los receptores glutamatérgicos metabotrópicos de tipo II (mGluRII) que actúa a nivel presináptico en las CGs, reduciendo la probabilidad de liberación en los terminales de las mossy fibers (Kamiya et al., 1996). Se puede ver que en presencia de DCG-IV el *pop-spike* y el segundo disparo de las PV-INs se ven afectados mientras que la subsecuente aplicación de KYN, antagonista de receptores glutamatérgicos de tipo ionotrópicos, bloquea todas las respuestas glutamatérgicas (Figura r.28D). A partir de estos experimentos podemos concluir que la primera espiga se genera por la estimulación directa de la mPP sobre las PV-INs, mientras que la segunda espiga registrada en la misma PV-INs es provocada por la activación de las células granulares (Figura r.28D,E).

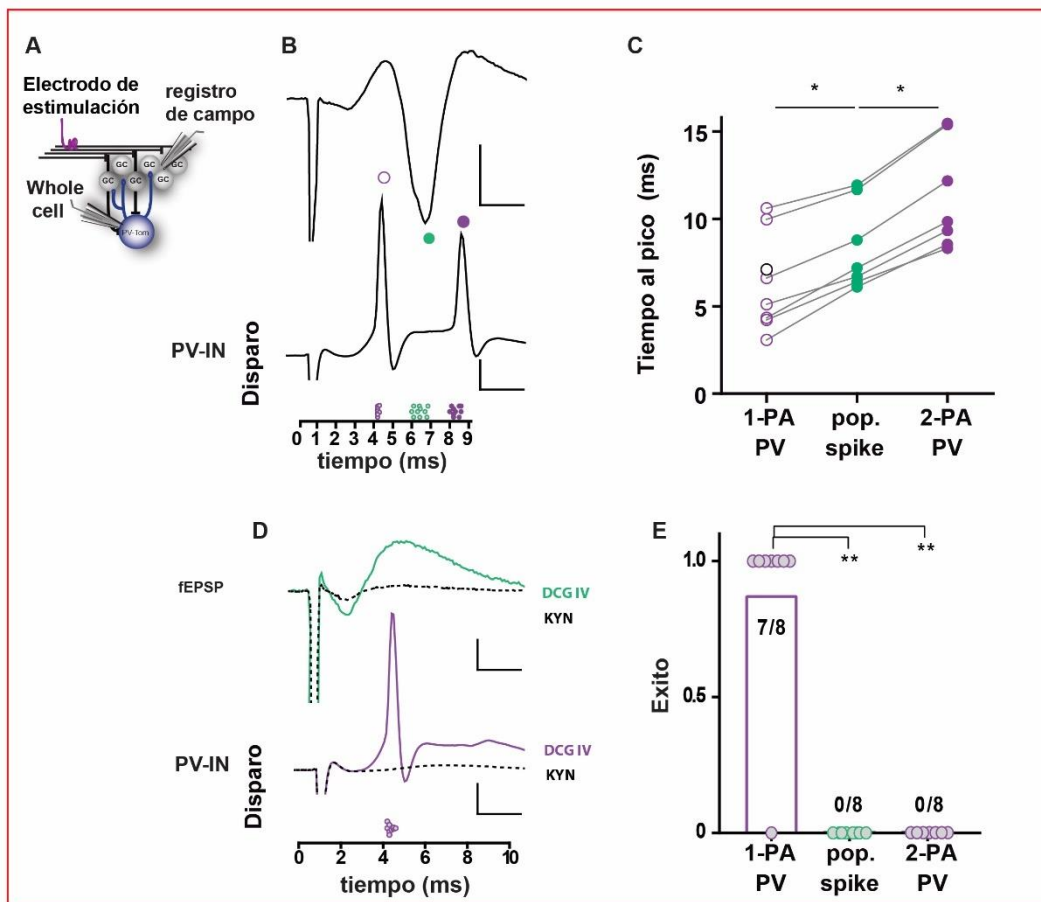


Figura 1.28: Microcircuitos de PV-INs (A) Esquema experimental: se realizaron registros en simultáneo de campo en la capa granular y registro intracelular en PV-INs para estudiar la respuesta proveniente de la estimulación eléctrica de la vía media perforante. (B) Trazos representativos, muestran el registro de campo (arriba) y registros de *whole-cell* en PV-INs (abajo), ubicados en la escala temporal donde también se muestra la ubicación de la espiga del resto de las células registradas. Escala, 2 ms, 1 mV (arriba), 20 mV (abajo). (C) Tiempo al pico de los registros individuales. $n=8$ PV-INs, 7 rodajas, 5 ratones. Estadística realizada mediante el test de Friedman seguido de Wilcoxon matched-pairs signed rank, $p<0.05$ (*). (D) Trazos representativos en presencia de DCG-IV (trazo verde) previene la actividad de las CGs y consecuentemente la segunda espiga de PV-INs desencadenada por la actividad de la capa granular (trazo violeta). La presencia de KYN (6 mM) suprime la actividad (trazos negros discontinuos). Escala, 2 ms, 0.5 mV (arriba), 20 mV (abajo). (E) Tasa de éxito en la actividad neuronal en presencia de DCG-IV. Se muestra el número de casos (positivo/total). Estadística realizada mediante el test exacto de Fisher, $p<0.01$ (**). Experimentos realizados en colaboración con Sung M. Yang.

R.10 Integración en la fisiología del circuito inhibitorio: SOM-INs

Realizamos un experimento similar pero registrando SOM-INs, que se visualizan por la expresión de la proteína fluorescente tomate en un ratón $SOM^{Cre};CAG^{floxstop-tdTomato}$.

En este caso se registraron SOM-INS mediante la técnica de *loose-patch* con el fin de evaluar su actividad evitando modificar el medio intracelular (Figura r.29 A). Se realizó el mismo protocolo de estimulación que se llevó a cabo en la figura r.28A, obteniendo los registros representativos que se muestran en la figura r.29B, en donde la mayoría de las SOM-INS registradas se activaron luego de la respuesta global de la capa granular. La cuantificación muestra la respuesta temporal y el número total de neuronas registradas (Figura r.29C). A partir de estos resultados podemos concluir que las SOM-INS son principalmente reclutadas por las CGs del giro dentado.

Estos resultados junto con los resultados previos en donde encontramos aferencias y eferencias funcionales de CGs nuevas con PV- y SOM-INS nos llevan a concluir que las CGs nuevas en estadios avanzados se integran a los circuitos locales inhibitorios. En particular FFI y FBI mediado por PV-INS y FBI mediado por SOM-INS.

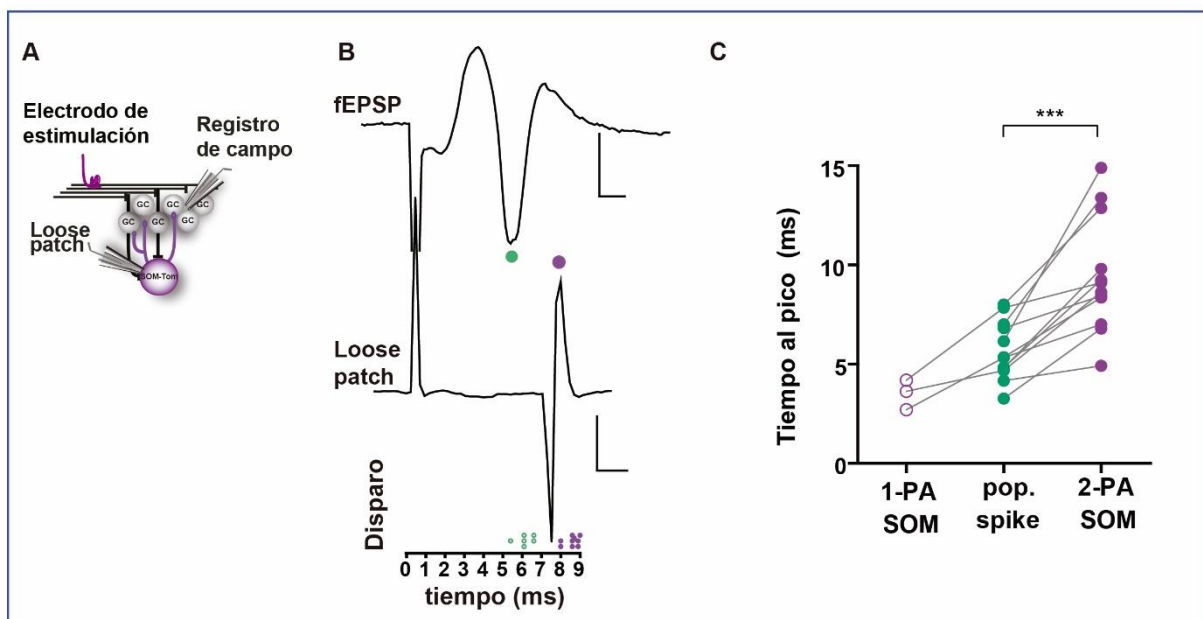


Figura r.29: Microcircuitos de SOM-INS (A) Esquema experimental. (B) Trazo ejemplo de la respuesta de potencial excitatorio postsináptica de campo (fEPSP) (arriba) y del registro de actividad mediante *loose-patch* en SOM-INS (abajo), ambos ubicados en la escala temporal, donde se ubican el resto de las neuronas registradas. Escala, 2 ms, 1 mV (arriba), 100 pA (abajo). (C) Tiempo al pico de los disparos individuales. n=12 SOM-INS, 10 rodajas, 10 ratones. Se aplicó el test de Wilcoxon matched-pairs signed rank, $p < 0.001$ (***)

