



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Circuitos neuronales involucrados en la representación cortical de olores y su plasticidad

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

Lic. Olivia Pedroncini

Directora de tesis: Dra. Antonia Marín Burgin

Codirectora de tesis: Dra. Noel Federman

Consejero de Estudios: Dr. Arturo Romano

Lugar de Trabajo: Instituto de Investigación en Biomedicina de Buenos Aires - CONICET- Instituto Partner de la Sociedad Max Planck

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 2023

Resumen

Título: “Circuitos neuronales involucrados en la representación cortical de olores y su plasticidad”

Palabras clave: olfacción, corteza piriforme, circuitos neuronales, plasticidad, corteza entorrinal lateral.

Este trabajo de tesis tiene como marco general comprender cómo el procesamiento olfativo puede ser modulado por la experiencia. En particular, estudiamos la plasticidad de la representación cortical de olores asociada a un aspecto específico de la experiencia sensorial: el contexto espacial en el que se presentan los estímulos. Nos focalizamos en la interacción de la corteza piriforme (PC), región más extensa de la corteza olfativa, con aferencias provenientes de áreas cerebrales de alto nivel de integración como la corteza entorrinal lateral (LEC), donde se procesa información relacionada con el contexto espacial.

Por un lado, estudiamos las proyecciones de neuronas excitatorias de la LEC hacia distintas poblaciones de neuronas que conforman el microcircuito de la PC, tanto a nivel anatómico como funcional. Para esto realizamos registros electrofisiológicos en una preparación *ex vivo* de rodajas de cerebro de ratón y medimos tanto corrientes como potenciales evocados por la activación optogenética de las terminales de la LEC. Encontramos que tanto las neuronas piramidales superficiales y las interneuronas inhibitorias *Parvalbumin+* reciben en su mayoría conexiones sinápticas directas de la LEC. Además, estas dos poblaciones neuronales responden con un balance excitación-inhibición positivo a lo largo de un tren de estimulación de la LEC. Por el contrario, las neuronas piramidales profundas y las interneuronas inhibitorias *Somatostatin+* reciben menor proporción de contactos directos desde la LEC y responden con un balance negativo a lo largo del tren de estimulación. Estos efectos diferenciales sobre las poblaciones exploradas sugieren una reorganización de las entradas y salidas en el sistema de la PC dada por la activación de la LEC.

Por otra parte, con el fin de estudiar la contribución de la LEC en el procesamiento de olores *in vivo*, llevamos a cabo una serie de experimentos comportamentales en los que inactivamos bilateralmente la LEC durante una tarea GO/No-GO que involucra asociaciones entre olores y contextos espaciales. Hicimos uso de dos estrategias de silenciamiento (farmacología y quimiogenética) y en ambos casos observamos que al inhibir la LEC, la discriminación de contextos espaciales y, en menor medida, la discriminación de olores, se vieron afectadas. Estas observaciones sugieren que la LEC resulta necesaria para resolver una tarea en la que el animal debe discriminar a un mismo olor encontrado en contextos espaciales diferentes.

Abstract

Title: “Neuronal circuits involved in the representation of odors and its plasticity”

Keywords: olfaction, piriform cortex, neuronal circuits, plasticity, lateral entorhinal cortex.

The general framework of this thesis work is to understand how experience modulates olfactory processing. In particular, we study the plasticity involved in the cortical representations of odors associated with a specific aspect of the sensory experience: the spatial context in which the stimuli are presented. We focus on the interaction of the Piriform Cortex (PC) -the largest region of the olfactory cortex- with afferent inputs arriving from higher-order brain areas such as the Lateral Entorhinal Cortex (LEC) in which contextual information is processed.

On the one hand, we studied the projections of LEC excitatory neurons onto different populations of PC neurons – both at an anatomical and functional level-. For this, we performed electrophysiological recordings in an *ex vivo* preparation of mouse brain slices and measured both currents and potentials evoked by the optogenetic stimulation of LEC projections. We found that most of superficial pyramidal neurons and Parvalbumin+ interneurons receive direct synaptic connections from the LEC. Moreover, these two neuronal populations respond with a positive excitation to inhibition balance along a LEC train stimulation. On the contrary, deep pyramidal neurons and *Somatostatin*+ interneurons receive less proportion of direct inputs from LEC and respond with a negative balance along the stimulation train. This differential effect on the populations that we studied, suggest a re-organization of inputs and outputs of the PC network given by the activation of LEC.

On the other hand, in order to assess the contribution of LEC in the olfactory processing *in vivo*, we performed behavioral experiments in which we silenced LEC bilaterally during a GO/No-GO task that involves associations between odors and spatial contexts. We tried two different inactivation strategies- pharmacology and chemogenetics- and in both cases, we observed that during LEC silencing, context discrimination and -to some extent - odor discrimination, were affected. These observations suggest that LEC is necessary to solve a task in which the animal must discriminate the same odor in different spatial contexts.

Agradecimientos

A mis increíbles directoras, Anto y Noe, infinitamente. Por ser verdaderos modelos a seguir, como científicas, como mujeres, como personas. Por la enorme generosidad, la paciencia y la confianza. Gracias por todo lo que aprendí de ustedes.

A Anto por recibirme en el grupo. Por abrirme muchísimas puertas, desde las más concretas invirtiendo en mi formación, hasta las menos tangibles mostrándome los caminos posibles en la carrera académica e inspirando confianza y optimismo acerca de lo que fuimos construyendo. Gracias por la fortaleza y convicción que transmiten tu forma de ser.

A Noe, por toda la dedicación y amor con el que me enseñaste a trabajar en el laboratorio. Por invadir de alegría el ambiente. Por las reflexiones académicas y no académicas. Gracias por inspirar fascinación por esto que estudiamos y ganas de seguir haciendo y aprendiendo, siempre.

Gracias también al resto del labo Marin Burgin. Por el trabajo en equipo, por la buena predisposición para bancar al otro. Gracias por hacer del día a día una experiencia mejor, porque trabajar en compañía de amigos es mucho más fácil y mucho más lindo. A Seba Romano, por toda la ayuda de código y análisis. Por haber fundado la biblioteca DJ Roumani y la lista de reproducción Neuroñoquis, que he usufructuado asiduamente. A Solchu, por las incansables ganas de ayudar y por toda la organización aportada al grupo. A Macky, por sentar las bases comportamentales y por todas las innovaciones materiales y logísticas. A Lucca: para pasarla para nada mal al trabajar, saca trabas a las palabras para armar la batata. A Juli, un ángel caído del cielo, por todo tu trabajo que nos sacó una buena mochila de encima. A Giulia, por acompañar todos esos almuerzos pandémicos en la plaza. También a Mora, por haberme instruido en los primeros pasos del patch-clamp.

Al resto de la gran familia neuro. A Nara, por toda su sabiduría de puller que me ha salvado en varias ocasiones. Por ser tan generosa y tan dulce. A Damián, por las incontables cartas de recomendación. También por obligarnos a pensar la ciencia en su contexto.

A las grandes amistades que me deja este doctorado. A Flor, que me ha guiado en cada vericuetto administrativo habido y por haber. Pero, sobre todo, por ser desde el principio la cara familiar que tuve cerca, por compartir todo el remolino emocional que implicó esta etapa. Por las infinitas iniciativas para pensar y mejorar nuestras formas de hacer ciencia en este país. A Jero, por los chistes, por los juegos, por la complicidad de silbidos. Por llenar de jolgorio nuestras jornadas laborales. También por mostrarme otro espacio de formación y reflexión con el que he crecido mucho. A Iva, por sobrellevar juntas, de principio a fin, todas las dificultades con las que nos fuimos encontrando. Por tantas charlas de desahogo y distensión, que hicieron menos solitario el camino. También por los tererés y los videos de animalitos. A Diego, mi amigo sigiloso, por incursionarme en los primeros pasos por la mesada (aunque parezca mentira), por las jornadas de patcheo compartidas y por las clases de Python.

Al resto de los integrantes de los grupos Muraro y Refojo, que están y que estuvieron. A Seba Giusti, por su incansable devoción para enseñar, por su paciencia y generosidad. A Anita, por tantas horas de charla y compañía que me regaló en el setup. A Raque, por todos los cuentos y todo el entusiasmo. A Pedro, por hacer equipo en el horario nocturno y también, como no decirlo, por los mates más ricos. A Agus, por las recomendaciones literarias. A Cami, por los pasos karatecas. A Lali, Nati, Mari, Carol que sumaron también con sus amuletos, sus anécdotas, sus hermosas PCRs, al bienestar grupal.

A Ale y Cora, y todo el personal técnico y administrativo del IBioBA.

Gracias a Azu, mi compañera favorita de andanzas académicas. Por atravesar tantos años de desafíos juntas. Por bancarnos siempre en todas. Por la pasión contagiosa con la que compartís el conocimiento que te entusiasma. Qué suerte inmensa que tuve de tenerte cerca en esto.

A Ale, otro gran amigo de andanzas neurocientíficas. Por conectarme con lo divertido e intrigante de la biología. Por hacer que todo parezca un juego. Qué bueno que abandonaste la búsqueda de pepitas de oro y te sumaste a este quipo.

A la Red de Estudiantes en Neurociencia, una hermosa iniciativa de formación, contención y organización, que vimos nacer, crecer enormemente y que queda en muy buenas manos.

A mis amigxs de la facultad, con lxs que empezó todo y fueron el impulso para entrar y seguir en el camino científico.

A todxs aquillxs que desde otro lado hicieron esto posible. A mi mamá, mi papá y mis hermanas, Maia y Luisa. A mis amigas las pebas, hermanas de alma. A lxs rolos, la familia elegida. A Gonza, mi mayor descubrimiento de estos años de doctorado. Gracias a todxs ellxs por sentar las bases de amor y contención. Por hacerme una persona feliz y, gracias a eso, poder y querer esforzarme, aventurarme y enfrentarme a todos los desafíos que implicó este doctorado.

Gracias a lxs juradxs de esta tesis, por acceder a evaluar este trabajo.

Gracias a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y al CONICET, por la educación pública, gratuita y de calidad, y por la beca doctoral que posibilitaron mi formación académica.

Índice

Resumen	2
Abstract.....	3
Agradecimientos	4
Índice	6
Abreviaturas.....	8
Introducción	9
1. Introducción al sistema olfativo.....	10
2. Microcircuitos de la corteza piriforme.....	12
2.1. Aferencias excitatorias a la corteza piriforme	13
2.2. Circuitos inhibitorios en la corteza piriforme	15
2.2.1. Circuitos inhibitorios del tipo <i>feedforward</i> en la corteza piriforme.....	16
2.2.2. Circuitos inhibitorios del tipo <i>feedback</i> en la corteza piriforme	17
2.3. Eferencias de las neuronas principales de la corteza piriforme	18
2.4. Plasticidad sináptica en el microcircuito de la corteza piriforme	19
3. Corteza entorrinal lateral y su interacción con la corteza piriforme	21
4. Plasticidad en el procesamiento sensorial	22
Hipótesis y Objetivos	24
Materiales y Métodos.....	25
Animales	25
Virus.....	26
Parte 1: Experimentos electrofisiológicos en rodajas de cerebro de ratón	26
1.1. Cirugías	26
1.2. Preparación de las rodajas agudas de corteza piriforme.....	27
1.3. Registros electrofisiológicos.....	27
1.3.1. Consideraciones generales.....	28
1.3.2. Identificación de neuronas	28
1.3.3. Electrodo de registro	29
1.3.4. Protocolos experimentales	30
1.4. Experimentos con infusión de drogas al baño.....	31
1.5. Corroboración del sitio de inyección	33
1.6. Cálculo de parámetros electrofisiológicos	33
1.7. Análisis estadísticos de datos electrofisiológicos	34
Parte 2: Experimentos comportamentales	35
2.1. Cirugías	35

2.2. Tarea comportamental.....	36
2.3. Protocolo de entrenamiento.....	37
2.3.1. Restricción de agua.....	37
2.3.2. <i>Handling</i>	37
2.3.3. Habitación.....	38
2.3.4. Entrenamiento.....	38
2.4. Dispositivo Experimental.....	41
2.4.1. Entrega de olores.....	41
2.4.2. Detección y adquisición de señales.....	41
2.5. Odorantes.....	42
2.6. Silenciamiento de la LEC.....	42
2.7. Fijación de cerebro y corroboración de los sitios de inyección.....	44
2.8. Análisis estadísticos de datos comportamentales.....	45
2.9. Modelo comportamental.....	46
Resultados.....	47
Parte 1: Modulación de la actividad neuronal en la corteza piriforme dada por la activación de las proyecciones provenientes de la corteza entorrinal lateral.....	47
1.1. Respuestas evocadas por la activación de proyecciones excitatorias de la LEC en las neuronas SP y DP de la PC.....	47
1.2. Interacción de la LEC con la vía aferente LOT sobre las poblaciones neuronales SP y DP de la PC.....	53
1.3. Respuestas evocadas por la activación de proyecciones excitatorias de la LEC en las interneuronas inhibitorias PV y SOM de la PC.....	58
1.4. Mapa de conectividad de las proyecciones excitatorias de la LEC sobre las neuronas SP, DP, PV y SOM de la PC.....	63
1.5. Exploración de posibles mecanismos de plasticidad de la LEC en el microcircuito de la PC.....	67
Discusión - Parte 1.....	72
Parte 2: El rol de la corteza entorrinal lateral en una tarea comportamental de asociación entre olores y contextos espaciales.....	78
2.1. Aprendizaje de la tarea comportamental.....	78
2.2. Efecto del silenciamiento bilateral de la LEC sobre el comportamiento.....	87
2.2.1. Silenciamiento farmacológico de la LEC.....	88
2.2.2. Silenciamiento quimiogénico de la LEC.....	92
Discusión - Parte 2.....	99
Conclusiones.....	105
Referencias.....	107

Abreviaturas

ACSF	Líquido cefaloraquídeo artificial
ANOVA	Análisis de la varianza
ASSN	Vía asociativa, también llamada vía intracortical o recurrencia excitatoria
CA	Contexto A
CB	Contexto B
CBC	Carbachol
ChR2	ChannelRhodopsin
CNO	Clozapine N-oxide
DP	Neuronas piramidales profundas
DREADD	Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs
E/I	Balance excitación-inhibición
EPSC	Corriente postsináptica excitatoria
EPSP	Potencial postsináptico excitatorio
HZ	Neuronas horizontales
Iclamp	Current-clamp
IPSC	Corriente postsináptica inhibitoria
LEC	Corteza entorrinal lateral
LOT	Tracto olfativo lateral
LTP	Potenciación de largo término
NG	Neuronas neurogliaform
O1	Olor 1
O2	Olor 2
OB	Bulbo olfatorio
PA	Potencial de acción
PFA	Paraformaldehído
PV	Neuronas Parvalbumin+
Q_E	Carga excitatoria
Q_I	Carga inhibitoria
SL	Neuronas Semilunar
SOM	Neuronas somatostatin+

SP

Neuronas piramidales superficiales

Vclamp

Voltage-clamp

Introducción

1. Introducción al sistema olfativo

“La percepción de los olores es circunstancial, contextual y ecológica. Los olores no se almacenan en la memoria como entidades únicas. Por el contrario, siempre están interrelacionados con otras percepciones sensoriales que coinciden con ellos”.¹

En la mayoría de los organismos, las señales químicas presentes en el medio ambiente (odorantes u olores) guían comportamientos críticos para la supervivencia como la reproducción, la interacción madre-hijo, la búsqueda de alimento, y el escape a predadores. Los componentes básicos de los sistemas olfativos que traducen la presencia de odorantes en percepciones se han mantenido constantes a lo largo de millones de años de evolución² y a través de nichos ecológicos variados, con una gran sensibilidad y poder de discriminación³. Esto sugiere que su estudio puede revelar principios fundamentales sobre estrategias óptimas de codificación neuronal que han persistido a lo largo de la evolución de las especies animales.

Una característica única de esta modalidad es que el procesamiento olfativo es altamente dependiente del estado interno del animal, del contexto presente y de la experiencia pasada^{4,5,6}. Esta propiedad se sustenta en la extensa red de conexiones recíprocas formada por la corteza olfativa⁷ que le permite intercambiar información sensorial, afectiva y mnemónica con otras regiones corticales y sub-corticales (Figura I-1).

El sistema olfativo utiliza un conjunto de diversos receptores olfativos, especializados para la detección de odorantes a través del reconocimiento de moléculas⁸ o más comúnmente, de características sub-moleculares específicas⁹. Las neuronas sensoriales primarias del epitelio olfativo expresan un único tipo de receptor y, en vertebrados, todas aquellas que expresan el mismo receptor convergen en uno o dos glomérulos del bulbo olfatorio (OB, por sus siglas en inglés) (Figura I-1). Allí se desarrolla la etapa inicial del procesamiento olfativo, donde diferentes olores inducen distintos patrones espacio-temporales de actividad glomerular^{10,11}. En diversas especies, existe una gran precisión en la disposición espacial de los glomérulos en relación a su sensibilidad olfativa¹², generando un robusto mapa funcional olfatorio en el OB.

El siguiente nivel de procesamiento toma lugar en la corteza olfativa, definida por las regiones del prosencéfalo que reciben aferencias directas del OB, abarcando el núcleo olfatorio anterior, el tubérculo olfatorio, la corteza piriforme, la amígdala y la corteza entorrinal rostral. Estas áreas son comúnmente

referidas como “corteza olfativa primaria” aunque, como se describirá más adelante, sus funciones exceden a las establecidas clásicamente para las cortezas primarias.

La corteza olfativa recibe la información sensorial extraída en la periferia a través del tracto olfativo lateral (LOT, por sus siglas en inglés), formado por los axones de las neuronas de proyección del OB (células mitrales y *tufted*). La corteza piriforme (PC, por sus siglas en inglés) es la principal receptora de LOT. En esta región, en contraste con la topografía del OB, el olor se codifica de una manera escasa y dispersa, donde neuronas vecinas tienen la misma tendencia a activarse frente a olores diferentes como a olores similares produciendo patrones de actividad en los que parece no haber un ordenamiento espacial¹³. Es allí donde se considera que sucede la representación perceptual de olores comportamentalmente relevantes o, dicho de otro modo, la formación de “objetos olfativos”⁶.

El concepto de “objeto olfativo” implica que su percepción no es dictada únicamente por la estructura del odorante, sino que ensambla componentes individuales de la experiencia sensorial. En la PC, esto se construye a través de otras aferencias además de aquella provista por LOT.

Las neuronas principales de la PC extienden proyecciones divergentes produciendo vías de procesamiento paralelas de la información olfativa, que conducen dicha información hacia diversas subregiones de la corteza⁴ por lo cual se la conoce como una corteza “auto-asociativa”. Estas fuertes conexiones que establecen las neuronas de la PC entre sí son plásticas y sensibles al aprendizaje, de forma que podrían contribuir a una representación dependiente de experiencia⁴.

En este sentido, la corteza olfativa jugaría un papel crucial en la traducción de las características químicas inhaladas en percepciones matizadas por la experiencia^{4,14}. La hipótesis subyacente del presente trabajo es que el procesamiento de la información olfativa en la PC cambia dependiendo de la experiencia y el contexto en el que se presenta el olor. Es decir, que un mismo olor podría evocar una representación interna diferente en la PC según el escenario en el que se presente, luego de un aprendizaje.

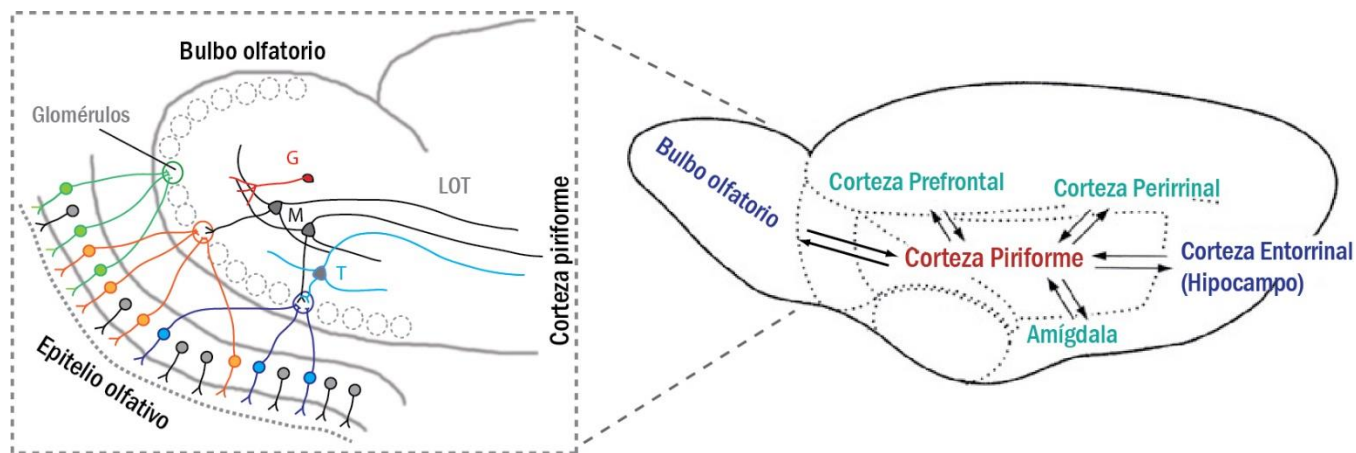


Figura I-1: Sistema olfativo. Aferencias y eferencias de la corteza piriforme. **RECUADRO:** procesamiento periférico olfativo.

2. Microcircuitos de la corteza piriforme

La PC es una paleocorteza que consta de tres capas celulares formadas por diferentes tipos de neuronas excitatorias e inhibitorias⁶. Es la región más extensa de la corteza olfativa y recibe aferencias directas desde el bulbo olfatorio a través de LOT. Estas interactúan dinámicamente con las aferencias de fibras asociativas/intracorticales/recurrentes (ASSN, de *associational* en inglés), dando lugar a la representación del olor en la PC^{15,16,17}. La actividad aferente que llega de ambas vías, LOT y ASSN, no sólo produce excitación de las neuronas de la PC, sino también recluta circuitos inhibitorios tanto de manera *feedforward*, como *feedback*^{15,18}. Por lo tanto, la interacción de la excitación y la inhibición en la PC¹⁶, como ocurre en otras regiones del cerebro^{19,20,21}, determina la población de neuronas que se activa en respuesta a un estímulo. Los cambios en la dinámica y el balance excitación-inhibición (E/I) pueden modificar fuertemente la activación de neuronas, como se ha reportado en otras regiones tales como el hipocampo^{20,22}.

Se ha descrito que las conexiones intracorticales de la PC pueden reforzar o suprimir la eficiencia de los estímulos periféricos, dependiendo del orden temporal relativo de la activación de ambas vías¹⁵. De esta forma, la sensibilidad y selectividad de la respuesta olfativa de las neuronas principales de la PC no está determinada únicamente por las aferencias de LOT, si no que la red de conexiones corticales (tanto excitatorias como inhibitorias) tiene un papel crítico.

Las proyecciones axónicas provenientes del OB se localizan en la capa más externa de la corteza, capa Ia. Allí forman contactos sinápticos con las tres poblaciones de neuronas principales glutamatérgicas: neuronas Semilunar (SL), neuronas Piramidales Superficiales (SP, por sus siglas en inglés) y neuronas

Piramidales Profundas (DP, por sus siglas en inglés) (Figura I-2). También contactan algunas poblaciones de interneuronas gabaérgicas de tipo *feedforward* cuyos somas se ubican en la misma capa. La capa Ib contiene fibras axónicas asociativas intra e intercorticales de neuronas glutamatérgicas y gabaérgicas. La capa II está densamente poblada por cuerpos celulares de neuronas SP cuyos árboles dendríticos se extienden apicalmente hacia capa I y basalmente hacia capa III. Cerca del límite con capa I, en la capa IIa, se ubican también somas de las neuronas SL que se distinguen por carecer de dendritas basales. Por último, en la capa III se encuentran los somas de las neuronas DP, así como de una gran variedad de neuronas inhibitorias^{2,4,23}.

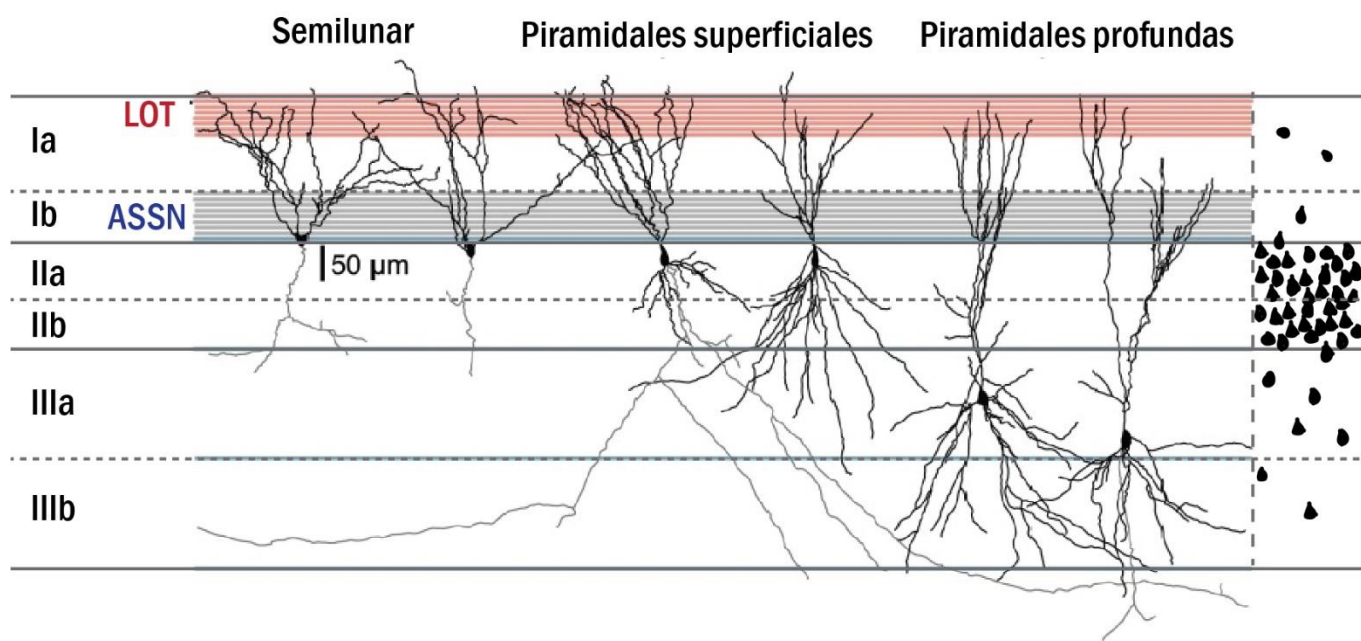


Figura I-2: Esquema de las capas neuronales que conforman la corteza piriforme. Se representan las tres poblaciones de neuronas principales excitatorias de la PC: neuronas Semilunar, neuronas piramidales superficiales y neuronas piramidales profundas. Además, se ilustran las dos principales aferencias, LOT y ASSN; y la densidad de somas por capa (derecha). Figura adaptada de *Large et al.*²⁴.

2.1. Aferencias excitatorias a la corteza piriforme

Como fue mencionado anteriormente, además de la aferencia sensorial proveniente del bulbo olfatorio a través de LOT, las neuronas principales de la PC reciben conexiones intracorticales locales e intercorticales de largo alcance. La vía intracortical está dada por las conexiones sinápticas entre las neuronas glutamatérgicas de la PC a nivel de las capas Ib, II y III^{2,25,26}.

Las neuronas principales de la PC difieren no solo en la localización laminar y morfología, sino también en la cantidad de entradas excitatorias sensoriales e intracorticales que reciben. Se ha reportado que existe un gradiente vertical asociado a la proporción entre estos dos tipos de entradas. Las neuronas más superficiales, como las SL, reciben fuertes conexiones desde la vía aferente de LOT y muy débiles provenientes de la vía ASSN. A mayor profundidad, la excitación aferente va disminuyendo mientras que la intracortical va en aumento, de modo que la relación se invierte para las neuronas ubicadas más profundamente en capa III como las DP. En estas, la excitación proveniente de la vía ASSN se impone por sobre la de LOT^{27,28}.

Gran parte de las conexiones sinápticas que conforman la vía ASSN provienen de las neuronas SL, que contactan fuertemente a las neuronas SP y DP, pero no a otras neuronas SL. Si bien las fibras axónicas intracorticales se hallan densamente distribuidas en la capa Ib, también establecen contactos en capas más profundas²⁹. Las neuronas SP forman conexiones principalmente con otras neuronas de la misma población en capa II, así como con neuronas DP en capa III. Por último, las neuronas DP también aportan a la vía ASSN contactando mayormente a otras neuronas DP y en menor medida, a neuronas SP²⁷ (Figura I-3).

Por otra parte, la PC se encuentra recíproca y extensamente conectada con varias áreas corticales de más alto orden² asociadas con aprendizaje emocional y procesos mnemónicos, como la corteza orbitofrontal³⁰, la amígdala³¹ y las cortezas perirrinal y entorrinal³² (Figura I-1). Todas estas regiones envían proyecciones excitatorias *feedback* a la PC, aunque muy poco se conoce acerca de su función y de cómo se integran en el microcircuito. En este trabajo hipotetizamos que dichas proyecciones estarían aportando diversos aspectos de la experiencia sensorial que contribuirían a la formación de una representación sensorial más amplia y dependiente de experiencia en la PC. En particular, aquí exploraremos las aferencias provenientes de la corteza entorrinal lateral (LEC, por sus siglas en inglés) que, especulamos, estarían aportando información acerca del contexto espacial en el que se presentan los olores.

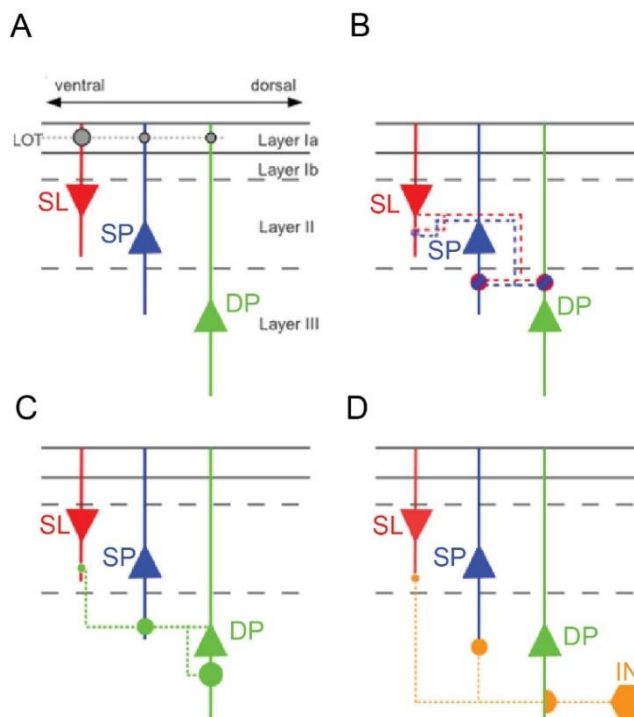


Figura I-3: Diagrama de los circuitos excitatorios aferentes y recurrentes de la PC. **A**, La entrada sensorial a través de LOT (línea punteada gris) se proyecta hacia neuronas SL (triángulo rojo), SP (triángulo azul) y DP (triángulo verde) a través de sinapsis en la capa Ia (círculos grises). El radio de los círculos indica la intensidad de la entrada. **B-D**, La fuerza de las conexiones intracorticales (círculos coloreados) está dispuesta en un gradiente de superficial a profundo que varía inversamente a la fuerza de la entrada sensorial. IN: neurona inhibidora. Figura adaptada de *Wiegand et al.*²⁷

2.2. Circuitos inhibitorios en la corteza piriforme

El reclutamiento de inhibición en circuitos corticales resulta crítico para el procesamiento de información^{33,34,19}. En diversas cortezas, incluyendo la olfativa, se ha demostrado que los circuitos locales inhibitorios, tanto del tipo *feedforward* como *feedback*, modulan las respuestas de las células piramidales a las aferencias sensoriales excitatorias. Lo hacen, típicamente, controlando la temporalidad, la fuerza y el ajuste de estas respuestas^{35,33,16,36,37}. En consecuencia, el patrón de activación neuronal frente a un estímulo sensorial depende del balance relativo entre excitación e inhibición.

Existe una gran variedad, tanto a nivel anatómico como funcional, de interneuronas que gobiernan los circuitos inhibitorios. Frecuentemente, diferentes poblaciones de interneuronas se especializan en dirigir la inhibición sobre distintos compartimentos subcelulares de las neuronas principales, y su activación se da de forma dinámica variando de acuerdo a la fuerza y temporalidad del estímulo excitatorio^{38,39,40}.

En la corteza piriforme, a diferencia de otras cortezas sensoriales, las interneuronas responsables de la inhibición *feedforward* y *feedback*, difieren en tipo neuronal y en su localización laminar, por lo cual son reclutadas diferencialmente por las vías de LOT y ASSN (Figura I-4). Ráfagas de actividad proveniente de LOT generan un cambio progresivo de la inhibición desde las dendritas apicales (inhibición de corta latencia y gobernada por interneuronas *feedforward*), hasta el soma de neuronas principales (inhibición de mayor latencia, gobernada por interneuronas *feedback*)¹⁸.

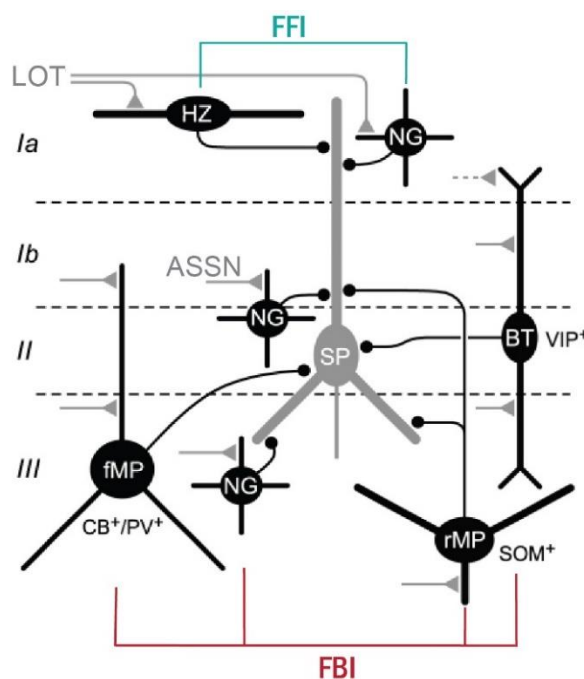


Figura I-4: Diagrama de los circuitos inhibitorios de tipo *feedforward* y *feedback* en la PC. HZ: neuronas horizontales; NG: neuronas *neurogliaform*; fMP: neuronas multipolares de disparo rápido (PV); rMP: neuronas multipolares de disparo regular (SOM); BT: neuronas *bitufted* (VIP). FFI: circuito inhibitorio de tipo *feedforward*, FBI: circuito inhibitorio de tipo *feedback*. Figura adaptada de Suzuki & Bekkers²³.

2.2.1. Circuitos inhibitorios del tipo *feedforward* en la corteza piriforme

Dos poblaciones conocidas de interneuronas gabaérgicas forman parte de los circuitos inhibitorios de tipo *feedforward* en la PC: las neuronas *neurogliaform* (NG) y neuronas horizontales (HZ), ambas localizadas en la capa Ia. Los dos grupos neuronales reciben fuertes entradas excitatorias desde LOT y proyectan densamente sus terminales axónicas en la capa I, donde contactan a las células piramidales de capas II y III.

Se sabe que ambas poblaciones difieren en la dinámica de las corrientes inhibitorias post-sinápticas (IPSCs, por sus siglas en inglés) que generan sobre las neuronas principales, y también en la disposición espacial de sus cuerpos celulares.

Por un lado, las neuronas HZ generan IPSCs rápidos, que no sufren gran depresión en trenes de estimulación de LOT. Se ha observado que sus somas se localizan estrictamente cerca de LOT y sus axones se ramifican localmente. En este sentido, se ha postulado que las células HZ podrían imponer una mayor precisión temporal en la respuesta de las neuronas cercanas a LOT⁴¹.

Por el contrario, las neuronas NG se localizan a lo largo de toda la capa I y, así como en otras regiones cerebrales, proveen inhibición lenta que deprime fuertemente a lo largo de un tren de estimulación^{42,43,44}.

La inhibición *feedforward* es un motivo común en la neocorteza e hipocampo donde se ha estudiado su implicancia en el ajuste de la ventana temporal para la iniciación del potencial de acción^{21,33,45}. Sin embargo, en dichas regiones la inhibición *feedforward* está mediada principalmente por interneuronas de disparo rápido perisomáticas, a diferencia de lo hallado en la PC donde este tipo de inhibición es dendrítica¹⁸.

No resulta claro entonces, que en este caso la inhibición *feedforward* tenga las mismas funciones. Se ha postulado que la depresión de esta inhibición durante un tren de estimulación, podría actuar como un filtro que permita una respuesta más vigorosa de las células principales de la PC durante las ráfagas de actividad provenientes del bulbo olfatorio¹⁸.

2.2.2. Circuitos inhibitorios del tipo feedback en la corteza piriforme

La inhibición del tipo *feedback* o recurrente es reclutada por el contacto de las neuronas excitatorias de la PC sobre diversas poblaciones de interneuronas ubicadas en las capas II y III^{23,41,46}. Estas interneuronas, dirigidas principalmente por las neuronas SL de capa IIa, forman sinapsis con las tres clases de neuronas principales de la PC proveyendo una inhibición global, de mayor latencia, que covaría con la excitación y resulta considerablemente más fuerte que la provista por los circuitos *feedforward*. Estas conexiones son divergentes⁴¹, de modo que una única interneurona de capa III es capaz de inhibir muchas neuronas principales, aunque es común que contacte mayormente a aquellas neuronas que la excitan.

Se ha reportado que la excitación recurrente sobre las neuronas principales es más débil que sobre las interneuronas de tipo *feedback*, lo cual resulta en una inhibición perisomática que domina a la excitación a nivel local^{15,18,24}.

En base a estos conocimientos se ha postulado que la inhibición *feedback* de las capas II y III, estaría implicada en dos importantes funciones: 1) limitar la ventana de integración de aferencias sensoriales y asociativas; 2) estabilizar el circuito de recurrencia excitatoria^{41,47,48}.

En consistencia con esta idea, se cree que la fuerte inhibición reclutada en el microcircuito de la PC, explicaría la activación neuronal dispersa y de baja correlación durante el procesamiento de olores²⁴.

Entre las interneuronas que participan de los circuitos *feedback*, se destacan las células *Somatostatin* positivas (SOM) y *Parvalbumin* positivas (PV). Las neuronas SOM han sido clásicamente catalogadas como neuronas de disparo regular, aunque se ha reportado que cerca de dos tercios de la población es de disparo rápido en la PC⁴⁹. Estas neuronas hacen contactos sinápticos con las neuronas principales a nivel de las dendritas proximales, en la capa Ib y su función está asociada a la regulación en la integración dendrítica de las entradas aferentes y recurrentes. Además, las interneuronas SOM forman sinapsis con otras interneuronas gabaérgicas del circuito como las PV y otras neuronas SOM, por lo cual también cumplen un rol determinante en la red de inhibición global⁴⁹.

Por otra parte, las interneuronas PV son neuronas multipolares de disparo rápido que se ubican mayormente en capa III y establecen contactos sinápticos con las neuronas principales a nivel de los somas. Se ha propuesto que estas neuronas pueden tener un rol en la regulación de la actividad de disparo⁵⁰.

2.3. Eferencias de las neuronas principales de la corteza piriforme

Para dilucidar la función de las distintas clases de neuronas principales, resulta crucial comprender la conectividad de cada una. En la PC, se han reportado diferencias en las proyecciones axónicas de estas poblaciones. Las neuronas SL extienden sus terminales densamente por toda la corteza piriforme, tanto hacia la zona más rostral como caudal. También proyectan hacia otras cortezas como el núcleo cortical amigdalino y la corteza entorrinal lateral. Tanto las neuronas SP como las DP, envían proyecciones *feedback* al bulbo olfatorio. Las primeras, también forman numerosas conexiones con otras áreas corticales como la corteza prefrontal, el núcleo cortical amigdalino, la corteza entorrinal y perirrinal, además de enviar proyecciones contralaterales a la PC^{26,51}. Poco se conoce adicionalmente de las conexiones de las neuronas DP, únicamente que sus árboles axónicos se extienden principalmente hacia la zona rostral de la PC.

Debido al alto nivel de intercomunicación con otras regiones cerebrales que se observa en la PC, se ha sugerido que la misma podría cumplir funciones análogas a las de una corteza asociativa de la neocorteza además de las que cumple típicamente una corteza primaria sensorial⁴⁶.

2.4. Plasticidad sináptica en el microcircuito de la corteza piriforme

La plasticidad neuronal constituye una característica importante e intrigante del cerebro presente en una gran cantidad de especies animales incluyendo todos los mamíferos. Se la entiende como la capacidad de una neurona o circuito neuronal de modificar sus propiedades en respuesta a la actividad neuronal desencadenada por una experiencia⁵².

Un amplio rango de mecanismos de plasticidad ha sido reportado en el sistema olfativo. En respuesta al aprendizaje y a la experiencia con olores, los circuitos olfativos pueden manifestar, por ejemplo, plasticidad sináptica a corto y largo plazo, plasticidad no-sináptica de las propiedades biofísicas de la membrana, cambios morfológicos en la complejidad dendrítica, y neurogénesis y apoptosis dependientes de experiencia⁵.

