



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular

**Influencia de las neuronas nuevas del giro dentado sobre la formación de memorias
espaciales en el hipocampo de ratón**

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

Lic. Matías Mugnaini

Director de Tesis: Dr. Emilio Kropff

Co-Directora de Tesis: Dra. Verónica del Carmen Piatti

Consejero de estudios: Dr. Arturo Romano

Lugar de trabajo: Laboratorio de Fisiología y Algoritmos del Cerebro,
Laboratorio de Plasticidad Neuronal,
Fundación Instituto Leloir

Buenos Aires, 01 de Febrero de 2023.

Influencia de las neuronas nuevas del giro dentado sobre la formación de memorias espaciales en el hipocampo de ratón

Durante la vida adulta, los circuitos del hipocampo atraviesan un extenso remodelado que tiene como uno de sus principales elementos la generación de células granulares nuevas. Mientras que muchos aspectos de este proceso han sido estudiados, la contribución de las células granulares nacidas en la adultez (CGna) en el giro dentado a las operaciones espaciales del hipocampo es todavía incierta. En esta tesis, mostramos que la activación optogenética de las CGna de 4 semanas de edad (jóvenes) en ratones forrageantes produjo la reconfiguración irreversible de los mapas espaciales en CA3 proximal, mientras que apenas evocó actividad neuronal. La estimulación de la misma cohorte en días siguientes, reclutó más neuronas de CA3 con creciente eficacia pero no indujo remapeo. En contraste, las CGna de 8 semanas de edad (maduras) reclutaron un gran número de neuronas de CA3 desde la primera estimulación, pero no produjeron alteraciones en los mapas espaciales. Nuestros resultados revelan que las CGnas jóvenes tienen un potencial único para remodelar las representaciones de CA3, que se extingue una vez desplegado y se pierde con la maduración neuronal. Esta habilidad podría ser crucial para generar códigos ortogonalizados río abajo que soporten la separación de patrones.

Palabras claves: Neurogénesis; Células de lugar; Plasticidad sináptica; Giro dentado; Remapeo.

Influence of adult born neurons of the dentate gyrus on spatial memory formation in the mice hippocampus

Mammalian hippocampal circuits undergo extensive remodeling through adult neurogenesis. While this process has been widely studied, the specific contribution of adult-born granule cells (aGCs) in the dentate gyrus to spatial operations in the hippocampus remains unknown. Here we show that optogenetic activation of 4-week-old (young) aGCs in free-foraging mice produces a non-reversible reconfiguration of spatial maps in proximal CA3, while rarely evoking neural activity. Stimulation of the same neuronal cohort on subsequent days recruits CA3 neurons with increased efficacy but fails to induce further remapping. In contrast, stimulation of 8-week-old (mature) aGCs can reliably activate CA3 cells but produce no alterations in spatial maps. Our results reveal a unique role of young aGCs in remodeling CA3 representations, a potential that can be depleted and is lost with maturation. This ability could contribute to generate orthogonalized downstream codes supporting pattern separation.

Key words: Neurogenesis; Place cells; Synaptic plasticity; Dentate gyrus; Remapping.

Agradecimientos

“Arribo, ahora, al inefable centro de mi relato; empieza, aquí, mi desesperación de escritor. Todo lenguaje es un alfabeto de símbolos cuyo ejercicio presupone un pasado que los interlocutores comparten; ¿cómo transmitir a los otros el infinito Aleph, que mi temerosa memoria apenas abarca? (...). Por lo demás, el problema central es irresoluble: la enumeración, siquiera parcial, de un conjunto infinito. En ese instante gigantesco, he visto millones de actos deleitables o atroces; ninguno me asombró como el hecho de que todos ocuparan el mismo punto, sin superposición y sin transparencia. Lo que vieron mis ojos fue simultáneo: lo que transcribiré, sucesivo, porque el lenguaje lo es. Algo, sin embargo, recogeré.” (Borges, 1949).

El problema que tuvo Jorge me fascinó desde que lo leí, así que lo cito (como se hace en la academia, ya que claramente algunos expresan el ser mejor que uno). Creo tener ese problema cada vez que hablo o escribo. Esta no es una excepción. Ahora por ejemplo, escribiendo, sé que andan por ahí. Me refiero a quienes anduvieron conmigo y, este es justamente parte del problema, a quienes no (o no directamente) también. Básicamente: a veces creo que con cada agradecimiento uno debería escribir una historia universal, como las que se pretendían escribir antes de la era de la información (capaz quedan pretendientes por ahí). Todavía así sería insuficiente, como eran aquellas.

Si pretendiera al menos listar las individualidades (porque no son sólo personas) contemporáneas que anduvieron conmigo, sé que algunas que hace años hubieran sido obvias, ahora no las nombraría. Sin embargo, las siento todas acá. A todas (bueno, tampoco tanta intensidad). Siento a algunas. Pero más allá de lo que sienta, si es que el modelo de universo corporeizado en mi individualidad está más o menos ajustado, parece cierto que esas otras individualidades (o alguno de sus aspectos) serían efectivamente N en las variables que explican mi varianza. Parece efectivamente que, mas allá de lo que sintamos (o no), somos elementos del mismo sistema.

Les quiero agradecer (para eso estamos) a todas esas individualidades por eso, por la grupalidad que nos hace. Sumamente agradecerles. Enormísimamente. Porque compartimos, coexistimos, convergimos (y también divergimos). Les voy a decir (ya les fui diciendo a varias de ellas). A algunas supongo que no voy a poder, pero creo (espero) que saben (o supieron) que estoy agradecido. Gracias a vos también por tu atención y tiempo.

INDICE

Introducción

- I.1 Neurogénesis en el hipocampo adulto, 8
 - I.1.1 Anatomía hipocampal, 8
 - I.1.2 Hipocampo: función, 9
 - I.1.3 Giro dentado: nicho neurogénico y función, 10
 - I.1.4 Las células granulares nacidas en la adultez, 12
- I.2 La sinapsis entre las fibras musgosas y las células de CA3, 13
 - I.2.1 Plasticidad de la sinapsis, 14
 - I.2.2 Otros aferentes a CA3, 15
- I.3 Reorganización de los mapas espaciales del hipocampo, 15
 - I.3.1 Remapeo fisiológico, 15
 - I.3.2 Eje próximo-distal de CA3, 17
 - I.3.3 Remapeo artificial, 18
- I.4 Separación de patrones, 19
 - I.4.1 El modelo clásico, 19
 - I.4.2 Separación de patrones en la red GD-CA3, 21
- I.5 Objetivos e hipótesis, 23

Materiales y métodos, 24

- M.1 Animales, 24
 - M.1.1 Grupos experimentales, 25
- M.2 Implante de opto-drives, 25
 - M.2.1 Opto-drives, 25
 - M.2.2 Cirugía de implante de microdrive, 25
- M.3 Descenso con tetrodos, 26
- M.4 Comportamiento, 26
 - M.4.1 Familiarización (días -5 a -1), 27
 - M.4.2 Experimentos de ambiente familiar (días 0, 1 y 3), 27
 - M.4.3 Experimentos de ambiente novedoso (día 2), 27
- M.5 Ratones longevos de la condición madura, 28
- M.6 Estimulación óptica, 28
- M.7 Análisis de datos, 29

- M.7.1 Recolección de los datos, 29
- M.7.2 *Spike sorting*, 29
- M.7.3 Mapas espaciales (medidas), 29
- M.7.4 Variaciones de la tasa de disparo en *bines* espaciales estimulados, 30
- M.7.5 Estadística aleatorizada (*Shuffling*), 31
- M.7.6 Clasificación de la actividad evocada, 31
- M.7.7 Análisis de los trenes de pulsos, 32
- M.7.8 Criterio de selección de células, 32
- M.8 Histología, 32
 - M.8.1 Procesamiento de cerebros para histología, 32
 - M.8.2 Conteo de células ChR2-EYFP⁺, 33
 - M.8.2.1 Inmunofluorescencia, 33
 - M.8.2.2 Microscopía confocal, 33
- M.9 Electrofisiología *ex vivo*, 33
 - M.9.1 Preparación de rodajas, 33
 - M.9.2 Optogenética *ex vivo*, 34

Resultados, 35

- R.1 Efecto de la actividad de las CGnas jóvenes o maduras en los mapas espaciales de CA3, 35
 - R.1.1 Estrategia experimental general, 35
 - R.1.2 Familiarización a la arena y estimulación óptica, 36
 - R.1.3 Las CGna jóvenes inducen la reconfiguración de los mapas espaciales de CA3 proximal, 40
 - R.1.4 Incremento transitorio en el disparo relativo a los *bines* estimulados en células remapeantes y no remapeantes, 46
 - R.1.5 Las CGna jóvenes de CA3 distal no inducen remapeo, 48
 - R.1.6 Depleción rápida de la capacidad de las CGna jóvenes para inducir remapeo, 49
 - R.1.7 La edad de las CGna y no la de los ratones explica el remapeo, 49
 - R.1.8 Conclusiones parciales, 50
- R.2 Cambios en la estabilidad de los mapas espaciales de CA3 asociados al remapeo inducido, 51

R.2.1 Variaciones en la estabilidad de células remapeantes y no remapeantes entre los días 1 y 2, 51

R.2.2 Nuevos mapas estables inducidos por la estimación de CGna jóvenes en los días 1 y 2, 53

R.2.3 Conclusiones parciales, 53

R.3 Caracterización de la actividad de las células de CA3 proximal evocada por la estimulación de las CGna, 53

R.3.1 Análisis de las respuestas evocadas temprana y tardía, 53

R.3.2 Análisis de la respuesta evocada a lo largo del tren de estímulos, 57

R.3.3 Conclusiones parciales, 58

R.4 Relación entre la actividad evocada y el remapeo en CA3, 59

R.4.1 Conclusiones parciales, 62

Discusión 63

D.1 Las CGn jóvenes poseen potencial único para remodelar los circuitos de CA3, 64

D.2 Actividad de las células de CA3 evocada por las CGna jóvenes y maduras, 64

D.3 Inducción artificial de la reorganización de mapas espaciales en el hipocampo, 65

D.4 Efectos proximales, 65

D.5 Separación de patrones, 66

D.6 Conclusiones, 68

Glosario, 70

REFERENCIAS, 71

Esta página fue intencionalmente dejada en blanco

Introducción

I.1 Neurogénesis en el hipocampo adulto

I.1.1 Anatomía hipocampal

El hipocampo de roedores está conformado por al menos cuatro subcampos: el giro dentado (GD) y los pertenecientes al *Cornu Amonnis* (CA1, CA2 y CA3). El flujo informacional de esta red ha sido clásicamente descrito siguiendo la dirección del llamado circuito trisináptico: GD > CA3 > CA1 (Figura i1). Sin embargo, la conectividad hipocampal incluye mayores niveles de complejidad. Para el propósito de este trabajo, cabe destacar dos caminos alternativos: 1) CA3 y CA1 reciben conexiones directas de la corteza entorrinal (CE) que no pasan por el GD y 2) CA3 envía proyecciones hacia atrás, al GD (Amaral et al., 2007). Una parte importante de la información procesada en el hipocampo converge hacia su salida principal, el subiculum, el cual a su vez proyecta principalmente a las cortezas entorrinal y perirrinal (O'Mara, 2005).

Entre las células principales del hipocampo tenemos a las células granulares (CG) en el GD y las piramidales en los CA. Las CG están distribuidas compactamente en una capa en forma de "C", cuya característica silencia está dada principalmente por la actividad dispersa devenida en parte de la fortaleza de las redes inhibitorias de *feedforward* y *feedback* (Andersen et al., 2006). Las CG extienden sus dendritas hacia la capa molecular, que recibe aferencias de la CE y está limitada por la fisura hipocampal. Sus axones, las fibras musgosas, atraviesan primero el hilus y luego CA3. En el GD se encuentran también las células musgosas (CM), interneuronas excitatorias con conexiones ipsi y contralaterales (Scharfman, 2016).

Como en el resto de los CA, las células piramidales de CA3 están dispuestas en una capa que se despliega transversalmente entre los *strata radiatum* y *oriens* desde el hilus y hasta el subiculum (Andersen et al., 2006). En el segmento proximal de CA3 las fibras musgosas se extienden supra, infra e intra-laminarmente respecto de la capa de células piramidales. En el segmento distal, en cambio, predominan supralaminarmente en el llamado *stratum lucidum*, el cual está delimitado por CA2 (Witter, 2007; Witter et al., 2014).

Todos los subcampos están poblados por interneuronas inhibitorias que conforman circuitos de *feedback* y *feedforward*, siendo las más prominentes y mayormente estudiadas las parabalvúmina y somatostatina positivas (Groisman et al., 2020).

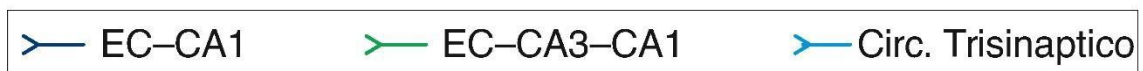
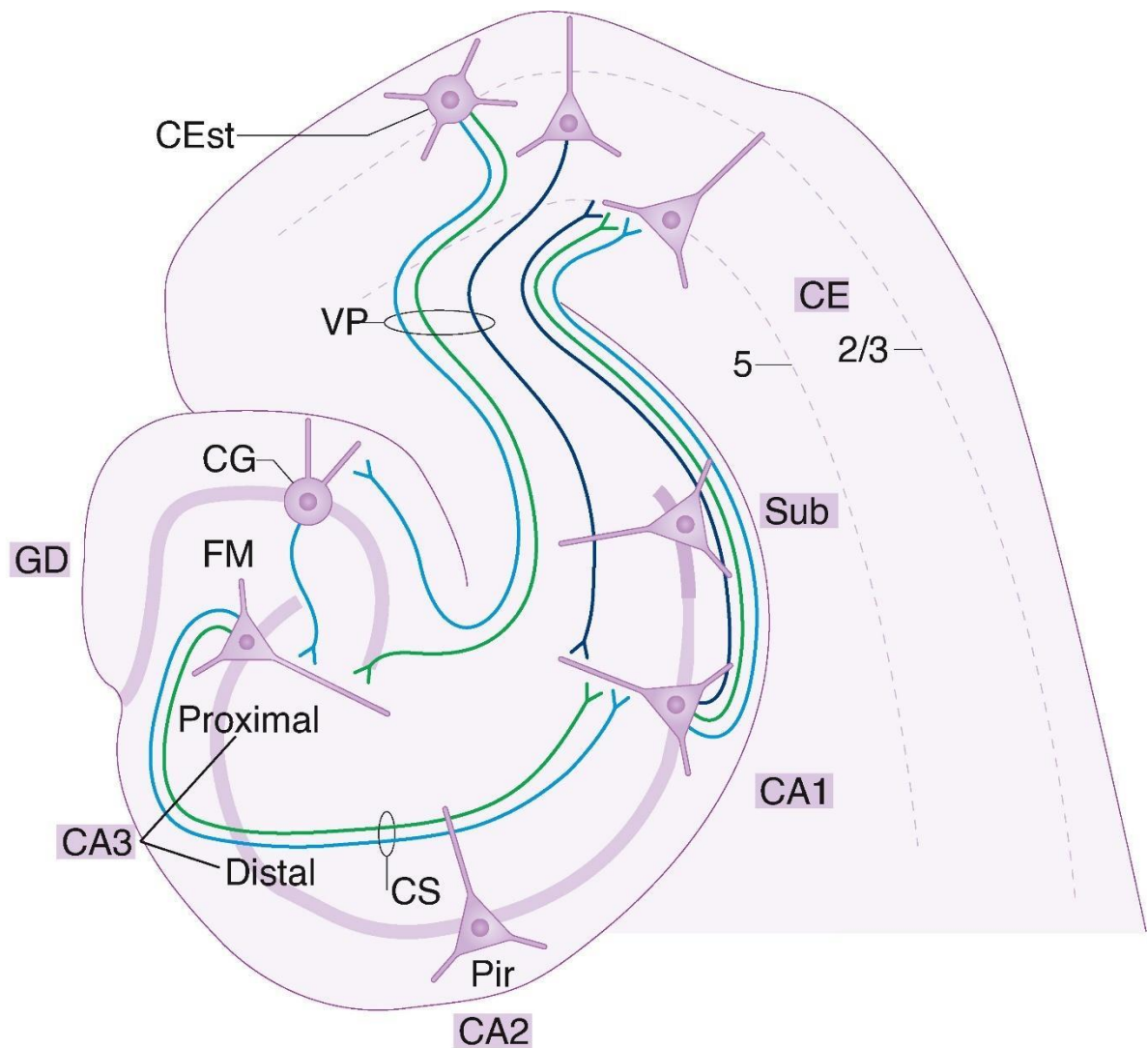


Figura i1. Anatomía hipocampal. Esquema de la anatomía del hipocampo adaptado de Hainmueller y Bartos, 2020a. Se muestran las principales conexiones del hipocampo murino. Circuitos indicados (código de color). CA3 proximal y distal indicados. Corteza entorrinal (CE), capas 5 y 2/3 indicadas. Giro dentado (GD). Cornu Ammonis (CA). Vía perforante (VP). Célula granular (CG). Fibra musgosa (FM). Colateral de Schaffer (CS). Subiculum (Sub). Célula estrellada (CEst).

I.1.2 Hipocampo: función

La función del hipocampo ha sido prominentemente asociada a la memoria y al procesamiento de secuencias espacio-temporales (Eichenbaum, 2004; Buzsaki y Tingley, 2018). Particularmente el hipocampo tiene un rol fundamental en la memoria episódica (dónde / cuándo / qué de un evento) y en la navegación espacial (O'Keefe y Nadel, 1978). En

roedores el estudio de dicho rol ha ocupado históricamente el centro de los esfuerzos científicos por décadas. No obstante, el hipocampo también tiene un rol prominente en el procesamiento de información no espacial (qué, más que dónde) (Eichenbaum, 2004).

Uno de los sellos distintivos del hipocampo como procesador de información espacial es la presencia de grandes números de células de lugar (*place cells*), descritas por primera vez en CA1. Estas células se caracterizan por exhibir un aumento pronunciado de su tasa de disparo en una o más regiones del espacio o campos de lugar (O'Keefe & Dostrovsky, 1971). Los campos receptivos de estas células pueden estar localizados en cualquier lugar de un ambiente y su posición es usualmente estable en el tiempo, en tanto no haya alteraciones en dicho ambiente (Latuske et al., 2018). Las células de lugar se organizan en ensambles capaces de representar ambientes enteros y secuencias espaciales tanto retrospectivas como prospectivas que permiten la navegación espacial (Meer et al., 2020). Este tipo de actividad puede ser observada en las células de lugar de todo el hipocampo y depende de la interacción de los inputs y outputs de cada estructura. Por ejemplo, se observó que la actividad de células de lugar en CA3 asociada a sitios de recompensa y ocurrida con anterioridad a alcanzar dicho sitio (prospectiva) depende a su vez de la actividad del GD. Así, la lesión de esta estructura hizo que la actividad prospectiva de las células de lugar de CA3, en una tarea dirigida a meta (*goal directed task*), fuera significativamente menor en sitios de reducida inervación de fibras musgosas (Sasaki et al., 2018).

Además de incluir células especialmente dedicadas al procesamiento de información espacial, como las células de borde (Lever et al., 2009) o de velocidad (Kropff, Carmichael, et al., 2015), la actividad del hipocampo ha sido asociada también a información no espacial. Al respecto, las células piramidales del *Cornu Ammonis* han sido implicadas, entre otras cosas, en el procesamiento de propiedades contextuales (J. K. Leutgeb et al., 2007a; S. Leutgeb et al., 2005), del tiempo (Itskov et al., 2011), del sonido (Aronov et al., 2017) o hasta en la codificación de eventos discretos en una secuencia (C. Sun et al., 2020).

I.1.3 Giro dentado: nicho neurogénico y función

El GD es uno de los pocos nichos neurogénicos del cerebro mamíferos adultos, incluyendo a humanos (Moreno-Jiménez et al., 2019; Sorrells et al., 2018). Diariamente un subconjunto de células madre neuronales similares a la glía (*radial glia like cells*) proliferan y dan origen a neuroblastos que comienzan su diferenciación hacia un fenotipo neuronal en la zona

subgranular (ZSG) del GD (Bonaguidi, 2012; Zhao et al., 2008). A diferencia del proceso homólogo ocurrido durante el desarrollo del organismo, la neurogénesis adulta es lenta y puede tardar hasta 8-10 semanas en exhibir un fenotipo maduro (Kropff, Yang, et al., 2015). Se estima que el número de neuronas generadas asciende a unas 700 diarias, al menos en humanos (Spalding et al., 2013).

Una de las hipótesis sobre el principal rol del GD emerge de trabajos realizados en tareas de discriminación e indica su preponderante participación en la discriminación de estímulos similares. En estos trabajos se ha determinado que el GD es necesario para la resolución de dichas tareas (Gilbert et al., 2001; T. J. McHugh et al., 2007; Morris et al., 2012), sobre todo cuando los estímulos son similares (Goodrich-Hunsaker et al., 2008). Por ejemplo, Hunsaker y colaboradores vieron que, producto de la lesión del GD, el rendimiento en una tarea de ordenamiento temporal de localizaciones espaciales fue menor sólo en las condiciones de alta interferencia entre estímulos, cuando la discriminación fina fue necesaria.

Estudios en esta misma línea indican que el rol del GD en la discriminación de estímulos estaría mediado por la neurogénesis. Así, en experimentos en donde fue alterada la tasa de neurogénesis se observó que su incremento afecta positivamente el rendimiento en tareas de discriminación (Creer et al., 2010; Sahay et al., 2011). En otros trabajos en donde la neurogénesis fue disminuida se observó un efecto negativo en el rendimiento de dichas tareas (Clelland et al., 2009; Goodrich-Hunsaker et al., 2008; Nakashiba et al., 2012; Scobie et al., 2009; Tronel et al., 2012). Entre estos estudios, Nakashiba y colaboradores (2012) observaron que la remoción con rayos X de las CG nacidas en la adultez (CGna) de menos de 4 semanas, en un GD cuyas CG y CGna maduras habían sido inhibidas con la toxina del tétano, produjo una marcada disminución en una tarea de discriminación de estímulos en un paradigma de condicionamiento de miedo contextual. En contraste, las CGna jóvenes fueron suficientes para que los ratones ejecutaran igual o mejor dicha tarea.

Conjuntamente, esta línea de evidencia indica que la neurogénesis adulta contribuye a la función del GD en la discriminación de estímulos. No obstante, el rol específico en la transmisión de información río abajo que tienen las CGna de distintas edades y su impacto diferencial en la discriminación de estímulos a nivel electrofisiológico, ha sido insuficientemente abordado (Kropff, Yang, et al., 2015; Piatti et al., 2013).

I.1.4 Las células granulares nacidas en la adultez

El desarrollo de las CGNa es notablemente lento respecto a sus pares nacidas en el desarrollo, como se indicó anteriormente. En un período que abarca entre 8 a 10 semanas la morfología, las propiedades electrofisiológicas intrínsecas y las conexiones sinápticas evolucionan en paralelo hacia un fenotipo maduro (Kropff, Yang, et al., 2015) (Figura i2).

Alrededor de la cuarta semana de vida, período de particular interés para el presente trabajo, las CGNa jóvenes ya son capaces de integrar información sináptica, disparar potenciales de acción y excitar a sus blancos por vía de la liberación de glutamato (Espósito et al., 2005; Gu et al., 2012; Marín-Burgin et al., 2012b; Mongiat et al., 2009; Stone et al., 2011). Estas células exhiben transitoriamente una característica hiperplasticidad e hiperexcitabilidad (Ge et al., 2007; Schmidt-Hieber et al., 2004), parcialmente mediadas por la alta resistencia al input (mayor que la que exhiben las maduras) y la falta de conexiones perisomáticas GABAérgicas (Dieni et al., 2013). Estas propiedades contrastan con la característica silencio del GD. Las CGs poseen además una baja especificidad en el input (Danielson et al., 2016; Marín-Burgin et al., 2012b; S. B. McHugh et al., 2022). A propósito, Danielson y colaboradores (2016) observaron con imaginería de Ca^{2+} con microscopía de dos fotones que CGNa de hasta 6 semanas exhibían mapas espaciales menos informativos que sus pares maduras en un paradigma de realidad virtual.

Entre la cuarta y la octava semana las CGNa se integran a las redes gabaérgicas locales de *feedforward* y *feedback* (Temprana et al., 2015) y su excitabilidad decae hasta alcanzar un fenotipo maduro para las semanas 8-10 de edad (Groisman et al., 2020). En este punto sus propiedades ya son indistinguibles de aquellas nacidas perinatalmente (Laplagne et al., 2006; Toni et al., 2008).

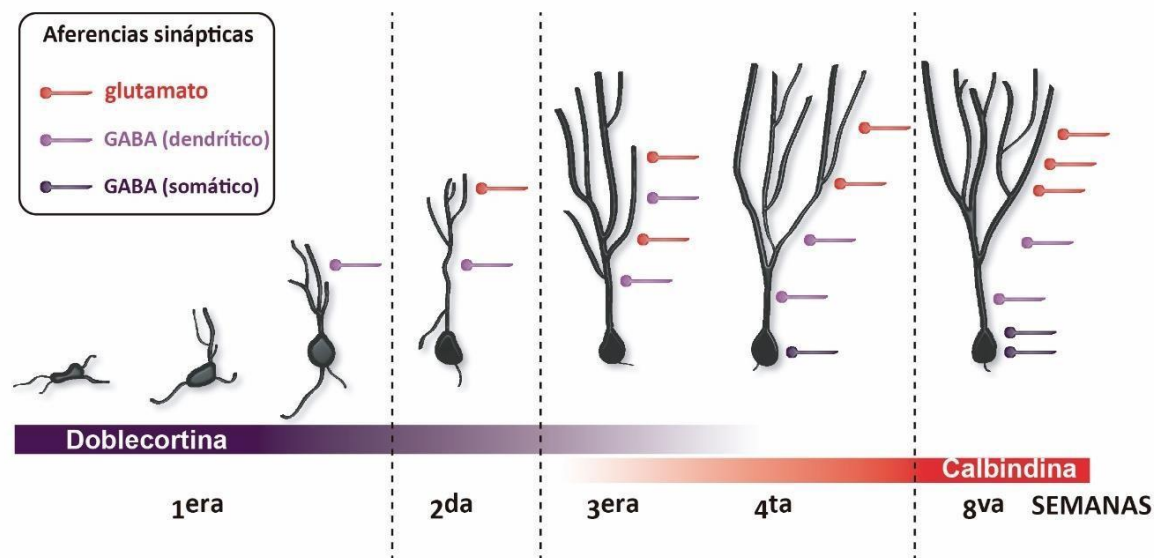


Figura i2: Sinaptogénesis y desarrollo de CGs. Representación esquemática del desarrollo funcional de las CGs. Inicialmente las neuronas reciben aferencias GABAérgicas dendríticas inicialmente despolarizantes (hacia la segunda semana de desarrollo). Con el desarrollo, adquieren contactos glutamatérgicos generando un balance de alta excitación / inhibición. Por último, maduran los contactos perisomáticos GABAérgicos hiperpolarizantes. Esta secuencia de conectividad es una de las razones por la que las neuronas jóvenes son más excitables que las más maduras. Las barras muestran el gradiente de expresión de dos marcadores de la maduración neuronal de CGna, doblecortina y calbindina. Figura modificada de Espósito et al., 2005.