Discusión

D.1 Mapa temporal de conectividad

En este trabajo, dilucidamos la integración de las CGs nuevas con dos grupos principales de INs: PV- y SOM-INs (Figura d.1). A nivel de las aferencias de CGs, hemos visto que las IPSCs presentan en los primeros estadios una cinética lenta (Figuras r.11 y r.13) consistente con los estudios de corrientes GABAérgicas registrados en CGs inmaduras (Marín-Burgin et al., 2012; Pardi et al., 2015). Teniendo en cuenta que las aferencias GABAérgicas que contactan a las CGs nuevas, provienen de INs generadas durante la neurogénesis embrionaria, podemos hipotetizar que los cambios cinéticos están determinados por modificaciones de la maquinaria postsináptica que se encuentra todavía en desarrollo. Estos mecanismos de maduración podrían incluir cambios en la expresión de subunidades o modificaciones postraduccionales de receptores GABA como así también cambios en la expresión de moléculas que regulen la composición y estructura de la sinapsis. Un ejemplo de estas moléculas son gephyrina y las neuroliginas (Fritschy and Panzanelli, 2014). Gephyrina es la principal molécula que forma parte de la densidad postsináptica. La misma es una molécula *scaffold* que forma ensamblajes que interaccionan con el citoesqueleto y sobre ella se anclan los receptores GABA. Además, sobre estos ensamblajes se producen múltiples interacciones proteína-proteína relevantes para la transmisión sináptica (Tyagarajan and Fritschy, 2014). Por otra parte, las neuroliginas son moléculas de adhesión postsinápticas esenciales para la formación y función de la sinapsis. Las mismas interaccionan con neurexinas, su contraparte presináptica. Se han descrito distintos tipos de neuroliginas que están asociados a distintas identidades sinápticas. En particular neuroligina 2 (NL2) se ha reportado en sinapsis GABAérgicas y se demostró su interacción directa con gephyrina (Poulopoulos et al., 2009). Si bien aún no se han dilucidado completamente las funciones de estas moléculas, las mismas tendrían un rol clave en la sinaptogénesis GABAérgica. Inclusive, esta maquinaria de regulación molecular podría ser responsable de la sensibilidad a estímulos externos tales como el ambiente enriquecido que estudiamos en la sinapsis PV-INs→CGs (Figura r.20,r.21). En particular se ha reportado que gephyrina forma ensamblajes dinámicos que sufren modificaciones postraduccionales frente a la plasticidad de sinapsis GABAérgicas. Esto genera cambios en las propiedades de ensamblaje del scaffold postsináptico

afectando la disponibilidad y funcionalidad de proteínas, y con ello las propiedades sinápticas en una escala temporal corta (Tyagarajan and Fritschy, 2014).

Como se muestra en la figura d.1, la integración (aferecias y eferencias) de CGs en la red inhibitoria de PV-INs madura en la semana 6, mientras que la integración en la red de SOM-INs madura recién en la semana 8 (Figura d.1). Este resultado muestra coincidencia entre la maduración aferente y eferente tanto en la sinapsis formada con PV- como con SOM-INs. Un reporte de los últimos años realizado en el modelo *C.elegans*, ha demostrado que la sinaptogénesis aferente y eferente está coordinada por UNC-3, un factor de transcripción (Kratsios et al., 2015). Proponemos que en la neurogénesis adulta, la sinaptogénesis aferente y eferente de una misma identidad neuronal también está regulada por la expresión de moléculas específicas. Considerando que las CGs nuevas se integran primero en la red inhibitoria de PV- INs, podemos concluir que la sinaptogénesis en las CGs madura a distintos tiempos y esto es dependiente de la identidad de INs que participan. En línea con esto, se ha reportado que la sinaptogénesis requiere del reconocimiento previo del blanco neuronal que está mediado por moléculas de adhesión (Rawson et al., 2017). Para comprender cuáles son las moléculas que regulan el desarrollo de las CGs, sería relevante estudiar y comparar la expresión de genes involucrados en la maduración de cada sinapsis. Al momento se conoce muy poco de la regulación transcripcional de las CGs durante su desarrollo. Profundizar esta investigación podría ayudar a comprender las reglas moleculares del circuito que regulan la neurogénesis adulta.

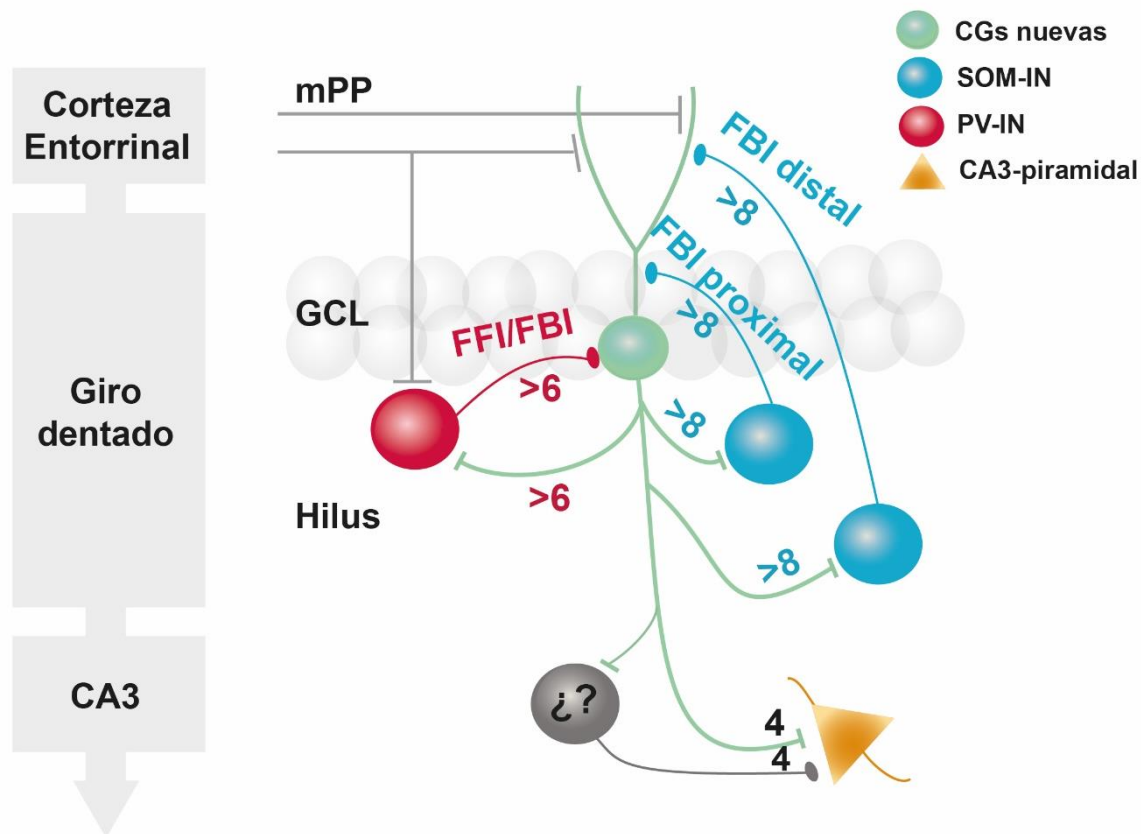


Figura d.1. Mapa temporal de la integración de las CGs nuevas en los circuitos locales inhibitorios del hipocampo adulto. Se muestra la integración de las CGs en dos circuitos inhibitorios locales mediados por PV-INS (rojo) y SOM-INS (azul). Los números representan la edad en semanas de las CGs a partir de la cual la conexión alcanza la maduración. Se puede ver que la misma interneurona PV-INS participa en los microcircuitos FFI y FBI. Por otra parte, SOM-INS participan principalmente en FBI contactando a las CGs a nivel proximal y distal. En gris se representan INs de CA3 que se conectan con las CGs nuevas que aún no han sido caracterizadas por marcadores moleculares.

D.2 Plasticidad del circuito

La actividad neuronal suele generarse mediante distintos patrones de disparo, ya sea *bursts*, estímulos repetidos o estímulos aislados; aunque esto último es menos frecuente. Por ello evaluamos qué ocurre en la fisiología de la sinapsis con la llegada de estímulos en forma de trenes. Se ha descrito que la inhibición puede sintonizar determinadas frecuencias sincronizando la red mediante la activación conjunta de ensambles neuronales. Esto se conoce como oscilaciones y en el hipocampo las mismas se pueden generar durante la exploración (Lisman and Idiart, 1995). Si bien aún no se ha esclarecido como se generan las oscilaciones, las PV-INS han sido

reportadas como el principal grupo que genera oscilaciones de tipo gama definidas en el rango 25-140 Hz (Bartos et al., 2007). A partir de nuestros resultados hemos visto que la sinapsis PV-INs→CGs deprime en una frecuencia cercana a gama, cuando las CGs alcanzan la maduración (Figura r.17). Esta enorme depresión podría hacer que las CGs se encuentren menos restringidas para activarse por aferencias excitatorias provenientes de la vía perforante. Nuestros resultados son consistentes con otros trabajos que han reportado que las CGs pueden sintonizar frecuencias mayores a 20 Hz, en donde la sinapsis PV-INs→CGs deprimen mientras que a menor frecuencia donde no hay plasticidad sináptica, las CGs estarían fuertemente inhibidas (Kraushaar and Jonas, 2000; Lee et al., 2016).

Cuando analizamos la componente distal proveniente de SOM-INs observamos una cinética mucho más lenta y estable en donde estímulos repetidos a 20 Hz generan IPSCs que no deprimen en los últimos pulsos. Si bien la cinética lenta podría explicar la sumación temporal observada, la acumulación de calcio residual contribuye a evitar la depresión e incluso produce facilitación frente a estímulos repetidos (Zucker and Regehr, 2002; Bucurenciu et al., 2008; Jonas and Vyleta, 2012). Esto genera un fuerte control inhibitorio sobre las dendritas de las CGs a través de altas frecuencias (cercanas a gama), generando un efecto complementario a la menor inhibición por depresión detectada en la sinapsis formada por PV-INs frente a estímulos repetitivos. Este resultado junto con otros reportes muestra que cada grupo de INs presenta una fisiología distinta en las oscilaciones del circuito, regulando la actividad de la red frente a los distintos estados comportamentales del animal (Liu et al., 2014, Bartos et al., 2007, Lee et al., 2016).