Dentro de estos mecanismos, la plasticidad sináptica ha sido postulada como una forma de almacenamiento de información en el sistema nervioso desde su descubrimiento. Se refiere específicamente a los cambios de la fuerza o eficacia de la transmisión sináptica en sinapsis preexistentes, dependientes de actividad. Se ha propuesto que desempeña un papel central en la capacidad del cerebro para incorporar experiencias transitorias en trazas de memoria persistentes⁵².

La plasticidad sináptica a corto plazo puede tener una duración que varía en el orden de milisegundos a varios minutos, y se ha reportado en prácticamente todas las sinapsis examinadas tanto en invertebrados como en mamíferos⁵³. De forma general, se cree que está implicada en la adaptación a estímulos sensoriales a corto término, en cambios comportamentales transitorios, y en la formación de memoria a corto plazo.

La mayoría de las formas de plasticidad sináptica a corto plazo se desencadenan por breves ráfagas de actividad que provocan una acumulación transitoria de calcio en las terminales neuronales presinápticas. Este aumento del calcio presináptico provoca, a su vez, cambios en la probabilidad de liberación de neurotransmisores al modificar directamente los procesos bioquímicos que subyacen a la liberación de las vesículas sinápticas⁵².

En el sistema olfativo, la plasticidad sináptica a corto plazo ocurre tanto en el bulbo olfatorio como en la corteza piriforme. Se la vincula con la adaptación a estimulaciones repetidas o prolongadas, y con el ajuste fino del procesamiento que requieren las plumas de olor irregulares e impredecibles⁵. En la corteza piriforme anterior, las neuronas corticales adaptan su respuesta rápidamente frente a olores novedosos, a pesar de una estimulación relativamente sostenida de las aferencias excitatorias⁵⁴.

En cuanto a las modificaciones sinápticas a largo plazo, se las considera la base del almacenamiento de nueva información en el cerebro (es decir, la formación de nuevas memorias). En particular, las memorias asociativas se forman por un proceso de modificaciones sinápticas que generan la potenciación de una conexión cuando la actividad presináptica correlaciona con la respuesta postsináptica, lo que se conoce como potenciación de largo plazo (LTP) asociativa. Una simple explicación de este fenómeno se basa en que, si existe una actividad repetitiva persistente entre dos neuronas A y B, la señal tenderá a inducir cambios celulares duraderos, en una o ambas neuronas, que promuevan la estabilidad de esa conexión. Estos cambios implicarían un aumento en la eficiencia de la transmisión de la señal desde la neurona A y/o en la capacidad de excitación de la célula B⁵⁵.

En la corteza piriforme, se ha postulado que las representaciones duraderas de olores se construyen a partir del fortalecimiento a largo plazo de las sinapsis entre las neuronas piramidales que son co-activadas por las aferencias del bulbo olfatorio^{4,7}. Se ha reportado que las sinapsis intracorticales se potencian luego de un aprendizaje olfativo *in vivo*⁵⁶, y pareando las estimulaciones sobre la vía de LOT y la vía intracortical *ex vivo*^{57,58}. En este último caso, al asociar una estimulación fuerte sobre LOT con una débil sobre las fibras intracorticales, las sinapsis intracorticales experimentan un LTP asociativo mediado por receptores NMDA. Sin embargo, esto solo sucede si, simultáneamente, se suprime el componente rápido (dendrítico) de la inhibición *feedback*. Distintos grupos han logrado esta desinhibición dendrítica mediante diversas estrategias: aplicando localmente un agonista gabaérgico^{57,59}; a través de la infusión en el baño del agonista colinérgico, carbachol⁶⁰ (que afecta negativamente este componente de la inhibición como se detallará más adelante); y mediante el silenciamiento de las neuronas SOM, interneuronas responsables de la inhibición *feedback* a nivel dendrítico en capa Ib⁵⁰.

Así como la asociación entre la entrada de LOT y la recurrencia del circuito de la PC origina las representaciones olfativas aprendidas, hipotetizamos que la aferencia proveniente de la LEC podría también asociarse con la entrada de LOT para dar lugar a una modulación de la representación de olores dada por el contexto espacial en el que se presentan. En este trabajo exploramos distintas formas de plasticidad sináptica asociando la vía de LOT con la de la LEC. Además, sabiendo que el neuromodulador Acetilcolina permite la inducción de LTP asociativo con la vía intracortical en la PC, pero también, que está

involucrado en procesos atencionales a estímulos sensoriales, y de aprendizaje y memoria⁶¹, decidimos estudiar los mecanismos de plasticidad en presencia de carbacol.

En relación al efecto específico de la acetilcolina en el microcircuito de la PC, se sabe que reduce la transmisión sináptica de la recurrencia (lo cual impacta también sobre el componente *feedback* de la inhibición) y tiene poco o nulo efecto sobre las aferencias sensoriales⁶². En línea con esto, se cree que, en términos generales, la modulación colinérgica actúa aumentando la detección de señal y filtrando información irrelevante⁶¹. El efecto de este neuromodulador sobre aferencias a la PC de otras regiones del cerebro como la LEC, no había sido estudiado hasta el momento y en este trabajo buscamos obtener un primer acercamiento.

3. Corteza entorrinal lateral y su interacción con la corteza piriforme

La corteza entorrinal lateral es una región cerebral de alto orden que ha sido largamente estudiada por su fuerte conexión con el hipocampo. Se la ha asociado con el procesamiento de la localización espacial de objetos en el pasado y en el presente^{63,64,65,66,67,68,69,70,71}, el reconocimiento de las combinaciones asociativas de objetos, lugares y contextos con episodios⁶⁸; y la asociación de atributos que conforman un ambiente o contexto local⁷².

Además de su papel en memoria y cognición, la LEC es también un componente del sistema olfativo. Recibe entradas tanto del bulbo olfatorio como de la corteza piriforme que, en roedores, constituyen las aferencias principales⁷³. A su vez, la LEC envía proyecciones *feedback* a estas dos áreas^{46,74,75} que se originan de las mismas células que proyectan a la formación hipocampal⁷⁵.

En cuanto a la función de la LEC en el procesamiento olfativo, se ha sugerido que desempeña un rol importante en la modulación de la codificación de olores específicos, dependiente de experiencia y estado interno del animal⁷⁶. Más recientemente, se ha descubierto que esta región cerebral resulta esencial para la discriminación rápida de la identidad e intensidad de olores⁷⁷.

Otros trabajos han mostrado que lesiones de la LEC en ratas generan una mejora en el aprendizaje y la memoria olfativa^{78,79,80}; un deterioro en la discriminación fina de mezclas de olores⁸¹; así como un aumento en la actividad neuronal de la PC⁸², tanto a nivel de neuronas únicas como a nivel poblacional⁸¹. A partir de esto, se sostiene que la LEC tiene una función supresora sobre la PC, consistente con una inhibición que involucraría circuitos locales de interneuronas inhibitorias. Sin embargo, hasta el momento no habían sido investigados los blancos celulares de estas proyecciones en la PC. En este trabajo nos propusimos

explorarlo con el objetivo de contribuir al entendimiento del mecanismo y función de la modulación de la LEC sobre la representación olfativa en la PC.

4. Plasticidad en el procesamiento sensorial

La naturaleza compleja y fluctuante del ambiente que habitamos requiere que el sistema nervioso sea capaz de generar representaciones internas de los estímulos sensoriales flexibles y adaptables, pero también suficientemente robustas para una buena identificación. Esto implica la habilidad de ajustar el procesamiento sensorial a diferentes contingencias, de forma tal que un organismo pueda adquirir respuestas confiables y al mismo tiempo adaptables a un mundo cambiante. Por ejemplo, dependiendo del contexto en el que un animal se encuentra, un mismo estímulo podría requerir diferentes respuestas comportamentales. Este “contexto”, entendido de la forma más general, involucra tanto la situación ambiental del momento, como las expectativas del individuo, su estado interno, y el valor hedónico asociado al estímulo según la experiencia previa.

En este sentido, se ha reevaluado la idea clásica de que las cortezas sensoriales primarias responden de manera fija y estable a los atributos físicos de los estímulos. Recientemente, se ha observado que existe una importante modulación de la respuesta de neuronas sensoriales a otros factores comportamentales y del contexto de la tarea comportamental, como aspectos específicos del movimiento del animal^{83,84}. Otros experimentos recientes en la corteza visual indican que la misma no responde únicamente a estímulos visuales sino también al contexto espacial⁸⁵. Por último, también se ha observado que los animales pueden modificar su comportamiento alterando de esa manera el procesamiento sensorial. Por ejemplo, la tasa de inhalación aumenta cuando un roedor se aproxima a un olor, y ese olfateo controla un filtro adaptativo en el bulbo olfatorio para detectar cambios en los olores⁸⁶. Estos datos sugieren que los códigos sensoriales se pueden transformar incluso con el comportamiento de muestreo que los animales adoptan.

Como detallamos previamente, la corteza piriforme también presenta plasticidad en la representación de olores. Se ha visto que el aprendizaje asociativo olfativo modifica ciertas respuestas a olores en la PC^{87,88}, reflejando la plasticidad neuronal o sináptica⁸⁹ o modificaciones de la conectividad funcional dentro de la red extendida en la que dicha corteza participa (involucrando, por ejemplo, al hipocampo)⁶. Sin embargo, no se conocen los mecanismos que utilizan los circuitos corticales para generar cambios en la representación.

La corteza piriforme, dentro del sistema olfativo, posee varios elementos que la hacen extremadamente interesante para estudiar la modulación de la representación sensorial. Por un lado, tiene conexiones recíprocas con la mayoría de las áreas que están involucradas en funciones como la memoria y la emoción^{6,7,30}. Por otro lado, parece ser una red no preestablecida, altamente modificable por la experiencia, ya que se ha demostrado que la activación optogenética de patrones aleatorios de neuronas dispersas en la PC puede guiar comportamientos específicos con la experiencia (indicando que su función no depende de una topografía particular)⁹⁰. Esta red olfativa extendida, que conecta regiones que regulan la cognición, la emoción, la memoria y el comportamiento, es reminiscente de una corteza sensorial asociativa, donde las representaciones de componentes individuales son ensambladas en objetos holísticos⁶.

En este trabajo decidimos enfocarnos en uno de los aspectos de la experiencia sensorial, el contexto espacial en el que se presentan los estímulos, para explorar su efecto modulador sobre las representaciones olfativas. Sabiendo que una de las aferencias a la corteza piriforme es la corteza entorrinal lateral, y que allí se procesa información acerca del contexto espacial, nos preguntamos, ¿cuáles son los mecanismos por los cuales los circuitos neuronales de la corteza entorrinal lateral y de la corteza piriforme intercambian información para la adaptación de la codificación de olores de acuerdo al contexto en que éstos son percibidos?

Hipótesis y Objetivos

El estudio de las diferentes modalidades sensoriales ha producido grandes avances en nuestro entendimiento sobre el funcionamiento cerebral, particularmente sobre como los circuitos neuronales forman una representación del mundo exterior. El olfato es una modalidad primitiva en términos evolutivos, y crítica para la supervivencia de muchas especies animales. A diferencia de otros sentidos, se ha visto que el procesamiento olfativo es altamente dependiente de la experiencia pasada, el contexto en el que se presentan los estímulos y el estado interno del animal.

La corteza piriforme genera patrones de actividad dispersa en respuesta a olores que son el resultado de la combinación de entradas aferentes sensoriales (provenientes del bulbo olfatorio), intracorticales (de la recurrencia de las neuronas principales de la PC), de los circuitos inhibitorios de la PC y de las entradas provenientes de otras regiones cerebrales de mayor orden jerárquico como la corteza entorrinal lateral.

La hipótesis general de este proyecto es que la PC utiliza la información que llega desde la LEC para cambiar el procesamiento de la información olfativa de una manera adaptativa. El objetivo es entender cómo esta área del cerebro interactúa con el microcircuito de la PC para la formación de representaciones neuronales olfativas que dependen de la experiencia y del contexto espacial.

El proyecto propone experimentos en rodajas de cerebro e *in vivo* que permitan revelar los mecanismos circuitales, celulares y sinápticos que subyacen a la plasticidad de las representaciones corticales. Los objetivos específicos planteados en este proyecto son:

Objetivo 1: Estudiar el efecto de activación de las proyecciones de la corteza entorrinal lateral en la corteza piriforme sobre las neuronas piramidales que la conforman.

Objetivo 2: Explorar el efecto de activación de las proyecciones de la corteza entorrinal lateral en la corteza piriforme sobre los circuitos inhibitorios.

Objetivo 3: Evaluar la interacción entre las vías aferentes provenientes del bulbo olfatorio y de la corteza entorrinal lateral en el microcircuito de la corteza piriforme.

Objetivo 4: Determinar la contribución de la corteza entorrinal lateral *in vivo* sobre la asociación ente olores y contextos espaciales.

Materiales y Métodos

Animales

Todos los experimentos de esta tesis fueron realizados utilizando ratones *wild-type* o transgénicos en fondo genético (*background*) C57BL/6J. Los ratones se alojaron en condiciones estándar de laboratorio (22 ± 1 °C, $55 \pm 5\%$ de humedad) con comida y agua *ad libitum* en el bioterio del IBioBA hasta el momento del experimento.

Se emplearon las siguientes líneas transgénicas: *PvalbCre;CAGFloxStopTom* (PV-Cre-Tom), *SOMCre;CAGFloxStopTom* (SOM-Cre-Tom) y *CAGFloxStophM4di* (M4di).

Para generar la línea *PvalbCre;CAGFloxStopTom* (PV-Cre-Tom), ratones B6.129P2-Pvalbtm1(cre)Arbr/J (PV-Cre) fueron cruzados con condicionales reporteros B6.Cg-Gt(ROSA)26Sortm14(CAG-tdTomato)Hze/J (Ai14). Únicamente animales heterocigotas para Cre fueron utilizados.

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

La línea M4di fue importada del laboratorio de Dr. Jens Brüning, Max Planck Institute for Metabolism Research, Cologne, Germany. Fueron utilizados ratones homocigotas para el gen R26(CAG)TKneo-FloxStop-(Ascl)hM4di-WPRE (M4di).

En todos los experimentos, los animales fueron criados en grupos de hasta 6 por jaula hasta el momento de la cirugía. Para los experimentos de electrofisiología *ex vivo*, utilizamos animales adultos (tanto machos como hembras) de 4 a 6 semanas de edad que, luego de la cirugía, se mantuvieron en grupos de hasta 4 por jaula. En el caso de los experimentos comportamentales, se eligieron ratones adultos de entre 7 y 9 semanas que fueron separados en jaulas individuales después de las cirugías.

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

Virus

Para los experimentos electrofisiológicos en los que exploramos las proyecciones excitatorias hacia la PC proveniente de la LEC, se empleó el virus pAAV-CaMKIIa-hChR2(H134R)-mCherry (AAV9) de la empresa *AddGene*. El promotor *CamkIIa* direcciona la expresión de la proteína *Channelrhodopsin* (ChR2), un canal iónico activable por luz de 470nm, a neuronas glutamatérgicas.

Para los experimentos comportamentales, se utilizó el virus pENN.AAV9.CamKII 0.4.Cre.SV40 (*AddGene*) en combinación con los ratones transgénicos M4di para direccionar la expresión del *DREADD*⁹¹ (por las siglas en inglés de “Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs”) inhibitorio hacia las neuronas excitatorias de la LEC.

Parte 1: Experimentos electrofisiológicos en rodajas de cerebro de ratón

1.1. Cirugías

Previo a la cirugía, se anestesió a cada animal con una inyección abdominal de 150µg Ketamina + 15µg Xilacina en 10 µl de solución salina por gramo. Se realizó una craneotomía sobre la región de interés (Coordenadas estereotáxicas de la LEC desde Bregma: -3,6mm Anteroposterior; ±3,9mm Mediolateral; -3mm Dorsoventral) y se inyectó entre 400nl y 450nl de adenovirus utilizando microcapilares estériles calibrados (*Sigma*).

Se dejó transcurrir entre 4 y 5 semanas luego de la cirugía para posibilitar la expresión del canal asociado a la opsina ChR2 a lo largo de las proyecciones axónicas de las neuronas infectadas. Pasado este tiempo, se sacrificó al ratón con una inyección de Ketamina+Xilacina seguida de decapitación, se extrajo su cerebro y se seccionó en rodajas con un vibrátomo. Se seleccionaron aquellas rodajas conteniendo la corteza piriforme para llevar a cabo los registros electrofisiológicos (Figura M-1.A). Mediante esta estrategia, al iluminar la rodaja con luz azul (470nm) se promueve la liberación de neurotransmisor desde las terminales de las neuronas infectadas (Figura M-1.1.B).

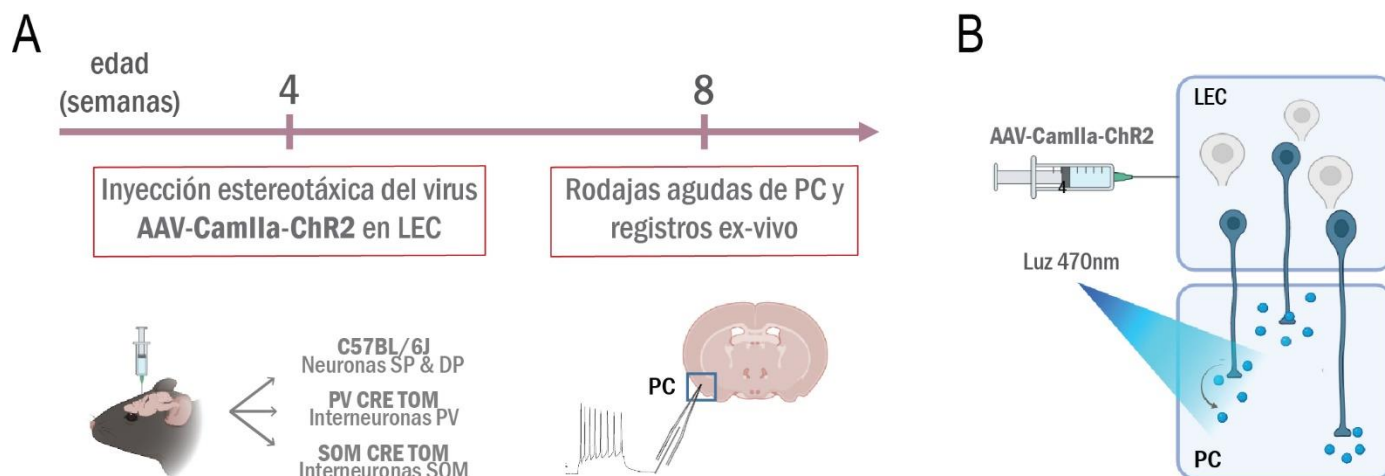


Figura M-1.1: Metodología experimental de registros electrofisiológicos ex vivo **A**, Línea de tiempo del experimento: a las 4 semanas de edad se inyecta el virus en animales *wild-type* o transgénicos de acuerdo al tipo de neurona que se quiera registrar; a las 8 semanas se sacrifica el animal y se extraen las rodajas de la corteza piriforme. **B**, Estrategia de estimulación optogenética. ChR2 se expresa a lo largo de las proyecciones que llegan a la PC de las neuronas infectadas en LEC.

1.2. Preparación de las rodajas agudas de corteza piriforme

Luego de sacrificar a un animal, se removió su cerebro en una solución fría de composición (mM): 110 colina-Cl⁻; 2.5 KCl, 2.0 NaH₂PO₄, 25 NaHCO₃, 0.5 CaCl₂, 7 MgCl₂, 20 dextrosa, 1.3 Na⁺-ascorbato, 0.6 Na⁺-piruvato. Se aisló el hemisferio correspondiente al sitio de inyección viral, y se realizaron secciones coronales de 350µm de espesor con un vibrátomo (*Leica VT 1200S*). Posteriormente, se transfirieron las rodajas de interés a una cámara con una solución de líquido cefalorraquídeo artificial (ACSF) de composición (mM): 125 NaCl, 2.5 KCl, 2 NaH₂PO₄, 25 NaHCO₃, 2 CaCl₂, 1.3 MgCl₂, 1.3 Na⁺-ascorbato, 3.1 Na⁺-piruvato y 10 dextrosa (315 mOsm).

Las rodajas fueron burbujeadas con carbógeno (95% O₂/5% CO₂), incubadas a 32° C por 1 hora y luego mantenidas a temperatura ambiente. Para los registros, fueron trasladadas, de a una por vez, a un sistema de perfusión de ACSF burbujeada con carbógeno a temperatura ambiente, bajo un microscopio de contraste de interferencia diferencial (*Olympus BX61WI*) montado con una cámara CCD (*Hamamatsu electron multiplier CCD camera C9100-13*).

1.3. Registros electrofisiológicos

1.3.1. Consideraciones generales

Los registros fueron obtenidos usando el amplificador Multiclamp700B (*Molecular Devices*), digitalizados con una Digidata 1440A (*Molecular Devices*) y adquiridos a 20 kHz en una computadora personal usando el software pClamp10 (*Molecular Devices*).

Las estimulaciones eléctricas (sobre LOT, en capa Ia) fueron realizadas con electrodos monopolares de acero (*Frederick Haer Company*) a través de un aislador de estimulaciones (*Iso-Flex A.M.P.I.*). La activación optogenética en rodajas se realizó utilizando un LED azul de longitud de onda de 470nm alimentado por una fuente de alta potencia con la que se generaron pulsos de luz cuadrada (*MultiTK-LED, Tolket*).

Para todas las neuronas registradas en modalidad *whole-cell* se realizó, en primer lugar, una “prueba del sello” que consistió en un pulso hiperpolarizante de 10mV y 500ms de duración fijando el voltaje de membrana en $V_m = -70\text{mV}$. Fueron descartadas del análisis aquellas neuronas que mostraran picos de capacitancia menores a 100pA, teniendo que cuenta que esto indica un mal sello entre el electrodo de registro y la membrana celular. También se dejaron de lado aquellas mediciones en las que la inyección de corriente para mantener el voltaje en -70mV fuera mayor a -600pA . Se consideró que estos casos representaban células en mal estado.

En los registros en modo *voltage-clamp*, se fijó el voltaje de membrana en $V_m = -70\text{mV}$ para aislar corrientes excitatorias (equivalente al potencial de reversión de la corriente inhibitoria) y en $V_m = 0\text{mV}$ para aislar corrientes inhibitorias (equivalente al potencial de reversión de la corriente excitatoria).

Los casos en los que ninguna neurona registrada en una misma rodaja respondiera ante el estímulo optogenético, fueron descartados para el análisis. Para determinar si una neurona respondía o no, se estableció un umbral de $\pm 10\text{pA}$ que se comparó con el promedio de las corrientes excitatorias o inhibitorias postsinápticas (EPSC e IPSC, respectivamente) de un tren de estimulación. Una neurona con promedio mayor a 10pA (en valores absolutos), fue tomada como una neurona que respondía.

1.3.2. Identificación de neuronas

Las neuronas SP y DP fueron reconocidas por su posición relativa a la capa II de la PC, la cual es muy fácilmente identificable por su alta densidad de somas. También se tuvo en cuenta la forma y el tamaño de los cuerpos celulares. En el caso de las neuronas PV y SOM se pudo reconocerlas utilizando las respectivas

líneas transgénicas en las que estos genes se hallan asociados a una proteína fluorescente roja tdTomato (Figura M-1. 2).

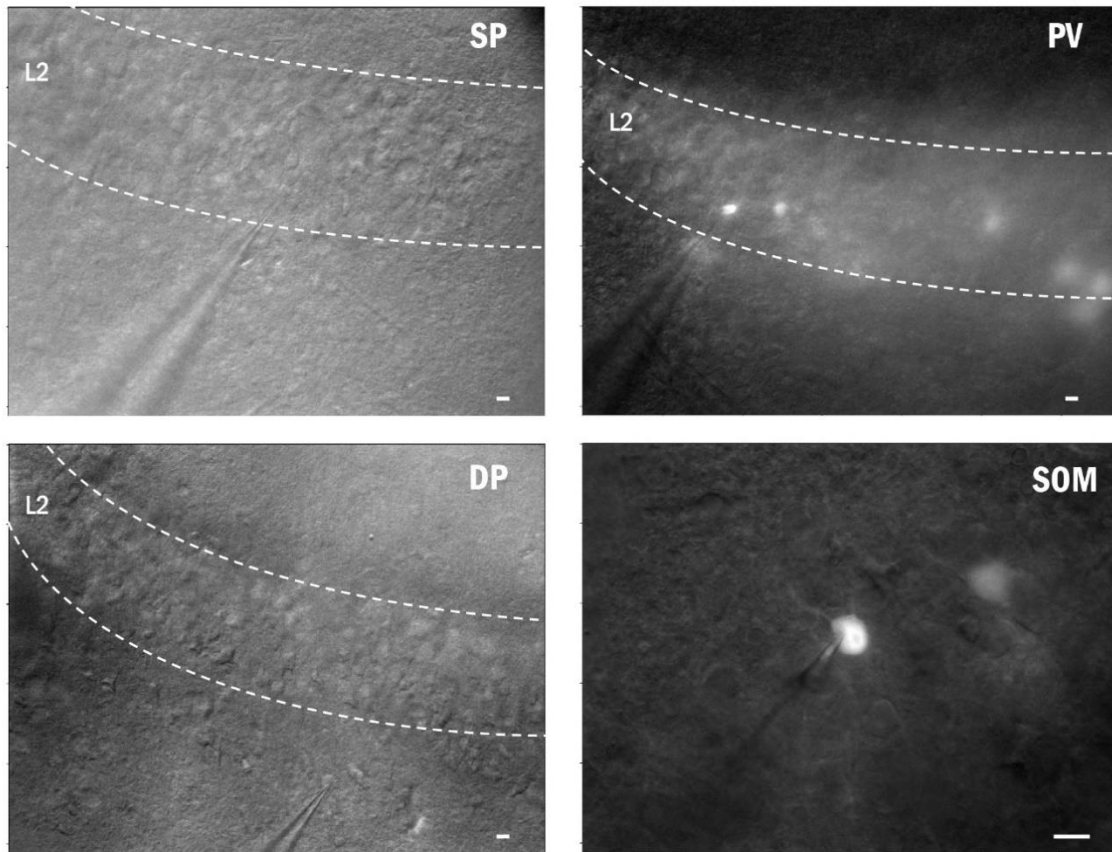


Figura M-1.2: Ejemplos de neuronas registradas. Fotos representativas tomadas en el dispositivo experimental de los cuatro tipos neuronales registrados (SP, DP, PV y SOM). Escala: $x=20\mu\text{m}$.

1.3.3. Electrodo de registro

Para los registros electrofisiológicos se utilizaron microelectrodos de vidrio de borosilicato (KG-33, *King Precision*) estirados con un *Puller* (*Sutter Instrument*, modelo *P-97 Flaming/Brown*) para regular el tamaño y resistencia de la punta de acuerdo a lo requerido.

Para los registros en modo *cell-attached* se utilizaron microelectrodos de 6–12 M Ω de resistencia, cargados con una solución interna de Gluconato de Potasio (mM): 150 K-gluconato, 10 Hepes, 0.1 EGTA, 4 MgCl₂, 1 NaCl, 4 Tris-ATP, 0.3 Tris-GTP y 10 fosfocreatina, a pH 7.3 y 290 mOsm.

En el caso de los registros intracelulares en modalidad *whole-cell*, se emplearon microelectrodos de 4-10 M Ω de resistencia cargados o bien con la solución interna de Gluconato de Potasio, o bien con una solución interna de Cesio (mM): 130 CsOH, 130 ácido D-glucónico, 2 MgCl₂, 0.2 EGTA, 5 NaCl, 10 HEPES, 4 ATP-tris, 0.3 GTP-tris, 10 fosfocreatina, a pH 7.3 y 290 mOsm.

1.3.4. Protocolos experimentales

Para los experimentos en los cuales se estudiaron las respuestas de corrientes postsinápticas evocadas por la estimulación de la LEC, se realizaron registros en modalidad *whole-cell* con microelectrodos cargados de solución de Cesio. Se fijó el voltaje en modo *voltage-clamp* a $V_m = -70$ mV para medir corrientes excitatorias y a $V_m = 0$ mV para medir corrientes inhibitorias. El protocolo de estimulación consistió en trenes de 10 pulsos de luz de 0.5 ms de duración cada uno, a máxima intensidad y con una frecuencia de 10 Hz, enviados cada 30 segundos (Figura M-1.3.A). Esta frecuencia se encuentra dentro del rango de oscilaciones theta (7-12 Hz) que coincide como la actividad evocada por olor tanto en la LEC como en el OB⁷⁶.

El estudio de respuestas de disparo frente a la estimulación de LOT o la estimulación conjunta de LOT y LEC, se llevó a cabo realizando registros ya sea en modalidad *whole-cell* (en modo *current-clamp*) o en modalidad *cell-attached*, con microelectrodos cargados con solución de gluconato de potasio. El protocolo de estimulación de la vía de LOT consistió en trenes de 5 pulsos eléctricos de 0.2 ms de duración cada uno, a intensidad umbral y con una frecuencia de 10 Hz, enviados cada 30 segundos. Para la estimulación conjunta de LOT y LEC, se superpuso al protocolo anterior, trenes de luz de 0.5 ms de duración cada uno, a máxima intensidad y con una frecuencia de 10 Hz, de forma tal que el inicio de los pulsos de luz y de los pulsos eléctricos coincidieran temporalmente (Figura M-1.3.B).

Para los experimentos de plasticidad, se registraron las neuronas en modalidad *whole-cell*, y modo *current-clamp*. En primer lugar, se tomó una línea de base de la respuesta del potencial postsináptico excitatorio (EPSP, por sus siglas en inglés) con un pulso a intensidad subumbral (ya sea eléctrico para estudiar la respuesta a la vía de LOT, o de luz para estudiar la respuesta a la vía de LEC) enviado cada 60 segundos para evitar plasticidad dada por esta estimulación. Luego, se envió el protocolo de LTP asociativo que consistió en un tren de 4 pulsos eléctricos de 0.2 ms de duración cada uno, a intensidad umbral y con una frecuencia de 100 Hz, sobre la vía de LOT, sumado a un tren de 16 pulsos de luz de 0.5 ms de duración cada uno, a máxima intensidad y con una frecuencia de 40 Hz. Esto se repitió 10 veces cada 450 ms (Figura

M-1.3.C). Posteriormente se registró nuevamente la respuesta de EPSP en las mismas condiciones en las que había sido tomada la línea de base.

1.4. Experimentos con infusión de drogas al baño

En la exploración de inervación directa desde la LEC hacia las distintas poblaciones de neuronas de la PC, se hizo uso de una estrategia farmacológica que implicó el agregado de Tetrodotoxina (TTX) en concentración 1 μ M, y 4-aminopiridina (4-AP) en concentración 100 μ M. TTX bloquea canales de sodio dependientes de voltaje, por lo cual previene la generación de potenciales de acción. 4-AP bloquea canales de potasio por lo que mantiene despolarizadas las membranas celulares, incluyendo las terminales sinápticas provenientes de la LEC que, al ser estimuladas optogenéticamente, alcanzan a liberar sus vesículas con neurotransmisores. Al menos 5 minutos se dejaron pasar entre el agregado de las drogas y la evaluación de su efecto. Se estableció un umbral de -15pA para determinar si una neurona respondía o no bajo efecto de las drogas TTX y 4-AP.

Para los experimentos de plasticidad en los que se evaluó el efecto del agonista colinérgico, carbachol, se agregó al baño esta droga en concentración 20 μ M, y se esperó alrededor de 5 minutos.

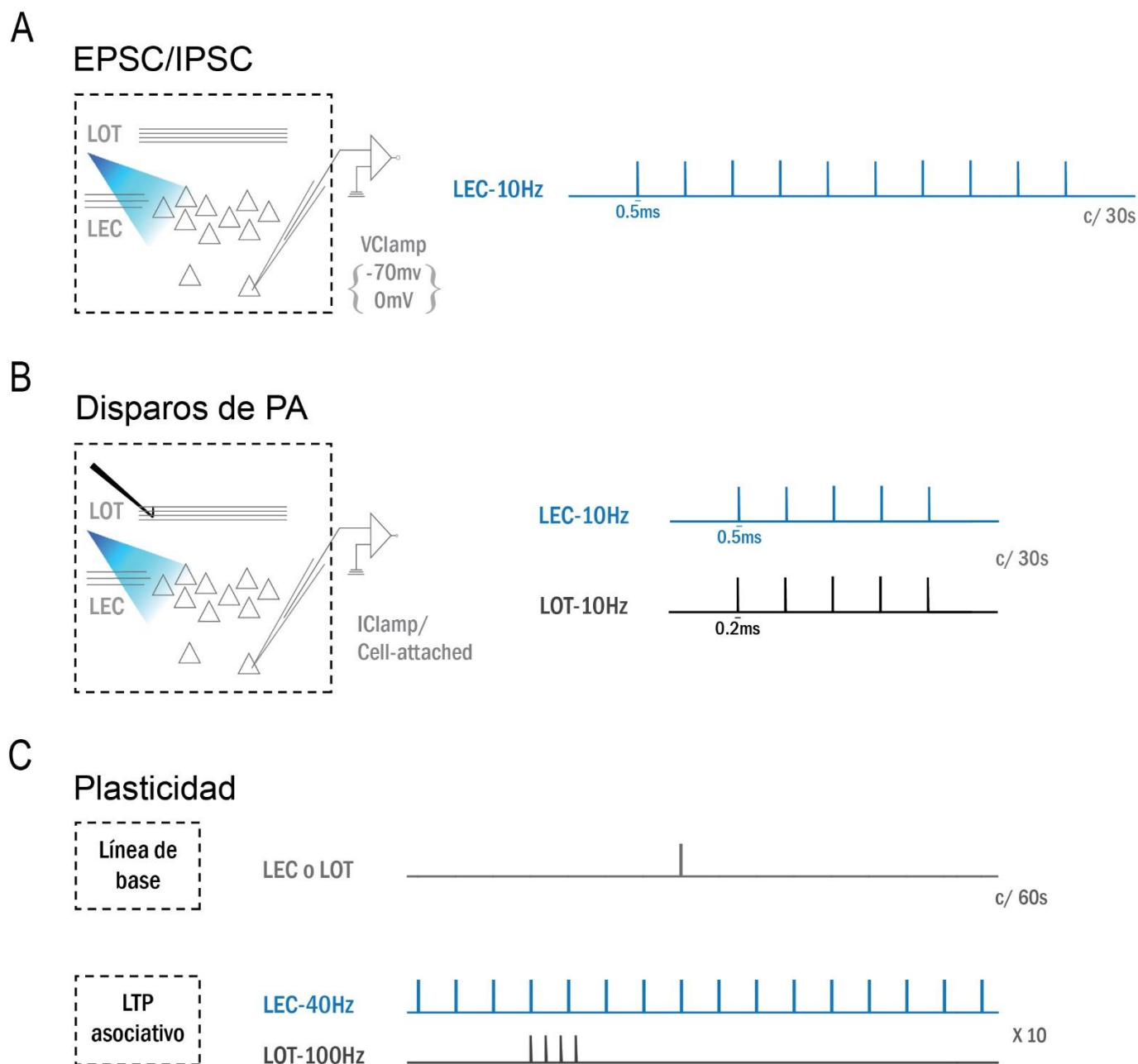


Figura M-1.3: Protocolos experimentales. **A**, Protocolo utilizado para la medición de EPSCs (fijando el voltaje de membrana a $V_m = -70\text{mV}$) e IPSCs (fijando el voltaje a $V_m = 0\text{mV}$) en modo *voltage-clamp* (Vclamp). **B**, Protocolo utilizado para la medición de EPSPs y respuestas de disparo en modo *current-clamp* (Iclamp). El inicio de los pulsos de luz y los pulsos eléctricos coinciden temporalmente. **C**, Protocolo utilizado para los experimentos de plasticidad. La línea de base, así como la respuesta post-LTP, fue tomada con un pulso cada minuto. El protocolo de LTP asociativo consistió en la estimulación eléctrica de la vía de LOT con 4 pulsos a 100Hz superpuesta con la estimulación optogenética de la vía de LEC fue estimulada con 16 pulsos a 40 Hz. Se realizaron 10 repeticiones cada 450 ms.

1.5. Corroboración del sitio de inyección

Después de cada experimento se corroboró el sitio de inyección viral en la LEC (Figura M-1.4). Para esto, al momento de realizar los cortes del cerebro, se conservaron algunas secciones coronales conteniendo la región inyectada. Dichas rodajas fueron trasladadas inmediatamente a una solución de paraformaldehído (PFA) al 4% y posteriormente, fueron montadas en portaobjetos para su observación bajo un microscopio confocal (*Zeiss, AxioObserver Z1 LSM710*). El adenovirus utilizado para la expresión de ChR2, contenía asociada la proteína fluorescente mCherry por lo cual fue posible su observación utilizando el láser y filtro adecuados. Fueron descartados los registros correspondientes a animales en los que la inyección había caído fuera de la región deseada.

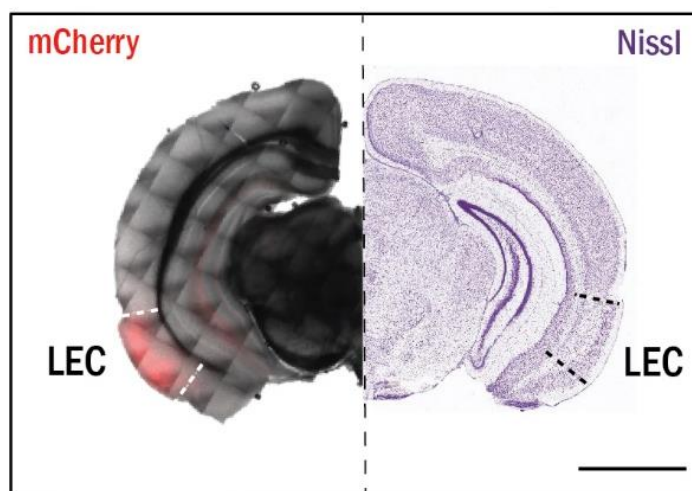


Figura M-1.4: Corroboración de sitio de inyección. IZQUIERDA: Imagen confocal correspondiente a una rodaja coronal del hemisferio izquierdo del cerebro de un ratón experimental. La proteína fluorescente mCherry se expresa en las neuronas infectadas con el adenovirus conteniendo el gen de ChR2. DERECHA: Imagen extraída del *Allen Mouse Brain Atlas*⁹². En ambas imágenes se resalta el área correspondiente a la LEC. Escala: 2mm

1.6. Cálculo de parámetros electrofisiológicos

Para el análisis de los registros electrofisiológicos, se desarrollaron códigos de programación específicos en lenguaje MATLAB y Python.

Los parámetros calculados para el análisis de las corrientes evocadas fueron: pico de la corriente (evaluado en una ventana temporal de 40ms luego del pulso), latencia (tiempo entre el pico del pulso de estimulación e inicio de la corriente u *onset*), y carga (integral de la corriente evaluada en una ventana de 90ms luego

del pulso). Valores de corriente excitatoria menores a -800pA fueron considerados disparos de potencial de acción (PA) y fueron eliminados del análisis de EPSCs. Para el análisis de latencias se descartaron aquellos registros con picos de corriente menores a 20pA en promedio debido a que, en dichos casos, el error de determinación del *onset* es muy grande.

Para el análisis de la respuesta de disparo, se estableció un umbral (50mV para registros *whole-cell* y $40\text{-}170\text{pA}$ para registros *cell-attached*), por encima del cual se buscaron los picos. Se estableció una ventana de búsqueda de 70ms luego del pulso de estimulación. La latencia se calculó como el tiempo entre el pico del pulso y el pico del PA. Fueron descartados del análisis, aquellos PAs con latencias menores a 2ms , al considerarse producto de estimulación directa y no sináptica.

1.7. Análisis estadísticos de datos electrofisiológicos

Las comparaciones de carga total acumulada de las corrientes (tanto excitatorias e inhibitorias) así como del balance E/I, entre las neuronas SP y DP, y las interneuronas PV y SOM, se realizaron mediante pruebas *t* no-pareadas.

Para el análisis de la respuesta de disparo frente a la estimulación de LOT versus la estimulación conjunta de LOT y LEC, se utilizó una prueba *t* pareada. En el caso de la probabilidad de disparo a lo largo del tren de estimulación se realizaron las comparaciones mediante pruebas ANOVA de dos factores (medidas repetidas).

En el caso del análisis de frecuencia acumulada para las latencias de disparo, se utilizó una prueba de Kolmogorov-Smirnov para dos muestras.

Las comparaciones entre poblaciones de latencias de EPSCs y amplitud de corriente directa, se realizaron utilizando pruebas de Kruskal-Wallis.

Finalmente, las diferencias en amplitud de corrientes con y sin carbachol, se detectaron utilizando pruebas *t* pareadas.

Para todos los análisis paramétricos llevados a cabo, se probó previamente la normalidad de los residuos.

Parte 2: Experimentos comportamentales

A continuación, se describen las distintas etapas del paradigma comportamental empleado y los procedimientos para el silenciamiento agudo de la LEC, tanto farmacológico como quimiogénético.

2.1. Cirugías

Previo a la cirugía, los animales fueron inyectados intraperitonealmente con una mezcla de 150µg Ketamina + 15µg Xilacina en 10µl de solución salina por gramo. Una vez anestesiados y ubicados en el marco estereotáxico se les inyectó, además, 40µl de un analgésico local (bupivacaína 0.5%) bajo la piel de la cabeza. Se removió la piel asegurándose de despejar la región correspondiente a las coordenadas de inyección en la LEC (Coordenadas estereotáxicas desde Bregma: -3,6mm Anteroposterior; ±3,9mm Mediolateral; -3mm Dorsoventral).