I.2 La sinapsis entre las fibras musgosas y las células de CA3

Los axones de las CGna (fibras musgosas) contactan los mismos blancos que sus pares nacidos perinatalmente. Estos incluyen: interneuronas del hilus y de CA3 y sus neuronas piramidales (Faulkner et al., 2008; Gu et al., 2012; Toni et al., 2008). El contacto de las CGna con las células piramidales sucede desde la segunda semana de edad, estabilizándose hacia la semana 4 (Gu et al., 2012). No obstante, a las fibras musgosas de las CGna les toma entre 3 y 5 semanas acceder a la porción distal de CA3, alcanzando su extensión máxima recién a las 11 semanas. Entre las semanas 3 y 5 la densidad de botones en los axones comienza a alcanzar su máximo nivel (G. J. Sun et al., 2013). Restivo y colaboradores han descrito que en el mismo período, particularmente en la semana 4, los filopodios y los botones *en passant* alcanzan su mayor número, decayendo rápidamente en las semanas subsiguientes (Restivo et al., 2015). Esto podría tener consecuencias funcionales en el procesamiento de información local. Sin embargo, si tales consecuencias están linealmente relacionadas a la presencia de filopodios y botones, no ha sido aún dilucidado.

Ha sido propuesto que la transferencia de información en la sinapsis fibra musgosa-CA3 sucedería “uno a uno” en virtud de su presunta fortaleza (McNaughton & Morris, 1987; Treves et al., 2008). No obstante, la presencia de las así llamadas “sinapsis detonadoras” es menor en el sistema nervioso central que en el periférico o en el tallo encefálico (Vyleta et al., 2016), por lo que el consenso sobre su existencia en el hipocampo aún se debate. La relevancia funcional que para el hipocampo pudieran tener las sinapsis detonadoras está asociada a la posibilidad de mediar la selección de células de CA3 en el proceso de formación de memorias (Treves et al., 2008). Así, mientras que en una red con sinapsis débiles la actividad en un ensamble de neuronas depende de la convergencia de inputs presinápticos, en una red de sinapsis fuertes la actividad de una sola célula sería suficiente para inducir actividad en la postsinapsis (Brecht et al., 2004).

Experimentos *in vivo* indican que la estimulación de CGs a alta frecuencia (100 Hz) conjuntamente con la sumación temporal de la respuesta postsináptica son capaces de generar disparos en las células río abajo (Henze et al., 2002; Vyleta et al., 2016). Estos resultados originaron la idea de que la sinapsis fibra musgosa-CA3 podría efectivamente operar como un detonador condicional, esto es, sólo bajo ciertos regímenes de actividad presináptica (Henze et al., 2002). En esta dirección, Vyleta y colaboradores (2016) encontraron que, a pesar de que los potenciales postsinápticos excitatorios (PPSEs) en la sinapsis CGs-CA3 fallaron en la iniciación de disparos, tanto la inducción de plasticidad de corto término como la potenciación post-tetánica produjeron un cambio en la actividad de la sinapsis de un régimen subdetonador a otro detonador. Estos resultados muestran que las CGs nacidas en el desarrollo serían capaces de inducir actividad detonadora río abajo. Menos clara, en cambio, es la naturaleza de la conexión CGna-CA3. Particularmente, hasta la fecha no se sabía si las CGna transmiten información río abajo en forma de espigas (*spikes*).

I.2.1 Plasticidad de la sinapsis CGs-CA3

Elevados niveles de facilitación de corto plazo han sido reportados en la sinapsis CGs-CA3 tanto *ex vivo* (Mori et al., 2004, 2007; Salin et al., 1996; Toth et al., 2000) como *in vivo* (Henze et al., 2002; Zucca et al., 2017). Estos estudios, como la mayoría de los que abordan la actividad en esta sinapsis, no distinguen entre la edad de las CGs estudiadas o incluyen mayormente CGs maduras nacidas en el desarrollo o en la adultez. Por ende, poco se sabe de la plasticidad entre las CGna jóvenes y CA3. La poca evidencia disponible indica que, si bien

tanto las CGna jóvenes como las maduras evocan los mismos niveles de corrientes excitatorias e inhibitorias *ex vivo* (Temprana et al., 2015), las primeras producen mayores niveles de potenciación a largo plazo *in vivo* (Gu et al., 2012). Estos hallazgos reflejarían las propiedades plásticas transientes que las CGna exhiben tanto a nivel intrínseco como a nivel circuital (Ge et al., 2007; Groisman et al., 2020; Schmidt-Hieber et al., 2004; Temprana et al., 2015).

I.2.2 Otros aferentes a CA3

El principal aferente cortical del hipocampo, y en particular de CA3, se origina en las capas superficiales de la corteza entorrinal. Tanto su subdivisión lateral (CEL) como medial (CEM), envían axones al GD, CA3 y CA1 hipocampales. Mientras que la primera procesa información no espacial acerca de objetos y tiempo (Tsao et al., 2013), la corteza medial procesa información espacial, incluyendo varios tipos de neuronas especializadas (Latuske et al., 2018). Entre ellas se encuentran: las células de grilla, caracterizadas por patrones de disparo organizados en hexágonos (Hafting et al., 2005); las células de dirección de la cabeza (Sargolini et al., 2006); las células de borde (Savelli et al., 2008); las células de velocidad (Kropff, Carmichael, et al., 2015). Como las células de lugar del hipocampo, las células de grilla tienen una disposición no topológica en la corteza entorrinal, exhibiendo propiedades constantes entre módulos funcionales que varían dorso-ventralmente a lo largo de la CEM (M. B. Moser et al., 2015).

I.3 Reorganización de los mapas espaciales del hipocampo

I.3.1 Remapeo fisiológico

Los mapas espaciales de las células de lugar pueden atravesar una reorganización causada por alteraciones en los alrededores del animal o por su ingreso a un ambiente distinto (Latuske et al., 2018; J. K. Leutgeb et al., 2007a; S. Leutgeb et al., 2005; Muller & Kubie, 1987). Este remapeo ocurre al menos de dos maneras (Figura i3). Por un lado, la forma *global* implica reorganizaciones extensivas del mapa espacial, como la deriva, eliminación o emergencia *de novo* del o los campos de lugar. El remapeo global requiere usualmente de cambios ambientales drásticos. Por otro lado, la forma *de tasa de disparo* involucra campos de lugar estables que exhiben variaciones de la tasa de disparo de la célula. El remapeo de tasa de disparo implicaría la codificación de información contextual que no está directamente relacionada con la posición del animal.

Debido a que la CE constituye la fuente principal de aferencias corticales hacia el hipocampo, algunos estudios se han enfocado en su estudio con el fin de dilucidar su posible contribución como fuente del remapeo río abajo. Mientras que durante el remapeo de tasa de disparo en CA3 se observó que las *grid cells* de la CEM no exhiben grandes cambios en su actividad, durante el remapeo global se vieron cambios tanto en sus propiedades, como la fase y la orientación (Fyhn et al., 2007). Otro estudio determinó que, en general, el hipocampo provee información espacial de forma más confiable que la que recibe proveniente de la CEM (Cholvin et al., 2021). En la misma línea se observó que la inactivación, tanto farmacogenética como optogenética, de la CEM produce el remapeo de células ubicadas en CA3 (Miao et al., 2015). Sin embargo, en aparente contradicción con estos resultados, un estudio de los efectos de la lesión de la CEM en el remapeo de CA1 no encontró influencias de esta manipulación en el remapeo global ni en la rápida generación de mapas estables (Schlesiger et al., 2018). Estos resultados sugieren entonces que, aunque la CEM sería suficiente para inducir remapeo río abajo en al menos uno de los subcampos del hipocampo, no sería necesaria. Por lo tanto, existiría una fuente alternativa para el remapeo hipocampal. Un estudio reciente acerca del procesamiento de información latente, o aspectos del contexto presente codificados independientemente de la información sensorial inmediata y de las metas futuras, sugiere que la red GD-CA3 podría constituir dicha fuente (Keinath et al., 2020). Los autores de dicho estudio mostraron que la inhibición quimiogenética de la red DG-CA3 suprimió el remapeo de tasa de disparo de las neuronas de CA1 río abajo, sugiriendo que dicho circuito es necesario para la codificación de un aspecto del remapeo en el hipocampo. Existen otras líneas de evidencia que apuntan particularmente al GD como fuente de remapeo en el hipocampo. Uno de estos trabajos mostró inicialmente que las células del GD exhiben mayores niveles de reorganización de los mapas espaciales que sus pares de CA3, indicando que dichas células podrían explicar el remapeo río abajo (J. K. Leutgeb et al., 2007a). Posteriormente estudios dedicados a dilucidar la contribución diferencial de los dos tipos celulares excitatorios del GD indicaron que dicho remapeo provendría más de la población de CM que de las CGs (GoodSmith et al., 2017, 2019a; Hainmueller & Bartos, 2018a; Senzai & Buzsáki, 2017; van Dijk & Fenton, 2018). Esto implicaría que la codificación de distintas representaciones espaciales en CA3 obedecería a cambios graduales en la actividad de las CGs o abruptos de las CMs y no, como se creía, a poblaciones independientes de CGs (Hainmueller & Bartos, 2020a). Cabe destacar que las CM sólo proyectan al interior del GD (Scharfman,

2016), por lo que la mediación del remapeo en CA3 sería todavía a través de interneuronas inhibitorias o de las mismas CGs.

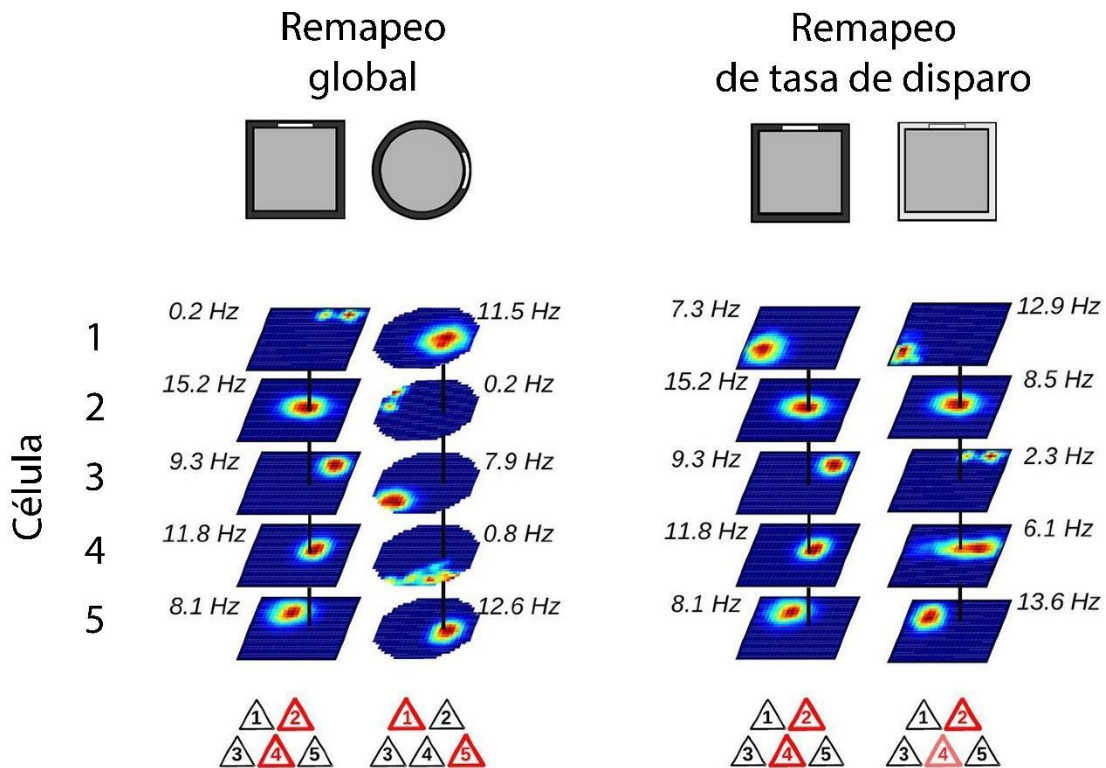


Figura i3. Remapeo. Arriba: El animal recorre los ambientes de geometrías (izquierda) o aspecto (derecha) distintas de manera secuencial. Medio: mapas espaciales de 5 células de lugar del hipocampo. Tasa de disparo máxima indicada a los costados (Hz). Abajo: esquema de la actividad de las células del hipocampo. Nótese a la izquierda que cada ambiente es representado en la red por poblaciones independientes. A la derecha, la representación de los cambios ambientales no implica distintas poblaciones, sino cambios en la tasa de disparo de la misma población. Adaptado de Latuske et al., 2018.

I.3.2 Eje próximo-distal de CA3

Estudios recientes han propuesto que la red GD-CA3 proximal constituye una unidad funcional explicada por la complementariedad de sus propiedades fisiológicas y el alto nivel de conectividad entre las CGs, CMs y piramidales (GoodSmith et al., 2019a). Según estos autores, esta unidad funcional se ubicaría en el extremo medial de un eje extendido a lo largo de CA3 hasta CA2. Dicho eje estaría directamente involucrado en la reorganización de las representaciones espaciales del hipocampo (H. Lee et al., 2015; Lu et al., 2015). Se observó un gradiente en el nivel de remapeo exhibido por las células piramidales de CA3 que decae hacia su porción distal y alcanza valores mínimos en CA2. En particular, mientras que el

remapeo de tasa de disparo decae gradualmente a lo largo del eje, el remapeo global muestra un cambio abrupto cerca de la transición hacia CA2, en CA3 distal (Lu et al., 2015).

I.3.3 Remapeo artificial

Con el fin de ganar una mayor inteligencia en los mecanismos circuitales y celulares del remapeo, muchos estudios se han dedicado en los últimos años a la inducción artificial de campos de lugar. Estos trabajos asumen al menos parcialmente una de dos posturas: 1) un input ambiental cualquiera asociado a la manipulación plástica apropiada puede en principio dar lugar a un nuevo campo de lugar; 2) dichas manipulaciones sólo son exitosas en tanto logren desenmascarar campos de lugar asociados o actividad subumbral preexistentes.

La primera de las posturas ha encontrado apoyo fundamentalmente en el estudio de la plasticidad sináptica de escala temporal comportamental (Bittner et al., 2015, 2017; Diamantaki et al., 2016a, 2018; Milstein et al., 2021). Según ésta, los campos de lugar podrían ser rápidamente formados en cualquier lugar de un ambiente como producto del incremento en los pesos sinápticos de ciertas conexiones, toda vez que se induzcan potenciales de meseta dendríticos de Ca^{2+} (Bittner et al., 2017). Este proceso sería capaz de fortalecer conexiones de forma no hebbiana, independientes de la correlación de la actividad pre- y post sináptica, ya que ha sido demostrado que estos potenciales pueden facilitar la formación de campos de lugar incluso sin coincidir con espigas postsinápticas ni con despolarizaciones subumbrales (Milstein et al., 2021).

Otro conjunto de trabajos dedicados a la manipulación de mapas espaciales apoya no obstante la segunda postura: la idea de que la formación de campos de lugar no involucra asociaciones arbitrarias, sino el desenmascaramiento de actividad preexistente (Dragoi et al., 2003; D. Lee et al., 2012a; McKenzie et al., 2021; Rickgauer et al., 2014; Stark et al., 2012). En estos estudios la estimulación indujo remapeo no sólo en las neuronas blanco, sino también en neuronas no estimuladas (Dragoi et al., 2003; McKenzie et al., 2021; Rickgauer et al., 2014; Stark et al., 2012). Además, entre las neuronas estimuladas, los mapas no coincidieron necesariamente con el sitio de estimulación (Dragoi et al., 2003; McKenzie et al., 2021; Rickgauer et al., 2014). Rickgauer et al. usaron optogenética holográfica para realizar registros y estimulación ópticos simultáneamente e investigar este fenómeno (Rickgauer et al., 2014). Estos autores encontraron que la estimulación constante de baja intensidad aplicada a neuronas de otro modo silentes produjo su disparo en zonas específicas de un corredor lineal

virtual dónde, presumiblemente, el potencial de membrana ya estaba en niveles cercanos al umbral de disparo.

La totalidad de estos estudios han explorado la inducción de campos de lugar, bien en los mismos tipos celulares que fueron estimulados (CGs o piramidales de CA) o en otras sinapsis que la fibras musgosas-CA3. Sólo un trabajo ha explorado la inducción de remapeo en la sinapsis entre las fibras musgosas y células de CA3 (J. Lee et al., 2019). Este estudio mostró que la estimulación de CGs nacidas en el desarrollo no produjo alteraciones permanentes en los campos de lugar de las células río abajo. Tanto la estimulación de baja (8 Hz) como de alta (50 Hz) frecuencia indujeron actividad o silenciamiento de las neuronas de CA3 sólo de manera transitoria.

Tomados conjuntamente, estos trabajos sugieren que, más que de la asociación arbitraria entre estímulos *alla* tabula rasa, la formación de campos de lugar dependería de la actividad preexistente de la red. No obstante, no es posible descartar que dicha actividad involucre la existencia de potenciales de meseta como los descritos (McKenzie et al., 2021).

I.4 Separación de patrones

I.4.1 El modelo clásico

La separación de patrones es la transformación de inputs similares en outputs disímiles (Hainmueller & Bartos, 2020a). Este algoritmo sería la base de la discriminación de representaciones similares en el cerebro. Se ha propuesto que, en el hipocampo, la separación de patrones podría subyacer a la discriminación de estímulos precisamente por vía del remapeo global (representación de estímulos por conjuntos independientes de neuronas) o del remapeo de tasa (representación de estímulos por cambios graduales en el mismo conjunto de neuronas) (Hainmueller & Bartos, 2020). La separación de patrones podría ser inferida entonces, entre otros fenómenos, a partir de la habilidad de las células de lugar para exhibir una reorganización sustancial de sus mapas espaciales concomitante a pequeños cambios en los estímulos (Moser et al., 2008).

Una de las descripciones más simples de la función hipocampal fundada en el trabajo pionero de David Marr (Marr, 1971; Treves et al., 2008) explica el algoritmo de separación de patrones como el producto de la actividad dispersa del GD y de la expansión del código mediada por la diferencia entre el número de neuronas de la CE y el GD (600000 a 1000000 en ratas) (Piatti et al., 2013; Rolls, 2016). Otros factores que explicarían la implementación de dicho algoritmo

incluyen al pequeño número de conexiones entre las CG y las células de CA3 (~46 inputs de CGs por célula de CA3) y a la dispersión misma de los patrones de actividad de CA3. Por su parte, si bien la existencia de axones recurrentes confiere a CA3 una elevada conectividad y una gran capacidad autoasociativa (Rolls, 2016), la dinámica emergente de este tipo de red capaz de promover la recuperación de patrones de actividad enteros a partir de estímulos parciales posibilitaría también la rápida convergencia hacia patrones de actividad estables diferenciados. Esto contribuiría a la separación de patrones, sobre todo cuando los inputs a CA3 son suficientemente distintos unos de otros (Hainmueller & Bartos, 2020a). Esta dinámica proveería entonces representaciones espaciales dispersas, localmente continuas pero también ortogonales mediadas por el remapeo de tasa de disparo y el global, respectivamente (J. K. Leutgeb et al., 2007a). Por otra parte, también la generación de CGna ha sido propuesta como una variable importante para la implementación de la separación de patrones en la red GD-CA3. Las CGna proveerían nuevas conexiones aleatorias hacia las células de CA3 capaces de mediar la formación de nuevas representaciones. No obstante, aunque se sabe que la neurogénesis influye en la capacidad de discriminar estímulos similares (Kropff, Yang, et al., 2015), su relevancia funcional a nivel electrofisiológico debe ser todavía probada (Treves et al., 2008).

Una de las consecuencias del modelo clásico sería la linealización de la relación entre subconjuntos de CG y de células piramidales respecto de la representación de estímulos ortogonalizados (Hainmueller & Bartos, 2020a; Treves et al., 2008). Como se indicó anteriormente, McNaughton y Morris (1987) hipotetizaron que el GD transferiría a CA3 patrones de actividad por medio de conexiones “uno a uno” de una estructura a otra, posiblemente a través de las llamadas sinapsis detonadoras. Así, cambios en el código de células de CA3 se corresponderían entonces con cambios en el código de células de GD. Dicho de otro modo, el remapeo de células de CA3 se correspondería con el remapeo de células del GD. Distintos estudios que emplearon registros electrofisiológicos en la CE (Hafting et al., 2005), el GD (J. K. Leutgeb et al., 2007a) y CA3 (J. K. Leutgeb et al., 2007a; S. Leutgeb et al., 2005) apuntarían en esa dirección. En general, observaron que las células de la CE, GD y CA3 exhibían niveles de remapeo escalonados, mostrando el GD mayores niveles de remapeo que CA3. De acuerdo con el modelo derivado de esta línea de investigación, mientras que el GD ejecuta separación de patrones principalmente en virtud de la expansión del código, CA3 implementaría la función complementaria de completado de patrones a partir de su red de

axones recurrentes. El completado de patrones permite la recuperación de un patrón de actividad completo por la presentación de un patrón incompleto o degradado de inputs (Knierim & Neunuebel, 2016). Los axones recurrentes, entonces, posibilitarían dicha función a través del despliegue de una dinámica de atractores. En términos generales, los atractores son puntos estables de un espacio de actividad hacia los cuales ésta converge dadas ciertas condiciones iniciales (Knierim & Neunuebel, 2016). Las memorias almacenadas en la red de CA3 serían entonces atractores del sistema.

I.4.2 Separación de patrones en la red GD-CA3

La constatación de la presencia de un gradiente en el remapeo a lo largo de CA3 (H. Lee et al., 2015; Lu et al., 2015) fortaleció la idea de una coparticipación o de un comportamiento dual de la red GD-CA3 (Knierim & Neunuebel, 2016). De acuerdo con esta perspectiva, la implementación de la separación de patrones en el hipocampo sería la resultante de la operación conjunta de la red competitiva del GD y de la autoasociativa de CA3, y no tanto de la especialización funcional estricta de cada estructura. Cuando las variaciones en el input proveniente del GD son pequeñas, el output de CA3 reflejaría completado de patrones (Figura i4). En cambio, cuando la variación en GD es grande, CA3 reflejaría separación de patrones (Knierim & Neunuebel, 2016; J. K. Leutgeb et al., 2007a; Neunuebel & Knierim, 2014). Se ha propuesto incluso, como se indicó anteriormente, que las neuronas de la red GD-CA3 proximal constituirían una unidad funcional que implementa la separación de patrones debido a la complementariedad de sus propiedades fisiológicas y el elevado nivel de conectividad (GCs, CMs, CGna, piramidales) (Danielson et al., 2016; GoodSmith et al., 2019a). Evidencia reciente sobre el disparo de las células del GD pone todavía más en cuestión al modelo clásico. Según este, la relación lineal entre la actividad del GD y CA3 se daría en virtud de la existencia de sinapsis detonadoras y, en consecuencia, el GD exhibiría niveles de remapeo superiores a CA3 (J. K. Leutgeb et al., 2007a; Treves et al., 2008). En trabajos de los últimos años se observó que no serían las CGs sino las MCs las que muestran los mayores niveles de reorganización en los mapas espaciales. Así, mientras que las MCs poseen múltiples campos de lugar y muestran niveles altos de remapeo, las CGs poseen uno o dos campos de lugar y niveles bajos de remapeo (GoodSmith et al., 2017, 2019a; Senzai & Buzsáki, 2017; van Dijk & Fenton, 2018). En esta misma línea, Hainmueller y colaboradores (2018), utilizando imaginería de Ca^{2+} con microscopía de dos fotones en un paradigma de realidad virtual,

encontraron sólo cambios graduales o moderados en el disparo de las CGs entre ambientes similares a través de los días. En conjunto, estos resultados indican que la representación de ambientes similares no recaería en poblaciones completamente distintas de CGs, sino en cambios graduales de su actividad (Hainmueller & Bartos, 2020a). A pesar de que hay indicios de que son espacialmente poco informativas o inespecíficas respecto de sus pares maduras (Danielson et al., 2016; S. B. McHugh et al., 2022), el rol de las CGna jóvenes en este escenario alternativo no había sido explorado hasta ahora.

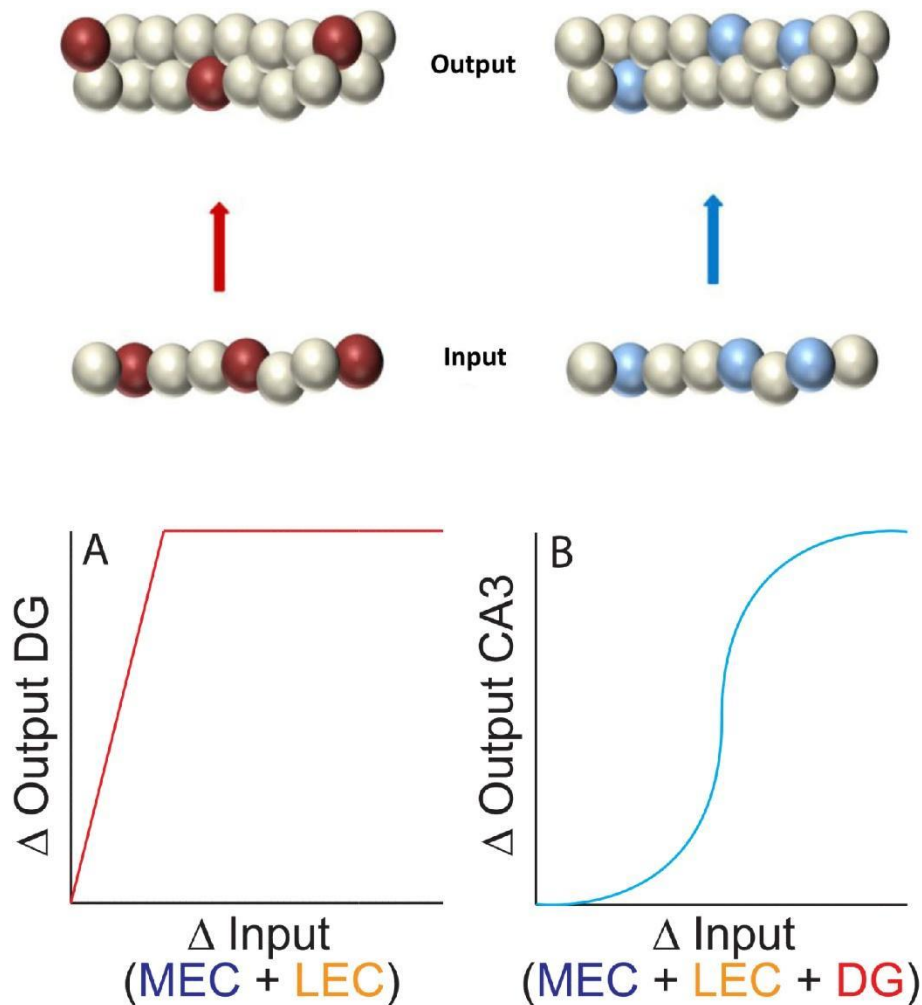


Figura i4. Separación de patrones en la red GD-CA3. Arriba: esquema de la expansión del código atinente con la propuesta del modelo simple. Dos patrones (código de color), son codificados en el input (CE) por patrones de actividad altamente correlacionados. En el output (GD), en cambio, poblaciones independientes de neuronas codifican ortogonalmente los patrones. Abajo: Relación entre el delta (Δ) de dos patrones en el input y en el output de dos estructuras. Derecha: GD (DG, en inglés) vs. CEM (MEC) + CEL (LEC). Izquierda: CA3 vs. CEM (MEC) + CEL (LEC) + GD (DG). Adaptado de Knierim y Neunuebel, 2016.