D.3 Efectos del AE en el desarrollo de la conectividad GABAérgica

Durante la codificación de información relevante en una tarea adquirida, las CGs nuevas que se encuentran débilmente acopladas a la red inhibitoria, sufren modificaciones sinápticas dependientes de actividad que refinan las conexiones aferentes y eferentes (Bergami et al., 2015; Ge et al., 2007; Gu et al., 2012; Schmidt-Hieber et al., 2004). En este trabajo hemos probado que la experiencia acelera la maduración de la sinapsis PV-INs→CGs. Hemos visto además que una estimulación por trenes a 50 Hz solo es detectada por la sinapsis PV-INs→CGs de animales

expuestos a un AE, mientras que la sinapsis correspondiente al grupo control filtra la señal, generando sobre las CGs un control inhibitorio fuerte que no deprime, lo que las mantendría desacopladas de las oscilaciones de la red (Figura r.21). En un estudio previo se mostró que hay un aumento de las oscilaciones gama en registros *in vivo* de hipocampo de ratas expuestas a un AE (Shinohara et al., 2013). A partir de nuestros resultados proponemos que la exposición a un AE aumenta la participación de CGs nuevas en las oscilaciones gama que se generan durante la exploración activa y de las que se ha reportado que las PV-INs contribuyen a la sincronización y generación de las mismas (Bartos et al., 2007; Lee et al., 2016). Esto además tiene relevancia durante requerimientos cognitivos. Hay numerosos reportes que demuestran que la exposición a múltiples estímulos presentes en un AE produce un mejor desempeño cognitivo durante determinadas tareas comportamentales de aprendizaje y memoria (Yuan et al., 2012, Gobbo et al., 2004, Arendash et al., 2004, Nilsson et al., 1999, Kazlauckas et al., 2011).

Nuestros resultados además tienen relevancia en el contexto de la disfunción de los circuitos. Un trabajo reciente mostró que las oscilaciones gama participan en el rescate de la pérdida de memoria generada en la enfermedad de Alzheimer (Etter et al., 2019). En línea con esto, recientemente se ha demostrado que una estimulación visual en el rango de las oscilaciones gama (40 Hz), revierte el estado neurodegenerativo en ratones modelo de Alzheimer (Adaikkan et al., 2019). A partir de nuestros resultados proponemos que la exposición a un AE incorpora nuevas unidades funcionales acoplándolas a la red inhibitoria de PV-INs y a las oscilaciones gama en el circuito. Sería interesante evaluar esto en ratones modelo de Alzheimer. En línea con esto, se ha demostrado que la exposición a un AE puede revertir los efectos adversos de la enfermedad de Alzheimer mediante la regulación de la expresión del microRNA-132 un regulador multifactorial imprescindible para la transmisión sináptica y el estado neuronal (Wei et al., 2020). Serán necesarios futuros estudios que investiguen la regulación transcripcional de la sinaptogénesis en la neurogénesis adulta durante la exposición a un AE y su relevancia en dicha enfermedad.

D.4 Impacto de las interneuronas GABAérgicas en la fisiología del giro dentado

Las CGs maduras participan en circuitos FBI que limitan la actividad de la GCL principalmente mediante inhibición lateral (Espinoza et al., 2018; Temprana et al., 2015). Las mismas también reclutan células mossy que a su vez activan interneuronas, mayormente PV células-“basket” (Scharfman, 2018). En nuestro trabajo, estudiamos el control temporal que pueden ejercer de forma específica las PV- y SOM-INs sobre la GCL. Como se mostró en la figura r.19, ambas interneuronas limitan la actividad de la GCL. Las PV-INs además, son capaces de generar una inhibición sostenida en el tiempo y muy eficiente, ya que inhiben la mayor parte de la actividad reclutada por la mPP (Figura r.19). Por otra parte, las SOM-INs ejercen un control más débil sobre la GCL y más acotado en el tiempo, ya que la inhibición supera el 50% de la actividad global solo cuando se estimulan en simultáneo la mPP y SOM-INs ($-5 \text{ ms} < dT < 5 \text{ ms}$). Postulamos que las diferencias en la eficiencia de inhibición y el amplio control temporal de la actividad de la GCL ejercido por las PV-INs se deben principalmente a la inhibición perisomática que ejercen y a la alta probabilidad de conectividad con CGs reportada (Cobb et al., 1995; Espinoza et al., 2018; Miles et al., 1996; Royer et al., 2012).

El circuito FFI generado por la activación de la mPP, involucró principalmente PV-INs (Figura r.28). Este resultado es consistente con el alto grado de conectividad reportado entre los axones de la mPP y las PV-INs (Hsu et al., 2016). Por otra parte, la activación de las PV- y SOM-INs ocurre seguido de la activación del *pop-spike* reclutado por la estimulación de la mPP. En línea con este resultado, en un trabajo reciente Jonas y colaboradores reportaron un mapa de conectividad de la red del giro dentado y evaluaron las conexiones entre CGs maduras y distintos grupos de INs. Encontraron que las PV-INs son el grupo más extensamente conectado con las CGs tanto a nivel aferente como eferente, siendo mucho más prominente la conectividad en la dirección PV-INs→CGs (28%) (Espinoza et al., 2018). Además, las PV-INs, contactan preferentemente CGs que no hayan formado eferencias sobre ellas mismas, lo cual va en línea con la prevalencia de la inhibición lateral que es casi diez veces mayor que la inhibición recurrente. Este tipo de arquitectura favorece el modelo “winner takes all” (de Almeida et al., 2009; Faghihi and Moustafa, 2015; Maass, 2000; Tetzlaff et al., 2012) en donde las CGs que son reclutadas durante un determinado comportamiento, prevalecen activas con el resto de la red silenciada. Este modelo

sería compatible con la separación de patrones, en donde aferencias similares se traducen en patrones no solapados de activación en la red, clave para las funciones del hipocampo que incluyen navegación espacial y discriminación de contextos (Drew et al., 2013; McAvoy et al., 2015). Cabe destacar que la inhibición lateral requiere una activación coincidente suficientemente grande de las aferencias excitatorias provenientes de CGs para que las mismas alcancen el umbral de disparo y activen a las PV-INs (Espinoza et al., 2018). Nuestro descubrimiento de que las mismas PV-INs individuales participan en inhibición FFI y FBI sugiere que la excitación de las PV-INs proveniente de los axones de la mPP, baja el umbral de activación de las mismas haciendo más eficiente su reclutamiento por una subpoblación aislada de CGs activa. En el caso de SOM-INs, las mismas participan casi exclusivamente en el circuito FBI. Esto lleva a pensar que este grupo de INs no necesariamente se encuentra activo en paralelo a la actividad de las PV-INs. Al no estar directamente conectadas con las aferencias excitatorias de la mPP su activación es independiente de esta vía. Por otra parte, la actividad aislada de las CGs solo podría llegar a reclutar SOM-INs si se activan de forma repetida a alta frecuencia como se describió anteriormente (Sección R.8.2), mientras que un único disparo de las CGs posiblemente reclute solamente a las PV-INs. Es decir que las CGs son controladas por una fuerte inhibición dendrítica durante períodos de actividad intensa, en donde se estimula la facilitación a corto plazo en las sinapsis formadas por SOM-INs-CGs (Liu et al., 2014). Teniendo en cuenta la elevada heterogeneidad dentro del grupo SOM-INs, sería relevante estudiar en el futuro si hay un rango de frecuencias de estimulación que reclute preferencialmente subgrupos de SOM-INs. Esto permitiría comprender el procesamiento de los distintos estímulos aferentes por la red local. Por ejemplo, se ha reportado que un subgrupo de SOM-INs que forman proyecciones de larga distancia, son capaces de sincronizar circuitos locales con otras regiones en particular el septum medial (Yuan et al., 2017). Este subgrupo de SOM-INs, estaría especialmente activo durante la navegación y formación de memoria espacial, en donde tiene que haber una coordinación temporal con la velocidad del movimiento del animal (Abbas et al., 2018). A partir de la caracterización electrofisiológica que realizamos (Figura r.8) detectamos 4 subtipos diferentes de SOM-INs con distintos perfiles de disparo y R_{input} . Sería lógico pensar que las sinapsis proximales y distales provienen de SOM-INs pertenecientes a distintos subgrupos. En línea con esta hipótesis, recientemente se reportaron dos subtipos de SOM-INs en el giro dentado:

las HIPPs cuyos axones se han detectado en la capa molecular, capaces de formar sinapsis distales y las Hils, cuyos axones se encuentran en el hilus y proveen inhibición perisomática sobre otras interneuronas (Yuan et al., 2017). Teniendo en cuenta nuestros resultados, proponemos que las Hils no solo contactan interneuronas de forma perisomática sino que también pueden contactar CGs nuevas a nivel proximal. Sería relevante realizar estudios pareados con el fin de corroborar esto, en donde esperamos registrar en CGs nuevas únicamente IPSCs distales o proximales, dependiendo del subtipo de SOM-INs que estimulemos. Por otra parte, las SOM-INs de localización distal, podrían activar receptores GABA_B que contribuyen a modular la excitabilidad dendrítica en CGs nuevas que atraviesan los estadios más avanzados de maduración (Gonzalez et al., 2018). Esto es relevante para mantener la actividad aislada característica de las CGs y que es sumamente relevante para la separación de patrones en el giro dentado (Leutgeb et al., 2007).

D.5 Perspectivas

En este trabajo hemos realizado un estudio fisiológico del desarrollo de conectividad durante la neurogénesis adulta, en la que están implicados dos grupos principales de interneuronas. Los tiempos de maduración obtenidos en la sinaptogénesis son específicos para la sinapsis correspondiente a cada identidad GABAérgica (Figura d.1) tanto para el desarrollo aferente como eferente. En base a estos resultados, nos preguntamos si la regulación de la integración de CGs en los circuitos inhibitorios depende de un perfil transcripcional específico para cada estadio de desarrollo de las CGs. Estudios realizados en corteza, han demostrado la relevancia de los programas transcripcionales que regulan el posicionamiento específico de las proyecciones neuronales durante el desarrollo (Hippenmeyer, 2014). Sin embargo, se desconoce si estos mecanismos son los mismos que controlan la morfogénesis del hipocampo y la neurogénesis adulta. Existen numerosas vías de señalización que participan en la especificación sináptica, donde actúan conjuntamente señales atractoras y repulsoras, promoviendo la formación de sinapsis sobre los blancos adecuados y evitando la sinaptogénesis en regiones no deseadas (Yogev and Shen, 2014). Estos resultados indican que hay señales moleculares generadas específicamente durante la sinaptogénesis que llevan información sobre el tiempo de desarrollo en la integración de CGs. Hemos visto la relevancia de las interneuronas en la fisiología del

giro dentado (Alvarez et al., 2016), en donde una disrupción de la inhibición tiene consecuencias directas sobre el funcionamiento del hipocampo llevando al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer (Gillespie et al., 2016; Jones, 2010) o afectando el desempeño en tareas cognitivas e incluso los estados emocionales del animal (Kheirbek et al., 2013). Asumiendo que durante la neurogénesis adulta, son las CGs nuevas las que modifican su perfil transcripcional a lo largo de su desarrollo, mientras que las INs con las que se conectan presentan un perfil transcripcional maduro, sería relevante identificar las moléculas responsables en cada estadio de CGs descrito (sección 1.8.2-3). La detección de moléculas específicas para la formación y mantenimiento de los contactos sinápticos es relevante para comprender cómo se regula la neurogénesis adulta.