Para los experimentos de silenciamiento quimiogénético, se realizaron craneotomías sobre ambos hemisferios de la LEC a través de las cuales se inyectó alrededor de 400nl del adenovirus CamkIIa-CRE utilizando microcapilares estériles calibrados (*Sigma*). Posteriormente, se cubrió toda la superficie expuesta del cráneo con pegamento y se adhirió una barra de aluminio de 2,5 cm x 0.5 cm y 350 mg de peso mediante la cual, luego, se fijaría el animal al dispositivo comportamental. Finalmente, se recubrió la zona con acrílico dental con el fin de proteger el cráneo y cementar la barra en la posición deseada.

En los experimentos de inhibición con muscimol, se marcaron las regiones correspondientes a las coordenadas anteroposterior y mediolateral de ambos hemisferios de la LEC (utilizando un marcador indeleble de punta fina), para su posterior identificación. Se protegieron las marcas con una silicona adhesiva (*World Precision Instruments*), se colocó pegamento sobre el resto del cráneo, se adhirió la barra de aluminio y, por último, se recubrió la zona con el cemento dental.

Al finalizar cada cirugía, se administró mediante una inyección subcutánea, una dosis del analgésico Tramadol (5 mg/kg peso corporal) y una del antiinflamatorio Ketoprofeno (5mg/kg peso corporal). Como tratamiento posterior, se administró Tramadol en forma de gotas en el agua de bebida (2 gotas en 200ml de agua) y se realizó una segunda inyección de Ketoprofeno al siguiente día.

El día de la inyección con muscimol, los animales fueron sometidos a una segunda cirugía para la cual se los anestesió en isofluorano 0.75-2%. En esta intervención, se retiró la silicona adhesiva y se realizaron craneotomías sobre las marcas en la LEC. Luego, se bajó, hasta la coordenada dorsoventral

correspondiente, un microcapilar pintado por fuera con colorante *Dil* que permitiría, posteriormente, la corroboración de los sitios de inyección. Se inyectaron 125nl de una solución de muscimol diluida en PBS (0.05µg/µl) en cada hemisferio. Por último, se esperó a que los animales se despertaran y mostraran signos de recuperación (como exploración en la jaula) para, finalmente, trasladarlos al dispositivo experimental.

2.2. Tarea comportamental

Se utilizó un dispositivo experimental, previamente desarrollado en el laboratorio⁹³, con el cual se entrenaron ratones para resolver una tarea “GO-NoGO” de asociación entre olores y contextos espaciales. En este tipo de tareas, los animales deben aprender a realizar una acción (GO) o no realizarla (No-GO) dependiendo de los estímulos presentados. En este caso, la acción a realizar consistió en una respuesta de lamido, es decir, la extensión de la lengua sobre un puerto de agua o *lickport* ubicado frente a la boca de los ratones a una distancia aproximada de 1 cm. Los ratones deben aprender a dar la respuesta de lamido únicamente cuando se presenta una combinación de un olor particular en un contexto espacial específico. Al responder correctamente frente a dicha combinación, son recompensados con una gota de agua. Dado que se los mantiene bajo restricción de agua durante el protocolo de entrenamiento, se hallan fuertemente motivados por esta recompensa.

Cada animal es colocado individualmente sobre un rodillo y fijado mediante una barra de aluminio adherida a su cráneo (en configuración *head-fixed*). Frente al mismo, una pantalla proyecta una realidad virtual directamente vinculada al movimiento del rodillo. De esta forma, a medida que el ratón camina sobre el rodillo, avanza por un corredor virtual proyectado frente a él. En cada ensayo, el animal recorre toda la extensión de un pasillo constituido mayormente por paredes negras con puntos blancos, hasta llegar a un parche de distinto color y patrón visual que se denominó “contexto espacial”. Dos contextos espaciales distintos por sus colores y formas, pueden presentarse: el Contexto A (CA), verde; o el Contexto B (CB), gris. Una vez que el animal “entra” a alguno de estos contextos, uno de dos olores posibles, Olor 1 (O1) u Olor 2 (O2), es liberado durante 1 segundo. Al salir del contexto, el animal debe dar su respuesta GO o No-GO en lo que se llamó “zona de recompensa”. En los casos en los que se registra un lamido en esta zona, habiéndose presentado la asociación olor-contexto recompensada, una gota de entre 8µl y 16µl de agua es entregada a través del *lickport*. En los casos en los que el ratón responde incorrectamente, se pasa al siguiente ensayo sin aplicar penalización.

En los experimentos llevados a cabo para esta tesis, se eligió como combinación recompensada el Olor 1 en el Contexto A. De este modo, la respuesta correcta cuando dicha combinación es presentada, consiste

en lamer el puerto de agua; mientras que frente a las tres combinaciones restantes (Olor 2 en CA, Olor 1 en CB y Olor 2 en CB), la respuesta correcta es no lamer (Figura M-2.1.C).

2.3. Protocolo de entrenamiento

Después de la cirugía, los ratones fueron colocados en jaulas individuales en las que se agregó una rueda para correr y una pequeña fuente para depositar el agua diariamente. Se mantuvieron en un cuarto de alojamiento con ciclo de luz-oscuridad invertido (12O:12L) y todas las etapas de la tarea se llevaron a cabo durante la fase oscura del ciclo.

Los animales tuvieron acceso a comida *ad libitum* mientras que el agua se administró de acuerdo al protocolo de restricción de agua detallado más adelante. El protocolo completo de entrenamiento consistió en la sucesión de 3 etapas: *handling*, habituación y entrenamiento.

2.3.1. Restricción de agua

La restricción de agua inició pasados los tres días de la cirugía y consistió en darle, a cada animal, 1 ml de agua por día en un recipiente dentro de la jaula. Se controló diariamente el peso corporal, la salud del pelo y la locomoción de los ratones. En el caso de una caída por debajo del 70% del peso inicial (peso corporal mínimo), se aumentó el volumen de agua dispensado hasta lograr la estabilización del peso en restricción de agua. Este protocolo fue adaptado del laboratorio de Dr. Karel Svoboda, HHMI, Janelia, USA⁹⁴.

2.3.2. Handling

En simultáneo a la restricción de agua, comenzó la fase de *handling* que se extendió por tres o más días consecutivos. El objetivo de esta etapa es la habituación del animal a la manipulación por parte del experimentador.

Cada sesión de *handling* consistió en mantener al ratón sobre las manos durante 5 a 10 minutos. A medida que los ratones se acostumbran a la manipulación, dejan de morder, orinar y defecar, y se mueven libremente entre ambas manos del experimentador.

2.3.3. Habitación

Una vez finalizada la etapa de *handling*, se dio lugar a la habitación al dispositivo experimental. Cada animal fue colocado en el dispositivo, sobre un rodillo y sujetado por la cabeza. Se ubicó el *lickport* a una distancia aproximada de 1 cm frente a la boca del ratón y se le suministró la dosis de agua diaria en gotas de 2 μ l.

Esta fase se extiende por tres días consecutivos en los cuales se aumenta progresivamente el tiempo de permanencia en el dispositivo. Se parte de una duración de 15 minutos en el primer día y se alcanza por lo menos 45 minutos en el tercer día (tiempo comparable a la duración de una sesión de entrenamiento). Genera como resultado, que los animales reduzcan su nivel de estrés al ser colocados en el dispositivo y se acostumbren a beber el agua a través del *lickport*.

2.3.4. Entrenamiento

Cada sesión de entrenamiento consistió en la presentación de 100 a 200 ensayos y tuvo una duración de entre 40 y 120 minutos. Se realizó una sesión por día hasta que el animal aprendiera la tarea (típicamente entre 5 y 10 sesiones).

Como fue descrito anteriormente, en un ensayo el animal debía recorrer la totalidad de un corredor virtual y, al llegar al final, era teletransportado al inicio del pasillo dando comienzo el siguiente ensayo. Las 4 combinaciones resultantes de asociar uno de dos olores en uno de dos contextos espaciales, fueron presentadas de manera pseudo-aleatoria a lo largo de una sesión.

En la primera sesión, la probabilidad de aparición del tipo de ensayo recompensado fue más elevada que para el resto de los tipos de ensayos (40% CA-O1, 15% CB-O1, 15% CA-O2, 15% CB-O2) con el objetivo de mantener alta la motivación del animal. En alguna de las sesiones subsiguientes, de acuerdo a la cantidad de ensayos realizados por sesión, se ajustaron los porcentajes hasta alcanzar una igual proporción por tipo de ensayo (25% CA-O1, 25% CB-O1, 25% CA-O2, 25% CB-O2).

En unos pocos ensayos al comienzo de las primeras sesiones, se retiró la condición de “lamer para obtener la recompensa” de modo que, cuando se presentaba un ensayo recompensado, la gota de agua era entregada a través del *lickport* sin necesidad de que el ratón lamiera previamente. Esto se realizó para que

el animal advirtiera el tipo de recompensa y tendiera a realizar la acción de lamer. Para el análisis posterior, estos ensayos fueron descartados.

En los experimentos de silenciamiento quimiogénico, antes de colocar a los animales en el dispositivo experimental, se realizó una “mímica de inyección intraperitoneal” sujetándolos firmemente y presionando levemente la punta de una jeringa en el abdomen. Esta manipulación se realizó con el fin de reducir el estrés causado por la inyección intraperitoneal de CNO que se daría el día de la intervención.

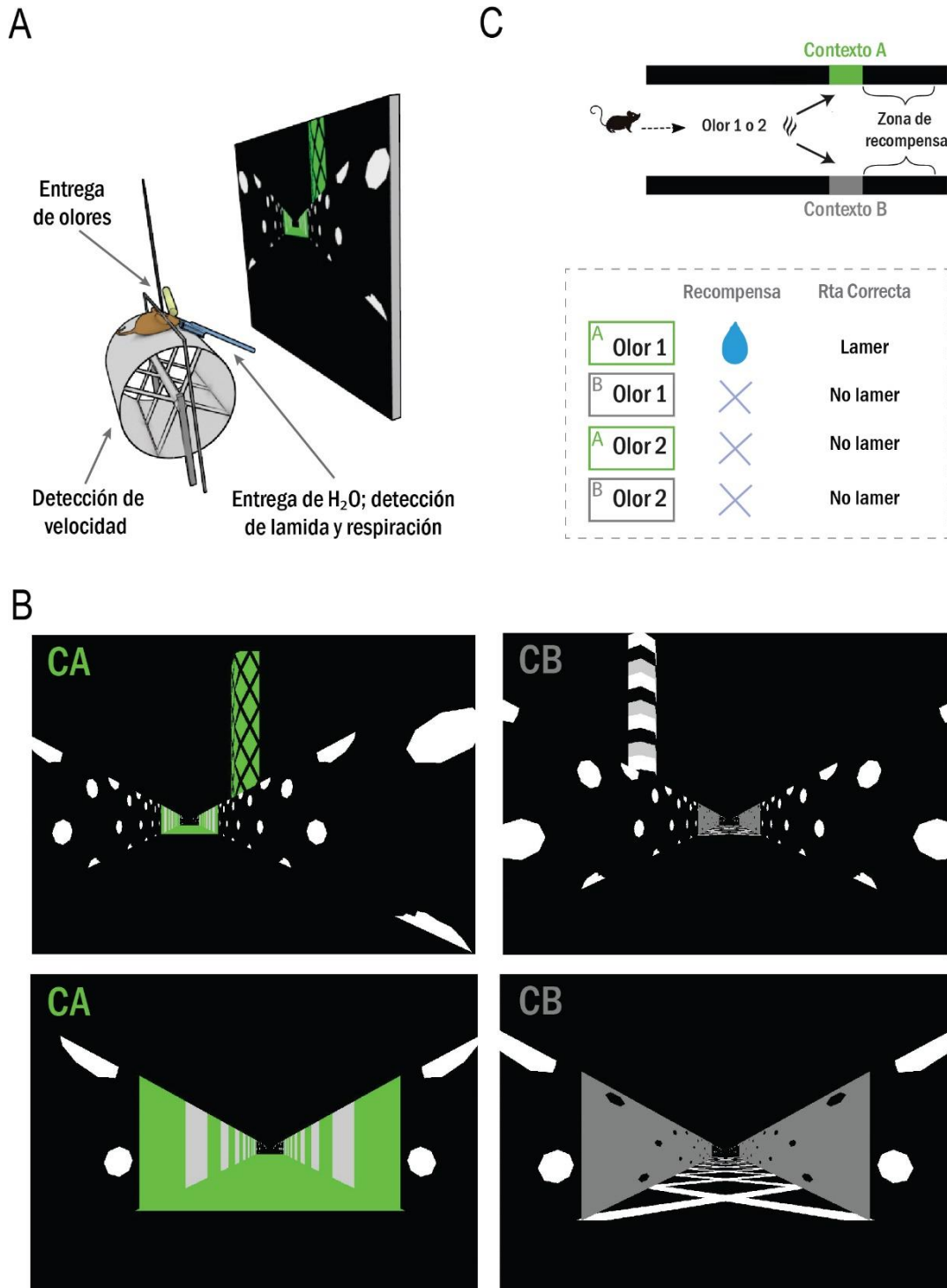


Figura M-2.1: Dispositivo experimental utilizado para los experimentos comportamentales. **A**, Esquema del dispositivo experimental conformado por: un rodillo donde se coloca al animal, una pantalla donde se proyecta la realidad virtual, un puerto de agua, un puerto de olores, detectores de lamidas, respiración y velocidad sobre el rodillo. **B**, Detalles del pasillo virtual para el contexto A (izquierda) y B (derecha). **C, ARRIBA**: Esquema de la tarea comportamental: los animales avanzan por un pasillo negro hasta alcanzar uno de dos contextos posibles (CA o CB) donde se entrega uno de dos olores (O1 u O2). **ABAJO**: Solo la asociación entre CA y O1 predice una recompensa de agua.

2.4. Dispositivo Experimental

2.4.1. Entrega de olores

La liberación de olores se llevó a cabo de manera controlada mediante el uso de un olfatómetro, un dispositivo compuesto por un circuito de válvulas (*NResearch*, modelo sh360T041) conectadas a tuberías. Este sistema se controla informáticamente, lo cual permite la presentación de diferentes olores con velocidades de flujo regulables y la rápida alternancia entre estímulos (<20 ms). Se utiliza, además, un extractor de aire para retirar el olor luego de su liberación, de forma tal que las presentaciones suceden de manera puntual.

El flujo de aire se mantiene constante y se regula mediante un conjunto de flujómetros (*Coleparmer*, modelos # 03216-06 y # 03216-16).

2.4.2. Detección y adquisición de señales

La tasa respiratoria se midió con un sensor de flujo ubicado externamente cerca de la narina izquierda del animal. La orientación precisa relativa a la fosa nasal se optimizó manualmente antes de cada registro.

Un haz infrarrojo ubicado perpendicularmente a la entrada del *lickport* se utilizó para detectar la respuesta de lamido (cada vez que el animal lo interrumpe con su lengua). Un sistema de microcontroladores y adquisición de datos (*Bpod State Machine r1*, *Sanworks*) se utilizó para registrar dicha respuesta y controlar en tiempo real el estado de la tarea (actualización de los estímulos olfativos y de la recompensa) de acuerdo al protocolo. El agua se suministró con un sistema de válvulas conectadas al *lickport* (*The Lee Company*, modelo LFAA1200118H).

La velocidad del animal se registró mediante un *rotary encoder*, (*US Digital*, modelo *H5 Ball Bearing Optical Shaft Encoder*) ubicado en el rodillo y conectado a un microcontrolador ARDUINO. La señal entrante fue utilizada para controlar en tiempo real la plataforma de realidad virtual.

Los datos de respiración, respuesta de lamido y posición se colectaron mediante un sistema de adquisición y almacenamiento de señales (*Smartbox Neuronexus*).

El entorno de realidad virtual, la secuencia de ensayos y la entrega de la recompensa se comandaron con distintos códigos de programación desarrollados en MATLAB.

2.5. Odorantes

En la mayoría de los animales entrenados, se empleó Etil Butirato como Olor 1, e Isoamil Acetato como Olor 2. Únicamente en dos de los ratones que formaron parte de este trabajo se cambió la combinación de olores a Amil Acetato como Olor 1 y Citral como Olor 2 (*Sigma-Aldrich*). Los odorantes fueron seleccionados asegurándonos de que no existiera una respuesta innata en los ratones frente a los mismos⁹⁰.

Cada olor se preparó en fase líquida a temperatura ambiente y se suministraron los volátiles de la fase gaseosa como estímulo olfativo. Para todos los experimentos se utilizaron diluciones 1:200 (olor: aceite mineral). Los volátiles presentes en la fase gaseosa de los viales fueron administrados a los animales mediante un olfatómetro. Este dispositivo se construyó con una serie de viales que contenían una fase líquida de 2000 µl con la dilución mencionada y una fase gaseosa de 10 ml en la que se acumularon sus vapores hasta alcanzar el equilibrio con su respectiva presión de vapor. Como fuente de aire purificado se utilizó una bomba de acuario cuyo aire se hizo pasar por filtros de carbón activado y algodón. El flujo de aire fue constantemente controlado por válvulas manejadas por controladores eléctricos. Se reguló la apertura y el cierre del flujo de aire que pasaba a través de cada vial. Cuando una válvula se abría, se desplazaba un volumen de la porción gaseosa del vial, la cual se mezclaba con un caudal principal continuo de aire purificado y finalmente desembocaban en un tubo con una salida ubicada a aproximadamente 1 o 2 cm de la cabeza del ratón. El flujo de aire fue regulado por dos flujómetros, uno de ellos controlando el caudal principal (de 1 litro/min) y el otro controlando el caudal proveniente de cada uno de los viales con los odorantes (de 100ml/min). Cada odorante en solución fue dispuesto en un vial independiente.

2.6. Silenciamiento de la LEC

Una vez que los animales hubiesen atravesado el protocolo completo de entrenamiento y alcanzado cierto nivel de performance que denominamos “experto” (porcentaje de respuestas correctas mayor a un 80%), procedimos a silenciar bilateralmente la corteza entorrinal lateral y evaluar la performance en la tarea comportamental (Figura M-2.2.A). Para ello, fueron empleadas dos técnicas diferentes detalladas a continuación.

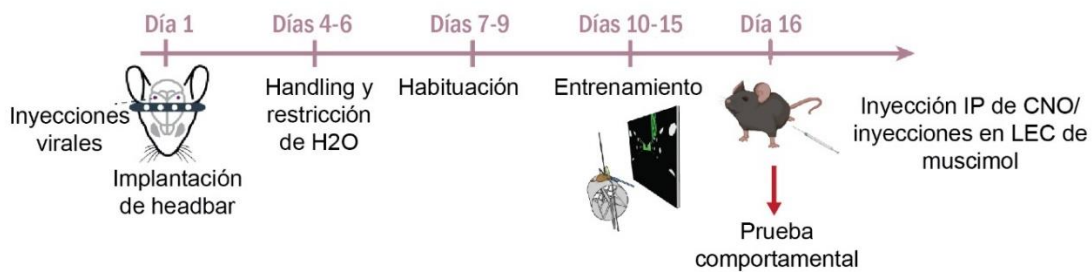
En primer lugar, se utilizó una estrategia farmacológica basada en la acción de un agonista gabaérgico, muscimol, que genera un silenciamiento a través de la activación de circuitos inhibitorios locales. Ratones *wild-type* fueron entrenados en la tarea y, posteriormente, el día de la intervención, se los anestesió en

isofluorano (0.75-2%) y se inyectó, secuencialmente en cada hemisferio, 125nl de una solución de muscimol de 0.05µg/µl en PBS. Se esperó a que cada animal se recuperara luego de la cirugía, mostrando un comportamiento normal de caminata y lamido, y se lo colocó en el dispositivo experimental para su evaluación.

Luego de una larga puesta a punto, esta técnica fue dejada de lado debido, principalmente, a una baja tasa de recuperación después de la cirugía. 12 animales fueron entrenados y sometidos a la cirugía, pero solo 5 se recuperaron normalmente y fueron evaluados en la tarea.

Posteriormente, se empleó una estrategia de silenciamiento basada en la combinación de ratones transgénicos floxM4Di con inyecciones en la LEC de adenovirus CamKIIa-CRE. Esta combinación genera la expresión del receptor inhibitorio hM4Di (DREADD) en neuronas excitatorias de la LEC infectadas con el adenovirus (Figura M-2.2.B). Los receptores hM4Di no tienen ligandos endógenos en ratones por lo cual solo se activan con la administración de un ligando exógeno, como *clozapine- N-oxide* (CNO). En estos experimentos, el día de la intervención se inyectó de manera intraperitoneal una solución de CNO de 5mg/kg del animal diluida en DMSO y PBS. Luego de 10 minutos, se colocaron los animales en el dispositivo experimental y se registró el comportamiento en la tarea previamente descrita.

A



B

Animal transgénico:



Adenovirus inyectado en LEC:

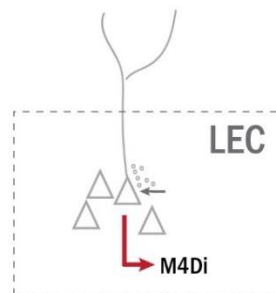


Figura M-2.2. Línea de tiempo experimental y estrategia genética para el silenciamiento quimiogénico. **A**, Etapas del experimento comportamental: luego de la cirugía, los ratones pasan por una serie de fases secuenciales hasta volverse expertos en una tarea de asociación olores-contextos espaciales; posteriormente, se realiza una intervención aguda para silenciar LEC y evaluar el comportamiento en la tarea. **B**, Estrategia genética para la expresión del receptor inhibitorio hM4di en neuronas excitatorias de la LEC.

2.7. Fijación de cerebro y corroboración de los sitios de inyección

Finalizado el experimento, se sacrificó al animal y se extrajo su cerebro para ser fijado de acuerdo al siguiente protocolo:

Etapa	Procedimiento	Temperatura	Duración
1	PFA 4%, SAC 4% en PBS - en agitación	4°C	12-48hs
2	SAC 30% en PBS	4°C	12-48hs
3	PBS	En hielo	5 min
4	Secado y almacenamiento	-80°C	Hasta su uso

Tabla M-2.1: Protocolo de fijación de cerebros enteros.

Posteriormente, de cada cerebro se realizaron cortes coronales de 50µm en congelación utilizando un criostato (*Thermo Fisher*) que fueron colocados en portaobjetos cargados (*ThermoScientific, SuperFrost Plus*). Las secciones de cerebro atravesaron una siguiente etapa de fijación de acuerdo a lo descrito en la Tabla M-2.2. Finalmente, se observaron bajo un microscopio confocal (*Zeiss, AxioObserver Z1 LSM710*).

Etapa	Procedimiento	Duración
1	PFA 4% en PBS	5 min
2	PBS	5 min X3
3	DAPI 1:10000 en H ₂ O	5 min
4	PBS	5 min X3

Tabla M-2.2: Protocolo de fijación de secciones cerebrales montadas en portaobjetos.

Todos los animales experimentales pasaron por este protocolo si bien, para el caso de los animales intervenidos quimiogénicamente, no fue posible identificar el sitio de inyección ya que el virus utilizado no contenía un marcador fluorescente. Los animales experimentales en los que se observó la marca de colorante (indicando el sitio de inyección) fuera de la LEC, fueron descartados para el análisis aquí presentado. En la Figura M-2.3 se puede ver una imagen del sitio de inyección en la zona deseada.

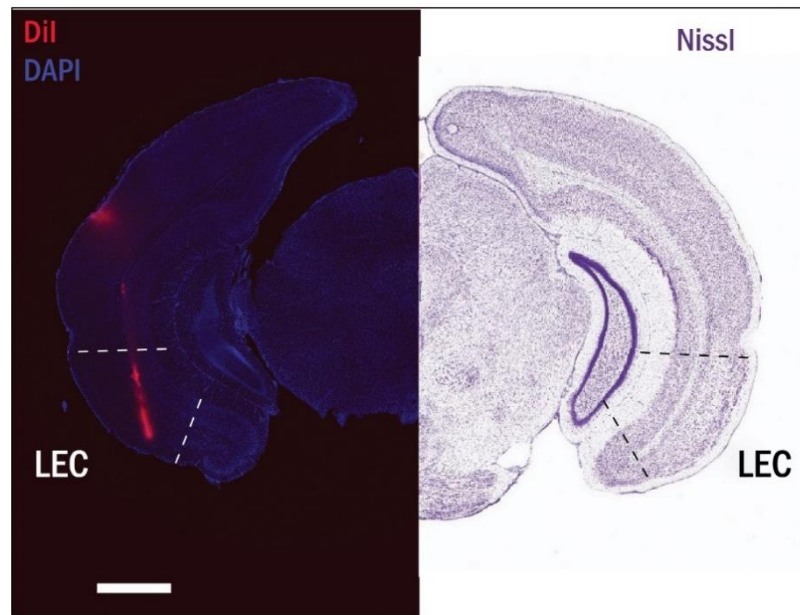


Figura M-2.3: Corroboración de sitio de inyección.: **IZQUIERDA:** Imagen confocal de una sección de cerebro de un animal experimental, conteniendo la LEC. En rojo se ve la marca del colorante Dil; en azul se ven los núcleos de las células con DAPI; escala=1mm. **DERECHA:** Imagen extraída del *Allen Mouse Brain Atlas*⁹². En ambas imágenes se marca la zona correspondiente a la LEC.

2.8. Análisis estadísticos de datos comportamentales

Para el análisis de proporción de respuestas correctas a lo largo del aprendizaje se ajustaron los datos a un modelo de efectos mixtos y, se realizaron múltiples comparaciones de Tuckey entre tipos de ensayo.

La cuantificación de la tasa de lamido por tipo de ensayo se comparó mediante una prueba de Friedman y, posteriormente, se realizaron múltiples contrastes con la corrección de Benjamini, Krieger, & Yekutieli.

Tanto para el análisis de promedio de velocidad como de pendiente de tasa de inhalación, se utilizó una prueba de t entre poblaciones.

Finalmente, para la comparación de proporción de respuestas correctas por tipo de ensayo en sesión Experto versus sesión CNO, se llevó a cabo un análisis ANOVA de dos factores y múltiples comparaciones de Sidak.

2.9. Modelo comportamental

Para la construcción del modelo comportamental se desarrolló un código de programación en Python. Se modeló el cambio en la probabilidad de respuesta dada por la presentación del contexto (A o B) de acuerdo al parámetro k_1 . La variación en la probabilidad de respuesta dada por la presentación del olor dado el contexto A, se modeló de acuerdo al parámetro k_2 ; y, dado el contexto B, de acuerdo al parámetro k_3 . Se propuso una relación directamente proporcional entre k_1 y k_2 , e inversamente proporcional entre k_1 y k_3 , según:

$$\begin{aligned} \hat{k}_2 &= \alpha \cdot \hat{k}_1 \\ \hat{k}_3 &= \frac{\beta}{\hat{k}_1} \end{aligned}$$

donde α y β son constantes. En consiguiente, la probabilidad de respuesta por tipo de ensayo estuvo dada por las siguientes ecuaciones:

$$P_{(CA-O1)} = \hat{k}_1 + \alpha \cdot \hat{k}_1$$

$$P_{(CA-O2)} = \hat{k}_1 - \alpha \cdot \hat{k}_1$$

$$P_{(CB-O1)} = -\hat{k}_1 + \frac{\beta}{\hat{k}_1}$$

$$P_{(CB-O2)} = -\hat{k}_1 - \frac{\beta}{\hat{k}_1}$$

Resultados

Parte 1: Modulación de la actividad neuronal en la corteza piriforme dada por la activación de las proyecciones provenientes de la corteza entorrinal lateral.

Trabajos previos han demostrado que ciertas neuronas de la corteza entorrinal lateral proyectan sus terminales axónicas hacia la corteza piriforme^{46,74,75}. Se sabe, además, que la inhibición de la LEC tiene un impacto sobre la actividad eléctrica en la PC⁸¹. Sin embargo, no había sido estudiada hasta el momento la integración de esta entrada en el microcircuito de la PC. Tampoco se conocía en detalle, la distribución anatómica de las proyecciones de la LEC en la PC ni la interacción específica con la vía de LOT. Aquí nos propusimos investigar en estas direcciones con el objetivo de comprender en mayor profundidad la función de esta conexión intercortical.

Para estudiar la entrada específica de la LEC sobre la PC, utilizamos una herramienta optogenética que nos permitió activar selectivamente las proyecciones de neuronas excitatorias de la LEC a nivel de la PC. Inyectamos un virus conteniendo el gen de la opsina ChR2 bajo un promotor de neuronas excitatorias (CamKIIa) en la LEC, esperamos entre 4 a 5 semanas, y realizamos rodajas agudas del cerebro. Conservamos aquellas rodajas conteniendo la PC del mismo hemisferio en el que había sido inyectado el virus.

1.1. Respuestas evocadas por la activación de proyecciones excitatorias de la LEC en las neuronas SP y DP de la PC

En primer lugar, nos preguntamos cómo respondían las neuronas piramidales de la PC, SP y DP, ante la activación de la aferencia de la LEC. Para estudiarlo, estimulamos cada rodaja con trenes de 10 pulsos de luz azul a 10 Hz, y registramos, en modalidad *whole-cell*, las corrientes evocadas postsinápticas excitatorias e inhibitorias (EPSCs e IPSCs respectivamente) en dichas neuronas.

Observamos que no todas las neuronas SP y DP registradas mostraban respuestas ante la estimulación de la LEC. Decidimos entonces, cuantificar el porcentaje de neuronas con respuestas excitatorias e inhibitorias dentro de cada población con respecto al total de neuronas registradas a -70mV (para aislar excitación) y 0mV (para aislar inhibición) respectivamente (Figura 1.1.1). Dado que no siempre pudimos

registrar en las mismas neuronas a 70mV y 0mV, los porcentajes se expresan como medidas independientes sobre el total de neuronas registradas a -70mV ($n_{SP}=43$, $n_{DP}=26$), el total de neuronas registradas a 0mV ($n_{SP}=20$, $n_{DP}=10$) y el total registrado en ambos voltajes ($n_{SP}=20$, $n_{DP}=9$). Notamos que la mayoría de las neuronas registradas recibían entradas excitatorias ante la estimulación de la LEC ($SP_E=74.42\%$, $n=43$; $DP_E=84.62\%$, $n=26$). Con respecto a las entradas inhibitorias evocadas, el porcentaje registrado fue mucho menor para ambas poblaciones ($SP_I=30\%$, $n=20$; $DP_I=50\%$, $n=10$). Es importante resaltar que las respuestas inhibitorias evocadas por la LEC, en este caso, serían únicamente debidas a la recurrencia inhibitoria del circuito de la PC dado que la estimulación optogenética ocurre a nivel de las proyecciones excitatorias. No es extraño entonces, que el porcentaje de neuronas con respuesta inhibitoria sea un poco más elevado en las DP de capa III que en las neuronas de capa II dado que, como ha sido reportado previamente, las primeras reciben mayor recurrencia inhibitoria²⁴. Cuantificamos también la proporción de células en las que registramos tanto excitación como inhibición en respuesta a la activación de la LEC ($SP_{E\&I}=25\%$, $n=20$; $DP_{E\&I}=44.44\%$, $n=9$). De este grupo de neuronas, notamos que, para la población SP, todas aquellas que mostraron inhibición también evocaron excitación; mientras que para la población DP, un 27% mostró inhibición sin excitación.

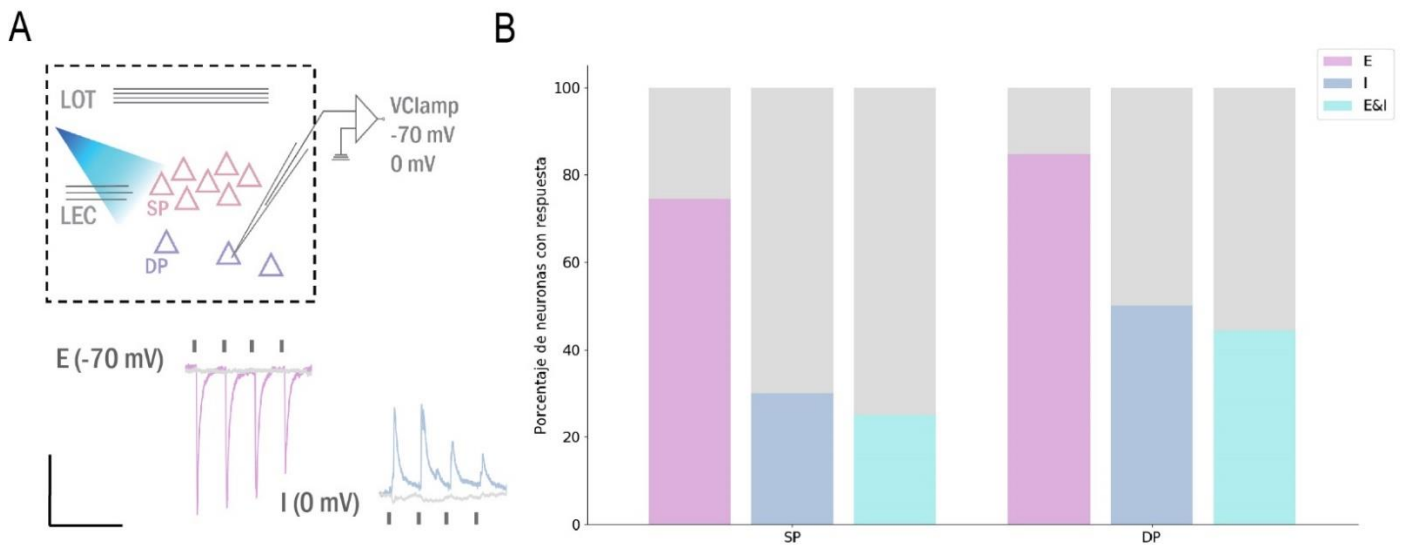


Figura 1.1.1: Porcentaje de neuronas en las que se registraron corriente excitatoria (E), inhibitoria (I), o ambas (E&I) en respuesta a la estimulación optogenética de las proyecciones excitatorias de la LEC. A, ARRIBA: Esquema del experimento. Se registran neuronas SP y DP en *whole-cell* a -70mV (para medir excitación) y a 0mV (para medir inhibición); se estimula optogenéticamente las terminales de la LEC. **ABAJO:** Trazos representativos de registros de una neurona SP que responde con excitación (violeta), otra neurona DP que responde con inhibición (azul), y dos neuronas SP que no responden (gris); se muestran los cuatro primeros pulsos del tren representados por las líneas negras; escala: $x=250\text{ms}$, $y=100\text{pA}$. **B,** Cada porcentaje fue calculado en base al total de neuronas registradas a -70mV para la excitación, a 0mV para la inhibición y a ambos voltajes para la

excitación e inhibición. $SP_E=74.42\%$, $n_E=43$; $SP_I=30\%$; $n_I=20$; $SP_{E\&I}=25\%$, $n_{E\&I}=20$; $DP_E=84.62\%$, $n_E=26$; $DP_I=50\%$, $n_I=10$; $DP_{E\&I}=44.44\%$, $n_{E\&I}=9$.

Posteriormente, nos propusimos evaluar más detalladamente la naturaleza de las corrientes evocadas. Para esto, seleccionamos únicamente el conjunto de neuronas que hubiera evidenciado respuesta. Es decir, para el análisis de la excitación, se tuvieron en cuenta el 74.42% de neuronas SP y el 84.62% de neuronas DP en las que se registraron corriente excitatorias evocadas por la LEC, mientras que el resto de las neuronas fue dejado de lado. Lo mismo ocurrió con el análisis de la inhibición. Para el caso del balance excitación-inhibición, se tuvieron en cuenta todas las neuronas en las que se midió tanto excitación como inhibición. De esta manera buscamos revelar cómo las poblaciones neuronales estudiadas integran todas las entradas que reciben en respuesta a la estimulación de la LEC.

Al estudiar aisladamente las corrientes excitatorias evocadas por la LEC, pudimos observar que las neuronas SP muestran una mayor carga (calculada como la integral de la corriente en una ventana temporal) en respuesta al tren de estimulación, en comparación con las neuronas DP (Figura 1.1.2.A). La carga excitatoria total acumulada a lo largo de todo el tren fue significativamente mayor para las neuronas SP en relación a las DP (Prueba t: $p=0.05$, $n_{SP}=32$, $n_{DP}=22$) (Figura 1.1.2.B). Obtuvimos un resultado similar al analizar el pico de la amplitud de las corrientes en lugar de la carga.

Distintas razones podrían explicar este resultado: 1) las neuronas SP podrían estar recibiendo simplemente más recurrencia excitatoria del microcircuito de la PC; 2) una mayor proporción de neuronas SP podría estar siendo contactada directamente por las terminales sinápticas de neuronas de la LEC; 3) las neuronas SP podrían estar recibiendo más entradas o entradas más fuertes desde la LEC.

La primera propuesta fue descartada luego de una revisión bibliográfica en la que corroboramos que las neuronas SP reciben menos recurrencia que las DP²⁷. Más adelante, en la sección 1.4, exploramos las dos hipótesis restantes.

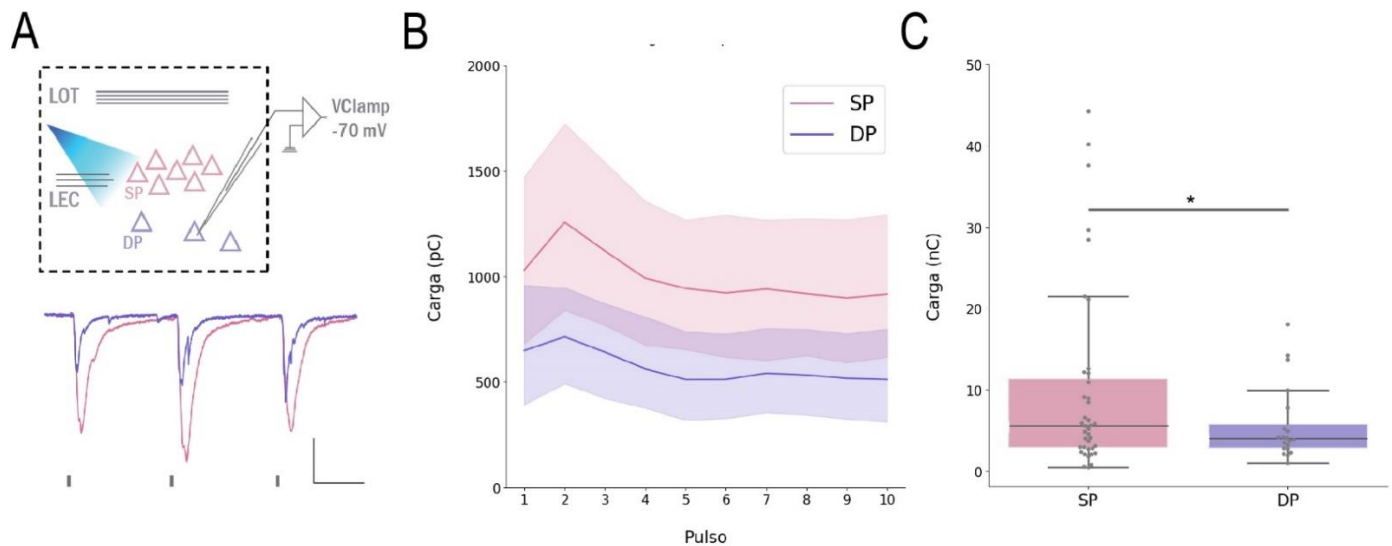


Figura 1.1.2: Carga excitatoria de neuronas piramidales en respuesta a un tren de estimulación de la LEC. A, ARRIBA: Esquema del experimento. Se registran neuronas SP y DP en *whole-cell* a -70mV ; se estimula optogenéticamente las terminales de la LEC. **ABAJO:** Trazos representativos de registros de una neurona SP y una DP (se muestran los tres primeros pulsos del tren representados por las líneas negras); escala: $x=50\text{ms}$, $y=100\text{pA}$. **B,** Carga excitatoria evocada por cada pulso del tren de estimulación optogenética para las dos poblaciones neuronales registradas, en valores absolutos. Cada curva corresponde a la media y desvío estándar. **C,** Total de la carga excitatoria a lo largo del tren. Cada punto corresponde a la suma de la carga evocada por los 10 pulsos del tren para una neurona; las cajas indican mediana y cuartiles (Prueba t entre poblaciones: $p=0.05$, $n_{\text{SP}}=32$, $n_{\text{DP}}=22$).

Las corrientes inhibitorias reclutadas por la activación de las proyecciones excitatorias de la LEC resultaron similares entre ambas poblaciones (Figura 1.1.3). Si bien parece haber una tendencia a que las neuronas DP evoquen mayor carga inhibitoria a lo largo del tren, no resultó significativa la diferencia con la respuesta de las neuronas SP (Prueba t: $p=0.508$, $n_{\text{SP}}=6$, $n_{\text{DP}}=5$). Nuevamente, el resultado fue similar al analizar el pico de las corrientes en lugar de la carga. Estos datos estarían indicando que, dentro del conjunto de neuronas que recibe entradas inhibitorias, no existe una diferencia dada por el tipo neuronal.