I.5 Objetivos e hipótesis

El **objetivo general** de este proyecto fue investigar la participación de las CGna del GD en el procesamiento de información en CA3 durante la formación de memorias espaciales.

Los **objetivos específicos** fueron:

- Estudiar el impacto de la actividad de las CGna jóvenes y maduras sobre la configuración de mapas espaciales en CA3.
- Caracterizar la actividad de las células de CA3 evocada por la estimulación de CGna jóvenes y maduras.
- Investigar cuál es el tipo de relación establecida entre dicha actividad y la configuración de esos mapas.

Basados en la evidencia anteriormente detallada, hipotetizamos que el efecto de la actividad de las CGna sobre las representaciones de CA3 varía a lo largo del proceso de maduración, confiriendo las CGna jóvenes un rol computacional diferencial.

Materiales y métodos

M.1 Animales

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 las recomendaciones estipuladas en la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio.

Ratones genéticamente modificados $Ascl1^{CreERT2}$ ($Ascl1^{tm1(Cre/ERT2)Jejo/J}$) (Battiste et al., 2007) $CAG^{flox Stop - Chr2 EYFP}$ (Ai32) ($Gt(ROSA) 26Sor^{tm32(CAG COP4*H134R/EYFP)Hze/J}$) (Madisen et al., 2012) obtenidos en laboratorios Jackson fueron cruzados para generar ratones de la línea $Ascl1^{CreERT2} - CAG^{flox Stop - Chr2 EYFP}$. Esta línea transgénica expresa la opsina excitatoria ChR2 y el fluoróforo EYFP en la descendencia de progenitores $Ascl1$ (principalmente CGna) de manera condicional a la presencia de Tamoxifeno (TAM) (Yang et al, 2016). Esto permite el marcado indeleble de una determinada cohorte de CG del GD para su posterior manipulación óptica.

Veintisiete ratones $Ascl1^{CreERT2} - CAG^{flox Stop - Chr2 EYFP}$ (12 machos y 15 hembras) fueron alojados en grupos de 2-4 animales por caja desde el destete en una sala fuera de la colonia bajo un régimen de luz invertida (12-h luz/12-h oscuridad, encendido de luces 20:00 h) con una temperatura de 22 ± 2 C°. La inversión del ciclo de luz tuvo como propósito evaluar a los animales durante la fase oscura, que incluye el período de mayor actividad en estos roedores. Tres días antes de la inyección de tamoxifeno (TAM) fueron transferidos a cajas individuales con ruedas de ejercicio donde permanecieron hasta su eutanasia al término de los procedimientos experimentales. A las 4, 8 o 12 semanas de vida, dependiendo de la condición experimental, los animales alojados individualmente fueron sometidos a 4 inyecciones de TAM (120 ug/g, 2 por día). Dicho procedimiento fue realizado para optimizar el marcado de progenitores neuronales (van Praag et al., 1999). La comida y el agua estuvieron disponibles *ad libitum* durante toda la vida de los ratones.

Un conjunto diferente de 8 ratones $Ascl1^{CreERT2} - CAG^{flox Stop - Chr2 EYFP}$ (3 machos y 5 hembras) fue usado para comparar el número de CGnas entre condiciones (ver sección Conteo de células ChR2-EYFP⁺; Figura r6A-B). Adicionalmente, otro grupo de 10 ratones $Ascl1^{CreERT2} - CAG^{flox Stop - Chr2 EYFP}$ (6 machos y 4 hembras) fue usado en los experimentos de electrofisiología *ex vivo* para comparar la eficacia del ChR2 entre condiciones (ver sección “Registros

electrofisiológicos *ex vivo*”; Figura r6C-E). Todos estos animales fueron mantenidos en las mismas condiciones de alojamiento que los 27 animales experimentales.

M.1.1 Grupos experimentales

Las condiciones experimentales fueron definidas según la edad de la cohorte ChR2-EYFP⁺ de CGna. En las condiciones joven y madura, la expresión de ChR2 fue inducida con inyecciones de TAM en ratones de 8 semanas de vida. Los experimentos en la condición joven (6 machos y 6 hembras) fueron realizados 4 semanas después, y los de la condición madura (7 machos y 5 hembras) 8 semanas después.

En una condición control (2 machos y 5 hembras), destinada a evaluar una cohorte madura en ratones de 12 semanas de vida, el TAM fue inyectado cuando los animales tenían 4 semanas de vida y los experimentos fueron realizados 8 semanas después.

M.2 Implante de opto-drives

M.2.1 Opto-drives

Los tetrodos (~25- μ m de diámetro) fueron contruidos con 4 hebras de cable de tungsteno entrelazadas (99.95% tungsteno, 12.5 μ m de diámetro, California Fine Wire Company, USA) y unidas por derretimiento de la cubierta aislante (110° C aproximadamente). Los 4 tetrodos fueron dispuestos en un arreglo aproximadamente rectangular en el microdrive (Axona Limited, UK; peso total alrededor de 2.5 g) atravesando cánulas de acero inoxidable de movilidad independiente (distancia entre tetrodos: ~400 μ m). Uno de los tetrodos fue acoplado a una fibra óptica (250 μ m de diámetro), con su punta viajando 500-700 μ m por debajo del extremo de dicha fibra. Cada tetrodo fue cortado plano y “plateado” con solución de oro (gold plating solution, Neuralynx, MT, USA) para reducir la impedancia a valores entre 0.2–0.4 M Ω (Nano Z, White Matter, WA, USA).

M.2.2 Cirugía de implante de microdrive

Cuatro (condición joven) o 32 (condición madura) días después de la inducción con TAM los ratones fueron implantados crónicamente con un optodrive de cuatro tetrodos. La cirugía fue conducida bajo ketamina-xilacina (150 μ g ketamina/15 μ g xilacina in 10 μ l salina/g). Una craneotomía elíptica (aproximadamente 1 x .5 mm de diámetro) fue realizada en el cráneo arriba del hipocampo dorsal derecho. El centro de dicha apertura fue -2.4 mm lateral a la línea

media y -1.7 mm posterior a bregma. Siete micro-tornillos fueron insertados en huecos torneados en el cráneo alrededor de la craneotomía con el fin de dar solidez estructural al implante. Después de remover las meninges, el optodrive fue implantado introduciendo los tetrodos 1 mm dentro del cerebro (respecto de la superficie de la corteza). La interfaz corteza-microdrive fue rellenada con gel biocompatible Neuroseal (0.5% alginato de sodio y 10% cloruro de calcio disueltos en agua destilada). El cráneo, los tornillos y la base del microdrive fueron cubiertos con cemento dental (acrílico auto-cristal, DentalLab). Después del procedimiento quirúrgico los animales atravesaron un periodo de recuperación de entre 3 y 5 días.

M.3 Descenso con tetrodos

Durante un período de 2-3 semanas después de la recuperación post-quirúrgica los tetrodos fueron desplazados progresivamente hacia la capa piramidal de CA3 del hipocampo (160 μ m por vuelta). Uno de ellos sirvió como referencia y fue mantenido en una zona eléctricamente estable (arriba del hipocampo, próximo a la superficie del cerebro). Esta referencia fue usada para la amplificación diferencial del voltaje en los otros electrodos. Los tetrodos restantes sirvieron como sondas de registro. La señal proveniente de las células piramidales de la capa de CA1 y las *sharp wave-ripples*, visualizadas con Cheetah (Neuralynx, Inc., MT, USA), fueron usadas como guías para orientar el posicionamiento de los tetrodos en la capa piramidal de CA3.

M.4 Comportamiento

Los experimentos de forrajeo libre fueron conducidos en dos arenas abiertas: una cuadrada (46 cm cada lado) y otra circular (50 cm de diámetro) (Figuras r7 y r13). Las paredes de la arena eran de acrílico (círculo) o cartón (cuadrado) cubiertos de papel adhesivo. Los pisos eran placas de yeso recubiertas con acrílico. Una tarjeta blanca (cuadrado) o una naranja (círculo y triángulo) de 20 x 25 cm fue colocada en la parte superior de la pared de la arena para facilitar la orientación. No se utilizaron cortinas y los objetos circundantes en la sala de experimentación proveyeron claves orientativas adicionales. En las sesiones 2 y 3 del día 2, la arena novedosa fue posicionada en la misma sala experimental 1.5 m de distancia de la posición de la arena familiar, con la tarjeta rotada 90°. Las arenas cuadradas y circulares

fueron usadas como ambientes familiares o novedosos para distintos ratones en un modo contrabalanceado.

Durante las sesiones en la arena abierta los ratones fueron filmados usando una cámara CCTV (tasa de muestreo: 25 Hz) ubicada en el techo del laboratorio. Las posiciones de un LED verde y uno rojo en el headstage (HS-18-MM-LED, Neuralynx, Inc., MT, USA) conectado al optodrive fueron rastreadas para estimar la posición instantánea del ratón. Durante estas sesiones se arrojó de manera esporádica en la arena cereal de chocolate en posiciones aleatorias con el fin de estimular un recorrido homogéneo de la arena durante el forrajeo de los animales. Después de cada sesión en la arena, ésta fue limpiada con etanol 70%.

M.4.1 Familiarización (días -5 a -1)

El proceso de familiarización a la arena fue realizado exponiendo a los ratones 15 min a la misma arena por 5 días consecutivos.

M.4.2 Experimentos de ambiente familiar (días 0, 1 y 3)

Después de 1, 2 y 4 días del último día de familiarización, tuvieron lugar múltiples presentaciones de la arena mientras se registraba la actividad de las unidades únicas de CA3. Las sesiones de registro incluyeron: a) 10 min de descanso en un pedestal afuera del rango de la cámara, b) 3 sesiones consecutivas en la arena (15 min cada una) separadas por 5 min de descanso en el pedestal y c) 10 min de descanso en el pedestal. En los días 1 y 3, las GCna del GD fueron optogenéticamente estimuladas en la sesión 2 en dos épocas de 4 y 20 Hz (ver abajo).

M.4.3 Experimentos de ambiente novedoso (día 2)

El protocolo fue similar al de los experimentos de ambiente familiar, pero con 4 sesiones. Las sesiones 1 y 4 fueron realizadas en el ambiente familiar, mientras que las sesiones 2 y 3 fueron conducidas en el ambiente novedoso. Todas las sesiones en la arena duraron 15 minutos y fueron separadas por periodos de descanso en el pedestal. La misma cohorte neuronal fue optogenéticamente estimulada en la sesión 3 en dos épocas de 4 y 20 Hz (ver abajo).

M.5 Ratones longevos de la condición madura

Un grupo de 4 ratones (3 machos y 1 hembra) de la condición joven no fueron eutanasiados inmediatamente después del último día de experimentación. En cambio, estos animales fueron mantenidos en sus cajas alrededor de 3 semanas para repetir la batería de experimentos con la misma cohorte, esta vez con la misma cohorte de CGna, pero maduras. Entonces, mientras que el ambiente familiar fue el mismo que en la primera ronda de experimentos, el novedoso fue un triángulo equilátero de 45 cm de lado. Esta arena tenía paredes de cartón cubiertas con papel adhesivo (contact) y pisos de yeso cubiertos de acrílico. Evaluamos las diferencias entre los datos recolectados durante esta segunda ronda de experimentos y aquellos provenientes de la condición madura regular (CGna estimuladas por primera vez a las 8 semanas; 4 machos y 4 hembras). A pesar del hecho de que estos 4 ratones tenían experiencia adicional con la manipulación del experimentador y con el forrajeo libre en la arena, y que las CGna tuvieron más sesiones de estimulación, no encontramos diferencia entre éstos y los ratones en la condición madura regular. Críticamente, evaluamos remapeo en ambos grupos (ver sección M.7.3.2). La correlación espacial entre la primera y la última sesión fue similar en los días 1 y 0 en estos 4 ratones (Test de Mann-Whitney de cola izquierda para los días 1 vs. 0, $p = 0.62$). De manera similar, no hubo un efecto significativo de la estimulación de las CGna maduras en los animales pertenecientes a la condición madura regular (Test de Mann-Whitney de cola izquierda para los días 1 vs. 0, $p = 0.39$). Dadas estas semejanzas, los datos de la segunda ronda de experimentos proveniente de estos 4 ratones fue agrupada con la condición madura.

M.6 Estimulación óptica

Para la estimulación óptica se usó un láser de 1 W (447 nm; Tolket, Argentina). La luz atravesó un conector SMA hacia la juntura de una fibra óptica con una férula rotatoria (Thorlabs, NJ, USA), a su vez conectada a otra férula en el optodrive con un interconector de salida rápida (Thorlabs, NJ, USA). La intensidad del láser fue modulada con un aislante óptico ISO-Flex (AMPI, Israel) para alcanzar 30 mW medidos en la punta de la fibra óptica antes de la cirugía con un sensor de potencia térmica PM160T (Thorlabs, NJ, USA).

La estimulación óptica, controlada por un Arduino Uno (Arduino, MA, USA), consistió en 80 trenes de pulsos de 2 ms (10 pulsos por tren) con un intervalo entre trenes de 5 s. Los trenes fueron divididos en dos épocas de 40 trenes cada uno, con frecuencias de estimulación de 4 y 20 Hz, respectivamente. Cada época de estimulación duró aproximadamente 300 s y 200 s,

respectivamente. La época de 4 Hz comenzó 2 minutos después del inicio de la sesión de forrajeo, con un período entre épocas de 160 s. De este modo, la época de 20 Hz terminó 2 min antes del final de la sesión de 15 min.

M.7 Análisis de datos

M.7.1 Recolección de los datos

La actividad proveniente de los disparos de neuronas individuales (unidad única; umbral de alrededor de 40 μ V) fue adquirida a una tasa de muestreo de 32KHz usando el sistema digital de registro Digital Lynx 4SX-M system (Neuralynx, Inc., MT, USA). Los registros diferenciales fueron realizados con un electrodo de referencia posicionado en la corteza. Dicha señal fue filtrada entre los 600 y 6000 Hz. El procesamiento de los datos, así como los consiguientes análisis, fueron realizados con programas escritos *ad hoc* en MATLAB (MathWorks, MA, USA).

M.7.2 Spike sorting

Los eventos correspondientes a potenciales disparos de neuronas individuales fueron manualmente agrupados (identificación de “*clusters*”) después de la realización de los registros. Distintas proyecciones de baja dimensión fueron usadas simultáneamente para identificar los distintos clusters de eventos: voltaje pico a pico de cada electrodo, el voltaje de cada electrodo a distintos puntos en el tiempo definidos *ad hoc* por el usuario y proyecciones obtenidas con tSNE, un algoritmo de reducción de dimensionalidad de datos (la función de MATLAB *tsne*). La autocorrelación y la correlación cruzada de trenes de eventos fueron usadas como criterios adicionales, según los requerimientos de cada caso así como también la presencia del *cluster* desde el inicio, primer reposo del experimento hasta el final, último descanso en el pedestal.

M.7.3 Mapas espaciales

M.7.3.1 Los mapas espaciales expresando tasa de disparo de las neuronas en función de la posición del animal fueron obtenidos calculando la razón entre el conteo de disparos neuronales y el tiempo que el animal ocupó cada uno de los *bines* de 2.5 cm de lado de una cuadrícula del tamaño de la arena. El mapa resultante fue suavizado espacialmente usando un filtro Gaussiano en 2D (desviación estándar: 1.2 *bines*).

M.7.3.2 El remapeo fue determinado usando el coeficiente de correlación de Pearson entre los mapas espaciales de dos sesiones, según fue indicado en cada experimento (típicamente las sesiones pre- vs. post estimulación).

M.7.3.3 La estabilidad fue computada como la correlación espacial entre mapas construidos con datos provenientes de los segmentos pares e impares obtenidos después de dividir cada sesión en ventanas consecutivas de 30 s.

M.7.3.4 En el análisis de vectores poblacionales los mapas espaciales fueron normalizados por la media de la tasa de disparo de la correspondiente sesión. El objetivo de esta normalización fue asegurar la evaluación estrictamente espacial del remapeo, como en la comparación de mapas individuales a través de la correlación espacial de mapas. El vector poblacional fue entonces calculado concatenando los mapas espaciales de las células de una condición dada en un gran vector. Un valor único, indicativo del remapeo poblacional, fue obtenido calculando la correlación de Pearson entre los vectores poblacionales correspondientes a dos sesiones distintas. Utilizamos estadística aleatorizada (*shuffling*) para evaluar la significancia estadística de la diferencia entre valores de remapeo poblacional.

M.7.3.5 La información espacial de un mapa espacial con una tasa media de disparo λ y un valor λ_i para cada uno de los N bins, fue calculada como

$$Información = \sum_{i=1}^N p_i \frac{\lambda_i}{\lambda} \log_2 \left(\frac{\lambda_i}{\lambda} \right),$$

donde p_i es la probabilidad de ocupación del i-ésimo bin.

M.7.4 Variaciones de la tasa de disparo en bins espaciales estimulados

Después de notar que la distribución de la tasa de disparo de las células no cambió a lo largo de las sesiones debido a la estimulación, computamos para cada una de ellas la tasa de disparo media al interior de los bins espaciales estimulados (Figura r11). Dicha tasa fue normalizada por la media de la tasa de disparo de toda la sesión evaluada usando mapas espaciales no suavizados. Los bins estimulados fueron definidos como aquellos donde al menos un pulso de luz tuvo lugar durante la sesión de estimulación.

M.7.5 Estadística aleatorizada (*Shuffling*)

La estadística aleatorizada para una variable W dada (ej. correlación de vector poblacional) fue construida a través de un procedimiento de *shuffling* (mezclado), bien de las etiquetas temporales de los eventos o de las etiquetas de las células. Para los *shuffles* temporales (Figura r4D y E) la secuencia entera de disparos de neuronas fue movida en el tiempo por un intervalo aleatorio entre 30 s y la duración total de la sesión menos 30 s con el final de la sesión concatenada al inicio. La instancia aleatorizada de la variable W fue entonces calculada usando la misma estructura de trenes de disparo neuronal, pero desplazada en el tiempo. La colección de 100 valores aleatorizados de W para cada célula compuso la estadística aleatorizada. Para obtener los valores de corte para la clasificación celular, los datos aleatorizados para todas las células fueron agrupados y el percentil 95 de la distribución calculado.

Los *shuffles* (mezcla) de etiquetas fueron usados para evaluar si una determinada propiedad W (ej. el porcentaje de neuronas reclutadas) fue diferente para dos grupos de células. La distribución aleatorizada de W fue obtenida agrupando todas las células y reagrupándolas aleatoriamente en grupos del tamaño correspondiente. En cada paso un nuevo valor aleatorizado de W fue obtenido y el valor observado de W fue luego comparado con la distribución de valores aleatorizados.

M.7.6 Clasificación de la actividad evocada

Los histogramas del disparo de las células de CA3 relativo a los pulsos de luz (-5 a 45 ms desde el inicio del pulso) fueron tomados como las variables independientes de un modelo lineal generalizado bajo la asunción de una distribución de Poisson (Figura r15). Se incluyeron 3 variables predictoras correspondientes a distintos periodos: línea de base (-5 a 0 ms), ventana temprana (5 a 13 ms), ventana tardía (15 a 30 ms). Estas variables fueron usadas para segmentar la respuesta neuronal y determinar diferencias estadísticamente significativas entre la línea de base y las ventanas mencionadas.

M.7.7 Análisis de los trenes de pulsos

Los cambios en la actividad evocada a lo largo del tren de estimulación fueron computados tomando la razón entre el primero y último pulsos y comparados contra la hipótesis de

mediana igual a uno (test Wilcoxon de dos colas). Sólo el período de respuesta temprano fue considerado en el análisis (5 a 13 ms desde el inicio del pulso).

M.7.8 Criterio de selección de células

Para analizar el remapeo, fueron seleccionadas las células activas y estables en la primera sesión de cada día. Las células fueron consideradas activas si la tasa media de disparo en esta sesión excedía los 0.1 Hz. Las células fueron consideradas estables si la estabilidad (ver arriba) en dicha sesión excedía el percentil 95 de la distribución aleatorizada (*shuffle*) para esa variable. Las células fueron consideradas putativas de disparo rápido si su tasa de disparo medio durante la primera sesión estuvo por encima de 7 Hz. De otro modo, fueron consideradas putativas piramidales. Las células putativas de disparo rápido fueron excluidas del análisis de remapeo.

M.8 Histología

M.8.1 Procesamiento de cerebros para histología

Sin mover los tetrodos después de la sesión final de registro, se sometió a los ratones a una anestesia profunda con ketamina-xilacina (inyección intraperitoneal). Después se los perfundió intracardiácamamente primero con 100 ml de solución salina heparinizada y después con 100 ml de paraformaldeído al 4%. Tres horas después de la perfusión, los tetrodos fueron elevados y los cerebros extraídos y almacenados en la misma solución durante la noche y después en sacarosa al 30% hasta la precipitación de los mismos (alrededor de 48h). Se obtuvieron rodajas coronales (40 μ m) de los cerebros y se las montó en porta objetos de vidrio con PVA-DABCO. La posición de registro de los tetrodos fue determinada posteriormente en microscopios de epifluorescencia BX60, Olympus (Japón) y Examiner D1, ZEISS (Alemania).

M.8.2 Conteo de células ChR2-EYFP⁺

M.8.2.1 Inmunofluorescencia

Ocho ratones $Ascl1^{CreERT2} - CAG^{flox Stop - ChR2 EYFP}$ de 8 semanas de edad fueron inyectados intraperitonealmente con 120 μ g/g/inyección de TAM para inducir la expresión indeleble de ChR2-EYFP en la membrana de las CGna (joven: n=4; madura: n=4). Dos inyecciones en 1 día en vez de 4 en 2 fueron usadas para limitar el tamaño de la cohorte neuronal marcada y

facilitar la discriminación del soma reduciendo la superimposición de la marca. La tinción por inmunofluorescencia fue realizada sobre secciones coronales de cerebro en flotación libre en redes al interior de wells. Se aplicaron anticuerpos en TBS con 3% de suero donkey y 0.25% de Triton x-100. Se utilizaron anticuerpos anti GFP (chicken policlonal; 1:500; Invitrogen). El anticuerpo Cy2 anti-chicken fue usado como secundario (1:250; Jackson ImmunoResearch Laboratories, PA, USA).

M.8.2.2 Microscopía confocal

Una sección por animal de la región dorsal del hipocampo (anteroposterior, -1.5 a -2.2 mm de bregma; Paxinos & Franklin, 2004) fue incluida en el análisis. Las imágenes fueron adquiridas usando un microscopio confocal Zeiss LSM 5 (Carl Zeiss). Las imágenes fueron adquiridas (20x; NA 1.3) de secciones de 40 μm , incluyendo típicamente secciones ópticas de $x < 0.9 \mu\text{m}$. Unidad de airy = 1 a intervalos de 1 μm . El conteo celular fue realizado en la proyección de un z-stack restringido a células con niveles de fluorescencia que permitieran una clara identificación de los cuerpos celulares. Además, sólo células GFP+ localizadas en la capa de células granulares y de la zona sub granular fueron incluidas en el análisis.

M.9 Electrofisiología *ex vivo*

M.9.1 Preparación de rodajas

Diez ratones $\text{Ascl1}^{\text{CreERT2}} - \text{CAG}^{\text{flox Stop - ChR2 EYFP}}$ de 8 semanas fueron anestesiados y decapitados 4 u 8 semanas después de la inducción por TAM. Para preparar las rodajas transversales, los cerebros fueron colocados en una solución fría que contenía (en mM): 110 colina-Cl, 2.5 KCl, 2.0 NaH_2PO_4 , 25 NaHCO_3 , 0.5 CaCl_2 , 7 MgCl_2 , 20 dextrosa, 1.3 Na^+ -ascorbato, 3.1 Na^+ -piruvato, and 4 ácido kinurnico (kyn). Rodajas coronales de 400 μm de grosor desde el polo dorsal conteniendo ambos hipocampos fueron cortadas con vibratomo y transferidas a una cámara que contenía (en mM): 125 NaCl, 2.5 KCl, 2 NaH_2PO_4 , 25 NaHCO_3 , 2 CaCl_2 , 1.3 MgCl_2 , 1.3 Na^+ -ascorbato, 3.1 Na^+ -piruvato, and 10 dextrosa (315 mOsm). Las rodajas fueron burbujeadas con 95% O_2 / 5% CO_2 y mantenidas a 30°C por 45 min antes del inicio de los experimentos.

M.9.2 Optogenética *ex vivo*

CGna ChR2⁺ de las condiciones joven o madura fueron estimuladas usando luz proveniente de un láser de 447 nm a través del camino de epifluorescencia de un microscopio (filtro FITC, objetivo 63X) comandado por el software de adquisición. Registros de *loose-patch* fueron realizados con pipetas rellenas de ACSF de entre 8 a 10 MΩ para registrar las corrientes evocadas ópticamente (Figura r6).

Resultados

R.1 Efecto de la actividad de las CGnas jóvenes o maduras en los mapas espaciales de CA3

R.1.1 Estrategia experimental general

Con el fin de explorar el efecto que la actividad de las CGna jóvenes (4 semanas) o maduras (8 semanas) pudiera tener en los mapas espaciales de CA3, realizamos manipulaciones optoelectrofisiológicas *in vivo* en ratones transgénicos $Ascl1^{CreERT2}; CAG^{floxStop-ChR2-EYFP}$ (Figura r1).

