



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Rol del aprendizaje y el contexto sobre las representaciones de la corteza olfativa piriforme

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

Lic. Lucca Salomon

Directora de tesis: Dra. Antonia Marin-Burgin

Codirector de tesis: Dr. Sebastián Alejo Romano

Consejera de estudios: Dra. Lidia Szczupak

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

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 2026

Resumen

Título: Rol del aprendizaje y el contexto sobre las representaciones de la corteza olfativa piriforme

Palabras clave: Olfación - Plasticidad - Electrofisiología - Realidad virtual - Comportamiento

Una característica única del procesamiento de olores es que es altamente dependiente de la experiencia previa, del contexto actual y del estado interno del animal. El objetivo principal de este trabajo fue estudiar cómo el aprendizaje y el contexto visual modulan las representaciones neuronales en la corteza piriforme (PCx) del ratón, la región más extensa de la corteza olfativa.

Para abordarlo, desarrollamos una tarea de aprendizaje asociativo en un entorno de realidad virtual en la que los ratones tienen que aprender a asociar un olor con un contexto visual para obtener una recompensa, y realizamos registros electrofisiológicos neuronales *in-vivo* en la PCx a lo largo de las sesiones de entrenamiento, combinando modelos de codificación/decodificación conductual y neuronal.

Observamos que los animales aprenden la tarea de forma secuencial, primero discriminando olores (sesión intermedia) y luego contextos (sesión experta), y descubrimos que la codificación de la PCx refleja el aprendizaje: la PCx de animales de primera sesión y de sesión intermedia sólo codifica olores, mientras que en animales expertos codifica tanto olores como contextos, posición e información asociativa, mostrando que sus neuronas adquieren selectividad mixta sólo luego del aprendizaje. Los análisis de decodificación neuronal corroboraron estos resultados y también mostraron que la presencia de información contextual en la PCx mejora la discriminación de olores. Al romper la contingencia entre olores y contextos, demostramos la necesidad de un mecanismo asociativo para que la información contextual se vuelva evidente en la PCx. Sorpresivamente, encontramos que cuando el olor funciona como un distractor, la PCx pareciera sufrir un proceso de supresión selectiva de la información olfativa.

En conjunto, este trabajo muestra que la corteza piriforme presenta una notable plasticidad y versatilidad, siendo capaz de fortalecer conexiones con información relevante o suprimir aquellas que impiden el correcto desarrollo de una tarea.

Abstract

Title: Role of learning and context on representations of the olfactory piriform cortex

Keywords: Olfaction - Plasticity - Electrophysiology - Virtual reality - Behavior

A unique feature of odor processing is that it is highly dependent on prior experience, current context, and the animal's internal state. The primary objective of this work was to study how learning and visual context modulate neural representations in the mouse piriform cortex (PCx), the largest region of the olfactory cortex.

To address this, we developed an associative learning task within a virtual reality environment where mice learn to associate an odor with a visual context to obtain a reward. We performed *in-vivo* neural electrophysiological recordings in the PCx throughout training sessions, combining behavioral and neural encoding/decoding models.

We observed that the animals learn the task sequentially, first discriminating odors (intermediate session) and then contexts (expert session). We found that PCx encoding reflects this learning process: in early and intermediate sessions, the PCx only encodes odors, whereas in expert animals, it encodes odors as well as contexts, position, and associative information, demonstrating that neurons acquire mixed selectivity only after learning. Neural decoding analyses corroborated these results and also showed that the presence of contextual information in the PCx enhances odor discrimination. By breaking the contingency between odors and contexts, we demonstrated the necessity of an associative mechanism for contextual information to become evident in the PCx. Surprisingly, we found that when the odor serves as a distractor, the PCx appears to undergo a process of selective suppression of olfactory information.

Taken together, this work shows that the piriform cortex exhibits remarkable plasticity and versatility, being capable of strengthening connections with relevant information or suppressing those that hinder the correct execution of a task.

Agradecimientos

A mis directorxs soñadxs, por la paciencia, didáctica, cariño y acompañamiento en tan espectacular proceso. A Anto, mi mamá científica, por la generosidad en cada aspecto de la vida, por fomentar el intercambio y el pensamiento crítico, por los viajes, por la ciencia argentina de primer nivel y por darme fuerza y confiar en cada paso. A Seba, director y amigo, por nunca subestimarme y guiarme con paciencia infinita, aunque muchas veces te pidiera que me repitas cosas que acabábamos de ver. Por poder desconectar un rato del rol director-estudiante y tomarnos una birra (o, tal vez, unos cuantos fernets en alguna fiesta de fin de congreso). Ambos dos, un verdadero lujo de directorxs, un ejemplo a seguir con muchísimo orgullo e ilusión.

A nuestro grupo. A Noe, una de las personas más amorosas, alegres e inteligentes que conocí en estos años. Por enseñarme a trabajar con animales (y tantas otras cosas más) con todo el cuidado y compañía que alguien puede desear. Hiciste que un proceso difícilísimo se vea fácil y que aprenda a hacer cosas que jamás me imaginé que iba a poder hacer. A mis amigas y compañeras de todo el doctorado, Sol (la jefa) y Macky, por hacer un increíble equipo de trabajo, acompañarnos codo a codo en todo este proceso y, aparte, cagarnos de risa en el camino. A Oli: clara, sagaz, capa; más para nada faltan palabras; arma pavadas para largar vastas carcajadas. A Juli, por la suavidad y caricia que generaste cuando entraste al labo. A la sangre nueva: a Car, Magui, los *compu boys* y Tino, por traer alegría y, sobre todo, manija al grupo.

Al gran, increíble e inigualable supergrupo de Neuroñoquis. Compartir todos estos años en un ambiente de trabajo tan ameno, conjunto e interactivo fue una verdadera fiesta. Por el altísimo nivel de colaboración entre todos los grupos de neuro, por los sesudos seminarios y, sobre todo, por la chanchada *ad libitum* qué tantos picos de glucemia nos regaló. A lxs directores, Anto, Nara, Damián y Tomás, por crear este mágico espacio de trabajo. A los que les gusta fenotípicamente, por el compañerismo, las risas y, por qué no, los juegos de mesa.

En general, a todo el IBioBA.

A Tincho, mi padre y amigo científico. A vos y a Vero, por llevarme de la mano en los primeros pasos del mundo académico, instancia en la que estaba bien verde, y transmitirme la pasión y el pensamiento crítico, acompañado de cariño y paciencia. A Gabi y a todo el LNM, con quienes compartí tantos años y a quienes aprecio mucho.

A la familia. A mi mamá: no alcanzan las palabras para describir tanto amor. No podría imaginarme una mejor mamá que vos. Te quiero con todo el corazón. A mis hermanos, Milo y Gaspi, compañeros de vida, cómplices absolutos, tentadas infinitas, amor del bueno y del que es para todo la vida. A mi papá, por enseñarme que uno puede salirse de los esquemas y que nunca es tarde para apostar por un nuevo sueño. A Car, Mori, Sofi y Ale, por las festivas juntadas, las charlas, los banquetes y las largas jornadas de basas (aunque les suela ganar). A Bubú, por enseñarme a encontrar el disfrute en lo lúdico, aspecto que, desde ese momento, marcó mi vida para siempre. Al abuelo Carlos y a Ade, por generar rituales de encuentro, por creer en los vínculos y por enseñarme los códigos implícitos del vivir en sociedad. Al abuelo, particularmente, por ser un ejemplo a seguir y mostrarme que se puede seguir creando proyectos para dejar a la posteridad a los 90 pirulos. A Flor y Fefo, por introducirme en este magnífico mundo natural y exacto, que forjó mi identidad y me hizo conocer amistades y colegas para toda la vida. A Migue, por la alegría y el optimismo intransigente. A Joaco, Vio y Ale, por creer en las familias ensambladas y abrir las puertas a una nueva cotidianidad. A Joaco y a Vio, particularmente, por permitirnos sitiar olivos, por tantos momentos, viajes y fines de semanas hermosos vividos juntos durante nuestra niñez y juventud, y por tantos otros por compartir. A Pau, por las nuevas alegrías, con abundantes risas, por la paciencia y, también, por seguir creyendo en los vínculos. A todxs, lxs quiero con ese querer profundo que uno tiene con su familia (su factoría).

A Del, mi amorcito. Qué escribirte? Desde que te conocí la vida es tanto más linda, mi amor. Por tanto compañerismo, por ponernos culo con culo a laburar durante todo este proceso aunque hagan 40 °C y, aún así, concretar lo que nos propusimos, por confiar en los proyectos juntxs, por querer compartir, por tantas cocinadas, por las riquísimas chareus con lluvia, pero sobre todo, por el cariño de todos los días. Te amo muchísimo, corazón.

A Clau, por los momentos compartidos y por confiar en mí para acompañar a Del en este camino.

A la Chancha, mi segunda familia, la elegida en vida. Por los jejes y jajas, por los viajes, por acompañarnos durante toda la facultad sin soltarnos las manos. A ustedes también, por apostar a los proyectos compartidos. Sueño con una adultez y vejez en comunidad y con ustedes. Los quiero con todo el corazón.

Al Tata, por enseñarme qué significa la palabra 'equipo' y por darme la confianza y paciencia para enamorarme del *furvo*. Con ustedes también, la complicidad y el amor es absoluto.

A Mar, Shuls y Lau, por elegir y caminar la neurociencia juntxs. Por las tremendas y numerosas jornadas de cafecito, compu y laburo que metimos durante el doctorado (?). Por manijearnos y acompañarnos durante todo esto. Por las chipas, las jodas y la organización de movidas juntxs. Dónde estaremos dentro de 10 años? A ustedes también, lxs quiero muchísimo.

A la banda de Endócrino, por las divinas juntadas y por la complicidad de haber compartido tan bellos esquemas maridados con botas de piel de cocodrilo.

Al resto de la gente con la que compartí el magnífico mundo de Exactas. A Nati, a Joacubidú y tantxs otrxs. Hermoso haber compartido pasillos, aulas, pasto y fiestas juntxs.

A la banda del Ciudad, por habernos criado juntxs y seguir compartiendo la vida ahora. Especialmente, a Joaco y a Magui, mis amigxs del alma, a quienes quiero muchísimo.

A la banda de la Salseush, por agregarle sabor y juego a la vida.

A las Apasionatas, por compartir un proyecto conjunto y divertirnos tanto en el camino. Por las mil y un anécdotas de volcar copas, lavar en bañaderas y rasquetear comida de lugares inimaginados.

A Gal, por las tortas y las largas charlas de proyectos de vida, sin tapujos ni filtros.

A Zul y Rorro, por el cariño, el cotidiano y la *cashorrada*. Que la vida nos vuelva a encontrar, siempre mejor que la vez anterior!

A la Red de Estudiantes de Neurociencias, por creer en lo colectivo y desde abajo.

Al *fulbo* de los viernes, por alimentar los rituales en un contexto de tanta alienación, por confiar en el afuera y en lo comunitario, por ser la zanahoria al final de la semana, por ser la frutillita del postre (aunque la fruta no lo sea).

A Racing, por ser el mejor club de Argentina. A Lau, por llevarme a la cancha por primera vez. A Maxi, por compartir la pasión y locura.

A Conesa, por ser un nido de contención y amor dónde hacer base y echar raíces para crecer.

A la universidad pública, gratuita y de altísima calidad. A todxs lxs docentes y no docentes que se rompen el lomo laburando por dos mangos porque confían en que alimentando este proyecto se genera un mejor país.

Una vez más, y hoy más que nunca, a Néstor y a Cristina, por creer en un país más igualitario, donde los derechos de los trabajadores crezcan con el país y la gente pueda estar cada vez mejor.

Tuve la dicha de compartir el doctorado, y toda mi vida hasta el momento, con amistades, colegas, familia y amor, con gente que hizo que vivir estos procesos sea una experiencia hermosa. A todxs ellxs (y a todxs los que me olvidé de nombrar acá), gracias por acompañarnos en esto y espero sigamos este camino juntxs!

Índice

Resumen.....	2
Abstract.....	3
Agradecimientos.....	4
Índice.....	8
Abreviaturas.....	10
Introducción.....	12
Introducción al sistema olfativo.....	12
La corteza piriforme (PCx).....	15
Anatomía.....	15
Función.....	18
Modulación contextual de las representaciones sensoriales.....	23
Aprendizaje y procesamiento sensorial cortical.....	25
Hipótesis y Objetivos.....	28
Hipótesis.....	28
Objetivos.....	28
Materiales y Métodos.....	29
Animales.....	29
Cirugías.....	29
Localización estereotáxica y colocado de barra metálica.....	29
Craneotomía.....	30
Tarea comportamental.....	31
Protocolo de entrenamiento.....	33
Restricción de agua.....	33
Handling.....	33
Habitación.....	33
Entrenamiento.....	34
Estímulos olfativos.....	35
Delivery de olores.....	35
Detección y adquisición de señales.....	35
Odorantes.....	36
Registros de actividad neuronal.....	37
Adquisición de datos.....	38
Análisis estadístico.....	39
Análisis del desempeño comportamental.....	39
Spike sorting.....	40
Respuestas neuronales individuales.....	41
Modelo lineal generalizado para análisis de codificación y decodificación neuronal.....	42
Parametrización de variables y filtros lineales.....	42
Ajuste y medición de performance del modelo.....	45
Selección de modelos.....	46

Contribución de cada variable al modelo GLM de encoding.....	47
Decoding con el modelo GLM.....	48
Decodificación de olores con clasificadores lineales.....	50
Agrupamiento de neuronas según la similaridad en las contribución relativas de las variables de encoding.....	51
Resultados.....	53
Parte 1: El aprendizaje de una asociación entre olores, contextos visuales y recompensas modifica de forma dinámica el comportamiento y las respuestas de los circuitos corticales olfativos.....	53
Análisis comportamental.....	53
Respuestas neuronales.....	59
Codificación neuronal: GLM.....	68
Decodificación neuronal.....	74
Discusión - Parte 1.....	78
Parte 2: Evaluación de mecanismos asociativos responsables de la adquisición de la codificación mixta en la corteza piriforme.....	84
Análisis comportamental.....	85
Respuestas neuronales.....	88
Codificación neuronal: GLM.....	92
Decodificación neuronal.....	96
Olores dentro de la realidad virtual vs estimulación pasiva.....	98
Discusión - Parte 2.....	103
Conclusiones.....	108
Referencias.....	110

Abreviaturas

AP	Coordenada anteroposterior
aPCx	Corteza piriforme anterior
ASSNs	Fibras asociativas (del inglés <i>associational fibers</i>)
C _N	Contexto no recompensado
C _R	Contexto recompensado
CR	Rechazo correcto (del inglés <i>correct rejection</i>)
CS	Estímulo condicionado (del inglés <i>conditioned stimulus</i>)
DP	Células piramidales profundas (del inglés <i>deep pyramidal</i>)
DV	Coordenada dorsoventral
FA	Falsa alarma
FBI	Inhibición de tipo <i>feedback</i> (del inglés <i>feedback inhibition</i>)
FFI	Inhibición de tipo <i>feedforward</i> (del inglés <i>feedforward inhibition</i>)
GLM	Modelo lineal generalizado (del inglés <i>generalized linear model</i>)
HZ	Interneuronas gabaérgicas horizontales
iLTP	Potenciación de la inhibición a largo plazo (del inglés <i>inhibitory long term potentiation</i>)
KDE	Estimación de densidad de probabilidad por <i>kernels</i> (del inglés <i>kernel density estimation</i>)
LEC	Corteza entorrinal lateral (del inglés <i>lateral entorhinal cortex</i>)
LLR	Cociente de verosimilitud logarítmica (del inglés <i>log-likelihood ratio</i>)
LOT	Tracto olfativo lateral (del inglés <i>lateral olfactory tract</i>)
LTD	Depresión sináptica a largo plazo (del inglés <i>long term depression</i>)
LTP	Potenciación a largo plazo (del inglés <i>long term potentiation</i>)
MDS	Escalamiento multidimensional (del inglés <i>multidimensional scaling</i>)
ML	Coordenada mediolateral
NG	Interneuronas gabaérgicas <i>neurogliaform</i>
O _A	Olor A (etil butirato)
O _B	Olor B (isoamil acetato)
OB	Bulbo olfatorio

O _N	Olor no recompensado
O _R	Olor recompensado
PCA	Análisis de componentes principales (del inglés <i>principal component analysis</i>)
PCx	Corteza piriforme (del inglés <i>piriform cortex</i>)
PFC	Corteza prefrontal (del inglés <i>prefrontal cortex</i>)
pPCx	Corteza piriforme posterior
PSTH	Histogramas peri-estímulo
RIC	Rango intercuartílico
SDT	Teoría de detección de señales (del inglés <i>signal detection theory</i>)
SL	Neuronas glutamatérgicas semilunares
SP	Neuronas glutamatérgicas piramidales superficiales (del inglés <i>superficial pyramidal</i>)
TRN	Núcleo reticulado talámico (del inglés <i>thalamic reticular nucleus</i>)
UPGMA	Método de agrupamiento jerárquico por distancia media no ponderada (del inglés <i>unweighted pair group method with arithmetic mean</i>)
US	Estímulo incondicionado (del inglés <i>unconditioned stimulus</i>)

Introducción

Introducción al sistema olfativo

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 (D. a. Wilson & Sullivan, 2011). 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 evolución y a través de nichos ecológicos variados, con una gran sensibilidad y poder de discriminación. 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 (Shepherd et al., 2021).

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. La capacidad de reconocer un olor depende en gran medida del contexto en el que se presenta: un mismo estímulo olfativo puede identificarse con facilidad en un entorno previamente asociado, pero resultar ambiguo o irreconocible fuera de él. Esto evidencia el carácter contextual y dependiente de la memoria del sistema olfativo (Gottfried, 2010; D. a. Wilson & Sullivan, 2011). Esta propiedad se sustenta en la extensa red de conexiones recíprocas formada por la corteza olfativa que le permite intercambiar información sensorial, afectiva y mnemónica con otras regiones corticales y sub-corticales (Carmichael et al., 1994; Haberly & Price, 1978; Insausti et al., 2002; D. M. Johnson et al., 2000)(ver Figura I.1.B).

El sistema olfativo utiliza un conjunto de diversos receptores olfativos especializados para la detección de odorantes a través del reconocimiento de moléculas o, más comúnmente, de características sub-moleculares específicas. Las neuronas sensoriales primarias del epitelio olfativo expresan un único tipo de receptor y, en la gran parte de los vertebrados, todas aquellas que expresan el mismo receptor convergen en uno o dos glomérulos del bulbo olfatorio (OB, por sus siglas en inglés) (ver Figura I.1.A)

(Mombaerts et al., 1996). Allí se desarrolla la etapa inicial del procesamiento olfativo, donde diferentes olores inducen distintos patrones espacio-temporales de actividad glomerular. En diversas especies, existe una gran precisión en la disposición espacial de los glomérulos en relación a su sensibilidad olfativa, generando un robusto mapa funcional olfatorio en el OB o su análogo en invertebrados, el lóbulo antenal (Mombaerts et al., 1996; B. A. Johnson & Leon, 2007; Ache & Young, 2005; Eisthen, 2002; Fulton et al., 2024).

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 (Shipley & Ennis, 1996; D. A. Wilson & Barkai, 2017; Neville & Haberly, 2004). 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 (PCx, por sus siglas en inglés) es la principal receptora del 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 espacial (Rennaker et al., 2007; Stettler & Axel, 2009; Courtiol & Wilson, 2017).

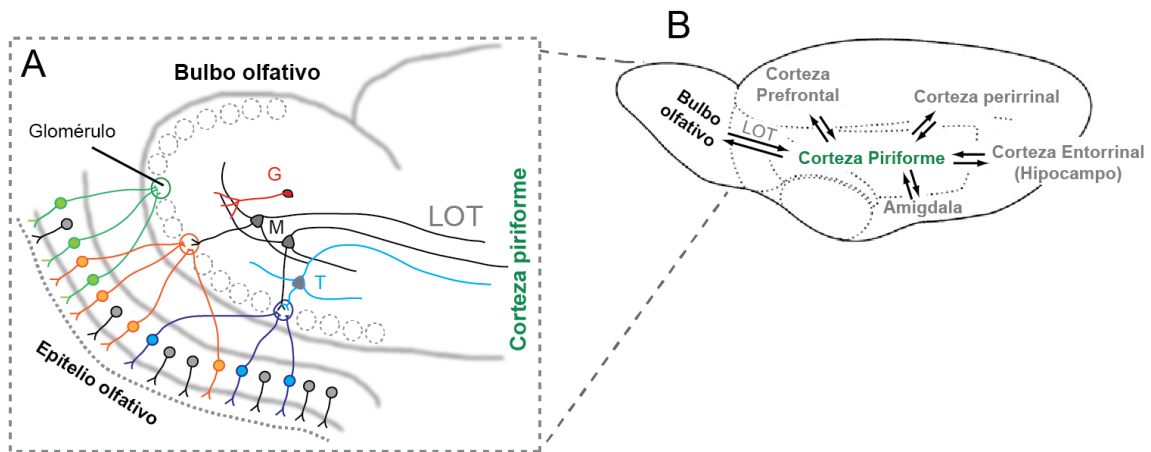


Figura I.1: Sistema olfativo. **A**, procesamiento periférico olfativo. La identidad del receptor expresado en cada neurona del epitelio olfativo se distingue por un color distinto. La eferencia del bulbo olfativo está principalmente compuesta por las células mitrales (M) y *tufted* (T) que viajan a través el tracto olfativo lateral (LOT) hacia la corteza piriforme. **B**, aferencias y eferencias de la corteza piriforme.

La corteza piriforme (PCx)

Anatomía

La corteza piriforme (PCx) es la región más extensa de la corteza olfativa primaria del ratón. Anteroposteriormente, puede dividirse en anterior (aPCx) y posterior (pPCx) (Figura I.2.A). Como puede observarse en el esquema, la aPCx recibe mayor influencia del OB a través del LOT y menor influencia de fibras asociativas (ASSNs), mientras que la pPCx tiene un patrón de conectividad inverso (Hagiwara et al., 2012; Litaudon et al., 2003; Luna & Morozov, 2012; Nagayama et al., 2010; Rennaker et al., 2007). Esta conectividad diferencial hace que se vincule a la aPCx con el mundo exterior (la estructura química del odorante) y a la pPCx con aspectos más introspectivos (Bekkers & Suzuki, 2013).

Estructural y evolutivamente, la PCx es una paleocorteza de tres capas (claras en un corte coronal/transversal del cerebro) compuesta por diversos tipos de neuronas excitatorias e inhibitorias (Figura I.2.B). La capa I es una capa plexiforme superficial que contiene dendritas apicales de neuronas piramidales, fibras o axones de las neuronas de proyección (mitrales y *tufted*) del bulbo olfatorio y muy pocos somas neuronales (principalmente de interneuronas inhibitorias). Está dividida en dos partes: una porción superficial, llamada capa 'Ia', donde se producen sinápsis excitatorias entre las fibras aferentes del bulbo olfatorio a través del LOT y las dendritas apicales de las neuronas piramidales de capas más profundas de la PCx, y una porción más profunda, llamada 'Ib', que recibe fibras de asociación (ASSN) cortico-corticales desde otras porciones de la corteza piriforme y proyecciones desde otras áreas corticales olfativas (Price, 1973). La capa II es compacta y altamente densa en cuerpos celulares. Esta también puede ser subdividida en una parte más superficial, capa 'IIa', donde se encuentran los somas de las neuronas glutamatérgicas semilunares (SL, que únicamente presentan dendritas apicales) y una parte más profunda, capa 'IIb', en la que se encuentran más densamente empaquetados los cuerpos celulares de las neuronas glutamatérgicas piramidales superficiales (SP, por sus siglas en inglés, con dendritas apicales y basales) (Haberly & Price, 1978). También se han encontrado ASSNs en esta capa (Hagiwara et al., 2012). Mientras que las SLs son activadas principalmente por el *input* proveniente del bulbo, la actividad de las SPs es dominada por las ASSNs (Bekkers & Suzuki, 2013). La capa III es

estructurada. En su superficie contiene una densidad moderada de células piramidales profundas (DP, por sus siglas en inglés) y una baja densidad de interneuronas inhibitorias. Como la capa Ib, la capa III tiene una alta densidad de fibras asociativas que hacen sinapsis en las dendritas basales de las células piramidales y otros elementos neuronales (Hagiwara et al., 2012).