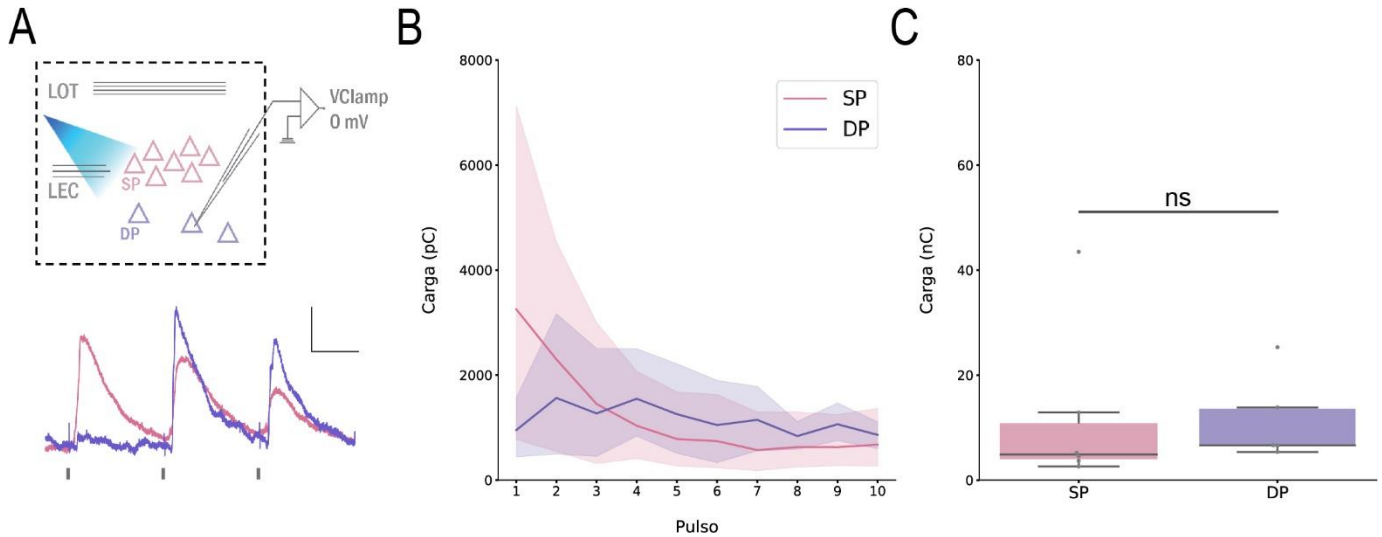


Figura 1.1.3: Carga inhibitoria de neuronas piramidales en respuesta a un tren de estimulación de la LEC. A, ARRIBA: Esquema del experimento. Se registran neuronas SP y DP en *whole-cell* a 0mV; se estimula optogenéticamente las terminales de la LEC. **ABAJO:** Trazos representativos de registros de una neurona SP y una DP (se muestran los tres primeros pulsos del tren representados por las líneas negras); escala: x=50ms, y=100pA. **B,** Carga inhibitoria evocada por cada pulso del tren de estimulación optogenética para las dos poblaciones neuronales registradas. Cada trazo corresponde a la media y desvío estándar. **C,** Total de la carga inhibitoria a lo largo del tren. Cada punto corresponde a la suma de la carga evocada por los 10 pulsos del tren para una neurona; las cajas indican mediana y cuartiles (Prueba t entre poblaciones: $p=0.508$, $n_{SP}=6$, $n_{DP}=5$).

Finalmente, para comprender cómo cada neurona integra todas las entradas que recibe en respuesta a la activación de la LEC, calculamos un balance entre la carga excitatoria y la carga inhibitoria a lo largo del tren de estimulación. Este fue expresado como la proporción de carga excitatoria sobre el total de la carga:

$$\text{Balance} = Q_E / (Q_E + Q_I)$$

donde Q_E : carga excitatoria y Q_I : carga inhibitoria. Esta forma de expresar el balance resulta más conveniente que un cociente (Q_E / Q_I) cuando en la muestra existen valores cercanos a cero, como en nuestro caso.

Dado que, en muchos casos, las corrientes excitatorias son evocadas con menor latencia que las inhibitorias, es importante considerar el factor temporal para interpretar la integración de todas las entradas en una neurona. Este fue el principal motivo por el cual decidimos tomar la carga como parámetro para calcular el balance ya que integra el valor de la corriente en una ventana temporal extendida.

Observamos que para el total de neuronas registradas a -70mV y 0mV, el balance resultó positivo a lo largo del tren en el caso de las SP y negativo para las DP. Contrastamos por un lado el balance promedio a lo

largo del tren entre ambas poblaciones (Prueba t: $p=0.0001$, $n_{SP}=20$, $n_{DP}=11$) y por otro lado, el balance promedio de cada población contra el valor 0.5 que supondría excitación e inhibición balanceadas (Prueba t, SP: discrepancia=0.07814, $p=0.0223$; DP: discrepancia= -0.1296, $p=0.005$).

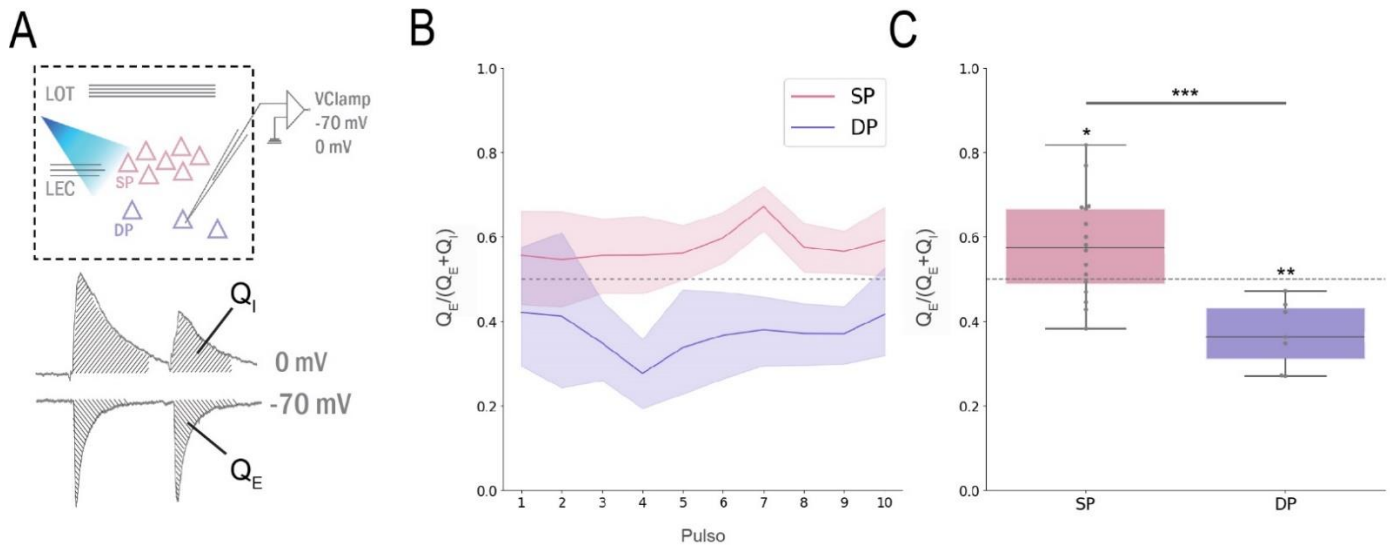


Figura 1.1.4: Balance excitación - inhibición para las poblaciones SP y DP en respuesta a un tren de estimulación de la LEC. A, ARRIBA: Esquema del experimento. Se registran neuronas SP y DP en *whole-cell* a -70mV y 0mV; se estimula optogenéticamente las terminales de la LEC. **ABAJO:** La carga se calcula como el área bajo la curva (Q_E : carga excitatoria; Q_I : carga inhibitoria). **B,** Balance expresado como la proporción de carga excitatoria sobre el total de carga evocada por 10 pulsos sucesivos de luz azul. Cada curva representa el promedio y desvío estándar correspondiente a cada población aquí estudiada. **C,** Promedio del balance en un tren de estimulación de la LEC para cada población. Cada punto corresponde al balance promedio de cada neurona; las cajas indican mediana y cuartiles (Prueba t entre poblaciones, $p=0.0001$. Prueba t para cada población, SP: $p=0.0223$, $n_{SP}=20$; DP: $p=0.005$, $n_{DP}=7$).

Estos resultados indican que el total de corriente excitatoria que reciben las neuronas SP en respuesta al tren de activación de la LEC es mayor que el total de corriente inhibitoria recibida. Es probable que esto se deba, en parte, a que la excitación se mantiene a lo largo del tren mientras que la inhibición decae fuertemente.

Con respecto a las neuronas DP, observamos un efecto contrario: la inhibición es predominante en la respuesta total reclutada por la activación de la LEC. Esto surge de, por un lado, pequeñas respuestas excitatorias (Figura 1.1.2), así como del hecho de que mayor porcentaje de las neuronas correspondientes a esta población reciben recurrencia inhibitoria (Figura 1.1.1).

Con estos resultados, hubiese sido interesante comprender cómo es afectada la salida de las neuronas piramidales en respuesta a la estimulación de la LEC midiendo cambios la tasa de disparo. Sin embargo, en la gran mayoría de las neuronas registradas en modalidad *current-clamp*, notamos que la estimulación optogenética no era suficiente para provocar un disparo de potencial de acción (PA). Por otro lado, dado que estas poblaciones tienen muy poca actividad espontánea, tampoco nos fue posible observar ningún tipo de reducción de la actividad basal. Por lo tanto, no pudimos revelar cambios en la actividad supraumbral de las poblaciones SP y DP en respuesta a la activación optogenética de las proyecciones de la LEC. Logramos, sin embargo, estudiar la modulación de la LEC sobre la salida de las neuronas en respuesta a la estimulación de la vía LOT, que detallamos en la siguiente sección.

1.2. Interacción de la LEC con la vía aferente LOT sobre las poblaciones neuronales SP y DP de la PC

Hasta aquí hemos planteado que la información proveniente de la LEC llega a la PC y es integrada diferencialmente entre las poblaciones de neuronas excitatorias SP y DP. Nos preguntamos a continuación si, de algún modo, esta entrada podría alterar el procesamiento de la información proveniente del bulbo olfatorio. En este sentido, decidimos explorar la modulación de la LEC sobre las respuestas de las poblaciones SP y DP frente a la activación de vía aferente proveniente del bulbo olfatorio, que aquí estudiamos mediante la estimulación eléctrica de LOT.

Quisimos estudiar la interacción de las vías LOT y LEC a nivel de la salida de las neuronas, para lo cual medimos su tasa de disparo. Registramos las neuronas en modalidad *whole-cell*, (modo *current-clamp*) o en modalidad *cell-attached*, y estimulamos, por un lado, la vía de LOT y por otro, esta misma vía combinada con la vía de LEC (Figura 1.2.1.A). Las estimulaciones se realizaron con trenes de 5 pulsos a 10 Hz. Si bien exploramos distintos desfasajes temporales entre las estimulaciones de ambas vías, aquí se muestran únicamente los resultados en los que las estimulaciones se solapan perfectamente, es decir, sin desfasaje temporal. Para cada neurona, fijamos la estimulación de LOT a una intensidad “umbral” que fue determinada como aquella que evocara un disparo de PA en respuesta al primer pulso, en aproximadamente la mitad de las repeticiones.

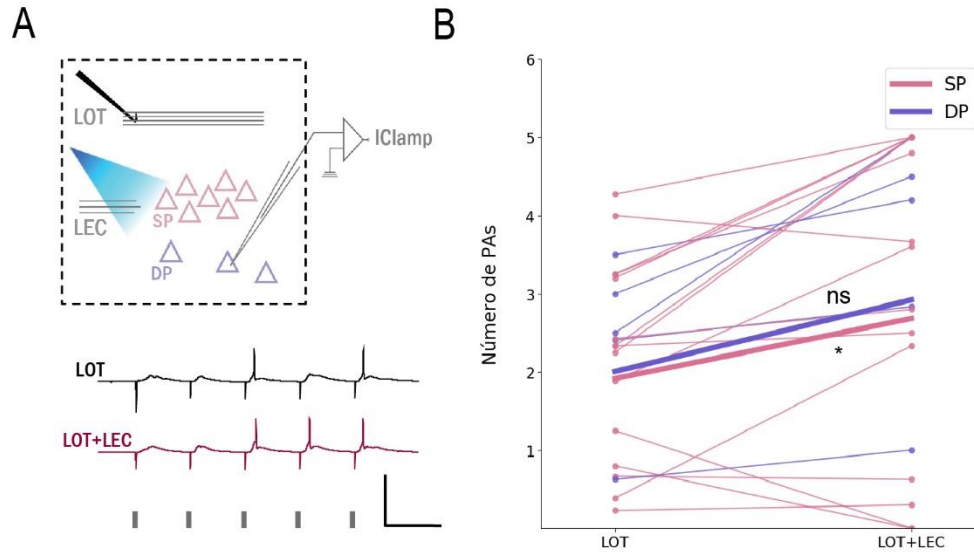


Figura 1.2.1: Modulación de la LEC sobre la respuesta de disparos de PA de las neuronas SP y DP frente a la estimulación de LOT. **A, ARRIBA:** Esquema del experimento. Se registran neuronas SP y DP en *whole-cell, current-clamp*; se estimula eléctricamente LOT y optogenéticamente las terminales de la LEC. **ABAJO:** Trazos representativos de registros de una neurona en respuesta a la estimulación de LOT o a la estimulación conjunta de LOT y LEC; escala: x=100ms, y=1V. **B,** Número total de potenciales de acción evocados por un tren de 5 pulsos a 10Hz de estimulación de LOT versus LOT en conjunto con LEC. Cada trazo corresponde a una neurona. Las líneas gruesas representan la media de cada población. (Prueba t para cada población, SP: $p=0.0352$, $n_{SP}=15$; DP: $p=0.0528$, $n_{DP}=5$).

En la Figura 1.2.1.B se muestra el total de disparos de PA de cada neurona evocados a lo largo del tren de estimulación, y el promedio correspondiente a cada población. Como puede observarse, la respuesta pareciera aumentar tanto para las neuronas SP como las DP al estimular en conjunto LOT y LEC, con respecto a la respuesta ante LOT. La diferencia en las respuestas a LOT versus LOT+LEC fue significativa únicamente para la población de neuronas SP (Prueba t pareada LOT vs. LOT+LEC, SP: $p=0.0352$, $n_{SP}=15$; DP: $p=0.0528$, $n_{DP}=5$). Si bien no encontramos diferencias significativas para la población de DP, es probable que esto se deba en parte a que el n muestral de esta población es chico.

Con el fin de comprender en mayor detalle el efecto de modulación de la LEC sobre la vía de LOT, quisimos observar la dinámica de disparo a lo largo del tren. Para ello, graficamos la probabilidad de observar un disparo de PA frente a cada pulso del tren de estimulación. Mediante una prueba ANOVA de dos factores (medidas repetidas), no pudimos revelar que hubiese diferencias significativas en la probabilidad de disparo entre la estimulación única de LOT y la estimulación conjunta de LOT y LEC, ni para las neuronas SP (Figura 1.2.2.A) ni para las DP (Figura 1.2.2.B) (ANOVA de dos factores -medidas repetida, SP: $p=0.1184$,

$n_{SP}=15$; DP: $p=0.2861$, $n_{DP}=6$). Sin embargo, se observa una tendencia al aumento sostenido en la probabilidad de disparo a lo largo del tren, particularmente para la población SP.

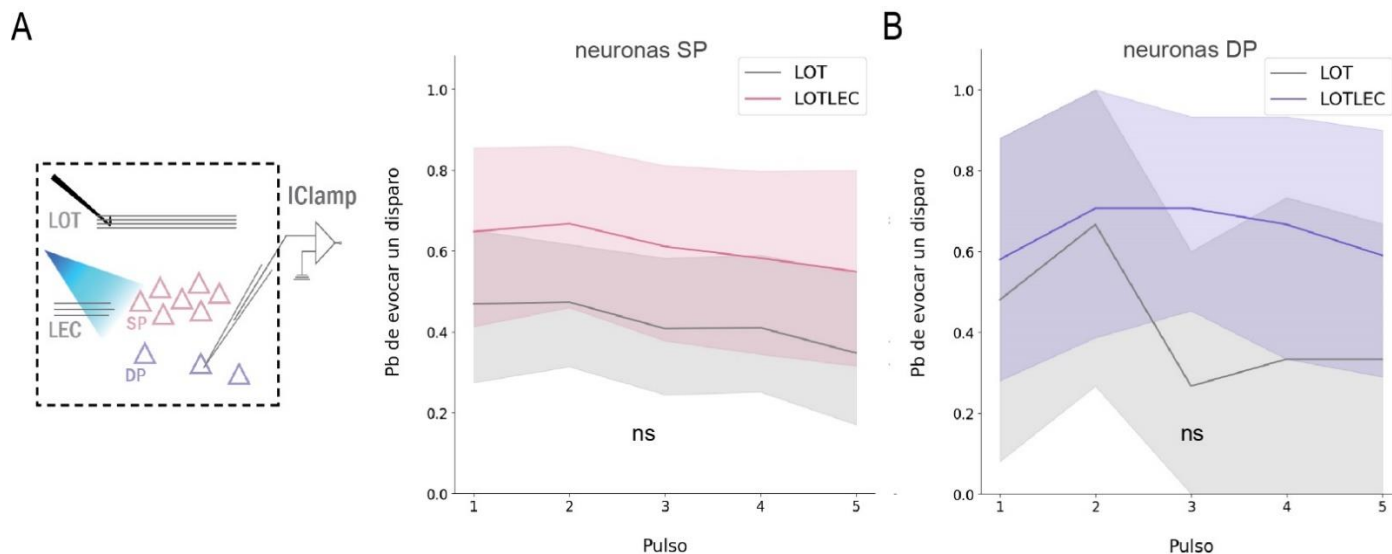


Figura 1.2.2. Probabilidad de disparo de PA a lo largo de un tren de estimulación de LOT versus LOT+LEC. **A**, Esquema del experimento. Se registran neuronas SP y DP en *whole-cell, current-clamp*; se estimula eléctricamente LOT y optogenéticamente las terminales de la LEC. **B-C** Probabilidad de evocar al menos un PA en respuesta a cada pulso del tren de estimulación para neuronas SP (**A**) y neuronas DP (**B**). No se encontraron diferencias significativas entre la estimulación única de LOT y la estimulación conjunta de LOT y LEC para ninguno de los dos casos (ANOVA 2 factores-medidas repetidas, SP: $p=0.1184$, $n_{SP}=15$; DP: $p=0.2861$, $n_{DP}=6$)

Otra forma en la que la LEC podría modular la respuesta a LOT es a través de la temporalidad de la respuesta de disparo. Como fue mencionado en la introducción, la inhibición es capaz de restringir temporalmente la ventana de sumación de entradas excitatorias que puede derivar en la generación de un PA. Siguiendo esta línea, un cambio en la inhibición del circuito podría afectar la latencia de los disparos de PA evocados.

Para explorar esta alternativa, calculamos las latencias desde la estimulación hasta la generación del PA. Dado que no todos los pulsos de estimulación evocan disparos, al analizar pulso por pulso el n resultaba muy pequeño para graficar una distribución, por lo cual decidimos agrupar las latencias de disparos correspondientes a los 5 pulsos del tren.

Como puede observarse en las Figuras 1.2.3.A y B, las latencias de disparo correspondientes a la población de neuronas SP no difirieron entre la estimulación única de LOT y la estimulación conjunta de LOT y LEC

(Prueba Kolmogorov-Smirnov para dos muestras: $p=0.6101$, $n_{total}=314$). En ambas distribuciones encontramos un máximo absoluto cerca de los 9 ms ($Max1_{LOT} = 8.71ms$, $Max1_{LOTLEC} = 8.55ms$) y un segundo pico mucho más pequeño alrededor de los 20ms ($Max2_{LOT}=19.13ms$, $Max2_{LOTLEC}=20.84ms$).

Para las neuronas DP, encontramos diferencias significativas entre ambas estimaciones como se muestra en las Figuras 1.2.3.C y D (Prueba Kolmogorov-Smirnov para dos muestras: $p=0.0016$, $n_{total}=159$). En este caso, hallamos dos picos para la distribución de latencias en respuesta a LOT ($Max1_{LOT} = 17.01ms$, $Max2_{LOT} = 11.93ms$) y uno solo para la distribución de LOT+LEC, coincidente con el segundo máximo de la distribución de LOT ($Max_{LOTLEC} = 11.11ms$).

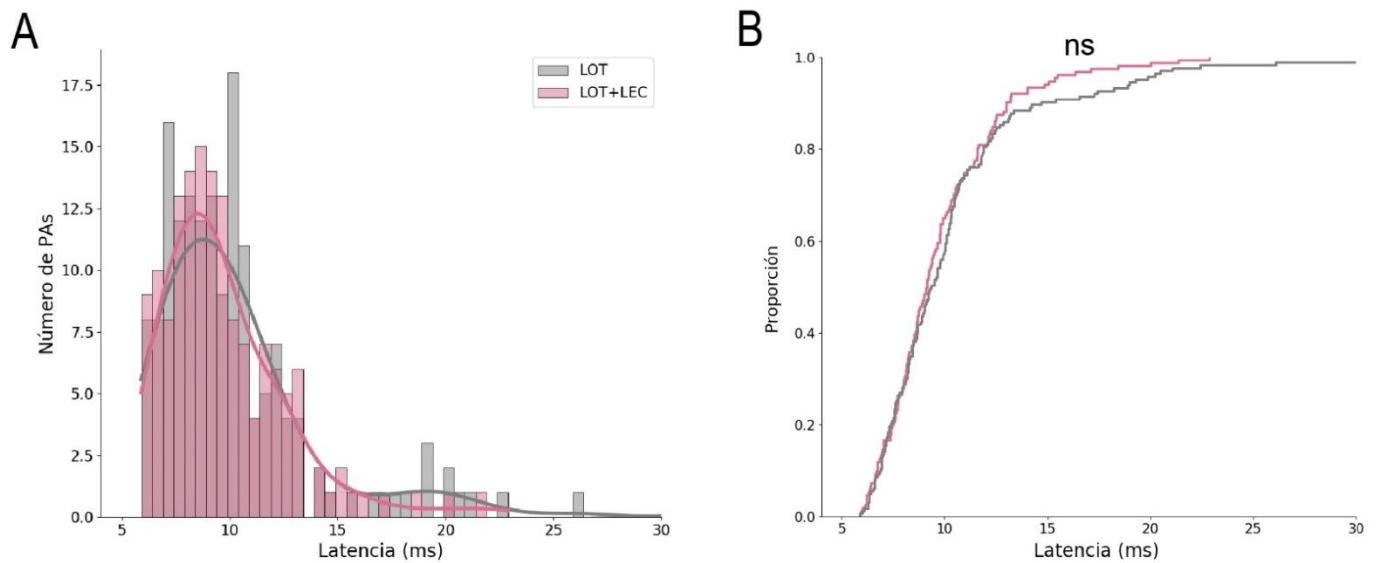
En resumen, observamos que la respuesta de las neuronas SP ante la activación de LOT, se conforma mayoritariamente por disparos de PA cerca de los 10 ms (que llamaremos “tempranos”), y esta respuesta se mantiene al estimular adicionalmente la LEC. En cuanto a las neuronas DP, observamos que hay un desplazamiento temporal de la mayoría de los disparos: mientras que la estimulación de LOT evoca principalmente disparos “tardíos” (alrededor de 20ms) y algunos disparos tempranos, la estimulación conjunta provoca una fuerte disminución de los disparos tardíos y un aumento de los tempranos.

Interpretamos que los disparos tardíos se deben principalmente a la actividad recurrente del sistema más que a la estimulación directa desde LOT. En este sentido, era de esperar observar mayores latencias en la respuesta de las neuronas DP ante LOT, ya que estas reciben entradas más débiles provenientes de esta vía de forma tal que el componente recurrente tiene mayor peso sobre ellas.

El efecto observado a partir de la activación de la LEC podría explicarse a través de un cambio en la inhibición de la red. Si la LEC activara directamente interneuronas, provocaría un aumento en la inhibición del circuito y consecuentemente, una reducción de la excitación recurrente. En este caso, las respuestas tempranas desencadenadas por la vía de LOT no se verían demasiado afectadas, pero sí veríamos una reducción de las respuestas tardías ocasionadas por la actividad recurrente del circuito. Esto coincide con lo registrado para las neuronas DP, que son las que más entradas recurrentes reciben.

Con el fin de explorar esta hipótesis, nos propusimos como siguiente paso, estudiar la respuesta a la activación de la LEC de dos poblaciones de interneuronas inhibitorias presentes en el microcircuito de la PC.

neuronas SP



neuronas DP

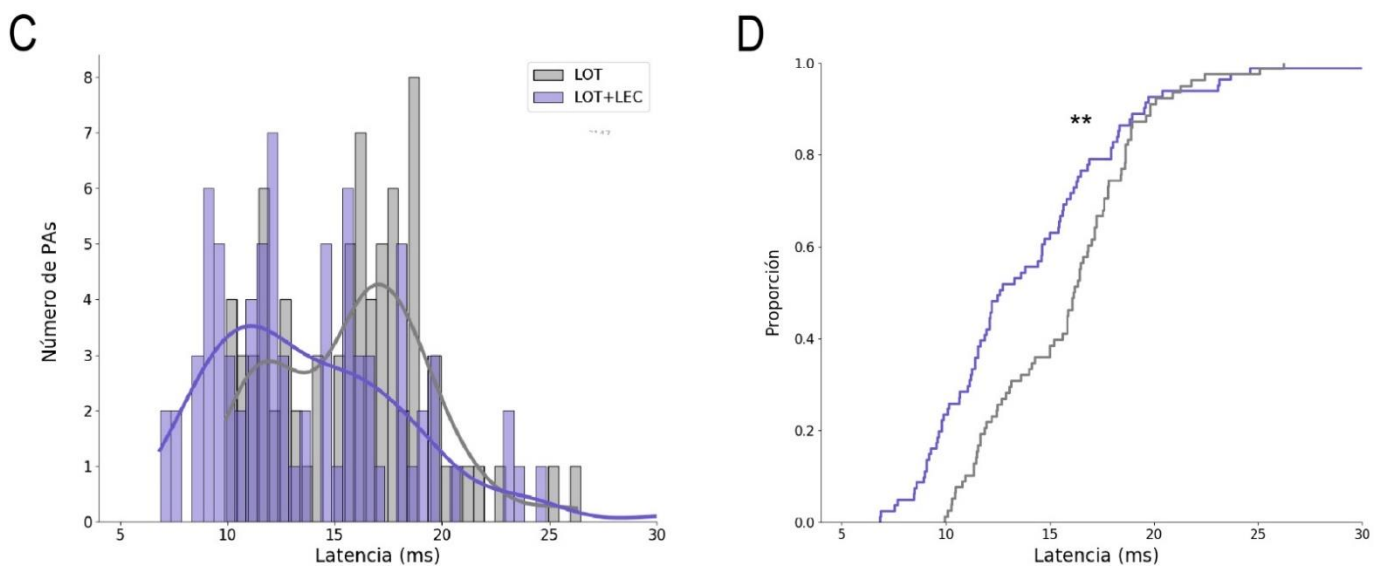


Figura 1.2.3. Distribución de las latencias de disparos de PA evocados por la estimulación de LOT versus LOT+LEC. A y C, Histogramas de distribución de las latencias desde la estimulación hasta la generación de un PA para las neuronas SP (**A**) y las neuronas DP (**C**). Los datos de los 5 pulsos del tren de estimulación se muestran agrupados. El ancho de cada bin fue fijado en 0.5ms. Las curvas representan la estimación de densidad del kernel. **B y D,** Distribución acumulativa de las latencias en respuesta a LOT versus LOT+LEC para las neuronas SP (**B**) y las DP (**D**). Las distribuciones fueron significativamente diferentes para neuronas DP pero no para las SP (Prueba Kolmogorov-Smirnov para dos muestras, SP: $s=0.0845$, $p=0.6101$, $n_{SP}=314$; DP: $s=0.2934$, $p=0.0016$, $n_{DP}=159$)

1.3. Respuestas evocadas por la activación de proyecciones excitatorias de la LEC en las interneuronas inhibitorias PV y SOM de la PC

A continuación, decidimos explorar las respuestas de corrientes excitatorias e inhibitorias evocadas por la activación optogenética de la LEC sobre dos poblaciones de neuronas gabaérgicas presentes en la PC: las neuronas *Parvalbumin+* y las neuronas *Somatostatin+*. Al igual que para las neuronas piramidales, hallamos que no todas las neuronas registradas mostraban respuestas de excitación e inhibición frente a la activación de la LEC. Decidimos entonces, cuantificar el porcentaje de neuronas PV y neuronas SOM en las que observamos cada tipo de respuesta.

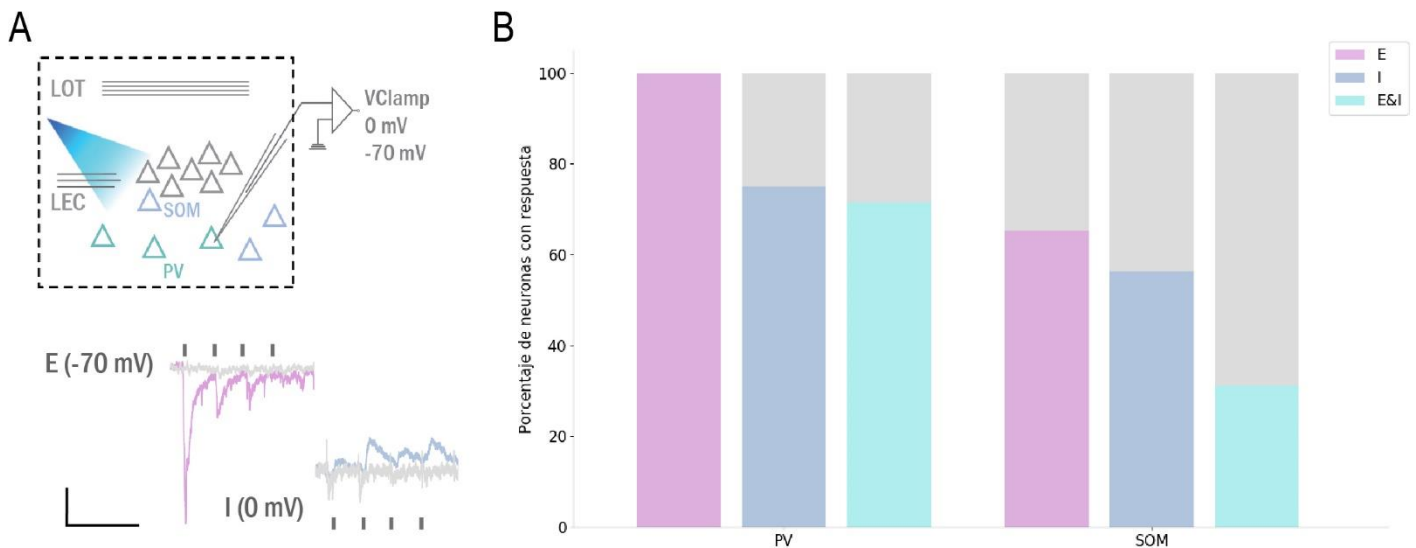


Figura 1.3.1: Porcentaje de interneuronas en las que se registraron corriente excitatoria (E), inhibitoria (I), o ambas (E&I) en respuesta a la estimulación optogenética de las proyecciones excitatorias de la LEC. A, ARRIBA: Esquema del experimento. Se registran neuronas PV y SOM (en distintos animales) en *whole-cell* a -70mV (para medir excitación) y a 0mV (para medir inhibición); se estimula optogenéticamente las terminales de la LEC. **ABAJO:** Trazos representativos de registros de una neurona SOM que responde con excitación (violeta), otra neurona SOM que responde con inhibición (azul), y dos neuronas (SOM y PV) que no responden (gris); se muestran los cuatro primeros pulsos del tren representados por las líneas negras; escala: x=250ms, y=20pA. **B,** Cada porcentaje fue calculado en base al total de neuronas registradas a -70mV para la excitación, a 0mV para la inhibición y a ambos voltajes para la excitación e inhibición. $PV_E=100\%$, $n_E=12$; $PV_I=75\%$, $n_I=8$; $PV_{E\&I}=71.43\%$, $n_{E\&I}=7$; $SOM_E=65.22\%$, $n_E=23$; $SOM_I=56.25\%$, $n_I=16$; $SOM_{E\&I}=31.25\%$, $n_{E\&I}=16$.

Encontramos que el total de las neuronas PV registradas a -70mV presentaba respuestas excitatorias frente a la estimulación de la LEC, mientras que una menor proporción de las neuronas SOM mostraba este tipo de respuestas ($PV_E=100\%$, $n_E=12$, $SOM_E=65.22\%$, $n_E=23$) (Figura 1.3.1). Hallamos que el porcentaje de

neuronas que recibe entradas inhibitorias en respuesta a la vía de LEC es menor para ambos tipos neuronales, aunque más alto que en las neuronas piramidales (Figura 1.1.1). Esto podría explicarse por una alta conectividad entre las interneuronas gabaérgicas del circuito.

Realizamos también, un análisis más detallado de las corrientes evocadas por las neuronas PV y SOM en respuesta a la vía de LEC. Así como procedimos para el caso de las neuronas piramidales, seleccionamos únicamente las neuronas con respuestas excitatorias para cuantificar la excitación evocada, y únicamente aquellas neuronas con respuestas inhibitorias para analizar la inhibición evocada.

Descubrimos que las interneuronas PV reciben corrientes excitatorias significativamente mayores que las registradas en las SOM a lo largo del tren de estimulación (Prueba t: $p=0.00365$, $n_{PV}=10$, $n_{SOM}=15$) (Figura 1.3.2). Así como planteamos para las neuronas piramidales, en este caso, existen varios escenarios que podrían explicar el resultado obtenido: 1) las neuronas PV podrían estar recibiendo mayor recurrencia excitatoria proveniente de las neuronas piramidales; 2) una mayor proporción de neuronas PV podría estar siendo contactada directamente por las proyecciones de la LEC; 3) las neuronas PV podrían estar recibiendo más entradas o entradas más fuertes desde la LEC. En la siguiente sección exploraremos algunas de estas alternativas en mayor profundidad.

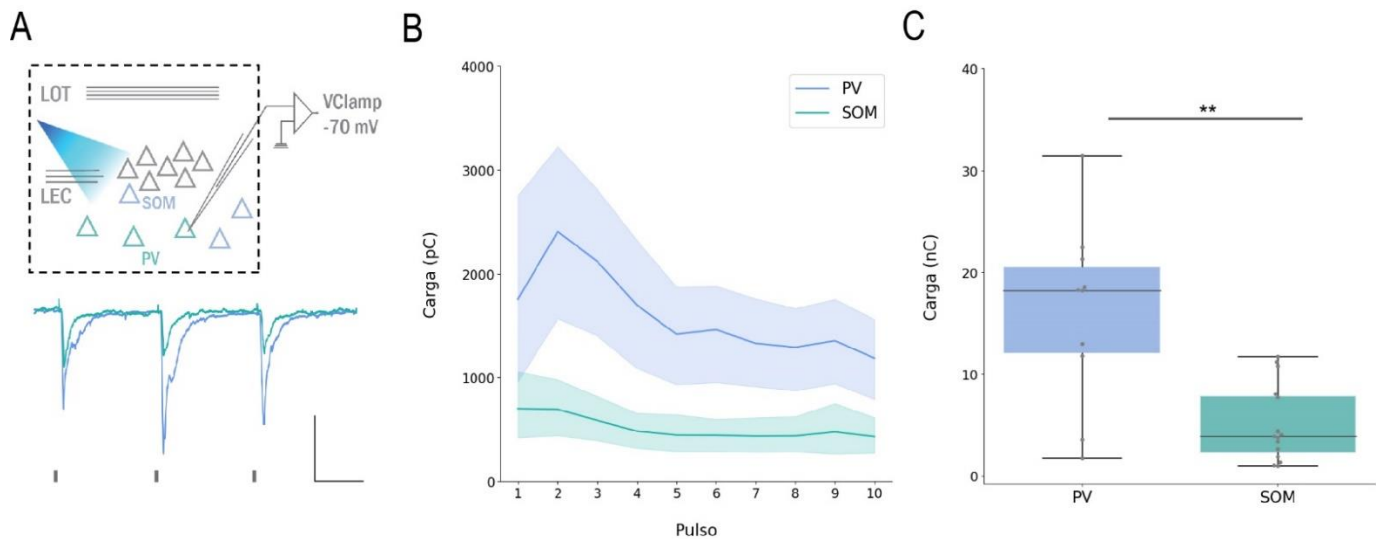


Figura 1.3.2: Carga excitatoria de interneuronas PV y SOM en respuesta a un tren de estimulación de la LEC. A, ARRIBA: Esquema del experimento. Se registran neuronas PV y SOM (en distintos animales) en *whole-cell* a -70mV; se estimula optogenéticamente las terminales de la LEC. **ABAJO:** Trazos representativos de registros de una neurona PV y una SOM (se muestran los tres primeros pulsos del tren representados por las líneas negras); escala: x=50ms, y=100pA. **B,** Carga excitatoria evocada por cada pulso del tren de estimulación optogenética para las dos poblaciones de interneuronas registradas, en valores absolutos. Cada curva corresponde a la media y desvío estándar. **C,** Total de la carga excitatoria a lo largo del tren. Cada punto

corresponde a la suma de la carga evocada por los 10 pulsos del tren para una neurona; las cajas indican mediana y cuartiles (Prueba t entre poblaciones: $p=0.0036$, $n_{PV}=10$, $n_{SOM}=15$).

Al estudiar la respuesta inhibitoria de las interneuronas PV y SOM, observamos que las corrientes reclutadas fueron similares para ambas poblaciones. Más precisamente, no pudimos determinar una diferencia entre las poblaciones (Prueba t: $p=0.5345$, $n_{PV}=5$, $n_{SOM}=9$) (Figura 1.3.3).

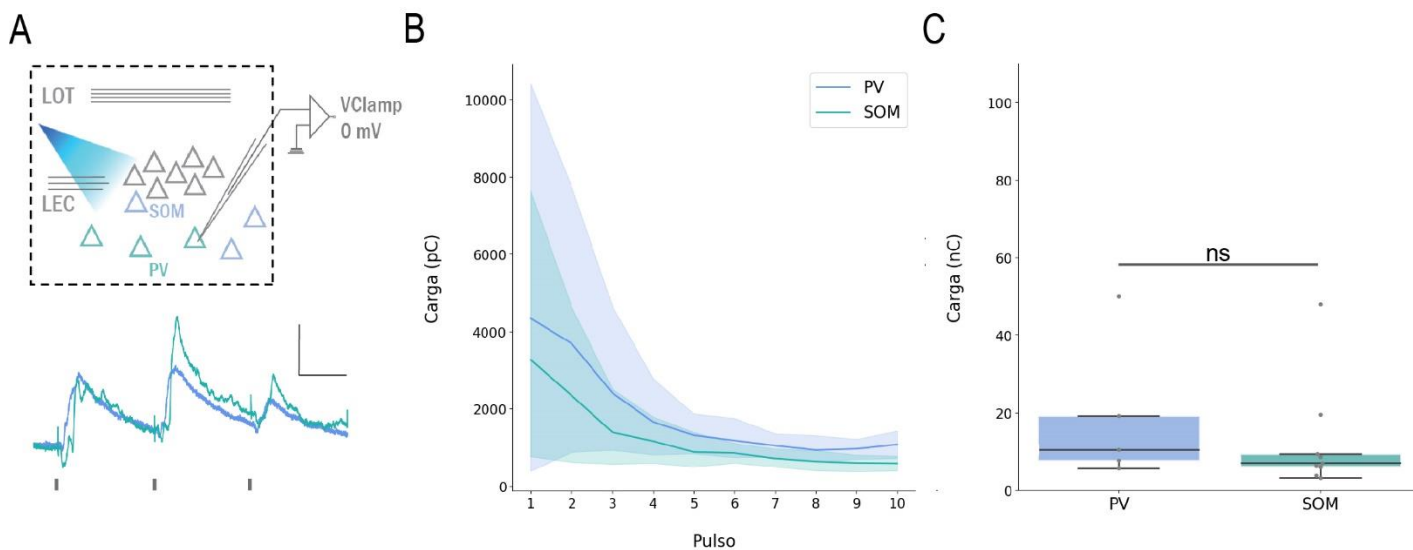


Figura 1.3.3: Carga inhibitoria de interneuronas PV y SOM en respuesta a un tren de estimulación de la LEC. A, ARRIBA: Esquema del experimento. Se registran neuronas PV y SOM (en distintos animales) en *whole-cell* a 0mV; se estimula optogenéticamente las terminales de la LEC. **ABAJO:** Trazos representativos de registros de una neurona PV y una SOM (se muestran los tres primeros pulsos del tren representados por las líneas negras); escala: $x=50\text{ms}$, $y=50\text{pA}$. **B,** Carga inhibitoria evocada por cada pulso del tren de estimulación optogenética para las dos poblaciones de interneuronas registradas. Cada trazo corresponde a la media y desvío estándar. **C,** Total de la carga inhibitoria a lo largo del tren. Cada punto corresponde a la suma de la carga evocada por los 10 pulsos del tren para una neurona; las cajas indican mediana y cuartiles (Prueba t entre poblaciones: $p=0.5345$, $n_{PV}=5$, $n_{SOM}=9$).

Por último, calculamos el balance tomando en cuenta todas las neuronas registradas a -70mV y 0mV de cada población. Como se muestra en la Figura 1.3.4, encontramos que la población de interneuronas SOM recibe más inhibición que excitación ante la activación de la LEC, resultando en un balance negativo (Prueba t: $p=0.0499$, $n=8$). Si bien el balance parece ser ligeramente positivo para las neuronas PV, no hallamos diferencias significativas entre el balance promedio a lo largo del tren con respecto a una media hipotética de 0.5 en la que excitación e inhibición estarían perfectamente balanceadas (Prueba t: $p=0.4631$, $n=6$).