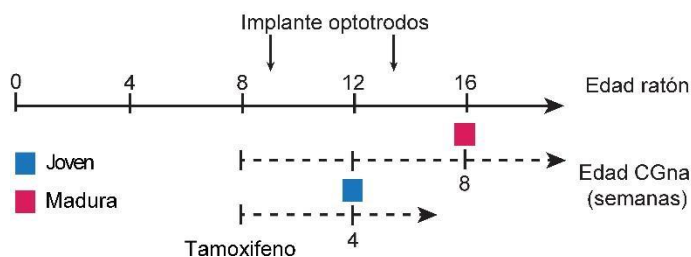


Figura r1 – Diseño experimental. Diseño experimental indicando la inyección de tamoxifeno, las cirugías de implante de optotrodos (una por grupo experimental) y los experimentos (cuadrados de color) para las líneas temporales de los ratones (arriba) y las cohortes de CGna (abajo).

Estos animales permiten la expresión de Channelrhodopsin 2 (ChR2) en una cohorte de CGna de manera condicional a la presencia de Tamoxifeno (Yang et al., 2015). Dichos ratones fueron implantados con un optotrodo apuntando a CA3 (Figura r2). Esta estrategia posibilitó la excitación óptica de CGna jóvenes o maduras durante el registro electrofisiológico en CA3 mientras los ratones exploraban libremente una arena.

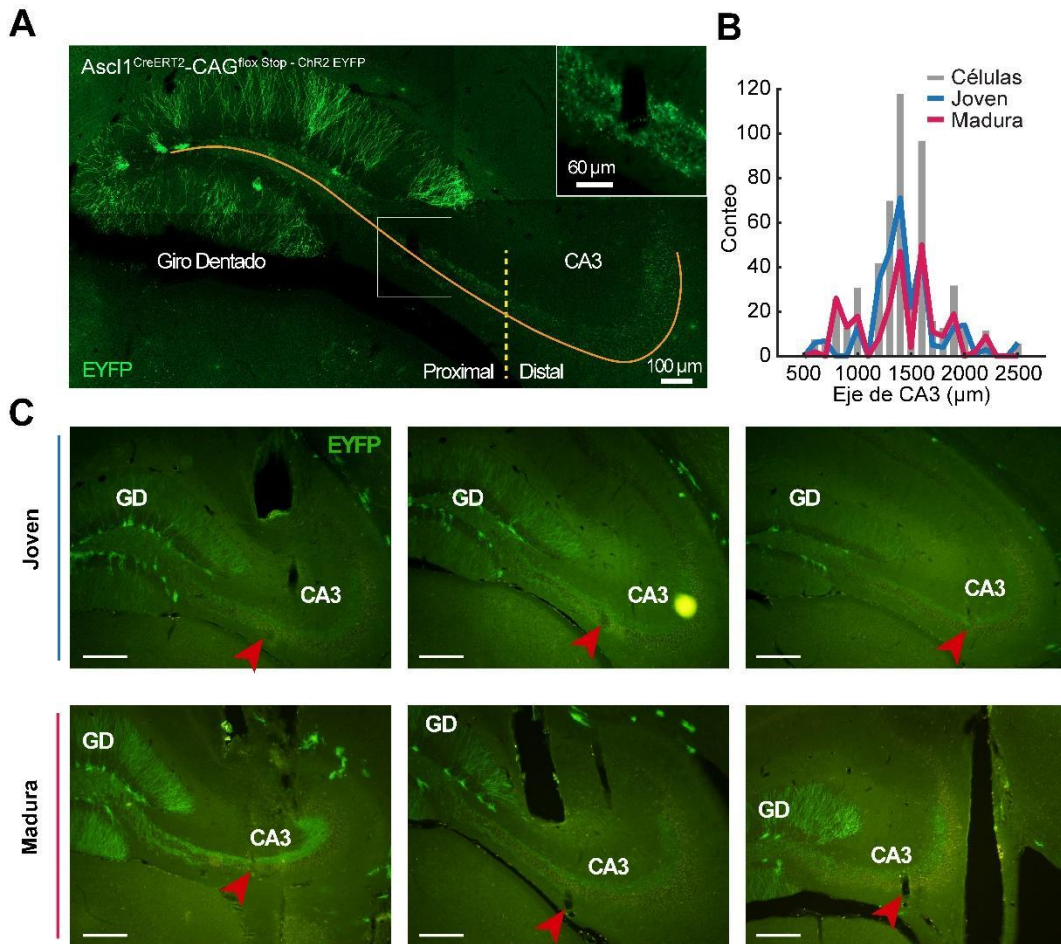


Figura r2 – Sitios de registro en CA3. (A) Histología representativa mostrando CGNa (EYFP, verde), el eje próximo-distal (naranja) y su línea de corte (amarillo, 1500 μ m). Inset: punta de un tetrodo. (B) Distribución de todas las células registradas en CA3 a lo largo del eje próximo-distal en las condiciones joven (azul; n=293) o madura (rojo; n=240). Barras grises: datos de ambas condiciones agrupados. (C) Imágenes representativas de histología de cortes coronales del hipocampo mostrando CGNa EYFP⁺ (verde) en el GD y fibras musgosas en CA3 en ratones representativos implantados con optotrodos. Flecha roja: punta de un tetrodo cerca o adentro de la capa piramidal de CA3. Escala: 250 μ m. Fila superior: condición joven. Fila inferior: condición madura.

R.1.2 Familiarización a la arena y estimulación óptica

Después de 5 días de familiarización a una arena con una geometría dada (días -5 a -1, respecto de la edad de la cohorte de CGNa), los ratones fueron expuestos y registrados en múltiples sesiones diarias en esa misma arena durante 4 días (0 a 3; Figura r3). En el día 2 se incluyeron además 2 sesiones en una arena novedosa (indicado con círculos).

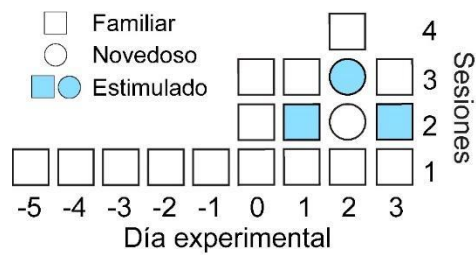


Figura r3 – Esquema comportamental. Sesiones comportamentales por día experimental en las arenas familiar o novedosa (Código de forma). Azul: sesión estimulada.

Este esquema de familiarización tuvo como objetivo estabilizar las representaciones espaciales de CA3 y proveer circunstancias basales similares entre condiciones, con el fin de robustecer la comparabilidad de las manipulaciones experimentales. En consecuencia, observamos que para el día 0 los mapas espaciales obtenidos fueron similares entre sesiones (Figura r4A). Otras características generales de dichos mapas, como la tasa de disparo promedio, la información espacial y la estabilidad, exhibieron niveles similares en las condiciones joven y madura (Figura r4B).

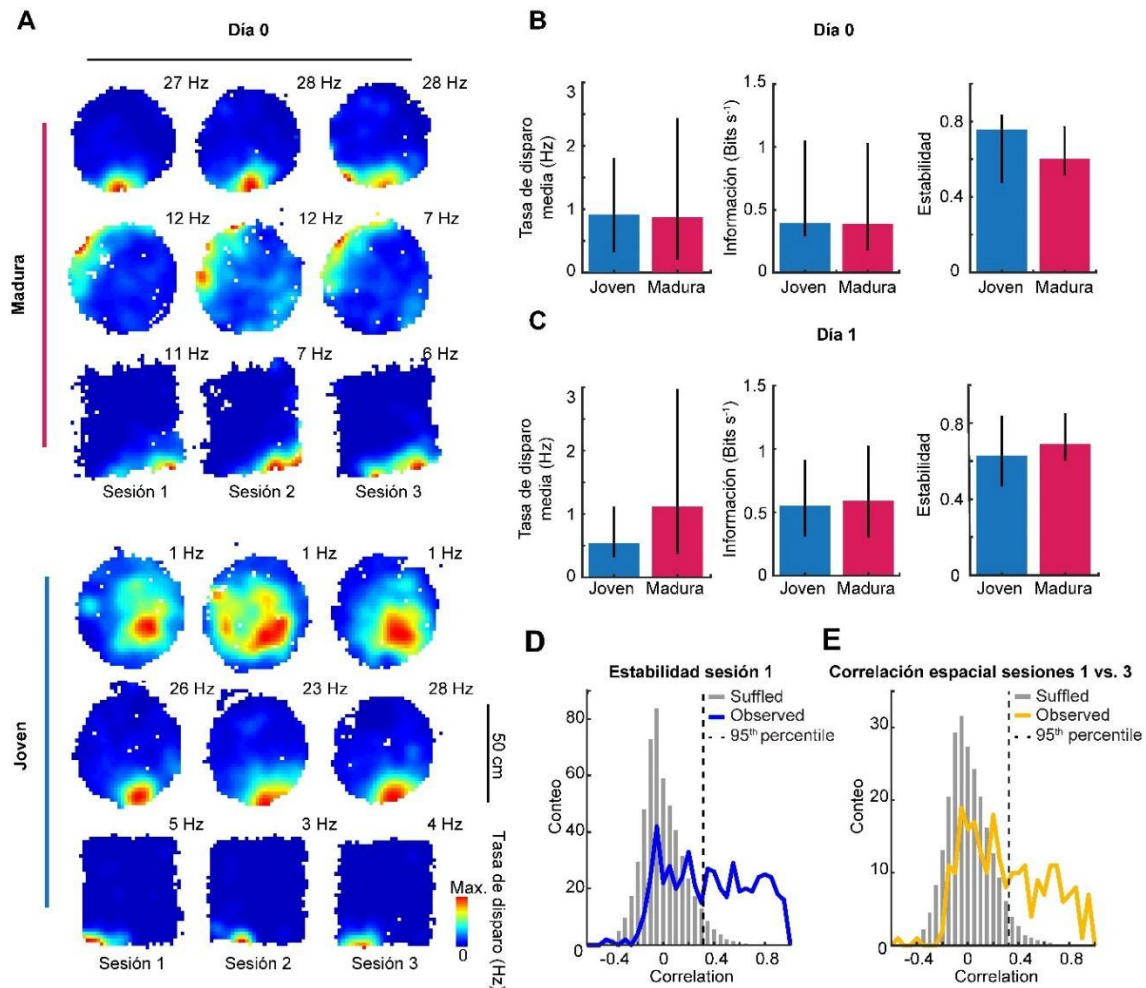


Figura r4 – Caracterización de los mapas espaciales de CA3. (A) Ejemplos de mapas espaciales (Código de color, tasa de disparo máxima y sesiones indicadas) del día 0 en las condiciones joven (abajo) y madura (arriba; respuesta de una célula por fila en cada subpanel). (B) Caracterización de células piramidales putativas activas y estables registradas en CA3 proximal. De izquierda a derecha: tasa de disparo media, información espacial y estabilidad en la sesión 1 del día 0 para las condiciones joven (azul; 18 células) y madura (roja; 21 células). (C) Igual a B pero para el día 1 (joven: 34 células; madura: 22 células). No se encontraron diferencias significativas en B ni C (Test de Mann-Whitney de dos colas, $p > 0.11$). (D) Distribución de la estabilidad observada (azul) y de los 100 *shuffles* por neurona (gris; normalizado por el número de *shuffles*) durante la sesión 1. Los datos de los días 0 y 1 fueron agrupados entre condiciones. Las líneas punteadas indican el percentil 95 de la distribución aleatorizada (0.32), usada como punto de corte para seleccionar células estables. (E) Distribución de la correlación espacial entre las sesiones pre- y post estimulación del día 0 (naranja) y los 100 *shuffles* por neurona (gris; normalizado por el número de *shuffles*).

Desde el día 1 en adelante, las CGNa jóvenes o maduras fueron repetidamente estimuladas con luz azul durante una sesión intermedia usando trenes de 10 pulsos (4 y 20 Hz). Este

protocolo de estimulación fue capaz de evocar confiablemente disparos en algunas células de CA3 en ambas condiciones (Figura r5).

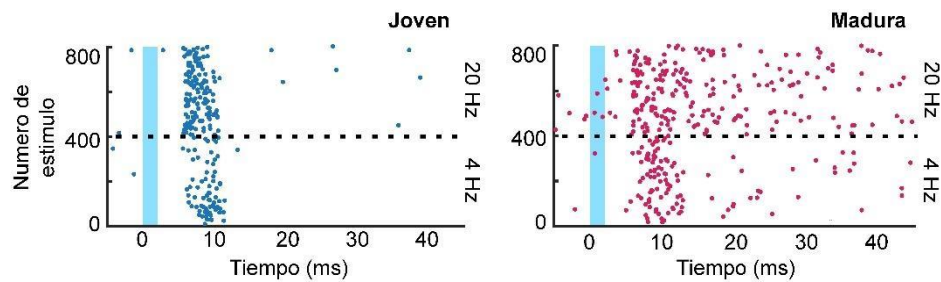


Figura r5 – Actividad en CA3 evocada por CGNa jóvenes y maduras *in vivo*. Raster plots mostrando la actividad de dos células piramidales putativas de CA3 evocada por la estimulación de CGNa jóvenes (izquierda) o maduras (derecha). Las épocas de estimulación a 4 o 20 Hz están indicadas.

Se llevaron a cabo 2 experimentos para controlar que los niveles de expresión de ChR2 (Figura r6A y B) y su eficacia para activar las CGNa fueran similares entre las condiciones de CGNa jóvenes y maduras (Figura r6C a E). En primer lugar, encontramos que el conteo de somas expresando ChR2-EYFP en las zonas granular y subgranular del GD en las condiciones joven y madura fue similar (Figura r6A y B). En segundo lugar, observamos una similitud entre dichas condiciones también en la intensidad de luz azul necesaria para provocar el disparo (Figura r6C a E).

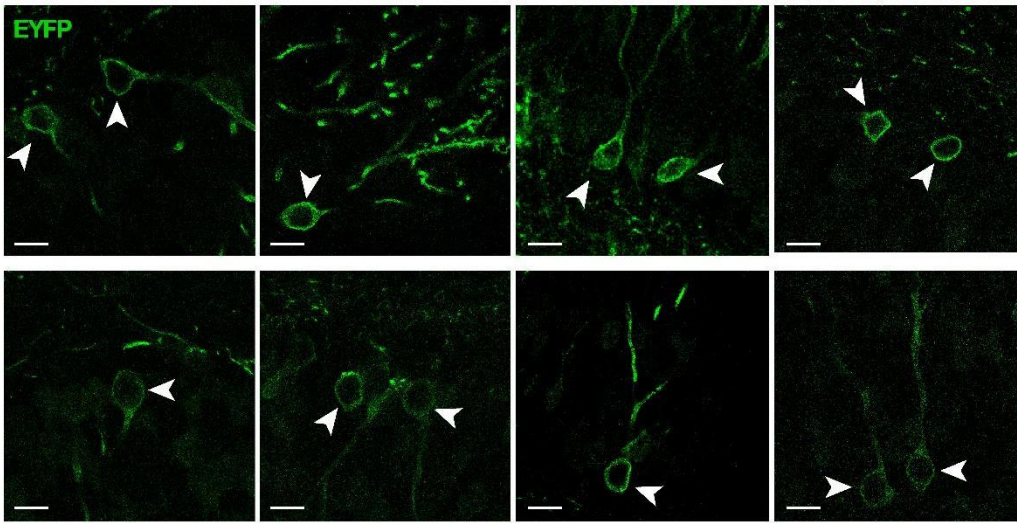
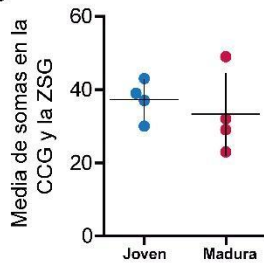
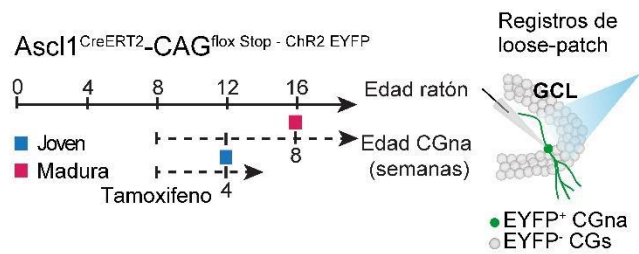
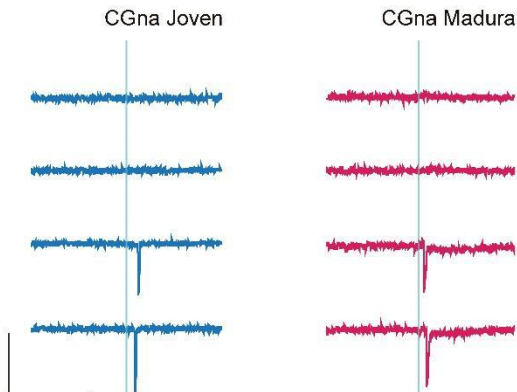
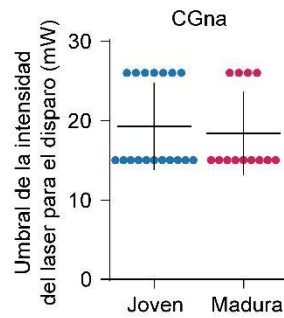
A**B****C****D****E**

Figura r6 – Similar expresión y eficacia excitatoria del ChR2 en las condiciones joven y madura. (A) Imágenes confocales representativas de CGNa (flechas) pertenecientes a la condición joven (fila superior) o madura (fila inferior). Escala: 10 μ m. Las imágenes corresponden a 8 diferentes animales. (B) Media del número de cuerpos celulares en la capa de células granulares (CCG) y en la zona sub-granular (SGZ) de un corte coronal del DG dorsal de 40 μ m de espesor para las condiciones joven (azul) o madura (rojo; un ratón por círculo; negro: media \pm s.e.m.). Test de Mann-Whitney de dos colas: $p = 0.49$. (C) Izquierda: Diseño experimental similar a la Figura r1. Ratones Ascl1^{CreERT2};CAG^{floxStopChR2EYFP} de 8 semanas de edad recibieron inyecciones de TAM para inducir la expresión indeleble de ChR2 en los progenitores neurales y fueron sacrificados 4 u 8 semanas después. Derecha: Esquema de los registros de *loose-patch* en CGNa EYFP⁺ llevados a cabo en conjunto con estimulación óptica. (D) Ejemplo de trazas obtenidas de dos CGNa con registros de *loose-patch*, una de la condición joven (azul) y la otra

de la madura (rojo) con intensidades de láser crecientes (de arriba abajo: 3, 15, 26 and 40 mW). Línea azul: pulso de luz para la estimulación de 2 ms de duración. Escalas: 50 pA, 100 ms. (E) Distribución del umbral de intensidad del láser necesario para producir disparos neuronales (mean \pm s.e.m). Tamaño de las muestras (neuronas/ratón) 18/5 (joven) and 13/5 (madura) ($p = 0.72$, test de dos colas de Mann-Whitney). El experimento de electrofisiología ex vivo fue realizado por Mariela Trinchero del Laboratorio de Plasticidad Neuronal, Instituto Leloir.

R.1.3 Las CGna jóvenes inducen la reconfiguración de los mapas espaciales de CA3 proximal

Con el propósito de evaluar cambios potenciales en las representaciones espaciales de CA3 debidos a la estimulación de las CGna, seleccionamos las células piramidales de CA3 putativas activas y estables en la primera sesión de cada día (Figura r4D). Empezamos analizando las células localizadas en la porción proximal de CA3, donde el nivel de remapeo es mayor (Lu et al., 2015; Lee et al., 2015; Goodsmith et al., 2019). Se analizaron los mapas espaciales de la primera (pre-estimulación) vs. la última (post-estimulación) sesión por medio de correlaciones espaciales (Figura r7 y r4E).

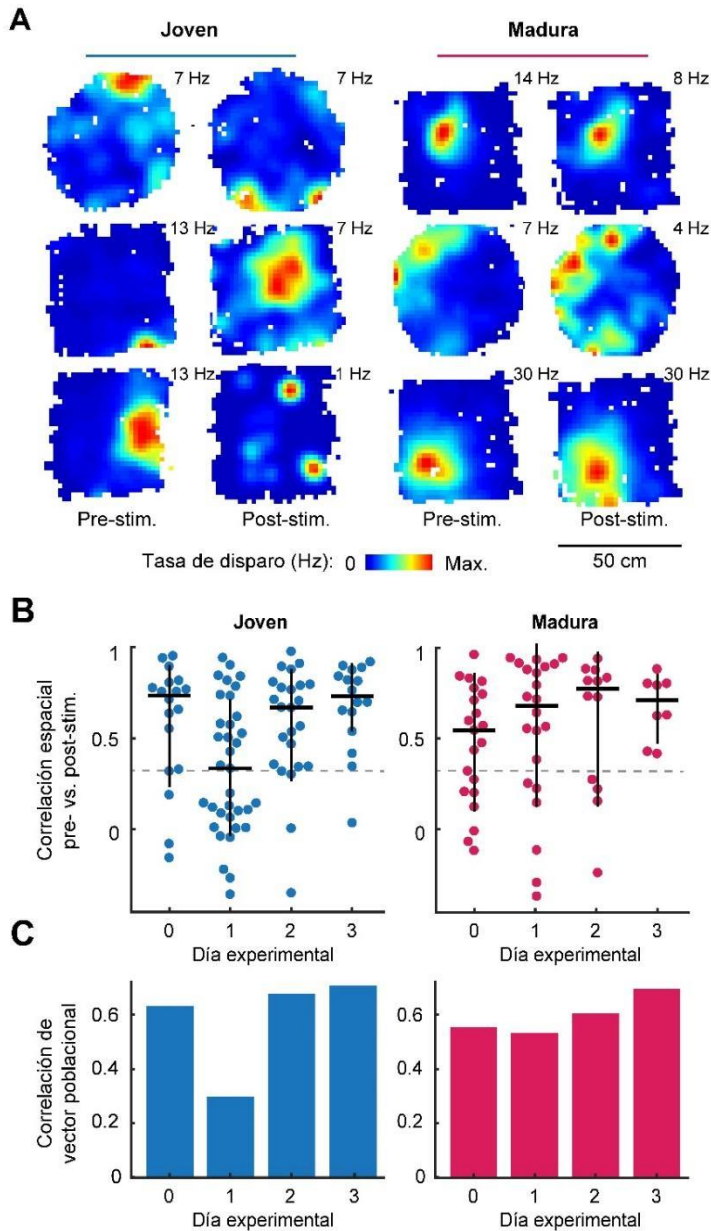


Figura r7 – Remapeo en CA3 inducido por la estimulación de CGNa jóvenes. (A) Ejemplos de mapas espaciales (Código de color, tasa de disparo máxima y sesiones indicadas) del día 1 en las condiciones joven (izquierda) y madura (derecha; una célula por fila en cada subpanel). (B) Distribución (un punto por neurona; negro: mediana \pm RIQ o rango intercuartil) de la correlación espacial entre los mapas antes y después de la estimulación de las CGNa jóvenes (izquierda) y maduras (derecha) a lo largo de los días experimentales. Joven, n por día: 18, 34, 24 y 16. Madura: 21, 22, 11 y 8. Comparaciones: condición joven, día 1 vs. día 0: $p = 0.01$; otras: $p > 0.25$ (Test de Mann-Whitney, cola izquierda). (C) Como B pero para la correlación de vectores poblacionales. Comparaciones: condición joven, día 1 vs. día 0: $p = 0.04$; otras: $p > 0.4$ (*shuffling*).

Observamos que la estimulación óptica de las CGNa jóvenes indujo la reconfiguración de un extenso conjunto de los mapas espaciales registrados en CA3 (Figura r7A, r8 y r9). En contraste, cuando la estimulación óptica fue dirigida a las CGNa maduras, el remapeo fue

infrecuente (Figura r7A, r10), sugiriendo un rol específico para las CGna jóvenes en el procesamiento espacial del hipocampo.

Para validar esta observación cuantitativamente, comparamos los mapas espaciales de las sesiones pre- y post estimulación en los días 0 y 1. Encontramos que la distribución de la correlación entre mapas espaciales fue significativamente más baja en el día 1 (estimulación) que en el día 0 para la condición joven, indicando la presencia de remapeo. Casi la mitad de los mapas espaciales de las células piramidales putativas registradas en CA3 hicieron remapeo global. Sin embargo, la correlación espacial fue similar para los mismos días y sesiones en la condición madura. El mismo patrón fue encontrado al computar las diferencias entre vectores poblaciones (Figura r7C).

Colectivamente, estos resultados apuntan a que las CGna jóvenes poseen la capacidad de remodelar los mapas espaciales de CA3 proximal. Las CGna maduras en cambio son ineficaces en este respecto. Los controles realizados hasta ahora indican que este fenómeno no se debió a diferencias relativas a la expresión de ChR2 en las distintas cohortes o a las propiedades fisiológicas basales de las células de CA3 pertenecientes a cada condición.

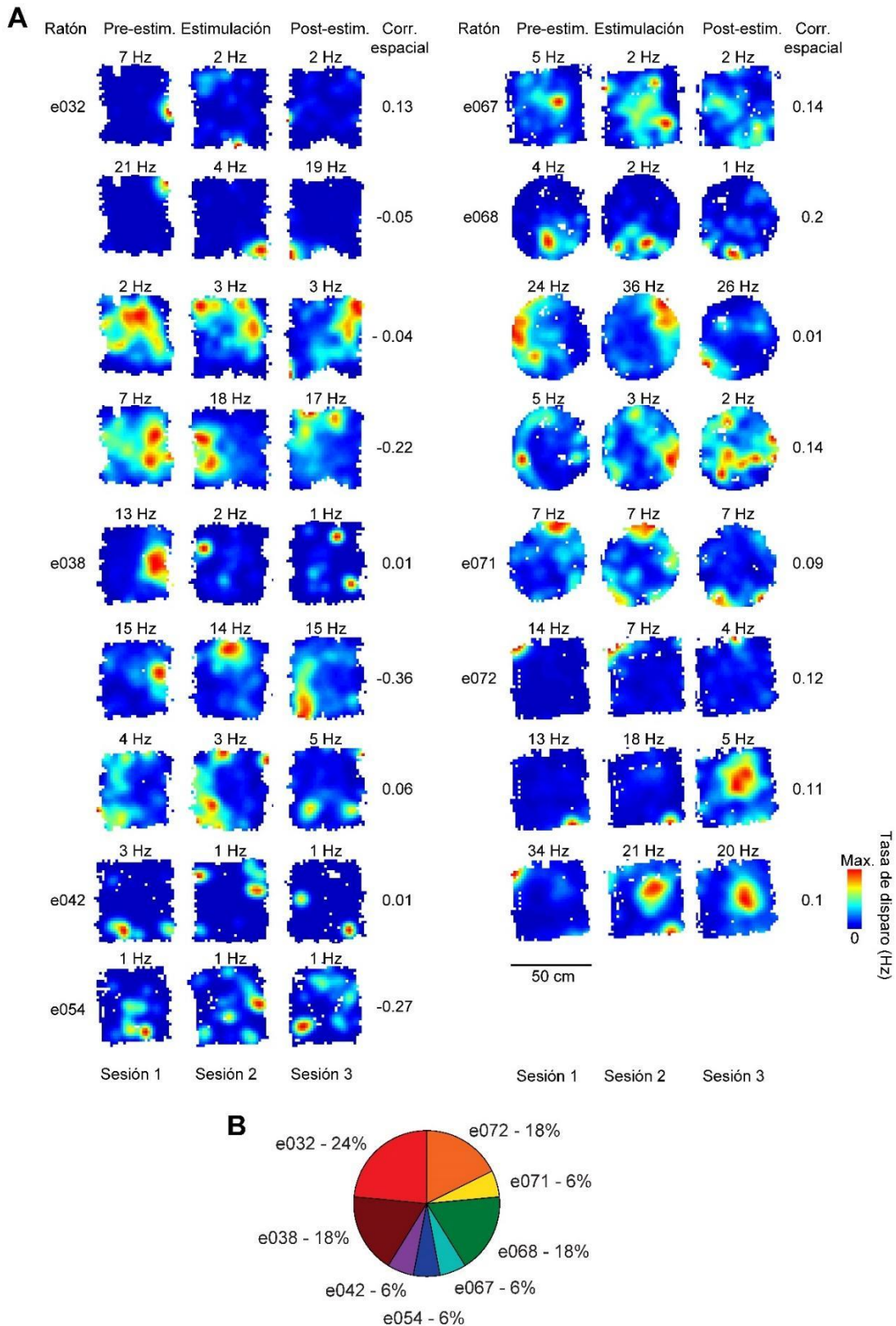


Figura r8 – Mapas espaciales para todas las células remapeantes en la condición joven en el día 1. (A) Mapas espaciales de células piramidales putativas de CA3 activas y estables (Código de color, tasa de disparo indicados, una célula por fila) registradas en el día 1. Columnas de izquierda a derecha: identidad del ratón, mapa pre-

estimulación, mapa de la sesión con estimulación, mapa post-estimulación, correlación espacial entre los mapas pre- y post estimulación. **(B)** Distribución de células remapeantes entre los ratones.