Como fue mencionado anteriormente, las neuronas principales de la PCx reciben conexiones excitatorias asociativas intracorticales locales e intercorticales de largo alcance. La vía intracortical está dada por las conexiones sinápticas entre las neuronas glutamatérgicas de la PCx a nivel de las capas Ib, II y III (Barkai & Wilson, 2014; D. M. Johnson et al., 2000; Neville & Haberly, 2004). Estas neuronas principales también difieren en la cantidad de entradas excitatorias sensoriales e intracorticales que reciben, mostrando un gradiente vertical: las células superficiales, como las SL, reciben fuertes conexiones sensoriales desde el LOT y muy débiles desde la vía ASSN; las células más profundas, como las SP y las DP, tienen una aferencia sensorial muy disminuída y, en cambio, conexiones asociativas dominantes. De hecho, se estimó que cada célula piramidal recibe al menos 2000 *inputs* recurrentes de otras células piramidales de la PCx y tan sólo 200 *inputs* aferentes del bulbo, es decir, al menos una relación 10:1 (Davison & Ehlers, 2011). En cuanto a las conexiones eferentes, la PCx se encuentra recíproca y extensamente conectada con el OB y con áreas de más alto orden o jerarquía, asociadas con aprendizaje emocional y procesos mnemónicos, como la corteza orbitofrontal (Illig, 2005), la amígdala (Majak et al., 2004) y las cortezas perirrinal y entorrinal (Haberly & Price, 1978; Kerr et al., 2007) (Figura I.1.B). Todas estas cortezas envían proyecciones excitatorias *feedback* a la PCx, aunque se conoce poco de su función y de cómo es la interacción con las neuronas excitatorias e inhibitorias que forman los microcircuitos en la PCx. Experimentos de nuestro grupo han comenzado a estudiar la influencia de las proyecciones desde la corteza entorrinal lateral (LEC) a la PCx (Pedroncini et al., 2024).

Con respecto a las conexiones inhibitorias, se encontraron distintos tipos de interneuronas gabaérgicas dispersas uniformemente a través de todas las capas de las PCx (Haberly, 1983; Kapur et al., 1997; Suzuki & Bekkers, 2007). A diferencia de otras cortezas sensoriales, en la PCx hay distintos tipos de interneuronas (y con distinta

localización laminar) que forman los circuitos inhibitorios de tipo *feedforward* (FFI) o *feedback* (FBI) sobre las células principales (Bekkers & Suzuki, 2013; Franks et al., 2011; Stokes & Isaacson, 2010), lo cual hace que haya un reclutamiento diferencial por parte de las aferencias sensoriales y las ASSNs (Stokes & Isaacson, 2010)(Figura I.2.B). Las neuronas gabaérgicas *neurogliaform* (NG) y las horizontales (HZ) se localizan en la capa Ia, reciben fuertes entradas excitatorias desde LOT, proyectan densamente sus terminales axónicas en la capa I (donde contactan a las células piramidales de capas II y III) y son las principales responsables de la inhibición *feedforward* (Figura I.2.B, 'FFI'). Las interneuronas (*Somatostatin* positivas y *Parvalbumin* positivas) ubicadas en las capas II y III de la PCx son reclutadas, principalmente, por las neuronas excitatorias SL, actúan sobre los tres tipos de neuronas glutamatérgicas (SL, SP y DP) de esta región y brindan una inhibición global de tipo *feedback* (Figura I.2.B, 'FBI') que resulta considerablemente más fuerte que la provista por los circuitos *feedforward* (Haberly & Price, 1978; Suzuki & Bekkers, 2010, 2012). Estas últimas conexiones divergen (Suzuki & Bekkers, 2012), lo cual implica que una única interneurona es capaz de inhibir muchas neuronas principales. Se reportó que la excitación recurrente sobre las neuronas principales es más débil que sobre las interneuronas de tipo *feedback*, resultando en una dominación de la inhibición perisomática sobre la excitación a nivel local (Franks et al., 2011; Large et al., 2016; Stokes & Isaacson, 2010), lo cual podría explicar la activación neuronal dispersa y de baja correlación durante el procesamiento de olores (Large et al., 2016). Asimismo, resultados recientes del laboratorio muestran que algunas de estas interneuronas reciben fuertes aferencias de regiones de mayor jerarquía de procesamiento como la LEC (Pedroncini et al., 2024).

Por último, la PCx también recibe *inputs* difusos neuromodulatorios de, por ejemplo, acetilcolina y norepinefrina (Hasselmo & Barkai, 1995; D. A. Wilson, 2009) relacionados a la plasticidad en el procesamiento de información olfativa en esta región.

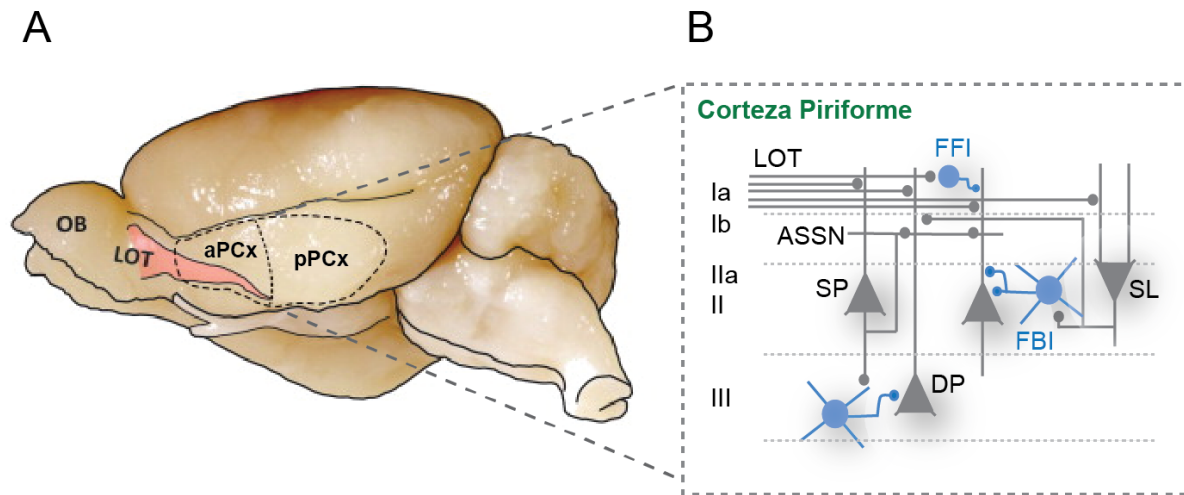


Figura 1.2: Anatomía de la corteza olfativa y sus microcircuitos neuronales. **A.** Cerebro de ratón marcando la región de la PCx anterior (aPCx) y posterior (pPCx). Se puede ver que el tracto olfativo lateral (LOT) lleva la información olfativa hacia la aPCx. **B.** Microcircuitos de la corteza piriforme. En gris se esquematizan neuronas excitatorias: SP, piramidal superficial; DP, piramidal profunda (*Deep piramidal*); SL, semilunar. En azul se esquematizan interneuronas inhibitorias que producen inhibición *feedforward* (FFI) y *feedback* (FBI). Adaptada de Bekkers y Suzuki 2013 y de Wilson and Sullivan 2011 (Bekkers & Suzuki, 2013; D. a. Wilson & Sullivan, 2011).

Función

En la naturaleza, el estímulo olfativo puede variar en función de la humedad ambiente, la dirección del viento, el ángulo con el que ingresa a la nariz, la cercanía a la fuente olfativa, entre otras particularidades. Esto genera que el estímulo se vea corrompido y deba reconstruirse para lograr una percepción estable. Por otro lado, los olores presentes en la naturaleza suelen encontrarse como complejas mezclas de diferentes odorantes monomoleculares (y no como una única estructura química), lo cual necesita de un paso de procesamiento extra para extraer la identidad del olor como un objeto perceptual. En este proceso, la PCx cumple una función fundamental.

Aunque considerada una corteza sensorial primaria, la PCx se diferencia de otras cortezas sensoriales en varios aspectos. La información sensorial no llega a la PCx a través del tálamo, como ocurre en la corteza visual, auditiva, o somatosensorial, sino que la información sobre la identidad molecular/química de los odorantes proviene del OB. Las cortezas sensoriales presentan una organización funcional topográfica, en la que neuronas vecinas tienden a codificar de forma similar las distintas características del estímulo sensorial (por ej., tonotopía en la corteza auditiva primaria, retinotopía en la

corteza visual primaria). En el caso de la olfacción, el OB procesa información olfativa mediante patrones espacio-temporales de actividad glomerular ordenados topográficamente, pero las proyecciones del OB a la PCx no presentan una organización espacial, de forma tal que la representación olfativa de la PCx es dispersa, escasa y no topográfica (Courtiol & Wilson, 2017; Rennaker et al., 2007; Stettler & Axel, 2009).

Mediante la técnica de imaging de calcio in-vivo en ratones anestesiados, se demostró que cada odorante genera un patrón único y distribuido de excitación en las neuronas principales de las PCx, y que una neurona determinada puede responder a múltiples odorantes diferentes, proporcionando pruebas de un campo receptivo discontinuo para los olores (Stettler & Axel, 2009). Experimentos de patch clamp in-vivo reforzaron la idea de que las respuestas de las células principales de las capas II/III de la PCx son dispersas y sin ordenamiento espacial, como resultado del control que ejerce la inhibición intracortical uniforme, global y no selectiva de la PCx sobre los inputs olfativos excitatorios selectivos del OB (Poo & Isaacson, 2009). Dos grupos más informaron descubrimientos similares, ambos utilizando registros de neuronas individuales en roedores despiertos para mostrar una capacidad de respuesta variable y dispersa en las neuronas principales de la PCx (Miura et al., 2012; Zhan & Luo, 2010). Además, utilizando optogenética para excitar conjuntos de neuronas distribuidas espacialmente de forma aleatoria en la PCx de ratones, se mostró que se pueden desencadenar comportamientos apetitivos o aversivos cuando la estimulación se asocia a una recompensa o a un shock eléctrico, respectivamente, lo que provee fuerte evidencia de que la función de la PCx no depende de su topografía espacial (Choi et al., 2011).

De hecho, dada la enorme contribución de las conexiones asociativas recurrentes sobre la actividad de esta región, se definió a la PCx como una corteza 'auto-asociativa' (Haberly, 2001; D. a. Wilson & Sullivan, 2011), de forma similar a la organización recurrente de la subregión CA3 del hipocampo (McNaughton & Morris, 1987; O'Reilly & Rudy, 2001). Resumidamente, este modelo auto-asociativo propone que las combinaciones únicas de características olfativas pueden sintetizarse, almacenarse y evocarse en ensambles distribuidos de células piramidales de la PCx, actuando como un dispositivo de reconocimiento de patrones de actividad para gestionar las complejas y dinámicas respuestas combinatorias provenientes del bulbo olfativo (Bekkers & Suzuki, 2013). En el cerebro, la percepción sensorial depende del reconocimiento de patrones

de actividad en poblaciones neuronales, y dicho proceso se basa en dos motores fundamentales, la separación y el completado de patrones (es decir, “discriminación” y “generalización”). La separación de patrones es el proceso de codificación que permite al sistema de reconocimiento distinguir entre dos estímulos extremadamente parecidos. El completado de patrones es el proceso de recuperación que permite al sistema reconocer un patrón completo a partir de una pista fragmentada o ruidosa. El reconocimiento de patrones exitoso, y en última instancia la percepción, depende de un equilibrio dinámico entre ambos procesos (Rolls & Treves, 1998).

Resulta destacable que la PCx ha sido involucrada tanto en la separación como el completado de patrones, con la aPCx más ligada a la separación y la pPCx al completado. Un estudio electrofisiológico en ratas anestesiadas, en el cual se comparan respuestas de la aPCx a mezclas de olores y a sus componentes odorantes aislados, demostró que la aPCx (y no el OB) distingue entre los componentes monomoleculares y el objeto olfativo ‘mezcla’ luego de un paso previo de aprendizaje (D. A. Wilson, 2003). Un trabajo similar, también realizado en ratas anestesiadas, encontró una decorrelación de las respuestas poblacionales de la aPCx frente a mezclas de olores y sus componentes individuales, mientras que en la pPCx se vieron más altamente correlacionados (Kadohisa & Wilson, 2006). Esto sugiere un procesamiento diferencial de los olores familiares/entrenados en cada subregión de la corteza piriforme en donde la aPCx codifica la identidad del objeto olfativo sintético (separación de patrones) y la pPCx muestra una función más integrativa, codificando la similitud o cualidad del olor dependiente de la experiencia (completado de patrones). Esta marcada diferencia de funcional entre aPCx y pPCx se sustenta en la conectividad descrita previamente, donde la gran parte de las fibras aferentes del bulbo olfativo inervan la aPCx (con información más cercana a los atributos químicos del odorante) y las conexiones asociativas lideran la actividad de la pPCx (lo que permite unificar las representaciones elementales en un todo perceptivo) (Gottfried, 2010). Sin embargo, existen reportes de que la aPCx también puede adquirir funciones de completado de patrones, correlacionando con la capacidad comportamental de discriminación perceptual (Barnes et al., 2008). Se observó, en ratas, que estas tienen dificultades para discriminar entre una mezcla de 10 odorantes y la misma mezcla sin 1 de los 10 componentes, mostrando la tendencia a rellenar la información faltante. Nuevamente trabajando con registros bajo anestesia, se demostró que los ensambles neuronales del OB presentan distinta actividad frente a la mezcla de

10 vs 9 componentes, mientras que la aPCx ignora esa pequeña variación del estímulo (corrompido), mostrando que esta última cumple el rol de completado de patrones y estabilización del percepto. Al seguir quitando componentes de la mezcla, los animales logran discriminar comportamentalmente entre la mezcla original y aquella empobrecida, lo cual se vio reflejado en patrones divergentes en la aPCx, consistente con su conocido rol de separación de patrones.

Más recientemente, se registró (utilizando los mismos arreglos de electrodos que en esta tesis) la actividad extracelular simultánea del OB y la aPCx en ratones despiertos y fijados de la cabeza mientras se los estimulaba con distintas concentraciones de odorantes, mostrando que las neuronas del OB responden de forma diferencial frente a la distintas concentraciones y de forma prolongada en el tiempo, mientras que las de la aPCx tienen una rápida (previa a los 100 ms desde la inhalación del olor) y transiente excitación que es invariante frente a las distintas concentraciones de los odorantes (Bolding & Franks, 2018). Mostraron, también, que la naturaleza concentración-invariante de la aPCx está dada por la inhibición feedback recurrente (Figura I.2.B, 'FBI') y sostenida en el tiempo. Estos experimentos muestran que la aPCx permite categorizar objetos olfativos, manteniendo su coherencia según su relevancia perceptiva y comportamental (Gottfried, 2010).

Finalizando esta sección, como se exployó previamente, gran parte de los trabajos que describieron la anatomía y definieron las funciones de la corteza piriforme fueron hechos *ex-vivo*, en rodajas o en animales anestesiados. Dada la aislada localización de la PCx (en la región más ventral y profunda del cerebro) y la dificultad técnica y tecnológica que implica hacer registros de actividad neuronal en animales despiertos realizando tareas complejas, pocos estudios han estudiado esta región en dichas condiciones (Bolding & Franks, 2017, 2018; Daniel J. Millman & Venkatesh N. Murthy, 2020; Nagappan & Franks, 2021; Poo et al., 2022; Schoonover et al., 2021; Schreck et al., 2022; Zhan & Luo, 2010; Zhang et al., 2019). Los registros a gran escala, por ejemplo usando arreglos de múltiples electrodos, ofrecen la oportunidad de poner a prueba los antiguos marcos teóricos que pensaban la variabilidad de las representaciones neuronales como ruido y que pensaban al cerebro como un sistema jerárquico y centralizado, monitoreando los circuitos neuronales locales en funcionamiento (Buzsáki, 2004).

En esta tesis estudiamos la influencia del contexto y el aprendizaje sobre las representaciones neuronales de la corteza piriforme, utilizando registros electrofisiológicos con arreglos multielectrodo en animales despiertos y realizando una tarea compleja de discriminación olfativa en contextos visuales.

Modulación contextual de las representaciones sensoriales

Históricamente, estudios pioneros en mamíferos, como los de Hubel y Wiesel en la corteza visual, sentaron las bases de gran parte de nuestro conocimiento sobre cómo las neuronas de las cortezas sensoriales primarias responden a distintos estímulos. Estos trabajos permitieron establecer conceptos fundamentales, como el de campo receptivo, según el cual atributos físico-químicos del mundo exterior son representados mediante cambios específicos en la actividad neuronal (Adrian, 1942; Hubel & Wiesel, 1962, 1977; Marshall et al., 1941; Merzenich et al., 1973). Estos trabajos, realizados en animales anestesiados, funcionaron como un punto de partida esencial para la neurociencia sensorial, al caracterizar las propiedades de respuesta relativamente estereotipadas (*hardware*) de estas cortezas.

Hace aproximadamente 20 años, el desarrollo de nuevas tecnologías que permitieron registrar la actividad neuronal en animales despiertos y comportándose, marcó un cambio conceptual significativo. Estos avances revelaron que la actividad en las cortezas sensoriales primarias no depende exclusivamente de las propiedades físicas del estímulo, sino que también está modulada por variables no sensoriales. En particular, estudios en la corteza visual, demostraron que la actividad neuronal en esta región puede ser modulada por el estado atencional, la expectativa, el aprendizaje y los movimientos del animal (Fiser et al., 2016; Fu et al., 2014; Herrero et al., 2008; Lee et al., 2014; Musall et al., 2019; Niell & Stryker, 2010; Poort et al., 2015). De manera similar, en la corteza auditiva se observó que las representaciones de los estímulos son moduladas por señales dopaminérgicas asociadas a recompensa, así como por los movimientos y el estado interno del animal (Bao et al., 2001; Fritz et al., 2003; McGinley et al., 2015; Schneider et al., 2014).

Dentro de los múltiples aspectos que modulan la actividad de las cortezas sensoriales, uno de los estudiados es la influencia del contexto, una palabra ambigua y poco definida en nuestro campo. Por ejemplo, Khan y Hofer (Khan & Hofer, 2018) llaman 'contexto' a diversos aspectos asociados a lo que experimenta el animal al momento de recibir un estímulo visual, como la presencia o ausencia de actividad locomotora, si el estímulo se presenta asociado a una recompensa (y por lo tanto lleva un aprendizaje) o si existe expectativa del mismo (cuán parecido es a lo predicho por su modelo interno), mostrando que los tres aspectos modulan la actividad de la corteza visual de mamíferos.

Por otro lado, se vio que la corteza auditiva es influenciada por el contexto temporal en el que ocurre un tono (vinculado a la expectativa y a la sorpresa) y por el contexto comportamental en el que se encuentra un animal (si el tono es presentado dentro de una tarea o de forma pasiva) (Jaramillo & Zador, 2011; Kuchibhotla et al., 2017; Ulanovsky et al., 2003). Más tangiblemente, se vio que las neuronas de la corteza visual son influenciadas por señales de navegación, es decir, por el contexto espacial (Saleem et al., 2018).

En la corteza olfativa, se encontró que la actividad neuronal frente a olores es modulada por diversos aspectos, como el ciclo respiratorio, el contexto predictivo (la expectativa que tiene el animal sobre el odorante), el estado interno del animal (si está hambreado o no, por ejemplo) y la asociación del estímulo olfativo con una recompensa (Roesch et al., 2007; Shusterman et al., 2011; Soria-Gómez et al., 2014; Zelano et al., 2011). Más recientemente, luego de comenzar esta tesis doctoral, un trabajo publicado por Poo y colaboradores mostró que animales entrenados en una tarea olfativa-espacial exhiben, en la corteza piriforme, respuestas neuronales asociadas a la posición del animal, especialmente alrededor de ubicaciones relevantes para la tarea (Poo et al., 2022).

En este marco teórico, la hipótesis subyacente del presente trabajo es que las representaciones sensoriales en la PCx no constituyen codificaciones estáticas de las propiedades físico-químicas de los odorantes, sino representaciones dinámicas que se reconfiguran en función del contexto y de la experiencia previa del animal. En particular, proponemos que un mismo olor puede evocar patrones de actividad neuronal cualitativamente diferentes según el contexto en el que se presente y según su historia de asociación con consecuencias relevantes, reflejando así una integración flexible entre información sensorial y variables internas y contextuales. Para esta tesis, cada vez que se hable de ‘contexto’ nos referiremos al contexto visual espacial, salvo que se aclare lo contrario.

Aprendizaje y procesamiento sensorial cortical

Durante mucho tiempo se pensó que los cambios plásticos en el cerebro ocurrían en ventanas temporales discretas, concentradas en etapas tempranas del desarrollo. Hoy sabemos que el aprendizaje es otra de las variables que modula el procesamiento sensorial (y tantas otras codificaciones del cerebro) en la vida adulta de los individuos, lo que obliga a concebir las representaciones neuronales como entidades dinámicas, flexibles y dependientes de la experiencia. Existen distintas clasificaciones del aprendizaje, por lo que, a continuación, se introducen tres de las más estudiadas: aprendizaje no-asociativo, aprendizaje perceptual y aprendizaje asociativo.

Los trabajos pioneros en *Aplysia* desarrollados en detalle por Kandel sentaron las bases para estudiar los mecanismos sinápticos, celulares y moleculares del *aprendizaje no-asociativo*, como la habituación y la sensibilización. Ambos procesos, aunque de signo opuesto, involucran la modulación de la presinapsis al nivel de la liberación de vesículas: la estimulación repetida de un mismo estímulo conduce a la habituación (estímulo específica), mientras que la activación intensa de una vía sensibilizante alternativa produce sensibilización, generalizable a otros estímulos (Kandel et al., 2021). En mamíferos, numerosos trabajos demostraron fenómenos análogos en corteza visual (Chanauria et al., 2016; Cooke et al., 2015; Dragoi et al., 2000; Kohn, 2007) y auditiva (Briley & Krumbholz, 2013; Gourévitch & Eggermont, 2008; Kato et al., 2015; Lanting et al., 2013). En la corteza olfativa también se observaron efectos sensibilizantes y de habituación (Schiltz et al., 2025; Vanderwolf & Zibrowski, 2001; D. A. Wilson, 1998, 2000b), en escalas de tiempo cortas y medias. En escalas más prolongadas, se describió una “deriva representacional” en la aPCx, es decir, cambios progresivos en la identidad de las neuronas que responden a un mismo olor a lo largo del tiempo, a menos que la exposición frecuente estabilice dichas respuestas (Schoonover et al., 2021).

Aunque muy vinculado con el aprendizaje no-asociativo y asociativo (McGann, 2015), el *aprendizaje perceptual* suele clasificarse por fuera de esta categoría y consiste, muy resumidamente, en mejorar la discriminación/detección sensorial a través de la experiencia o estimulación repetida. Clásicos ejemplos de este tipo de aprendizaje son la ampliación de los mapas sensoriales internos en la corteza somatosensorial y auditiva

de monos (Recanzone et al., 1993; Recanzone, Merzenich, & Jenkins, 1992; Recanzone, Merzenich, & Schreiner, 1992), el afinado de las curvas de sintonización (*tuning curves*) que reduce la superposición de respuestas neuronales (Recanzone et al., 1993; Schoups et al., 2001; Zohary et al., 1994) y cambios en las características temporales de las respuestas neuronales (Gilbert et al., 2001). La participación de influencias *top-down* en estos procesos sugiere que la mejora perceptual resulta de la interacción entre mecanismos locales y señales de retroalimentación provenientes de áreas de mayor jerarquía (Gilbert et al., 2001). En el sistema olfativo, se ha propuesto que la PCx actúa como un centro de aprendizaje perceptual (D. A. Wilson & Stevenson, 2003b), en cambios persistentes por la experiencia en sus campos receptivos, en los *inputs* provenientes de las células mitrales y en las fibras de asociación intracorticales (D. A. Wilson, 2000a; D. A. Wilson & Stevenson, 2003a), todos vinculados a una mejora en la discriminación de objetos olfativos.

Por último, el *aprendizaje asociativo* implica el establecimiento de contingencias entre estímulos cercanos en el tiempo y espacio, o entre acciones y consecuencias. Uno de los primeros autores en estudiarlo comportamentalmente fue Pavlov, quien, trabajando en condicionamiento clásico en perros, logró demostrar que es posible asociar un sonido (estímulo condicionado, CS, por sus siglas en inglés) a una recompensa (estímulo incondicionado, US, por sus siglas en inglés) que genera una respuesta de salivación innata, de forma tal que, luego de varias sesiones de entrenamiento, el animal produzca esa misma respuesta frente al CS en ausencia del US (Pavlov (1927), 2010). Skinner, por otro lado, estudió el condicionamiento operante en ratas y demostró que los animales pueden aprender a bajar una palanca para recibir una recompensa, asociando una acción a una consecuencia (Skinner, 2019). A nivel neuronal, el aprendizaje asociativo se sustenta en un proceso *hebbiano* en el que se propone que “las neuronas que disparan juntas fortalecen las conexiones entre sí” (D.o Hebb, 1949). Más adelante, se demostraron cambios a nivel sináptico dados por el aprendizaje asociativo en *Aplysia* (Hawkins et al., 1983), que pueden involucrar fenómenos de potenciación y depresión sináptica a largo plazo (LTP y LTD, por sus siglas en inglés). Con el pasar del tiempo se mostró que, en mamíferos, el aprendizaje asociativo induce cambios específicos para cada estímulo en cortezas sensoriales primarias (Gdalyahu et al., 2012; Morris et al., 1998; Ohl & Scheich, 2005; Polley et al., 2007; Poort et al., 2015).