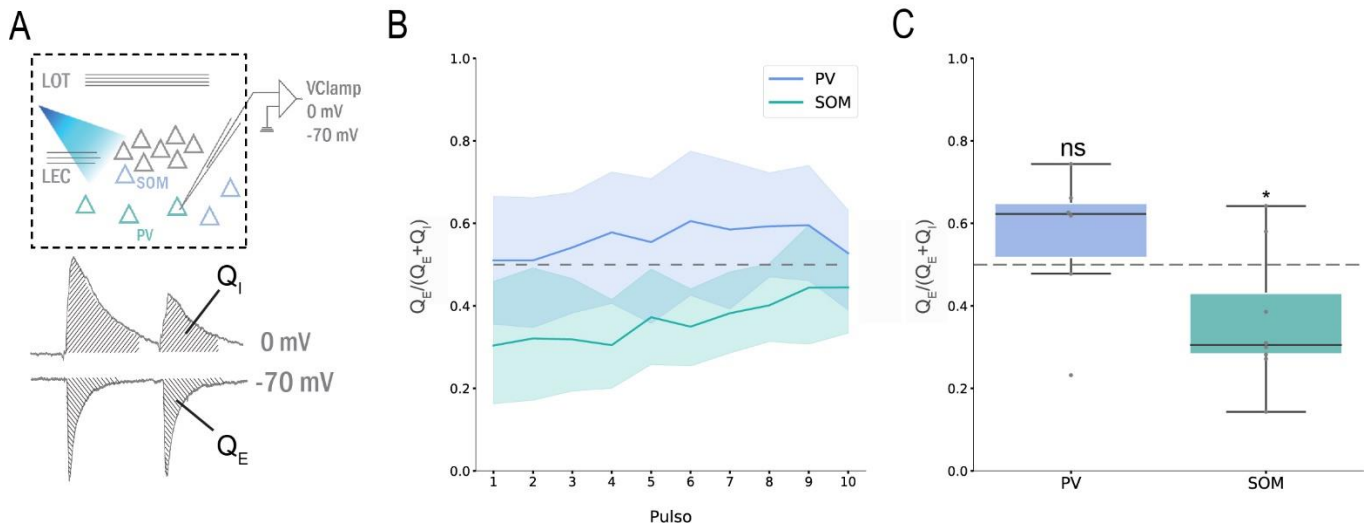


Figura 1.3.4: Balance excitación - inhibición para las poblaciones PV y SOM en respuesta a un tren de estimulación de la LEC. A, ARRIBA: Esquema del experimento. Se registran neuronas PV y SOM (en distintos animales) en *whole-cell* a -70mV y 0mV; se estimula optogenéticamente las terminales de la LEC. **ABAJO:** La carga se calcula como el área bajo la curva (Q_E : carga excitatoria; Q_I : carga inhibitoria). **B,** Balance expresado como la proporción de carga excitatoria sobre el total de carga evocada por 10 pulsos sucesivos de luz azul. Cada curva representa el promedio y desvío estándar correspondiente a cada población aquí estudiada. **C,** Promedio del balance en un tren de estimulación de la LEC para cada población. Cada punto corresponde al balance promedio de cada neurona; las cajas indican mediana y cuartiles (Prueba t para cada población, PV: $p=0.7853$, $n_{PV}=6$; SOM: $p=0.009$, $n_{SOM}=8$).

También comparamos el balance promedio entre poblaciones y en este caso, no obtuvimos diferencias significativas al calcular el balance a partir de la carga (Prueba t: $p=0.0655$) pero sí al calcularlo a partir de la amplitud del pico de la corriente (Prueba t: $p=0.0381$). Es probable que un aumento en el n de la población PV ayude a esclarecer este resultado. Sin embargo, nos inclinamos a pensar que las entradas excitatorias, aunque sea sutilmente, se imponen por sobre la inhibición para las neuronas PV. Esta hipótesis es respaldada por lo observado al analizar la salida de neuronas PV ante la estimulación de la LEC, como se detalla a continuación.

En un conjunto de neuronas, evaluamos la respuesta de disparo frente al mismo protocolo de activación de la LEC (10 pulsos de luz azul a 10Hz). Únicamente en la población de interneuronas PV, observamos una respuesta de disparos de PA. Ni las neuronas piramidales ni las interneuronas SOM mostraron, en general, este tipo de respuestas. En la Figura 1.3.5 se puede ver las respuestas de disparo en modalidad *cell-attached* registradas para la población PV.

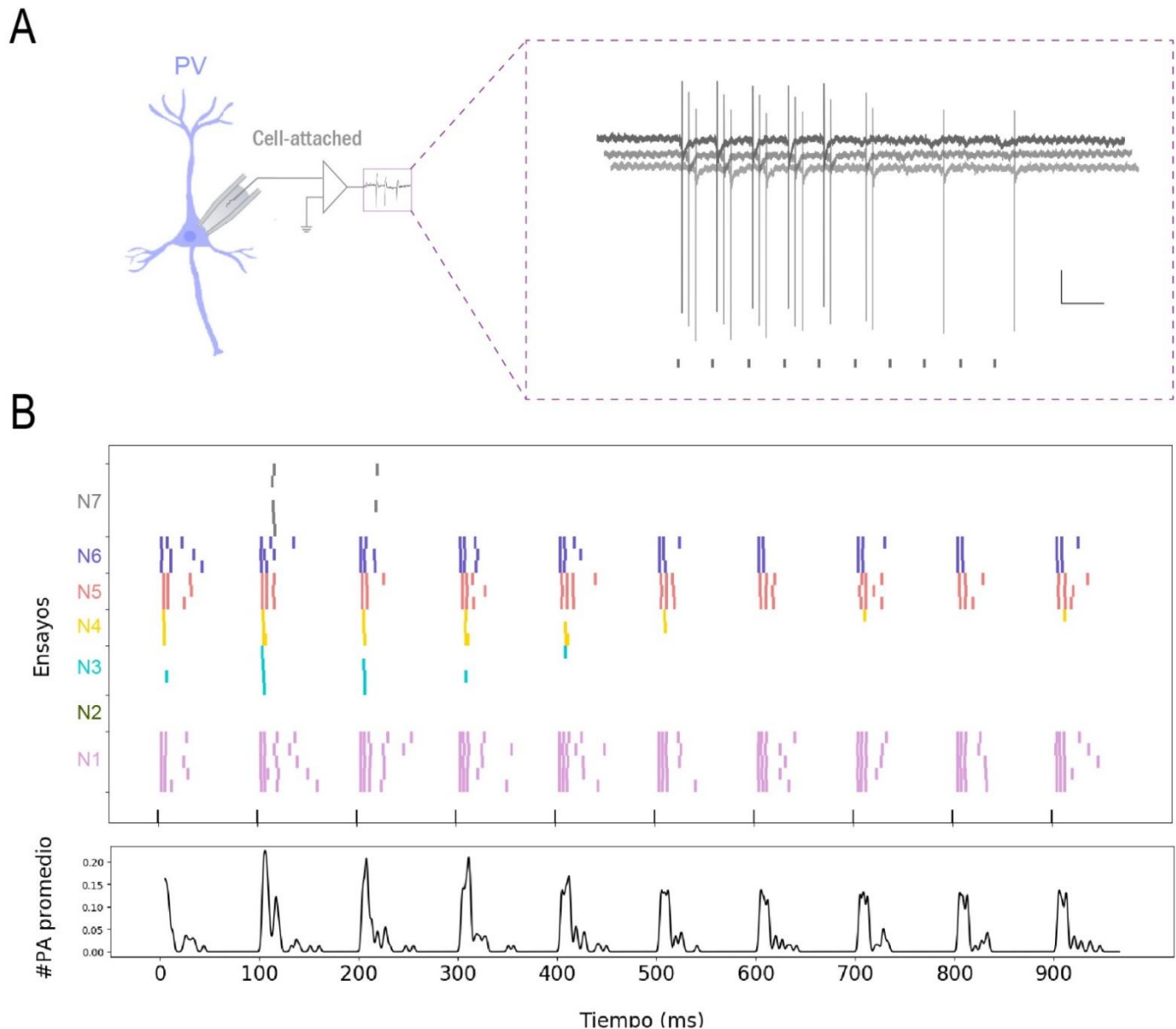


Figura 1.3.5: Respuesta de disparos de PA de neuronas PV. **A**, Trazos representativos correspondientes al registro en modalidad *cell-attached* de una neurona PV en respuesta a 10 pulsos de estimulación optogenética ilustrados por las líneas negras (se muestran tres repeticiones sucesivas). Escala: $x=125\text{ms}$, $y=50\text{pA}$. **B**, En el panel superior se muestra un *raster plot* en el que cada línea de color indica un disparo de PA y cada fila corresponde a un ensayo. Las neuronas se representan con colores diferentes. El tiempo cero corresponde al primer pulso del tren. Las líneas negras indican los tiempos de los 10 pulsos. En el panel inferior se puede ver un promedio de disparos en el tiempo.

Los resultados presentados en esta sección, sugieren que las neuronas PV reciben entradas excitatorias que se imponen sobre las entradas inhibitorias suficientemente como para evocar disparos de PA. En cuanto a las neuronas SOM, vemos que no solo no disparan en respuesta a la activación de la LEC, sino

que reciben entradas inhibitorias que se imponen sobre las entradas excitatorias, de modo que parecieran inhibirse en respuesta a la vía de LEC.

1.4. Mapa de conectividad de las proyecciones excitatorias de la LEC sobre las neuronas SP, DP, PV y SOM de la PC

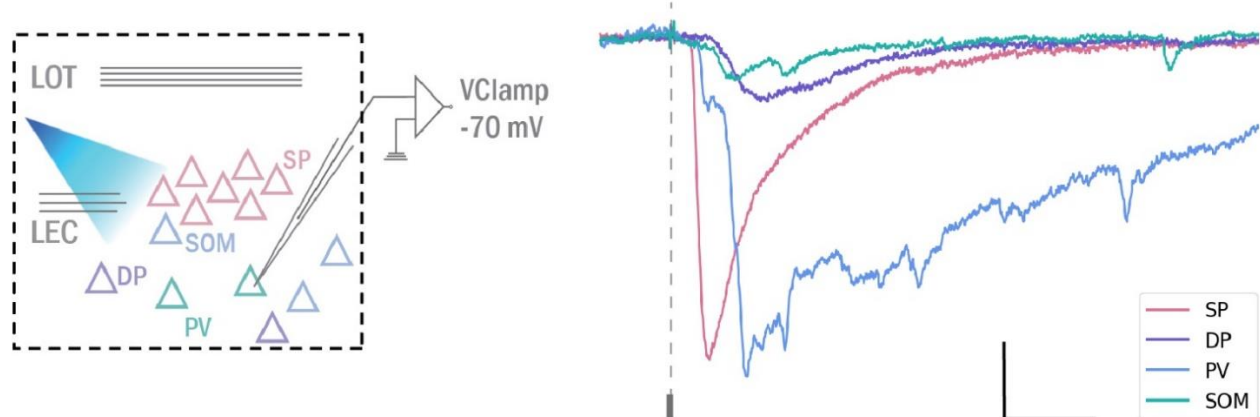
A raíz de las diferencias halladas en las respuestas excitatorias de las distintas poblaciones neuronales (SP, DP, PV y SOM) frente a la activación optogenética de la LEC, quisimos poner a prueba las hipótesis previamente planteadas en relación a una inervación diferencial de las proyecciones de la LEC.

En consiguiente, nos propusimos evaluar: en primer lugar, si existe alguna diferencia en la proporción de neuronas que recibe contactos directos de la LEC para cada población neuronal; en segundo lugar, si la entrada excitatoria directa sobre una neurona (que sería una combinación de la cantidad de contactos sinápticos y la fuerza de cada uno), depende del tipo neuronal.

Sabiendo que las respuestas directas tienen una latencia menor que las respuestas recurrentes, decidimos analizar la temporalidad de las corrientes evocadas por la estimulación optogenética para obtener evidencia a favor o en contra de la primera propuesta. Bajo esta premisa, y de acuerdo a los resultados previos, esperaríamos observar menores latencias para las neuronas SP y las neuronas PV que son las que muestran mayor excitación en respuesta a la vía de LEC, en comparación con las neuronas DP y SOM, respectivamente.

En la Figura 1.4.1.B se muestran las latencias agrupadas de los primeros 5 pulsos del tren separadas por población neuronal. De acuerdo a lo predicho, observamos que las neuronas SP responden con menor latencia que las neuronas DP (Prueba Kruskal-Wallis, múltiples comparaciones de Dunn: SP vs. DP: $p=0.0004$; $n_{SP}=119$, $n_{DP}=73$). También, encontramos que la latencia de las neuronas SP es indistinguible de la latencia de las PV y menor que la de las SOM (Prueba Kruskal-Wallis, múltiples comparaciones de Dunn: SP vs. PV: $p=0.0750$; SP vs. SOM: $p=0.0080$; $n_{PV}=60$, $n_{SOM}=35$).

A



B

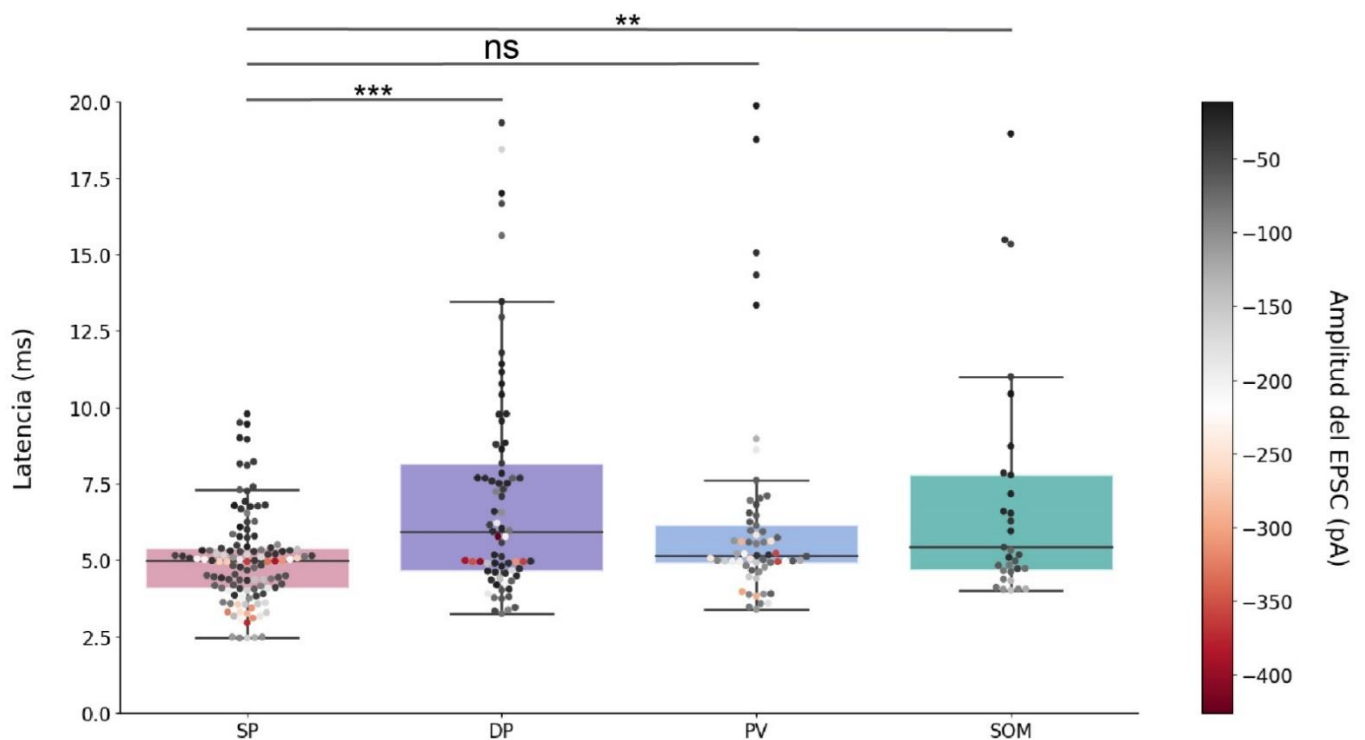


Figura 1.4.1: Latencia en la respuesta de EPSC frente a la estimulación de la LEC para las neuronas SP, DP, PV y SOM. A, IZQUIERDA: Esquema del experimento. Se registran neuronas SP, DP, PV y SOM (en distintos animales) en *whole-cell* a -70mV ; se estimula optogenéticamente las terminales de la LEC. **DERECHA:** Trazos representativos correspondientes a registros de EPSCs de los distintos tipos neuronales en respuesta a la activación optogenética de la LEC (se muestra el primer pulso del tren ilustrado por la línea negra). Escala: $x=12.5\text{ms}$, $y=50\text{pA}$. **B,** Latencias al inicio del EPSC para las distintas poblaciones de neuronas. Cada punto corresponde a un EPSC evocado por un pulso del tren; los primeros 5 pulsos se muestran agrupados. Las cajas indican

mediana y cuartiles (Prueba Kruskal-Wallis, SP vs. DP: $p=0.0004$; SP vs. PV: $p=0.0750$; SP vs. SOM: $p=0.0080$; $n_{SP}=119$, $n_{DP}=73$, $n_{PV}=60$, $n_{SOM}=35$). La escala de colores corresponde a la amplitud del pico de cada EPSC.

Pudimos observar también que las latencias de la población DP se distribuyen de una forma bimodal en la que una fracción de valores más bajos es comparable a las latencias de la población SP. ¿Podría indicar esto que una parte de las neuronas DP se halla directamente conectada con la LEC y otra parte responde únicamente a la recurrencia de la red?

Con el objetivo de obtener una noción más certera de lo que ocurre en el circuito, planteamos un nuevo experimento en el que agregamos al baño dos drogas cuya combinación nos permite diseccionar las corrientes monosinápticas evocadas por la LEC: Tetrodotoxina (TTX) y 4-aminopiridina (4-AP). TTX bloquea los canales de sodio voltaje-dependientes, previniendo disparos de PA, mientras que 4-AP bloquea canales de Potasio ayudando a mantener despolarizadas las membranas celulares, y así promover la liberación de neurotransmisor desde las terminales estimuladas optogenéticamente (Figura 1.4.2.A). En la condición con drogas en el baño, registramos distintas neuronas correspondientes a las 4 poblaciones estudiadas y determinamos si respondían o no estableciendo un umbral de mínima respuesta (-15pA). Luego, calculamos el porcentaje de neuronas que recibe contactos sinápticos directos desde la LEC y observamos que, de acuerdo a lo esperado, la mayoría de las neuronas SP y PV, mientras que solo la mitad de las neuronas DP y aún una menor proporción de las SOM, reciben entradas monosinápticas (SP=80%, $n=15$; PV=90.91%, $n=11$; DP=44.44%, $n=9$, SOM=25%, $n=4$) (Figura 1.4.2.B). La reducción en la amplitud de la corriente para cada neurona, junto con ejemplos representativos se muestra en la Figura 1.4.3.A y B.

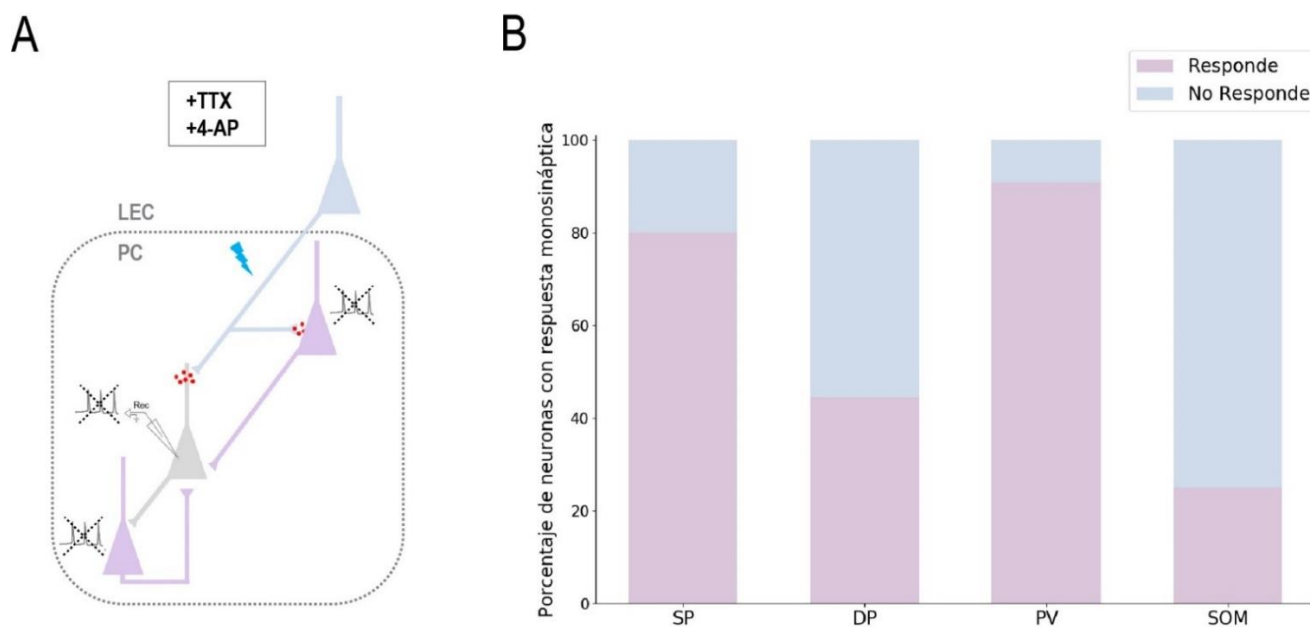


Figura 1.4.2: Porcentaje de neuronas con respuesta monosináptica a la estimulación de la LEC. **A**, Esquema que ilustra la estrategia para registrar únicamente respuestas monosinápticas. Con el agregado de las drogas TTX y 4-AP, se elimina la actividad recurrente del circuito. **B**, Porcentaje de neuronas en las que se registró respuesta excitatoria en la condición con drogas en el baño. SP=80%, n=15; DP=44.44%, n=9; PV=90.91%, n=11; SOM=25%, n=4.

Estos resultados coinciden con lo observado anteriormente en las latencias de los EPSCs: las poblaciones SP y PV muestran menores latencias y mayor proporción de neuronas directamente conectadas con la LEC; la población DP presenta una distribución bimodal de latencias que se condice con un porcentaje intermedio de neuronas directamente conectadas; y la población SOM revela altos valores de latencia y un bajo porcentaje de neuronas que reciben contactos directos de la LEC.

En conjunto, los resultados obtenidos respaldan la primera hipótesis planteada de que una mayor excitación sobre las neuronas SP y PV se debe a una mayor invasión de las proyecciones excitatorias de la LEC sobre estos tipos neuronales en relación a las poblaciones DP y SOM. Para evaluar la segunda hipótesis planteada, seleccionamos únicamente las neuronas con respuesta monosináptica y comparamos la amplitud de las corrientes directas (Figura 1.4.3.C). Dado que las poblaciones DP y SOM se hallan poco conectadas, obtuvimos muy pocas neuronas con respuesta para realizar esta comparación estadísticamente ($n_{DP}=4$, $n_{SOM}=1$). A grandes rasgos, pareciera que la respuesta directa de las SP y PV son mayores que las respuestas de las DP y SOM respectivamente, aunque habría que aumentar el n muestral para poder afirmarlo.

En conclusión, con estos resultados no podemos validar o refutar la hipótesis de que las entradas excitatorias directas son más grandes sobre las neuronas SP y PV.

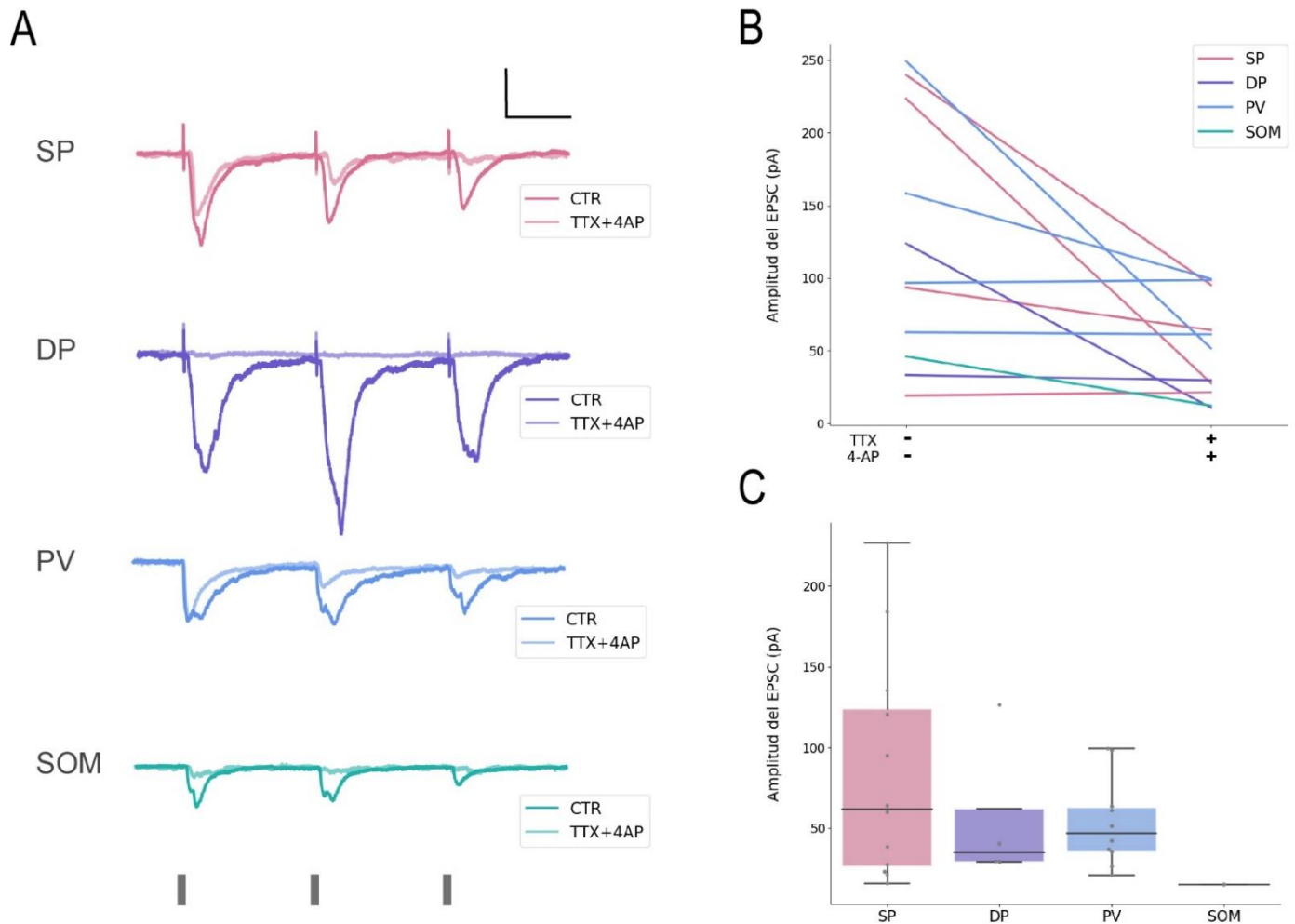


Figura 1.4.3: Magnitud de la respuesta monosináptica a la estimulación de la LEC para cada tipo neuronal. **A**, Trazos ejemplo de EPSCs de una neurona por población, antes y después de la infusión de las drogas TTX y 4-AP al baño. Escala: $x=50\text{ms}$, $y=50\text{pA}$ **B**, Amplitud del pico de la corriente excitatoria antes y después de la infusión de las drogas al baño. Los colores se asocian con el tipo neuronal. **C**, Amplitud del primer pico de la corriente evocada directa (luego de la infusión de drogas) para cada tipo neuronal. Se incluyen únicamente aquellas neuronas en las que se detectó respuesta monosináptica y se considera solo el primer pulso. No se revelaron diferencias significativas entre grupos (Prueba de Kruskal-Wallis: $S=$, $p=0.3704$; $n_{SP}=12$, $n_{DP}=4$, $n_{PV}=10$, $n_{SOM}=1$)

1.5. Exploración de posibles mecanismos de plasticidad de la LEC en el microcircuito de la PC

En las secciones previas, mostramos que las proyecciones excitatorias de la LEC contactan diferencialmente a las neuronas del microcircuito de la PC y provocan un fuerte efecto inhibitorio sobre la recurrencia de la red. Estos resultados sugieren que el procesamiento de la información olfativa se vería alterado al ocurrir en simultáneo con una señal proveniente de la LEC.

A partir de esto, nos preguntamos si podría darse algún cambio a corto, mediano o largo plazo en el sistema, desencadenado por la acción de la LEC en asociación con la vía de LOT. En este sentido, nos propusimos explorar posibles mecanismos de plasticidad a nivel del microcircuito de la PC.

Como fue mencionado en la introducción, se conocen algunas formas de LTP en la corteza piriforme. Se sabe que es posible facilitar LTP asociativo entre la vía de LOT y la vía recurrente (en ambos sentidos), solo si se bloquea la inhibición a nivel de las dendritas en capa Ib⁵⁷. También fue reportado que se facilita la vía recurrente con un protocolo de LTP asociativo en conjunto con la vía de LOT, en presencia del agonista colinérgico, carbachol⁶⁰.

Dado que la acetilcolina forma parte de muchos mecanismos de plasticidad sináptica en el cerebro ligados a atención, pero también a aprendizaje y memoria, decidimos realizar varios de los experimentos de plasticidad entre las vías LEC y LOT en presencia de carbachol. Diseñamos distintos protocolos para poner a prueba si la asociación de la vía de LOT con la de LEC podía dar lugar: 1) a una potenciación de la vía de LOT; o 2) a una potenciación de la vía de LEC.

Nos enfrentamos con algunas complicaciones técnicas vinculadas a la forma de estimulación optogenética. Por un lado, no pudimos estimular a frecuencias más altas que 40 Hz debido a la cinética de la opsina. Por otra parte, como fue mencionado previamente, no logramos realizar una estimulación “fuerte”, es decir, que evocara una respuesta supraumbral debido a las características del LED empleado. Teniendo en cuenta estas dificultades y basándonos en la bibliografía, planteamos un protocolo de LTP en el que combinamos una estimulación optogenética de la LEC de 16 pulsos a máxima intensidad y a una frecuencia de 40 Hz, con una estimulación eléctrica de LOT de 4 pulsos a intensidad umbral y a 100 Hz (Figura 1.5.1.A).

En primer lugar, evaluamos si ocurría una facilitación sobre la vía de LOT. Para ello, dimos 1 pulso prueba cada 60 segundos a una intensidad fijada a la mitad de la intensidad umbral. Una vez obtenida una línea de base estable, estimulamos con el protocolo de LTP asociativo y, posteriormente, registramos la respuesta de LOT por varios minutos. Como se retrata en la Figura 1.5.1.B, no observamos cambios robustos a corto o mediano plazo. Repetimos el experimento agregando el agonista carbachol al baño y tampoco encontramos cambios en la transmisión sináptica en este caso (Figura 1.5.1.C).

Finalmente, quisimos evaluar si la potenciación podía darse sobre las terminales de la LEC. Para ello tomamos una línea de base estimulando mínimamente la vía de LEC en presencia de carbachol. Una vez estabilizada la respuesta, aplicamos el mismo protocolo de LTP, y registramos en los minutos posteriores, la respuesta a la vía de LEC. No detectamos cambios considerables a corto o mediano plazo.

Muchas variables entran en juego a la hora de diseñar un experimento de plasticidad. En este caso, intentamos obtener un primer panorama, imitando los protocolos existentes de LTP en la PC asociando la vía de LOT con la vía recurrente. Sin embargo, muchas otras alternativas pueden ser exploradas aún, algunas de las cuales serán presentadas en la sección de discusión.

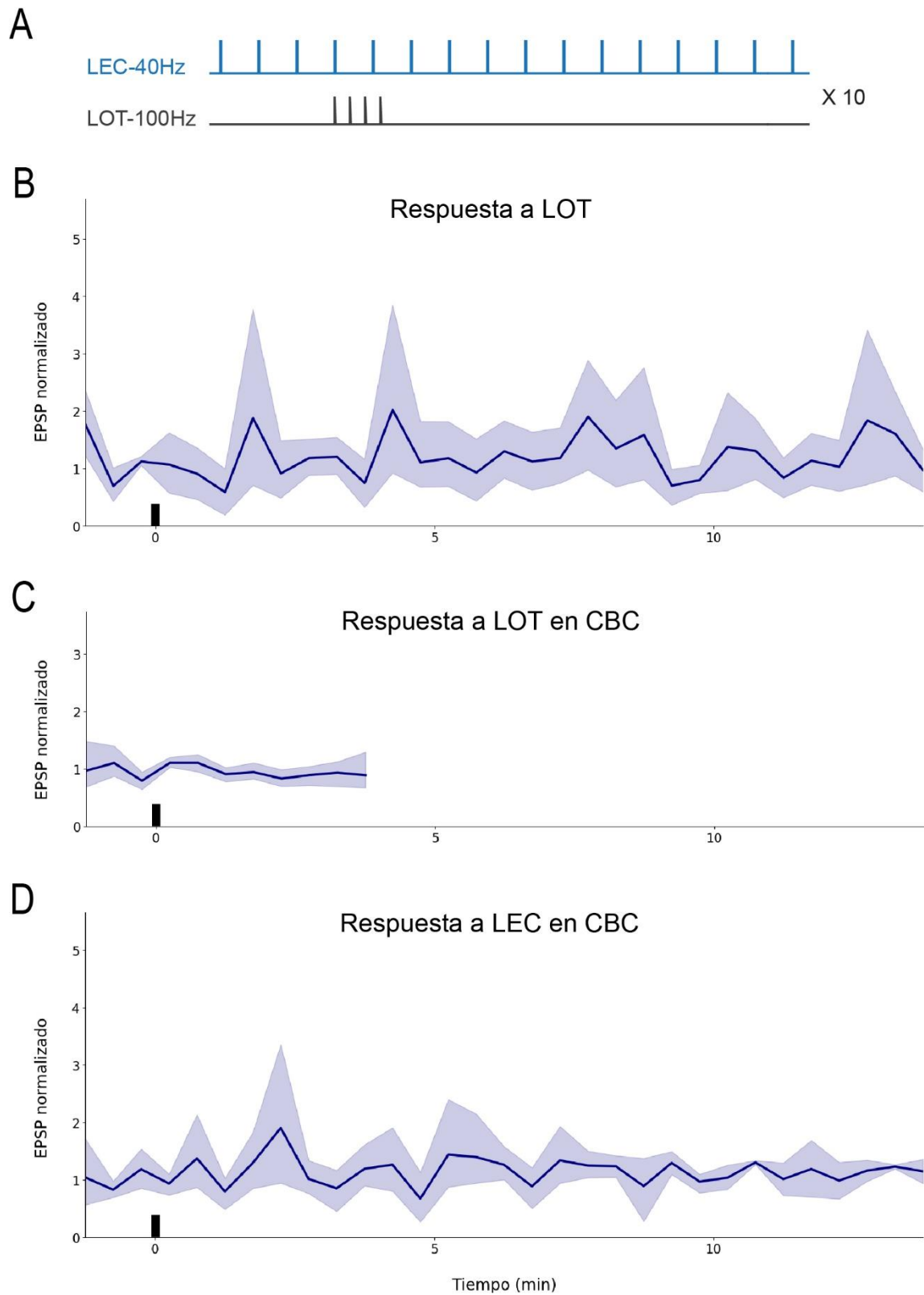


Figura 1.5.1: Protocolos de LTP asociativo entre las vías LOT y LEC: A, Esquema ilustrativo del protocolo de LTP asociativo. La vía de LOT fue eléctricamente con 4 pulsos a 100Hz mientras que la vía de LEC fue estimulada optogenéticamente con 16

pulsos a 40 Hz. Se realizaron 10 repeticiones cada 450 ms. **B, C,D**, Respuesta promedio de la amplitud del EPSP normalizado al promedio de los primeros pulsos previos al protocolo de LTP. La línea negra en $t=0$ indica el momento en el que se estimula con el protocolo de LTP. **A**, Respuesta a LOT ($n=6$). **B**, Respuesta a LOT posterior a la infusión de Carbachol (CBC) en el baño ($n=6$). **C**, Respuesta a LEC posterior a la infusión de Carbachol en el baño ($n=7$).

A continuación, decidimos explorar los efectos de la modulación colinérgica *per se* sobre las aferencias de la LEC. Para ello, agregamos carbachol al baño mientras registrábamos las respuestas a la estimulación de LOT y de la LEC en neuronas SP. En primer lugar, observamos, en línea con lo previamente reportado, que la respuesta a LOT no se ve afectada por la presencia de carbachol (Figura 1.5.2.A). Por el contrario, detectamos una fuerte reducción de la respuesta a la vía de LEC (Figura 1.5.2.B). Ante estos resultados, nos preguntamos si la disminución detectada se debía a una reducción en la entrada directa de la LEC o, por el contrario, en la fracción dada por la recurrencia del circuito.

Para dilucidar esto, agregamos al baño el conjunto de drogas TTX y 4-AP utilizado anteriormente con el fin de diseccionar las entradas monosinápticas. Si bien el n que obtuvimos es pequeño, no parece haber cambios sobre la porción directa de la respuesta a la activación de la LEC (Figura 1.5.2.C). En resumen, pareciera que la reducción observada bajo el efecto de carbachol no se debe a una disminución en la respuesta directa a la LEC, sino en la fracción recurrente. Como se discutirá en la siguiente sección, esto podría indicar que en circunstancias en las que se libera acetilcolina en la PC, las señales provenientes del OB y de la LEC se imponen por sobre la señal de la vía recurrente.

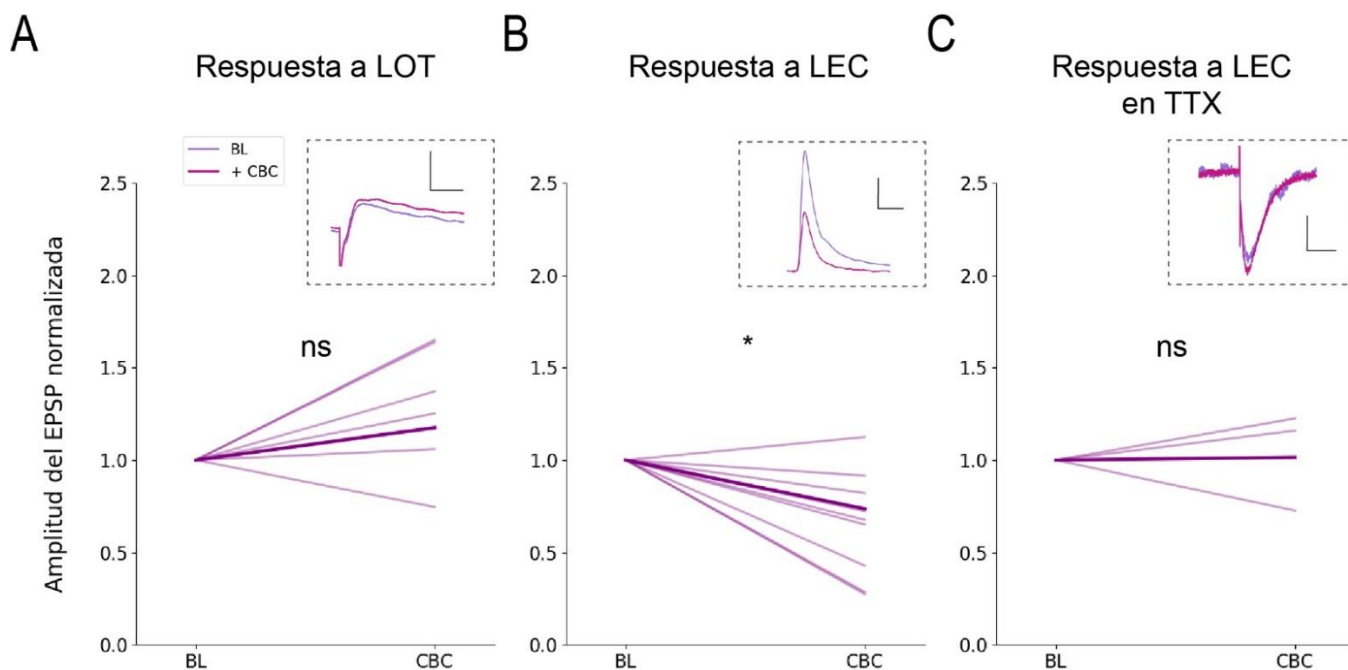


Figura 1.5.2: Efecto de Carbachol sobre la respuesta a las vías de LOT y LEC. **A**, Amplitud del EPSP normalizado al promedio de EPSPs basales, es decir, previos al agregado de CBC (BL) en respuesta a la estimulación de LOT (**A**) y LEC (**B**). **RECUADROS**: Trazos representativos de EPSPs antes y después del agregado de CBC. Escala: $x=25\text{ms}$, $y=2\text{mV}$. **C**, Amplitud del EPSC normalizado a los EPSCs basales (con TTX y 4-AP). **RECUADRO**: Trazo representativo de EPSCs antes y después del agregado de CBC. Escala: $x=25\text{ms}$, $y=10\text{pA}$. (Prueba t pareada, LOT: $p=0.1422$, $n=7$; LEC: $p=0.0348$, $n=9$, LEC_{TTX} : $p=0.9335$, $n=3$).

Discusión - Parte 1

La corteza piriforme es activada por las aferencias sensoriales que llegan a través de LOT y por las fuertes conexiones recurrentes entre sus neuronas principales. La interacción entre ambas vías determina la actividad del circuito en respuesta a estímulos olfativos. Se sabe, además, que las distintas poblaciones de neuronas excitatorias de la PC integran ambos tipos de entradas en diferentes proporciones. La vía de LOT contacta más fuertemente a neuronas principales superficiales mientras que la vía ASSN lo hace sobre neuronas profundas²⁷.

Por otro lado, así como en otras cortezas cerebrales, las aferencias excitatorias se hallan estrechamente reguladas por circuitos inhibitorios de tipo *feedforward* y *feedback*^{15,18}. Las interneuronas PV, ubicadas en su mayoría en capa III, proveen gran parte de la inhibición recurrente y lo hacen contactando

perisomáticamente a todas las clases de neuronas principales (mayormente a las DP). Las interneuronas SOM también juegan un papel importante en la inhibición recurrente estableciendo sinapsis a nivel de las dendritas de las neuronas principales, en capa Ib⁵⁰.