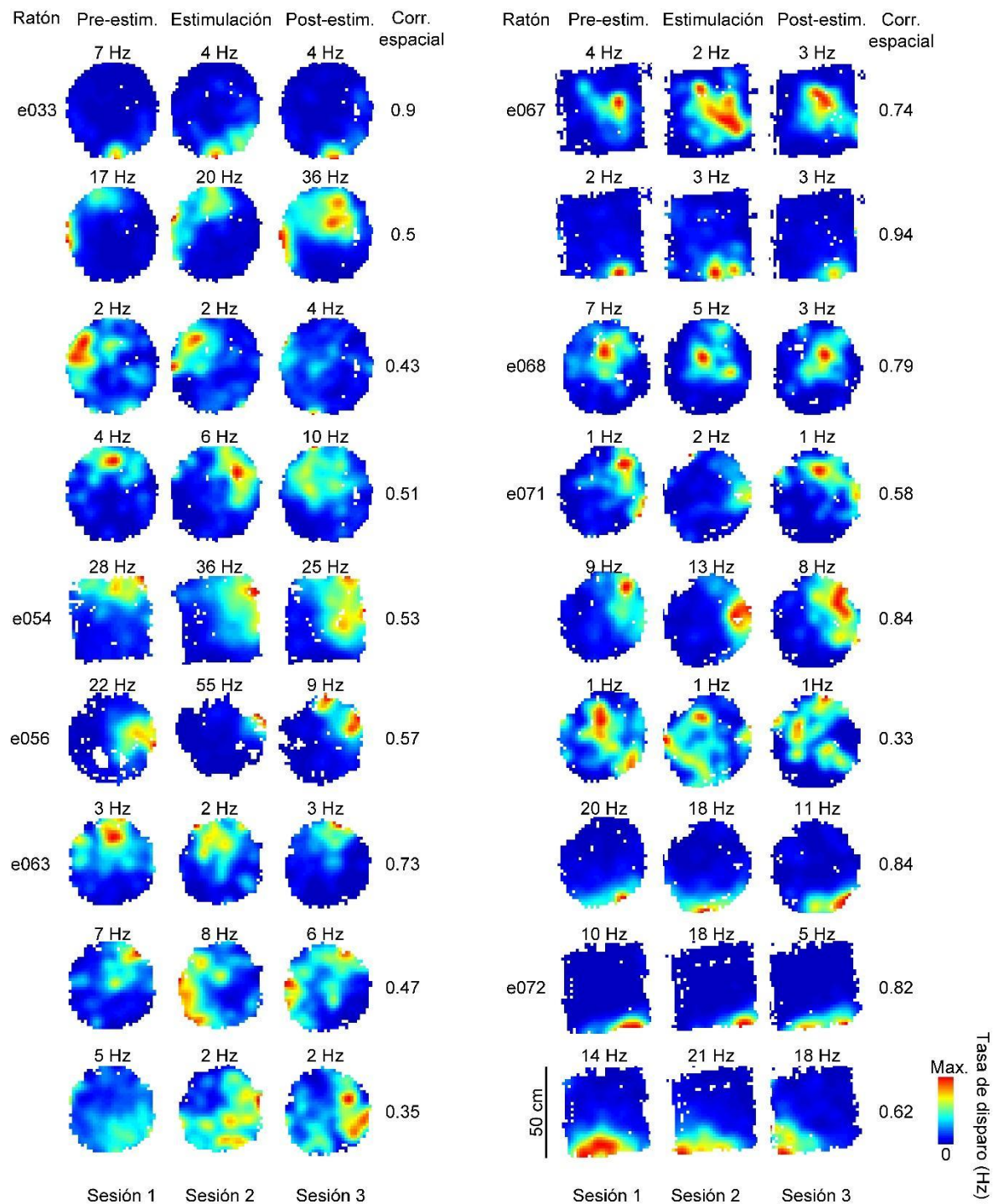


Figura r9 – Mapas espaciales para todas las células no-remapeantes en la condición joven en el día 1. Mapas espaciales de células piramidales putativas de CA3 activas y estables (Código de color, tasa de disparo indicados, una célula por fila) registradas en el día 1. Columnas de izquierda a derecha: identidad del ratón, mapa pre-estimulación, mapa de la sesión con estimulación, mapa post-estimulación, correlación espacial entre los mapas pre- y post estimulación.

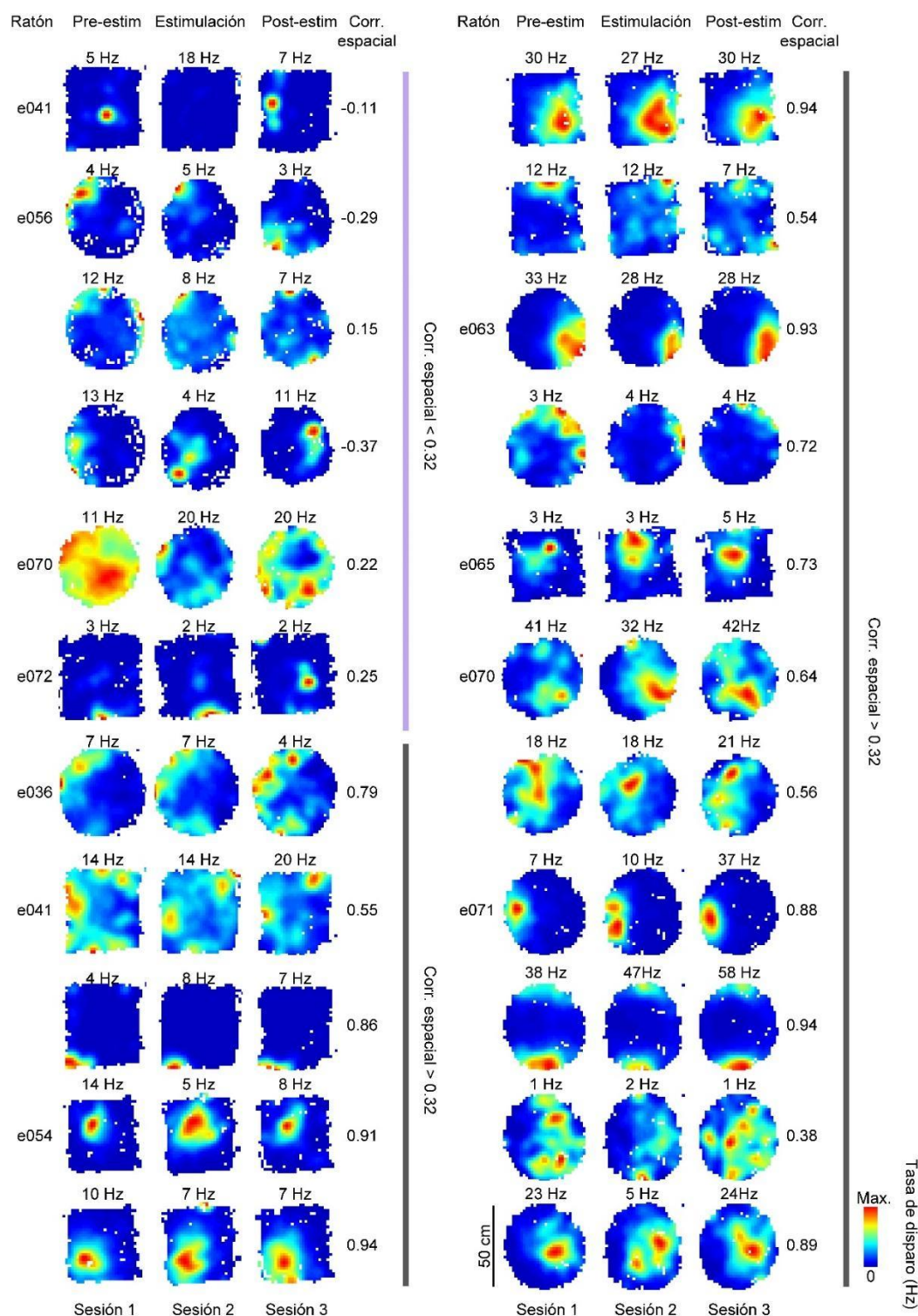


Figura r10 – Mapas espaciales para todas las células en la condición madura en el día 1. Mapas espaciales de células piramidales putativas de CA3 activas y estables (Código de color, tasa de disparo indicados, una célula por fila) registradas en el día 1. Columnas de izquierda a derecha: identidad del ratón, mapa pre-estimulación, mapa de la sesión con estimulación, mapa post-estimulación, correlación espacial entre los mapas pre- y post

estimulación. Las células fueron agrupadas de acuerdo a si su correlación espacial estuvo arriba (lila) o abajo (gris) del punto de corte para clasificar células remapeantes en la condición joven (0,32, Figura r4E).

R.1.4 Incremento transitorio en el disparo relativo a los bins estimulados en células remapeantes y no remapeantes

Debido a los cambios observados en la correlación de los mapas de las células de CA3 en la condición joven, decidimos analizar su tasa de disparo en busca de efectos adicionales provocados por la estimulación de las CGNa. Mientras que la tasa de disparo media no cambió entre sesiones (Figura r11A), los disparos de las células de CA3 mostraron un incremento durante la última sesión del día 1 en los *bins* espaciales donde las CGNa jóvenes habían sido estimuladas (Figura r11B). Nos preguntamos entonces si este efecto diferencial de largo plazo se restringía en el orden de las horas o si era todavía sostensible en el orden de los días. Con este objetivo, evaluamos el subconjunto de células registradas en el día 1, las que también fueron registradas en el día 2, y medimos la tasa de disparo en las sesiones del mismo ambiente familiar (1 a 3, día 1; 1 y 4, día 2). Encontramos que el aumento manifiesto en el día 1 desapareció en el día 2. Este efecto transitorio en el incremento de la tasa de disparo de los bins espaciales estimulados sugiere una asociación entre el aumento local de la tasa de disparo producido por la estimulación y el remapeo. No obstante, dicha asociación no implica que los cambios en los mapas y los eventos de estimulación hayan estado directamente relacionados. Por el contrario, como fue observado en trabajos previos (Rickgauer et al., 2014; McKenzie et al., 2021), la reorganización de los mapas no estuvo confinada a las zonas estimuladas del espacio.

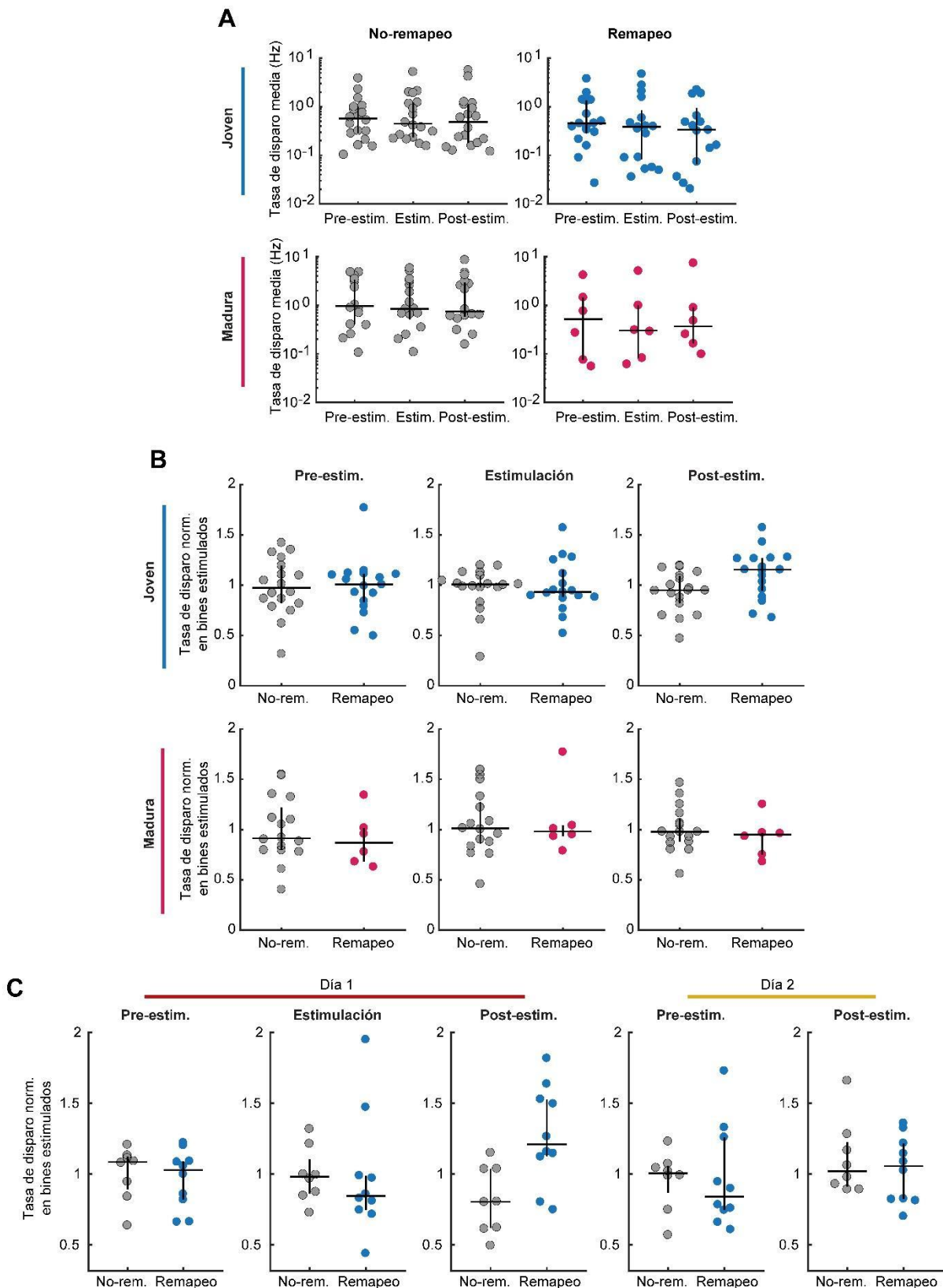


Figura r11 – Incremento transitorio en el disparo relativo a los bins estimulados en células remapeantes y no remapeantes. (A) Tasa de disparo media a lo largo de las sesiones del día 1 para células con correlación espacial arriba (izquierda, no-remapeantes; $n=18$) o debajo (derecha, remapeantes; $n=16$) del punto de corte del

clasificador (0.32; Figura r4E) en las condiciones joven (arriba) o madura (abajo). No se encontraron variaciones a lo largo de las sesiones (Test de Kruskal-Wallis: $p > 0.5$). **(B)** Para cada célula y sesión determinada, la tasa de disparo normalizada fue calculada como la razón entre la tasa de disparo adentro de los bins estimulados en la sesión 2 y la tasa media de disparo de toda la sesión. Los subpaneles corresponden a las sesiones del día 1 (indicadas) y muestran la tasa de disparo normalizada de las células no remapeantes (izquierda) y remapeantes (derecha) en las condiciones joven (arriba) o madura (abajo; un punto por célula, negro: mediana \pm RIQ). Nótese el incremento de actividad en los bins estimulados durante la sesión post-estimulación pero no en la sesión estimulada o en la previa, únicamente presente en las células remapeantes de la condición joven (Test de Mann Whitney de dos colas: $p = 0.024$; demás comparaciones: $p > 0.44$). **(C)** Igual que B pero incluyendo las sesiones pre- y post estimulación del día 2 para las células registradas tanto en el día 1 como en el 2. Sólo la comparación de la sesión post- estimulación del día 1 entre las células remapeantes ($n=10$) y no remapeantes ($n=8$) arrojó una diferencia significativa ($p = 0.0085$).

R.1.5 Las CGNa jóvenes de CA3 distal no inducen remapeo

Después de analizar los mapas espaciales de la porción proximal de CA3 nos enfocamos en el segmento distal para entender si esta porción también podía ser afectada por la estimulación de las CGNa. A diferencia de lo observado en CA3 proximal, encontramos que las células localizadas en la porción distal de CA3 no exhibieron diferencias significativas en las correlaciones de mapas espaciales tanto en la condición joven como en la madura (Figura r12). Estos resultados están en línea con estudios recientes que observaron un gradiente en el nivel de remapeo de las células de CA3 que exhibía valores altos en su porción proximal, con una marcada disminución hacia CA2 (Lu et al., 2015; Lee et al., 2015; Goodsmith et al., 2019). Por esta razón, restringimos los análisis siguientes a CA3 proximal, a menos que haya sido indicado específicamente.

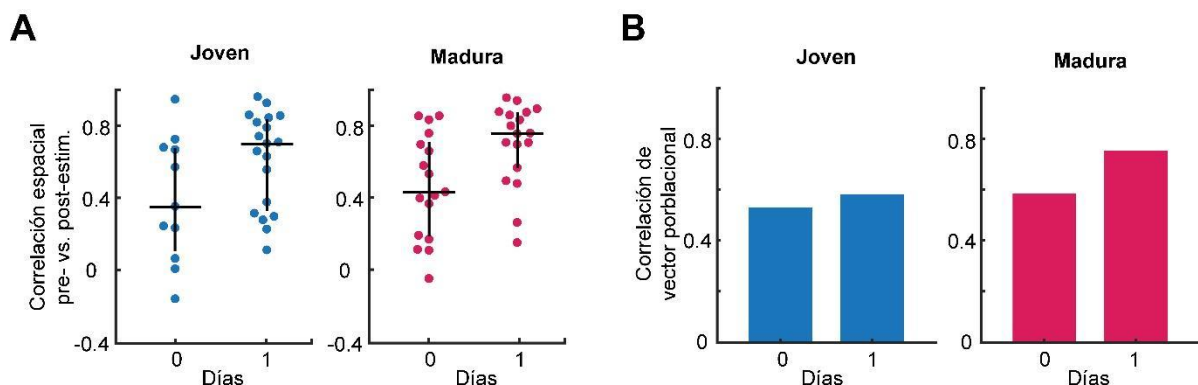


Figura r12 – Las CGNa jóvenes no inducen remapeo en CA3 distal. (A) Distribución (un punto por neurona; negro: mediana \pm RIQ) de la correlación espacial entre los mapas antes y después de la estimulación de las CGNa

jóvenes (izquierda, 11 y 19 células) y maduras (derecha, 17 y 18 células). Comparaciones realizadas contra el día 0 con un test de Mann-Whitney cola izquierda. Condición joven: día 1, $p = 0.96$; condición madura: día 1, $p = 0.99$. **(B)** Como A pero para la correlación de vectores poblacionales. Comparaciones realizadas contra el día 0 por comparación directa con la distribución aleatorizada de las etiquetas de los mapas. Condición joven: día 1, $p = 0.65$; condición madura: día 1, $p = 0.97$.

R.1.6 Depleción rápida de la capacidad de la CGNa jóvenes para inducir remapeo

Además de la exploración de la arena en múltiples presentaciones en los días 0 y 1, los ratones fueron expuestos a otra o la misma arena en los días 2 y 3. Cada día, las CGNa fueron estimuladas durante una sesión intermedia. Analizamos entonces el patrón exhibido por las correlaciones espaciales en estos días, preguntándonos si el remodelado de las representaciones espaciales podía continuar por medio de la re-estimulación de las CGNa en los días siguientes. En contraste a lo observado en el día 1, los mapas del ambiente familiar permanecieron inalterados después de que la estimulación ocurriera en la arena novedosa (día 2) o en la misma arena (día 3; Figura r7B y C). Estos resultados apuntan a una rápida depleción en la capacidad de las CGNa para inducir remapeo.

R.1.7 La edad de las CGNa y no la de los ratones explica el remapeo

Además de la edad de las CGNa de la cohorte marcada, conforme pasa el tiempo, también la edad del ratón aumenta. De este modo, los ratones en la condición madura (16 semanas de edad) eran más viejos que aquellos en la condición joven (12 semanas). Para descartar la posibilidad de que el remapeo estuviera relacionado a la edad del ratón más que a la edad de las neuronas estimulamos una cohorte madura marcada por medio de la misma estrategia en un grupo control de animales más jóvenes (12 semanas de edad). No encontramos cambios significativos en los mapas espaciales utilizando tanto la correlación espacial como la correlación de vectores poblacionales (Figura r13). Este resultado apunta a la edad neuronal como el factor crítico detrás del remodelado de los mapas espaciales de CA3.

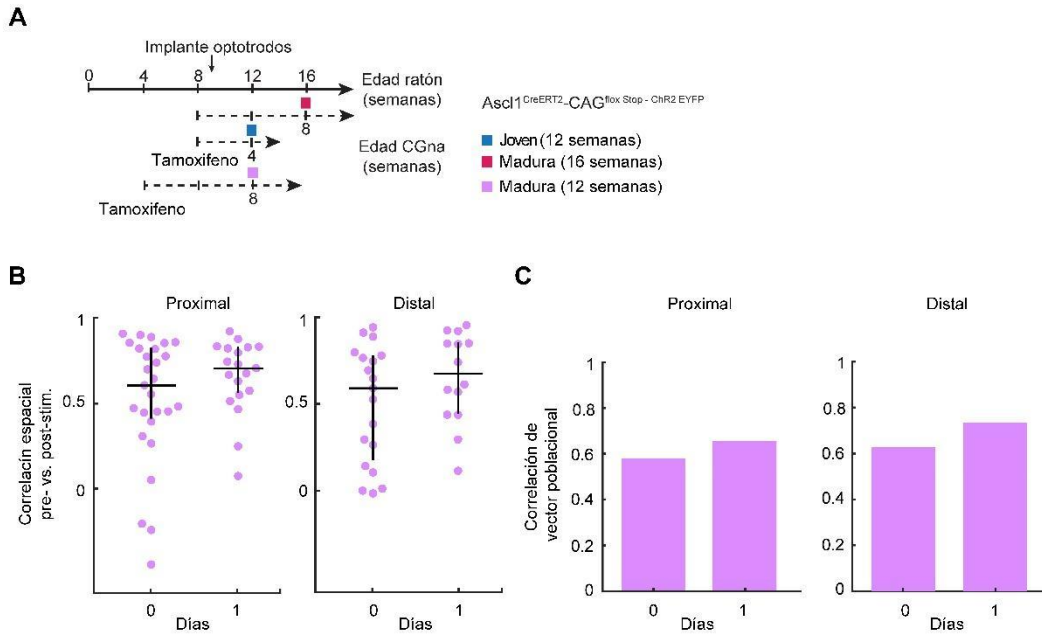


Figura r13 – La estimulación de CGNa maduras en ratones de 12 semanas de vida no produce remapeo. (A) Diseño experimental como en la Figura r1 pero agregando la línea de tiempo para el experimento control con animales de 12 semanas de vida (lila). Los ratones recibieron inyecciones de tamoxifeno a las 4 semanas de edad y los experimentos fueron realizados a las 12 semanas de edad. (B) Distribución de la correlación espacial para todas las células activas y estables en los días 0 y 1 en CA3 proximal (izquierda, 27 y 19 células) o distal (derecha, 19 y 14 células; un punto por célula; negro: mediana \pm RIQ). Test de Mann-Whitney de cola izquierda. Proximal: días 0 vs. 1, $p = 0.85$. Distal: días 0 vs. 1, $p = 0.95$. (C) Correlación de vector poblacional para los mismos días y células en CA3 proximal (izquierda) y distal (derecha). Proximal: días 0 vs. 1, $p = 0.99$ (*shuffling*). Distal: días 0 vs. 1, $p = 0.91$ (*shuffling*).

R.1.8 Conclusiones parciales

El análisis de los mapas espaciales de las células de CA3 mostró que las CGNa jóvenes, pero no las maduras, fueron capaces de reorganizar río abajo representaciones espaciales previamente establecidas. Entre las células de CA3 con menor correlación espacial encontramos un aumento transitorio en la tasa de disparo en la sesión post-estimulación, sugestivo de una asociación indirecta entre la estimulación y el remapeo. Este efecto no fue explicado por diferencias en la expresión de Chr2 en las cohortes manipuladas. Tampoco fue explicado por diferencias en la fisiología de las células de CA3 de cada condición, ni por la edad de los animales. Adicionalmente, en línea con el hallazgo de que CA3 proximal exhibe mayores niveles de reorganización en los mapas espaciales, el remapeo inducido por la estimulación de las CGNa estuvo confinado a dicho segmento (Lee et al., 2015; Lu et al., 2015; Goodsmith et al., 2019). En conjunto, estos resultados revelan un potencial único de las CGNa

para inducir remapeo en las representaciones espaciales de CA3 proximal. Esta habilidad se extingue una vez desplegada y se pierde con la maduración neuronal.