La PCx posee varios elementos que la hacen extremadamente interesante para estudiar la modulación de la representación sensorial por el aprendizaje. Posee conexiones recíprocas con la mayoría de las áreas que están involucradas en funciones como la memoria y la emoción (Gottfried, 2010; Haberly, 2001; Illig, 2005). En humanos, el condicionamiento aversivo con olores produce una mejora en la discriminación perceptual entre enantiómeros casi idénticos, acompañada de una divergencia en los patrones de actividad de la PCx (Li et al., 2008). Por otro lado, como ya mencionamos en secciones anteriores, la PCx carece de una organización topográfica rígida, lo que sugiere una arquitectura altamente distribuida y modificable por la experiencia. Como se mencionó previamente, esta red olfativa extendida y altamente distribuida, 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 olfativos” (D. a. Wilson & Sullivan, 2011): la percepción no está dictada únicamente por la estructura química del odorante, sino por un ensamblaje de múltiples componentes de la experiencia sensorial, convirtiendo atributos químicos en percepciones matizadas por la experiencia. De hecho, estudios en tareas de discriminación olfativa GO/NOGO mostraron modificaciones en las respuestas neuronales tras el aprendizaje (Roesch et al., 2007), y trabajos longitudinales evidenciaron que estas representaciones continúan reorganizándose a lo largo de los días (Schoonover et al., 2021), consolidándola como un sistema de aprendizaje rápido y continuo.

En esta tesis se utilizó un paradigma de entrenamiento que combina un condicionamiento operante (la asociación entre la respuesta de lamido en una localización específica de un corredor virtual y la obtención de una recompensa) y un condicionamiento clásico (asociación entre estímulos olfativos y contextos visuales), con el objetivo de investigar cómo el aprendizaje reconfigura las representaciones neuronales en la corteza piriforme.

Hipótesis y Objetivos

Hipótesis

La hipótesis de trabajo es que las representaciones neuronales en la corteza piriforme no son estáticas ni dependen exclusivamente de las propiedades físico-químicas de los odorantes, sino que se modulan dinámicamente por otras variables relacionadas al contexto en el que el olor se presenta y por el aprendizaje. En particular, se propone que el aprendizaje de asociaciones entre olores, contextos visuales y recompensa induce una reorganización de los patrones poblacionales de actividad en esta corteza, generando una codificación en la que la identidad del olor y su significado contextual quedan integrados en la representación neuronal.

Objetivos

1. Estudiar cómo el aprendizaje de una asociación entre olores, contextos visuales y recompensas modifica el comportamiento y las respuestas de los circuitos corticales olfativos.
2. Evaluar los mecanismos asociativos responsables de la adquisición de la codificación mixta en la corteza piriforme.

Materiales y Métodos

Animales

Los experimentos de este trabajo se realizaron con ratones *wild-type* de fondo genético C57BL/6J, los cuales se alojaron en el bioterio del IBioBA a temperatura (22 ± 1 °C) y humedad (55 ± 5 %) controlada, con comida y agua *ad libitum*, y se mantuvieron en ciclo de luz-oscuridad de 12/12 hs. Fueron criados en grupos de hasta seis individuos por jaula hasta el momento de la cirugía.

Para los experimentos, se utilizaron animales, machos y hembras. Los experimentos fueron siempre realizados durante la fase de oscuridad.

Cirugías

Localización estereotáxica y colocado de barra metálica

A los animales se les inyectó por vía intraperitoneal ketamina (100 mg/kg de peso corporal) y xilazina (10 mg/kg de peso corporal). Desde el establecimiento de la anestesia total, controlada mediante la pérdida de los reflejos corporales, la operación duró un máximo de 80 minutos. Se realizó sobre una almohadilla térmica para preservar el calor corporal del animal. Se protegieron los ojos contra la sequedad aplicando geles oftálmicos como Vidisic (ingrediente activo: ácido poliacrílico). Todo el procedimiento se realizó en condiciones asépticas. Una vez anestesiados, los animales se colocaron en un estereotáxico. Se inyectó una dosis de bupivacaína al 0,5 % (50 µl) bajo la piel como anestésico local y se esperó 5 minutos antes de continuar. Se realizó una incisión en la piel para exponer el cráneo, desinfectando la zona con pervinox mediante hisopos estériles. Se preparó al animal para colocar una barra metálica que nos permitiera fijar su cabeza al dispositivo experimental y mantenerla inmovilizada y, por otro lado, marcar el cráneo en la posición donde se insertaría posteriormente el electrodo de registro. Se cortó el cuero cabelludo, exponiendo el cráneo y la región a perforar. Se limpió y secó el cráneo con hisopos estériles para una mejor adhesión del pegamento. Se colocó la barra de aluminio de 2,5 cm × 0,5 cm y 350 mg de peso directamente sobre el pegamento húmedo y, a continuación, se añadió acrílico dental para cubrir el pegamento y cementar la barra en la posición deseada. La barra metálica quedó, entonces, rígidamente

adherida al cráneo, sin atravesarlo. La barra se fijó al aparato durante el comportamiento. Con la ayuda de un atlas del cerebro de ratón, se alcanzó la posición deseada en relación con el bregma en el hemisferio izquierdo (para la corteza piriforme AP 0,1 mm; ML [3,0-3,3]mm; según AP, son coordenadas de aPCx, aunque en el límite de desaparición del LOT) utilizando un estereotáxico y se marcó un punto. También implantamos los electrodos (alambre de plata 925 de 1 mm diámetro) de tierra y de referencia en el cerebelo y en una posición contralateral al sitio de registro (aproximadamente AP 0,1 mm y ML -3,3 mm), respectivamente. Después de la operación, los animales se recuperaron en la almohadilla térmica hasta que despertaron de la anestesia. Nos aseguramos de que, en las dos horas posteriores a la operación, los ratones se despierten, caminen, beban, coman y no muestren un comportamiento indicativo de sensación de dolor. Sin embargo, como medida preventiva, administramos el analgésico tramadol en dosis subcutánea (5 mg/kg del peso corporal) y en el agua de bebida. Además, se administró el antiinflamatorio ketoprofeno mediante inyección subcutánea (5 mg/kg del peso corporal) en una dosis, durante 2 días. Se dejó que los animales se recuperaran de la cirugía durante 3 días.

Craneotomía

El día anterior a cada sesión de registro neuronal, se realizó una craneotomía en el sitio marcado durante la primer cirugía, ubicación donde se insertaría el electrodo de registro al día siguiente. Para ello, se anestesió a los animales con isoflurano (2 % de inducción, 0,5-1,5 % de mantenimiento) y se utilizó un taladro para limar suavemente el hueso en la zona marcada. A continuación, con la ayuda de una aguja, se levantó una pequeña “tapa”, dejando al descubierto una pequeña zona del cerebro que se mantuvo húmeda cuidadosamente con hisopos humedecidos con solución salina, evitando tocar el cerebro. Por último, la parte expuesta se cubrió con una fina capa de pegamento cianoacrílico (WPI). Al final, se administró 100 µl del antiinflamatorio ketoprofeno mediante inyección subcutánea (5 mg/kg de peso corporal) y se dejó que los animales se despertaran y recuperaran.

Tarea comportamental

Se utilizó un dispositivo experimental, previamente desarrollado en el laboratorio, con el cual se entrenó 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 (*NOGO*) dependiendo de los estímulos presentados. En este caso, la acción a realizar consiste 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 la combinación de un olor particular en un contexto visuo-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 (*closed loop*). 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”. Se utilizaron dos contextos espaciales distintos (por sus colores y formas): uno verde y el otro gris. Una vez que el animal “entra” a alguno de estos contextos, uno de dos posibles olores, Olor A (O_A , etil butirato) u Olor B (O_B , isoamil acetato), es liberado durante 1 segundo. Al salir del contexto, el animal debe dar su respuesta *GO* o *NOGO* en lo que se llamó la “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 8 μ l y 18 μ l 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 general, a lo largo de esta tesis se va a poner el foco en si los estímulos están o no asociados a la recompensa (y no tanto a la identidad del estímulo). La nomenclatura es: O_R para el olor recompensado, O_N para el olor no recompensado, C_R para el contexto recompensado y C_N para el contexto no recompensado. Notar que se habla de estímulo

(olor o contexto) recompensado, pero, para que el ensayo sea realmente recompensado, el animal debe haber recibido la asociación de estímulos $O_R C_R$ y haber lamido en la zona de recompensa. Los ensayos serán correctos si el animal lame en la zona de recompensa al recibir $O_R C_R$ o si no lame habiendo recibido alguna de las otras tres combinaciones de estímulos ($O_R C_N$, $O_N C_R$, $O_N C_N$).

La tarea comportamental descrita hasta acá fue utilizada para la primera parte de esta tesis. Para la segunda parte de la tesis, se utilizó el mismo protocolo de entrenamiento, pero desvinculando la asociación específica entre la información olfativa y contextual: los animales recibieron los mismos dos olores en los mismos dos contextos visuales, pero sólo la identidad del contexto predijo la recompensa. La experiencia sensorial fue la misma que la de la primera parte, pero cambiaron los tipos de ensayo recompensados: dos fueron recompensados (cualquiera de los dos olores en el contexto recompensado, $O_A C_R$ y $O_B C_R$) y los otros dos no lo fueron (cualquiera de los dos olores en el contexto no recompensado, $O_A C_N$ y $O_B C_N$). Al final de esta segunda parte, se entrenó un subgrupo de animales en esta misma tarea sin asociación olor-contexto y, cuando llegaron al nivel de *expertise* deseado, se registró su actividad neuronal mientras estaban inmersos en la realidad virtual (durante aproximadamente 1 hora) e, inmediatamente después, se apagó la realidad virtual y se estimuló a los animales de forma pasiva con los mismos dos olores. Durante la estimulación pasiva, la pantalla permaneció oscura, los animales pudieron caminar libremente sobre el rodillo (aún en condición *head-fixed*), sin flujo óptico y los estímulos olfativos fueron presentados (en pulsos de 1s y un intervalo entre pulsos de 15s) de forma pseudoaleatoria.

Protocolo de entrenamiento

Después de la cirugía del colocado de la barra metálica, 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.

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, USA.

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 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.

Habituación

Una vez finalizada la etapa de *handling*, se dio lugar a la habituación 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 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*.

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). Para el protocolo de la segunda parte, los animales aprendieron la tarea en aproximadamente 4 días.

En un ensayo el animal debe recorrer la totalidad de un corredor virtual y, al llegar al final, es 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% $O_R C_R$, 15% $O_R C_N$, 15% $O_N C_R$, 15% $O_N C_N$) 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% $O_R C_R$, 25% $O_R C_N$, 25% $O_N C_R$, 25% $O_N C_N$). Para los animales de la segunda parte de esta tesis, todos los ensayos fueron equiprobables desde la primera sesión, dando 50% de chance de que sea recompensado.

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.

Estímulos olfativos

Delivery 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 utilizó, 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 mantuvo constante y se reguló mediante un conjunto de flujómetros (Coleparmer, modelos # 03216-06 y # 03216-16).

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.

Odorantes

En todos los animales entrenados, se empleó etil butirato (Sigma-Aldrich) como olor A, e isoamil acetato (Sigma-Aldrich) como olor B. Los odorantes fueron seleccionados asegurándonos de que no existiera una respuesta innata en los ratones frente a los mismos.

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 desembocaba 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. Para hacer la estimulación olfativa lo más discreta posible, se utilizó un extractor para eliminar los residuos volátiles dentro del dispositivo experimental ensayo a ensayo.

Registros de actividad neuronal

El día del registro neuronal, colocamos al animal despierto en el dispositivo experimental, pintamos la sonda de registro (un arreglo de microelectrodos llamado *silicon probes*, Neuronexus) con un colorante fluorescente (DiI D3911, ThermoFisher), retiramos con unas pinzas el pegamento/gel que cubría la craneotomía e insertamos la sonda en el cerebro. Con la ayuda del micromanipulador, llegamos a la corteza piriforme, descendiendo lentamente (1 micrón/segundo) hasta la zona objetivo (DV 3,8-5,2 mm, dependiendo del animal). Una vez allí, esperamos 15 minutos para estabilizar la posición de registro. Todos los registros se realizaron utilizando *silicon probes* A1x32-Poly3-5 mm-25 s-177 (área de superficie de 177 μm^2 , geometría de panel de 3 columnas con un espaciado lateral de 18 μm y vertical de 25 μm , 36 μm de distancia horizontal entre centros, 275 μm de distancia vertical entre centros, 114 μm de ancho máximo del vástago cerca de los sitios y 15 μm de grosor del vástago) con un conector H32 (NeuroNexus Technologies). El animal realizó la tarea comportamental mientras se registraba su actividad neuronal. Una vez finalizada la sesión de registro, se colocó al animal en su jaula con agua *ad libitum* y se lo dejó allí por 2 días, hasta volverse a hidratar. Luego de este período, se perfundió al animal y se diseccionó el cerebro. El cerebro del animal se utilizó para verificar la ubicación de la sonda de registro. Para ello, el cerebro se cortó en secciones de 50 micrones en el criostato, las secciones se tiñeron con preparaciones de DAPI para visualizar los núcleos celulares bajo un microscopio de fluorescencia Axio Observer (Zeiss), y la ubicación de la punta de la sonda se reveló mediante la fluorescencia del colorante *DiI*. Las imágenes se analizaron con Zen Zeiss pro 2011 (Zeiss).

Adquisición de datos

Las señales electrofisiológicas se adquirieron con una sonda aguda con 32 electrodos de registro (A1 × 32-Poly3-5mm-25s-177, Neuronexus, MI) conectada a un cabezal *Acute Smartlink32* (Neuronexus, MI). Las señales sin filtrar se digitalizaron a 30 kHz en el amplificador y se registraron mediante un sistema de adquisición de datos multicanal *Smartbox* (Neuronexus, MI). Los eventos experimentales y las señales respiratorias se adquirieron a 30 kHz mediante entradas analógicas y digitales del sistema *Smartbox* utilizando el software *AllegoSmartbox* versión 0.7.3.0-20180628 (Neuronexus, MI). La respiración se monitorizó con un sensor de flujo de aire masivo de micropuente (*Honeywell* AWM3100V, NJ) colocado directamente frente a la nariz del animal. El flujo de aire negativo corresponde a la inhalación y a los cambios negativos en el voltaje de la salida del sensor.

El comportamiento se supervisó automáticamente mediante un sistema de medición del comportamiento *Bpod SanWorks Console* v1.77 (Sanworks, Nueva York), que se programó para controlar el flujo de tareas según el protocolo y envió marcas de tiempo del comportamiento mediante señales BNC al sistema *Smartbox* para su sincronización con las señales neuronales.

El desplazamiento del animal en la rueda de correr se midió con un codificador rotatorio óptico (H5-360-IE-S, US Digital, WA) acoplado al eje de la rueda. Cuando el animal se movía, el codificador enviaba pulsos TTL a la *Smartbox* (para la sincronización posterior con las señales neuronales) y a un microcontrolador (MEGA 2560, Arduino, NY) programado para calcular la posición del animal. El microcontrolador transmitía la información posicional al motor *VirtualRealityMATLAB* (ViRMEn). También enviaba pulsos TTL a la *Bpod* para señalar la entrada en la zona de contexto (para activar la estimulación olfativa) y la salida (para señalar la entrada en la zona de recompensa).

Análisis estadístico

Todos los análisis de datos y pruebas estadísticas se realizaron con *software* personalizado utilizando MATLAB (Mathworks). La significancia estadística se evaluó con la prueba de Kruskal-Wallis (no paramétrica) en la primera parte de la tesis y con la prueba de suma de rangos de Wilcoxon en la segunda parte. En caso de encontrar efectos significativos para comparaciones de 3 o más grupos, se realizaron comparaciones múltiples de Tukey-Kramer *post hoc*.

Análisis del desempeño comportamental

El desempeño comportamental de los animales en las distintas tareas se cuantificó utilizando métricas de la teoría de detección de señales (SDT). Sintéticamente, mediante el análisis de la tasa de aciertos (*HIT rate*) y la tasa de falsas alarmas (*FA rate*) de un sujeto que realiza una tarea de discriminación, la SDT permite desambiguar las contribuciones de la fuerza perceptiva del estímulo y el sesgo del sujeto para responder. El parámetro denominado d' (también *d-prime* o sensibilidad) mide la fuerza perceptiva del estímulo objetivo, es decir, la capacidad de discriminación entre las representaciones perceptivas del sujeto asociadas a la presencia o ausencia del estímulo objetivo:

$$d' = Z(\text{HIT rate}) - Z(\text{FA rate}) \quad (1)$$

donde Z es la función de distribución acumulativa inversa normal. En nuestra tarea, los estímulos objetivo son los ensayos $O_R C_R$. Un valor $d' = 0$ equivale a un desempeño aleatorio, mientras que valores mayores indican una mejora en el desempeño. Por ejemplo, para $\text{HIT rate} = 0,95$ y $\text{FA rate} = 0,05$ se obtiene un valor $d' = 3,29$.

El parámetro denominado *criterion* (también c) está relacionado con la respuesta sesgada del sujeto:

$$\text{criterion} = -0.5 \times [Z(\text{Hit rate}) + Z(\text{FA rate})] \quad (2)$$

Según la SDT, el sujeto decide responder o no en un ensayo determinado imponiendo un umbral: si la representación perceptiva en el ensayo es mayor que el criterio del umbral,

entonces el sujeto responde con un *GO*. Los valores negativos del *criterion* indican un sesgo hacia las respuestas *GO*, los valores positivos indican un sesgo hacia las respuestas *NOGO*, y el *criterion* = 0 indica que no hay sesgo (respuesta neutra). En nuestra tarea, las sesiones iniciales de entrenamiento de los animales tenían un *criterion* negativo y valores *d'* bajos, lo que indicaba un rendimiento casi aleatorio y un sesgo hacia el lamido en todos los ensayos (ya que los animales tenían sed y no había castigo por las falsas alarmas). A medida que avanzaba el entrenamiento, los animales aumentaban constantemente el *d'* (aumentando su desempeño comportamental) y llevaban el *criterion* hacia una respuesta neutral e imparcial (*criterion* $\rightarrow$ 0).

Spike sorting

Las trazas de voltaje extracelular se preprocesaron con referencia mediana común (sustracción de la mediana en todos los canales y en cada muestra de tiempo para eliminar artefactos), se clasificaron los potenciales de acción utilizando *Kilosort* (<https://github.com/cortex-lab/Kilosort>) y el resultado obtenido se curó manualmente con la interfaz gráfica de usuario *phy* (<https://github.com/kwikteam/phy>). Durante el curado manual, todos los grupos de eventos de potenciales de acción putativos detectados por cada plantilla se inspeccionaron y evaluaron de acuerdo con una serie de criterios. En primer lugar, descartamos los grupos que se consideraban ruido si sus eventos tenían una amplitud cercana a cero o si las formas de onda de los eventos no eran fisiológicas y/o se extendían por todos los canales de registro. También se descartaron los grupos que contenían formas de onda inconsistentes o un gran número de violaciones del período refractario (<2 ms) en el autocorrelograma. En un paso final, fusionamos pares de grupos que tenían formas de onda similares, mostraban sincronización cruzada del período refractario o correlogramas cruzados coordinados temporalmente que indicaban una neurona en ráfaga. Las unidades que superaron estos criterios se etiquetaron como neuronas únicas y se tuvieron en cuenta en esta tesis.

Respuestas neuronales individuales

Para visualizar y analizar las respuestas neuronales, utilizamos histogramas peri-estímulo (PSTH, por sus siglas en inglés) que se suavizaron temporalmente con un filtro gaussiano (desviación estándar, 30 ms). Estos “PSTH de eventos” describían la evolución temporal de la tasa de disparo neuronal en torno al momento de aparición de los estímulos sensoriales, los eventos de la tarea o los eventos conductuales (ejemplos en las Figuras 1.8 y 2.10). Para describir las respuestas medias a lo largo de un ensayo completo, construimos PSTH que se obtuvieron uniendo los “PSTH de eventos” correspondientes a la siguiente secuencia de eventos del ensayo: entrada en el contexto visual, primera inhalación del olor, respuesta del animal y resultado del ensayo (etiquetados como “C”, “O”, “L” y “R” en las Figuras 1.6, 2.4 y 2.9.B). “respuesta del animal” refiere al momento en que este lame por primera vez después de la liberación del olor (en los ensayos *GO*) o al momento en que el animal abandona el contexto visual (en los ensayos *NOGO*). “resultado del ensayo” refiere al momento en que se entrega la recompensa (en los ensayos *HIT*) o al momento que correspondió a un intervalo mediano adicional entre lamidas después del evento de “respuesta del animal” (en los ensayos *MISS*, *FA* y *CR*; la razón de esto es que las recompensas se entregaban en el segundo lamido realizado en la zona de recompensa). Cada uno de estos cuatro “PSTH de eventos” (C, O, L y R) se alineó con el tiempo medio de cada evento en todos los ensayos, en relación con la primera inhalación de olor (para los datos de la primera sesión y sesión intermedia, C, O, L y R se alinearon con -0,46, 0, 2,45 y 2,99 s, respectivamente; para los datos de la sesión de expertos, C, O, L y R se alinearon a -0,43, 0, 1,38 y 1,96 s, respectivamente). El PSTH final que describe la actividad media de una neurona a lo largo de un ensayo completo se obtuvo uniendo esta secuencia de “PSTH de eventos” alineados en el tiempo, promediando los períodos en los que había solapamiento temporal entre ellos. Confirmamos que este procedimiento de unión no distorsiona la forma de los “PSTH de eventos” individuales y describe con precisión la secuencia de variaciones de la tasa de disparo a lo largo del ensayo. Todos los PSTH unidos se muestran en las Figuras 1.6, 2.4 y 2.9.B (donde se restó la tasa de disparo media de cada neurona para mostrar las variaciones en la tasa de disparo alrededor de la media).

Modelo lineal generalizado (GLM) para análisis de codificación y decodificación neuronal

Para este análisis, las series temporales de actividad de potenciales de acción se discretizaron en intervalos de 10 ms. El análisis se realizó adaptando la implementación en MATLAB de la regresión GLM de Poisson para datos de potenciales de acción basados en ensayos de Park et al. (<https://github.com/pillowlab/neuroGLM>) (Park et al., 2014a). Este marco plantea un modelo de codificación $p(\mathbf{r} | \mathbf{x})$ de la relación probabilística entre una respuesta neuronal $\mathbf{r}$ y un conjunto de variables de tarea $\mathbf{x}$ en un ensayo determinado. La probabilidad de respuesta está relacionada con una tasa de potenciales de acción subyacente que varía en el tiempo λ_t , que viene dada por:

$$\lambda_t = \exp(\sum_i (k_i \otimes x_i)_t) \quad (3)$$

donde x_i es la evolución temporal de la variable i -ésima en el modelo, k_i es el *kernel* de la neurona (es decir, el filtro lineal) asociado a esa variable, y $\otimes$ indica una convolución lineal. El *kernel* captura la relación entre esta variable y la probabilidad de disparo de la neurona. A su vez, en un ensayo único determinado, la probabilidad de que la neurona dispare está dada por una distribución de Poisson (es decir, se asume una estadística de disparo Poisson):

$$p(\mathbf{r} | \mathbf{x}, \{k_i\}) = \prod_{t=0}^T p(r_t | \mathbf{x}, \{k_i\}) = \frac{1}{r_t!} \prod_{t=0}^T (\Delta \lambda_t)^{r_t} e^{-\Delta \lambda_t} \quad (4)$$

donde Δ es el tamaño del intervalo temporal (10 ms), T corresponde al total de intervalos temporales en un ensayo, y r_t es la cuenta de disparos en un intervalo temporal $(t, t + \Delta)$.

Parametrización de variables y filtros lineales

En las Figuras M.1 y 1.10.A se muestra una representación esquemática de la parametrización. La elección de las variables de regresión se basó en las modulaciones de la respuesta neuronal observadas en los PSTH y en la dinámica poblacional. En nuestro modelo había dos tipos de *kernels*: *kernels* “basados en eventos” (es decir, *kernels* que reflejan la influencia cambiante en el tiempo de una variable de la tarea sobre la tasa de disparo cambiante en el tiempo) y *kernels* “basados en sintonización”

(es decir, *kernels* que describen la dependencia de la activación neuronal sobre el valor de una variable de la tarea). Los *kernels* se parametrizaron mediante un conjunto de funciones base. Para cualquier *kernel* parametrizado por n bases, el modelo infiere un conjunto de n coeficientes que corresponden a la combinación lineal ponderada de las n funciones base. Para elegir el número de bases n utilizado para parametrizar cada *kernel*, realizamos una serie de pruebas preliminares en un conjunto de neuronas y evaluamos el rendimiento de la parametrización mediante validación cruzada.