Conclusiones

A partir de nuestros resultados podemos concluir que, si bien ambas poblaciones de INs son parte de FBI, las mismas generan circuitos inhibitorios distintos pudiendo activarse uno u otro dependiendo del estímulo que arribe. Por otra parte, la inhibición que ejercen las SOM-INs es principalmente distal y esto afecta la integración de las aferencias excitatorias que llegan a las dendritas de las CGs. Es decir que este grupo de INs participa en la regulación fina de la integración de estímulos aferentes mientras que PV-INs ejercen inhibición perisomática que controla la actividad de la capa granular.

Se ha reportado que en áreas directamente conectadas con el hipocampo la inhibición recurrente y la inhibición lateral se dan de forma equiprobable (Couey et al., 2013; Holmgren et al., 2003; Peng et al., 2017; Yoshimura and Callaway, 2005; Znamenskiy et al., 2018) y por lo tanto aún no es claro si SOM-INs así como otros grupos de INs, generan con alguna preferencia inhibición lateral al igual que se reportó en PV-INs. Conocer esto podría ayudar a dilucidar si las SOM-INs se pueden incluir en el modelo “winner takes all”. Sin embargo, teniendo en cuenta las diferencias fisiológicas entre PV y SOM-INs, sería factible que este grupo de INs ocupe otro rol en el procesamiento de información y genere otro tipo de inhibición. Se ha reportado que la inhibición recurrente en corteza contribuye al enlentecimiento de oscilaciones (Brunel and Wang, 2003), regulando así distintos estados de actividad. Hace algunos años se reportó que las oscilaciones gama pueden ser de distintos tipos dependiendo del grupo de INs que participa (Middleton et al., 2008). Además registros in vivo hipocampales muestran un rol especializado de los grupos de INs en el control de las oscilaciones (Klausberger and Somogyi, 2008). Estos trabajos aportan a la hipótesis de que en el giro dentado coexisten circuitos locales que involucran diferencialmente grupos de INs que, con distintas reglas de conectividad y tipos de inhibición, son capaces de modular de forma diferencial la red computacional.

Hemos detectado algunos ejemplos de SOM-INs que participan en FFI. Este circuito ha sido caracterizado por Pouille and Scanziani 2001, en donde se ha reportado que las INs que participan contactan a nivel del soma a las células principales. Una hipótesis a testear es que el subtipo de SOM-INs que presenta inhibición proximal sea

el grupo que participe en inhibición FFI, ya que serían reclutadas por los axones provenientes de la corteza entorrinal, en la mPP. Esto queda pendiente a ser corroborado en futuros estudios.

Resultados previos de nuestro laboratorio propusieron un modelo computacional que demuestra que la neurogénesis adulta favorecería la adquisición de aferencias no solapantes a través del acoplamiento lento en el circuito inhibitorio por parte de las CGs nuevas (Kropff et al., 2015; Temprana et al., 2015). En línea con esto, nuestros resultados demuestran que durante varias semanas las CGs permanecen débilmente acopladas tanto a la red de PV- como a la red de SOM-INs, a nivel de las aferencias y las eferencias (Figura d.1). Esto indicaría que las CGs nuevas se mantendrían como unidades funcionales potencialmente disponibles para integrarse en la red inhibitoria local generando niveles de plasticidad elevados en la red y sumamente susceptibles a la actividad neuronal. Mayores requerimientos cognitivos podrían estimular la incorporación de las CGs nuevas al circuito. Mientras tanto, las CGs nuevas escaparían de la inhibición lateral en los primeros estadios generando un canal paralelo para el flujo de información desde la corteza entorrinal hacia CA3 (Marín-Burgin et al., 2012; Temprana et al., 2015).

Cabe destacar que las conexiones que forman las CGs con la capa piramidal de CA3, se forman mucho más temprano, a partir de la 4^{ta} semana (Temprana et al., 2015) estadio en el que también son capaces de reclutar INs (Figura d.1). Aún queda por dilucidar cuáles son las identidades neuronales GABAérgicas reclutadas en la región de CA3, cuya dinámica de conectividad es muy distinta a la estudiada en los circuitos locales del DG.

Abreviaturas

AE	Ambiente Enriquecido
BrdU	Bromodesoxiuridina
CGm	Células Granulares maduras
CGs	Células Granulares
ChR2	Channelrhodopsin-2
DG	Giro Dentado
EC	Corteza Entorrinal
EPSCs	Corrientes Postsinápticas Excitatorias
FBI	Inhibición <i>Feedback</i>
fEPSPs	Potenciales de campo postsinápticos excitatorios
FFI	Inhibición <i>Feedforward</i>
GCL	Capa Granular
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
HILs	Interneuronas del hilus
HIPPs	Interneuronas del hilus asociadas a la vía perforante
IML	Capa Molecular Interna
INs	Interneuronas GABAérgicas
IPSCs	Corrientes Postsinápticas Inhibitorias
KCC2	Cotransportador de K-Cl de tipo 2
KYN	Ácido Kynurénico
LTP	Potenciación a largo plazo
MCs	Células Mossy
mGluRII	Receptor Metabotrópico Glutamatérgico de tipo II
ML	Capa Molecular
mPP	Vía Media Perforante
NKCC1	Cotransportador Na-K-Cl de tipo 1
NSCs	Células Madres Neurales
OML	Capa Molecular Externa
<i>pop-spike</i>	Cambio de Potencial Eléctrico poblacional
pp	Vía Perforante
PTX	Picrotoxina

PV-INs	Interneuronas Parvalbúmina
RFP	<i>Red Fluorescent Protein</i>
RV	Retrovirus
SOM-INs	Interneuronas Somatostatina
SVZ	Zona Subventricular
Tom	Proteína fluorescente tdTomato

Bibliografía

- Abbas, A.I., Sundiang, M.J.M., Henoch, B., Morton, M.P., Bolkan, S.S., Park, A.J., Harris, A.Z., Kellendonk, C., and Gordon, J.A. (2018). Somatostatin Interneurons Facilitate Hippocampal-Prefrontal Synchrony and Prefrontal Spatial Encoding. *Neuron* 100, 926-939 e923.
- Abrous, D.N., Koehl, M., and Le Moal, M. (2005). Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *Physiological reviews* 85, 523-569.
- Acsády, L., Kamondi, A., Sík, A., Freund, T., and Buzsáki, G. (1998). GABAergic Cells Are the Major Postsynaptic Targets of Mossy Fibers in the Rat Hippocampus. *The Journal of Neuroscience* 18, 3386-3403.
- Adaikkan, C., Middleton, S.J., Marco, A., Pao, P.-C., Mathys, H., Kim, D.N.-W., Gao, F., Young, J.Z., Suk, H.-J., Boyden, E.S., *et al.* (2019). Gamma Entrainment Binds Higher-Order Brain Regions and Offers Neuroprotection. *Neuron* 102, 929-943.e928.
- Allen, C., and Stevens, C.F. (1994). An evaluation of causes for unreliability of synaptic transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 10380-10383.
- Alvarez, D.D., Giacomini, D., Yang, S.M., Trincherro, M.F., Temprana, S.G., Buttner, K.A., Beltramone, N., and Schinder, A.F. (2016). A disynaptic feedback network activated by experience promotes the integration of new granule cells. *Science* 354, 459-465.
- Amaral, D.G., Scharfman, H.E., and Lavenex, P. (2007). The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). In *Prog Brain Res* (Elsevier), pp. 3-790.
- Andrews-Zwilling, Y., Gillespie, A.K., Kravitz, A.V., Nelson, A.B., Devidze, N., Lo, I., Yoon, S.Y., Bien-Ly, N., Ring, K., Zwilling, D., *et al.* (2012). Hilar GABAergic interneuron activity controls spatial learning and memory retrieval. *PLoS One* 7, e40555.
- Bakker, A., Kirwan, C.B., Miller, M., and Stark, C.E.L. (2008). Pattern separation in the human hippocampal CA3 and dentate gyrus. *Science (New York, NY)* 319, 1640-1642.
- Bartos, M., Vida, I., and Jonas, P. (2007). Synaptic mechanisms of synchronized gamma oscillations in inhibitory interneuron networks. *Nature reviews Neuroscience* 8, 45-56.
- Bauer, S., and Patterson, P.H. (2005). The cell cycle-apoptosis connection revisited in the adult brain. *J Cell Biol* 171, 641-650.
- Bergami, M., Masserdotti, G., Temprana, S.G., Motori, E., Eriksson, T.M., Göbel, J., Yang, S.M., Conzelmann, K.-K., Schinder, A.F., Götz, M., *et al.* (2015). A critical period for experience-dependent remodeling of adult-born neuron connectivity. *Neuron* 85, 710-717.
- Bergmann, O., Spalding, K.L., and Frisé, J. (2015). Adult Neurogenesis in Humans. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7, a018994.
- Book, T.h. (2006). *The Hippocampus Book*, 1 edition edn (Oxford ; New York: Oxford University Press).