R.2 Cambios en la estabilidad de los mapas espaciales de CA3 asociados al remapeo inducido

R.2.1 Variaciones en la estabilidad de células remapeantes y no remapeantes entre los días 1 y 2

Para caracterizar el remodelado de las representaciones espaciales de CA3 inducido por la activación de las CGna de 4 semanas de edad, clasificamos las células registradas en el día 1 de la condición joven en remapeantes y no-remapeantes de acuerdo a su correlación espacial (Figura r7B y r5E). Por medio de esta clasificación evaluamos si el remapeo inducido estuvo asociado con cambios en la estabilidad de los mapas espaciales. La estabilidad fue definida como la correlación espacial entre mapas construidos con datos provenientes de los segmentos pares e impares obtenidos después de dividir cada sesión en ventanas consecutivas de 30 s. Observamos que las células remapeantes y las no-remapeantes mostraron niveles similares de estabilidad antes de la sesión de estimulación. Sin embargo, mientras que las células no-remapeantes continuaron mostrando altos niveles de estabilidad, las células remapeantes mostraron una marcada reducción después de la estimulación (Figura r14A y B). Con el objetivo de determinar el curso temporal de este proceso, monitoreamos las células remapeantes en el día siguiente y encontramos que la estabilidad fue recuperada para la primera sesión del día 2 (Figura r14A y B).

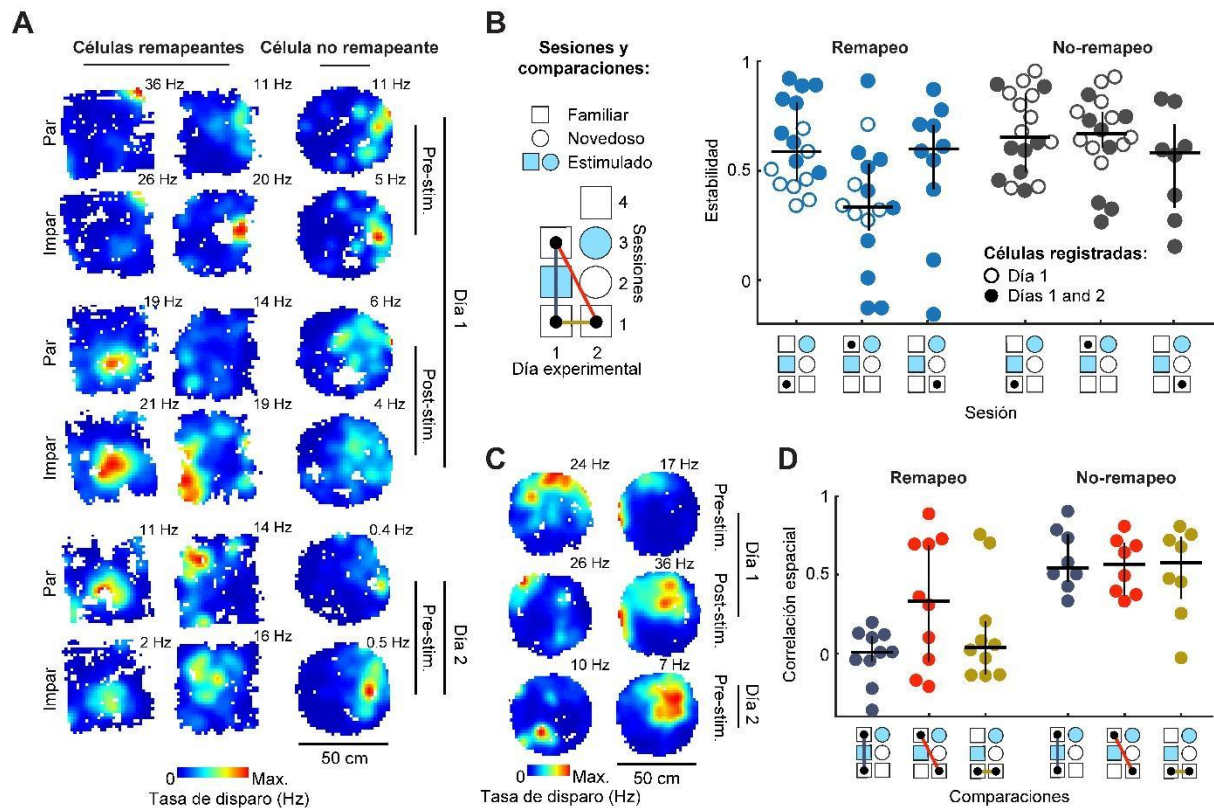


Figura r14 – Desestabilización y remapeo irreversible como consecuencia de la primera estimulación de CGna jóvenes. (A) Ejemplos de estabilidad para células remapeantes (izquierda) y no-remapeantes (derecha; una por columna). Mapas espaciales a lo largo de las distintas sesiones y días (Código de color y tasa de disparo máxima indicados) construidos con bins de 30 s pares (arriba) o impares (abajo). (B) Izquierda: Esquema de sesiones y comparaciones. Derecha: Distribución de la estabilidad a lo largo de las sesiones (un círculo por neurona; negro: mediana y RIQ) para las células remapeantes (azul; $n=16$) y no-remapeantes (gris; $n=18$) registradas exclusivamente en el día 1 (vacío) o también el día 2 (lleno). Test de Wilcoxon de cola izquierda entre las columnas 1 vs. 2 (todos los círculos): $p = 0.004$; 1 vs. 2 (círculos llenos): $p = 0.007$; 1 vs. 3 (círculos llenos): $p = 0.07$; comparaciones similares para las células no-remapeantes: $p > 0.15$. Test de Wilcoxon de cola izquierda entre las columnas 1 vs. 4 (todos los círculos): $p = 0.4$. (C) Ejemplos de mapas espaciales (Código de color, tasa de disparo máxima indicada. Una célula por columna) de las células remapeantes a lo largo de los días y las sesiones. (D) Distribución de la correlación espacial entre mapas de las sesiones indicadas (Código de color como en B; un círculo lleno por neurona; negro: mediana y RIQ) para las células remapeantes (izquierda; $n=10$) y no-remapeantes (derecha; $n=8$) que se lograron registrar e identificar ambos días. Test de Wilcoxon de cola derecha contra la hipótesis de mediana igual a cero: células remapeantes de izquierda a derecha $p = 0.46$, $p = 0.02$, $p = 0.24$; células no-remapeantes $p < 0.02$.

R.2.2 Nuevos mapas estables inducidos por la estimulación de CGNa jóvenes en los días 1 y 2

La recuperación observada en la estabilidad podría haber sido indicativa de que las células remapeantes bien recuperaron sus mapas previos a la estimulación o adquirieron nuevos mapas estables. Para distinguir entre estas alternativas analizamos la correlación entre mapas correspondientes a diferentes sesiones de los días 1 y 2 (Figura r14C y D). Mientras que los mapas pre-estimulación del día 2 fueron diferentes de los mapas pre-estimulación del día 1, algunos se conservaron respecto de la sesión post-estimulación del día 1. Este resultado apoya la idea de que la estimulación de las CGNa indujo la formación de nuevos mapas estables, ortogonales a los originales, para el mismo contexto familiar. También sugiere variabilidad en el tiempo (en el orden de las horas), necesaria para establecer nuevos mapas estables. Las células no-remapeantes, en cambio, mantuvieron sus mapas a lo largo de las sesiones y los días.

R.2.3 Conclusiones parciales

Los resultados de esta sección indican que la estimulación de CGNa jóvenes produjo la pérdida de estabilidad en los mapas espaciales de las células remapeantes de CA3. Dicha estabilidad fue reestablecida dentro de las 24h. Mientras tanto, las células no-remapeantes no exhibieron variaciones significativas en su estabilidad. Adicionalmente, nuestros datos revelaron que las células remapeantes de CA3 formaron nuevos mapas, no correlacionados con los originales. Esta ortogonalización respecto de la representación anterior, sugiere un posible mecanismo para la separación de patrones.

R.3 Caracterización de la actividad de las células de CA3 proximal evocada por la estimulación de las CGNa

R.3.1 Análisis de las respuestas evocadas temprana y tardía

A continuación, analizamos la actividad evocada en CA3 con el propósito de determinar la posible relación entre esta y el remodelado de las representaciones espaciales de CA3 observado en la condición joven. Primero caracterizamos la actividad de las células de CA3 evocada por la estimulación de las CGNa, para luego abordar la relación propiamente dicha. Consideramos la actividad media de las células a lo largo del tren de estímulos entregados durante la sesión 2. La estimulación típicamente evocó un incremento temprano (5 a 13 ms

post estímulo) en la tasa de disparo, seguido por un retorno a valores basales o una leve inhibición tardía (15 a 30 ms; Figura r15). Estas características fueron encontradas tanto en las células piramidales putativas (Pir) como en las de disparo rápido (DR), definidas de acuerdo con su tasa de disparo media.

Las respuestas de neuronas individuales a la estimulación fueron clasificadas usando un modelo lineal generalizado. Dicho modelo comparó estadísticamente la actividad durante las ventanas temprana o tardía con la actividad basal previa al pulso de luz. En general, las células fueron clasificadas como “transientes” (respuesta temprana) o “no-respondientes”. Las CGna maduras reclutaron una proporción mayor de células transientes que las CGna jóvenes y, en general, su respuesta fue seguida por una fuerte inhibición (Figura r16A a C, r17A a C). La inhibición observada a nivel poblacional en la ventana tardía no se usó como criterio de clasificación porque resultó difícil su detección en neuronas individuales.

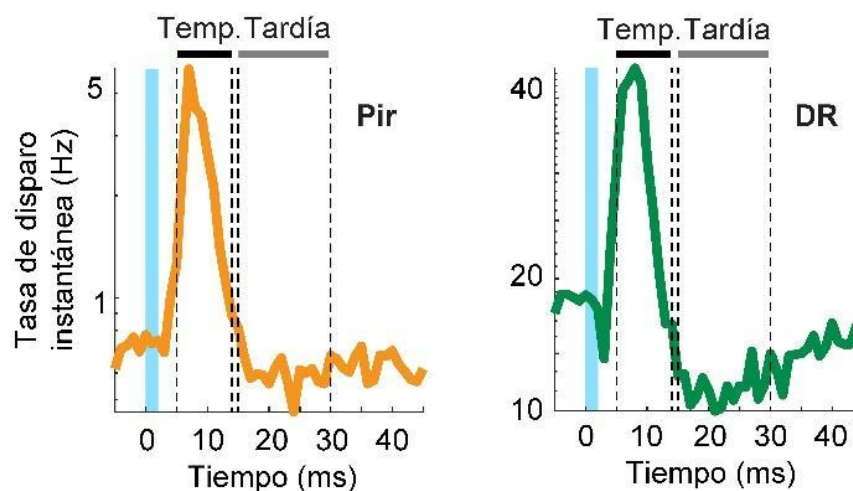


Figura r15 – Respuesta evocada en neuronas piramidales y de disparo rápido putativas. Actividad evocada media relativa al inicio de la estimulación para células piramidales (Pir, izquierda, naranja; n=296) o de disparo rápido de CA3 (DR, derecha, verde; n=36). Las células fueron agrupadas a través de las categorías de disparo, los días y condiciones. Estímulo óptico, ventanas temprana (5-13 ms; negro) y tardía (15-30 ms; gris) indicadas. Las líneas punteadas verticales indican los límites de las ventanas.

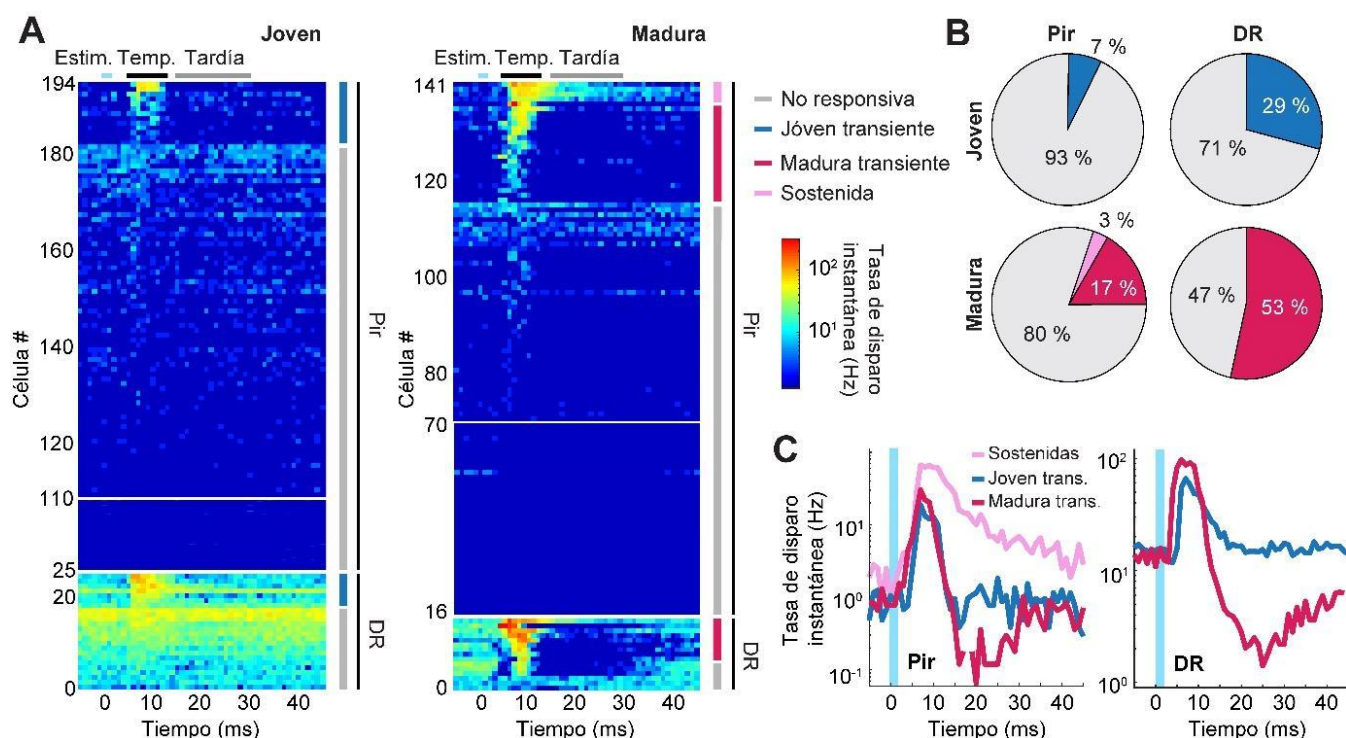


Figura r16 – Los patrones de actividad evocada en CA3. (A) Mapas de calor representando la actividad media en CA3 (una neurona por fila) evocada por la estimulación de CGna jóvenes (izquierda) o maduras (derecha) para células piramidales putativas (Pir; subpanel superior; transientes: 13/170 y 21/126, respectivamente; sostenidas: 5/126) o de disparo rápido (DR; subpanel inferior; transientes: 7/24 y 8/15). Patrones de respuesta, estimulación, ventanas temprana y tardía indicadas. (B) Distribución de los patrones de respuesta (Código de color como en A) para Pir (izquierda) o DR (derecha) en las condiciones joven (arriba) y madura (abajo). Comparaciones del reclutamiento de células transientes en las condiciones joven vs. madura: $p = 0.004$ (Pir), $p = 0.06$ (DR) (*shuffling*). (C) Patrones de respuesta medios (Código de color) para células Pir (izquierda) o DR (derecha). Comparación de la respuesta de células transientes entre condiciones (*shuffling*): ventana temprana $p = 0.46$ (Pir), $p = 0.1$ (DR); ventana tardía $p = 0.03$ (Pir), $p = 0.007$ (DR). Comparación de la respuesta de las células maduras transientes vs. sostenidas (*shuffling*): ventana temprana $p = 0.002$; ventana tardía: $p < 0.0001$.

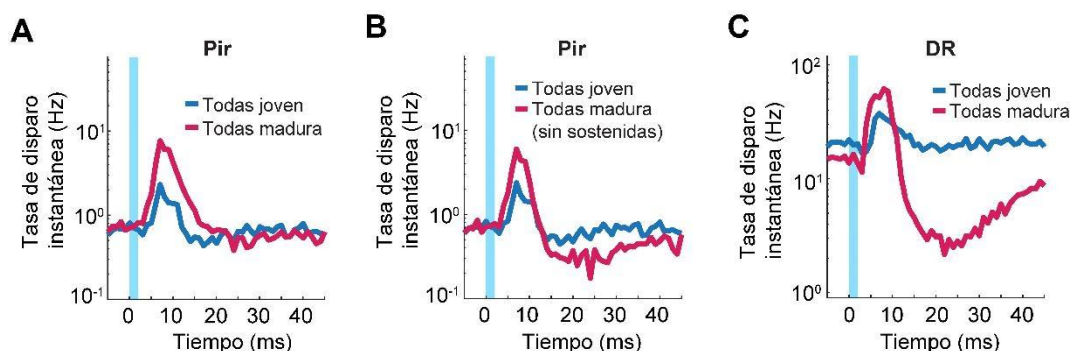


Figura r17 – Actividad poblacional evocada. (A) Respuesta evocada media de todas las células Pir registradas en las condiciones joven (azul; $n=170$) o madura (roja; $n=126$). Comparaciones entre condiciones (*shuffling*): $p = 0.0005$ (ventana temprana), $p = 0.23$ (ventana tardía). (B) Como en A pero excluyendo las células de actividad

sostenida (n=5). Nótese que las diferencias entre las condiciones en las ventanas temprana y tardía están menos o más marcadas, respectivamente. Comparaciones entre condiciones (*shuffling*): $p = 0.02$ (ventana temprana), $p < 0.0001$ (ventana tardía). (C) Igual que B pero para células DR (joven=24; madura=15). Comparaciones entre condiciones (*shuffling*): $p = 0.03$ (ventana temprana), $p < 0.0001$ (ventana tardía).

Mientras que la actividad poblacional evocada mostró diferencias entre las condiciones, la amplitud de las respuestas individuales de las células transientes fueron similares. Esto implica una diferencia cuantitativa pero no cualitativa en el reclutamiento de células transientes (Fig r16C). En la fase temprana de la respuesta encontramos diferencias entre condiciones tanto en la población de células Pir como en la de DR (Fig r17A y C). No obstante, mientras que en la respuesta poblacional de células DR hay diferencia en la respuesta tardía (Fig r17C), en la de todas las piramidales juntas no la hay (Fig r17A).

En la condición madura encontramos un grupo adicional de células Pir clasificadas como “sostenidas”, las cuales exhibieron una respuesta temprana fuerte que permaneció elevada a lo largo de la fase tardía de la respuesta. Aunque este grupo no pudo explicar completamente la diferencia en el tamaño de la respuesta temprana de toda población de células Pir, sí explica la ausencia de inhibición en la fase tardía (Fig r17A y B). El llamativo patrón de actividad de estas células podría deberse a la acción de circuitos recurrentes excitatorios en CA3 (Rolls, 2016). No obstante, el bajo número de neuronas con actividad sostenida no permitió una caracterización más profunda para validar dicha hipótesis.

Analizamos también la actividad evocada en la porción distal de CA3. Encontramos que casi todas las neuronas reclutadas pertenecieron a la condición madura (Figura r18A a C). El bajo número de neuronas con actividad sostenida no permitió una caracterización más acabada de los patrones de respuesta. Para nuestro conocimiento, no hay una caracterización del desarrollo de las conexiones de las CGna a lo largo del eje próximo-distal de CA3 que permita una interpretación acabada de los resultados. Es más, si bien los axones de las CGna no alcanzan su extensión máxima hasta la onceava semana de desarrollo (Sun et al., 2013), para los 56 días de desarrollo, éstos ya se ubican en la porción distal de CA3 dorsal.

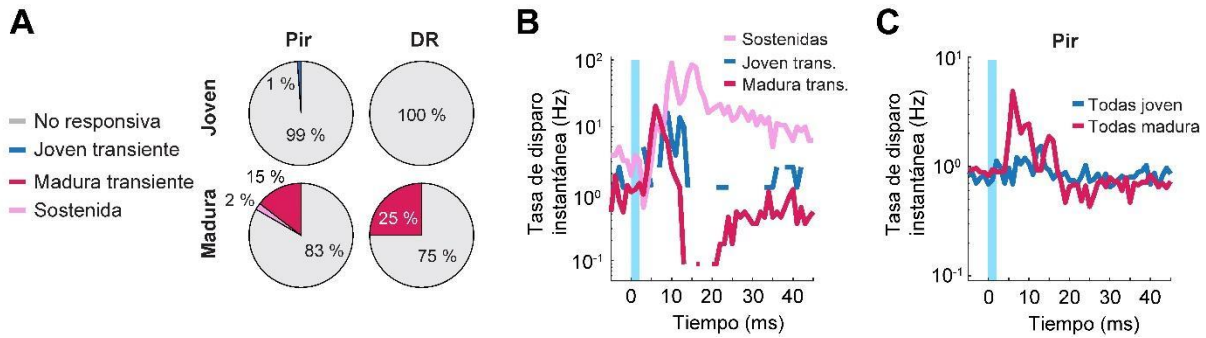


Figura r18 – Las CGNa jóvenes de CA3 distal evocan bajos niveles de actividad. (A) Distribución de los patrones de respuesta (Código de color indicado) para Pir (izquierda) o DR (derecha) en las condiciones joven (arriba; n=1/88 y 0/10) y madura (abajo; n=14/96 y 1/4; sostenidas: 2/96). Comparaciones del reclutamiento de células transientes en las condiciones joven vs. madura: $p = 0.0004$ (Pir), $p < 0.0001$ (DR) (*shuffling*). (B) Patrones de respuesta medios (código de color) para células Pir respondientes. Comparación de la respuesta de células transientes entre condiciones: ventana temprana $p = 0.8$; ventana tardía $p = 0.8$ (*shuffling*). Comparación de la respuesta de las células maduras transientes vs. sostenidas (*shuffling*): ventana temprana $p = 0.009$; ventana tardía: $p < 0.0001$. Las líneas quebradas corresponden al valor 0, que no puede ser graficado en escala logarítmica. (C) Patrones de respuesta medios (código de color) para células Pir en las condiciones joven (azul; n=88) y madura (rojo; n=96). Incluye las células de actividad sostenida. Comparación entre condiciones (*shuffling*): ventana temprana $p = 0.003$; ventana tardía $p = 0.9$. Otros gráficos y estadísticas de la porción distal de CA3 no fueron incluidos debido al bajo número de datos disponibles (transiente joven Pir: n = 1; sostenida: n = 2; transiente madura DR: n = 1).

R.3.2 Análisis de la respuesta evocada a lo largo del tren de estímulos

Analizamos la respuesta evocada a lo largo del tren de estímulos en busca de efectos de plasticidad en el corto término. Debido a que no observamos diferencias sustanciales entre frecuencias (4 y 20 Hz) o días, para el siguiente análisis fueron utilizados todos los estímulos disponibles. Para las células Pir, los trenes de estímulos a las CGNa jóvenes elicitaron una respuesta inicial pequeña en los primeros pulsos con una notable facilitación de la actividad a lo largo de los pulsos subsiguientes (Pir transientes: incremento de 6 veces; Figura r19A). En contraste, la estimulación de las CGNa maduras elicó una fuerte respuesta inicial con menor facilitación en pulsos subsiguientes (Pir transientes: 1.5 veces; sostenidas: 3 veces; Figura r19A). Entre las células DR, mientras que la estimulación de las jóvenes CGNa tendió a elicitar facilitación, las maduras tendieron a inducir depresión, aunque dado el bajo número de neuronas registradas estas dos tendencias no pudieron ser confirmadas estadísticamente (Figura r19B). Las respuestas observadas en las células de CA3 distal mostraron un patrón distinto, en el cual las células Pir transientes de la condición madura no mostraron facilitación

(Figura r19C). Otras condiciones no pudieron ser analizadas por la baja disponibilidad de células respondientes.

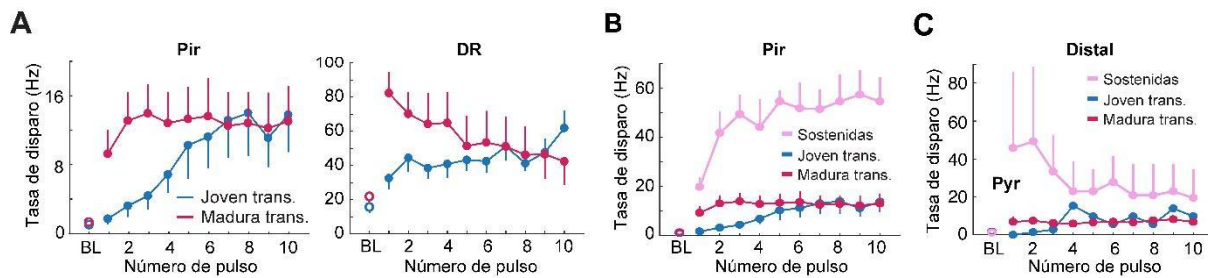


Figura r19 – Actividad evocada en CA3 a lo largo de los trenes de estimulación. (A) Actividad evocada de las células Pir transientes joven (azul) y transientes madura (rojo) a lo largo del tren de estimulación de 10 pulsos (media \pm s.e.m; BL: baseline). Test Wilcoxon de dos colas para la variación significativa normalizada entre el primero y último pulso: joven $p = 0.0002$; maduro $p = 0.02$. Células DR: joven $p = 0.08$; maduro $p = 0.2$. (B) Similar a A pero con las células de actividad sostenida (rosa). Comparación de la razón entre el último y primer pulso vs. 1 para las células de actividad sostenida (Test de Wilcoxon de dos colas): $p = 0.02$. (C) Similar a A pero con las células de la porción distal de CA3. Test Wilcoxon de dos colas para la variación significativa normalizada entre el primero y último pulso: madura, $p = 0.09$. Otros gráficos y estadísticas de la porción distal de CA3 no fueron incluidos debido al bajo número de datos disponibles (transiente joven Pir: $n = 1$; sostenida: $n = 2$; transiente madura DR: $n = 1$).

R.3.3 Conclusiones parciales

El análisis de la actividad en CA3 evocada por las CGna mostró que aquellas neuronas pertenecientes a la condición madura reclutaron una mayor proporción de células río abajo. A pesar de esto, encontramos que las células respondientes produjeron una respuesta temprana similar a nivel individual. Esto es cierto tanto para las células DR como para las Pir, si se excluyen las células de actividad sostenida. La respuesta a lo largo del tren difirió entre condiciones, mostrando un cambio varias veces mayor en las Pir de la condición joven y apenas una variación inicial en la condición madura.

La comparación de las porciones proximal y distal de CA3 puso de manifiesto una diferencia tanto en los niveles de reclutamiento como en la respuesta temprana y la facilitación. La actividad evocada en la condición joven fue prácticamente nula en la porción distal. Además, las CGna maduras no indujeron facilitación en CA3 distal.

Tomados conjuntamente, estos resultados revelan propiedades distintivas en la transmisión sináptica y la plasticidad durante la maduración neuronal en el eje próximo distal de CA3.

Proveen además evidencia de que las CGna continúan desarrollando sus conexiones más allá de la cuarta semana de edad, constituyendo el primer reporte *in vivo* en animales de movilidad libre que evalúa el efecto diferencial de la edad de las CGna (Gu et al., 2012; Henze et al., 2002; Zucca et al., 2017; Lee et al., 2019).