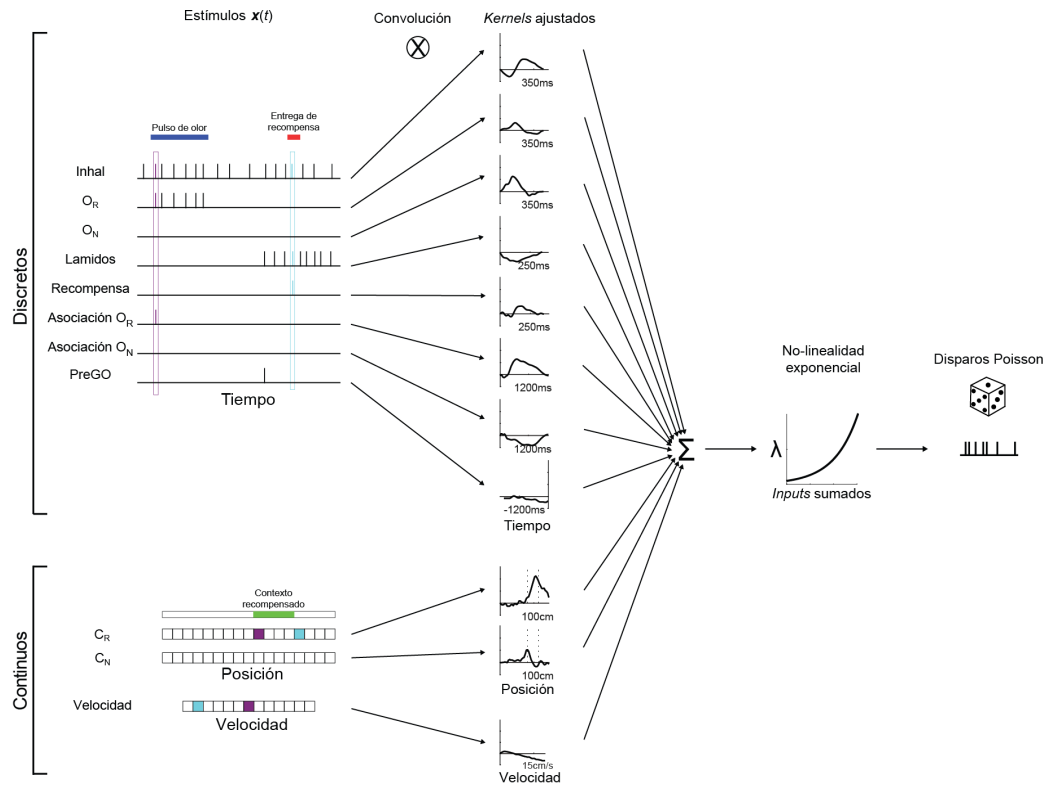


Figura M.1: esquema de la parametrización de las variables de la tarea. **Discretos**, evolución temporal de las variables parametrizadas para la convolución con *kernels* basados en eventos. **Continuos**, variables de estado del animal parametrizadas para la convolución con *kernels* basados en sintonización. Los valores instantáneos de las variables en dos intervalos de tiempo individuales de 10 ms están etiquetados en morado y cian.

Discretos:

Cada evento asociado con la variable se representó como una función delta a lo largo del tiempo y se convolucionó con el *kernel* correspondiente (Figuras M.1, 'Discretos' y 1.10.A). Para parametrizar los *kernels* asociados a eventos, utilizamos funciones base definidas por una serie de disparos elevados de coseno, centrados en diferentes

momentos que abarcaban el intervalo de tiempo cubierto por el *kernel* (Figuras M.1 y 1.10.A):

- Inicio de la inhalación: 10 bases que cubren una ventana de 460 ms después del inicio de cada inhalación. Etiquetado como “Inhalación”.
- Inhalaciones de olores recompensados y no recompensados: 10 bases que cubren una ventana de 460 ms después del inicio de cada inhalación de olor durante la estimulación olfativa. Un *kernel* para cada olor, etiquetado como “O_R” y “O_N”.
- Lamido: 15 bases que cubren una ventana de 360 ms tras el inicio de cada lamido. Etiquetado como “Lamido”.
- Consumo de recompensa: 15 bases que cubren una ventana de 360 ms tras el inicio de cada lamido. Etiquetado como “Recompensa”.
- Anticipación a la respuesta *GO*: 22 bases que cubren 2000 ms antes del primer lamido que sigue a la estimulación olfativa. Etiquetado como “PreGO”.
- Modulación de las respuestas olfativas por la presencia de un contexto recompensado: 20 bases que cubren 1500 ms después de la primera inhalación del olor. Etiquetado como “Asociación”. Este *kernel* tiene como objetivo describir la interacción entre los olores y los contextos.

Continuos:

Cada variable se discretizó, se representó como un vector de estado del animal para la variable en un instante dado de tiempo y se convolucionó con el *kernel* correspondiente (Figuras M.1, ‘Continuos’, y 1.10.A). Cada vector de estado del animal denota un valor variable, cuyos elementos se establecen en 0, excepto un elemento, que se establece en 1, correspondiente al grupo que ocupa el estado del animal actual. Para parametrizar estos *kernels* de sintonización, utilizamos funciones base definidas por una serie de potenciales de acción elevados de coseno, centrados en diferentes valores variables a lo largo del rango abarcado por el vector de estado del animal (Figuras M.1 y 1.10.A):

- Posición del animal a lo largo de contextos visuales recompensados y no recompensados: 42 bases que cubren toda la longitud del pasillo virtual discretizado en una secuencia de intervalos de 4 cm. Un *kernel* para cada contexto, etiquetado como “C_R” y “C_N”.

- Velocidad de locomoción: una secuencia de intervalos de 1 cm/s hasta la velocidad máxima de carrera del animal (el número total de bases variaba entre los animales en función de su velocidad máxima, normalmente se utilizaban ~35 bases). Etiquetado como «Velocidad».

Ajuste y medición de *performance* del modelo

Para ajustar los pesos de las funciones base que parametrizan los *kernels* en el modelo de codificación GLM de cada neurona, maximizamos el *log-posterior* del modelo, utilizando un *Ridge prior* para regularizar los pesos inferidos (bajo el supuesto de que los *kernels* deben ser relativamente suaves):

$$L(\mathbf{k}) = \sum_{t=0}^T (r_t \log(\lambda_t \Delta) - \lambda_t \Delta) + C - \xi \|\mathbf{k}\|^2 \quad (5)$$

donde $\mathbf{k}$ es un vector que representa los pesos que se obtendrán, C es una constante que no depende de $\mathbf{k}$ (por lo que es irrelevante para el procedimiento de optimización) y ξ es el hiperparámetro de suavizado que controla la regularización.

El rendimiento del modelo se cuantificó mediante validación cruzada, calculando el *log-likelihood* del modelo (el *log-posterior* sin el último término de regularización *a priori*) de los datos retenidos en el modelo. Para ello, dividimos aleatoriamente los ensayos en 10 conjuntos (*folds*) de igual tamaño. El procedimiento de validación cruzada se repitió en cada uno de estos 10 conjuntos de ensayos (validación cruzada de 10 *folds*; el *log-likelihood* del modelo en cada *fold* se normalizó por el número de potenciales de acción en el *fold*). Este procedimiento penalizó el sobreajuste del modelo, lo que permitió realizar comparaciones válidas del rendimiento entre modelos de diversa complejidad.

Para seleccionar el hiperparámetro ξ , adoptamos un enfoque bayesiano empírico, en el que maximizamos la verosimilitud marginal (también denominada evidencia del modelo) con respecto a ξ (elegido a partir de una cuadrícula) y utilizamos esta estimación de ξ en el *posterior*. Para calcular la verosimilitud marginal, utilizamos la aproximación de Laplace. Este procedimiento no requiere validación cruzada y se realizó en todos los ensayos a la vez.

Una vez seleccionado el modelo (ver “Selección de modelos”), se infirió la estimación final de $\mathbf{k}$ ajustando el modelo a todos los ensayos a la vez.

Selección de modelos

Tres de las variables de la tarea fueron parametrizadas con dos *kernels* que dependían de las identidades de los odorantes y/o contextos: inhalaciones de olores recompensados y no recompensados (O_R y O_N), modulación de las respuestas olfativas por la presencia de un contexto recompensado (Asociación O_R y Asociación O_N) y posición a lo largo de contextos visuales recompensados y no recompensados (C_R y C_N). Al realizar la regresión de las respuestas neuronales con respecto a estas tres variables, se utilizaron los dos *kernels* correspondientes. Por lo tanto, el número total de variables de regresión fue de ocho (olor, contexto, asociación, inhalación, lamido, recompensa, velocidad y PreGO), y los modelos considerados incluyeron combinaciones entre todas ellas.

Probar todas las combinaciones de variables es inviable. Por lo tanto, implementamos un procedimiento de selección de modelos de búsqueda hacia adelante similar al introducido por Hardcastle et al., que selecciona el modelo más simple que mejor predice los datos de actividad neuronal retenidos (*log-likelihood* del modelo normalizado por potenciales de acción en 10 *folds* de datos de validación cruzada; ver “Ajuste y medición de *performance* del modelo”) (Hardcastle et al., 2017). En primer lugar, se evaluaron los modelos que incluían una sola variable y se determinó cuál era el que ofrecía un mejor rendimiento. A continuación, se comparó este modelo de una sola variable con todos los modelos de dos variables que incluían dicha variable. Si el modelo de dos variables con mayor rendimiento era significativamente mejor que el mejor modelo de una sola variable, se procedía a comparar este modelo de dos variables con el modelo de tres variables con mejor rendimiento que incluía este par de variables. Continuamos incluyendo variables en el modelo mediante este procedimiento hasta que el modelo más complejo considerado no mostró una mejora en el rendimiento de la predicción, en cuyo caso se seleccionó el modelo más simple. La significancia estadística de la mejora del rendimiento se evaluó siempre con una prueba de rangos con signo unilateral de dos muestras, que comprueba la hipótesis de que la diferencia de rendimiento entre los *folds* de datos del modelo más complejo y el más simple proviene de una distribución con una mediana superior a 0. Se consideró que los modelos tenían un mejor rendimiento si tenían un p-valor inferior a 0,05 en esta prueba. Las neuronas para las que el modelo seleccionado no funcionaba significativamente mejor que un

modelo con una tasa de disparo media constante se consideraron no moduladas por variables de tarea (es decir, tenían 0 variables moduladoras).

Contribución de cada variable al modelo GLM de encoding

Estimamos la contribución de una variable dada x_i (asociada con un *kernel* k_i) al modelo de codificación de una neurona calculando la diferencia en el rendimiento del modelo (aumento de la verosimilitud logarítmica normalizada por cantidad de potenciales de acción) entre el modelo seleccionado θ (con frecuencia de disparo λ_t) y el modelo $\theta^{\sim k_i}$ (con frecuencia de disparo $\lambda_t^{\sim k_i}$) que contiene todas las variables del modelo seleccionado, menos la variable x_i :

$$\text{Contribución de la variable } x_i = \frac{\sum_{t \in \{t_{k_i}\}} \left[(r_t \log(\lambda_t \Delta) - \lambda_t \Delta) - (r_t \log(\lambda_t^{\sim k_i} \Delta) - \lambda_t^{\sim k_i} \Delta) \right]}{\log(2)(1 + \sum_{t \in \{t_{k_i}\}} r_t)} \quad (7)$$

Acá, la suma se realiza sobre el conjunto de intervalos de tiempo $\{t_{k_i}\}$ en los que se realizó la convolución $k_i \otimes x_i$, siendo estos los momentos en el tiempo en los que el *kernel* k_i contribuyó a la tasa de disparo λ_t . El factor de normalización tiene un *offset* de 1 en la suma de r_t sobre $\{t_{k_i}\}$ para evitar expresiones numéricas indefinidas cuando no hubo disparos durante $\{t_{k_i}\}$, y se incluye $\log(2)$ para medir el aumento de la verosimilitud logarítmica normalizada por cantidad de potenciales de acción en términos de bits. La contribución de las variables calculadas para todas las neuronas registradas se muestra en las Figuras 1.11.B y 2.6.B. Para la contribución relativa porcentual de cada variable (Figuras 1.11.C y 2.6.C), para cada neurona normalizamos la contribución de cada variable por la suma de todas las contribuciones:

$$\text{Contribución relativa de la variable } x_i = \frac{\text{Contribución de la variable } x_i}{\sum_i \text{Contribución de la variable } x_i} \quad (8)$$

Decoding con el modelo GLM

Al utilizar los modelos GLM ajustados es posible decodificar experimentalmente las categorías de variables binarias mientras que se tienen en cuenta las modulaciones de la respuesta neuronal relacionadas con todas las demás variables de la tarea. Como se demostró anteriormente (Park et al., 2014a) para este modelo GLM, el cálculo para decodificar la identidad de una variable x_j con dos categorías $x_j = A$ y $x_j = B$ (por ejemplo, olor recompensado o no recompensado) con *kernels* k_j^A y k_j^B , respectivamente, es bastante sencillo. Consideremos el cociente de verosimilitud logarítmica (LLR, por sus siglas en inglés) para esta situación:

$$LLR = \log \frac{\text{likelihood}_{x_j=A}}{\text{likelihood}_{x_j=B}} = \log \frac{p(\mathbf{r}|\mathbf{x}^{\sim j}, x_j=A)}{p(\mathbf{r}|\mathbf{x}^{\sim j}, x_j=B)} \quad (9)$$

donde $\mathbf{x}^{\sim j}$ es un vector con el resto de las variables aparte de x_j (i.e., $\mathbf{x} = \{ \mathbf{x}^{\sim j}, x_j \}$).

Desarrollando un poco más:

$$LLR = \sum_{t=0}^T \left[r_t ((k_i^A \otimes x_j)_t - (k_i^B \otimes x_j)_t) + \Delta(\lambda_t^A - \lambda_t^B) \right] \quad (10)$$

donde λ_t^A y λ_t^B son la tasa de potenciales de acción variable en el tiempo para el modelo con $x_j = A$ y $x_j = B$ respectivamente. El LLR conduce a una regla simple para decodificar la categoría de la variable x_j : cuando $LLR > 0$, la neurona registrada indica que $x_j = A$ es más probable según el modelo; por el contrario, $x_j = B$ es más probable si $LLR < 0$. Este procedimiento matemático puede conceptualizarse como una estimación variable en el tiempo de si los potenciales de acción emitidos hasta ese momento en el ensayo son más probables según la predicción de la tasa de disparo de un modelo que considera una de las categorías variables en lugar de la alternativa. Cuando se considera una población de neuronas registradas simultáneamente, los LLR de las neuronas individuales pueden sumarse. En las Figuras 1.13 y 2.8, esta precisión (*accuracy*) de decodificación se promedia entre los animales. Para el análisis de la relación entre la precisión y el número de neuronas utilizadas para la decodificación (Figuras 1.13.CyD y 2.8.CyD), se construyeron pseudopoblaciones de neuronas con subconjuntos de neuronas que se muestrearon aleatoriamente de todas las sesiones de registro, hasta un número total de N neuronas (que coincide con el número total de

neuronas de los registros de todas las sesiones evaluadas en la figura, por ejemplo, primera sesión, intermedia y experta para la Figura 1.13). Para cada tamaño de población, el procedimiento de muestreo se repitió 100 veces y se calculó la precisión media.

Los registros de animales expertos solían contener más ensayos que los de animales de primera sesión y sesión intermedia. Para controlar el efecto de esta diferencia en la estimación del modelo y, por lo tanto, en la precisión de la decodificación, reajustamos los modelos GLM después de igualar el número de ensayos utilizados en todas las condiciones de entrenamiento. Todos los resultados de la decodificación se muestran después de este procedimiento de igualación de ensayos.

En la Figura 1.14 comparamos $p(O_R | \text{disparos})$ y $p(C_R | \text{disparos})$ con el retraso en la respuesta comportamental (en los ensayos *GO*, este último corresponde al tiempo de reacción hasta el primer lamido tras la primera inhalación del olor, mientras que en los ensayos *NOGO* corresponde al retraso hasta abandonar la zona del contexto tras la primera inhalación del olor). La cantidad $p(O_R | \text{disparos})$, la probabilidad *a posteriori* de O_R dados los disparos observados, es una decodificación basada en GLM de la representación PCx de O_R en un ensayo. Siguiendo a Park et al. (Park et al., 2014a), calculamos $p(O_R | \text{disparos})$ a partir de la distribución de codificación del GLM utilizando la regla de Bayes. Si asumimos que las probabilidades *a priori* de O_R y O_N son iguales (lo cual es razonable, ya que ambos olores se presentaron con iguales probabilidades en todos los ensayos), entonces $p(O_R | \text{disparos})$ se obtiene mediante:

$$p(O_R | r, \{x^{\sim \text{olores}}_i\}) = \frac{p(r | O_R, \{x^{\sim \text{olores}}_i\})}{p(r | O_R, \{x^{\sim \text{olores}}_i\}) + p(r | O_N, \{x^{\sim \text{olores}}_i\})} \quad (11)$$

donde en el lado derecho se observan los modelos de codificación del GLM y $\{x^{\sim \text{olores}}_i\}$ es el conjunto de todas las covariables excepto las correspondientes a los olores.

Para $p(C_R | \text{disparos})$ se utiliza una fórmula similar, reemplazando O_R y $\sim \text{olores}$ por C_R y $\sim \text{contextos}$.

Decodificación de olores con clasificadores lineales

Para el análisis de decodificación de olores entre las condiciones de realidad virtual y la estimulación pasiva (Figura 2.11), usamos un clasificador lineal que consistió en una regresión logística y validación cruzada con 3-*folds*. Este análisis es independiente de los modelos GLM y sus respectivos análisis de decodificación, lo que garantiza que la precisión de la decodificación obtenida no se vea influida por diferencias entre condiciones en la bondad de ajuste de los modelos GLM.

Las respuestas neuronales se concatenaron en una matriz de Ensayos (E) x Neuronas (N), organizada de manera que cada fila contuviera las respuestas del ensayo a un olor particular. La respuesta de cada neurona se promedió en una ventana de 1,3 s tras la primera inhalación del olor (coincidente con la decodificación máxima de las respuestas pasivas). Los ensayos se etiquetaron según el olor muestreado y se organizaron en un vector de E elementos.

Se construyeron pseudopoblaciones de neuronas con subconjuntos de neuronas que se muestrearon al azar de todas las condiciones de registro, hasta un número total de 111 neuronas (el número total de neuronas registradas en este experimento). Dado que las diferentes condiciones contenían diferente número de ensayos, se excluyó un subconjunto aleatorio de respuestas de cada neurona, de modo que el número de ensayos por condición fuera coherente entre las neuronas de la pseudopoblación. Para cada tamaño de población, este procedimiento de muestreo de ensayos se repitió 50 veces y se promediaron los valores obtenidos. Se utilizó un total de 28 ensayos por condición.

Agrupamiento de neuronas según la similaridad en las contribución relativas de las variables de *encoding*

Para agrupar las neuronas según las variables de la tarea que modulan su actividad, utilizamos un enfoque de agrupamiento (*clustering*) jerárquico aglomerativo. Solo consideramos las neuronas cuyo modelo de codificación GLM contenía al menos una variable de la tarea (es decir, con un número total de variables moduladoras ≥ 1 ; primera sesión: 172 de 243 neuronas, 70,8%; sesión intermedia: 71 de 111 neuronas, 64,0%; sesión experta con asociación: 99 de 142 neuronas, 69,7%; sesión experta sin asociación: 103 de 148 neuronas, 69,6%). En primer lugar, para cada neurona k determinamos el vector **ContribRel** $_k = \{\text{Contribución relativa de la variable } x_i\}_i$ que contiene las contribuciones relativas de todas las variables a la neurona k . A continuación, utilizamos una métrica de correlación para calcular las distancias por pares entre todos los vectores de contribuciones relativas, $pdist_{i,j} = 1 - r_{i,j}$, donde $r_{i,j}$ muestra la correlación entre el par (**ContribRel** $_i$, **ContribRel** $_j$). Con estas distancias, construimos un árbol jerárquico aglomerativo de *clusters*, en el que las distancias entre *clusters* se especificaron mediante la distancia media no ponderada entre todos los pares de objetos en dos *clusters* cualesquiera (UPGMA, por sus siglas en inglés). Para dividir un árbol jerárquico en *clusters* individuales, agrupamos las hojas del árbol utilizando un umbral de corte $umbral_{corte}$ para los coeficientes de distancia de los nodos del árbol (es decir, cortando el árbol en los nodos cuya altura era inferior a $umbral_{corte}$; se descartaron los *clusters* con menos de 3 neuronas). Los *clusters* de contribuciones relativas obtenidos se muestran en las Figuras 1.12 y 2.7.

Determinamos el valor óptimo para el umbral mediante la validación cruzada de la generalizabilidad de los *clusters* resultantes. Para ello, dividimos aleatoriamente los ensayos en dos conjuntos de igual tamaño (conjuntos A y B) y ajustamos por separado el modelo GLM a cada conjunto de ensayos, obteniendo los vectores de las contribuciones relativas de todas las variables a la neurona k en el conjunto A y en el conjunto B , **ContribRel** $_k^A$ y **ContribRel** $_k^B$ respectivamente. Primero evaluamos cómo generalizaban los *clusters* del conjunto A al conjunto B : etiquetamos A como el conjunto de entrenamiento y B como el conjunto de prueba. A continuación, fijamos el umbral en un valor determinado y realizamos el procedimiento de agrupamiento jerárquico descrito tanto para **ContribRel** $_k^A$ como para **ContribRel** $_k^B$, obteniendo una matriz de partición

para cada conjunto, P^{A}_{Entr} y P^{B}_{Eval} (si N es el número total de neuronas, la matriz de partición P es una matriz binaria $N \times N$, donde la posición de la matriz $P_{i,j}$ vale 1 si la neurona i y la neurona j pertenecen al mismo *cluster*, y vale 0 en caso contrario). A continuación, construimos una matriz de partición adicional $P^{A \rightarrow B}$ utilizando los centroides de los *cluster* en P^{A}_{Entr} para realizar la agrupación en el conjunto B : asignamos la neurona k al *cluster* j en $P^{A \rightarrow B}$ si **ContribRel** $^{B}_k$ era el más cercano al centroide del *cluster* j entre todos los centroides de *clusters* del conjunto A . Para cuantificar cuán generalizables fueron los resultados de la agrupación, calculamos el coeficiente de correlación de la muestra entre el bloque triangular superior de la matriz P^{B}_{Eval} y el bloque triangular superior de la matriz $P^{A \rightarrow B}$. Repetimos este procedimiento utilizando B como conjunto de entrenamiento y A como conjunto de prueba, y variamos el umbral a lo largo de un rango de valores. Mediante este procedimiento, determinamos que el umbral óptimo era 2,2 para los datos de la primera sesión y 2 para los datos de la sesión de expertos. Para animales de sesión intermedia utilizamos un umbral de 2,2 y, para los expertos en la tarea sin asociación, uno de 2.

Para visualizar la organización de los vectores de contribución relativa de todas las neuronas y realizar una validación cualitativa de los *clusters* obtenidos, utilizamos el escalamiento multidimensional (MDS, por sus siglas en inglés). Esta técnica no lineal mapea la colección de vectores de contribución relativa de las neuronas $\{\mathbf{ContribRel}_i\}_i$ desde su espacio original de ocho dimensiones (correspondiente a las 8 variables de la tarea) a una proyección bidimensional que preserva mejor las distancias originales entre los vectores $\{pdist_{i,j}\}_{i,j}$. Las neuronas con vectores de contribución relativa similares ocupan regiones similares del plano MDS bidimensional, lo que permite visualizar la estructura global de similitudes de $\{\mathbf{ContribRel}_i\}_i$. Aplicamos el algoritmo MDS no clásico (no métrico) a la colección de valores $pdist_{i,j}$, calculados con la métrica de distancia euclidiana, con el criterio de bondad de ajuste normalizado de Kruskal stress-1. En las Figuras 1.12 y 2.7, las neuronas del plano MDS se colorearon según el *cluster* al que pertenecen, determinado por nuestro enfoque de agrupamiento jerárquico.

Resultados

Parte 1: El aprendizaje de una asociación entre olores, contextos visuales y recompensas modifica de forma dinámica el comportamiento y las respuestas de los circuitos corticales olfativos

Análisis comportamental

Con el objetivo de evaluar si la respuesta a olores en la corteza olfativa cambia dependiendo del contexto visual en el que se presenta el olor asociado a una recompensa, en el laboratorio se desarrolló un paradigma comportamental asociativo (ver Figura 1.1, A). En la tarea, del tipo *GO-NOGO*, los animales son fijados de la cabeza y corren sobre una rueda que mueve una realidad virtual que representa un pasillo (negro con puntos blancos) sobre el que avanzan hasta llegar a dos posibles contextos visuales, uno verde y uno gris, los cuales ven llegar a la distancia. Al entrar a la zona del contexto, los animales reciben durante 1 segundo uno de dos posibles olores (O_A =etil butirato u O_B =isoamil acetato) y al salir deben dar la respuesta de lamido (*GO*) o no-lamido (*NO-GO*) de acuerdo a la combinación olor-contexto presentada en el ensayo. Los ensayos pueden clasificarse de ensayos según combinación de estímulos (O: olor; C: contexto; R: recompensado; N: no recompensado) y según la respuesta del animal (HIT: si recibió la combinación de estímulos recompensada y lamió; MISS: si recibió la combinación de estímulos recompensada y no lamió; Falsa alarma [FA]: si recibió otra combinación de estímulos y lamió; Rechazo correcto [CR, por sus iniciales en inglés]: si recibió otra combinación de estímulos recompensada y no lamió) (ver Figura 1.1.B). La recompensa la reciben en una única combinación de olor-contexto y deben aprender a lamer solo en esa y no lamer en las otras tres combinaciones (ver Figura 1.1.B, combinación roja). Los ratones aprenden la tarea en aproximadamente 7 días, lo cual se evidencia en un aumento del índice de desempeño comportamental (d') hasta llegar a un valor cercano a 3,2 que equivale a una tasa de HIT de 0,95 y una tasa de FA de 0,05. Decimos que los animales son expertos en esta tarea cuando llegan a dicho valor. Junto con esta mejora comportamental, presentan menor sesgo a realizar lamidos, lo cual se

refleja en valores de *criterion* cercanos a 0 con el paso de las sesiones de entrenamiento (ver Figura 1.1.C).