- Booker, S.A., and Vida, I. (2018). Morphological diversity and connectivity of hippocampal interneurons. *Cell and Tissue Research* 373, 619-641.
- Boyden, E.S., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G., and Deisseroth, K. (2005). Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nature neuroscience* 8, 1263-1268.
- Brunel, N., and Wang, X.-J. (2003). What determines the frequency of fast network oscillations with irregular neural discharges? I. Synaptic dynamics and excitation-inhibition balance. *Journal of neurophysiology* 90, 415-430.
- Buckmaster, P.S., and Jongen-Rêlo, A.L. (1999). Highly specific neuron loss preserves lateral inhibitory circuits in the dentate gyrus of kainate-induced epileptic rats. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19, 9519-9529.
- Buckmaster, P.S., Wenzel, H.J., Kunkel, D.D., and Schwartzkroin, P.A. (1996). Axon arbors and synaptic connections of hippocampal mossy cells in the rat in vivo. *J Comp Neurol* 366, 271-292.
- Burgess, N., Maguire, E.A., and O'Keefe, J. (2002). The human hippocampus and spatial and episodic memory. *Neuron* 35, 625-641.
- Cameron, H.A., and McKay, R.D. (2001). Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J Comp Neurol* 435, 406-417.
- Carr, M.F., Jadhav, S.P., and Frank, L.M. (2011). Hippocampal replay in the awake state: a potential substrate for memory consolidation and retrieval. *Nature neuroscience* 14, 147-153.
- Chancey, J.H., Adlaf, E.W., Sapp, M.C., Pugh, P.C., Wadiche, J.I., and Overstreet-Wadiche, L.S. (2013). GABA Depolarization Is Required for Experience-Dependent Synapse Unsilencing in Adult-Born Neurons. *Journal of Neuroscience* 33, 6614-6622.
- Chancey, J.H., Poulsen, D.J., Wadiche, J.I., and Overstreet-Wadiche, L. (2014). Hilar Mossy Cells Provide the First Glutamatergic Synapses to Adult-Born Dentate Granule Cells. *Journal of Neuroscience* 34, 2349-2354.
- Clelland, C.D., Choi, M., Romberg, C., Clemenson, G.D., Jr., Fragniere, A., Tyers, P., Jessberger, S., Saksida, L.M., Barker, R.A., Gage, F.H., *et al.* (2009). A functional role for adult hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation. *Science* 325, 210-213.
- Cobb, S.R., Buhl, E.H., Halasy, K., Paulsen, O., and Somogyi, P. (1995). Synchronization of neuronal activity in hippocampus by individual GABAergic interneurons. *Nature* 378, 75-78.
- Couey, J.J., Witoelar, A., Zhang, S.-J., Zheng, K., Ye, J., Dunn, B., Czajkowski, R., Moser, M.-B., Moser, E.I., Roudi, Y., *et al.* (2013). Recurrent inhibitory circuitry as a mechanism for grid formation. *Nature neuroscience* 16, 318-324.
- Creer, D.J., Romberg, C., Saksida, L.M., van Praag, H., and Bussey, T.J. (2010). Running enhances spatial pattern separation in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 2367-2372.
- Daumas, S., Halley, H., Francés, B., and Lassalle, J.-M. (2005). Encoding, consolidation, and retrieval of contextual memory: differential involvement of dorsal CA3 and CA1 hippocampal subregions. *Learn Mem* 12, 375-382.

de Almeida, L., Idiart, M., and Lisman, J.E. (2009). A second function of gamma frequency oscillations: an E%-max winner-take-all mechanism selects which cells fire. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29, 7497-7503.

De Vries, H. (1958). Atomic bomb effect: variation of radiocarbon in plants, shells, and snails in the past 4 years. *Science (New York, NY)* 128, 250-251.

Deng, X., Gu, L., Sui, N., Guo, J., and Liang, J. (2019). Parvalbumin interneuron in the ventral hippocampus functions as a discriminator in social memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116, 16583-16592.

Deshpande, A., Bergami, M., Ghanem, A., Conzelmann, K.-K., Lepier, A., Götz, M., and Berninger, B. (2013). Retrograde monosynaptic tracing reveals the temporal evolution of inputs onto new neurons in the adult dentate gyrus and olfactory bulb. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, E1152-E1161.

Dolorfo, C.L., and Amaral, D.G. (1998). Entorhinal cortex of the rat: organization of intrinsic connections. *J Comp Neurol* 398, 49-82.

Donato, F., Rompani, S.B., and Caroni, P. (2013). Parvalbumin-expressing basket-cell network plasticity induced by experience regulates adult learning. *Nature* 504, 272-276.

Drew, L.J., Fusi, S., and Hen, R. (2013). Adult neurogenesis in the mammalian hippocampus: why the dentate gyrus? *Learn Mem* 20, 710-729.

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

Eichenbaum, H., Schoenbaum, G., Young, B., and Bunsey, M. (1996). Functional organization of the hippocampal memory system. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93, 13500-13507.

Engel, A.K., Fries, P., and Singer, W. (2001). Dynamic predictions: oscillations and synchrony in top-down processing. *Nature reviews Neuroscience* 2, 704-716.

Eriksson, P.S., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, A.M., Nordborg, C., Peterson, D.A., and Gage, F.H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature medicine* 4, 1313-1317.

Ernst, A., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Perl, S., Tisdale, J., Possnert, G., Druid, H., and Frisén, J. (2014). Neurogenesis in the striatum of the adult human brain. *Cell* 156, 1072-1083.

Espinoza, C., Guzman, S.J., Zhang, X., and Jonas, P. (2018). Parvalbumin+ interneurons obey unique connectivity rules and establish a powerful lateral-inhibition microcircuit in dentate gyrus. *Nature Communications* 9, 4605.

Esposito, M.S., Piatti, V.C., Laplagne, D.A., Morgenstern, N.A., Ferrari, C.C., Pitossi, F.J., and Schinder, A.F. (2005). Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. *J Neurosci* 25, 10074-10086.

Etter, G., van der Veldt, S., Manseau, F., Zarrinkoub, I., Trillaud-Doppia, E., and Williams, S. (2019). Optogenetic gamma stimulation rescues memory impairments in an Alzheimer's disease mouse model. *Nat Commun* 10, 5322.

Faghihi, F., and Moustafa, A.A. (2015). A computational model of pattern separation efficiency in the dentate gyrus with implications in schizophrenia. *Frontiers in systems neuroscience* 9, 42-42.

Faulkner, R.L., Jang, M.-H., Liu, X.-B., Duan, X., Sailor, K.A., Kim, J.Y., Ge, S., Jones, E.G., Ming, G.-I., Song, H., *et al.* (2008). Development of hippocampal mossy fiber synaptic outputs by new neurons in the adult brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 14157-14162.

Fishell, G., and Rudy, B. (2011). Mechanisms of inhibition within the telencephalon: "where the wild things are". *Annual review of neuroscience* 34, 535-567.

Freund, T.F. (2003). Interneuron Diversity series: Rhythm and mood in perisomatic inhibition. *Trends in Neurosciences* 26, 489-495.

Freund, T.F., and Buzsáki, G. (1996). Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6, 347-470.

Fries, P. (2009). Neuronal gamma-band synchronization as a fundamental process in cortical computation. *Annual review of neuroscience* 32, 209-224.

Fries, P. (2015). Rhythms for Cognition: Communication through Coherence. *Neuron* 88, 220-235.

Fritschy, J.-M., and Panzanelli, P. (2014). GABA_A receptors and plasticity of inhibitory neurotransmission in the central nervous system. *European Journal of Neuroscience* 39, 1845-1865.

Fuchs, E., and Flügge, G. (2014). Adult neuroplasticity: more than 40 years of research. *Neural Plast* 2014, 541870-541870.

Gabernet, L., Jadhav, S.P., Feldman, D.E., Carandini, M., and Scanziani, M. (2005). Somatosensory integration controlled by dynamic thalamocortical feed-forward inhibition. *Neuron* 48, 315-327.

Gage, F.H. (2002). Neurogenesis in the adult brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22, 612-613.

Ge, S., Goh, E.L.K., Sailor, K.A., Kitabatake, Y., Ming, G.-I., and Song, H. (2006). GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature* 439, 589-593.

Ge, S., Yang, C.-h., Hsu, K.-s., Ming, G.-I., and Song, H. (2007). A Critical Period for Enhanced Synaptic Plasticity in Newly Generated Neurons of the Adult Brain. *Neuron* 54, 559-566.

Ghosh, H.S. (2019). Adult Neurogenesis and the Promise of Adult Neural Stem Cells. *J Exp Neurosci* 13, 1179069519856876-1179069519856876.

Gillespie, A.K., Jones, E.A., Lin, Y.H., Karlsson, M.P., Kay, K., Yoon, S.Y., Tong, L.M., Nova, P., Carr, J.S., Frank, L.M., *et al.* (2016). Apolipoprotein E4 Causes Age-Dependent Disruption of Slow Gamma Oscillations during Hippocampal Sharp-Wave Ripples. *Neuron* 90, 740-751.

Gonzalez, J.C., Epps, S.A., Markwardt, S.J., Wadiche, J.I., and Overstreet-Wadiche, L. (2018). Constitutive and Synaptic Activation of GIRK Channels Differentiates Mature and Newborn Dentate Granule Cells. *The Journal of Neuroscience* 38, 6513-6526.