R.4 Relación entre la actividad evocada y el remapeo en CA3

Hasta este punto, los resultados indicaron que las CGna de 4 semanas de edad poseen capacidades únicas para remodelar CA3. El análisis de los mapas espaciales indicó que las CGna jóvenes indujeron su reorganización de manera concomitante a la estimulación. La sesión post-estimulación exhibió una reducción tanto de la correlación como de la estabilidad de los mapas espaciales en la condición joven. En contraste, la mayor actividad evocada fue encontrada en la condición madura, aunque en la condición joven la facilitación fue mayor. Como también se señaló, el hallazgo de que la tasa de disparo de los bins estimulados aumentó en las células remapeantes sugiere una asociación entre remapeo y estimulación. Con el fin de evaluar la posibilidad de una asociación, analizamos la actividad evocada en relación a los mapas espaciales en CA3 en la condición joven. Por un lado, evaluamos la actividad evocada en aquellas células clasificadas como remapeantes y la comparamos con las no remapeantes. Encontramos que las respuestas elicitadas por la estimulación de CGna fueron en general bajas y similares entre las dos condiciones en el día que se indujo el remapeo (Figura r20A). Por otro lado, comparamos la correlación espacial entre las sesiones pre- y post estimulación del día 1 en la condición joven, donde se indujo el remapeo, y el nivel de actividad evocada tanto en la fase temprana como tardía de la respuesta. En la misma dirección que los resultados anteriores, la correlación entre el remapeo y la actividad evocada (temprana o tardía), no mostró un vínculo directo entre las variables (Figura r20B y C). Esto sugiere que los procesos plásticos responsables del remapeo no dependen de manera directa de la actividad evocada en CA3.

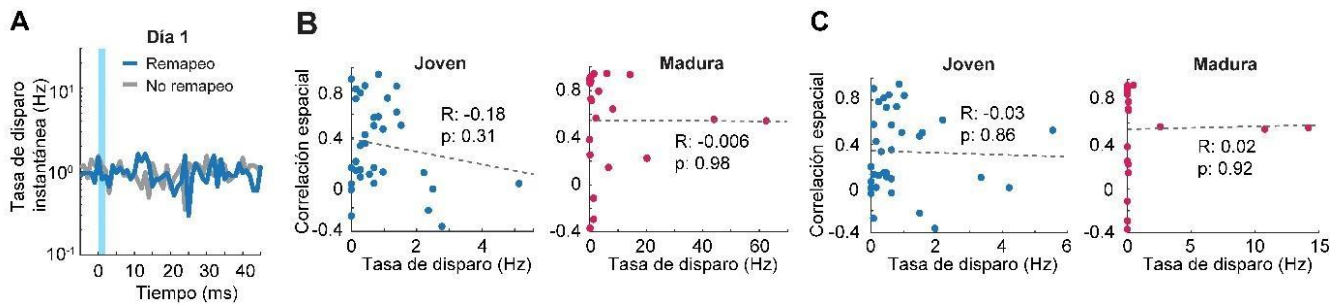


Figura r20 – Los patrones de actividad evocada en CA3 no están relacionados con el remapeo. (A) Actividad evocada media para células Pir de CA3 remapeantes (azul; $n=16$) y no remapeantes (gris; $n=18$) relativa a la estimulación de las CGna jóvenes en el día 1. Comparaciones entre las células remapeantes y no remapeantes (*shuffling*): $p = 0.09$ (ventana temprana), $p = 0.58$ (ventana tardía). (B) Correlación espacial (como en Figura r7) vs. la actividad evocada temprana en el día en las condiciones joven (izquierda) y madura (derecha; coeficientes de la regresión indicados). (C) Mismo que B, pero para la actividad evocada tardía.

El análisis de la relación entre la actividad evocada y el remapeo indicó que no hay una relación directa entre ambos. A nivel de las células individuales de CA3, por lo tanto, el remapeo no fue predicho por la respuesta a la estimulación. Decidimos entonces analizar detalladamente la evolución de dicha respuesta a lo largo de los días de experimento en busca de una relación a nivel poblacional de CA3. Comparada con el día 1, la actividad total evocada por las CGna jóvenes varió sustancialmente en los días siguientes, mostrando un cambio varias veces mayor en el reclutamiento de células Pir (Figura r21A a C). En contraste, la proporción de células Pir reclutadas en la condición madura fue alta desde el inicio y no mostró cambios significativos a lo largo de los días.

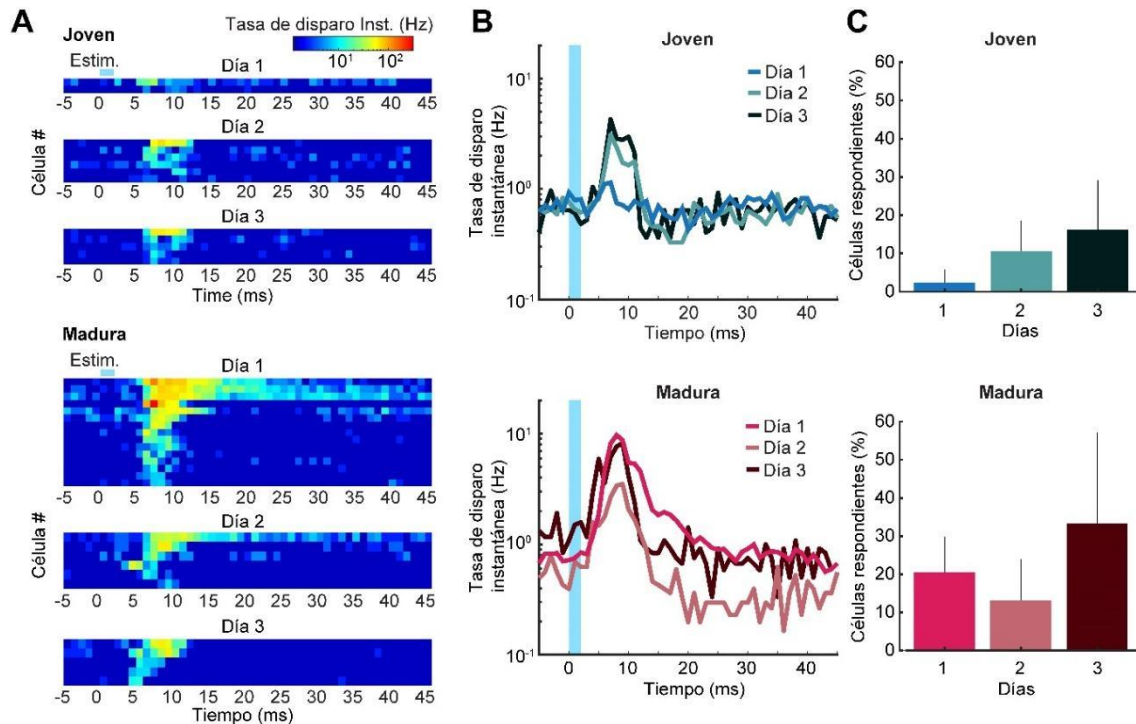


Figura r21 – Marcado incremento en el reclutamiento de células en CA3 como consecuencia de la primera estimulación de las CGna jóvenes. (A) Mapas de calor de la actividad evocada para todas las células Pir responsivas a lo largo de los días (subpaneles; una célula por fila) en la condición joven (arriba, 13 células) o madura (abajo, 26 células). (B) Actividad evocada promediada para todas las células Pir a lo largo de los días (código de color) en las condiciones joven (arriba; $n=82$, 57 & 31) o madura (abajo; $n=73$, 38 & 15). Comparaciones de la respuesta temprana en la condición joven para los días 1 vs. 2: $p = 0.04$, días 1 vs. 3 $p = 0.03$; comparaciones en la condición de células maduras: $p > 0.26$ (*shuffling*). (C) Porcentaje de células Pir responsivas a lo largo de los días en las condiciones joven (arriba; $n=2/82$, 6/57 & 5/31) y madura (abajo; $n=15/73$, 6/38 & 5/15). Test de Kruskal-Wallis: joven $p = 0.03$, madura $p = 0.25$. Diferencias con el día 1 en la condición joven: día 2 $p = 0.08$, día 3 $p = 0.02$ (Test post hoc de Dunn).

De manera atinente al hallazgo de diferencias generales entre los segmentos de CA3, en la porción distal sólo en la condición madura se observó un patrón de respuesta análogo al de la porción proximal a lo largo de los días (Figura r22A y B).

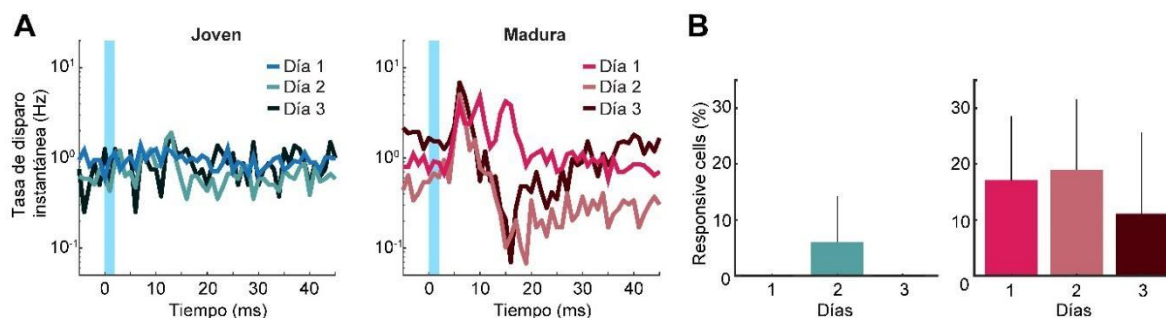


Figura r22 – Las CGna jóvenes no reclutan actividad en CA3 distal a lo largo de los días. (A) Actividad evocada promediada para todas las células Pir a lo largo de los días (código de color) en las condiciones joven (izquierda, 88 células) o madura (derecha, 98 células). Comparaciones de la respuesta temprana los días 1 vs. 2 y días 1 vs. 3 en ambas condiciones: $p > 0.19$ (*shuffling*). **(B)** Porcentaje de células Pir responsivas a lo largo de los días en las condiciones joven (izquierda) y madura (derecha). Test de Kruskal-Wallis: joven $p = 0.17$, madura $p = 0.76$.

R.4.1 Conclusiones parciales

Tomados colectivamente, los resultados de esta sección refuerzan la hipótesis de la existencia de una asociación indirecta entre la estimulación de las CGna jóvenes y el remapeo. El gran incremento en la responsividad postsináptica en la condición joven a lo largo de los días sugiere que un extenso remodelado sináptico y reticular tuvo lugar después de la primera estimulación de CGna. Así, la relación inversa entre la presencia de actividad evocada y el remapeo indicaría que la reorganización de los mapas de CA3 dependió de cambios que no son consecuencia directa del disparo de sus células. Estos cambios podrían haber desenmascarado procesos subumbrales, como ha sido sugerido en otra parte (Milstein et al., 2021; McKenzie et al., 2021).

Discusión

D.1 Las CGn jóvenes poseen un potencial único para remodelar los circuitos de CA3

Nuestros resultados muestran que la estimulación de un número relativamente pequeño de CGna jóvenes puede inducir extensas modificaciones en la red de CA3. Como producto de la primera estimulación, las CGna jóvenes fueron capaces de desestabilizar y reorganizar los mapas espaciales de CA3. Esta capacidad se perdió en menos de 24 hs., momento en el cual estas CGna comenzaron a exhibir un aumento sustancial en el reclutamiento postsináptico. El remapeo sugiere que las CGna jóvenes inducen el remodelado de los circuitos postsinápticos de manera dependiente de la actividad, posiblemente como un reflejo de los altos niveles de excitabilidad y plasticidad sináptica característicos del período crítico que atraviesan (Ge et al., n.d.; Gu et al., 2012; Marín-Burgin et al., 2012a; Schmidt-Hieber et al., 2004). La constatación de la naturaleza dinámica de la eficacia de las CGnas para remodelar su principal output propicia un mayor entendimiento acerca de su rol en el procesamiento de información en el hipocampo (Kropff et al., 2015). Nuestros resultados sugieren una conexión entre la demanda de nuevas representaciones en CA3 dependiente de la experiencia y la provisión continua de nuevas neuronas, proceso que las volvería una fuente irremplazable de plasticidad.

D.2 Actividad de las células de CA3 evocada por las CGna jóvenes y maduras

Como se indicó en la introducción, un gran número de estudios *ex vivo* han sido realizados con el fin de entender las propiedades de la sinapsis entre las fibras musgosas (*mossy fibers*) y las células de CA3. Pocos estudios, en cambio, abordaron dicha sinapsis *in vivo* (Gu et al., 2012; Henze et al., 2002; J. Lee et al., 2019; S. B. McHugh et al., 2022; Zucca et al., 2017), y entre éstos sólo uno investigó la influencia diferencial de las CGna jóvenes y maduras en ratones anestesiados (Gu, et al., 2012). Nuestro trabajo en ratones de movilidad libre apunta a la existencia de algunas semejanzas y muchas diferencias entre las CGna jóvenes y maduras y su conexión con CA3, muchas de las cuales están en línea con la literatura previa.

Nuestros resultados muestran que a pesar de que las CGna maduras reclutaron valores más altos de actividad en el nivel poblacional, ambas cohortes indujeron respuestas similares a nivel de las células transientes individuales. Este efecto podría ser explicado por hallazgos *ex vivo* que describen un tamaño similar en las corrientes post-sinápticas evocadas por CGs de

ambas edades (Temprana et al., 2016). Así, aunque las CGna maduras activan más células de CA3, ambas cohortes activan estas células de forma semejante.

Entre los días 1 y 3 el número de células reclutadas en la condición joven aumentó varias veces, mientras que en la condición madura no varió significativamente, manteniéndose a un nivel superior a los valores encontrados en la condición joven. Este cambio en la conectividad sináptica podría deberse a que las CGna jóvenes exhiben mayores niveles de plasticidad de largo plazo río abajo (Gu, et al., 2012). No obstante, una diferencia importante entre un hallazgo y otro es que los efectos observados en nuestro caso se encuentran en el orden de los días, mientras que los relacionados con la potenciación a largo plazo fueron evaluados en el orden de las horas. Por esta razón, esta posibilidad debe ser considerada prudentemente. El análisis de actividad a lo largo del tren de estimulación mostró niveles altos de plasticidad de corto plazo en las células piramidales de CA3. En las células de la condición joven se observó un aumento en el nivel de respuesta con cada pulso que alcanzó 6 veces su tamaño al final del tren. Mientras tanto, las células de la condición madura exhibieron una respuesta grande desde el principio del tren, que sólo cambió significativamente en los primeros pulsos. Henze y colegas reportaron que la estimulación eléctrica (100 Hz) de CGs *in vivo* indujo un incremento en la probabilidad de respuesta de las piramidales de CA3 cuantos más disparos realizaba la CG estimulada (Henze et al., 2002). Un efecto análogo al hallado a lo largo del tren. Nuestros resultados no sólo muestran efectos a frecuencias menores (4 y 20 Hz) para la estimulación de CGna jóvenes y maduras, sino también variaciones en la respuesta en las células de disparo rápido. De nuevo, diferencias metodológicas (estimulación eléctrica vs. óptica) desaconsejan una comparación directa entre resultados.

D.3 Inducción artificial de la reorganización de mapas espaciales en el hipocampo

La reorganización observada en los mapas espaciales de CA3 incluyó cambios que están en la misma línea que otros vistos luego de manipulaciones experimentales similares: 1) la desaparición de campos receptivos espaciales (Dragoi et al., 2003; Milstein et al., 2021); 2) la emergencia de nuevos campos (Dragoi et al., 2003; Lee et al., 2012; Diamantaki et al., 2015; Lee et al., 2019; McKenzie et al., 2021); y 3) la deriva de éstos de un lugar a otro (Miao et al., 2015; Milstein et al., 2021; McKenzie et al., 2021). Además, tal como también fue observado en otros trabajos, algunos de estos cambios fueron ostensibles instantáneamente, ya en la sesión de estimulación (Miao et al., 2015; Lee et al., 2019; Milstein et al., 2021), mientras que

otros se volvieron evidentes de manera diferida, en la sesión post-estimulación (McKenzie et al., 2021). Esto está en línea con la variabilidad observada en nuestro trabajo en la correlación entre mapas del día 2 y mapas del día 1 post-estimulación.

Nuestros resultados no muestran una relación directa del remapeo con los sitios de estimulación o la actividad evocada. Un patrón similar fue observado con la estimulación de células de CA1 en un *linear track* (McKenzie et al., 2021). Particularmente, nuestros resultados muestran que, a pesar del aumento transitorio en la tasa de disparo de las células de CA3 en los bins espaciales estimulados, estos bins no pertenecieron necesariamente a los del campo de lugar derivado del remapeo. Tampoco observamos una correlación entre la actividad evocada y la reorganización de los mapas, siendo las células remapeantes de CA3 prácticamente no respondientes a los estímulos que originaron el remapeo. Por lo tanto, parece razonable suponer que los cambios en los mapas de CA3 obedecieron al desenmascaramiento de una actividad subumbral preexistente, más que a la asociación arbitraria entre un input espacial y la actividad postsináptica resultante de una manipulación artificial, como ha sido propuesto en otra parte (Milstein et al., 2021; McKenzie et al., 2021).

D.4 Efectos proximales

Los efectos que las CGNa jóvenes tuvieron tanto en la actividad evocada en CA3 como en la reorganización de sus mapas espaciales estuvieron restringidos a la porción proximal de CA3. Consistentemente con estos hallazgos se ha observado un decaimiento en el remapeo a lo largo del eje CA3-CA2 en ratas, ya sea producto de modificaciones en una arena abierta (Lu et al., 2015) o como producto de un conflicto entre claves cercanas y distantes en una arena circular (Lee et al., 2015). Con el propósito de dar cuenta de esta disociación entre las porciones proximal y distal de CA3, distintas propiedades de la red GD-CA3 han sido invocadas en la literatura y podrían explicar los cambios que observamos en nuestras manos: 1) CA3 distal y proximal son inervados por células granulares cuyos axones viajan mayormente de forma transversal de distintas partes del GD (capas superior e inferior, respectivamente) y sólo las fibras musgosas que alcanzan CA3 proximal contactan profundo a ambos lados de la capa piramidal (Witter, 2007); 2) la red de colaterales recurrentes es más profusa en CA3 distal que proximal, favoreciendo sus propiedades asociativas o de completación de patrones (Lee et al., 2015; Lu et al., 2015); 3) los aferentes provenientes de la corteza entorrinal (CE) serían más débiles en la porción proximal de CA3 que en la distal (Witter, 2007); 4) se ha

propuesto que el GD y CA3 proximal conforman una unidad funcional, cuyas células principales (CG, CM y las piramidales de CA3) comparten patrones de disparo con la CE lateral probablemente asociados a la discriminación de estímulos (Goodsmith et al., 2019). En su conjunto, estas propiedades de la red GD-CA3 contribuirían a la explicación de las diferencias que observamos entre las células piramidales proximales y distales respecto del remapeo.

D.5 Separación de patrones

El GD ha sido propuesto como un jugador fundamental en la formación de memorias debido a su rol en la ortogonalización de estímulos similares a través de la separación de patrones (I. Lee & Kesner, 2004; Rolls, 2016; Treves et al., 2008). En línea con esta idea, distintos trabajos han mostrado que la manipulación de las CGna puede afectar positiva o negativamente el rendimiento en distintas tareas que requieren de la discriminación de estímulos (Clelland et al., 2009; Luna et al., 2019; Nakashiba et al., 2012; Scobie et al., 2009; Tronel et al., 2012). Las CGna podrían entonces influir en la capacidad de CA3 para producir patrones de actividad distintos para codificar estímulos similares. Al menos en el dominio del procesamiento de información espacial, este proceso implicaría la reorganización de mapas espaciales o remapeo, según ha sido indicado muchas veces (Colgin et al., 2008; Hainmueller & Bartos, 2020a; Knierim & Neunuebel, 2016; J. K. Leutgeb et al., 2007a; E. I. Moser et al., 2008). En otras palabras, la separación de patrones equivale a la representación de ambientes similares por mapas distintos.

Desde la perspectiva del modelo clásico, la separación de patrones ha sido concebida por décadas como la resultante de la expansión del código proveniente de la corteza entorrinal, debido al mayor número y actividad dispersa de las CGs (Marr, 1971; Treves et al., 2008). De este modo, inputs similares serían codificados por poblaciones independientes de CGs, redundando en la formación de atractores de actividad distintos en la red autoasociativa de CA3 río abajo (Leutgeb et al., 2007; Knierim y Neunuebel, 2016; Rolls, 2016). Sin embargo, diversas fuentes recientes de evidencia sugieren que este no sería el caso, y que la formación de representaciones en CA3 no requeriría de diferencias masivas en el código poblacional río arriba (van Dijk and Fenton, 2018; GoodSmith et al., 2017, 2019; Hainmueller y Bartos, 2018, 2020; Senzai and Buzsáki, 2017). Estos trabajos coinciden en que las CGs del GD exhiben una menor tendencia a remapear que sus vecinas las MC o que las piramidales en CA3 y CA1. Por lo tanto, una alternativa a la interpretación derivada del modelo clásico podría ser que la

representación de estímulos similares en el GD recae en cambios graduales en la actividad de sus CGs y no tanto en conjuntos de células completamente distintos, como ha sido apuntado en otra parte (Hainmueller y Bartos, 2020). Nuestros resultados abren la puerta a una nueva hipótesis que atribuye un rol central y dinámico para las CGna (Kropff et al., 2015). Las CGna podrían entonces estar mediando los cambios en el GD responsables del remapeo en CA3. En esta misma dirección, se mostró que el hipocampo puede generar mapas espaciales de ambientes familiares y novedosos de forma independiente de la información espacial proveniente de la corteza entorrinal medial (Schlesiger et al 2018). Este estudio prueba a través de la lesión de dicha corteza, que la reorganización de los mapas espaciales del hipocampo no es afectada por la ausencia de las aferencias especializadas de la entorrinal medial, a pesar de que su manipulación puede producir remapeo (Kanter et al., 2017; Miao et al., 2015). Nuestros resultados sugieren entonces que tanto la generación de mapas espaciales en el hipocampo como su reorganización podrían estar mediadas por la actividad de las CGna jóvenes del GD, zanjando así la aparente contradicción entre esos resultados.

D.6 Conclusiones

Los resultados presentados en esta tesis proveen evidencia de que las CGna jóvenes poseen un potencial único para remodelar los mapas espaciales de su principal *output*, CA3. Este potencial se agota con el uso y se pierde con la maduración. Además, la eficacia de las CGna jóvenes para inducir remapeo mostró ser inversa a su capacidad para evocar actividad en CA3, lo cual apunta a la existencia de un mecanismo subumbral de desenmascaramiento de actividad preexistente. La diferencia hallada fue debida a cambios relativos a la edad de las CGna mismas, no relacionados a cambios del mismo CA3.

En el nivel poblacional, las CGna maduras reclutaron un mayor número de células de CA3, sobre todo en el primer día de estimulación. Mientras tanto, en el nivel de células individuales, la actividad evocada fue comparable entre las condiciones pero mostró mayor facilitación con la estimulación de las CGna jóvenes, donde creció varias veces su valor inicial. Los cambios en los mapas y la actividad evocada observados entre las células de CA3 de la condición joven son atinentes con el reporte de que las CGna jóvenes son más plásticas que sus pares maduras.

Conjuntamente, nuestros resultados sugieren que la función dinámica de las CGna desplegada a lo largo de su desarrollo tiene un fuerte impacto en el procesamiento de

información espacial de CA3. Las CGna jóvenes podrían entonces constituir mediadores claves en el rol que el GD tiene en la separación de patrones almacenados en CA3.