Con el interés de estudiar el proceso de aprendizaje asociativo, nos focalizamos en la cuantificación por separado de la discriminación de olores y de contextos. Para esto se utilizó un índice de discriminación d' para olores (evaluándolo la discriminación de los 2 olores sobre ensayos de contexto recompensado) y otro para contextos (evaluándolo la discriminación de los 2 contextos sobre ensayos de olor recompensado) (ver Materiales y Métodos), lo cual mostró que el aprendizaje de la tarea es secuencial: primero aprenden a discriminar olores (ver Figura 1.1, D, curvas rosadas) y luego contextos (ver Figura 1.1, D, curvas grises). Esto nos permitió definir una ventana de aprendizaje intermedia en la cual los animales aprendieron a discriminar olores (con un d' cercano a 2,5 que equivale a una tasa de HIT de 0,9 y una de FA de 0,1), pero no aún contextos (aproximadamente en la tercera sesión de entrenamiento). Utilizamos el estadio intermedio para entender con mayor detalle la asociación, durante el aprendizaje, entre olores y contextos.

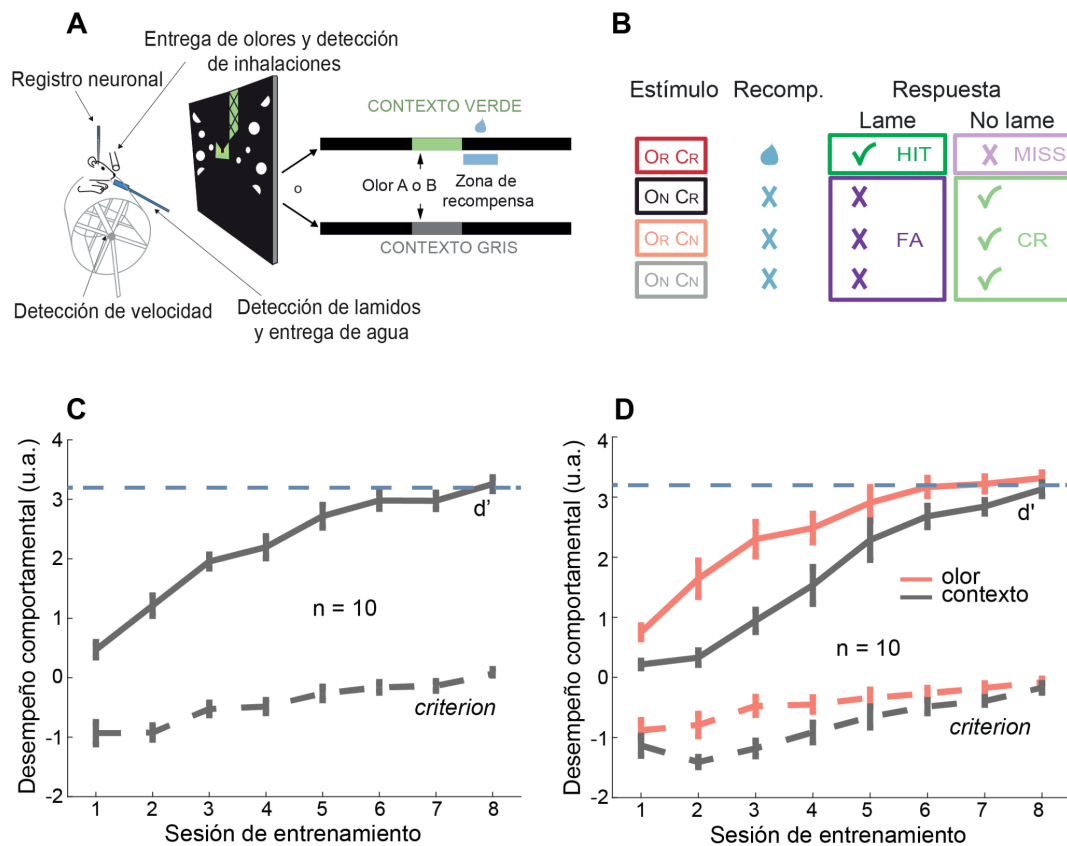


Figura 1.1: **A**, esquema del paradigma comportamental de realidad virtual utilizado en la tesis. **B**, clasificación de ensayos según combinación de estímulos (O: olor; C: contexto; R: recompensado; N: no recompensado) y la respuesta del animal (*HIT*: si recibió la combinación de estímulos recompensada y

lamió; *MISS*: si recibió la combinación de estímulos recompensada y no lamió; Falsa alarma [FA]: si recibió otra combinación de estímulos y lamió; Rechazo correcto [CR, por sus iniciales en inglés]: si recibió otra combinación de estímulos recompensada y no lamió). Desempeño comportamental a lo largo de las sesiones de entrenamiento unificado para los 4 tipos de ensayo (**C**) y desacoplado entre índices de discriminación de olores (rosado) y contextos (gris) (**D**). La curva continua muestra el índice d' y la discontinua el *criterion*. Se utilizaron los mismos 10 animales para construir ambos paneles.

Para caracterizar con más detalle cómo cambia el comportamiento con el aprendizaje de la tarea en los distintos estadios, cuantificamos diversas variables comportamentales como la tasa de lamidos, la velocidad de locomoción y la tasa de inhalación. Observamos que dichas variables también cambian secuencialmente con el aprendizaje de la tarea.

Los animales de la primera sesión de entrenamiento presentaron una tasa de lamido basal, relativamente constante a lo largo del corredor virtual y similar para los 4 tipos de ensayo (ver Figura 1.2, 'Primera sesión'). Como era esperable, la tasa de lamido aumentó considerablemente al momento de recibir la recompensa en los ensayos recompensados (ver Figura 1.2, 'Primera sesión', curva roja). Se observó un aumento anticipatorio leve para los ensayos de O_R indicando un aprendizaje precoz dentro de la propia sesión (ver Figura 1.2, 'Primera sesión', curvas roja y rosada). Los animales que aprendieron a discriminar olores pero no contextos (sesión intermedia) redujeron considerablemente la tasa de lamido a lo largo del corredor para los 4 tipos de ensayo y mostraron un aumento anticipatorio a la llegada de la recompensa, únicamente para los ensayos correspondientes al olor posiblemente recompensado (ver Figura 1.2, 'Sesión intermedia', curvas roja y rosada). Por último, los animales expertos en la tarea dejaron de lamer a lo largo del corredor y lamieron de forma anticipatoria únicamente para los ensayos recompensados (ver Figura 1.2, 'Sesión experta', curva roja).

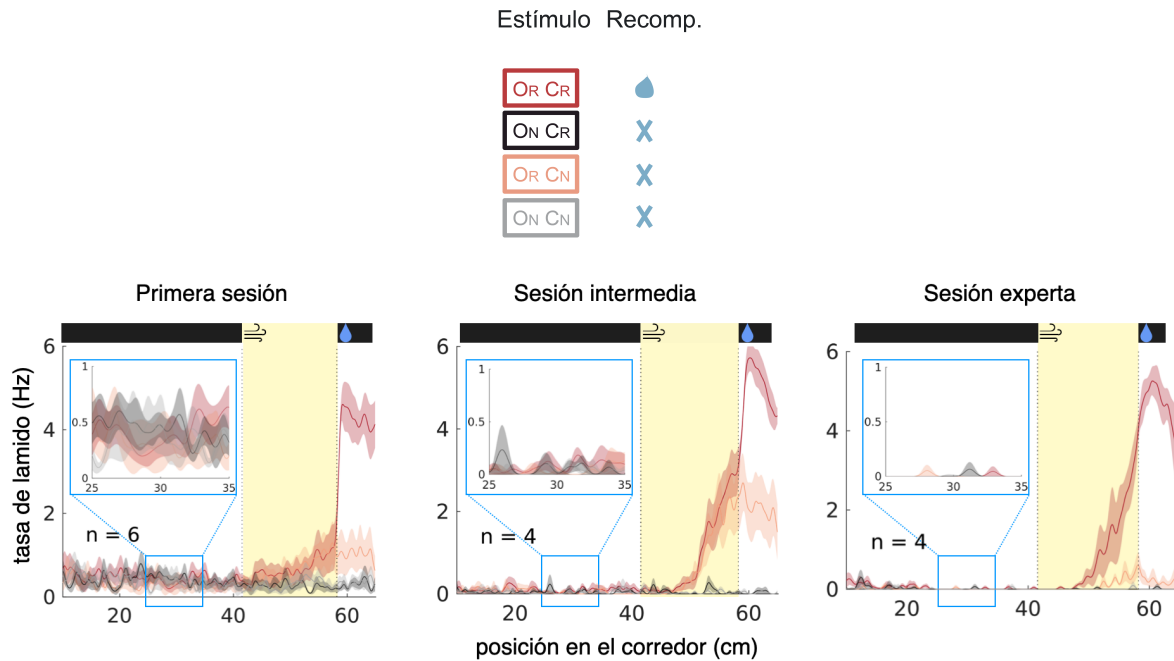


Figura 1.2: Tasa de lamido a lo largo de la posición en el corredor virtual para las 3 sesiones de entrenamiento estudiadas (primera, intermedia y experta, respectivamente). Cada curva corresponde a un tipo de ensayo: roja, para ensayos de olor y contexto recompensado ($O_R C_R$); rosada, para olor recompensado y contexto no recompensado ($O_R C_N$); negra, para olor no recompensado y contexto recompensado ($O_N C_R$); gris, para ambas variables no recompensadas ($O_N C_N$). El parche amarillo indica el segmento del pasillo que corresponde al contexto visual. Recuadro: ampliación de la región del corredor virtual comprendida entre 25 y 35 cm, previa a la entrada al contexto visual. Se utilizaron distintos grupos de animales para cada una de las sesiones.

Al analizar la velocidad de locomoción a lo largo del corredor virtual encontramos que los animales de primera sesión mostraron dinámicas similares para los cuatro tipos de ensayo (ver Figura 1.3, ‘Primera sesión’). También observamos una disminución de la velocidad mientras recibían la recompensa (ver Figura 1.3, ‘Primera sesión’, curva roja, salida del contexto visual). Los animales de sesión intermedia presentaron una marcada disminución de la velocidad al acercarse al sitio de estimulación olfativa y, una vez recibido el olor, la modularon de forma diferencial para cada tipo de odorante (ver Figura 1.3, ‘Sesión intermedia’, curvas roja y rosada contra negra y gris), evidenciando el aprendizaje olfativo: al recibir el olor no recompensado (curvas negra y gris) aceleraron hacia el siguiente ensayo, mientras que al recibir el recompensado se mantuvieron a baja velocidad para lamer por su recompensa, sin importar el tipo de contexto. Los animales expertos modularon su velocidad según las distintas instancias relevantes de la tarea, haciendo evidente el aprendizaje asociativo del olor, el contexto y la

recompensa: al acercarse al contexto no recompensado aceleraron la marcha para pasar al siguiente ensayo, mientras que cuando se acercaron al contexto recompensado la ralentizaron (ver Figura 1.3, ‘Sesión experta’, previo a la entrada del contexto, curvas rosas y gris contra roja y negra, respectivamente). Luego, al recibir el olor no recompensado, aceleraron y pasaron al siguiente ensayo, mientras que al recibir el olor recompensado bajaron su velocidad y lamieron por su recompensa (ver Figura 1.3, ‘Sesión experta’, dentro del contexto, curva negra contra roja, respectivamente).

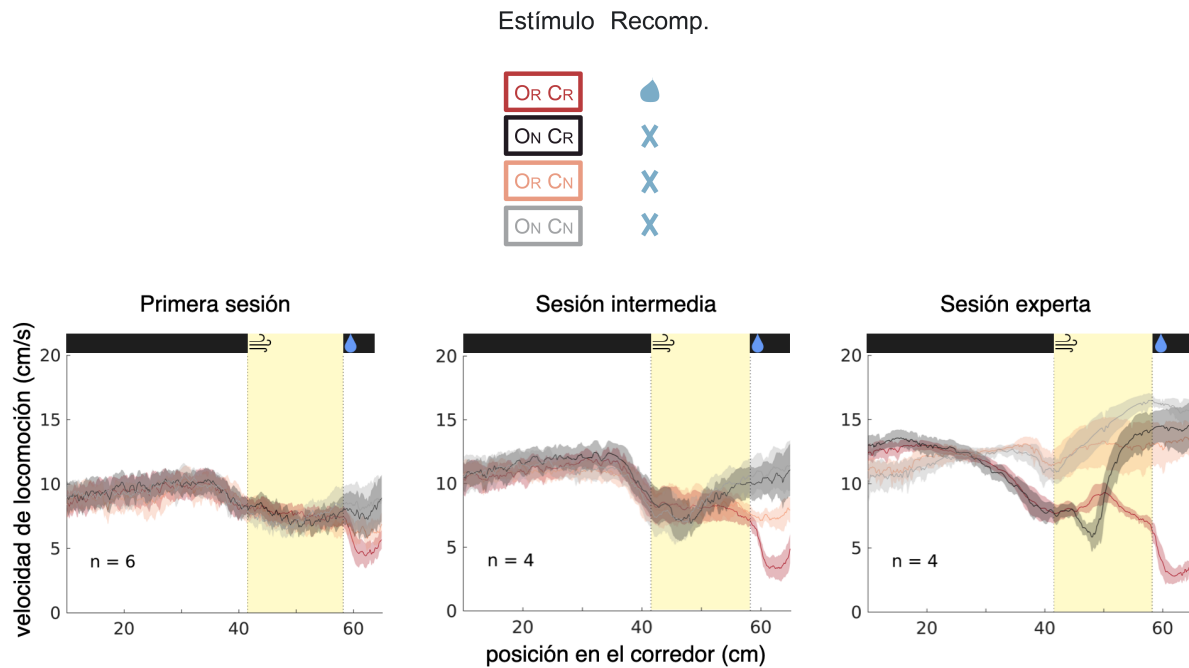


Figura 1.3: Velocidad de locomoción a lo largo de la posición en el corredor virtual para las 3 sesiones de entrenamiento estudiadas (primera, intermedia y experta, respectivamente). Cada curva corresponde a un tipo de ensayo: roja, para ensayos de olor y contexto recompensado ($O_R C_R$); rosada, para olor recompensado y contexto no recompensado ($O_R C_N$); negra, para olor no recompensado y contexto recompensado ($O_N C_R$); gris, para ambas variables no recompensadas ($O_N C_N$). El parche amarillo indica la posición en la que los animales están dentro del contexto visual. *Inset*: ampliación de la región del corredor virtual comprendida entre 25 y 35 cm, previa a la entrada al contexto visual.

Por último, al analizar la tasa de inhalación graficada en función de la primera inhalación del olor encontramos que los animales de primera sesión tuvieron un comportamiento de olfateo similar frente a los distintos tipos de ensayo (ver Figura 1.4, ‘Primera sesión’). Los de sesión intermedia aumentaron su tasa de inhalación de forma anticipatoria a la estimulación olfativa para los 4 tipos de ensayo por igual (ver Figura 1.4, ‘Sesión intermedia’). Finalmente, los animales expertos aumentaron más su tasa de

inhalación de forma anticipatoria en los ensayos de contexto recompensado que en los de contexto no recompensado (ver Figura 1.4, 'Sesión experta', curvas roja y negra contra rosada y gris, respectivamente). Teniendo en cuenta que los animales ya habían aprendido a dar valor a cada uno de los olores en sesiones anteriores y que la actividad inhalatoria evaluada es previa a la estimulación olfativa, este resultado muestra que los ratones expertos aprendieron a discriminar también los contextos visuales.

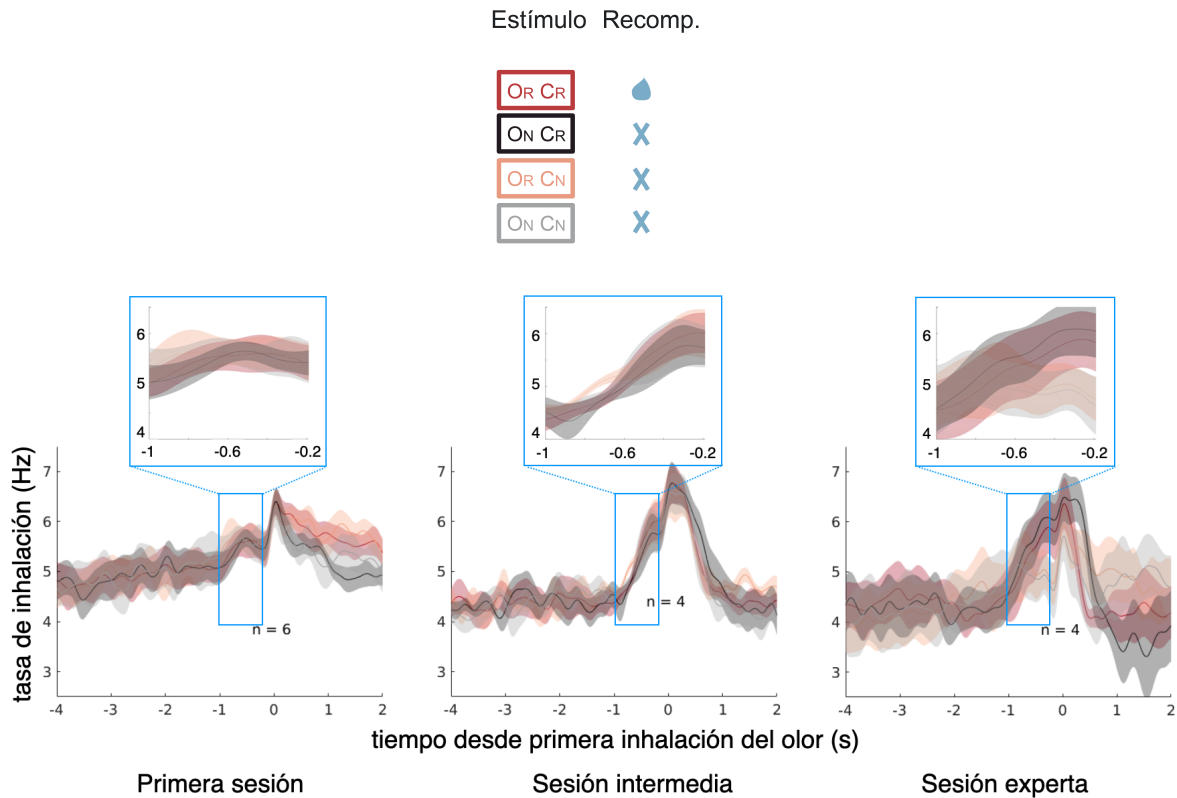


Figura 1.4: Tasa de inhalación fijada a la primera inhalación del olor para las 3 sesiones de entrenamiento estudiadas (primera, intermedia y experta, respectivamente). Cada curva corresponde a un tipo de ensayo: roja, para ensayos de olor y contexto recompensado ($O_R C_R$); rosada, para olor recompensado y contexto no recompensado ($O_R C_N$); negra, para olor no recompensado y contexto recompensado ($O_N C_R$); gris, para ambas variables no recompensadas ($O_N C_N$). Recuadro: ampliación del segundo anterior a percibir el olor.

Por un lado, estos resultados permiten evidenciar que los animales de sesión intermedia efectivamente aprendieron a discriminar olores pero no aún contextos visuales. Por el otro, muestran que, al igual que el desempeño general de la tarea, los comportamientos de lamido, locomoción y olfateo son adaptados con el aprendizaje de forma secuencial.

Respuestas neuronales

Para investigar si las respuestas neuronales de la corteza piriforme (PCx) cambian a medida que los animales aprenden a asociar olores con contextos visuales y recompensas, realizamos registros electrofisiológicos agudos de la actividad neuronal de dicha región. Particularmente, registramos en las coordenadas AP 0,1 mm y ML [3,0 3,3], correspondientes a una zona de la PCx donde aún se encuentra el LOT (aunque en el límite de desaparecer) (Paxinos & Franklin, 2012), es decir, aPCx. Para esto se utilizaron electrodos multisitio, llamados *silicon probes*, que permiten registrar extracelularmente la actividad de un gran número de neuronas. Mediante algoritmos de separación de dicha actividad (*spike sorting*, ver Materiales y Métodos), se pueden identificar los potenciales de acción de neuronas individuales. Obtuvimos de esa manera registros en animales de primera sesión de entrenamiento (243 neuronas de 9 animales, 27 ± 16 neuronas por animal; media $\pm$ desvío estándar), sesión intermedia (111 neuronas de 4 animales, 28 ± 19 neuronas por animal; media $\pm$ desvío estándar) y sesión experta (142 neuronas de 5 animales, 28 ± 18 neuronas por animal; media $\pm$ desvío estándar; ver Figura 1.6). Se encontraron diferencias significativas entre las tasas de disparo de las tres sesiones de entrenamiento (test de Kruskal-Wallis: p -valor $<0,0001$). Particularmente, los animales de primera sesión (comparación múltiple por Tukey-Kramer, p -valor $<0,0001$) y los expertos (comparación múltiple por Tukey-Kramer, p -valor $<0,05$) mostraron tasas de disparo mayores que los de la sesión intermedia (ver Figura 1.5.A), estando la sesión intermedia enriquecida en neuronas de baja (0 a 4 Hz) tasa de disparo (ver Figura 1.5.B), consistente con una ventana de plasticidad inhibitoria (Vogels et al., 2011). No se encontraron diferencias significativas entre las tasas de disparo de los animales de primera sesión y los expertos (comparación múltiple por Tukey-Kramer, p -valor=0,35).

Con el fin de visualizar la actividad de todas las neuronas registradas para cada estadio de aprendizaje, se generaron mapas de color del cambio en la tasa de disparo respecto del basal alineado a cada posición relacionada a eventos importantes de la tarea como la entrada del contexto visual (C), la primera inhalación del olor (O), la primera respuesta de lamido posterior al olor y previa a la recompensa (L) y la recompensa (R)(Figura 1.6, paneles superiores). Junto con estos, se graficó el promedio del cambio de la tasa de disparo (Figura 1.6, paneles centrales) y los 3 primeros componentes principales de

dicha variación (Figura 1.6, paneles inferiores), siendo estos últimos capaces de separar las contribuciones inhibitorias y excitatorias de la actividad neuronal. Como era esperable para una corteza olfativa, las neuronas de la PCx mostraron típicas respuestas tanto excitatorias como inhibitorias vinculadas al inicio de la inhalación del olor (ver Figura 1.6, actividad alrededor de 'O'). Notoriamente, encontramos una marcada ausencia de las respuestas olfativas inhibitorias en la sesión intermedia (ver Figura 1.6.B, actividad alrededor de 'O', mapas de color y análisis de componentes principales), pudiéndose tratarse de un silenciamiento de las interneuronas inhibitorias en este estadio, consistente también con las menores tasas de disparo reportadas al analizar sus distribuciones (ver Figura 1.5). Por otro lado, observamos que para animales expertos en la tarea, dichas neuronas respondieron (en su gran mayoría de forma excitatoria) también al ingreso del contexto visual (ver Figura 1.6.C, actividad alrededor de 'C'). Además observamos cambios en la actividad de algunas neuronas asociados a la recompensa (ver Figura 1.6, actividad alrededor de 'R').

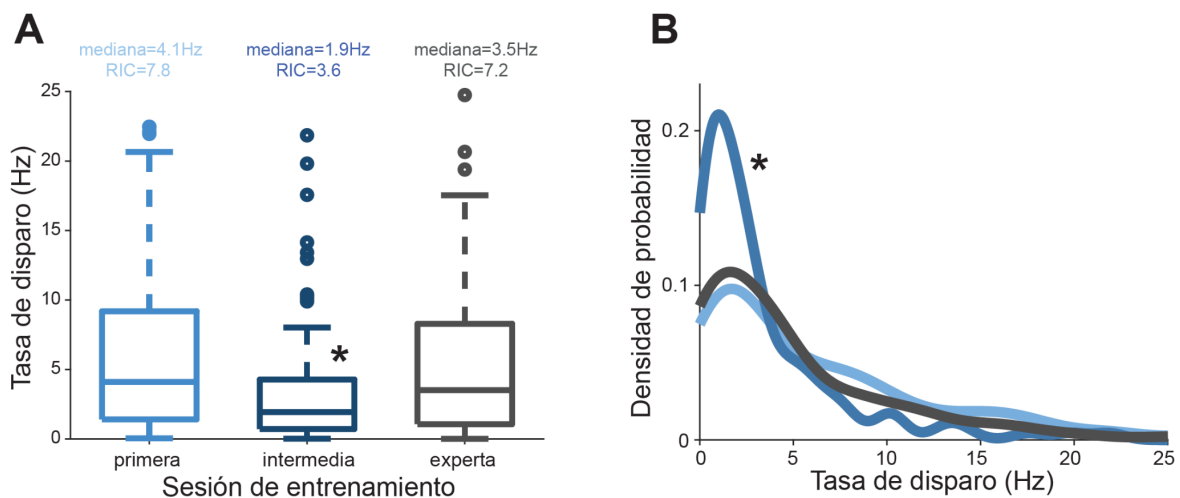


Figura 1.5: Distribución de las tasas de disparo de las neuronas registradas en animales de primera sesión (celeste), sesión intermedia (azul) y en animales expertos (gris). **A**, *boxplots* de las tasas de disparo neuronal donde se explicita la mediana y el rango intercuartílico (RIC) de cada distribución. **B**, estimación de densidad de probabilidad por *kernels* (KDE, por sus siglas en inglés) de las tasas de disparo neuronal. Se encontraron diferencias significativas (mostradas por asteriscos) entre las distribuciones (*test* de Kruskal-Wallis: p -valor<0,0001). Las comparaciones múltiples de a pares *post-hoc* de Tukey-Kramer revelaron diferencias significativas entre los animales de primera sesión y sesión intermedia

(p -valor $<0,0001$), y entre los de sesión intermedia y los expertos (p -valor $<0,05$). No se encontraron diferencias significativas entre los animales de primera sesión y los expertos (p -valor $=0,35$).