- Gottlieb, D.I., and Cowan, W.M. (1973). Autoradiographic studies of the commissural and ipsilateral association connection of the hippocampus and dentate gyrus of the rat. I. The commissural connections. *J Comp Neurol* 149, 393-422.
- Gould, E., Beylin, A., Tanapat, P., Reeves, A., and Shors, T.J. (1999). Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nature neuroscience* 2, 260-265.
- Gu, Y., Arruda-Carvalho, M., Wang, J., Janoschka, S.R., Josselyn, S.A., Frankland, P.W., and Ge, S. (2012). Optical controlling reveals time-dependent roles for adult-born dentate granule cells. *Nature Neuroscience* 15, 1700-1706.
- Halasy, K., and Somogyi, P. (1993a). Distribution of GABAergic synapses and their targets in the dentate gyrus of rat: a quantitative immunoelectron microscopic analysis. *J Hirnforsch* 34, 299-308.
- Halasy, K., and Somogyi, P. (1993b). Subdivisions in the multiple GABAergic innervation of granule cells in the dentate gyrus of the rat hippocampus. *The European journal of neuroscience* 5, 411-429.
- Hashimoto, Y., Nasrallah, K., Jensen, K.R., Chávez, A.E., Carrera, D., and Castillo, P.E. (2017). LTP at Hilar Mossy Cell-Dentate Granule Cell Synapses Modulates Dentate Gyrus Output by Increasing Excitation/Inhibition Balance. *Neuron* 95, 928-943.e923.
- Hioki, H., Okamoto, S., Konno, M., Kameda, H., Sohn, J., Kuramoto, E., Fujiyama, F., and Kaneko, T. (2013). Cell type-specific inhibitory inputs to dendritic and somatic compartments of parvalbumin-expressing neocortical interneuron. *J Neurosci* 33, 544-555.
- Hippenmeyer, S. (2014). Molecular pathways controlling the sequential steps of cortical projection neuron migration. *Adv Exp Med Biol* 800, 1-24.
- Hippenmeyer, S., Vrieseling, E., Sigrist, M., Portmann, T., Laengle, C., Ladle, D.R., and Arber, S. (2005). A developmental switch in the response of DRG neurons to ETS transcription factor signaling. *PLoS Biol* 3, e159.
- Holmgren, C., Harkany, T., Svennenfors, B., and Zilberter, Y. (2003). Pyramidal cell communication within local networks in layer 2/3 of rat neocortex. *The Journal of physiology* 551, 139-153.
- Holtmaat, A., and Caroni, P. (2016). Functional and structural underpinnings of neuronal assembly formation in learning. *Nature Neuroscience* 19, 1553-1562.
- Hosp, J.A., Struber, M., Yanagawa, Y., Obata, K., Vida, I., Jonas, P., and Bartos, M. (2014). Morpho-physiological criteria divide dentate gyrus interneurons into classes. *Hippocampus* 24, 189-203.
- Hsu, T.-T., Lee, C.-T., Tai, M.-H., and Lien, C.-C. (2016). Differential Recruitment of Dentate Gyrus Interneuron Types by Commissural Versus Perforant Pathways. *Cerebral Cortex* 26, 2715-2727.
- Hu, H., Gan, J., and Jonas, P. (2014). Interneurons. Fast-spiking, parvalbumin(+) GABAergic interneurons: from cellular design to microcircuit function. *Science* 345, 1252-1263.
- Isaac, J.T., Crair, M.C., Nicoll, R.A., and Malenka, R.C. (1997). Silent synapses during development of thalamocortical inputs. *Neuron* 18, 269-280.

- Isaac, J.T., Nicoll, R.A., and Malenka, R.C. (1995). Evidence for silent synapses: implications for the expression of LTP. *Neuron* 15, 427-434.
- Isaacson, Jeffrey S., and Scanziani, M. (2011). How Inhibition Shapes Cortical Activity. *Neuron* 72, 231-243.
- Jiao, Y., and Nadler, J.V. (2007). Stereological analysis of GluR2-immunoreactive hilar neurons in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy: correlation of cell loss with mossy fiber sprouting. *Exp Neurol* 205, 569-582.
- Jinde, S., Zsiros, V., Jiang, Z., Nakao, K., Pickel, J., Kohno, K., Belforte, J.E., and Nakazawa, K. (2012). Hilar mossy cell degeneration causes transient dentate granule cell hyperexcitability and impaired pattern separation. *Neuron* 76, 1189-1200.
- Jinde, S., Zsiros, V., and Nakazawa, K. (2013). Hilar mossy cell circuitry controlling dentate granule cell excitability. *Front Neural Circuits* 7, 14.
- Jones, M.W. (2010). Errant ensembles: dysfunctional neuronal network dynamics in schizophrenia. *Biochem Soc Trans* 38, 516-521.
- Kaila, K., Price, T.J., Payne, J.A., Puskarjov, M., and Voipio, J. (2014). Cation-chloride cotransporters in neuronal development, plasticity and disease. *Nature reviews Neuroscience* 15, 637-654.
- Kamiya, H., Shinozaki, H., Yamamoto, C. (1996) Activation of metabotropic glutamate receptor type 2/3 suppresses transmission at rat hippocampal mossy fibre synapses. *Journal of physiology* 493, 447-455.
- Kandel, E.R., Dudai, Y., and Mayford, M.R. (2014). The molecular and systems biology of memory. *Cell* 157, 163-186.
- Kapfer, C., Glickfeld, L.L., Atallah, B.V., and Scanziani, M. (2007). Supralinear increase of recurrent inhibition during sparse activity in the somatosensory cortex. *Nature neuroscience* 10, 743-753.
- Kempermann, G., Kuhn, H.G., and Gage, F.H. (1997). More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386, 493-495.
- Kepecs, A., and Fishell, G. (2014). Interneuron cell types are fit to function. *Nature* 505, 318-326.
- Kheirbek, M.A., Drew, L.J., Burghardt, N.S., Costantini, D.O., Tannenholz, L., Ahmari, S.E., Zeng, H., Fenton, A.A., and Hen, R. (2013). Differential control of learning and anxiety along the dorsoventral axis of the dentate gyrus. *Neuron* 77, 955-968.
- Khirug, S., Huttu, K., Ludwig, A., Smirnov, S., Voipio, J., Rivera, C., Kaila, K., and Khiroug, L. (2005). Distinct properties of functional KCC2 expression in immature mouse hippocampal neurons in culture and in acute slices. *EurJNeurosci* 21, 899-904.
- Kisvárdy, Z.F. (1992). GABAergic networks of basket cells in the visual cortex. *Prog Brain Res* 90, 385-405.
- Klausberger, T., and Somogyi, P. (2008). Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. *Science (New York, NY)* 321, 53-57.

- Kratsios, P., Pinan-Lucarré, B., Kerk, S.Y., Weinreb, A., Bessereau, J.-L., and Hobert, O. (2015). Transcriptional coordination of synaptogenesis and neurotransmitter signaling. *Curr Biol* 25, 1282-1295.
- Kraushaar, U., and Jonas, P. (2000). Efficacy and stability of quantal GABA release at a hippocampal interneuron-principal neuron synapse. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20, 5594-5607.
- Kropff, E., Yang, S.M., and Schinder, A.F. (2015). Dynamic role of adult-born dentate granule cells in memory processing. *Current Opinion in Neurobiology* 35, 21-26.
- Laplagne, D.A., Espósito, M.S., Piatti, V.C., Morgenstern, N.A., Zhao, C., van Praag, H., Gage, F.H., and Schinder, A.F. (2006). Functional Convergence of Neurons Generated in the Developing and Adult Hippocampus. *PLoS Biology* 4, e409.
- Laplagne, D.A., Kamienkowski, J.E., Esposito, M.S., Piatti, V.C., Zhao, C., Gage, F.H., and Schinder, A.F. (2007). Similar GABAergic inputs in dentate granule cells born during embryonic and adult neurogenesis. *Eur J Neurosci* 25, 2973-2981.
- Laurberg, S., and Sørensen, K.E. (1981). Associational and commissural collaterals of neurons in the hippocampal formation (hilus fasciae dentatae and subfield CA3). *Brain research* 212, 287-300.
- Lee, C.-T., Kao, M.-H., Hou, W.-H., Wei, Y.-T., Chen, C.-L., and Lien, C.-C. (2016). Causal Evidence for the Role of Specific GABAergic Interneuron Types in Entorhinal Recruitment of Dentate Granule Cells. *Scientific Reports* 6, 36885.
- Lee, S.-H., Marchionni, I., Bezaire, M., Varga, C., Danielson, N., Lovett-Barron, M., Losonczy, A., and Soltesz, I. (2014). Parvalbumin-positive basket cells differentiate among hippocampal pyramidal cells. *Neuron* 82, 1129-1144.
- Lee, S., Hjerling-Leffler, J., Zagha, E., Fishell, G., and Rudy, B. (2010). The largest group of superficial neocortical GABAergic interneurons expresses ionotropic serotonin receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30, 16796-16808.
- Leutgeb, J.K., Leutgeb, S., Moser, M.-B., and Moser, E.I. (2007). Pattern Separation in the Dentate Gyrus and CA3 of the Hippocampus. *Science* 315, 961-966.
- Liao, D., Hessler, N.A., and Malinow, R. (1995). Activation of postsynaptically silent synapses during pairing-induced LTP in CA1 region of hippocampal slice. *Nature* 375, 400-404.
- Lisman, J.E., and Idiart, M.A. (1995). Storage of 7 +/- 2 short-term memories in oscillatory subcycles. *Science (New York, NY)* 267, 1512-1515.
- Liu, G. (2004). Local structural balance and functional interaction of excitatory and inhibitory synapses in hippocampal dendrites. *Nature neuroscience* 7, 373-379.
- Liu, Y.-C., Cheng, J.-K., and Lien, C.-C. (2014). Rapid dynamic changes of dendritic inhibition in the dentate gyrus by presynaptic activity patterns. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 34, 1344-1357.
- Lledo, P.-M., Alonso, M., and Grubb, M.S. (2006). Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nature reviews Neuroscience* 7, 179-193.

- Lovett-Barron, M., Kaifosh, P., Kheirbek, M.A., Danielson, N., Zaremba, J.D., Reardon, T.R., Turi, G.F., Hen, R., Zemelman, B.V., and Losonczy, A. (2014). Dendritic inhibition in the hippocampus supports fear learning. *Science (New York, NY)* 343, 857-863.
- Maass, W. (2000). On the computational power of winner-take-all. *Neural Comput* 12, 2519-2535.
- Maccaferri, G. (2005). Stratum oriens horizontal interneurone diversity and hippocampal network dynamics. *The Journal of physiology* 562, 73-80.
- Madisen, L., Mao, T., Koch, H., Zhuo, J.M., Berenyi, A., Fujisawa, S., Hsu, Y.W., Garcia, A.J., 3rd, Gu, X., Zanella, S., *et al.* (2012). A toolbox of Cre-dependent optogenetic transgenic mice for light-induced activation and silencing. *Nat Neurosci* 15, 793-802.
- Madisen, L., Zwingman, T.A., Sunkin, S.M., Oh, S.W., Zariwala, H.A., Gu, H., Ng, L.L., Palmiter, R.D., Hawrylycz, M.J., Jones, A.R., *et al.* (2010). A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nature neuroscience* 13, 133-140.
- Marín-Burgin, A., Mongiat, L.A., Pardi, M.B., and Schinder, A.F. (2012). Unique Processing During a Period of High Excitation/Inhibition Balance in Adult-Born Neurons. *Science* 335, 1238-1242.
- Markram, H., Toledo-Rodriguez, M., Wang, Y., Gupta, A., Silberberg, G., and Wu, C. (2004). Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nature reviews Neuroscience* 5, 793-807.
- Markwardt, S.J., Dieni, C.V., Wadiche, J.I., and Overstreet-Wadiche, L. (2011). Ivy/neurogliaform interneurons coordinate activity in the neurogenic niche. *Nature Neuroscience* 14, 1407-1409.
- Marr, D. (1971). Simple memory: a theory for archicortex. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 262, 23-81.
- Mason, A., Nicoll, A., and Stratford, K. (1991). Synaptic transmission between individual pyramidal neurons of the rat visual cortex in vitro. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 11, 72-84.
- McAvoy, K., Besnard, A., and Sahay, A. (2015). Adult hippocampal neurogenesis and pattern separation in DG: a role for feedback inhibition in modulating sparseness to govern population-based coding. *Frontiers in Systems Neuroscience* 9.
- Megías, M., Emri, Z., Freund, T.F., and Gulyás, A.I. (2001). Total number and distribution of inhibitory and excitatory synapses on hippocampal CA1 pyramidal cells. *Neuroscience* 102, 527-540.
- Meyer, H.S., Schwarz, D., Wimmer, V.C., Schmitt, A.C., Kerr, J.N.D., Sakmann, B., and Helmstaedter, M. (2011). Inhibitory interneurons in a cortical column form hot zones of inhibition in layers 2 and 5A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 16807-16812.
- Middleton, S.J., Racca, C., Cunningham, M.O., Traub, R.D., Monyer, H., Knöpfel, T., Schofield, I.S., Jenkins, A., and Whittington, M.A. (2008). High-frequency network oscillations in cerebellar cortex. *Neuron* 58, 763-774.