En este trabajo nos propusimos estudiar cómo se integra en el circuito de la PC, la aferencia proveniente de la LEC que podría aportar información del contexto espacial a la representación de objetos olfativos en la PC. Para ello, activamos selectivamente las proyecciones de neuronas excitatorias de la LEC utilizando optogenética, y exploramos las respuestas de distintas poblaciones neuronales, excitatorias e inhibitorias, que conforman el microcircuito de la PC. Además, investigamos la conectividad de esta entrada, cuantificando la proporción de neuronas de cada población que recibe contactos monosinápticos de la LEC. Por otra parte, quisimos investigar la interacción entre la entrada de LOT y de la LEC, y posibles mecanismos de plasticidad en estas vías.

Encontramos que la estimulación de la LEC evoca grandes corrientes excitatorias tanto en las neuronas SP como en las interneuronas PV (Figura 1.1.2 y Figura 1.3.2). Esto produce un desbalance positivo de las entradas excitatorias en relación a las inhibitorias (Figura 1.1.4 y Figura 1.3.4) que, para el caso de las PV, da lugar a una respuesta de disparo de PAs (Figura 1.3.5). Observamos un efecto opuesto sobre las neuronas DP y las interneuronas SOM. En estas dos poblaciones, las corrientes excitatorias son significativamente más pequeñas que las de SP y PV respectivamente, y las corrientes inhibitorias se imponen resultando en un balance E/I negativo (Figura 1.1.4 y Figura 1.3.4).

Planteamos distintos escenarios que pudiesen explicar estos resultados teniendo en cuenta que: 1) el total de excitación evocada corresponde a la suma de la excitación directa y la recurrente; 2) la inhibición es únicamente recurrente dado que la activación optogenética se da a nivel de las proyecciones excitatorias.

En primer lugar, pensamos que la diferencia en las corrientes evocadas podría deberse, no a la entrada directa de la LEC, sino a la entrada recurrente que recibe cada población, determinada por la conexión entre las neuronas del microcircuito. Es decir, los resultados se explicarían si las neuronas SP y PV recibieran mayores entradas excitatorias de la vía ASSN, que las neuronas DP y SOM. La segunda alternativa que especulamos explica los resultados a partir de una inervación diferencial de las proyecciones de la LEC hacia los distintos tipos neuronales de la PC. Bajo esta hipótesis, las poblaciones de neuronas SP y PV recibirían mayor proporción de contactos directos desde la LEC que las de DP y SOM. Y, por último, un tercer escenario posible (y no-excluyente) sería que las entradas de la LEC fuesen más fuertes sobre neuronas SP y PV en comparación con las DP y SOM. Esto podría darse a través del establecimiento de mayor cantidad de contactos sinápticos sobre la misma neurona y/o mayor liberación de neurotransmisor por sinapsis.

La primera hipótesis fue contrastada con antecedentes bibliográficos, y rechazada luego de constatar, por un lado, que la vía intracortical tiene mayor impacto sobre las neuronas DP que sobre las SP²⁷; y por otro, que las fibras intracorticales reclutan en mayor medida interneuronas inhibitorias que otras neuronas principales glutamatérgicas^{15,16}.

El segundo escenario lo pusimos a prueba con los experimentos de TTX+4-AP, en los que disecamos los contactos monosinápticos de la LEC. Encontramos una inervación diferencial que va en línea con esta hipótesis: las poblaciones SP y PV se hallan más conectadas directamente desde la LEC (80% y 91% de las neuronas registradas, respectivamente) que las neuronas DP y SOM (44% y 25%, respectivamente), lo cual podría explicar las grandes corrientes excitatorias sobre las primeras (Figura 1.4.2.B).

De acuerdo con la tercera y última hipótesis, del total de neuronas directamente conectadas, las SP y PV recibirían mayor cantidad de contactos sinápticos por neurona y/o sinapsis más fuertes (lo cual se evidenciaría en corrientes directas más grandes). Si bien pareciera haber una tendencia coincidente con esta propuesta (Figura 1.4.3.C), habría que aumentar el tamaño muestral para poder respaldarla o refutarla.

En conclusión, hemos constatado que la LEC inerva preferentemente neuronas SP y PV y, por consiguiente, se observa una gran respuesta excitatoria evocada en estas neuronas. En el caso de las PV, si bien el balance E/I que calculamos no es significativamente positivo, la entrada de la LEC resulta suficiente para suscitar una respuesta de disparo de PAs. Cabe aclarar, que la forma en la que calculamos el balance contempla la carga de las corrientes en una ventana temporal, pero no tiene en cuenta la dinámica temporal dentro de esa ventana. Es decir, si existe un desfase temporal entre las corrientes excitatoria e inhibitoria, el valor del balance que calculamos no lo captura. Por lo cual, y dado que sabemos que la latencia de la excitación es menor que la de la inhibición (debido al componente directo), es probable que esto explique la respuesta de disparo en las neuronas PV: la excitación rápida generaría la despolarización supraumbral, y la inhibición más tardía controlaría el *jitter* de la respuesta de disparo.

Por otra parte, nos preguntamos en un sentido más funcional, cómo los cambios desencadenados por la actividad de la LEC modulan la respuesta de las neuronas de la PC a la estimulación sensorial proveniente de LOT. Para ello, evaluamos la respuesta de disparo de las neuronas piramidales frente a la activación de la vía de LOT y la comparamos con la respuesta frente a la activación conjunta de LOT y la LEC. Observamos un aumento en la respuesta de disparo de las neuronas SP, aunque el efecto más grande se vio al analizar las latencias.

Se sabe que la temporalidad de disparo de una célula en relación a otras neuronas, es un factor crítico en el circuito de la PC. *In vivo*, la inhibición global da lugar a estrechas ventanas temporales de oportunidad

para la generación de un PA¹⁶. Aquellas neuronas que alcanzan el umbral de disparo más tarde, son silenciadas por las conexiones inhibitorias^{16,18,23,48}.

Al estudiar la distribución de las latencias de disparo frente a la estimulación de LOT, observamos que ambas poblaciones neuronales mostraban un primer pico alrededor de los 10ms y un segundo pico alrededor de los 20ms, acorde con lo reportado en bibliografía²⁷. Adjudicamos esta bimodalidad de la distribución a la combinación de una respuesta temprana a la vía aferente de LOT y una respuesta tardía a la activación de la vía recurrente. En línea con esta idea, las neuronas SP que responden fuertemente a la vía aferente, muestran principalmente una respuesta temprana. Por el contrario, las neuronas DP, que responden más a la vía intracortical, manifiestan una respuesta mayormente tardía.

Al superponer la estimulación de LOT con la de la LEC, observamos un desplazamiento temporal en la distribución de los disparos hacia las respuestas tempranas. Para las neuronas SP, este desplazamiento fue sutil ya que inicialmente eran pocos los disparos tardíos. En cambio, para las neuronas DP, se vio una gran disminución de la respuesta tardía y un aumento de la respuesta temprana. Es decir, con la activación de la LEC, la respuesta a LOT se ajusta más y la recurrencia del circuito se silencia.

En conjunto, estos resultados nos permiten concluir que la LEC produce una fuerte activación de las interneuronas PV que inhiben a las neuronas principales, generando un silenciamiento de la vía recurrente. Como se demostró previamente²⁷, la inhibición recurrente tiene un mayor impacto sobre las neuronas DP lo cual coincide con el efecto negativo registrado en estas neuronas (Figura 1.1.4).

Paralelamente, ocurriría una desinhibición a nivel de las dendritas en capa Ib, dada por el silenciamiento de las interneuronas SOM. Esto podría provocar una mayor integración de las aferencias sensoriales y recurrentes, lo cual se traduciría en un aumento en la respuesta de disparo. También podría dar lugar a algún mecanismo de plasticidad. Recientemente se ha demostrado que la desinhibición de neuronas SOM facilita una potenciación a largo plazo de la vía intracortical luego de asociarse con una estimulación fuerte de la vía LOT⁵⁰. ¿Podría ser que en condiciones fisiológicas fuese la aferencia de la LEC responsable de esta desinhibición y habilitadora del LTP en la vía ASSN? Dado que la plasticidad en las sinapsis asociativas está vinculada con el aprendizaje de olores⁵ es posible imaginar un escenario en el que el contexto espacial en el que se presenta un olor (información presumiblemente aportada por la LEC) modifique la representación del mismo en la PC. En el futuro, haremos un experimento de LTP asociativo entre LOT y ASSN estimulando simultáneamente la aferencia de la LEC, para poner a prueba esta hipótesis.

En resumen, observamos que la aferencia de la LEC tiene un efecto diferencial sobre las poblaciones neuronales que componen el circuito de la corteza piriforme (Figura D-1). La activación de la inhibición mediada por las interneuronas PV genera una reducción en la excitación recurrente, es decir en la vía

ASSN. El silenciamiento de las interneuronas SOM produce, por el contrario, una desinhibición a nivel dendrítico que posibilitaría una mayor integración aferente. En síntesis, la actividad desencadenada por la activación de la LEC ocasiona una reorganización de las entradas al circuito por la cual, la vía de LOT parece imponerse por sobre la vía ASSN.

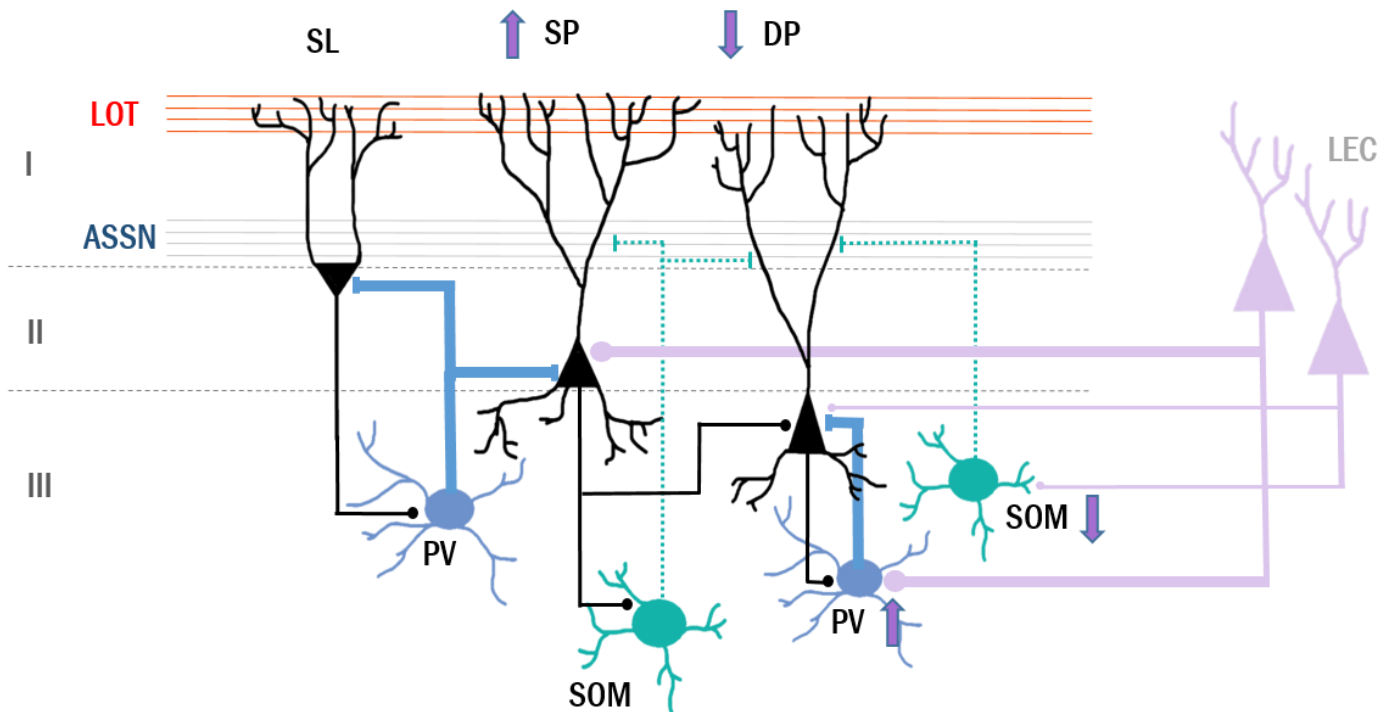


Figura D-1: Esquema de la integración de la aferencia de la LEC en el microcircuito de la PC.

En cuanto a los experimentos de plasticidad, si bien no logramos revelar mecanismos que expliquen cambios a largo plazo desencadenados por la LEC, aún queda un gran número de posibilidades para explorar en esta línea. Entre ellas, como fue mencionado anteriormente, la potenciación de la vía ASSN en asociación con LOT y simultánea activación de la LEC.

Por otra parte, el experimento que demuestra que el agonista colinérgico Carbachol no afecta la entrada de la LEC sugiere que, en procesos atencionales en los que se libera normalmente acetilcolina, las aferencias dominantes en el circuito de la PC no serían únicamente las olfativas provenientes del bulbo sino también las que arriban desde la LEC.

En este trabajo no pudimos describir la acción de las aferencias de la LEC sobre la tercera población de neuronas principales de la PC, las neuronas Semilunar. Sin embargo, dadas algunas características que

distinguen a esta población glutamatérgica de las otras (establecen contactos más fuertes con LOT, reciben escasa o nula aferencia recurrente excitatoria, no extienden proyecciones *feedback* al bulbo olfatorio), creemos que estudiarlas sería muy interesante y enriquecedor. Hoy en día, existe una línea transgénica de ratones para dirigir una proteína fluorescente a esta población neuronal y de ese modo, lograr identificarlas bajo el microscopio⁹⁵. Esperamos en el futuro, poder hacer uso de esta herramienta y continuar la exploración del efecto de la LEC sobre las neuronas Semilunar.

Además, si bien la investigación aquí descrita se centró en las proyecciones excitatorias de la LEC hacia la PC, no descartamos la existencia de proyecciones inhibitorias de largo alcance. Algunas pruebas preliminares dirigiendo ChR2 bajo un promotor de neuronas PV en la LEC, no evocaron respuesta en diversas neuronas registradas en la PC. Esto sugiere que las neuronas PV de la LEC no proyectan hacia la PC. Sin embargo, podría ser otro tipo de neuronas inhibitorias en la LEC las que envíen sus proyecciones axónicas hacia la PC. Habría que realizar más experimentos en esta línea para poder dilucidar esta alternativa.

Por último, si bien los experimentos que realizamos estimulando optogenéticamente la LEC resultan un tanto artificiales, prueban que la información proveniente de dicha región cerebral llega y es capaz de reorganizar el circuito de la PC. Dado que se han reportado otras frecuencias oscilatorias en la LEC (en los rangos beta y gamma)⁷⁶ asociadas a diferentes estados comportamentales, sería interesante evaluar en el futuro si la integración de esta aferencia en el circuito de la PC depende de la frecuencia.

A partir de estos descubrimientos, concluimos que el procesamiento olfativo a nivel de la corteza piriforme puede ser modulado por la actividad aferente de la corteza entorrinal lateral. ¿Qué clase de información aporta la LEC? ¿En qué circunstancias se vería activada esta entrada? ¿Resulta necesaria la aferencia de la LEC en la PC para la asociación de olores con contextos espaciales?

Todas estas son preguntas abiertas que no podemos responder con una estrategia *ex vivo*. En la siguiente parte del trabajo, nos enfocaremos en tratar de dilucidar la contribución de la LEC en la asociación entre olores y contextos espaciales *in vivo*. Comprendiendo mejor el rol de la LEC en el comportamiento, esperamos clarificar la naturaleza de sus proyecciones hacia la PC.

Parte 2: El rol de la corteza entorrinal lateral en una tarea comportamental de asociación entre olores y contextos espaciales

En la primera parte de este trabajo, mostramos cómo interactúan las proyecciones neuronales de la LEC con el microcircuito de la corteza piriforme. A continuación, quisimos explorar la naturaleza de la información transmitida por dichas proyecciones desde la LEC hacia la PC considerando que podría contribuir a la codificación de olores dependiente de la experiencia.

Como fue mencionado en la introducción, la LEC ha sido vinculada con algunos aspectos de la representación espacial. En particular, se ha probado que está involucrada en asociar características de un ambiente local⁷² y en la asociación de contextos espaciales con objetos o episodios⁶⁸. En este sentido, nos preguntamos si, en el marco de una tarea que involucra asociaciones entre olores y contextos espaciales, la LEC podría estar aportando información relevante para su resolución. Especulamos que esto podría suceder si en dicha región se procesara la discriminación de contextos espaciales y/o la propia asociación entre olores y contextos espaciales.

Con el fin de dilucidar el rol que cumple la LEC, entrenamos 11 ratones en una tarea comportamental que combina discriminación olfativa y contexto-espacial⁹³. Una vez que los animales fueran expertos en resolver la tarea, silenciamos de manera aguda dicha región cerebral y evaluamos el efecto de su inactivación en el comportamiento de los animales.

2.1. Aprendizaje de la tarea comportamental

En la tarea comportamental llevada a cabo (del tipo GO-NOGO), los ratones deben aprender a lamer para recibir una recompensa que es entregada únicamente cuando se presenta una combinación específica de un olor y un contexto espacial. Los animales son colocados en el dispositivo experimental sobre un rodillo y fijados desde la cabeza (en configuración *head-fixed*). Delante de ellos, se proyecta en una pantalla una realidad virtual asociada a su movimiento. De esta forma, a medida que los animales corren sobre el rodillo, avanzan por un pasillo virtual. Como se ilustra en la Figura 2.2.1.A, en cada ensayo los ratones avanzan por un corredor negro con puntos blancos, hasta llegar a uno de dos posibles contextos espaciales (CA o CB) señalizados por un color y patrón visual de paredes y piso diferentes al pasillo. Al ingresar a la zona del contexto, los animales reciben durante 1 segundo uno de dos olores posibles (O1 u O2) y es al salir, que deben dar la respuesta de lamido (GO) o no-lamido (NO-GO) acorde a la combinación olor-contexto

presentada en el ensayo. Este paradigma, incluyendo la tarea y el análisis comportamental, fue desarrollado y puesto a punto previamente en el laboratorio⁹³.

En los experimentos de esta tesis, elegimos el Olor 1 en el Contexto A como combinación recompensada, habiendo probado previamente que el comportamiento no depende de los estímulos seleccionados para la asociación recompensada. Otros experimentos, no incluidos en este trabajo, fueron realizados con la recompensa asociada al Olor 2 en el Contexto B, y los resultados obtenidos en la curva de aprendizaje fueron similares (Recuadro en Figura 2.2.1.B).

En primer lugar, realizamos una descripción del aprendizaje de los ratones para lo cual cuantificamos la proporción de respuestas correctas para cada tipo de ensayo (Figura 2.1.1). Como fue mencionado anteriormente, la respuesta correcta frente al tipo de ensayo recompensado (CA-O1), es lamer a la salida del contexto; mientras que, para las tres combinaciones restantes, la respuesta correcta es no lamer a la salida del contexto (Figura 2.1.1.C).

En la Figura 2.1.1.C, se muestra cómo progresa la proporción de respuestas correctas para cada tipo de ensayo a lo largo del aprendizaje. Dado que los animales están bajo un protocolo de restricción de agua que los mantiene sedientos, tienden a lamer con alta frecuencia como respuesta basal. Además, como detallamos en la sección de métodos, los animales pasan por una sesión de “habitación” previa al entrenamiento, en la que se les enseña a lamer en el dispositivo experimental. Esto explica la alta proporción de respuestas correctas para el tipo de ensayo recompensado (CA-O1) y la baja proporción para las tres combinaciones no-recompensadas (CB-O1, CA-O2, CB-O2) en la primera sesión.

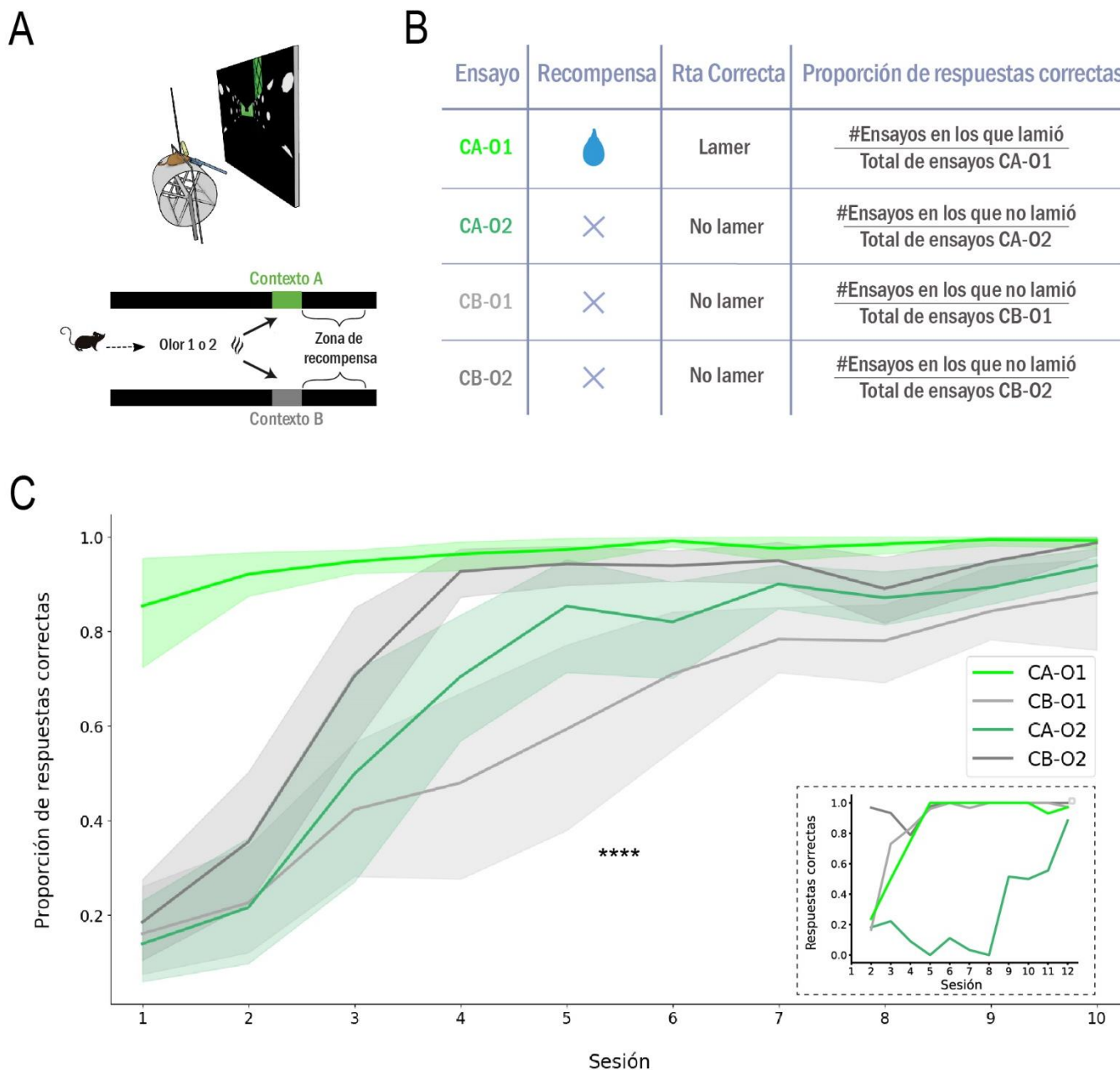


Figura 2.1.1: Proporción de respuestas correctas a lo largo del aprendizaje. **A**, Esquema del dispositivo y la tarea comportamental: los animales avanzan por un pasillo negro hasta alcanzar uno de dos contextos posibles (CA o CB) donde se entrega uno de dos olores (O1 u O2). **B**, Cálculo de proporción de respuestas correctas para cada tipo de ensayo. **C**, Promedio entre animales de proporción de respuestas correctas para cada tipo de ensayo en las sucesivas sesiones de entrenamiento (Modelo de efectos mixtos: $p < 0.0001$, $n=11$). Cada curva corresponde a la media y desvío estándar para los 4 tipos de ensayo. **RECUADRO:** Ejemplo de la performance de un animal entrenado con la combinación CB-02 asociada a la recompensa.

El comparar estadísticamente las curvas correspondientes a cada tipo de ensayo, encontramos que los animales aprenden, en primer lugar, a dejar de lamer frente a ensayos que contienen el olor no-recompensado (CB-02 y CA-02), y en segundo lugar a dejar de lamer frente al ensayo que contiene el olor

recompensado en el contexto no-recompensado (CB-O1). Esto indica que, en promedio los animales logran discriminar más rápidamente los olores que los contextos espaciales (Modelo de efectos mixtos, múltiples comparaciones de Tuckey, CB-O2 vs. CA-O2: $\text{adj-p} = 0.2485$; CB-O2 vs. CB-O1: $\text{adj-p} = 0.0002$; $n=11$).

Cuantificamos también otras variables comportamentales relevantes para la tarea: la tasa de lamido, la velocidad del animal y la tasa respiratoria a lo largo del pasillo virtual. Del total de animales entrenados, 5 fueron descartados para los subsiguientes análisis por razones que se detallarán más adelante. Por lo tanto, los datos mostrados a continuación corresponden a 6 animales.

Al estudiar la respuesta de lamido a lo largo del aprendizaje, constatamos que, antes de discriminar entre tipos de ensayo, los animales aprenden a restringir la respuesta de lamido a la zona de la recompensa (Figura 2.1.2). En la primera sesión, los animales tienden a lamer a lo largo de todo el corredor virtual y en todos los ensayos. Típicamente, en la segunda sesión ya empiezan a delimitar las lamidas cerca de la salida del contexto, aunque continúan realizándolas en todos los tipos de ensayo. Finalmente, cuando los ratones ya son expertos (sesión Experto), la respuesta de lamido se concentra únicamente en la zona de recompensa y en los ensayos en los que se presenta la asociación recompensada. A partir de estas observaciones, podemos especular que los ratones desarrollan una noción espacial de la tarea y logran asociar tempranamente una zona en el espacio virtual con la posibilidad de obtener la recompensa.

Cabe aclarar que, si bien las lamidas se ajustan a la salida del contexto, en los animales expertos se observa una respuesta anticipatoria sostenida que puede asociarse a la motivación por la recompensa, revelando la memoria de la asociación recompensada. Esta anticipación comienza dentro del contexto espacial, después de la liberación del olor y solo se da en ensayos recompensados.

En la Figura 2.1.3 se muestra el promedio para todos los animales analizados y se puede observar que, en la primera sesión, los ratones mantienen una tasa de lamido constante a lo largo del pasillo (desde el comienzo hasta la salida del contexto) que no difiere significativamente entre tipos de ensayo (Prueba de Friedman, $p=0.7715$, $n=6$). Por el contrario, en la sesión Experto, los ratones disminuyen la respuesta de lamido a lo largo del corredor, y solo la incrementan al aproximarse a la salida del contexto en los ensayos recompensados (Prueba de Friedman, múltiples comparaciones con corrección de Benjamini, Krieger, & Yekutieli, CA-O1 vs. CB-O1: $p=0.0444$; CA-O1 vs. CA-O2: $p=0.0444$; CA-O1 vs. CB-O2: $p=0.0018$; CB-O1 vs. CA-O2, $p=0.8750$; CB-O1 vs. CB-O2, $p=0.1887$; CA-O2 vs. CB-O2, $p=0.1887$; $n=6$).

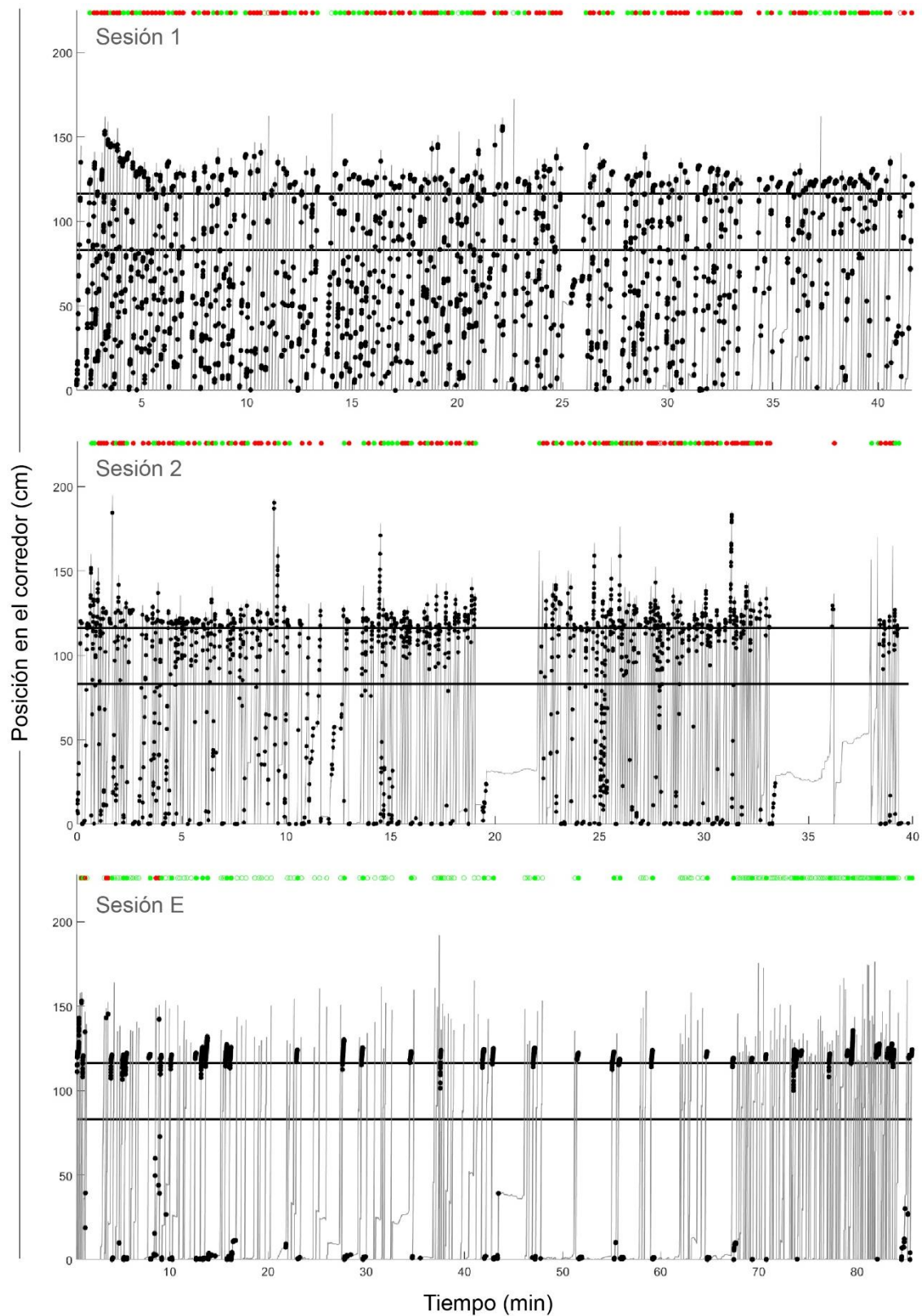


Figura 2.1.2: Respuesta de lamido a lo largo del aprendizaje. Ejemplos de la sesión 1, la sesión 2 y la sesión Experto (E) para un mismo animal. Se muestra la posición a lo largo del pasillo virtual en función del tiempo para una sesión y, superpuesta, las

respuestas de lamido (círculos negros). Las líneas negras indican la entrada y salida del contexto. También se grafica la performance en cada ensayo en la parte superior (círculos llenos: GO, círculos vacíos: NO-GO; círculos verdes: respuesta correcta, círculos rojos: respuesta incorrecta).

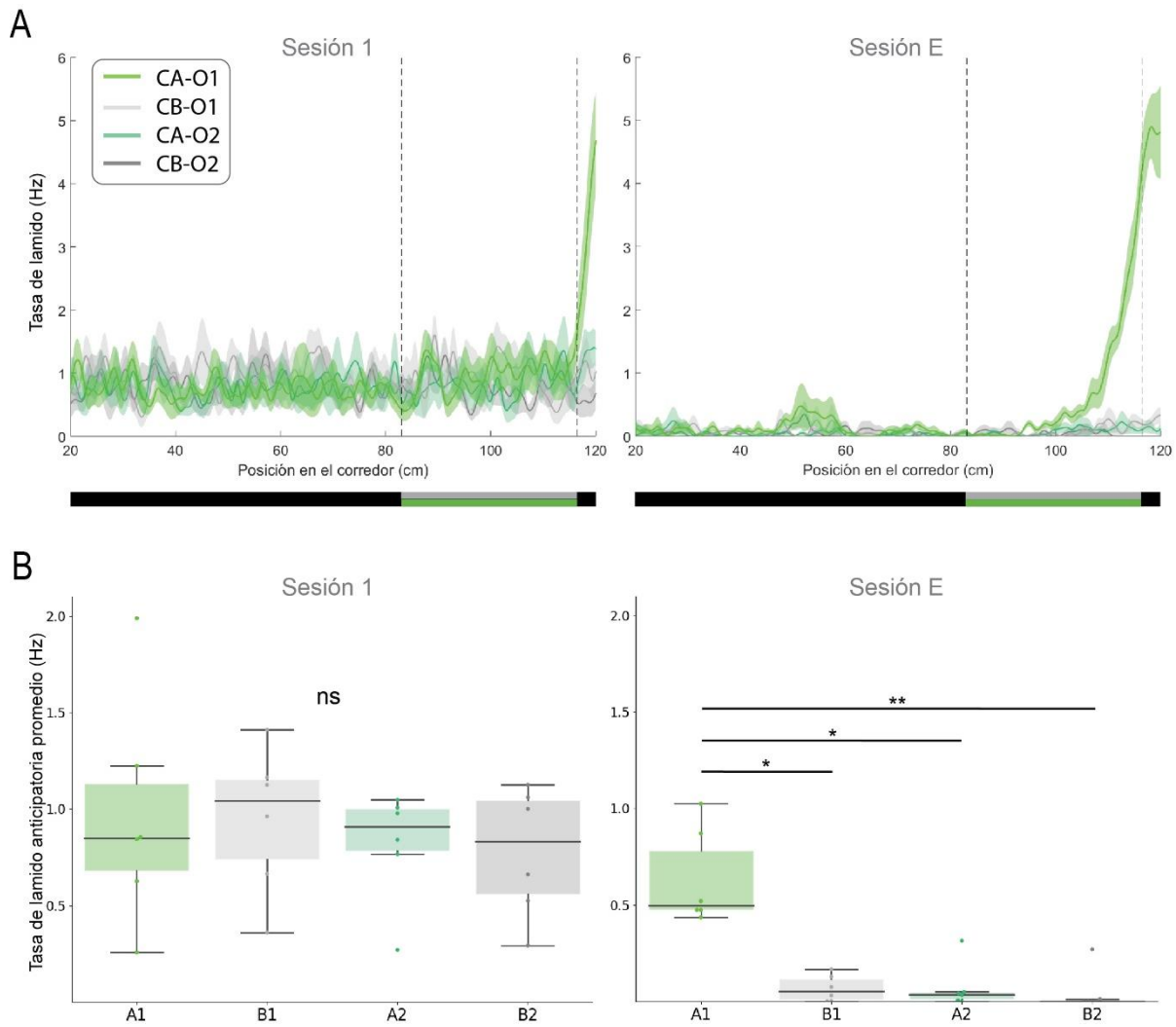


Figura 2.1.3: Modulación de la respuesta de lamido a lo largo del aprendizaje dependiente del tipo de ensayo. **A**, Tasa de lamido en función de la posición en el corredor para animales en primera sesión (izquierda) y en sesión experto (derecha). Cada curva corresponde a la media y desvío estándar para los 4 tipos de ensayo. Las líneas discontinuas corresponden a la entrada y salida del contexto. **B**, Cuantificación de la tasa de lamido anticipatoria (dentro del contexto) para cada tipo de ensayo; las cajas indican mediana y cuartiles (Prueba de Friedman, S1: $p=0.7715$; SE: A1 vs. B1, $p=0.0444$; A1 vs. A2, $p=0.0444$; A1 vs. B2, $p=0.0018$).

Detectamos también, cambios en la velocidad a lo largo del corredor que acompañan el aprendizaje de la tarea comportamental. Observamos que, en la primera sesión, los animales mantienen relativamente

estable su velocidad a lo largo del pasillo para todos los tipos de ensayo. En cambio, cuando los ratones son expertos en resolver la tarea, se aprecia una modulación de esta variable dependiente de la posición y el tipo de ensayo. Como se puede ver en la Figura 2.1.4, en la primera porción del corredor (donde los animales solo se valen de información del contexto espacial para predecir una posible recompensa), la velocidad de los ratones expertos disminuye al aproximarse al contexto únicamente si se trata del posiblemente recompensado (CA en este caso). Por el contrario, cuando se presenta el otro contexto (CB), la velocidad se mantiene. El promedio de la velocidad en los 10 cm previos a la entrada al contexto, revela diferencias significativas entre tipos de ensayo (CA vs CB) en los ratones expertos, pero no en los ratones en primera sesión (Prueba t entre poblaciones, Sesión 1: $p=0.5133$, $n=6$; Sesión Experto: $p=0.0172$, $n=6$).

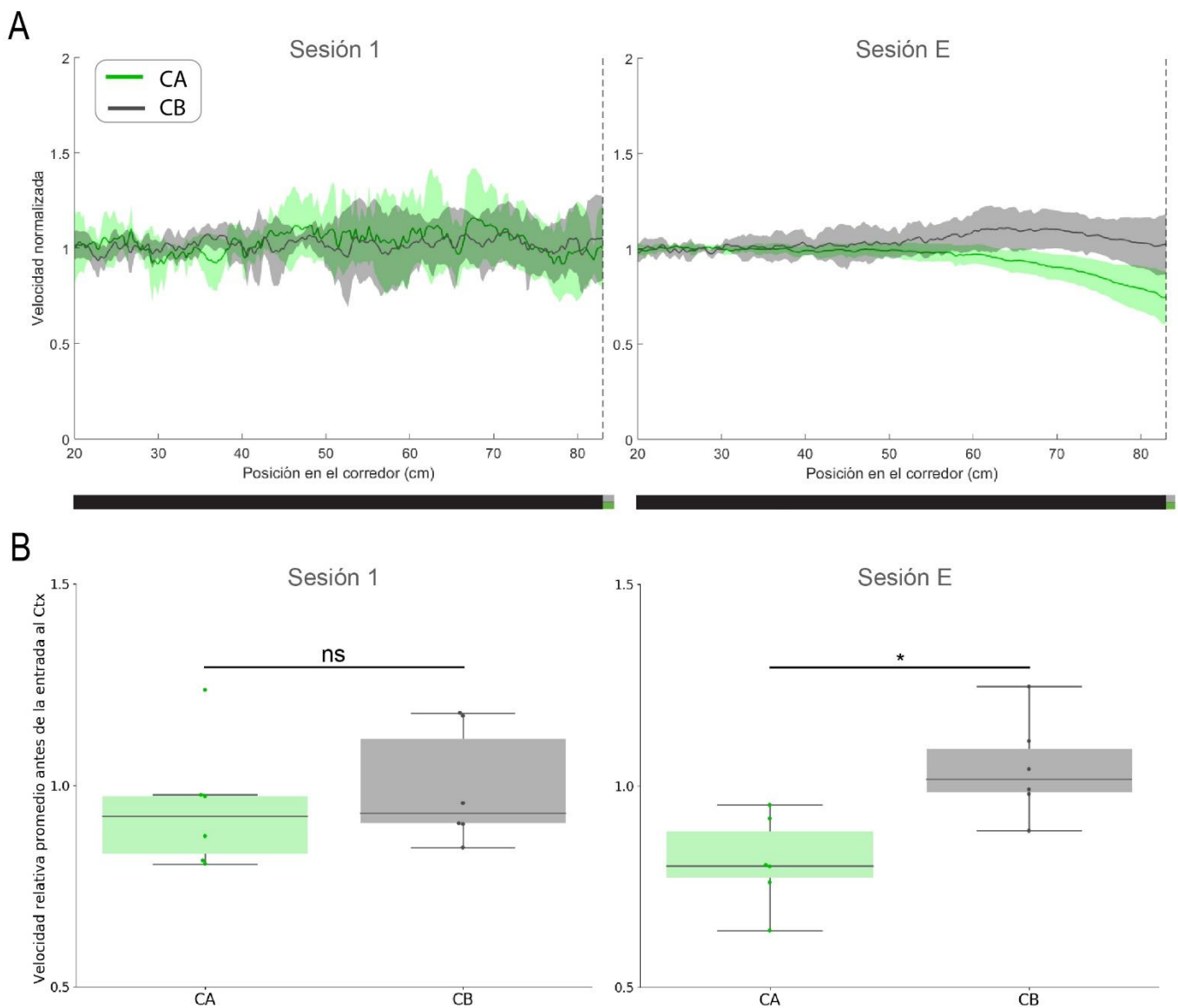


Figura 2.1.4. Modulación de la velocidad a lo largo del aprendizaje dependiente del contexto espacial. **A**, Velocidad (normalizada al valor promedio de cada animal al comienzo del pasillo) en función de la posición en el corredor para la primera sesión (izquierda) y la sesión Experto (derecha). La línea discontinua corresponde a la entrada al contexto. **B**, Promedio de la velocidad normalizada en los 10 cm previos a la entrada al contexto. Cada punto corresponde al promedio por animal; las cajas indican mediana y cuartiles (Prueba t entre poblaciones, Sesión 1: $p=0.5133$, $n=6$; Sesión Experto: $p=0.0172$, $n=6$).