Glosario

Cornu Ammonis (CA)

Corteza entorrinal (CE)

Corteza entorrinal Medial (CEM)

Corteza entorrinal Lateral (CEL)

Células granulares (CG)

Células granulares nacidas en la adultez (CGna)

Células musgosas (CM)

Dispáro rápido (DR)

Giro dentado (DG)

Piramidal (Pir)

Tamoxifeno (TAM)

REFERENCIAS

- Amaral, D. G., Scharfman, H. E., & Lavenex, P. (2007). *The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies)*.
- Aronov, D., Nevers, R., & Tank, D. W. (2017). *Mapping of a non-spatial dimension by the hippocampal/ entorhinal circuit*. 543(7647), 719–722.
<https://doi.org/10.1038/nature21692.Mapping>
- Bittner, K. C., Grienberger, C., Vaidya, S. P., Milstein, A. D., & John, J. (2015). *Conjunctive input processing drives feature selectivity in hippocampal CA1 neurons*. 18(8), 1133–1142.
- Bittner, K. C., Milstein, A. D., Grienberger, C., Romani, S., & Magee, J. C. (2017). Behavioral time scale synaptic plasticity underlies CA1 place fields. *Science*, 357(6355), 1033–1036.
<https://doi.org/10.1126/science.aan3846>
- Bonaguidi, M. A. (2012). A unifying hypothesis on mammalian neural stem cell properties in the adult hippocampus. *Current Opinion in Neurobiology*, 23(1), 1–7.
<https://doi.org/10.1016/j.conb.2012.03.013.A>
- Brecht, M., Schneider, M., Sakmann, B., & Margrie, T. W. (2004). Whisker movements evoked by stimulation of single pyramidal cells in rat motor cortex. *Nature*, 427(6976), 704–710. <https://doi.org/10.1038/nature02266>
- Cholvin, T., Hainmueller, T., & Bartos, M. (2021). The hippocampus converts dynamic entorhinal inputs into stable spatial maps. *Neuron*, 109(19), 3135–3148.e7.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.09.019>
- Clelland, C. D., Choi, M., Romberg, C., Clemenson, G. D., Fragniere, A., Tyers, P., Jessberger, S., Saksida, L. M., Barker, R. A., Gage, F. H., & Bussey, T. J. (2009). A functional role for adult hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation. *Science*, 325(5937), 210–213. <https://doi.org/10.1126/science.1173215>
- Cohen, J. D., Bolstad, M., & Lee, A. K. (2017). Experience-dependent shaping of hippocampal CA1 intracellular activity in novel and familiar environments. *ELife*, 6, 1–27.
<https://doi.org/10.7554/eLife.23040>
- Colgin, L. L., Moser, E. I., & Moser, M. B. (2008). Understanding memory through hippocampal remapping. *Trends in Neurosciences*, 31(9), 469–477.
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.06.008>

- Creer, D. J., Romberg, C., Saksida, L. M., Van Praag, H., & 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(5), 2367–2372.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0911725107>
- Danielson, N. B. B., Kaifosh, P., Zaremba, J. D. D., Lovett-Barron, M., Tsai, J., Denny, C. A. A., Balough, E. M. M., Goldberg, A. R. R., Drew, L. J. J., Hen, R., Losonczy, A., & Kheirbek, M. A. A. (2016). Distinct Contribution of Adult-Born Hippocampal Granule Cells to Context Encoding. *Neuron*, 90(1), 101–112. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.02.019>
- Diamantaki, M., Coletta, S., Nasr, K., Zeraati, R., Laturus, S., Berens, P., Preston-Ferrer, P., & Burgalossi, A. (2018). Manipulating Hippocampal Place Cell Activity by Single-Cell Stimulation in Freely Moving Mice. *Cell Reports*, 23(1), 32–38.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.031>
- Diamantaki, M., Frey, M., Preston-Ferrer, P., & Burgalossi, A. (2016a). Priming spatial activity by single-cell stimulation in the dentate gyrus of freely moving rats. *Current Biology*, 26(4), 536–541. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.12.053>
- Diamantaki, M., Frey, M., Preston-Ferrer, P., & Burgalossi, A. (2016b). Priming spatial activity by single-cell stimulation in the dentate gyrus of freely moving rats. *Current Biology*, 26(4), 536–541. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.12.053>
- Dieni, C. V., Nietz, A. K., Panichi, R., Wadiche, J. I., & Overstreet-Wadiche, L. (2013). Distinct determinants of sparse activation during granule cell maturation. *Journal of Neuroscience*, 33(49), 19131–19142. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2289-13.2013>
- Dragoi, G., Harris, K. D., & Buzsáki, G. (2003). Place representation within hippocampal networks is modified by long-term potentiation. *Neuron*, 39(5), 843–853.
[https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00465-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00465-3)
- Eichenbaum, H. (2004). Hippocampus: Cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory. *Neuron*, 44(1), 109–120.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.08.028>
- Espósito, M. S., Piatti, V. C., Laplagne, D. A., Morgenstern, N. A., Ferrari, C. C., Pitossi, F. J., & Schinder, A. F. (2005). Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. *Journal of Neuroscience*, 25(44), 10074–10086.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3114-05.2005>
- Faulkner, R. L., Jang, M. H., Liu, X. B., Duan, X., Sailor, K. A., Kim, J. Y., Ge, S., Jones, E. G.,

- Ming, G. L., Song, H., & Cheng, H. J. (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(37), 14157–14162.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0806658105>
- Fyhn, M., Hafting, T., Treves, A., Moser, M. B., & Moser, E. I. (2007). Hippocampal remapping and grid realignment in entorhinal cortex. *Nature*, 446(7132), 190–194.
<https://doi.org/10.1038/nature05601>
- Ge, S., Yang, C., Hsu, K., Ming, G., & Song, H. (n.d.). *A critical period for enhanced synaptic plasticity in newly generated neurons of the adult brain*.
- Ge, S., Yang, C., Hsu, K., Ming, G., & Song, H. (2007). *A critical period for enhanced synaptic plasticity in newly generated neurons of the adult brain*.
- Gilbert, P. E., Kesner, R. P., & Lee, I. (2001). Dissociating hippocampal subregions: A double dissociation between dentate gyrus and CA1. *Hippocampus*, 11(6), 626–636.
<https://doi.org/10.1002/hipo.1077>
- Goodrich-Hunsaker, N. J., Hunsaker, M. R., & Kesner, R. P. (2008). The Interactions and Dissociations of the Dorsal Hippocampus Subregions: How the Dentate Gyrus, CA3, and CA1 Process Spatial Information. *Behavioral Neuroscience*, 122(1), 16–26.
<https://doi.org/10.1037/0735-7044.122.1.16>
- GoodSmith, D., Chen, X., Wang, C., Kim, S. H., Song, H., Burgalossi, A., Christian, K. M., & Knierim, J. J. (2017). Spatial Representations of Granule Cells and Mossy Cells of the Dentate Gyrus. *Neuron*, 93(3), 677-690.e5.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.12.026>
- GoodSmith, D., Lee, H., Neunuebel, J. P., Song, H., & Knierim, J. J. (2019a). Dentate gyrus mossy cells share a role in pattern separation with dentate granule cells and proximal CA3 pyramidal cells. *Journal of Neuroscience*, 39(48), 9570–9584.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0940-19.2019>
- GoodSmith, D., Lee, H., Neunuebel, J. P., Song, H., & Knierim, J. J. (2019b). Dentate gyrus mossy cells share a role in pattern separation with dentate granule cells and proximal CA3 pyramidal cells. *Journal of Neuroscience*, 39(48), 9570–9584.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0940-19.2019>
- Groisman, A. I., Yang, S. M., & Schinder, A. F. (2020). Differential Coupling of Adult-Born Granule Cells to Parvalbumin and Somatostatin Interneurons. *Cell Reports*, 30(1), 202-

- 214.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.12.005>
- Gu, Y., Arruda-Carvalho, M., Wang, J., Janoschka, S. R., Josselyn, S. A., Frankland, P. W., & Ge, S. (2012). Optical controlling reveals time-dependent roles for adult-born dentate granule cells. *Nature Neuroscience*, 15(12), 1700–1706.
<https://doi.org/10.1038/nn.3260>
- Hafting, T., Fyhn, M., Molden, S., Moser, M. B., & Moser, E. I. (2005). Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. *Nature*, 436(7052), 801–806.
<https://doi.org/10.1038/nature03721>
- Hainmueller, T., & Bartos, M. (2018a). Parallel emergence of stable and dynamic memory engrams in the hippocampus. *Nature*, 558(7709), 292–296.
<https://doi.org/10.1038/s41586-018-0191-2>
- Hainmueller, T., & Bartos, M. (2018b). Parallel emergence of stable and dynamic memory engrams in the hippocampus. *Nature*, 558(7709), 292–296.
<https://doi.org/10.1038/s41586-018-0191-2>
- Hainmueller, T., & Bartos, M. (2020a). Dentate gyrus circuits for encoding, retrieval and discrimination of episodic memories. *Nature Reviews Neuroscience*, 21(3), 153–168.
<https://doi.org/10.1038/s41583-019-0260-z>
- Hainmueller, T., & Bartos, M. (2020b). Dentate gyrus circuits for encoding, retrieval and discrimination of episodic memories. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 21, Issue 3, pp. 153–168). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41583-019-0260-z>
- Henze, D. A., Wittner, L., & Buzsáki, G. (2002). Single granule cells reliably discharge targets in the hippocampal CA3 network in vivo. *Nature Neuroscience*, 5(8), 790–795.
<https://doi.org/10.1038/nn887>
- Itskov, V., Curto, C., Pastalkova, E., & Buzsáki, G. (2011). Cell assembly sequences arising from spike threshold adaptation keep track of time in the hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 31(8), 2828–2834. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3773-10.2011>
- Kanter, B. R., Lykken, C. M., Avesar, D., Borgesius, N. Z., Roudi, Y., Kentros, C. G., Borgesius, N. Z., Roudi, Y., & Kentros, C. G. (2017). Article A Novel Mechanism for the Grid-to-Place Cell Transformation Revealed by Transgenic Depolarization of Medial Entorhinal Cortex Layer II Article A Novel Mechanism for the Grid-to-Place Cell Transformation Revealed by Transgenic Depolarization of Med. *Neuron*, 93(6), 1480-1492.e6.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.03.001>

- Keinath, A. T., Nieto-Posadas, A., Robinson, J. C., & Brandon, M. P. (2020). DG–CA3 circuitry mediates hippocampal representations of latent information. *Nature Communications*, *11*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16825-1>
- Knierim, J. J., & Neunuebel, J. P. (2016). Tracking the flow of hippocampal computation: Pattern separation, pattern completion, and attractor dynamics. In *Neurobiology of Learning and Memory* (Vol. 129, pp. 38–49). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2015.10.008>
- Kropff, E., Carmichael, J. E., Moser, M. B., & Moser, E. I. (2015). Speed cells in the medial entorhinal cortex. *Nature*, *523*(7561), 419–424. <https://doi.org/10.1038/nature14622>
- Kropff, E., Yang, S. M., & Schinder, A. F. (2015). Dynamic Role of Adult-Born Dentate Granule Cells in Memory Processing. *Current Opinion in Neurobiology*, *176*(5), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2015.06.002>
- Laplagne, D. A., Espósito, M. S., Piatti, V. C., Morgenstern, N. A., Zhao, C., Van Praag, H., Gage, F. H., & Schinder, A. F. (2006). Functional convergence of neurons generated in the developing and adult hippocampus. *PLoS Biology*, *4*(12), 2349–2360. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040409>
- Latuske, P., Kornienko, O., Kohler, L., & Allen, K. (2018). Hippocampal remapping and its entorhinal origin. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *11*(January), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2017.00253>
- Lee, D., Lin, B. J., & Lee, A. K. (2012a). Hippocampal place fields emerge upon single-cell manipulation of excitability during behavior. *Science*, *337*(6096), 849–853. <https://doi.org/10.1126/science.1221489>
- Lee, D., Lin, B. J., & Lee, A. K. (2012b). Hippocampal place fields emerge upon single-cell manipulation of excitability during behavior. *Science*, *337*(6096), 849–853. <https://doi.org/10.1126/science.1221489>
- Lee, H., Wang, C., Deshmukh, S. S., & Knierim, J. J. (2015). Neural Population Evidence of Functional Heterogeneity along the CA3 Transverse Axis: Pattern Completion versus Pattern Separation. *Neuron*, *87*(5), 1093–1105. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.07.012>
- Lee, I., & Kesner, R. P. (2004). Encoding versus retrieval of spatial memory: Double dissociation between the dentate gyrus and the perforant path inputs into CA3 in the dorsal hippocampus. *Hippocampus*, *14*(1), 66–76. <https://doi.org/10.1002/hipo.10167>

- Lee, J., Yun, M., Cho, E., Lee, J. W., Lee, D., & Jung, M. W. (2019). Transient effect of mossy fiber stimulation on spatial firing of CA3 neurons. *Hippocampus*, 29(7), 639–651. <https://doi.org/10.1002/hipo.23066>
- Leutgeb, J. K., Leutgeb, S., Moser, M. B., & Moser, E. I. (2007a). Pattern separation in the dentate gyrus and CA3 of the hippocampus. *Science*, 315(5814), 961–966. <https://doi.org/10.1126/science.1135801>
- Leutgeb, J. K., Leutgeb, S., Moser, M. B., & Moser, E. I. (2007b). Pattern separation in the dentate gyrus and CA3 of the hippocampus. *Science*, 315(5814), 961–966. <https://doi.org/10.1126/science.1135801>
- Leutgeb, S., Leutgeb, J. K., Barnes, C. A., Moser, E. I., McNaughton, B. L., & Moser, M. B. (2005). Neuroscience: Independent codes for spatial and episodic memory in hippocampal neuronal ensembles. *Science*, 309(5734), 619–623. <https://doi.org/10.1126/science.1114037>
- Lever, C., Burton, S., Jeewajee, A., O’Keefe, J., & Burgess, N. (2009). Boundary vector cells in the subiculum of the hippocampal formation. *Journal of Neuroscience*, 29(31), 9771–9777. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1319-09.2009>
- Lu, L., Igarashi, K. M., Witter, M. P., Moser, E. I., & Moser, M. B. (2015). Topography of Place Maps along the CA3-to-CA2 Axis of the Hippocampus. *Neuron*, 87(5), 1078–1092. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.07.007>
- Luna, V. M., Anacker, C., Burghardt, N. S., Khandaker, H., Andreu, V., Millette, A., Leary, P., Ravenelle, R., Jimenez, J. C., Mastrodonato, A., Denny, C. A., Fenton, A. A., Scharfman, H. E., & Hen, R. (2019). Adult-born hippocampal neurons bidirectionally modulate entorhinal inputs into the dentate gyrus. *Science*, 364(6440), 578–583. <https://doi.org/10.1126/science.aat8789>
- Marín-Burgin, A., Mongiat, L. A., Pardi, M. B., & Schinder, A. F. (2012a). Unique processing during a period of high excitation/inhibition balance in adult-born neurons. *Science*, 335(6073), 1238–1242. <https://doi.org/10.1126/science.1214956>
- Marín-Burgin, A., Mongiat, L. A., Pardi, M. B., & Schinder, A. F. (2012b). Unique Processing During a Period of High Excitation/Inhibition Balance in Adult-Born Neurons. *Science*, 61(6), 515–525. <https://doi.org/10.1126/science.1214956>
- Marr, D. (1971). Simple Memory : a Theory By D . Marr. *Society*, 262(841), 23–81.
- McHugh, S. B., Lopes-dos-Santos, V., Gava, G. P., Hartwich, K., Tam, S. K. E., Bannerman, D.

- M., & Dupret, D. (2022). Adult-born dentate granule cells promote hippocampal population sparsity. *Nature Neuroscience*, 25(11), 1481–1491.
<https://doi.org/10.1038/s41593-022-01176-5>
- McHugh, T. J., Jones, M. W., Quinn, J. J., Balthasar, N., Coppari, R., Elmquist, J. K., Lowell, B. B., Fanselow, M. S., Wilson, M. A., & Tonegawa, S. (2007). Dentate Gyrus NMDA Receptors Mediate Rapid Pattern Separation in the Hippocampal Network. *Science*, 317(5834), 86–94. <https://doi.org/10.1126/science.1139158>
- McKenzie, S., Huszár, R., English, D. F., Kim, K., Christensen, F., Yoon, E., & Buzsáki, G. (2021). *Pre-existing hippocampal network dynamics constrain optogenetically induced place fields*. 109(6), 1040–1054. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.01.011>. Pre-existing
- McKenzie, S., Huszár, R., English, D. F., Kim, K., Christensen, F., Yoon, E., & Buzsáki, G. (2021). Preexisting hippocampal network dynamics constrain optogenetically induced place fields. *Neuron*, 109(6), 1040-1054.e7.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.01.011>
- McNaughton, B. L., & Morris, R. G. M. (1987). Hippocampal synaptic enhancement and information storage. *Trends in Neural Sciences*, 10(10), 408–415.
- Meer, M. A. A. Van Der, Kemere, C., Diba, K., & Kemere, C. (2020). *Progress and issues in second-order analysis of hippocampal replay*.
- Miao, C., Cao, Q., Ito, H. T., Yamahachi, H., Menno, P., Moser, M., Edvard, I., Miao, C., Cao, Q., Ito, H. T., Yamahachi, H., Witter, M. P., & Moser, M. (2015). Hippocampal Remapping after Partial Inactivation of the Medial Entorhinal Cortex Article Hippocampal Remapping after Partial Inactivation of the Medial Entorhinal Cortex. *Neuron*, 88(3), 590–603. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.09.051>
- Milstein, A. D., Li, Y., Bittner, K. C., Grienberger, C., Soltesz, I., Magee, J. C., & Romani, S. (2021). Bidirectional synaptic plasticity rapidly modifies hippocampal representations. *ELife*, 10, 1–29. <https://doi.org/10.7554/eLife.73046>
- Mongiat, L. A., Espósito, M. S., Lombardi, G., & Schinder, A. F. (2009). Reliable activation of immature neurons in the adult hippocampus. *PLoS ONE*, 4(4).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005320>
- Moreno-Jiménez, E. P., Flor-García, M., Terreros-Roncal, J., Rábano, A., Cafini, F., Pallas-Bazarra, N., Ávila, J., & 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(4), 554–560.
<https://doi.org/10.1038/s41591-019-0375-9>
- Mori, M., Abegg, M. H., & Gerber, U. (2004). A frequency-dependent switch from inhibition to excitation in a hippocampal unitary circuit. www.nature.com/nature
- Mori, M., Gähwiler, B. H., & Gerber, U. (2007). Recruitment of an inhibitory hippocampal network after bursting in a single granule cell. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(18), 7640–7645.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0702164104>
- Morris, A. M., Churchwell, J. C., Kesner, R. P., & Gilbert, P. E. (2012). Selective lesions of the dentate gyrus produce disruptions in place learning for adjacent spatial locations. *Neurobiology of Learning and Memory*, 97(3), 326–331.
<https://doi.org/10.1016/j.nlm.2012.02.005>
- Moser, E. I., Kropff, E., & Moser, M. B. (2008). Place cells, grid cells, and the brain's spatial representation system. In *Annual Review of Neuroscience* (Vol. 31, pp. 69–89).
<https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.31.061307.090723>
- Moser, M. B., Rowland, D. C., & Moser, E. I. (2015). Place cells, grid cells, and memory. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(2).
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021808>
- Muller, R. U., & Kubie, J. L. (1987). The effects of changes in the environment on the spatial firing of hippocampal complex-spike cells. *Journal of Neuroscience*, 7(7), 1951–1968.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.07-07-01951.1987>
- Nakashiba, T., Cushman, J. D., Pelkey, K. A., Renaudineau, S., Buhl, D. L., McHugh, T. J., Barrera, V. R., Chittajallu, R., Iwamoto, K. S., McBain, C. J., Fanselow, M. S., & Tonegawa, S. (2012). Young dentate granule cells mediate pattern separation, whereas old granule cells facilitate pattern completion. *Cell*, 149(1), 188–201.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.046>
- Neunuebel, J. P., & Knierim, J. J. (2014). CA3 Retrieves Coherent Representations from Degraded Input: Direct Evidence for CA3 Pattern Completion and Dentate Gyrus Pattern Separation. *Neuron*.
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2013.11.017>
- O'Keefe, J., & Dostrovsky, J. (1971). Short Communications The hippocampus as a spatial map . Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Research*,

- 34(1), 171–175. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5124915>
- O'Mara, S. (2005). The subiculum: What it does, what it might do, and what neuroanatomy has yet to tell us. *Journal of Anatomy*, 207(3), 271–282. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2005.00446.x>
- Piatti, V. C., Ewe, L. A., & Leutgeb, J. K. (2013). Neurogenesis in the dentate gyrus: Carrying the message or dictating the tone. *Frontiers in Neuroscience*, 7(7 APR), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fnins.2013.00050>
- Restivo, L., Niibori, Y., Mercaldo, V., Josselyn, S. A., & Frankland, P. W. (2015). Development of adult-generated cell connectivity with excitatory and inhibitory cell populations in the hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 35(29), 10600–10612. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3238-14.2015>
- Rickgauer, J. P., Deisseroth, K., & Tank, D. W. (2014). Simultaneous cellular-resolution optical perturbation and imaging of place cell firing fields. *Nature Neuroscience*, 17(1), 139–148. <https://doi.org/10.1038/nn.3866>. Simultaneous
- Rolls, E. T. (2016). Pattern separation, completion, and categorisation in the hippocampus and neocortex. *Neurobiology of Learning and Memory*, 129, 4–28. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2015.07.008>
- Sahay, A., Scobie, K. N., Hill, A. S., O'Carroll, C. M., Kheirbek, M. A., Burghardt, N. S., Fenton, A. A., Dranovsky, A., & René Hen. (2011). Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. *Nature*, 472(7344), 466–470. <https://doi.org/10.1038/nature09817>. Increasing
- Salin, P. A., Scanziani, M., Malenka, R. C., & Nicoll, R. A. (1996). Distinct short-term plasticity at two excitatory synapses in the hippocampus. In *Neurobiology* (Vol. 93).
- Sargolini, F., Fyhn, M., Hafting, T., McNaughton, B. L., Witter, M. P., Moser, M. B., & Moser, E. I. (2006). Conjunctive representation of position, direction, and velocity in entorhinal cortex. *Science*, 312(5774), 758–762. <https://doi.org/10.1126/science.1125572>
- Sasaki, T., Piatti, V. C., Hwaun, E., Ahmadi, S., Lisman, J. E., Leutgeb, S., & Leutgeb, J. K. (2018). Dentate network activity is necessary for spatial working memory by supporting CA3 sharp-wave ripple generation and prospective firing of CA3 neurons. *Nature Neuroscience*, 21(2), 258–269. <https://doi.org/10.1038/s41593-017-0061-5>
- Savelli, F., Yoganarasimha, D., & Knierim, J. J. (2008). Influence of boundary removal on the spatial representations of the medial entorhinal cortex. *Hippocampus*, 23(1), 237–337.

- <https://doi.org/10.1002/hipo.20511>.Influence
- Scharfman, H. E. (2016). The enigmatic mossy cell of the dentate gyrus. *Nature Reviews Neuroscience*, 17(10), 139–148. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.87>.The
- Schlesiger, M. I., Boubilil, B. L., Hales, J. B., Leutgeb, J. K., Leutgeb, S., Schlesiger, M. I., Boubilil, B. L., Hales, J. B., Leutgeb, J. K., & Leutgeb, S. (2018). Hippocampal Global Remapping Can Occur without Input from the Medial Entorhinal Cortex Report Hippocampal Global Remapping Can Occur without Input from the Medial Entorhinal Cortex. *CellReports*, 22(12), 3152–3159. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.02.082>
- Schmidt-Hieber, C., Jones, P., & Bischofberger, J. (2004). Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature*, 429(6988), 184–187. <https://doi.org/10.1038/nature02553>
- Scobie, K. N., Hall, B. J., Wilke, S. A., Klemenhausen, K. C., Fujii-Kuriyama, Y., Ghosh, A., Hen, R., & Sahay, A. (2009). Krüppel-like factor 9 is necessary for late-phase neuronal maturation in the developing dentate gyrus and during adult hippocampal neurogenesis. *Journal of Neuroscience*, 29(31), 9875–9887. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2260-09.2009>
- Senzai, Y., & Buzsáki, G. (2017). Physiological Properties and Behavioral Correlates of Hippocampal Granule Cells and Mossy Cells. *Neuron*, 93(3), 691-704.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.12.011>
- Sorrells, S. F., Paredes, M. F., Cebrian-Silla, A., Sandoval, K., Qi, D., Kelley, K. W., James, D., Mayer, S., Chang, J., Augustine, K. I., Chang, E. F., Gutierrez, A. J., Kriegstein, A. R., Mathern, G. W., Oldham, M. C., Huang, E. J., Garcia-Verdugo, J. M., Yang, Z., & Alvarez-Buylla, A. (2018). Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults. *Nature*, 555(7696), 377–381. <https://doi.org/10.1038/nature25975>
- Spalding, K. L., Bergmann, O., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Huttner, H. B., Boström, E., Westerlund, I., Vial, C., Buchholz, B. A., Possnert, G., Mash, D. C., Druid, H., & Frisén, J. (2013). Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell*, 153(6), 1219. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.002>
- Stark, E., Koos, T., & Buzsáki, G. (2012). Diode probes for spatiotemporal optical control of multiple neurons in freely moving animals. *Journal of Neurophysiology*, 108(1), 349–363. <https://doi.org/10.1152/jn.00153.2012>

- Stone, S. S. D., Teixeira, C. M., de Vito, L. M., Zaslavsky, K., Josselyn, S. A., Lozano, A. M., & Frankland, P. W. (2011). Stimulation of entorhinal cortex promotes adult neurogenesis and facilitates spatial memory. *Journal of Neuroscience*, 31(38), 13469–13484.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3100-11.2011>
- Sun, C., Yang, W., Martin, J., & Tonegawa, S. (2020). Hippocampal neurons represent events as transferable units of experience. *Nature Neuroscience*, 23(5), 651–663.
<https://doi.org/10.1038/s41593-020-0614-x>
- Sun, G. J., Sailor, K. A., Mahmood, Q. A., Chavali, N., Christian, K. M., Song, H., & Ming, G. L. (2013). Seamless reconstruction of intact adult-born neurons by serial end-block imaging reveals complex axonal guidance and development in the adult hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 33(28), 11400–11411.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1374-13.2013>
- Temprana, S. G., Mongiat, L. A., Yang, S. M., Trinchero, M. F., Alvarez, D. D., Kropff, E., Giacomini, D., Beltramone, N., Lanuza, G. M., & Schinder, A. F. (2015). Delayed Coupling to Feedback Inhibition during a Critical Period for the Integration of Adult-Born Granule Cells. *Neuron*, 85(1), 116–130.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.11.023>
- Toni, N., Laplagne, D. A., Zhao, C., Lombardi, G., Charles, E., Gage, F. H., & Schinder, A. F. (2008). *NIH Public Access*. 11(8), 901–907. <https://doi.org/10.1038/nn.2156>. Neurons
- Toth, K., Soares, G., Lawrence, J. J., Philips-tansey, E., & McBain, C. J. (2000). *Differential Mechanisms of Transmission at Three Types of Mossy Fiber Synapse*. 20(22), 8279–8289.
- Treves, A., Tashiro, A., Witter, M. P., & Moser, E. I. (2008). *FOREFRONT REVIEW WHAT IS THE MAMMALIAN DENTATE GYRUS GOOD FOR ?* 154, 1155–1172.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.04.073>
- Tronel, S., Belnoue, L., Grosjean, N., Revest, J. M., Piazza, P. V., Koehl, M., & Abrous, D. N. (2012). Adult-born neurons are necessary for extended contextual discrimination. *Hippocampus*, 22(2), 292–298. <https://doi.org/10.1002/hipo.20895>
- Tsao, A., Moser, M., & Moser, E. I. (2013). Report Traces of Experience in the Lateral Entorhinal Cortex. *Current Biology*, 23(5), 399–405.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.01.036>
- van Dijk, M. T., & Fenton, A. A. (2018). On How the Dentate Gyrus Contributes to Memory

- Discrimination. *Neuron*, 98(4), 832-845.e5.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.04.018>
- Vyleta, N. P., Borges-merjane, C., & Jonas, P. (2016). *Plasticity-dependent , full detonation at hippocampal mossy fiber – CA3 pyramidal neuron synapses*. 1–12.
<https://doi.org/10.7554/eLife.17977>
- Witter, M. P. (2007). Intrinsic and extrinsic wiring of CA3: Indications for connectional heterogeneity. In *Learning and Memory* (Vol. 14, Issue 11, pp. 705–713).
<https://doi.org/10.1101/lm.725207>
- Witter, M. P., Canto, C. B., Couey, J. J., Koganezawa, N., & O'Reilly, K. C. (2014). Architecture of spatial circuits in the hippocampal region. In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* (Vol. 369, Issue 1635). Royal Society.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0515>
- Yamahachi, H., Menno, P., Moser, M., Edvard, I., Miao, C., Cao, Q., Ito, H. T., Yamahachi, H., Witter, M. P., & Moser, M. (2015). Hippocampal Remapping after Partial Inactivation of the Medial Entorhinal Cortex Article Hippocampal Remapping after Partial Inactivation of the Medial Entorhinal Cortex. *Neuron*, 88(3), 590–603.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.09.051>
- Yang, S. M., Alvarez, D. D., & Schinder, A. F. (2015). Reliable genetic labeling of adult-born dentate granule cells using ascl1CreERT2 and glastCreERT2 murine lines. *Journal of Neuroscience*, 35(46), 15379–15390. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2345-15.2015>
- Zhao, C., Deng, W., & Gage, F. H. (2008). Mechanisms and Functional Implications of Adult Neurogenesis. *Cell*, 132(4), 645–660. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.033>
- Zucca, X. S., Griguoli, X. M., Male, X. M., Carta, X. M., & Mulle, X. C. (2017). *Control of Spike Transfer at Hippocampal Mossy Fiber Synapses In Vivo by GABA A and GABA B Receptor-Mediated Inhibition*. 37(3), 587–598.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2057-16.2016>