La presencia de respuestas neuronales en la corteza piriforme asociadas no solo a olores sino también al contexto visual o a la recompensa resultó sumamente interesante. Para continuar analizando cómo la actividad neuronal dependía del tipo de ensayo, correlacionamos la actividad poblacional entre los tipos de ensayos, en la primera sesión, sesión intermedia y animales expertos. Agrupamos los registros y creamos una serie temporal de vectores de actividad poblacional que contenían la cuenta de potenciales de acción de cada neurona. La serie temporal fue calculada en una secuencia de intervalos de tiempo (*bins*) alrededor de la estimulación olfativa. La similitud entre estos vectores se cuantificó mediante el coeficiente de correlación de Pearson. Tanto para la primera como para la sesión intermedia se evocaron patrones de actividad luego de la estimulación olfativa que distinguían la identidad del olor (ver Figura 1.7, dos bloques diagonales en el paneles superior y central). El análisis de los patrones de actividad de los animales expertos muestra un escenario más complejo: los tipos de ensayo pueden agruparse inicialmente según el contexto visual a medida que los animales se acercan a la entrada de dicho contexto (ver Figura 1.7, panel inferior, patrón de tablero de ajedrez que emerge antes de la estimulación olfativa), los patrones de respuesta posteriores discriminan entre olores (ver Figura 1.7, panel inferior, bloques diagonales alrededor de 0,3 s) y, 1,2s después de la primera inhalación de olor, diferencian los ensayos recompensados del resto de las condiciones (ver Figura 1.7, panel inferior, ensayo $O_R C_R$).

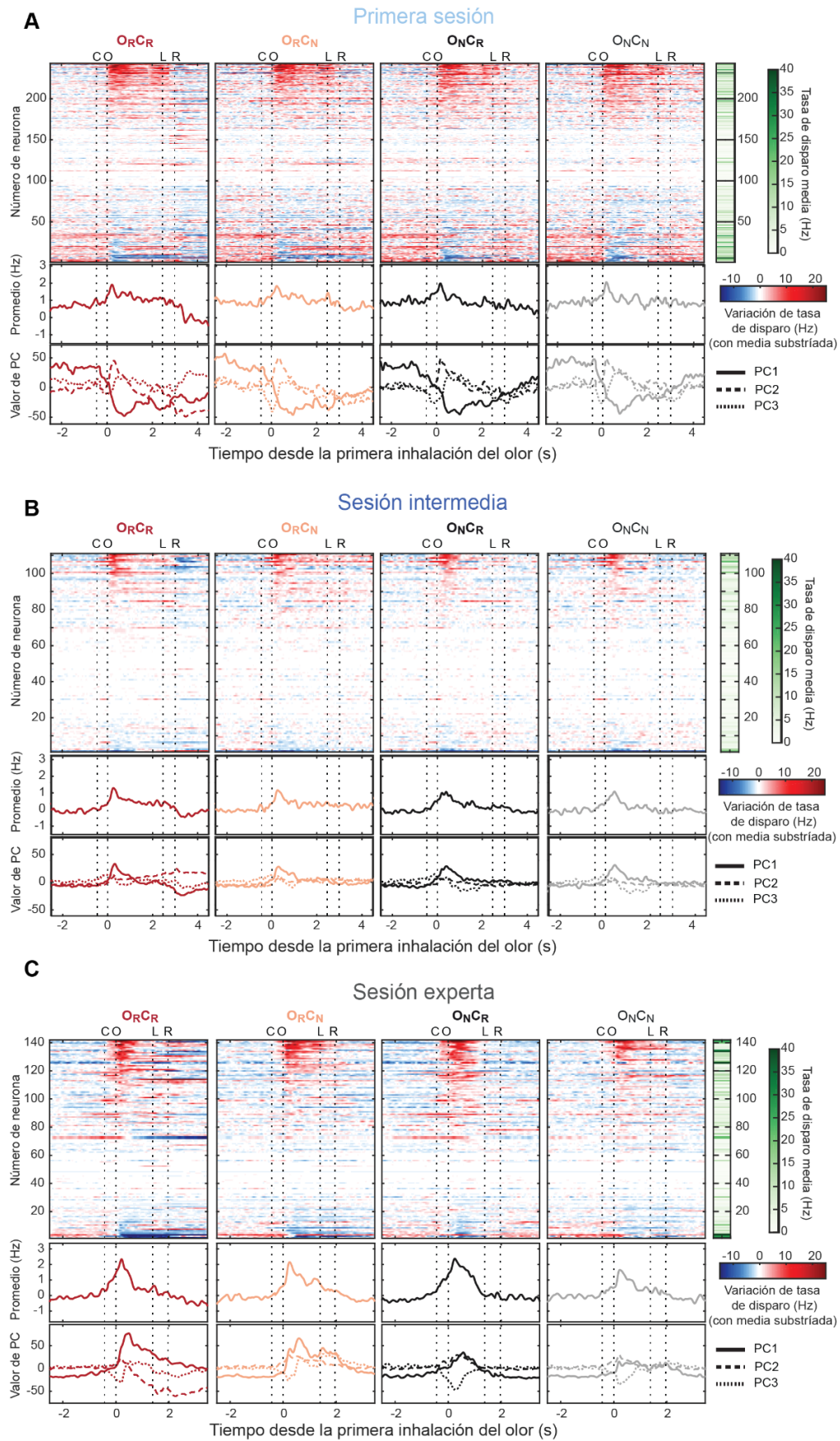


Figura 1.6: Actividad poblacional de la corteza piriforme en animales de primera sesión (A), sesión intermedia (B) y sesión experta (C). Dentro de cada panel, la **fila superior** muestra los mapas de color

con la variación promedio de la tasa de disparo de cada neurona con respecto a su tasa promedio (substrayendo la tasa promedio de la actual) fijada al momento en que los animales perciben el olor por primera vez. Cada columna corresponde a un tipo de ensayo distinto. Las líneas punteadas verticales muestran en alineamiento a los tiempos medianos de los siguientes eventos: C entrada al contexto, O estimulación olfativa, L respuesta de lamido previa a la entrega de la recompensa, R entrega de la recompensa (gota de agua). Tasa de disparo con sustracción de la media ‘cosida’ para su visualización (ver ‘Materiales y métodos’). La columna en escala de verdes de la derecha muestra la tasa de disparo media de cada neurona. Las neuronas se ordenaron según la respuesta media en los ensayos $O_R C_R$. La **fila central** muestra el promedio de la variación de la tasa de disparo poblacional y la **fila inferior** los primeros 3 componentes principales (PCs) de la actividad poblacional, los cuales tienden a separar las contribuciones excitatorias e inhibitorias.

Estos resultados indican que las señales no olfativas, presumiblemente relacionadas con el contexto visual y la recompensa, pueden observarse en la actividad poblacional de la PCx. Notablemente, dichas respuestas se adquirieron luego del aprendizaje de la tarea. A pesar de que tanto los animales de la primera sesión como los intermedios y los expertos son capaces de ver las señales contextuales visuales a la distancia, la actividad de las neuronas de los animales de la primera sesión y sesión intermedia no se agrupa según contextos visuales antes de la entrada al contexto, lo que sugiere que el aprendizaje induce una modulación contextual de la actividad de la PCx antes de que llegue el olor potencialmente recompensado.

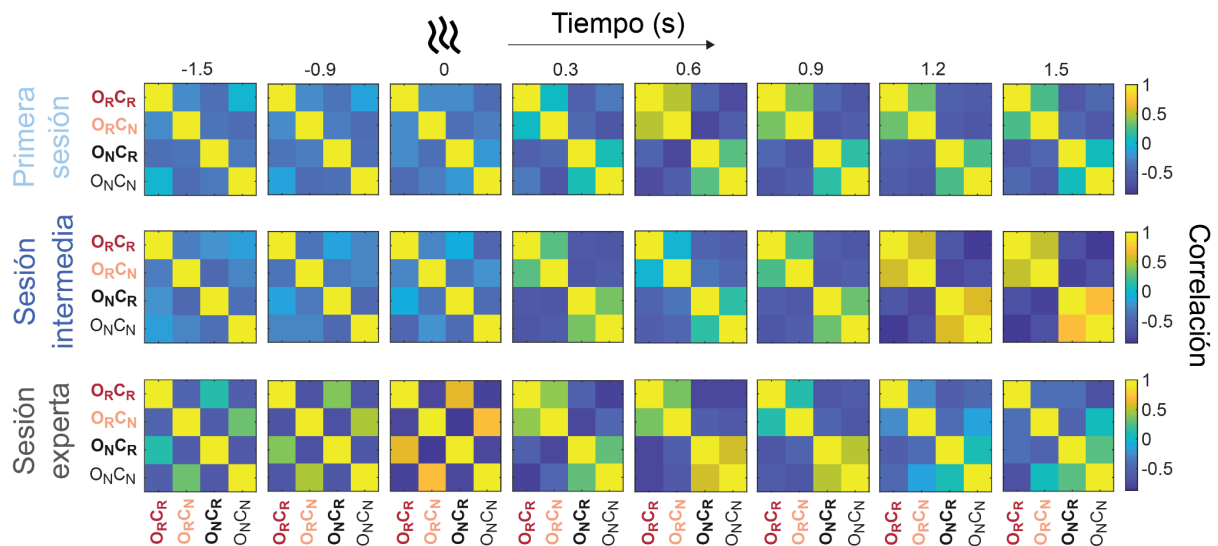


Figura 1.7: Matriz de correlación de Pearson entre tipos de ensayos para neuronas provenientes de animales de primera sesión (**fila superior**), sesión intermedia (**fila central**) y animales expertos (**fila inferior**). Las matrices se construyeron a partir de las series temporales de los vectores de actividad

poblacional que contienen la cuenta de disparos para cada neurona, calculada en secuencias de intervalos temporales (*bins*) alrededor de la estimulación olfativa.

Nos preguntamos, entonces, cómo se componen estas poblaciones neuronales. Las señales olfativas y contextuales observadas podrían ser transmitidas por diferentes subpoblaciones neuronales de la PCx o, alternativamente, esta información podría ser combinada por neuronas individuales. Evaluamos esto estudiando las respuestas individuales de las neuronas de la PCx de animales en las 3 sesiones de entrenamiento detalladas previamente (ver Figura 1.8). Como se vió en trabajos anteriores (Bolding & Franks, 2018; Poo & Isaacson, 2009, 2011), las neuronas de la PCx mostraron respuestas excitatorias o inhibitorias que dependían de la identidad del olor, y mostraron actividad sincronizada con la respiración, tanto para animales expertos como de primera y sesión intermedia (ver Figura 1.8, 'Respuestas olfativas' y 'Modulación por inhalación'). También encontramos neuronas cuyo nivel de actividad variaba según la velocidad de locomoción del animal, junto con cambios en la frecuencia de disparo antes y/o después de eventos de lamido individuales en todos los tipos de ensayos y después del consumo de la recompensa en los ensayos $O_R C_R$ (ver Figura 1.8, 'Modulación por velocidad', 'Modulación por lamidos' y 'Respuestas de recompensa'). Consistente por con lo reportado previamente (Poo et al., 2022), sólo una vez que los animales aprendieron la tarea, encontramos neuronas que se activaban según la ubicación espacial del animal a lo largo del pasillo virtual (ver Figura 1.8, C, 'Respuestas posicionales') y neuronas que mostraban una diversidad de respuestas discriminativas a las diferentes combinaciones de olores y contextos (ver Figura 1.8, C, 'Respuestas asociativas'). Para los ensayos $O_R C_R$, en el intervalo de tiempo que precede a la decisión de lamer, se presume que hay una combinación de señales premotoras y de anticipación de la recompensa que son difíciles de discriminar. No obstante, pudimos encontrar respuestas neuronales que precedían específicamente a los lamidos realizados después de la estimulación olfativa y en anticipación a la zona de recompensa durante los ensayos *GO*, pero no a los lamidos realizados antes de la administración del olor (es decir, lamidos 'espontáneos' no relacionados con ninguna asociación olfativa-contextual que predijera una recompensa), lo que indica una clara distinción entre las respuestas neuronales de anticipación de la recompensa y las de preparación motora (ver Figura 1.9). Estos resultados muestran que, más allá de la codificación de la identidad del olor, la actividad de las neuronas

individuales de la PCx es rica en información conductual, capaz de procesar el olfato en función del contexto y mostrar señales asociativas que emergen con el aprendizaje.

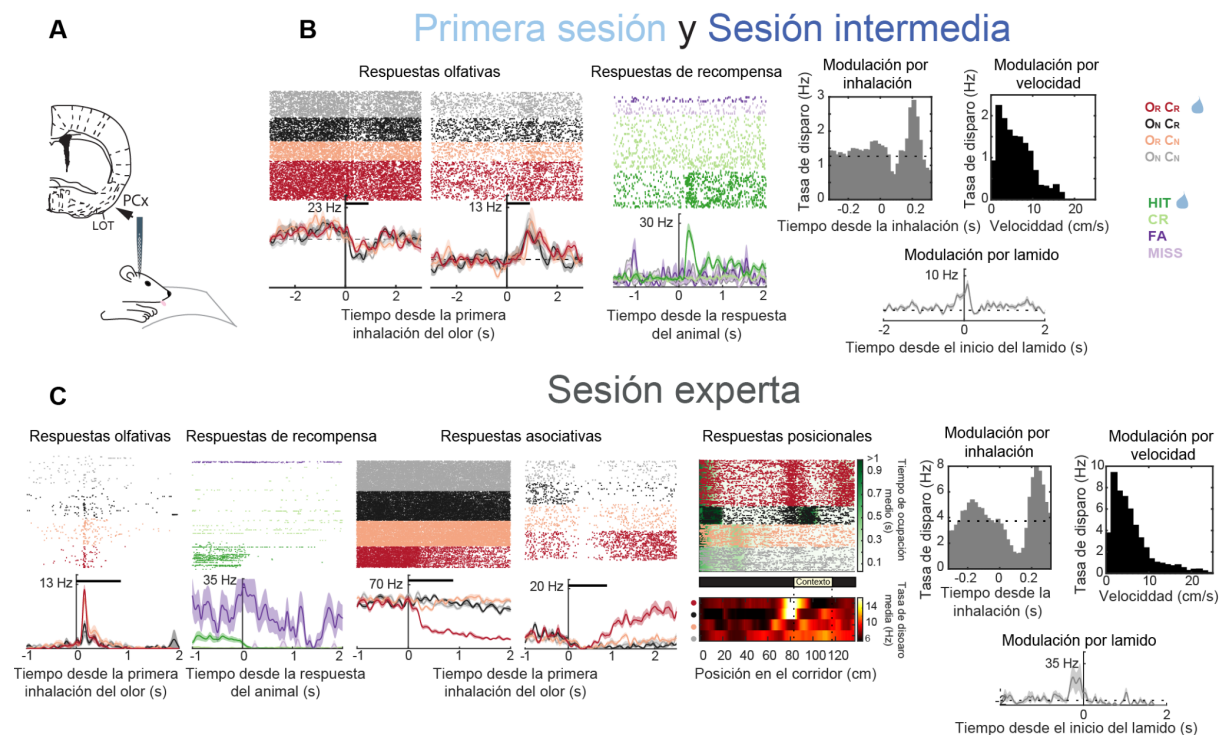
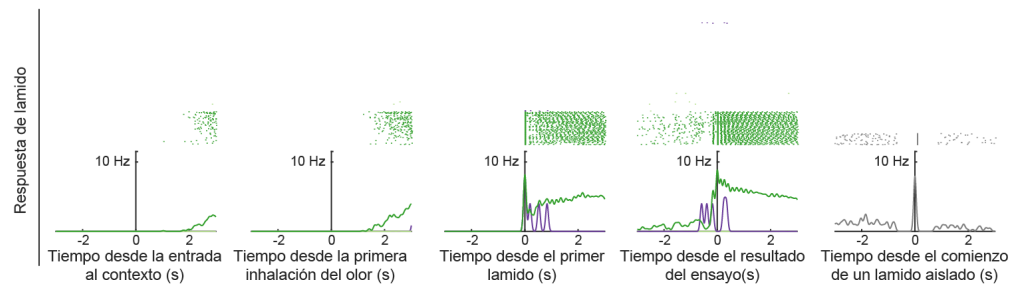


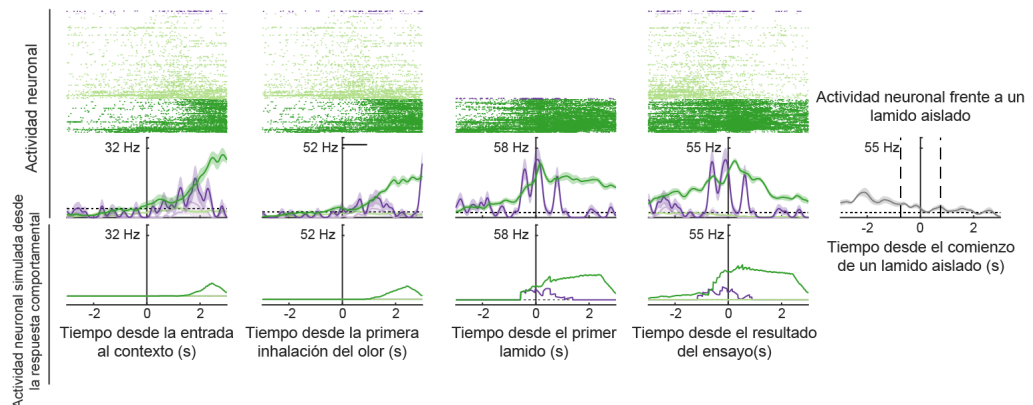
Figura 1.8: Neuronas individuales moduladas por variables sensoriales y comportamentales para animales de las tres sesiones de entrenamiento. **A**, esquema del sitio de registro neuronal en la PCx en animales comportándose. **B**, ejemplos de neuronas registradas durante la primera sesión y sesión intermedia. Las respuestas al olor y a la recompensa se muestran en gráficos rasterizados de potenciales de acción (cada marca) codificados por colores según el tipo de ensayo (respuestas olfativas) o el resultado del ensayo (respuestas de recompensa), de acuerdo con el código de colores de la derecha. La duración del estímulo olfativo se indica con una barra negra horizontal y equivale a 1s. Los paneles que se encuentran por debajo de los gráficos rasterizados muestran la frecuencia de disparo promedio (valor medio $\pm$ error estándar) para cada tipo de ensayo de esa misma neurona. Se muestra, también, la modulación por inhalación, velocidad y lamido. **C**, ejemplos de neuronas registradas en animales expertos. Las respuestas al olor, la recompensa, la inhalación, la velocidad y el lamido se muestran como en el panel superior derecho. Los animales expertos también muestran neuronas con respuestas asociativas y otras que responden a la posición del animal a lo largo del corredor. Las respuestas de posición están normalizadas por el tiempo que el animal pasó en cada ubicación (el tiempo medio de ocupación del animal se muestra en verde debajo del gráfico rasterizado) y el promedio se muestra como un mapa de calor.

A

HIT
CR
FA
MISS

**B**

Neurona ejemplo 1
(N31 #13)

**C**

Neurona ejemplo 2
(N31 #1)

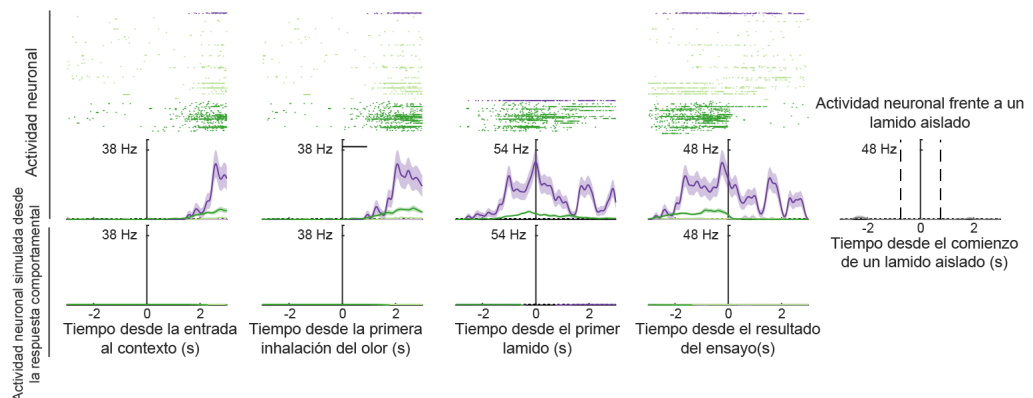


Figura 1.9: Neuronas que anticipan la recompensa. Diferenciación de señales premotoras y de anticipación de recompensa en neuronas individuales. Los colores indican el resultado del ensayo: HIT y CR en verde oscuro y claro, FA y MISS en violeta oscuro y claro, respectivamente. **A**, respuesta comportamental de lamido alineada con diferentes eventos del ensayo. Los paneles superiores muestran un *raster plot* de lamidos y los paneles inferiores muestran la tasa media instantánea de lamido. La columna de la derecha muestra (en gris) 29 lamidos que se produjeron antes de la estimulación olfativa y que estuvieron aislados temporalmente de otros lamidos por al menos 0,75 s. **B**, ejemplo de una neurona que está modulada por señales motoras de lamido. Los paneles superiores muestran la actividad neuronal registrada alineada con diferentes eventos del ensayo, con *raster plots* de disparos neuronales en la parte superior y tasas de disparo neuronal instantáneas promedio en la parte inferior. Las líneas punteadas horizontales indican la tasa de disparo neuronal promedio en todos los ensayos. La columna de la derecha muestra (en gris) la tasa de disparo neuronal instantánea media alineada a lamidos aislados. Las líneas

discontinuas verticales indican una ventana de tiempo entre $[-0,75s, 0,75s]$ alrededor del inicio del lamido: la curva de la tasa de disparo neuronal durante esta ventana temporal es la respuesta neuronal estimada por los lamidos, $RN^{lamidos}$. Los paneles inferiores muestran la actividad neuronal simulada esperada por la respuesta de lamido. Las simulaciones se obtuvieron mediante la convolución lineal de $RN^{lamidos}$ a partir de los eventos de lamido individuales a lo largo de los ensayos (más un desplazamiento de la frecuencia de disparo correspondiente a la frecuencia media de disparo neuronal a lo largo de los ensayos). Notar cómo la actividad simulada explica parcialmente las tasas de disparo neuronal instantáneas medias observadas que se muestran en la parte superior, lo que indica la presencia de modulaciones motoras en esta neurona. **C**, ejemplo de una neurona con señales de anticipación de recompensa que no pueden atribuirse a la actividad motora. Observar la ausencia total de actividad de disparo neuronal alrededor de los lamidos aislados, lo que da lugar a un $RN^{lamidos}$ plano y resulta en una actividad neuronal simulada que no recapitula la actividad neuronal observada.

Codificación neuronal: GLM

Para caracterizar la mezcla de variables sensoriales y comportamentales que modulan simultáneamente la actividad de las neuronas individuales de la PCx, implementamos un enfoque estadístico basado en un modelo lineal generalizado (GLM) de codificación neuronal de la familia *Poisson* (Park et al., 2014b; Pillow et al., 2008) (ver Figura 1.10; Materiales y Métodos).