Por último, el análisis de la tasa respiratoria también reveló información adicional acerca del comportamiento de los ratones en esta tarea. Al igual que para la velocidad, se registra una modulación diferencial de la tasa de inhalación dependiente del contexto, precediendo la liberación del olor. Dado que la naturaleza de la señal respiratoria es periódica, decidimos expresarla en función del tiempo en lugar de la posición. Para capturar la porción del corredor donde el animal se vale únicamente de la información contextual, alineamos el registro a la primera inhalación detectada luego de la liberación del olor y analizamos una fracción de tiempo previa a dicho evento (Figura 2.1.5). Encontramos que, solo para animales expertos, existe un incremento en la tasa de inhalación que antecede a la detección del olor, en aquellos ensayos en los que se presenta el contexto posiblemente recompensado. Comparamos estadísticamente la pendiente de las curvas en una ventana temporal de 700 ms antes de la primera inhalación del olor y observamos que, para la primera sesión, no existen diferencias significativas entre los tipos de ensayo (Prueba t: $p=0.1095$, $n=6$); mientras que sí existen para la sesión Experto (Prueba t: $p=0.0117$, $n=6$).

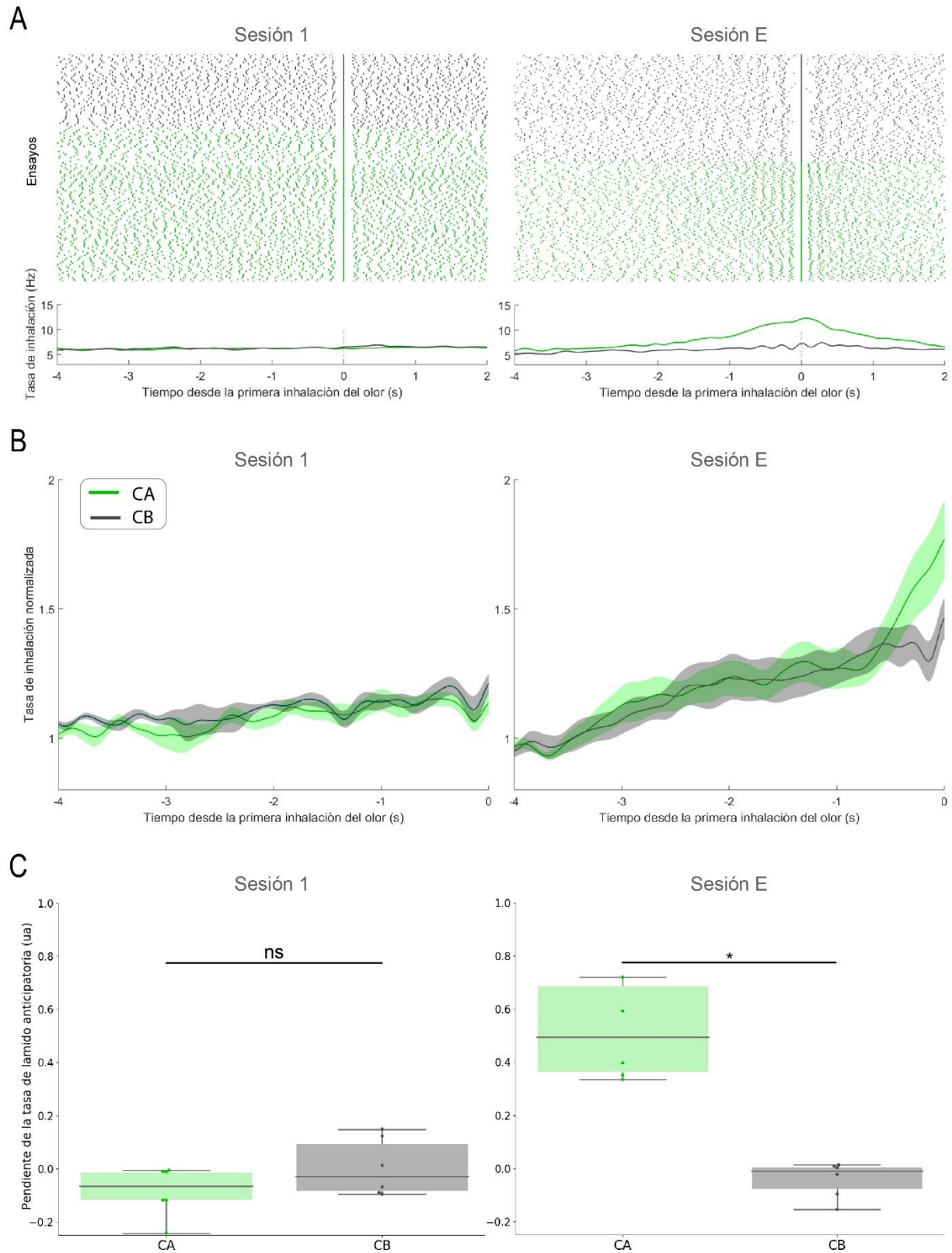


Figura 2.1.5.: Modulación diferencial de la tasa respiratoria dependiente del contexto espacial. A, Ejemplo de las inhalaciones de un animal alineadas al tiempo de la primera inhalación después de la liberación del olor, en primera sesión (izquierda) y sesión

Experto (derecha). **ARRIBA:** *Raster plot* mostrando las inhalaciones individuales de cada ensayo. Cada fila corresponde a los distintos ensayos agrupados por el tipo de contexto presentado: en gris, el CB; en verde, el CA. **ABAJO:** Tasa de inhalación promedio de toda la sesión para cada tipo de ensayo. **B,** Tasa de inhalación promedio para todos los animales en sesión 1 (izquierda) y sesión experto (derecha). Se muestra la tasa normalizada por animal al comienzo del ensayo. **C,** Pendiente de la curva de inhalación en la ventana de 700 ms previos a la inhalación del olor. Cada punto corresponde al promedio por animal; las cajas indican mediana y cuartiles (Prueba t entre poblaciones, Sesión 1: $p=0.1095$, $n=6$; Sesión Experto: $p=0.0117$, $n=6$).

Estas modulaciones diferenciales dependientes del contexto espacial podrían considerarse como indicios de una primera toma de decisión en cada ensayo. Cuando los ratones expertos identifican que el contexto presentado es el no-recompensado, ya no necesitan la información olfativa que se presentará dentro del contexto para determinar su respuesta NO-GO. En línea con esto, incrementan su velocidad y mantienen su tasa de inhalación. Si, por el contrario, reconocen que el contexto es el posiblemente recompensado, entonces deben integrar la información olfativa para determinar su respuesta. En este sentido, la disminución en la velocidad y el aumento en la tasa de inhalación que aparecen con el aprendizaje pueden considerarse como marcas de atención para la identificación del olor que se disparan una vez identificadas las claves visuales del contexto⁹³.

2.2. Efecto del silenciamiento bilateral de la LEC sobre el comportamiento

Utilizando el paradigma comportamental descrito, nos propusimos silenciar bilateralmente la LEC en animales expertos con el fin de identificar qué aspectos de este comportamiento requieren la información allí procesada.

La primera aproximación que llevamos a cabo para cumplir este objetivo fue utilizando un agonista de receptores GABA_A, muscimol. Si bien obtuvimos algunos resultados interesantes utilizando esta estrategia, advertimos que la técnica podía conllevar algunos efectos adversos que nos obligaban a descartar varios animales, por lo cual decidimos proseguir con una estrategia más controlada. Así es que, posteriormente, buscamos silenciar la LEC valiéndonos de herramientas quimiogénicas (DREADD inhibitorio).

De los 11 animales entrenados en la tarea, 5 fueron animales *wild-type* inyectados bilateralmente con muscimol en la LEC y 6 fueron ratones transgénicos hM4Di inyectados con un virus AAV-Camk2aCRE en la LEC y posteriormente, con CNO de forma intraperitoneal.

Por último, realizamos también algunas pruebas para poner a punto la inhibición con optogenética implantando fibras ópticas en ratones transgénicos que expresen ChR2 bajo el promotor *Parvalbumin* (no incluido en los resultados de este trabajo).

A continuación, se muestran algunos resultados preliminares del silenciamiento de la LEC, tanto farmacológico como quimiogénico, que revelan información interesante para especular acerca del rol de dicha región en esta tarea y permiten direccionar futuros experimentos.

2.2.1. Silenciamiento farmacológico de la LEC

Para este experimento, entrenamos ratones *wild-type* (C57) previamente sometidos a una cirugía en la que una barra de aluminio había sido adherida al cráneo (para fijarlos al dispositivo experimental) y las coordenadas de la LEC habían sido marcadas (para identificarlas en una siguiente cirugía). Al alcanzar el nivel de performance que consideramos “Experto”, anestesiarnos a los animales en isofluorano e inyectamos bilateralmente una solución de muscimol en la LEC. Las inyecciones se realizaron con capilares de vidrio pintados por fuera con colorante *Dil* para poder corroborar posteriormente los sitios de inyección. Luego de la sesión de entrenamiento con muscimol, sacrificamos a los animales, extrajimos sus cerebros, los cortamos en congelación y fijamos las rodajas para observar bajo un microscopio de fluorescencia.

Hallamos que 3 de estos animales mostraban marcas de inyección en el hipocampo en lugar de LEC por lo cual fueron descartados para los siguientes análisis. Estudiamos entonces, datos correspondientes a 2 animales lo cual implicó un impedimento para realizar pruebas estadísticas. Aun así, nos pareció útil mostrar los resultados aquí obtenidos para comparar con los de la manipulación quimiogénica descrita en la siguiente sección.

Lo primero que analizamos fue el porcentaje de respuestas correctas en la sesión de muscimol en comparación con la sesión del día previo (sesión Experto). Encontramos que, al inhibir la LEC, los animales disminuyen la proporción de respuestas correctas en los tres tipos de ensayo no-recompensados (Figura 2.2.1.1.B). En otras palabras, tienden a realizar mayor respuesta de lamido (GO), que es la respuesta correcta frente al tipo de ensayo CA-O1, pero incorrecta frente a los tipos de ensayo restantes. Además, muestran una tendencia a equivocarse menos cuando el tipo de ensayo es el CB-O2 (olor no-recompensado en contexto no-recompensado), es decir, el que más difiere con el ensayo recompensado.

Al estudiar en mayor detalle la respuesta de lamido, pudimos constatar que, bajo el efecto de muscimol, esta pierde su localización alrededor de la zona de recompensa y se da a lo largo de todo el corredor (Figura

2.2.1.1.C y Figura 2.2.1.2.A). Este resultado se asemeja a lo observado para los ratones en primera sesión, donde aún no han aprendido la espacialidad de la tarea. Podemos especular entonces que la LEC estaría implicada, o bien en la memoria espacial de la tarea, o bien en la capacidad de orientación/reconocimiento espacial del animal. Estas alternativas serán argumentadas en la siguiente sección de discusión.

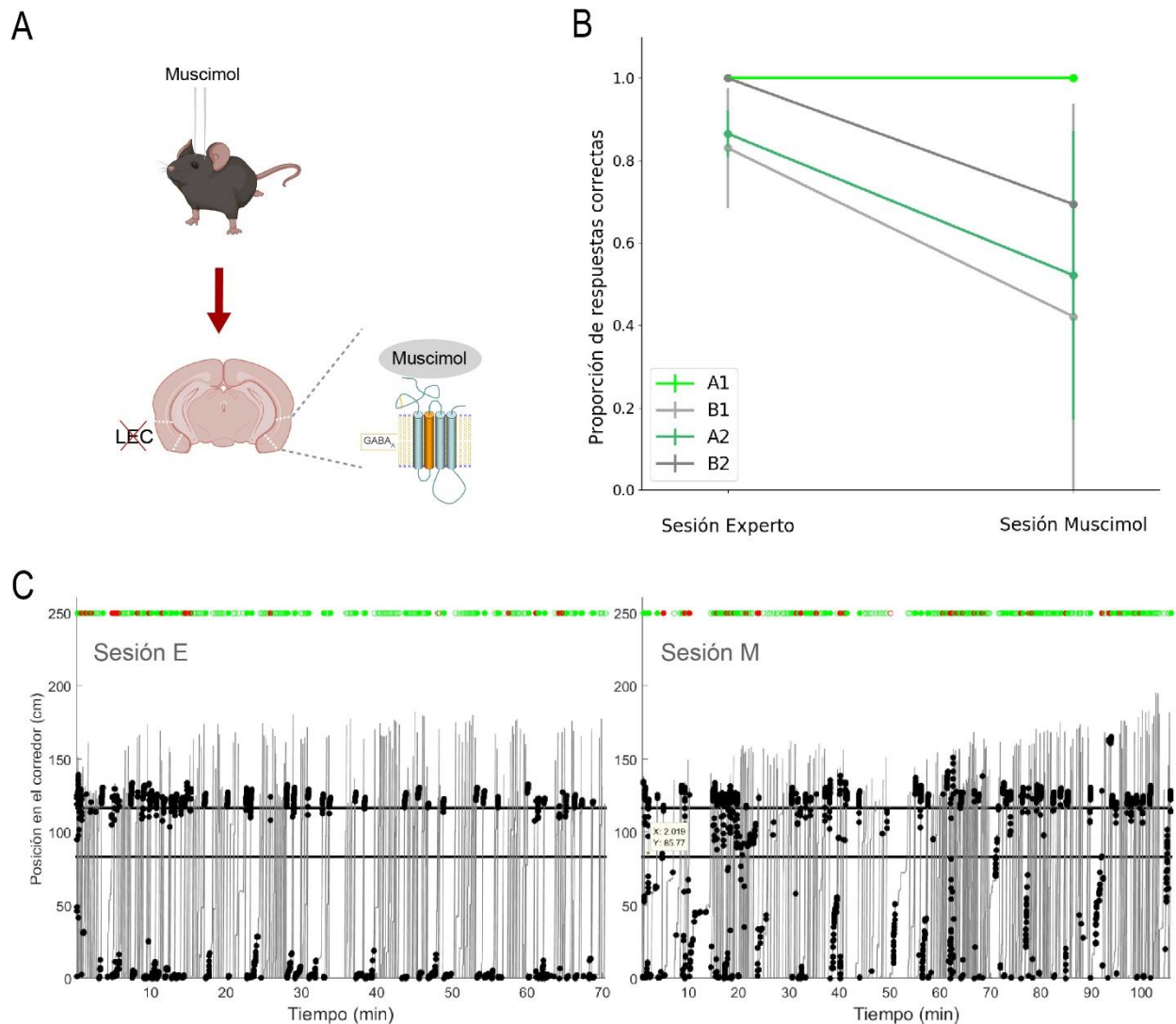


Figura 2.2.1.1: Silenciamiento bilateral de la LEC con farmacología. **A**, Esquema que ilustra el silenciamiento de la LEC: una inyección de muscimol en la LEC de cada hemisferio actúa excitando neuronas inhibitorias que expresan el receptor GABA_A y, en consecuencia, silenciando la región. **B**, Proporción de respuestas correctas por tipo de ensayo en la sesión “Experto” versus la sesión “Muscimol”. **C**, Ejemplo de la respuesta de lamido (círculos negros) de un animal en sesión experto (E) y sesión Muscimol a lo largo de la posición en el corredor virtual. Las líneas negras indican la entrada y salida del contexto. También se grafica el resultado del comportamiento en cada ensayo en la parte superior (círculos llenos: GO, círculos vacíos: NO-GO; círculos verdes: respuesta correcta, círculos rojos: respuesta incorrecta).

En segundo lugar, estudiamos la respuesta de lamido anticipatoria, la velocidad y la tasa respiratoria de los animales durante la sesión de muscimol. En cuanto a la tasa de lamido anticipatorio (dentro del contexto), observamos que pareciera aumentar con respecto a la condición Experto para todos los tipos de ensayo, como lo hace en otras zonas del corredor (Figura 2.2.1.2.A). A grandes rasgos, pareciera haber un mayor incremento en los ensayos CB-O1 (olor recompensado en contexto no-recompensado), lo cual podría ser un indicio de cierta dificultad en la discriminación de contextos espaciales.

Al analizar la velocidad, encontramos que, bajo el efecto de muscimol, desaparece la modulación diferencial dependiente del contexto. Se puede ver, que los animales se aproximan a la entrada al contexto a una velocidad relativa similar para ambos tipos de ensayo (CA y CB). Lo mismo ocurre al estudiar la tasa respiratoria, donde se achican las diferencias que se observaban en la sesión Experto entre los ensayos CA y CB.

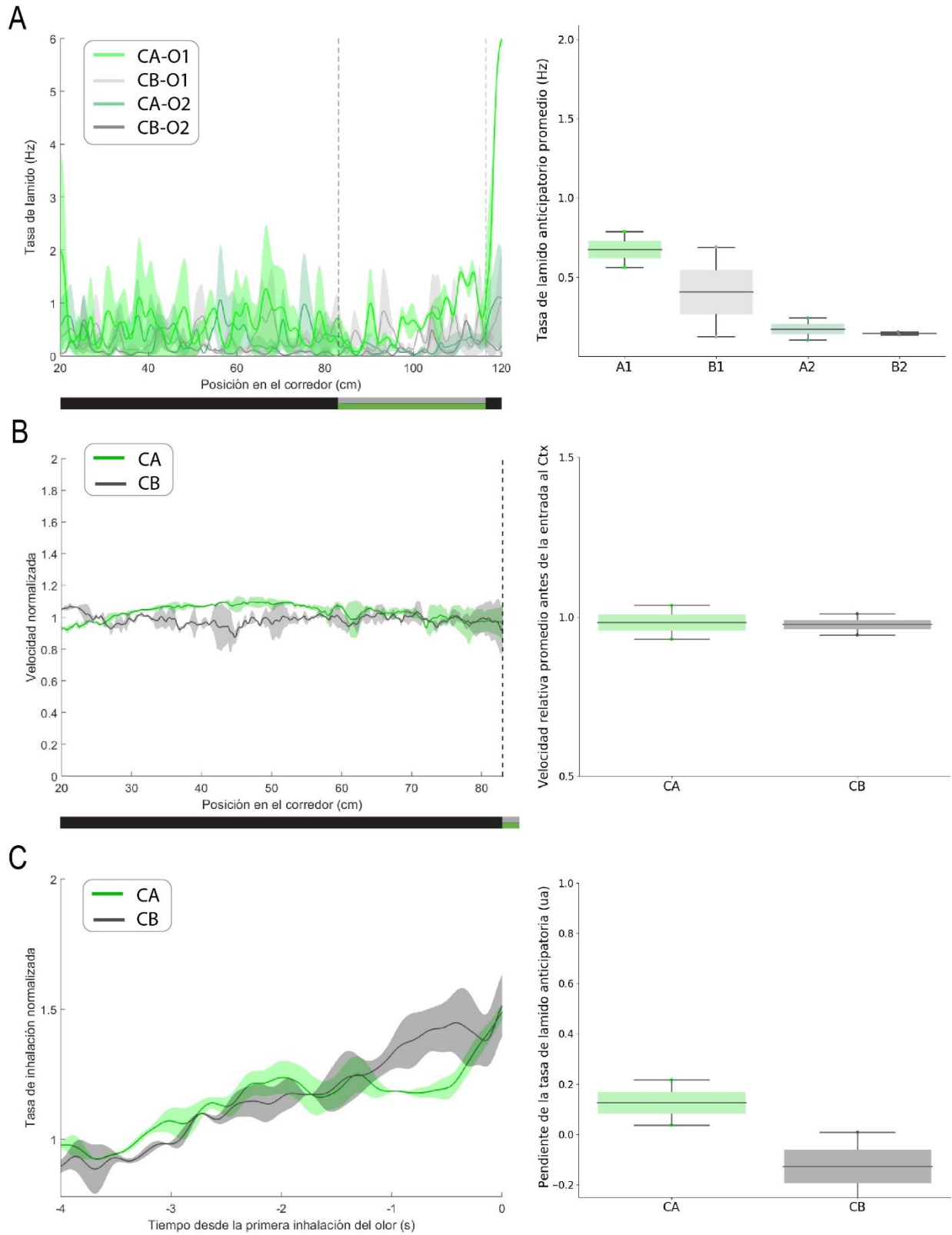


Figura 2.2.1.2: Variables comportamentales bajo efecto de muscimol. A, IZQUIERDA: Tasa de lamido en función de la posición en el corredor para animales en la sesión de muscimol. Cada curva corresponde a la media y desvío estándar para los 4 tipos de

ensayo. **DERECHA:** Cuantificación de la tasa de lamido anticipatoria (dentro del contexto) para cada tipo de ensayo; las cajas indican mediana y cuartiles. **B, IZQUIERDA:** Velocidad (normalizada al valor promedio de cada animal al comienzo del pasillo) en función de la posición en el corredor para la sesión de muscimol. **DERECHA:** Promedio de la velocidad normalizada en los 10 cm previos a la entrada al contexto. Cada punto corresponde al promedio por animal; las cajas indican mediana y cuartiles. **C, IZQUIERDA:** Tasa de inhalación promedio para todos los animales en la sesión muscimol. Se muestra la tasa normalizada por animal al comienzo del ensayo. **DERECHA:** Pendiente de la curva de inhalación en la ventana de 700 ms previos a la inhalación del olor. Cada punto corresponde al promedio por animal; las cajas indican mediana y cuartiles.

2.2.2. Silenciamiento quimiogénico de la LEC

Para llevar a cabo este experimento, utilizamos una línea de ratones transgénicos que contiene el receptor inhibitorio hM4Di bajo un codón STOP floxeado en neuronas. Cada animal que entrenamos fue sometido previamente a una cirugía en la que fijamos una barra de aluminio al cráneo e inyectamos bilateralmente en la LEC el virus AAV-Camk2aCRE. Como resultado de la acción de la recombinasa CRE sobre las secuencias Flox, las neuronas excitatorias de la LEC infectadas, comienzan a expresar el receptor hM4Di.

Entrenamos 6 animales en la tarea comportamental y, una vez expertos, inhibimos la LEC mediante una inyección intraperitoneal de CNO. Este compuesto actúa únicamente sobre los receptores hM4Di, activándolos y, en consecuencia, inhibiendo las neuronas que lo expresan (Figura 2.2.2.1.A, arriba). De esta manera, logramos silenciar la LEC de forma aguda y poco invasiva.

Al analizar los resultados de performance de los animales intervenidos, notamos que estos se separaban claramente en dos grupos: uno conformado por 2 animales en el que no vimos diferencias con respecto a la performance de animales expertos intactos; y otro grupo conformado por 4 animales que revelaba diversos efectos en la tasa de respuestas correctas (Figura 2.2.2.1.A, abajo). Es importante destacar que no logramos revelar los sitios de inyección del virus en estos animales, por lo cual no podremos asegurar que los resultados se deban al silenciamiento de la LEC y no de otra región aledaña. De todas maneras, nos pareció interesante exponer de manera detallada los efectos revelados en el grupo de 4 animales y compararlos con los animales intervenidos farmacológicamente. Los resultados analizados a continuación corresponden a dicho grupo de 4 animales en los que se reveló cierto efecto en la performance y se presentan aquí a modo de resultados preliminares. Más adelante, en la siguiente sección, pondremos en discusión posibles motivos que expliquen la variabilidad observada.

El resultado de la intervención quimiogénica sobre la performance por tipo de ensayo se puede observar en la Figura 2.2.2.1.B. Al igual que en el caso de la inhibición farmacológica, bajo el efecto de CNO, disminuye la proporción de respuestas correctas. La tendencia se puede observar para los tres tipos de

ensayo no-recompensado. Sin embargo, la diferencia entre la sesión Experto y la sesión de CNO es solo significativa para los ensayos CB-O1 y CA-O2 (Prueba ANOVA de dos factores, múltiples comparaciones Sidak: CA-O1, $p=0.9855$; CB-O1, $p=0.0062$; CA-O2, $p=0.0049$; CB-O2, $p=0.1188$; $n=4$). También observamos que los animales, al igual que con el silenciamiento farmacológico de la LEC, tienden a realizar la respuesta de lamido a lo largo de todo el pasillo virtual (Figura 2.2.2.1.C).

Dos explicaciones posibles podrían acompañar este escenario: 1) podría ser que se vea afectado, en cierta medida, el reconocimiento de los estímulos, es decir, la discriminación tanto de contextos espaciales como de olores y la orientación en el espacio; 2) o podría, en cambio, verse alterada la memoria de la tarea que implica la asociación entre olores y contextos espaciales, y la asociación entre una zona del pasillo y la posibilidad de obtener recompensa. En este último caso, el comportamiento se tornaría más similar al de la primera sesión.

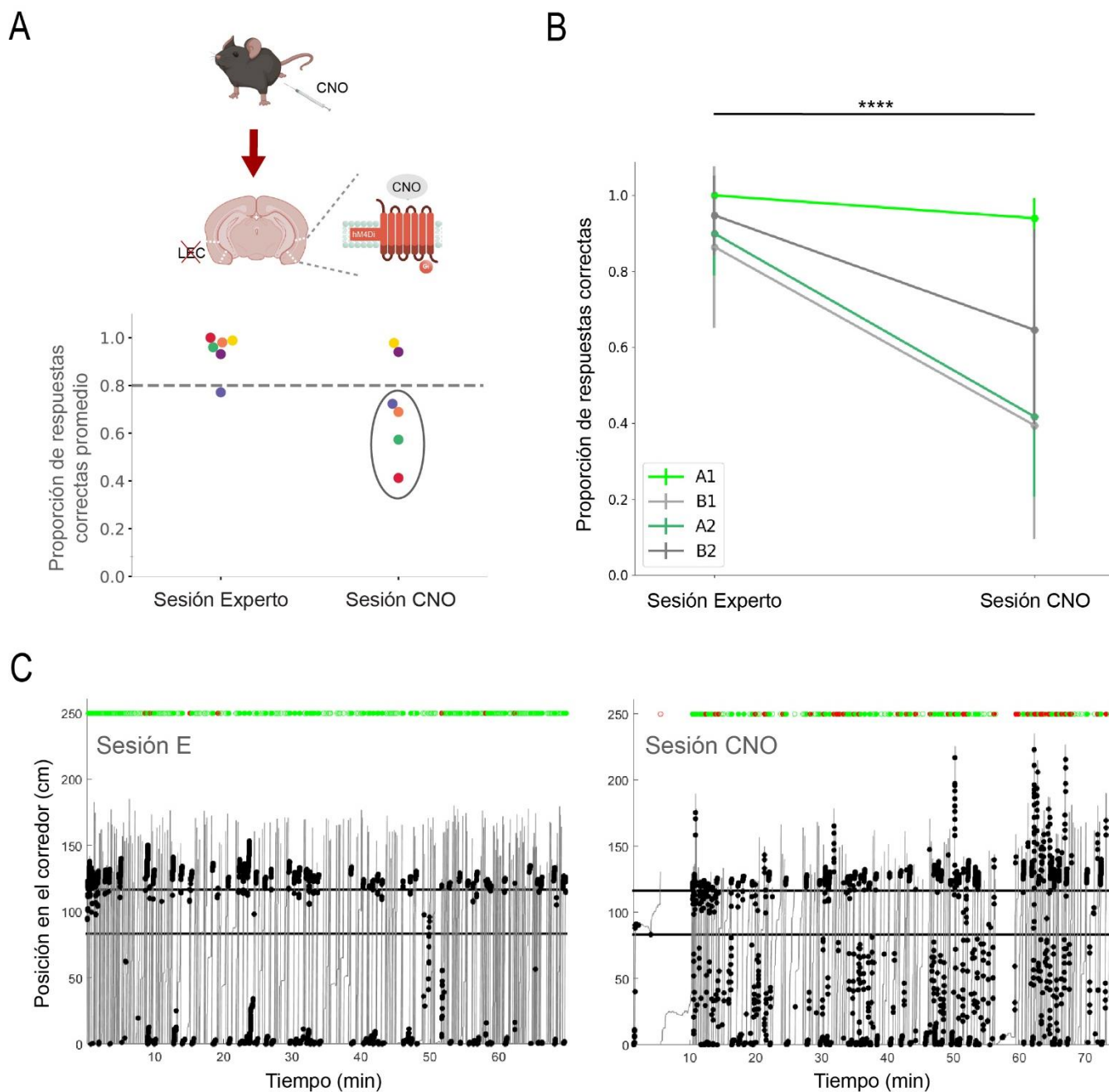


Figura 2.2.2.1: Silenciamiento bilateral de la LEC con quimiogenética. **A, ARRIBA:** Esquema que ilustra el silenciamiento de la LEC: una inyección intraperitoneal de CNO actúa sobre las neuronas excitatorias de la LEC que contienen el receptor inhibitorio h4MDi. **ABAJO:** Proporción de respuestas correctas promedio por animal en sesión Experto versus sesión CNO (tomando únicamente los ensayos correspondientes a la ventana de 10 a 40 minutos). Cada animal está representado con un color diferente. La línea discontinua corresponde al 80% de respuestas correctas, umbral de performance para considerarse Experto. El círculo negro agrupa aquellos animales que se analizan a continuación con más detalle. **B,** Proporción de respuestas correctas por tipo de ensayo en la sesión “Experto” versus la sesión “CNO” para los animales que mostraron una reducción en la performance bajo efecto del CNO (Prueba ANOVA de dos factores: $p < 0.0001$). **C,** Ejemplo de la respuesta de lamido (círculos negros) de un animal en sesión Experto (E) y sesión CNO a lo largo de la posición en el corredor virtual. También se grafica el resultado del

comportamiento en cada ensayo en la parte superior (círculos llenos: GO, círculos vacíos: NO-GO; círculos verdes: respuesta correcta, círculos rojos: respuesta incorrecta).

Con el objetivo de esclarecer el efecto del silenciamiento de la LEC sobre el comportamiento, decidimos analizar en mayor detalle el resto de las variables comportamentales registradas.

Al estudiar la respuesta de lamido anticipatoria, es decir, la que sucede dentro del contexto, obtuvimos un primer indicio para discernir entre las hipótesis previamente planteadas. Por un lado, observamos que la respuesta anticipatoria se mantiene alta para los ensayos recompensados. Esto significa que los animales aún conservan la memoria de la asociación olor-contexto que predice la recompensa. Además, hallamos un aumento en la respuesta anticipatoria de lamido frente a los ensayos CB-O1 (Olor recompensado en Contexto no-recompensado) que no difiere significativamente con la respuesta frente a ensayos recompensados (Prueba Friedman, múltiples comparaciones con corrección de Benjamini, Krieger, & Yekutieli: CA-O1 vs. CB-O1, $p=0.1003$; CA-O1 vs. CA-O2, $p=0.0137$; CA-O1 vs. CB-O2, $p=0.0137$; $n=4$) (Figura 2.2.2.2.A). Este aumento no se observa en los ensayos en los cuales se presenta el olor no recompensado, en cualquiera de los posibles contextos. A partir de este resultado podemos afirmar que la memoria de asociación entre una combinación de estímulos olor-contexto y una recompensa, se conserva con el silenciamiento de la LEC. Por el contrario, pareciera que la identificación de la combinación recompensada se ve afectada por una peor discriminación del contexto espacial. Por lo tanto, la reducción detectada en la performance no se debería simplemente a que los animales lamen más e indiscriminadamente como en la primera sesión.

Los análisis de la velocidad al aproximarse a la entrada del contexto y la tasa de inhalación antes de la detección del olor, respaldan esta hipótesis. Observamos que se pierde la modulación diferencial dependiente de contexto bajo el efecto de CNO. Encontramos que los animales reducen la velocidad ligeramente al aproximarse al contexto sin discriminar entre ambos tipos (Prueba t, CA vs CB: $p=0.5439$, $n=4$) (Figura 2.2.2.2.B). En el caso de la tasa respiratoria, comparamos las pendientes de las curvas normalizadas en una ventana de 700 ms previo a la primera inhalación del olor, y no hallamos diferencias significativas entre ambos contextos (Prueba t, CA vs. CB: $p=0.0973$, $n=4$) (Figura 2.2.2.2.C).

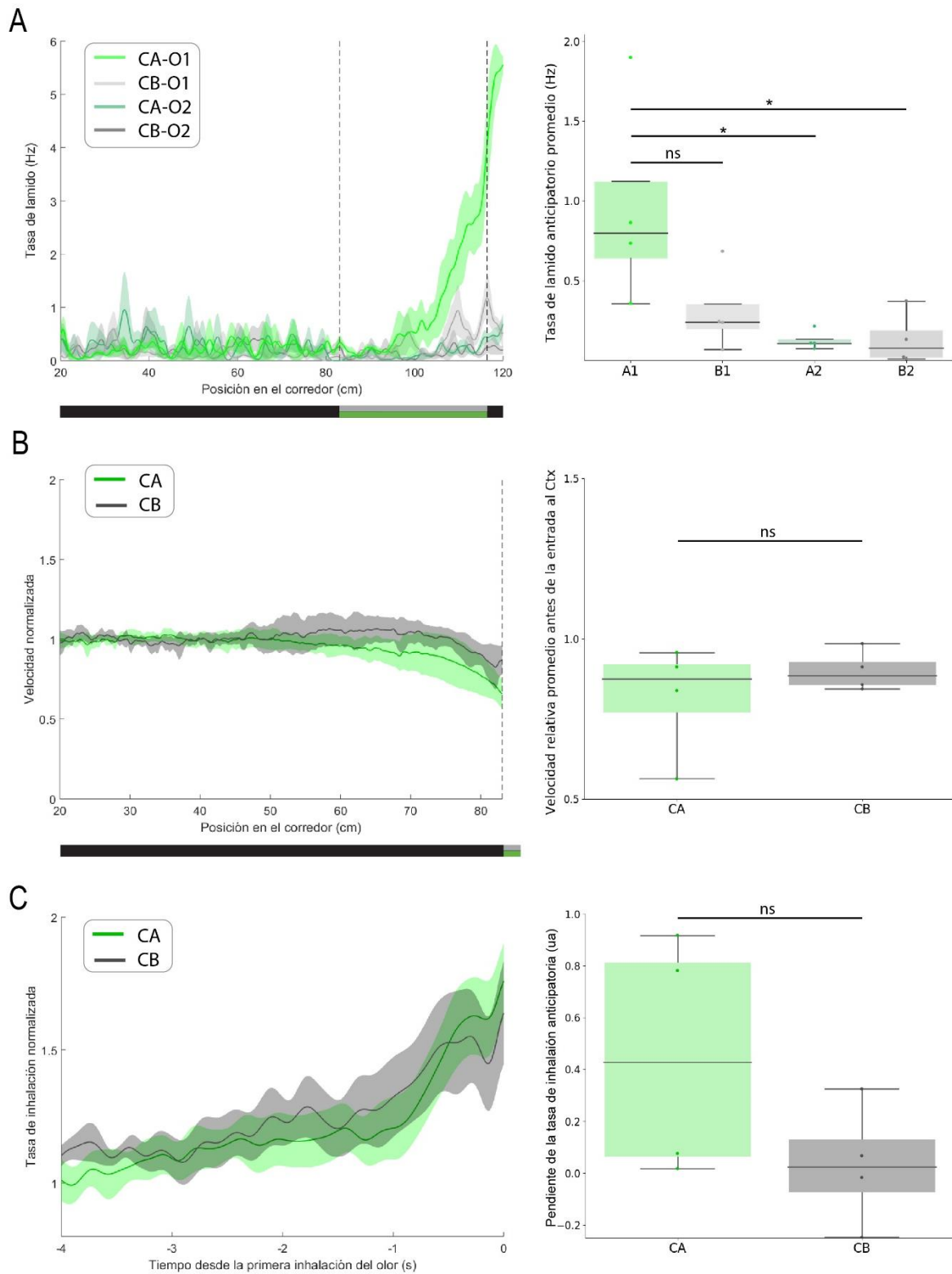


Figura 2.2.2: Variables comportamentales bajo efecto de CNO. A, IZQUIERDA: Tasa de lamido en función de la posición en el corredor para animales en la sesión de CNO. Cada curva corresponde a la media y desvío estándar para los 4 tipos de ensayo. **DERECHA:** Cuantificación de la tasa de lamido anticipatoria (dentro del contexto) para cada tipo de ensayo; las cajas indican

mediana y cuartiles (Prueba Friedman: CA-O1 vs. CB-O1, $p=0.1003$; CA-O1 vs. CA-O2, $p=0.0137$; CA-O1 vs. CB-O2, $p=0.0137$; $n=4$). **B, IZQUIERDA:** Velocidad (normalizada al valor promedio de cada animal al comienzo del pasillo) en función de la posición en el corredor para la sesión de CNO. **DERECHA:** Promedio de la velocidad normalizada en los 10 cm previos a la entrada al contexto. Cada punto corresponde al promedio por animal; las cajas indican mediana y cuartiles tipos (Prueba t, CA vs CB: $p=0.5439$, $n=4$). **C, IZQUIERDA:** Tasa de inhalación promedio para todos los animales en la sesión CNO. Se muestra la tasa normalizada por animal al comienzo del ensayo. **DERECHA:** Pendiente de la curva de inhalación en la ventana de 700 ms previos a la inhalación del olor. Cada punto corresponde al promedio por animal; las cajas indican mediana y cuartiles (Prueba t, CA vs. CB: $p=0.0973$, $n=4$).

Es importante aclarar que todos los efectos reportados se registraron a partir de los 30 minutos post-inyección de CNO y tuvieron una duración aproximada de entre 40 y 60 minutos. Después de este período, en el transcurso de la misma sesión, todos los animales recuperaron su comportamiento habitual de expertos en la tarea. Esto coincide con el efecto transitorio del CNO previamente reportado⁹¹.

Realizamos, además, un experimento control inyectando vehículo en uno de los animales tratados dos días después de la sesión de CNO. Como se muestra en la Figura 2.2.2.3, ninguna diferencia se evidenció con respecto a la sesión experto. Más animales, tanto controles como experimentales, se llevarán a cabo en el futuro para corroborar las hipótesis aquí presentadas.

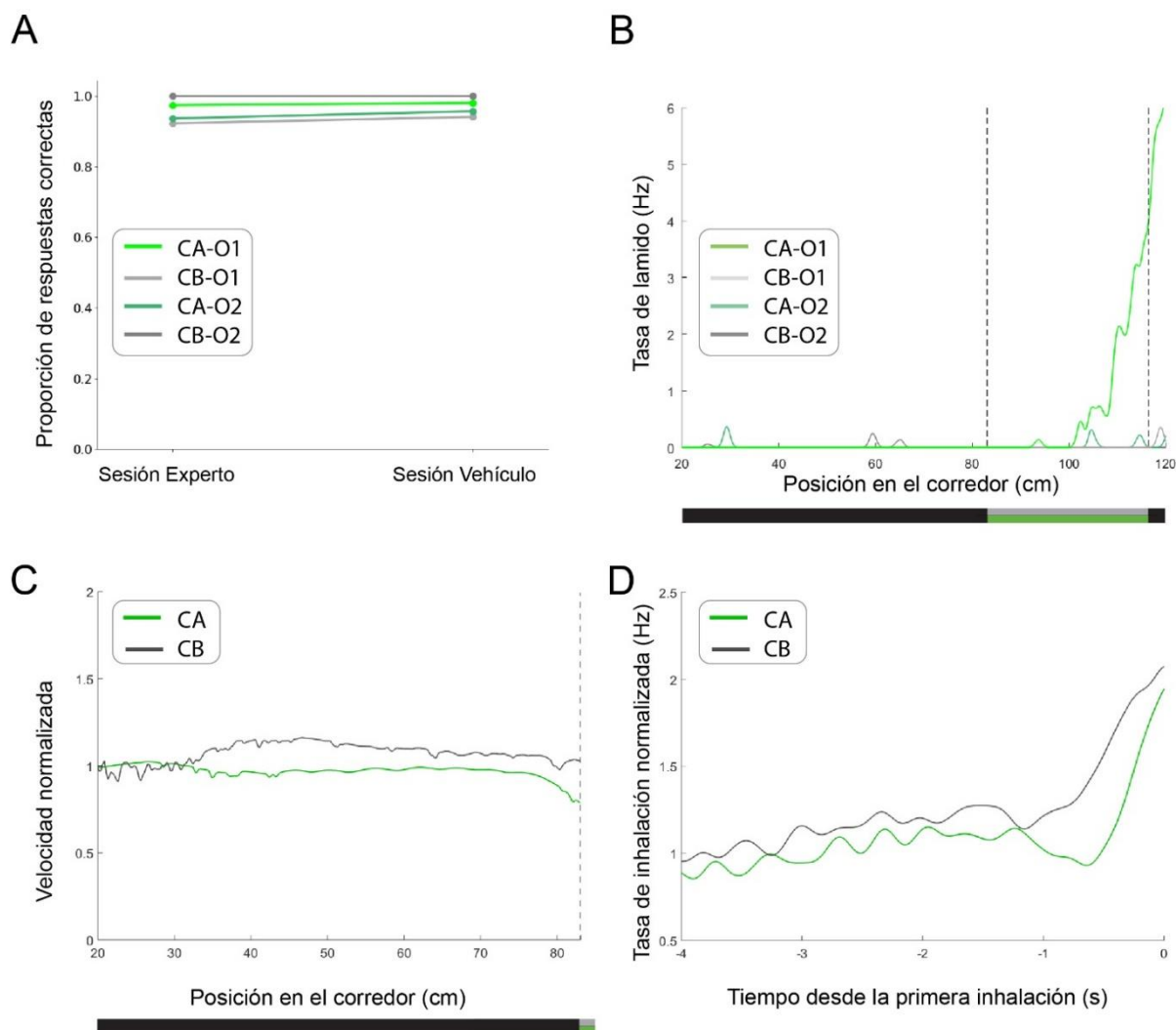


Figura 2.2.2.3. Performance y variables comportamentales de un animal control bajo efecto del vehículo. **A**, Proporción de respuestas correctas por tipo de ensayo en la sesión Experto versus la sesión Vehículo. **B**, Tasa de lamido en función de la posición en el corredor para cada tipo de ensayo. **C**, Velocidad normalizada en función de la posición en el corredor. **D**, Tasa de inhalación normalizada alineada al tiempo de la primera inhalación del olor.