Miles, R., Tóth, K., Gulyás, A.I., Hájos, N., and Freund, T.F. (1996). Differences between Somatic and Dendritic Inhibition in the Hippocampus. *Neuron* 16, 815-823.

Mongiati, L.A., Espósito, M.S., Lombardi, G., and Schinder, A.F. (2009). Reliable activation of immature neurons in the adult hippocampus. *PLoS one* 4, e5320-e5320.

Mongiati, L.A., and Schinder, A.F. (2011). Adult neurogenesis and the plasticity of the dentate gyrus network. *Eur J Neurosci* 33, 1055-1061.

Moreno-Jiménez, E.P., Flor-García, M., Terreros-Roncal, J., Rábano, A., Cafini, F., Pallas-Bazarra, N., Ávila, J., and Llorens-Martín, M. (2019). Adult hippocampal neurogenesis is abundant in neurologically healthy subjects and drops sharply in patients with Alzheimer's disease. *Nature Medicine* 25, 554-560.

Morgan, R.J., Santhakumar, V., and Soltesz, I. (2007). Modeling the dentate gyrus. *Prog Brain Res* 163, 639-658.

Mott, D.D., Turner, D.A., Okazaki, M.M., and Lewis, D.V. (1997). Interneurons of the dentate-hilus border of the rat dentate gyrus: morphological and electrophysiological heterogeneity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17, 3990-4005.

Murthy, V.N., Sejnowski, T.J., and Stevens, C.F. (1997). Heterogeneous release properties of visualized individual hippocampal synapses. *Neuron* 18, 599-612.

Nakashiba, T., Cushman, J.D., Pelkey, K.A., Renaudineau, S., Buhl, D.L., McHugh, T.J., Rodriguez Barrera, V., Chittajallu, R., Iwamoto, K.S., McBain, C.J., *et al.* (2012). Young dentate granule cells mediate pattern separation, whereas old granule cells facilitate pattern completion. *Cell* 149, 188-201.

Nydal, R., and Lövseth, K. (1965). Distribution of radiocarbon from nuclear tests. *Nature* 206, 1029-1031.

Overstreet-Wadiche, L.S., Bensen, A.L., and Westbrook, G.L. (2006). Delayed development of adult-generated granule cells in dentate gyrus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26, 2326-2334.

Overstreet Wadiche, L., Bromberg, D.A., Bensen, A.L., and Westbrook, G.L. (2005). GABAergic signaling to newborn neurons in dentate gyrus. *J Neurophysiol* 94, 4528-4532.

Pardi, M.B., Ogando, M.B., Schinder, A.F., and Marin-Burgin, A. (2015). Differential inhibition onto developing and mature granule cells generates high-frequency filters with variable gain. *Elife* 4, e08764.

Parent, J.M., and Lowenstein, D.H. (2002). Seizure-induced neurogenesis: are more new neurons good for an adult brain? *Prog Brain Res* 135, 121-131.

Paxinos, G., and Franklin, K.B.J. (2004). *The mouse brain in stereotaxic coordinates* (Amsterdam; Boston: Elsevier Academic Press).

Pearce, R.A. (1993). Physiological evidence for two distinct GABA responses in rat hippocampus. *Neuron* 10, 189-200.

Pelkey, K.A., Chittajallu, R., Craig, M.T., Tricoire, L., Wester, J.C., and McBain, C.J. (2017). Hippocampal GABAergic Inhibitory Interneurons. *Physiological Reviews* 97, 1619-1747.

- Peng, Y., Barreda Tomás, F.J., Klisch, C., Vida, I., and Geiger, J.R.P. (2017). Layer-Specific Organization of Local Excitatory and Inhibitory Synaptic Connectivity in the Rat Presubiculum. *Cerebral cortex* (New York, NY : 1991) 27, 2435-2452.
- Piatti, V.C., Davies-Sala, M.G., Esposito, M.S., Mongiat, L.A., Trincherro, M.F., and Schinder, A.F. (2011). The timing for neuronal maturation in the adult hippocampus is modulated by local network activity. *J Neurosci* 31, 7715-7728.
- Piatti, V.C., Ewell, L.A., and Leutgeb, J.K. (2013). Neurogenesis in the dentate gyrus: carrying the message or dictating the tone. *Front Neurosci* 7, 50.
- Pouille, F., and Scanziani, M. (2001). Enforcement of temporal fidelity in pyramidal cells by somatic feed-forward inhibition. *Science* (New York, NY) 293, 1159-1163.
- Pouille, F., Watkinson, O., Scanziani, M., and Trevelyan, A.J. (2013). The contribution of synaptic location to inhibitory gain control in pyramidal cells. *Physiol Rep* 1, e00067-e00067.
- Poulopoulos, A., Aramuni, G., Meyer, G., Soykan, T., Hoon, M., Papadopoulos, T., Zhang, M., Paarmann, I., Fuchs, C., Harvey, K., *et al.* (2009). Neuroligin 2 drives postsynaptic assembly at perisomatic inhibitory synapses through gephyrin and collybistin. *Neuron* 63, 628-642.
- Rawson, R.L., Martin, E.A., and Williams, M.E. (2017). Mechanisms of input and output synaptic specificity: finding partners, building synapses, and fine-tuning communication. *Current opinion in neurobiology* 45, 39-44.
- Restivo, L., Niibori, Y., Mercaldo, V., Josselyn, S.A., and Frankland, P.W. (2015). Development of Adult-Generated Cell Connectivity with Excitatory and Inhibitory Cell Populations in the Hippocampus. *J Neurosci* 35, 10600-10612.
- Ribak, C.E., Seress, L., and Leranth, C. (1993). Electron microscopic immunocytochemical study of the distribution of parvalbumin-containing neurons and axon terminals in the primate dentate gyrus and Ammon's horn. *J Comp Neurol* 327, 298-321.
- Rivera, C., Voipio, J., Payne, J.A., Ruusuvuori, E., Lahtinen, H., Lamsa, K., Pirvola, U., Saarma, M., and Kaila, K. (1999). The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* 397, 251-255.
- Royer, S., Zemelman, B.V., Losonczy, A., Kim, J., Chance, F., Magee, J.C., and Buzsáki, G. (2012). Control of timing, rate and bursts of hippocampal place cells by dendritic and somatic inhibition. *Nature neuroscience* 15, 769-775.
- Rudy, B., Fishell, G., Lee, S., and Hjerling-Leffler, J. (2011). Three groups of interneurons account for nearly 100% of neocortical GABAergic neurons. *Dev Neurobiol* 71, 45-61.
- Ruth, R.E., Collier, T.J., and Routtenberg, A. (1982). Topography between the entorhinal cortex and the dentate septotemporal axis in rats: I. Medial and intermediate entorhinal projecting cells. *J Comp Neurol* 209, 69-78.
- Sahay, A., Wilson, D.A., and Hen, R. (2011). Pattern separation: a common function for new neurons in hippocampus and olfactory bulb. *Neuron* 70, 582-588.
- Sailor, K.A., Schinder, A.F., and Lledo, P.-M. (2017). Adult neurogenesis beyond the niche: its potential for driving brain plasticity. *Current opinion in neurobiology* 42, 111-117.

- Sambandan, S., Sauer, J.-F., Vida, I., and Bartos, M. (2010). Associative plasticity at excitatory synapses facilitates recruitment of fast-spiking interneurons in the dentate gyrus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* *30*, 11826-11837.
- Santoro, A. (2013). Reassessing pattern separation in the dentate gyrus. *Front Behav Neurosci* *7*, 96.
- Savanthrapadian, S., Meyer, T., Elgueta, C., Booker, S.A., Vida, I., and Bartos, M. (2014). Synaptic properties of SOM- and CCK-expressing cells in dentate gyrus interneuron networks. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* *34*, 8197-8209.
- Scharfman, H.E. (1995). Electrophysiological evidence that dentate hilar mossy cells are excitatory and innervate both granule cells and interneurons. *Journal of neurophysiology* *74*, 179-194.
- Scharfman, H.E. (2016). The enigmatic mossy cell of the dentate gyrus. *Nat Rev Neurosci* *17*, 562-575.
- Scharfman, H.E. (2018). Advances in understanding hilar mossy cells of the dentate gyrus. *Cell Tissue Res* *373*, 643-652.
- Schmidt-Hieber, C., Jonas, P., and Bischofberger, J. (2004). Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature* *429*, 184-187.
- Scoville, W.B., and Milner, B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* *20*, 11-21.
- Shinohara, Y., Hosoya, A., and Hirase, H. (2013). Experience enhances gamma oscillations and interhemispheric asymmetry in the hippocampus. *Nat Commun* *4*, 1652.
- Silberberg, G., and Markram, H. (2007). Disynaptic inhibition between neocortical pyramidal cells mediated by Martinotti cells. *Neuron* *53*, 735-746.
- Sloviter, R.S. (1991). Feedforward and feedback inhibition of hippocampal principal cell activity evoked by perforant path stimulation: GABA-mediated mechanisms that regulate excitability in vivo. *Hippocampus* *1*, 31-40.
- Soltesz, I., Smetters, D.K., and Mody, I. (1995). Tonic inhibition originates from synapses close to the soma. *Neuron* *14*, 1273-1283.
- Somogyi, P., Kisvárdy, Z.F., Martin, K.A., and Whitteridge, D. (1983). Synaptic connections of morphologically identified and physiologically characterized large basket cells in the striate cortex of cat. *Neuroscience* *10*, 261-294.
- Song, J., Olsen, R.H.J., Sun, J., Ming, G.-L., and Song, H. (2016). Neuronal Circuitry Mechanisms Regulating Adult Mammalian Neurogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* *8*, a018937.
- Song, J., Zhong, C., Bonaguidi, M.A., Sun, G.J., Hsu, D., Gu, Y., Meletis, K., Huang, Z.J., Ge, S., Enikolopov, G., *et al.* (2012). Neuronal circuitry mechanism regulating adult quiescent neural stem-cell fate decision. *Nature* *489*, 150-154.