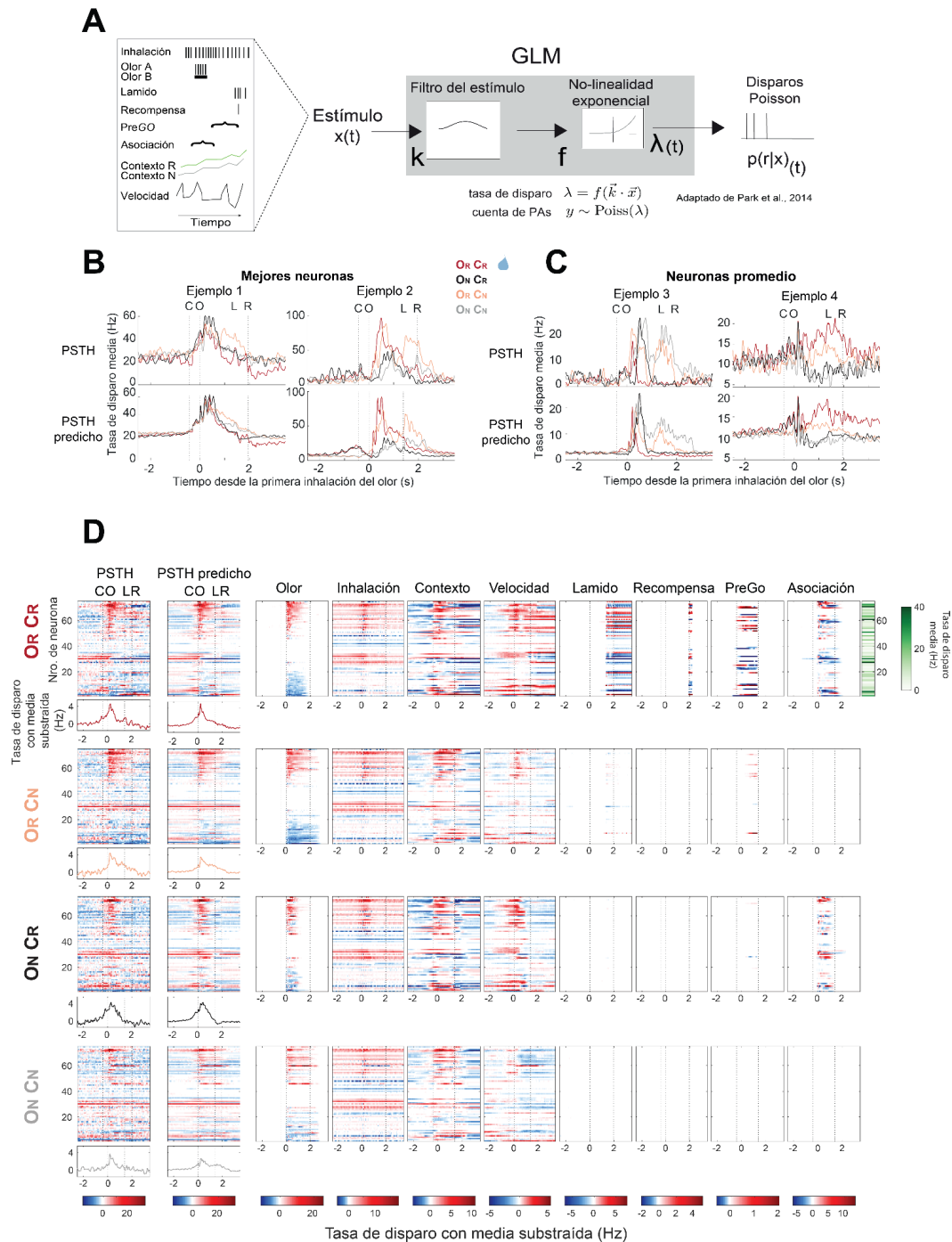


Figura 1.10: A, Esquema del modelo lineal generalizado (GLM) de codificación neuronal a nivel de neurona única y ensayo único. Ejemplos de histogramas de tiempo peri-estímulo (PSTH) y la predicción

del modelo del PSTH de dos ejemplos de las mejores neuronas (**B**) y las neuronas promedio (**C**) según cuán fielmente el modelo predijo la actividad observada. **D**, Modulaciones de las tasas de disparo inducidas por cada variable individual del modelo para un ejemplo de un animal experto. PSTH observado y predicho por el modelo con *kernels* ajustados para todas las neuronas. Los paneles de la derecha muestran las variaciones predichas de la tasa de disparo (alrededor de la tasa media de cada neurona) inducidas por cada variable del modelo (es decir, para modelos GLM que incluyen únicamente esa variable). Las neuronas fueron ordenadas según su respuesta promedio a los ensayos $O_R C_R$.

El modelo ajusta, a nivel de ensayo único y para cada neurona, la respuesta de disparo (variable en el tiempo) con respecto al momento y el valor de todas las variables de la tarea en simultáneo (ver Figura 1.10; Materiales y Métodos). De esta manera, se puede aislar la contribución individual a la actividad neuronal de cada una de las variables de la tarea (ver Figura 1.10.D). Para cada neurona, seleccionamos el modelo que contenía la combinación de estas variables que maximizan su rendimiento en la predicción de la actividad neuronal a partir de ensayos excluidos del procedimiento de ajuste (ver Figura 1.10; Materiales y Métodos). Al hacerlo, se infieren filtros lineales (*kernels*) que cuantifican las dependencias de las respuestas neuronales de cada variable (ver Figuras 1.10.D y 1.11). Las variables consideradas en nuestro modelo fueron sensoriales, motoras y cognitivas: olores; posición del animal en los contextos visuales; consumo de recompensa; inhalación; velocidad de locomoción; lamido; modulación de las respuestas olfativas por la presencia de un contexto recompensado, es decir, un filtro de la asociación; anticipación a la respuesta *GO*. También incluimos un filtro de sesgo (*bias*) para tener en cuenta las diferencias en la tasa de disparo basal de las neuronas.

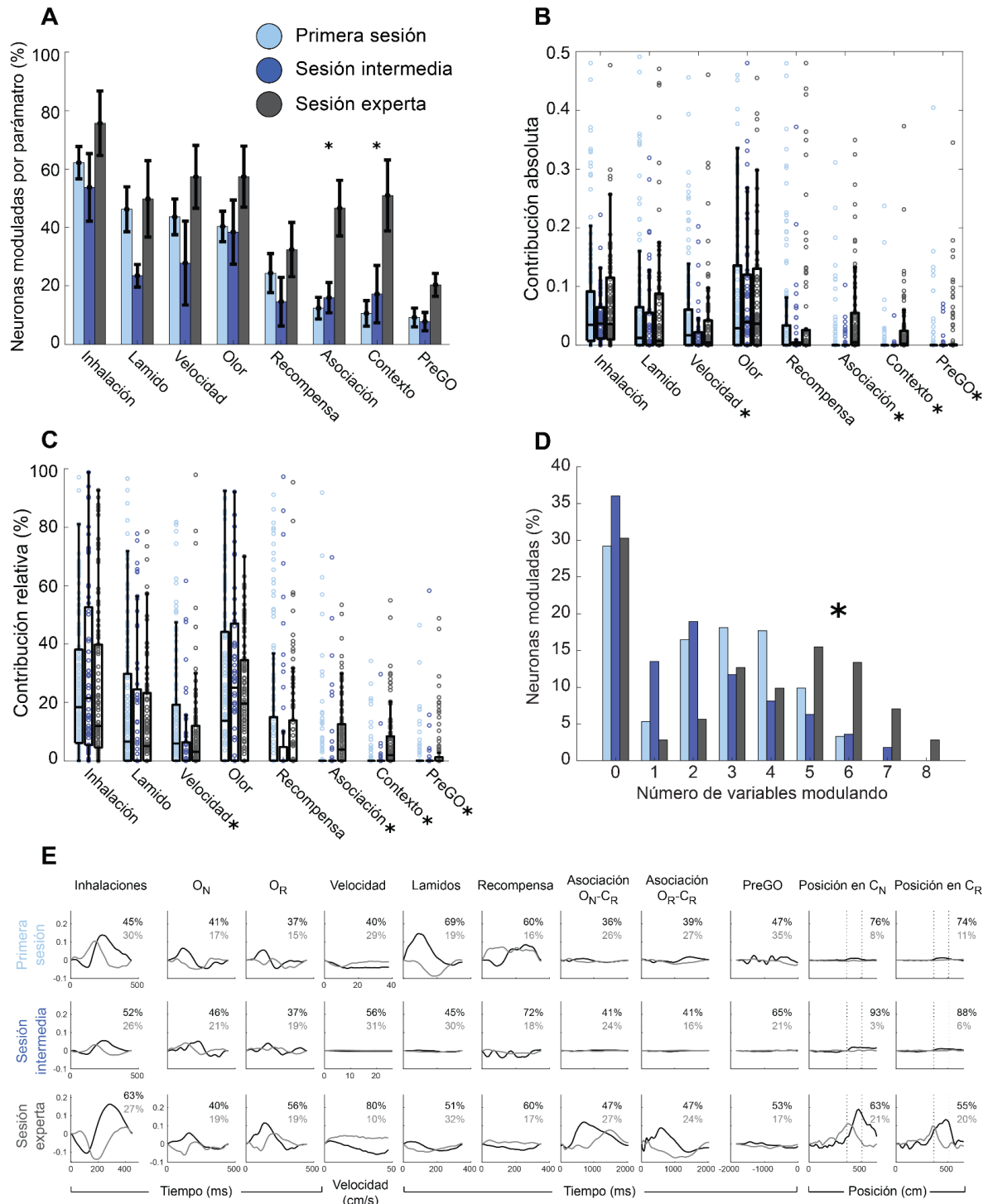


Figura 1.11: Resultados del modelo de codificación neuronal de la PCx utilizando animales de primera sesión (9 animales, 243 neuronas, celeste), sesión intermedia (4 animales, 111 neuronas, azul) y experta (5 animales, 142 neuronas, gris oscuro). **A**, porcentaje de neuronas moduladas por cada variable. **B**, *Boxplot* de la contribución absoluta (aumento de log-verosimilitud, *bits/disparo*) de cada variable al modelo. **C**, *Boxplot* de la contribución relativa (de forma tal que las contribuciones de todas las neuronas de un mismo grupo sumen 100%) de cada variable al modelo. Las variables incorporadas al modelo fueron: las inhalaciones, los lamidos, la velocidad de locomoción, la estimulación con olores, el consumo de la recompensa, la asociación dada por la modulación de las respuestas olfativas por la presencia de un

contexto recompensado, la posición del animal en los contextos visuales y la anticipación a la respuesta *GO* (PreGo), respectivamente. Los asteriscos muestran diferencias significativas entre la sesión experta y las dos restantes para las variables ‘Asociación’ y ‘Contexto’, y entre la sesión intermedia y las dos restantes para ‘Velocidad’. **D**, distribución del número de variables que modula la actividad de cada neurona. El asterisco muestra diferencias significativas entre la sesión experta y las dos restantes. **E**, Primer (negro) y segundo (gris) componente de PCA de los *kernels* pooleados para inhalación, olor sin recompensa y con recompensa (O_N y O_R), velocidad, lamido, recompensa, asociación del contexto recompensado con O_N y O_R , actividad previa a una decisión *GO* (PreGo) y posición en el corredor para ensayos de contexto sin recompensa y con recompensa (C_N y C_R). La varianza explicada por cada componente se indica en porcentajes, registros de la primera sesión (fila superior), de la sesión intermedia (fila central) y de animales expertos (fila inferior).

Los modelos ajustados revelan que las neuronas individuales de la PCx transmiten información sobre una diversidad de variables olfativas y no olfativas de distintas maneras, difiriendo en magnitud y dinámica temporal (ver Figura 1.11) (Federman et al., 2024). La actividad neuronal de los animales de primera sesión estuvo dominada por la inhalación, los lamidos, la velocidad y los filtros olfativos (ver Figuras 1.11, paneles A, B y C, barras celestes). A nivel de los filtros ajustados, el aprendizaje de la tarea va acompañado de dos características relevantes: el aumento significativo de la información asociativa (evidenciada por el filtro ‘Asociación’) y la incorporación de información de los contextos visuales (evidenciada por el filtro ‘Contexto’) en animales expertos (ver Figura 1.11). Las neuronas de los animales expertos fueron moduladas por un mayor número de parámetros que en las otras dos sesiones. Este aumento de la multiplexación o selectividad mixta luego del aprendizaje se confirmó estimando el porcentaje de neuronas moduladas por cantidad de variables (ver Figura 1.11.D; Kruskal-Wallis: p -valor<0,0001; comparación múltiple por Tukey-Kramer: primera-experta p -valor<0,005, intermedia-experta p -valor<0,0001, primera-intermedia p -valor=0.1), la contribución absoluta y relativa de las variables al modelo (ver Figuras 1.11, paneles B y C) y la amplitud de los filtros obtenidos (ver Figura 1.11, panel E) (Federman et al., 2024). Para todas estas cantidades, las neuronas de la sesión experta mostraron un mayor grado de codificación del contexto visual, asociación de las respuestas olfativas y contextuales (A) y actividad en anticipación a las respuestas *GO*. La modulación por velocidad resultó menor en la sesión intermedia que en la primera sesión y en animales expertos. No se encontraron diferencias significativas en el resto de las variables que modulan las neuronas de animales de primera sesión y

sesión intermedia. Todo esto muestra que, sólo luego del aprendizaje de la tarea, se incorporan respuestas de selectividad mixta a diferentes aspectos de la tarea conductual en las neuronas de la PCx. Notablemente, los animales de sesión intermedia, que aprendieron parte de la información posicional de la tarea (como dónde se encuentra la estimulación olfativa y dónde la zona de recompensa) y a discriminar entre los olores recompensado y no recompensado, mostraron un ‘estado’ de variables modulatorias de la PCx similar al de animales de primera sesión.

Nos preguntamos si el aprendizaje de la tarea reorganiza las neuronas de la PCx en nuevos grupos funcionales. Por un lado, hipotetizamos que las neuronas de selectividad mixta observadas luego del aprendizaje podían ser selectivas a cualquier combinación dada de variables, es decir, sin una preferencia particular. Por el otro, el aprendizaje podría promover patrones específicos de selectividad mixta compuestos por combinaciones particulares de variables. Para abordar esto, utilizamos un enfoque de agrupamiento (*clustering*) jerárquico para identificar conjuntos de neuronas con perfiles de modulación similares (ver Materiales y Métodos). El *clustering* de neuronas según la contribución relativa de variables que codifica (ver Figura 1.12) mostró que los perfiles de la primera sesión y de la sesión intermedia estaban dominados típicamente por variables únicas (ver Figura 1.12, paneles izquierdo y central, 61,2% y 76,9% de las células agrupadas, respectivamente) o pares de variables que incluían *clusters* de inhalación u olor (ver Figura 1.12, paneles izquierdo y central, columnas ‘Inhalación’ y ‘Olor’, 64,9% y 67,9% de las células agrupadas, respectivamente). Puede observarse que, en la sesión intermedia, surge un *cluster* dominado por olores que también es modulado por los lamidos (ver Figura 1.12, central, *cluster* superior de columna dominada por ‘Olor’), lo cual podría estar reflejando la asociación entre el olor recompensado y la respuesta *GO* aprendida (ver Figura 1.2, ‘Sesión intermedia’, curvas roja y rosada). Ahora bien, los *clusters* de neuronas de animales expertos fueron menos dominados por las inhalaciones y el 36,2% de las neuronas agrupadas fueron dominadas por olores y la influencia del contexto visual (C), olores y las modulaciones de las respuestas olfativas por el contexto recompensado (asociación, A), y olores junto con los lamidos (L) (ver Figura 1.12, panel derecho, columna dominada por ‘Olor’). Dado que en nuestros experimentos utilizamos animales diferentes para cada sesión de entrenamiento, no pudimos comparar las mismas neuronas en las distintas etapas del aprendizaje.

Entonces, las neuronas dominadas por olores antes del entrenamiento podrían haber adquirido la selectividad mixta después del aprendizaje o, por otro lado, podría haber surgido una nueva subpoblación de neuronas asociativas que codifique múltiples variables relacionadas con la tarea en animales expertos. En cualquier caso, este resultado muestra que la selectividad mixta adquirida en la PCx luego del aprendizaje involucraría, principalmente, neuronas dominadas por información olfativa.

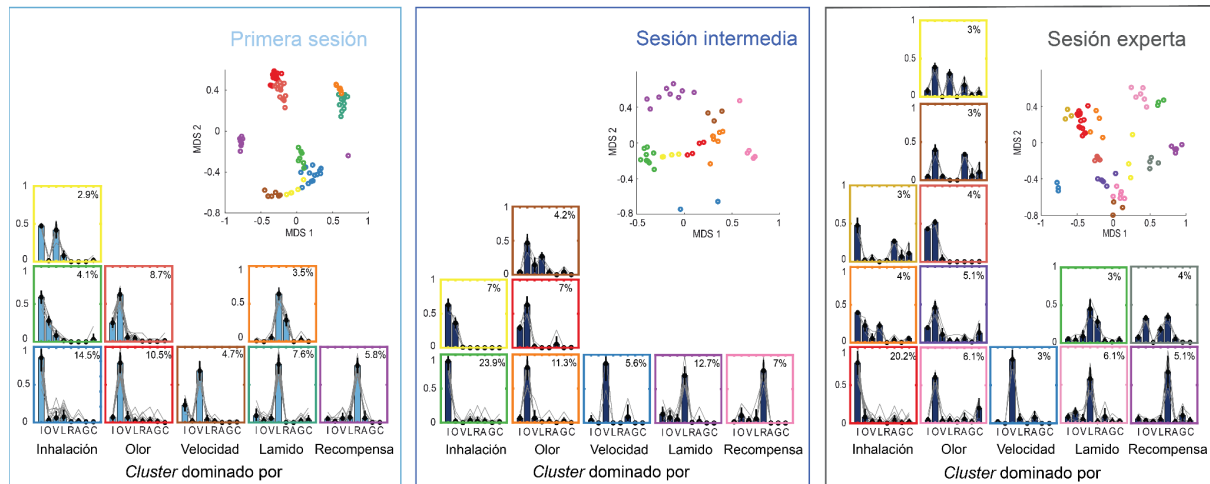


Figura 1.12: *Clustering* de neuronas ajustadas por el GLM ($n=243$, $n=111$ y $n=142$ para animales en la primera sesión, sesión intermedia y animales expertos, respectivamente) según la contribución relativa de cada variable. Los gráficos de barras dentro de los cuadrados de color representan la contribución relativa media de las variables a cada *cluster* individual (promedio $\pm$ desviación estándar). Las líneas grises muestran las neuronas individuales del *cluster*. Los porcentajes indican la proporción de neuronas incluidas en relación con la población total. Las columnas de los gráficos de barras están ordenadas según la variable dominante (indicada debajo de cada columna, I: inhalación, O: olor, V: velocidad, L: lamido, R: recompensa, A: modulación del olor por el contexto (asociación), G: modulación PreGO, C: contexto). El recuadro superior derecho muestra la proyección del escalado multidimensional (MDS) de estos datos. Cada punto es una neurona codificada por color según su *cluster*, y las neuronas con contribuciones relativas similares ocupan regiones similares del plano MDS.

Decodificación neuronal

Luego, nos preguntamos si la selectividad mixta tiene consecuencias funcionales, afectando la cantidad de información sensorial que transmiten las neuronas de la PCx. Para ello, utilizamos los modelos GLM ajustados y la actividad neuronal observada de la PCx para decodificar (a nivel de clasificación) la identidad de los olores y los contextos en cada ensayo (ver Materiales y Métodos).

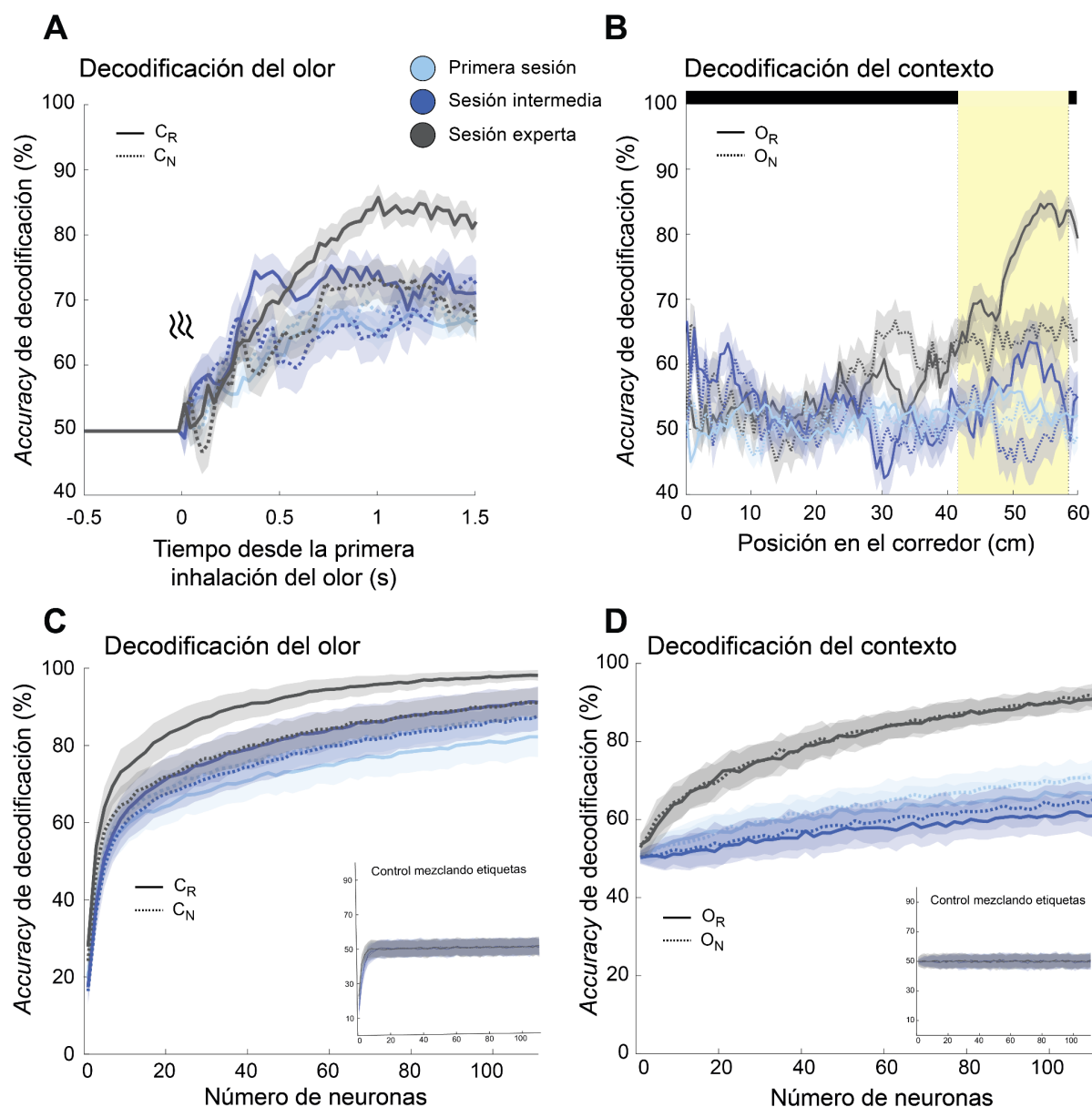


Figura 1.13: Decodificación, ensayo a ensayo, de la identidad del olor (**A y C**) y el contexto (**B y D**) a partir de los modelos GLM ajustados sobre la actividad neuronal de animales de primera sesión (celeste), sesión intermedia (azul) y animales expertos (gris). Se grafican los valores medios (línea) con el error estándar (sombreado) de la *accuracy* de decodificación las categorías binarias (olor recompensado frente a no recompensado, contexto visual recompensado frente a no recompensado, respectivamente) en función del

tiempo desde la primera inhalación del olor (**A**), la posición en el corredor (**B**) y el tamaño de la población de neuronas utilizada para la decodificación (**C** y **D**). En **C** se estimó la *accuracy* de decodificación 0,8 s después de la primera inhalación del olor, mientras que en **D** se estimó aproximadamente a los 44 cm del corredor virtual, dentro del contexto pero previo a la primera inhalación del olor. Las curvas continuas fueron construidas únicamente con ensayos de contexto recompensado (C_R , 'Decodificación del olor') y olor recompensado (O_R , 'Decodificación del contexto'), mientras que las discontinuas con ensayos de contexto no recompensado (C_N , 'Decodificación del olor') y olor no recompensado (O_N , 'Decodificación del contexto'). El parche amarillo corresponde a la posición en la que los animales se encuentran dentro del contexto visual. El número de ensayos utilizados para el ajuste del modelo y el análisis de decodificación se igualó entre los diferentes tipos de ensayos. *Insets*: controles realizando los mismos análisis pero con las etiquetas mezcladas.

En línea con los resultados anteriores, mientras que la actividad ensayo a ensayo de las neuronas de animales expertos (curva gris) permite decodificar la identidad de los olores y los contextos visuales, la de animales de primera sesión (curva celeste) y sesión intermedia (curva azul) solo permite decodificar información sobre los olores (ver Figura 1.13). La decodificación de la información contextual se realizó para cada posición del pasillo, lo cual permitió revelar que, para animales expertos, la identidad del contexto se logra decodificar sólo cuando los ratones se acercan al parche de color, viendo las claves visuales a la distancia (ver Figura 1.13.B).

Aunque se pudo decodificar la identidad del olor a partir de la actividad de la PCx tanto de animales expertos como de los de primera sesión y sesión intermedia, la decodificación del olor en los animales expertos alcanzó una mayor *accuracy* y requirió un menor número de neuronas que en etapas anteriores del aprendizaje (ver Figuras 1.13, A y C). Además, la identidad del olor en los animales expertos se descodificó mejor en los ensayos en los que la discriminación correcta del olor daba lugar a una recompensa, es decir, cuando el olor se presentaba en el contexto visual recompensado (ver Figuras 1.13, A y C, curva gris continua). Estos resultados muestran que la modulación contextual aprendida en la PCx mejora la calidad/disponibilidad de la información olfativa durante los momentos en que la discriminación de olores cobra importancia desde el punto de vista comportamental.