Los resultados que obtuvimos sugieren fuertemente que la LEC contribuye al reconocimiento y discriminación de contextos espaciales. Esto justificaría los cambios observados en la tasa de lamido, la velocidad y la tasa respiratoria. En cuanto a los resultados de la performance, observamos en línea con esta hipótesis, que los ratones intervenidos realizan mayor proporción de respuestas incorrectas cuando el Olor 1 es presentado en el Contexto B. Sin embargo, también observamos que la performance empeora cuando el Olor 2 es presentado en el Contexto A y, en menor medida, cuando el Olor 2 es presentado en el Contexto B. ¿Estaría entonces la LEC involucrada también en la discriminación de olores? ¿O, tal vez,

en algunas asociaciones entre contextos espaciales y olores? ¿O podrían, por el contrario, explicarse estos resultados solo a partir de una peor discriminación de contextos espaciales? Estas preguntas serán abordadas en detalle en la siguiente sección de discusión.

Discusión - Parte 2

La corteza entorrinal lateral es una región del cerebro de alto nivel jerárquico que integra información proveniente de distintas cortezas y envía una de las principales aferencias al hipocampo⁹⁶. Diversos trabajos han probado su participación en la asociación entre localizaciones espaciales y objetos^{63,64,65,66,67,68,69,70,71}, así como en la asociación entre claves que componen un “contexto espacial” local⁷². La LEC es además receptora de numerosas aferencias olfativas provenientes del bulbo olfatorio y de la corteza piriforme, y se han registrado respuestas a olores en dicha región⁷⁶. Recientemente se demostró, adicionalmente, que esta región es necesaria para la discriminación de olores en una ventana temporal temprana⁷⁷.

Como fue detallado en la primera sección de esta tesis, la LEC envía proyecciones axónicas hacia la corteza piriforme y es capaz de modificar allí el procesamiento de la información. Cabe preguntarse entonces, ¿qué clase de información transmite esta aferencia? ¿En qué circunstancias resulta relevante dicha información?

Con el objetivo de comenzar a resolver estas preguntas llevamos a cabo experimentos comportamentales en un paradigma que involucra el reconocimiento y discriminación tanto de olores como de contextos espaciales; así como la asociación entre dichos estímulos. Quisimos dilucidar, en primer lugar, el rol de la LEC en el comportamiento de resolución de esta tarea. Para ello, intervenimos a animales expertos silenciando bilateralmente la LEC y, posteriormente, evaluamos su comportamiento.

Antes de interpretar los resultados obtenidos, resulta importante tener una clara noción de las asociaciones involucradas en la tarea que empleamos. En primer lugar, los animales deben asociar una acción (lamer) con la entrega de agua que supone una recompensa. Esta primera etapa del aprendizaje se establece desde la fase de habituación al dispositivo experimental. En segundo lugar, los ratones aprenden a asociar una zona del corredor virtual con la posibilidad de obtener la recompensa, y esto ocurre típicamente en la segunda sesión de entrenamiento. Finalmente, aprenden a asociar los olores con los contextos visuales/espaciales, y en el caso de la combinación del Olor 1 y el Contexto A, con la recompensa. *A priori*, imaginamos que la LEC podría estar involucrada en alguna de estas asociaciones aprendidas y/o en el reconocimiento de los estímulos o espacios que requiere la tarea.

En primer lugar, al estudiar la performance de los ratones intervenidos para la inactivación de la LEC, confirmamos el papel fundamental de esta región cerebral en la tarea puesta a prueba, ya que se observa una reducción en la proporción de respuestas correctas (Figura 2.2.1.1.B y Figura 2.2.2.1.B). Sin embargo, a partir de este resultado no podemos discernir entre las alternativas planteadas para la función específica de la LEC.

Analizando detenidamente las distintas variables comportamentales relevantes para la tarea pudimos esbozar algunas hipótesis. La tasa de lamido elevada que se observa en los animales intervenidos, sugiere que la asociación entre la acción de lamido y la entrega de recompensa se mantiene (Figura 2.2.1.2.A y Figura 2.2.2.2.A). Esta misma variable muestra que, bajo el silenciamiento de la LEC, la respuesta de lamido deja de estar circunscripta a la zona del pasillo correspondiente a la salida del contexto visual, es decir, la zona de recompensa. A partir de esto, podemos interpretar o bien que la asociación entre una zona del corredor y la posibilidad de obtener la recompensa se ve, en cierta medida, afectada; o bien, que es el reconocimiento de la zona del pasillo lo que se ve perjudicado por el silenciamiento de la LEC.

La primera posibilidad está respaldada por antecedentes que demuestran la participación de la LEC en la asociación entre localizaciones espaciales y episodios⁶⁸. La segunda, se puede justificar si pensamos a las diferentes zonas del pasillo como asociaciones entre diversas claves visuales y espaciales, en las cuales la LEC estaría involucrada⁷².

Nos preguntamos, a continuación, si la LEC podría estar participando de la asociación entre los olores y los contextos espaciales que determina la presencia o ausencia de la recompensa. Esta alternativa va en línea con el resultado de la performance en el que se pone de manifiesto que los animales intervenidos realizan mayor número de respuestas GO (Figura 2.2.1.1.B y Figura 2.2.2.1.B), tal como se observa en las primeras sesiones de entrenamiento donde la asociación entre olores y contextos espaciales aún no está establecida.

Sin embargo, la respuesta de lamido anticipatoria muestra un aumento para el tipo de ensayo recompensado revelando que los animales intervenidos conservan la memoria de asociación entre el Olor 1 y el Contexto A que predice la recompensa (Figura 2.2.1.2.A y Figura 2.2.2.2.A). También se revela un aumento de la respuesta anticipatoria para los ensayos en los que se presenta el Olor 1 en el Contexto B (no-recompensado). Esto sugiere que estaría afectado, en cierta medida, el reconocimiento de los contextos visuales, pero no el de los olores.

Las cuantificaciones de velocidad y tasa de inhalación a lo largo del ensayo respaldan esta última hipótesis. En los animales expertos en condición control se observa una modulación diferencial entre los contextos A y B que revela un primer punto de decisión en la tarea. Al identificar el Contexto A (posiblemente

recompensado), los ratones modifican su comportamiento reduciendo la velocidad y aumentando la tasa respiratoria, de forma tal de optimizar la detección del olor. Por el contrario, al reconocer el Contexto B, no se registran estos cambios en velocidad e inhalación (Figura 2.1.4 y Figura 2.1.5). En los animales intervenidos la modulación diferencial entre contextos desaparece, sugiriendo que el silenciamiento de la LEC afectaría la discriminación de los contextos.

En síntesis, tanto la respuesta de lamido anticipatoria como la velocidad y la tasa respiratoria respaldan la propuesta de que el silenciamiento de la LEC estaría afectando el reconocimiento del contexto espacial. Ahora bien, ¿se podrían justificar todos los efectos observados a partir de esta hipótesis? Puede resultar desconcertante el hecho de que la proporción de respuestas correctas disminuye en animales intervenidos para el tipo de ensayo CA-O2. Si la discriminación de olores estuviese intacta esperaríamos, en principio, que los animales pudiesen identificar dicha asociación como no- recompensada. Sin embargo, se observa que los ratones intervenidos realizan más respuestas de tipo GO frente a este tipo de ensayo.

Comenzamos a elaborar un modelo que podría explicar los resultados de la inactivación de la LEC simplemente a partir de un peor reconocimiento del contexto espacial. El modelo busca predecir la probabilidad de dar una respuesta GO o No-GO, y propone que la misma estaría determinada por la distancia a un “umbral de decisión”. Como se ilustra en la Figura D-2.A, un animal experto en condición control enfrentaría el primer punto de decisión al identificar el contexto espacial (A o B) que se presenta en el ensayo. La confianza o seguridad sobre esta decisión cambiaría la probabilidad de GO/No-GO de acuerdo a un parámetro k_1 . Si se identifica el Contexto A, el ratón aumentaría su tasa atencional (que, en los datos, se ve reflejada en el incremento de la tasa de inhalación y la disminución de la velocidad) frente a la segunda toma de decisión dada por la entrega del olor. En este sentido, las probabilidades de GO/No-GO se modificarían en base a la identificación del olor de acuerdo a un nuevo parámetro, k_2 , directamente proporcional a k_1 : cuánta más confianza en la identificación del Contexto A, más atención sobre el olor entregado y, en consecuencia, mayor seguridad en la discriminación del estímulo olfativo.

Si, por el contrario, el animal identifica el Contexto B, entonces se vería una baja tasa atencional sobre la siguiente decisión (evidenciada por un sostenimiento de la tasa respiratoria y de la velocidad). Por consiguiente, el peso sobre la discriminación del olor sería menor y estaría determinado por un tercer parámetro, k_3 , inversamente proporcional a k_1 . De este modo, cuánta mayor confianza sobre la identificación del Contexto B, menor atención sobre el estímulo olfativo y, en consecuencia, menor seguridad en la discriminación del olor.

Es decir, los parámetros k_2 y k_3 podrían expresarse en función de k_1 como:

$$\hat{k}_2 = \alpha \cdot \hat{k}_1$$

$$\hat{k}_3 = \frac{\beta}{\hat{k}_1}$$

donde α y β son constantes. De esta forma, la probabilidad de cada tipo de ensayo estaría dada por:

$$P_{(CA-O1)} = \hat{k}_1 + \alpha \cdot \hat{k}_1$$

$$P_{(CA-O2)} = \hat{k}_1 - \alpha \cdot \hat{k}_1$$

$$P_{(CB-O1)} = -\hat{k}_1 + \frac{\beta}{\hat{k}_1}$$

$$P_{(CB-O2)} = -\hat{k}_1 - \frac{\beta}{\hat{k}_1}$$

Como fue mencionado previamente, la respuesta comportamental estaría determinada por la distancia a un umbral. Por encima del mismo la respuesta sería GO y por debajo, No-GO; y, cuánto más lejos del umbral, la probabilidad de la respuesta sería mayor. Cabe destacar que dicho umbral podría variar de acuerdo a la motivación del animal: un animal muy sediento tendría el umbral bajo, mientras que uno saciado tendría un alto umbral para dar la respuesta de GO.

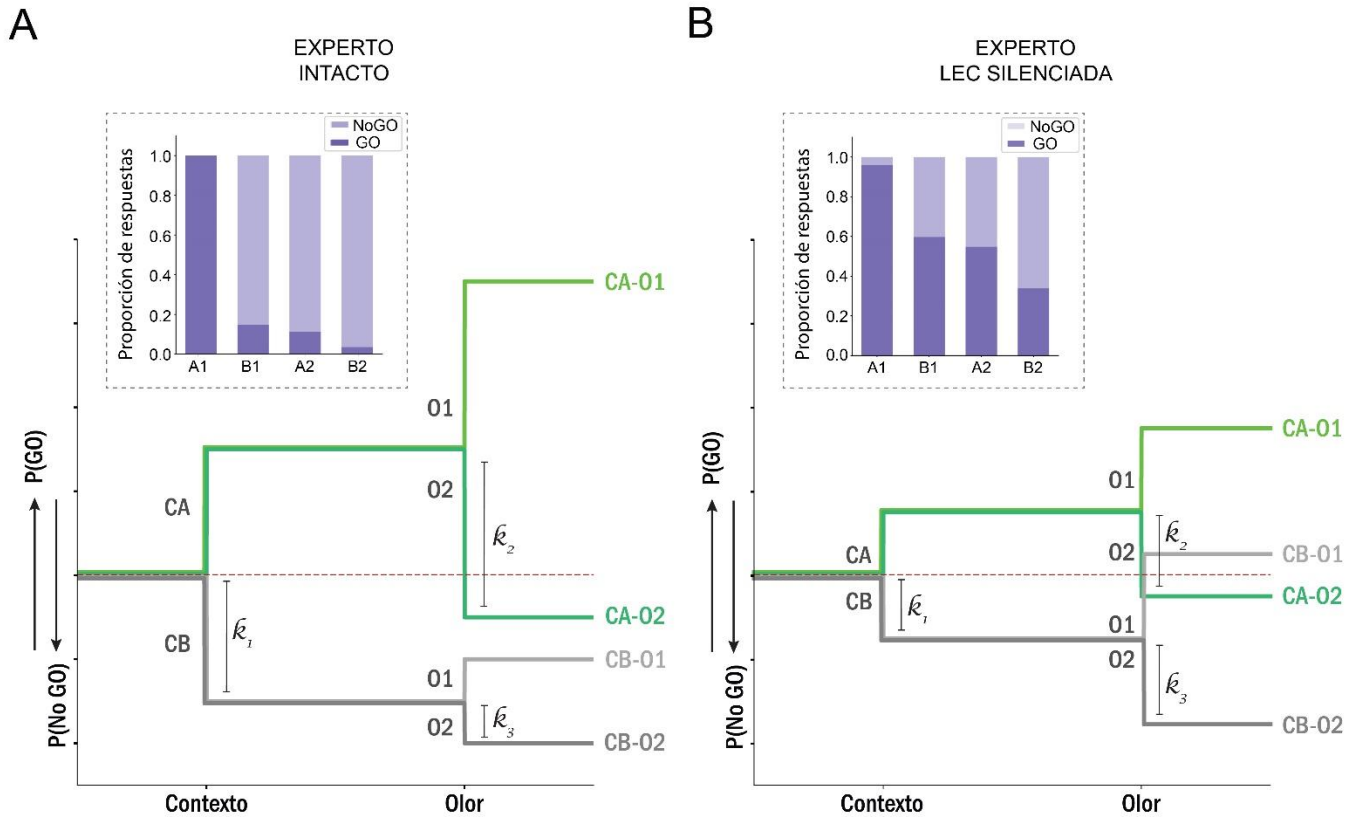


Figura D-2: Modelo de respuesta GO/No-GO. En el primer punto de decisión la identificación del Contexto separa los ensayos en CA y CB de acuerdo al parámetro k_1 . En el segundo punto de decisión, los tipos de ensayo se separan en las 4 combinaciones posibles. Los ensayos CA se dividen en CA-O1 y CA-O2 de acuerdo al parámetro k_2 . Los ensayos CB se separan en CB-O1 y CB-O2 en base al parámetro k_3 . La distancia y ubicación relativa al umbral determina si la respuesta comportamental es GO o No-GO. El umbral está ilustrado como una línea discontinua. **A**, Modelo de un animal experto intacto. Los parámetros seleccionados fueron $k_1=3$; $\alpha=1.33$; $\beta=3$. **RECUADRO:** Promedio de la proporción de respuestas GO y No-GO registrada para animales expertos intactos, $n=6$, datos agrupados de las Figuras 2.2.1.1.B y 2.2.2.1.B. **B**, Modelo de un animal intervenido con el silenciamiento de la LEC. Los parámetros seleccionados fueron: $k_1=1.5$; $\alpha=1.33$; $\beta=3$. **RECUADRO:** Promedio de la proporción de respuestas GO y No-GO registrada para animales expertos intervenidos, $n=6$, datos agrupados de las Figuras 2.2.1.1.B y 2.2.2.1.B.

Lo interesante de este modelo es que, ajustándolo a los datos de animales expertos, permitiría identificar qué parámetro se modifica en la condición de inactivación de la LEC, y eso podría ofrecer una mejor perspectiva de lo que ocurre en la realidad. Aquí elegimos parámetros manualmente para confeccionar los gráficos de modo tal, de obtener resultados aproximadamente coincidentes con la performance de los animales.

Si consideramos que el silenciamiento de la LEC genera una peor discriminación o reconocimiento de los contextos espaciales, entonces significaría que el parámetro k_1 sería menor, y consecuentemente, k_2 disminuiría y k_3 aumentaría. El resultado de reducir a la mitad el valor de k_1 se grafica en la Figura D-2.B y,

como puede observarse, tiene como consecuencia que las probabilidades de los tipos de ensayo CB-O1 y CA-O2 se aproximan al umbral. Esto significa que, en estos casos, la probabilidad de dar una respuesta GO y la probabilidad de dar una respuesta No-GO se vuelven similares (cerca de 0.5). Por otro lado, se observa que frente al tipo de ensayo CB-O2, si bien se aproxima un poco más al umbral en comparación con la condición intacto, la probabilidad de dar una respuesta No-GO es mayor que para el resto de los tipos de ensayo. Finalmente, para los ensayos CA-O1, la probabilidad por encima del umbral indica que la respuesta sería GO. Estas simulaciones se aproximan a los datos obtenidos en los experimentos de silenciamiento de la LEC que se expresan en términos de proporción de respuestas GO/No-GO en los recuadros de la Figura D-2. De todas maneras, creemos que el ajuste podría mejorar con más datos experimentales.

Por último, es necesario resaltar la variabilidad en los resultados obtenidos en esta parte. Es probable que estos no reflejen simplemente la variabilidad natural entre individuos sino también una variación debida a aspectos técnicos. Creemos que la principal fuente de variabilidad en este caso, se debe a que la región que buscamos silenciar, la LEC, tiene un gran tamaño y se extiende largamente en el eje anteroposterior. Esto significa que, posiblemente, no logremos inactivar toda la región a partir de las manipulaciones que realizamos. En consecuencia, estaríamos analizando el efecto del silenciamiento de una subregión o varias subregiones de la LEC que desconocemos; y un error en las coordenadas de inyección podría estar dirigiendo la intervención a subregiones con distintas funciones.

Hasta ahora, los experimentos de quimiogenética fueron realizados con un virus sin marcador fluorescente asociado, lo cual dificultó el análisis detallado del sitio de inyección. En los siguientes experimentos que planificamos, utilizaremos otro adenovirus con fluorescencia con el cual podríamos obtener una mejor noción de la zona inactivada y, esperamos, un mayor control de la variabilidad.

En el futuro, también buscaremos comprender específicamente el rol de las neuronas de la LEC que proyectan hacia la corteza piriforme. Para ello, utilizaremos una combinación de adenovirus que nos permitirán dirigir el DREADD inhibitorio M4Di hacia las neuronas glutamatérgicas de la LEC que envíen proyecciones axónicas hacia la PC.

Conclusiones

El marco general de este trabajo de tesis es comprender cómo el procesamiento olfativo puede ser modulado por la experiencia pasada. En particular, nos enfocamos en la plasticidad de la representación cortical de olores asociada a un aspecto específico de la experiencia sensorial: el contexto espacial en el que se presentan los estímulos. Antecedentes bibliográficos involucran a la corteza entorrinal en el procesamiento contextual espacial. Aquí planteamos la hipótesis de que las aferencias que llegan a la corteza piriforme desde la corteza entorrinal lateral podrían transmitir información contextual al procesamiento olfativo. Llevamos a cabo dos acercamientos experimentales para estudiar este tópico.

En la primera parte del trabajo, mostramos los resultados de experimentos electrofisiológicos en los que exploramos la integración de la aferencia de la LEC al microcircuito de la PC. Describimos, novedosamente, los efectos de la activación de las proyecciones de la LEC sobre cuatro poblaciones neuronales de la PC. Demostramos que, dentro de las neuronas piramidales, las SP reciben un mayor número de contactos directos de la LEC, y responden frente a su activación con un balance E/I positivo. Además, al estudiar la modulación de la LEC sobre la respuesta a la vía aferente proveniente del OB, mostramos que las neuronas SP aumentan su tasa de disparo. Por el contrario, las neuronas DP reciben escasos contactos directos desde LEC, y responden a su activación con un balance E/I negativo. Al estudiar la tasa de disparo, no detectamos un aumento significativo en respuesta a la estimulación conjunta de LOT y la LEC en relación a la respuesta a la estimulación única de LOT. Sin embargo, mostramos que se modifica la temporalidad de la respuesta restringiéndose los disparos de PA a una ventana temporal temprana.

En cuanto a las interneuronas inhibitorias que estudiamos, descubrimos que las PV reciben una alta proporción de contactos monosinápticos desde la LEC, lo cual evoca en las mismas una respuesta de disparo. Dado que estas interneuronas hacen sinapsis sobre los somas de las neuronas principales de la PC, planteamos que las mismas serían, en parte, responsables del silenciamiento de la vía recurrente en respuesta a la estimulación de la LEC. Por otro lado, mostramos que las interneuronas SOM reciben muy baja proporción de contactos directos de la LEC y, ante la activación de esta vía, responden con un balance E/I negativo. Estas interneuronas hacen sinapsis con las neuronas principales a nivel de las dendritas proximales, por lo cual, su inhibición podría generar una desinhibición dendrítica que estuviese posibilitando mayor integración de entradas aferentes.

En conclusión, los experimentos llevados a cabo en la primera parte de esta tesis, demuestran que la activación de la aferencia excitatoria de la LEC sobre la PC, evoca respuestas que varían según el tipo

neuronal. La consecuencia de este efecto diferencial es que el procesamiento de las aferencias sensoriales se modificaría cuando el circuito de la PC recibe, simultáneamente, información proveniente de la LEC. La respuesta diferencial de interneuronas inhibitorias a las aferencias de la LEC sugiere una reorganización de los circuitos inhibitorios que favorece las entradas sensoriales en las dendritas mientras que silencia la recurrencia de la red. Este tipo de reorganización podría involucrar un aumento en la señal respecto del ruido que podría fortalecer la codificación de la entrada sensorial que coincida con la activación de la LEC.

En la segunda parte del trabajo, expusimos los resultados obtenidos a partir de experimentos comportamentales, en los cuales evaluamos el papel de la LEC en una tarea de asociación entre olores, contextos espaciales y recompensa. Comparando el comportamiento de ratones expertos intactos con el de ratones expertos en los que se silenció de forma aguda la LEC, intentamos dilucidar el rol específico de esta región cerebral en la tarea.

Demostramos la participación de la LEC en la resolución de la tarea evaluada al descubrir que, a partir de su inhibición, los animales disminuyen la proporción de respuestas correctas. Más específicamente, observamos que los ratones aumentan la tasa de respuestas GO frente a ensayos no-recompensados. Analizando en detalle la velocidad, la tasa de lamido y la tasa de inhalación a lo largo de cada ensayo, acumulamos evidencia para sostener que la LEC es necesaria para una buena discriminación entre contextos espaciales.

Probamos que animales intervenidos son aun capaces de evocar la memoria de asociación entre contextos espaciales y olores que predice la recompensa. Planteamos, además, un modelo fenomenológico que nos permitiría explicar los resultados en términos de probabilidad de GO o No-GO.

En suma, las investigaciones llevadas a cabo en esta tesis echan luz sobre los posibles mecanismos por los cuales los circuitos neuronales de la corteza entorrinal lateral y de la corteza piriforme intercambian información para la adaptación de la codificación de olores de acuerdo al contexto en que éstos son percibidos.

Referencias

1. Engen Trygg. Odor Sensation and Memory. in 86–87 (1991).
2. Neville, K. R. & Haberly, L. B. Olfactory Cortex. in *The Synaptic Organization of the Brain* (ed. Shepherd, G. M.) 415–454 (Oxford University Press, 2004).
doi:10.1093/acprof:oso/9780195159561.003.0010.
3. Su, C.-Y., Menuz, K. & Carlson, J. R. Olfactory Perception: Receptors, Cells, and Circuits. *Cell* **139**, 45–59 (2009).
4. Wilson, D. A. & Sullivan, R. M. Cortical Processing of Odor Objects. *Neuron* **72**, 506–519 (2011).
5. Wilson, D. A., Best, A. R. & Sullivan, R. M. Plasticity in the Olfactory System: Lessons for the Neurobiology of Memory. *Neuroscientist* **10**, 513–524 (2004).
6. Gottfried, J. A. Central mechanisms of odour object perception. *Nature reviews. Neuroscience* **11**, 628–641 (2010).
7. Haberly, L. B. Parallel-distributed Processing in Olfactory Cortex: New Insights from Morphological and Physiological Analysis of Neuronal Circuitry. *Chemical Senses* **26**, 551–576 (2001).
8. Suh, G. S. B. *et al.* A single population of olfactory sensory neurons mediates an innate avoidance behaviour in *Drosophila*. *Nature* **431**, 854–859 (2004).
9. Araneda, R. C., Kini, A. D. & Firestein, S. The molecular receptive range of an odorant receptor. *Nat Neurosci* **3**, 1248–1255 (2000).
10. Rubin, B. D. & Katz, L. C. Optical Imaging of Odorant Representations in the Mammalian Olfactory Bulb. *Neuron* **23**, 499–511 (1999).
11. Uchida, N., Takahashi, Y. K., Tanifuji, M. & Mori, K. Odor maps in the mammalian olfactory bulb: domain organization and odorant structural features. *Nat Neurosci* **3**, 1035–1043 (2000).

12. Soucy, E. R., Albeanu, D. F., Fantana, A. L., Murthy, V. N. & Meister, M. Precision and diversity in an odor map on the olfactory bulb. *Nat Neurosci* **12**, 210–220 (2009).
13. Rennaker, R. L., Chen, C.-F. F., Ruyle, A. M., Sloan, A. M. & Wilson, D. A. Spatial and temporal distribution of odorant-evoked activity in the piriform cortex. *J Neurosci* **27**, 1534–1542 (2007).
14. Courtiol, E. & Wilson, D. A. The Olfactory Mosaic: Bringing an Olfactory Network Together for Odor Perception. *Perception* **46**, 320–332 (2017).
15. Franks, K. M. *et al.* Recurrent Circuitry Dynamically Shapes the Activation of Piriform Cortex. *Neuron* **72**, 49–56 (2011).
16. Poo, C. & Isaacson, J. S. Odor Representations in Olfactory Cortex: “Sparse” Coding, Global Inhibition, and Oscillations. *Neuron* **62**, 850–861 (2009).
17. Poo, C. & Isaacson, J. S. A major role for intracortical circuits in the strength and tuning of odor-evoked excitation in olfactory cortex. *Neuron* **72**, 41–48 (2011).
18. Stokes, C. C. A. & Isaacson, J. S. From Dendrite to Soma: Dynamic Routing of Inhibition by Complementary Interneuron Microcircuits in Olfactory Cortex. *Neuron* **67**, 452–465 (2010).
19. Isaacson, J. S. & Scanziani, M. How inhibition shapes cortical activity. *Neuron* **72**, 231–243 (2011).
20. Marín-Burgin, A., Mongiat, L. A., Pardi, M. B. & Schinder, A. F. Unique processing during a period of high excitation/inhibition balance in adult-born neurons. *Science* **335**, 1238–1242 (2012).
21. Pouille, F., Marin-Burgin, A., Adesnik, H., Atallah, B. V. & Scanziani, M. Input normalization by global feedforward inhibition expands cortical dynamic range. *Nat Neurosci* **12**, 1577–1585 (2009).
22. Pardi, M. B., Ogando, M. B., Schinder, A. F. & Marin-Burgin, A. Differential inhibition onto developing and mature granule cells generates high-frequency filters with variable gain. *Elife* **4**, e08764 (2015).
23. Suzuki, N. & Bekkers, J. M. Distinctive Classes of GABAergic Interneurons Provide Layer-Specific Phasic Inhibition in the Anterior Piriform Cortex. *Cerebral Cortex* **20**, 2971–2984 (2010).

24. Large, A. M., Vogler, N. W., Mielo, S. & Oswald, A.-M. M. Balanced feedforward inhibition and dominant recurrent inhibition in olfactory cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **113**, 2276–2281 (2016).
25. *Odor memory and perception*. (Elsevier, 2014).
26. Johnson, D. M. G., Illig, K. R., Behan, M. & Haberly, L. B. New Features of Connectivity in Piriform Cortex Visualized by Intracellular Injection of Pyramidal Cells Suggest that “Primary” Olfactory Cortex Functions Like “Association” Cortex in Other Sensory Systems. *J. Neurosci.* **20**, 6974–6982 (2000).
27. Wiegand, H. F. *et al.* Complementary Sensory and Associative Microcircuitry in Primary Olfactory Cortex. *Journal of Neuroscience* **31**, 12149–12158 (2011).
28. Suzuki, N. & Bekkers, J. M. Neural coding by two classes of principal cells in the mouse piriform cortex. *J Neurosci* **26**, 11938–11947 (2006).
29. Choy, J. M. C. *et al.* Optogenetic Mapping of Intracortical Circuits Originating from Semilunar Cells in the Piriform Cortex. *Cereb. Cortex* bhv258 (2015) doi:10.1093/cercor/bhv258.
30. Illig, K. R. Projections from orbitofrontal cortex to anterior piriform cortex in the rat suggest a role in olfactory information processing. *The Journal of comparative neurology* **488**, 224–231 (2005).
31. Majak, K., Rönkkö, S., Kemppainen, S. & Pitkänen, A. Projections from the amygdaloid complex to the piriform cortex: A PHA-L study in the rat. *J Comp Neurol* **476**, 414–428 (2004).
32. Johnson, B. A., Arguello, S. & Leon, M. Odorants with multiple oxygen-containing functional groups and other odorants with high water solubility preferentially activate posterior olfactory bulb glomeruli. *J. Comp. Neurol.* **502**, 468–482 (2007).
33. Gabernet, L., Jadhav, S. P., Feldman, D. E., Carandini, M. & Scanziani, M. Somatosensory integration controlled by dynamic thalamocortical feed-forward inhibition. *Neuron* **48**, 315–327 (2005).
34. Yoshimura, Y. & Callaway, E. M. Fine-scale specificity of cortical networks depends on inhibitory cell type and connectivity. *Nat Neurosci* **8**, 1552–1559 (2005).

35. Ferster, D. & Jagadeesh, B. EPSP-IPSP interactions in cat visual cortex studied with in vivo whole-cell patch recording. *J Neurosci* **12**, 1262–1274 (1992).
36. Wehr, M. & Zador, A. M. Balanced inhibition underlies tuning and sharpens spike timing in auditory cortex. *Nature* **426**, 442–446 (2003).
37. Wilent, W. B. & Contreras, D. Dynamics of excitation and inhibition underlying stimulus selectivity in rat somatosensory cortex. *Nat Neurosci* **8**, 1364–1370 (2005).
38. Markram, H. *et al.* Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev Neurosci* **5**, 793–807 (2004).
39. Silberberg, G. Polysynaptic subcircuits in the neocortex: spatial and temporal diversity. *Curr Opin Neurobiol* **18**, 332–337 (2008).
40. Somogyi, P., Tamás, G., Lujan, R. & Buhl, E. H. Salient features of synaptic organisation in the cerebral cortex. *Brain Res Brain Res Rev* **26**, 113–135 (1998).
41. Suzuki, N. & Bekkers, J. M. Microcircuits Mediating Feedforward and Feedback Synaptic Inhibition in the Piriform Cortex. *Journal of Neuroscience* **32**, 919–931 (2012).
42. Oláh, S. *et al.* Regulation of cortical microcircuits by unitary GABA-mediated volume transmission. *Nature* **461**, 1278–1281 (2009).
43. Karayannis, T. *et al.* Slow GABA transient and receptor desensitization shape synaptic responses evoked by hippocampal neurogliaform cells. *J Neurosci* **30**, 9898–9909 (2010).
44. Capogna, M. & Pearce, R. A. GABA A_A,slow: causes and consequences. *Trends Neurosci* **34**, 101–112 (2011).
45. Higley, M. J. & Contreras, D. Balanced excitation and inhibition determine spike timing during frequency adaptation. *J Neurosci* **26**, 448–457 (2006).

46. Haberly, L. B. & Price, J. L. Association and commissural fiber systems of the olfactory cortex of the rat. I. Systems originating in the piriform cortex and adjacent areas. *J. Comp. Neurol.* **178**, 711–740 (1978).
47. Sheridan, D. C. *et al.* Matching of feedback inhibition with excitation ensures fidelity of information flow in the anterior piriform cortex. *Neuroscience* **275**, 519–530 (2014).
48. Luna, V. M. & Schoppa, N. E. GABAergic Circuits Control Input-Spike Coupling in the Piriform Cortex. *Journal of Neuroscience* **28**, 8851–8859 (2008).
49. Large, A. M., Kunz, N. A., Mielo, S. L. & Oswald, A.-M. M. Inhibition by Somatostatin Interneurons in Olfactory Cortex. *Front. Neural Circuits* **10**, (2016).
50. Canto-Bustos, M., Friason, F. K., Bassi, C. & Oswald, A.-M. M. Disinhibitory Circuitry Gates Associative Synaptic Plasticity in Olfactory Cortex. *J. Neurosci.* **42**, 2942–2950 (2022).
51. Diodato, A. *et al.* Molecular signatures of neural connectivity in the olfactory cortex. *Nat Commun* **7**, 12238 (2016).
52. Citri, A. & Malenka, R. C. Synaptic Plasticity: Multiple Forms, Functions, and Mechanisms. *Neuropsychopharmacol* **33**, 18–41 (2008).
53. Zucker, R. S. & Regehr, W. G. Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol* **64**, 355–405 (2002).
54. Wilson, D. A. Habituation of odor responses in the rat anterior piriform cortex. *J Neurophysiol* **79**, 1425–1440 (1998).
55. Morris, R. G. D.O. Hebb: The Organization of Behavior, Wiley: New York; 1949. *Brain Res Bull* **50**, 437 (1999).
56. Saar, D., Grossman, Y. & Barkai, E. Learning-induced enhancement of postsynaptic potentials in pyramidal neurons. *J Neurophysiol* **87**, 2358–2363 (2002).

57. Kanter, E. D. & Haberly, L. B. Associative long-term potentiation in piriform cortex slices requires GABAA blockade. *J Neurosci* **13**, 2477–2482 (1993).
58. Johenning, F. W. *et al.* Dendritic compartment and neuronal output mode determine pathway-specific long-term potentiation in the piriform cortex. *J Neurosci* **29**, 13649–13661 (2009).
59. Kanter, E. D., Kapur, A. & Haberly, L. B. A dendritic GABAA-mediated IPSP regulates facilitation of NMDA-mediated responses to burst stimulation of afferent fibers in piriform cortex. *J Neurosci* **16**, 307–312 (1996).
60. Patil, M. M., Linster, C., Lubenov, E. & Hasselmo, M. E. Cholinergic agonist carbachol enables associative long-term potentiation in piriform cortex slices. *J Neurophysiol* **80**, 2467–2474 (1998).
61. Sarter, M., Hasselmo, M. E., Bruno, J. P. & Givens, B. Unraveling the attentional functions of cortical cholinergic inputs: interactions between signal-driven and cognitive modulation of signal detection. *Brain Res Brain Res Rev* **48**, 98–111 (2005).
62. Barkai, E. & Hasselmo, M. H. Acetylcholine and associative memory in the piriform cortex. *Mol Neurobiol* **15**, 17–29 (1997).
63. Deshmukh, S. S. & Knierim, J. J. Representation of Non-Spatial and Spatial Information in the Lateral Entorhinal Cortex. *Front. Behav. Neurosci.* **5**, (2011).
64. Beer, Z., Chwiesko, C., Kitsukawa, T. & Sauvage, M. M. Spatial and stimulus-type tuning in the LEC, MEC, POR, PrC, CA1, and CA3 during spontaneous item recognition memory: Spatial and Stimulus-Type Tunings in Recognition Memory. *Hippocampus* **23**, 1425–1438 (2013).
65. Hunsaker, M. R., Chen, V., Tran, G. T. & Kesner, R. P. The medial and lateral entorhinal cortex both contribute to contextual and item recognition memory: A test of the binding of items and context model. *Hippocampus* **23**, 380–391 (2013).

66. Tsao, A., Moser, M.-B. & Moser, E. I. Traces of Experience in the Lateral Entorhinal Cortex. *Current Biology* **23**, 399–405 (2013).
67. Van Cauter, T. *et al.* Distinct Roles of Medial and Lateral Entorhinal Cortex in Spatial Cognition. *Cerebral Cortex* **23**, 451–459 (2013).
68. Wilson, D. I. G., Watanabe, S., Milner, H. & Ainge, J. A. Lateral entorhinal cortex is necessary for associative but not nonassociative recognition memory. *Hippocampus* **23**, 1280–1290 (2013).
69. Wilson, D. I. G. *et al.* Lateral entorhinal cortex is critical for novel object-context recognition. *Hippocampus* **23**, 352–366 (2013).
70. Chao, O. Y., Huston, J. P., Li, J.-S., Wang, A.-L. & de Souza Silva, M. A. The medial prefrontal cortex-lateral entorhinal cortex circuit is essential for episodic-like memory and associative object-recognition: MPFC-LEC IS KEY FOR EPISODIC-LIKE AND ASSOCIATIVE MEMORY. *Hippocampus* **26**, 633–645 (2016).
71. Keene, C. S. *et al.* Complementary Functional Organization of Neuronal Activity Patterns in the Perirhinal, Lateral Entorhinal, and Medial Entorhinal Cortices. *J. Neurosci.* **36**, 3660–3675 (2016).
72. Kuruvilla, M. V. & Ainge, J. A. Lateral Entorhinal Cortex Lesions Impair Local Spatial Frameworks. *Front. Syst. Neurosci.* **11**, 30 (2017).
73. Kerr, K. M., Agster, K. L., Furtak, S. C. & Burwell, R. D. Functional neuroanatomy of the parahippocampal region: The lateral and medial entorhinal areas. *Hippocampus* **17**, 697–708 (2007).
74. Cleland, T. A. & Linster, C. Central olfactory structures. in *Handbook of Clinical Neurology* vol. 164 79–96 (Elsevier, 2019).
75. Agster, K. L. & Burwell, R. D. Cortical efferents of the perirhinal, postrhinal, and entorhinal cortices of the rat. *Hippocampus* **19**, 1159–1186 (2009).

76. Xu, W. & Wilson, D. A. Odor-evoked activity in the mouse lateral entorhinal cortex. *Neuroscience* **223**, 12–20 (2012).
77. Bitzenhofer, S. H., Westeinde, E. A., Zhang, H.-X. B. & Isaacson, J. S. Rapid odor processing by layer 2 subcircuits in lateral entorhinal cortex. *eLife* **11**, e75065 (2022).
78. Otto, T., Schottler, F., Staubli, U., Eichenbaum, H. & Lynch, G. Hippocampus and olfactory discrimination learning: Effects of entorhinal cortex lesions on olfactory learning and memory in a successive-cue, go–no-go task. *Behavioral Neuroscience* **105**, 111–119 (1991).
79. Ferry, B., Oberling, P., Jarrard, L. E. & Di Scala, G. Facilitation of conditioned odor aversion by entorhinal cortex lesions in the rat. *Behavioral Neuroscience* **110**, 443–450 (1996).
80. Wirth, S., Ferry, B. & Di Scala, G. Facilitation of olfactory recognition by lateral entorhinal cortex lesion in rats. *Behav Brain Res* **91**, 49–59 (1998).
81. Chapuis, J. *et al.* Lateral Entorhinal Modulation of Piriform Cortical Activity and Fine Odor Discrimination. *J. Neurosci.* **33**, 13449–13459 (2013).
82. Bernabeu, R., Thiriet, N., Zwiller, J. & Di Scala, G. Lesion of the lateral entorhinal cortex amplifies odor-induced expression of *fos*, *junB*, and *zif 268* mRNA in rat brain. *Synapse* **59**, 135–143 (2006).
83. Musall, S., Kaufman, M. T., Juavinett, A. L., Gluf, S. & Churchland, A. K. Single-trial neural dynamics are dominated by richly varied movements. *Nature neuroscience* **22**, 1677–1686 (2019).
84. Umeda, T., Isa, T. & Nishimura, Y. The somatosensory cortex receives information about motor output. *Science Advances* **5**, eaaw5388 (2019).
85. Saleem, A. B., Diamanti, E. M., Fournier, J., Harris, K. D. & Carandini, M. Coherent encoding of subjective spatial position in visual cortex and hippocampus. *Nature* **562**, 124–127 (2018).
86. Verhagen, J. V., Wesson, D. W., Netoff, T. I., White, J. A. & Wachowiak, M. Sniffing controls an adaptive filter of sensory input to the olfactory bulb. *Nat Neurosci* **10**, 631–639 (2007).

87. Kadohisa, M. & Wilson, D. A. Separate encoding of identity and similarity of complex familiar odors in piriform cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 15206–15211 (2006).
88. Roesch, M. R., Stalnaker, T. A. & Schoenbaum, G. Associative encoding in anterior piriform cortex versus orbitofrontal cortex during odor discrimination and reversal learning. *Cereb Cortex* **17**, 643–652 (2007).
89. Saar, D. & Barkai, E. Long-term modifications in intrinsic neuronal properties and rule learning in rats. *Eur J Neurosci* **17**, 2727–2734 (2003).
90. Choi, G. B. *et al.* Driving opposing behaviors with ensembles of piriform neurons. *Cell* **146**, 1004–1015 (2011).
91. Roth, B. L. DREADDs for Neuroscientists. *Neuron* **89**, 683–694 (2016).
92. *Allen Mouse Brain Atlas*.
93. Amigo Durán, Macarena. Tesis de Licenciatura ‘Análisis comportamental de una tarea de discriminación olfativa en un contexto visual en ratones’.
94. Guo, Z. V. *et al.* Procedures for behavioral experiments in head-fixed mice. *PLoS One* **9**, e88678 (2014).
95. Bolding, K. A., Nagappan, S., Han, B.-X., Wang, F. & Franks, K. M. Recurrent circuitry is required to stabilize piriform cortex odor representations across brain states. *Elife* **9**, e53125 (2020).
96. Witter, M. P., Doan, T. P., Jacobsen, B., Nilssen, E. S. & Ohara, S. Architecture of the Entorhinal Cortex A Review of Entorhinal Anatomy in Rodents with Some Comparative Notes. *Front. Syst. Neurosci.* **11**, 46 (2017).