Sorrells, S.F., Paredes, M.F., Cebrian-Silla, A., Sandoval, K., Qi, D., Kelley, K.W., James, D., Mayer, S., Chang, J., Auguste, K.I., *et al.* (2018). Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults. *Nature* 555, 377-381.

Spruston, N. (2008). Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration. *Nature reviews Neuroscience* 9, 206-221.

Squire, L.R., and Cave, C.B. (1991). The hippocampus, memory, and space. *Hippocampus* 1, 269-271.

Stark, E., Roux, L., Eichler, R., and Buzsaki, G. (2015). Local generation of multineuronal spike sequences in the hippocampal CA1 region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 10521-10526.

Stevens, C.F., and Wang, Y. (1994). Changes in reliability of synaptic function as a mechanism for plasticity. *Nature* 371, 704-707.

Sun, G.J., Sailor, K.A., Mahmood, Q.A., Chavali, N., Christian, K.M., Song, H., and Ming, G.-I. (2013). Seamless reconstruction of intact adult-born neurons by serial end-block imaging reveals complex axonal guidance and development in the adult hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33, 11400-11411.

Tamamaki, N., and Tomioka, R. (2010). Long-Range GABAergic Connections Distributed throughout the Neocortex and their Possible Function. *Frontiers in neuroscience* 4, 202-202.

Taniguchi, H., He, M., Wu, P., Kim, S., Paik, R., Sugino, K., Kvitsiani, D., Fu, Y., Lu, J., Lin, Y., *et al.* (2011). A resource of Cre driver lines for genetic targeting of GABAergic neurons in cerebral cortex. *Neuron* 71, 995-1013.

Tasic, B., Menon, V., Nguyen, T.N., Kim, T.K., Jarsky, T., Yao, Z., Levi, B., Gray, L.T., Sorensen, S.A., Dolbeare, T., *et al.* (2016). Adult mouse cortical cell taxonomy revealed by single cell transcriptomics. *Nature neuroscience* 19, 335-346.

Temprana, S.G., Mongiat, L.A., Yang, S.M., Trincherro, M.F., Alvarez, D.D., Kropff, E., Giacomini, D., Beltramone, N., Lanuza, G.M., and Schinder, A.F. (2015). Delayed coupling to feedback inhibition during a critical period for the integration of adult-born granule cells. *Neuron* 85, 116-130.

Tetzlaff, T., Helias, M., Einevoll, G.T., and Diesmann, M. (2012). Decorrelation of neural-network activity by inhibitory feedback. *PLoS Comput Biol* 8, e1002596-e1002596.

Thomson, A.M., Girdlestone, D., and West, D.C. (1988). Voltage-dependent currents prolong single-axon postsynaptic potentials in layer III pyramidal neurons in rat neocortical slices. *Journal of neurophysiology* 60, 1896-1907.

Toda, T., Parylak, S.L., Linker, S.B., and Gage, F.H. (2019). The role of adult hippocampal neurogenesis in brain health and disease. *Mol Psychiatry* 24, 67-87.

Toni, N., Laplagne, D.A., Zhao, C., Lombardi, G., Ribak, C.E., Gage, F.H., and Schinder, A.F. (2008). Neurons born in the adult dentate gyrus form functional synapses with target cells. *Nat Neurosci* 11, 901-907.

Toni, N., Teng, E.M., Bushong, E.A., Aimone, J.B., Zhao, C., Consiglio, A., van Praag, H., Martone, M.E., Ellisman, M.H., and Gage, F.H. (2007). Synapse formation on neurons born in the adult hippocampus. *Nature neuroscience* 10, 727-734.

- Tremblay, R., Lee, S., and Rudy, B. (2016). GABAergic Interneurons in the Neocortex: From Cellular Properties to Circuits. *Neuron* 91, 260-292.
- Treves, A., and Rolls, E.T. (1994). Computational analysis of the role of the hippocampus in memory. *Hippocampus* 4, 374-391.
- Tyagarajan, S.K., and Fritschy, J.-M. (2014). Gephyrin: a master regulator of neuronal function? *Nature reviews Neuroscience* 15, 141-156.
- van Praag, H., Kempermann, G., and Gage, F.H. (1999). Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nature neuroscience* 2, 266-270.
- van Praag, H., Schinder, A.F., Christie, B.R., Toni, N., Palmer, T.D., and Gage, F.H. (2002). Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 415, 1030-1034.
- Varela, F., Lachaux, J.P., Rodriguez, E., and Martinerie, J. (2001). The brainweb: phase synchronization and large-scale integration. *Nature reviews Neuroscience* 2, 229-239.
- Vivar, C., Potter, M.C., Choi, J., Lee, J.-Y., Stringer, T.P., Callaway, E.M., Gage, F.H., Suh, H., and van Praag, H. (2012). Monosynaptic inputs to new neurons in the dentate gyrus. *Nature communications* 3, 1107-1107.
- Vivar, C., Potter, M.C., and van Praag, H. (2013). All about running: synaptic plasticity, growth factors and adult hippocampal neurogenesis. *Curr Top Behav Neurosci* 15, 189-210.
- Vu, E.T., and Krasne, F.B. (1992). Evidence for a computational distinction between proximal and distal neuronal inhibition. *Science (New York, NY)* 255, 1710-1712.
- Wang, X.-J. (2010). Neurophysiological and computational principles of cortical rhythms in cognition. *Physiological reviews* 90, 1195-1268.
- Wei, Z., Meng, X., El Fatimy, R., Sun, B., Mai, D., Zhang, J., Arora, R., Zeng, A., Xu, P., Qu, S., *et al.* (2020). Environmental enrichment prevents A β oligomer-induced synaptic dysfunction through mirna-132 and hdac3 signaling pathways. *Neurobiol Dis* 134, 104617-104617.
- Witter, M.P., Doan, T.P., Jacobsen, B., Nilssen, E.S., and Ohara, S. (2017). Architecture of the Entorhinal Cortex A Review of Entorhinal Anatomy in Rodents with Some Comparative Notes. *Front Syst Neurosci* 11, 46.
- Witter, M.P., Van Hoesen, G.W., and Amaral, D.G. (1989). Topographical organization of the entorhinal projection to the dentate gyrus of the monkey. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 9, 216-228.
- Xu, H., Jeong, H.-Y., Tremblay, R., and Rudy, B. (2013). Neocortical somatostatin-expressing GABAergic interneurons disinhibit the thalamorecipient layer 4. *Neuron* 77, 155-167.
- Yeh, C.-Y., Asrican, B., Moss, J., Quintanilla, L.J., He, T., Mao, X., Cassé, F., Gebara, E., Bao, H., Lu, W., *et al.* (2018). Mossy Cells Control Adult Neural Stem Cell Quiescence and Maintenance through a Dynamic Balance between Direct and Indirect Pathways. *Neuron* 99, 493-510.e494.
- Yogev, S., and Shen, K. (2014). Cellular and molecular mechanisms of synaptic specificity. *Annual review of cell and developmental biology* 30, 417-437.

- Yoshimura, Y., and Callaway, E.M. (2005). Fine-scale specificity of cortical networks depends on inhibitory cell type and connectivity. *Nature neuroscience* 8, 1552-1559.
- Yuan, M., Meyer, T., Benkowitz, C., Savanthrapadian, S., Ansel-Bollepalli, L., Foggetti, A., Wulff, P., Alcami, P., Elgueta, C., and Bartos, M. (2017). Somatostatin-positive interneurons in the dentate gyrus of mice provide local- and long-range septal synaptic inhibition. *Elife* 6.
- Zeisel, A., Muñoz-Manchado, A.B., Codeluppi, S., Lönnerberg, P., La Manno, G., Juréus, A., Marques, S., Munguba, H., He, L., Betsholtz, C., *et al.* (2015). Brain structure. Cell types in the mouse cortex and hippocampus revealed by single-cell RNA-seq. *Science (New York, NY)* 347, 1138-1142.
- Zemelman, B.V., Lee, G.A., Ng, M., and Miesenböck, G. (2002). Selective photostimulation of genetically chARGed neurons. *Neuron* 33, 15-22.
- Zhang, J., and Jiao, J. (2015). Molecular Biomarkers for Embryonic and Adult Neural Stem Cell and Neurogenesis. *Biomed Res Int* 2015, 727542-727542.
- Zhao, C., Deng, W., and Gage, F.H. (2008). Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 132, 645-660.
- Zhao, C., Teng, E.M., Summers, R.G., Jr., Ming, G.L., and Gage, F.H. (2006). Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *J Neurosci* 26, 3-11.
- Zimmer, J. (1971). Ipsilateral afferents to the commissural zone of the fascia dentata, demonstrated in decommissurated rats by silver impregnation. *J Comp Neurol* 142, 393-416.
- Znamenskiy, P., Kim, M.-H., Muir, D.R., Iacaruso, M.F., Hofer, S.B., and Mrsic-Flogel, T.D. (2018). Functional selectivity and specific connectivity of inhibitory neurons in primary visual cortex. *bioRxiv*, 294835.