Por último, nos preguntamos por la naturaleza del proceso subyacente a la mejora en la capacidad de decodificación olfativa a partir de las neuronas de la PCx luego del

aprendizaje. Por un lado, hipotetizamos que podría tratarse de un proceso de aprendizaje perceptual (Gilbert et al., 2001; Wilson & Stevenson, 2003), es decir, que se produjera un aumento en la capacidad de decodificación por la sola presentación repetitiva de los estímulos olfativos a lo largo del entrenamiento. Por el otro, podría tratarse de un proceso asociativo, es decir, que la mejora se produjese únicamente al aprender la asociación entre la información olfativa y contextual. Encontramos que en los animales que fueron entrenados y ya aprendieron a discriminar olores pero no aún contextos (sesión intermedia), los niveles de decodificación olfativa resultaron similares a los de animales de primera sesión, manteniéndose por debajo de los niveles de animales expertos (ver Figuras 1.13, A y C, curvas azul y celeste contra gris, respectivamente). Así mismo, los niveles de decodificación de animales expertos en los ensayos de contexto no recompensado fueron similares a los de sesión intermedia y primera sesión (ver Figuras 1.13, A y C, curva gris discontinua contra curvas azul y celeste, respectivamente). Entonces, la mejora en la capacidad de decodificación olfativa en la PCx está dada por un proceso de aprendizaje asociativo, y no por uno de aprendizaje perceptual.

El hecho de que podamos decodificar mejor información de olores y contextos no implica que el animal use eso para mejorar su comportamiento. Nos preguntamos entonces si una mejora en la decodificación de la asociación olor-contexto se traduce en un mejor rendimiento comportamental. Para responderlo, usamos los modelos de GLM para calcular la probabilidad posterior (dados los potenciales de acción observados, PAs) que el modelo asigna a la decodificación de O_R y C_R , $p(O_R|PAs)$ y $p(C_R|PAs)$, respectivamente, para cada ensayo a los 0,5s después de la primera inhalación del olor (ver Materiales y Métodos). Luego, estudiamos si el retraso en la respuesta del animal (tiempo de reacción de lamido en los ensayos *GO* y tiempo de salida del contexto en los ensayos *NO GO*) estaba asociado a estas probabilidades de decodificación (ver Figura 1.14). Para ello, realizamos una regresión lineal múltiple del retraso de la respuesta comportamental en función de los predictores $p(O_R|PAs)$, $p(C_R|PAs)$ y el término de interacción $p(O_R|PAs)p(C_R|PAs)$, que resultó en un efecto significativo de la interacción (*F-test* de significancia global para el término de interacción: $p=0,03$ para ensayos *GO*, $p=0,02$ para ensayos *NO GO*). El término de interacción cuantifica la representación de la combinación recompensada de estímulos en la PCx. De hecho, las respuestas

comportamentales en los ensayos *GO* (es decir el tiempo de reacción de un lamido) son más rápidas cuando la combinación recompensada está mejor representada (ver Figura 1.14, panel izquierdo). Por el contrario, la respuesta conductual en los ensayos *NO GO* (salida del contexto hacia el siguiente ensayo) fue más rápida cuando la representación de la combinación recompensada era peor (ver Figura 1.14, panel derecho). En general, estos resultados respaldan que el grado en que la asociación $O_R C_R$ se codifica en la PCx se traduce en rendimiento de discriminación comportamental.

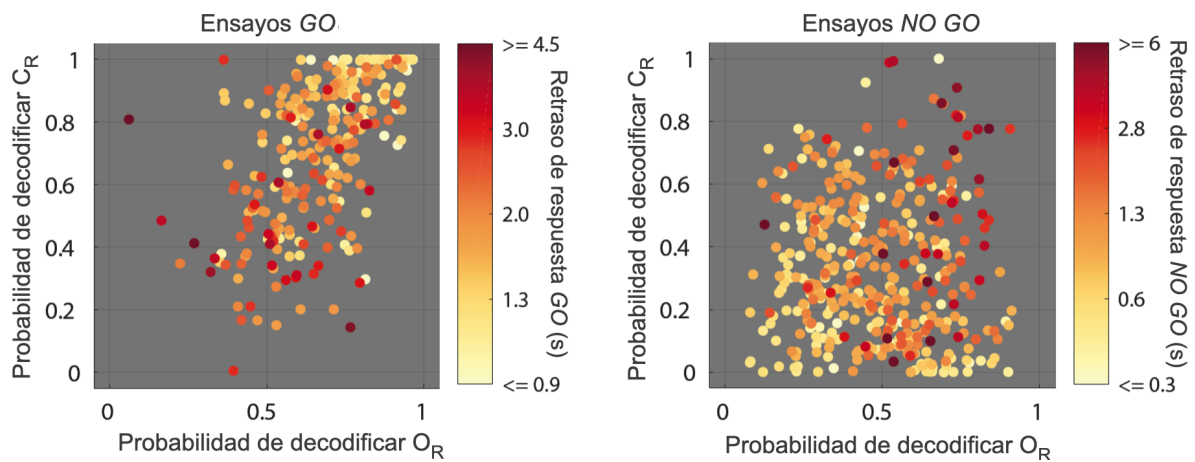


Figura 1.14: Retraso de las respuestas comportamentales en los ensayos *GO* (panel izquierdo) y *NO GO* (panel derecho) en función de la probabilidad de decodificación O_R , $p(O_R|PAs)$, y la probabilidad de decodificación C_R , $p(C_R|PAs)$. En los ensayos *GO* la respuesta comportamental corresponde al primer lamido después de la primera inhalación del olor, mientras que en los *NO GO* corresponde a la salida de la zona del contexto. Los datos provienen de animales expertos.

Nota: parte de los resultados de esta parte de la tesis fueron publicados en Federman et al., 2024.

Discusión - Parte 1

En la primera parte de esta tesis nos propusimos evaluar cómo el aprendizaje de una asociación entre olores, contextos visuales y recompensas modifica el comportamiento y las respuestas de los circuitos corticales olfativos de la corteza piriforme. Encontramos que los animales aprenden la tarea de forma secuencial, primero discriminando los olores y luego los contextos, adaptando sus comportamientos de lamido, locomoción y olfateo con esta misma dinámica. Demostramos que el aprendizaje de la asociación entre olores, contextos y recompensas induce una reorganización de las contribuciones de las variables sensoriales y comportamentales en las neuronas de la PCx, incorporando información del contexto visual espacial y la asociación entre olores y contextos, corroborado a nivel poblacional (Figura 1.7), de neurona única (Figura 1.8) y de los filtros ajustados al modelo de codificación GLM (Figura 1.11). El análisis de decodificación neuronal mostró que solo es posible decodificar la información contextual en la PCx luego del aprendizaje de la tarea (Figura 1.13, B y D) y que la presencia de esta calidad de información genera una mejora en la discriminación de olores (Figura 1.13, A y C), aportando un aspecto funcional a la presencia de dicha información en esta corteza sensorial 'primaria'. En esta misma línea, encontramos que el grado en el que la asociación recompensada está codificada en la PCx se traduce en rendimiento comportamental (Figura 1.14). Por último, mostramos que la capacidad de decodificación de olores utilizando la actividad neuronal de animales expertos en ensayos de contexto no recompensado (Figura 1.13, A y C, curva gris discontinua) es similar a la de animales de primera sesión (Figura 1.13, A y C, curvas celestes) y distinta de los animales expertos utilizando ensayos de contexto recompensado (Figura 1.13, A y C, curva gris continua). Esto evidencia que el proceso subyacente a la mejora en la decodificación de olores es de naturaleza asociativa y no puede ser explicado por uno de aprendizaje perceptual.

Los cambios plásticos producidos en el cerebro por procesos de aprendizaje están muy vinculados a ventanas de excitación aumentada, susceptibles a potenciaciones de largo término, en los circuitos locales de las regiones involucradas, lo cual suele tener como sustento un proceso de desinhibición (Froemke, 2015; Letzkus et al., 2015). Ejemplos de este proceso plástico son los encontrados en el hipocampo (Donato et al., 2013;

Ogando et al., 2021) y en las cortezas auditiva (Letzkus et al., 2011) y olfativa (Canto-Bustos et al., 2022). También se encontró que, luego de esta excitación aumentada, es necesaria una ventana de plasticidad inhibitoria rápida para equilibrar el sistema, demostrando que la inhibición no es estática (Vogels et al., 2011). Particularmente en la corteza piriforme, se vio que, al entrenar ratas en una tarea de discriminación olfativa compleja, sucede una potenciación de la inhibición a largo plazo (iLTP, por sus siglas en inglés), es decir, un aumento persistente, de al menos 3 días, en la fuerza de las sinapsis inhibitorias (Ghosh et al., 2015). En esta tesis encontramos, al estudiar la actividad neuronal de la corteza piriforme durante las tres sesiones de entrenamiento, que los animales de sesión intermedia, el estadio en el que cerebro se encuentra en pleno proceso plástico de aprendizaje, presentan neuronas con tasas de disparo promedio a lo largo de la tarea significativamente menores que en la primera sesión (donde apenas están comenzando a probar la tarea) y en la sesión experta (donde ya sucedió gran parte del proceso de aprendizaje) (Figura 1.5; Figura 1.6.B, 'Tasas de disparo media'), lo cual también se acompaña de una disminución de respuestas inhibitorias frente a las estimulaciones olfativas (Figura 1.6.B, ver mapas de color y análisis de componentes principales). Los animales de sesión intermedia se registraron al día siguiente de aprender la discriminación de olores (Figura 1.1.D). Sugerimos, entonces, que la PCx de los animales en sesión intermedia puede estar siendo dominada por un tono inhibitorio persistente a largo plazo, como los reportados previamente, consistente con días posteriores a un proceso de aprendizaje (Ghosh et al., 2015). Dicho aumento del tono inhibitorio explicaría la disminución de la tasa de disparo media y, a su vez, la reducción de respuestas olfativas inhibitorias (es decir, la reducción de las variaciones negativas de tasa disparo con respecto a la tasa media) en neuronas que ya están tónicamente inhibidas.

La integración de información sensorial, comportamental y contextual en las instancias iniciales del procesamiento cortical olfativo, como las que observamos en nuestros experimentos de PCx, ofrece potenciales ventajas: en vez de funcionar como un sitio de relevo de información olfativa aislada para su posterior procesamiento en las cortezas asociativas de alta jerarquía, la integración temprana en la corteza olfativa primaria podría habilitar la formación de representaciones olfativas estado-dependientes,

permitiendo que los animales generen un procesamiento flexible según la demanda comportamental actual (Khan & Hofer, 2018).

Un ejemplo claro de una ventaja de esta configuración yace en la imposición que genera el comportamiento inhalatorio al procesamiento olfativo: los odorantes interactúan con los receptores olfativos de forma cíclica y variable en el tiempo (Carey et al., 2009; Shusterman et al., 2011; Verhagen et al., 2007). Esto lleva a que la concentración de los olores fluctúe y complejice su procesamiento. El cerebro puede resolver estas ambigüedades integrando la información sobre los ciclos de olfateo con los datos sensoriales, dando sentido a la variabilidad observada en la actividad neuronal a partir de la frecuencia y la amplitud del olfateo (Jordan et al., 2018; Shusterman et al., 2018). En este sentido, para hacer inferencias precisas sobre el entorno externo, el cerebro debe corregir dónde y cómo se mueven los sensores, y las señales relacionadas con el movimiento podrían permitir a las áreas sensoriales calcular dichas correcciones (Parker et al., 2020).

Siguiendo esta misma línea argumental, la corteza piriforme es un centro de integración de información, donde las respuestas neuronales a olores son moduladas por la fase en el ciclo respiratorio (Shusterman et al., 2011), por la expectativa (Zelano et al., 2011) y el estado interno de los animales (Soria-Gómez et al., 2014), mostrando que múltiples aspectos del contexto (en su definición más amplia) comportamental, y no únicamente a aspectos olfativos, afectan su procesamiento. De hecho, como se mencionó previamente, también es posible encontrar mapas espaciales en la PCx (Poo et al., 2022). Muy de la mano con los descubrimientos previos, en esta tesis encontramos que se produce una reorganización de las variables comportamentales y sensoriales que modulan la actividad de la PCx, y que esta reorganización sucede únicamente después del aprendizaje de la tarea. En otras palabras, el proceso de aprendizaje estaría transformando a la PCx: pasaría de actuar como una corteza sensorial primaria clásica (Adrian, 1942; Hubel & Wiesel, 1962, 1977; Marshall et al., 1941; Merzenich et al., 1973), más vinculada a su *hardware* y función olfativa, a una corteza asociativa (Johnson et al., 2000) que procesa los olores como objetos perceptuales olfativos en función de su coyuntura comportamental (Gottfried, 2010).

Este tipo de integración holística trae aparejadas dos características fundamentales. La primera es que las representaciones neuronales son de alta dimensionalidad (Rigotti et al., 2013). Esto habilita un amplio conjunto de relaciones de entrada-salida del sistema, generando mejores clasificaciones al desambiguar las variables de interés. Se vio, por ejemplo, que la dimensionalidad de la representación neuronal de la corteza prefrontal sigue precisamente el desempeño comportamental de monos realizando una tarea de memoria, presentando baja dimensionalidad en ensayos incorrectos y alta dimensionalidad en los correctos (Rigotti et al., 2013). Estas representaciones suelen pensarse como un espacio N-dimensional donde cada eje es la tasa de disparo de una de las N neuronas y cada situación vivida por el animal (dada por los estímulos sensoriales, las variables comportamentales y contextuales) se expresa con un vector N-dimensional con un valor por cada eje (Rigotti et al., 2013). La dimensión real del problema es la cantidad mínima de ejes necesarios para representar todos los posibles puntos en el espacio de tasas de disparo (Fusi et al., 2016). Si todas las neuronas están totalmente correlacionadas, la representación se colapsa en 1 sólo dimensión (1 sólo grado de libertad). Para ejemplificarlo de forma caricaturesca podemos pensar en una representación dada por 3 neuronas que responden linealmente al mismo atributo: la concentración de los odorantes. Este sería un caso de 1 sólo grado de libertad. Si ahora quiero usar la actividad neuronal para clasificar entre la identidad de dos odorantes (por ejemplo, etil butirato e isoamil acetato), no importa cuántas mediciones tenga de la actividad de estas neuronas, nunca voy a poder resolverlo (sólo podría distinguir entre algo muy concentrado y algo poco concentrado). Si, en cambio, las 3 neuronas respondieran a 3 atributos independientes (identidad, concentración y ubicación del odorante), podríamos representar (y probablemente clasificar a partir de su actividad) un mayor número de situaciones. Este último es un escenario de alta dimensionalidad.

La segunda característica fundamental de este tipo de integración, ahora a nivel de neurona única, es la presencia de neuronas de selectividad mixta que codifican múltiples variables estadísticamente independientes, siendo lineal si su actividad se puede expresar como una suma pesada o no-lineal en el caso contrario (Fusi et al., 2016; Kaufman et al., 2022; Tye et al., 2024). En el ejemplo del párrafo anterior cada neurona era específica para un atributo (concentración), es decir, sin selectividad mixta. Si, en el segundo caso, cada neurona fuese una combinación no-lineal distinta de 3 atributos,

estaríamos en un caso de selectividad mixta no-lineal. En general, las representaciones de máxima dimensionalidad están fuertemente vinculadas a una diversidad de neuronas con selectividad-mixta no-lineal que garanticen una amplia cobertura del espacio de respuestas posibles (Fusi et al., 2016; Kaufman et al., 2022; Tye et al., 2024). De hecho, a partir de este tipo de neuronas es posible decodificar información específica de atributos únicos (como la concentración de un determinado odorante) sin que exista en la población una neurona específica para ese tipo de información (Fusi et al., 2016; Kaufman et al., 2022; Tye et al., 2024).

La selectividad-mixta fue bien documentada en regiones de alta jerarquía de procesamiento, como la corteza prefrontal (Aoi et al., 2020; Fusi et al., 2016; Helfrich & Knight, 2019) y el hipocampo (Eichenbaum, 2017), pero poco se sabe del impacto en los cómputos de las cortezas sensoriales primarias. En esta tesis encontramos que una de las características distintivas de la reorganización de las modulaciones de la PCx por el aprendizaje es la adquisición de selectividad mixta (Figura 1.11), principalmente sobre las neuronas olfativas de la PCx (Figura 1.12). Especulamos, entonces, que estas neuronas estarían favoreciendo la construcción de representaciones olfativo-contextuales de alta dimensionalidad en la PCx, habilitando el procesamiento de olores de forma estado-dependiente y flexible según la demanda comportamental actual. En este sentido, la PCx podría facilitar la separabilidad de los estímulos al reducir la superposición de las representaciones olfativas, promover la discriminación y evitar la generalización del mismo olor en diferentes contextos, lo cual es relevante para el correcto desempeño de la tarea. De hecho, una evidencia a favor de esta hipótesis es que encontramos cambios dinámicos en la decodificación de olores según la demanda comportamental: al utilizar los ensayos de contexto recompensado es posible discriminar más precisamente los olores que al utilizar los ensayos de contexto no recompensado (Figura 1.13, A y C). Un trabajo realizado en humanos, publicado muy recientemente, también evidenció este proceso de selectividad mixta, mostrando que las neuronas individuales de la PCx integran información visual y olfativa para representar el concepto del estímulo ('banana', por ejemplo), respondiendo tanto al olor, la imagen y el nombre escrito 'banana' (Kehl et al., 2024). Sería interesante investigar más a fondo si estos esquemas de codificación no lineales y lineales pueden coexistir en el PCx dependiendo del estado del animal y del nivel de aprendizaje.

Por último, la dificultad de la tarea podría desempeñar un papel importante en cuanto al tipo de información que se representa en la PCx. El entorno de realidad virtual permite que los animales operen sobre la dinámica de presentación de estímulos y recompensas, habilitando un nivel de compromiso y participación cognitiva diferente al que se obtiene con tareas asociativas de recompensa olfativa más simples, en las que no se observaron señales de recompensa en la PCx (Daniel J. Millman & Venkatesh N. Murthy, 2020; Wang et al., 2020). Sin embargo, otros han descubierto que el aprendizaje perceptivo modula la capacidad de discriminación de mezclas de olores complejas en la actividad de la PCx (Chapuis & Wilson, 2011; Shakhawat et al., 2014), por lo que se la ha propuesto como un centro de aprendizaje perceptual (D. A. Wilson & Stevenson, 2003). También se mostró la presencia de información asociativa y de valencia en la PCx durante aprendizajes con contingencias olor-recompensa (Calu et al., 2007; Gire et al., 2013; Ottenheimer et al., 2023; Roesch et al., 2007). En esta tesis demostramos que el proceso subyacente a la mejora en la decodificación de olores es de naturaleza asociativa y no puede ser explicado por mero aprendizaje perceptual, evidenciando más aún la plasticidad y versatilidad de las representaciones de la PCx.

Concluimos que la información contextual adquirida luego del aprendizaje asociativo de la tarea mejora la capacidad de discriminar olores en la PCx de forma dinámica y estado-dependiente ¿Qué gatilla la aparición de información contextual en esta región olfativa? En la segunda parte de esta tesis vamos a ahondar en el mecanismo subyacente a este proceso.

Parte 2: Evaluación de mecanismos asociativos responsables de la adquisición de la codificación mixta en la corteza piriforme

Hasta acá, mostramos cómo el aprendizaje de una asociación entre olores, contextos visuales y recompensas modifica secuencialmente el comportamiento y las respuestas de los circuitos de la corteza piriforme. En esta misma línea, vimos que la información contextual y de asociación entre olores y contextos sólo emerge de forma robusta en la PCx de animales expertos en la tarea. Hipotetizamos, entonces, que la información contextual en esta corteza primaria olfativa emerge si:

- H_0 : los animales aprenden a discriminar contextos.
- H_1 : los animales aprenden a asociar específicamente la información olfativa a la contextual.

En el primer caso (H_0), basta con la presencia de olores durante la tarea y el aprendizaje de contextos para que la información contextual aparezca en la PCx. En el segundo caso (H_1), se necesita una contingencia asociativa entre los estímulos olor-contexto para que se observe una modulación contextual de las respuestas de la PCx. Para probar cuál de las dos hipótesis subyace al mecanismo de interés, en esta segunda parte utilizamos un protocolo de entrenamiento muy similar al previamente descrito pero rompiendo la asociación específica entre la información olfativa y contextual: los animales recibieron los mismos dos olores y en los mismos dos contextos pero sólo la identidad del contexto predijo la recompensa. En este sentido, en este nuevo protocolo la experiencia sensorial es la misma que la del protocolo anterior, cambiando solo los tipos de ensayos que son recompensados: 2 tipos de ensayo fueron recompensados (cualquiera de los dos olores en el contexto recompensado, $O_A C_R$ y $O_B C_R$) y los otros dos no lo fueron (cualquiera de los dos olores en el contexto no recompensado, $O_A C_N$ y $O_B C_N$) (ver Figura 2.1.A y 2.1.B; ver Materiales y Métodos). Bajo este nuevo protocolo de entrenamiento esperamos no encontrar información contextual en la PCx de animales expertos si se cumple H_1 y encontrarla si se cumple H_0 .

Análisis comportamental

Con el objetivo de estudiar cómo los ratones aprenden la nueva tarea sin asociación entre olores y contextos, los entrenamos durante 7 días con el protocolo recién descrito. Encontramos que los animales aprenden esta tarea más velozmente que al entrenarlos con la asociación de estímulos, alrededor del cuarto día de entrenamiento, lo cual se evidencia en un aumento del índice d' hasta llegar al valor de *expertise* de 3,2 y una disminución en el sesgo a realizar lamidos (es decir, una tendencia a 0 en el valor de *criterion*) (ver Figura 2.1.C). Este resultado nos pareció razonable, dado que en este caso tienen que aprender a discriminar únicamente entre contextos visuales (y no asociaciones de estímulos). Dado que en esta tarea no había una respuesta esperada para cada olor, no nos pareció correcto calcular los índices discriminación de olores y contextos por separado.

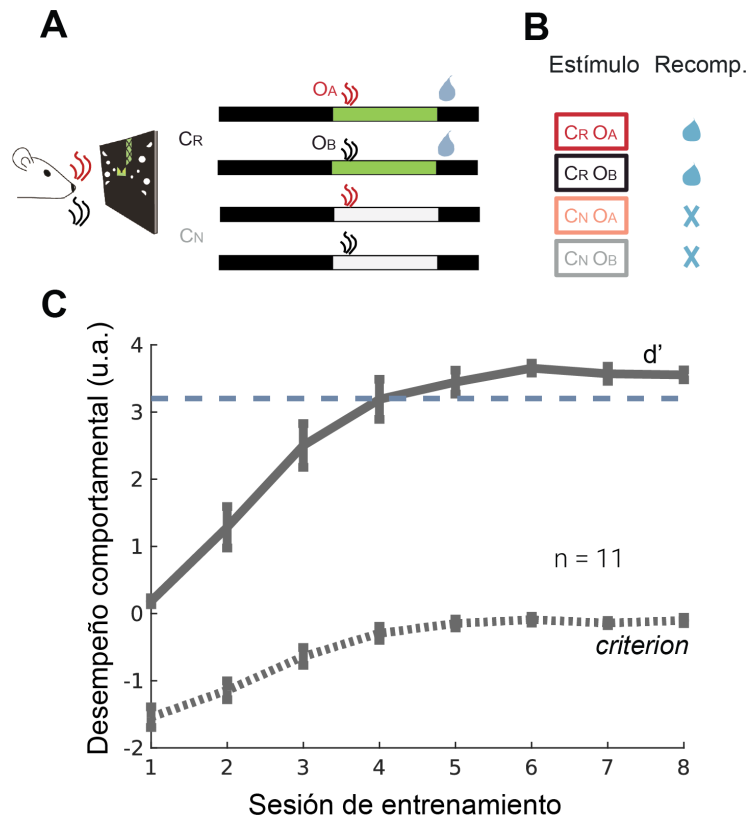


Figura 2.1: A, esquema del protocolo de entrenamiento sin asociación entre olores y contextos. B, clasificación de ensayos según combinación de estímulos (O: olor; C: contexto; R: recompensado; N: no recompensado; A: identidad del primer olor; B: identidad del segundo olor). C, desempeño comportamental en la tarea sin asociación entre olores y contextos a lo largo de las sesiones de entrenamiento. La curva continua muestra el índice d' y la discontinua el *criterion*. Se muestra el desempeño comportamental unificado para los 4 tipos de ensayo. Se utilizaron 11 animales para construir esta figura.

Como el objetivo de esta parte de la tesis era aproximarse al mecanismo por el cual se hace evidente la información contextual en la corteza piriforme, pusimos el foco en estudiar animales expertos (y no tanto la dinámica del aprendizaje de la tarea). Encontramos que las variables comportamentales medidas (tasa de lamidos, velocidad de locomoción y tasa de inhalación) son adaptadas a la nueva tarea luego del aprendizaje de la misma.

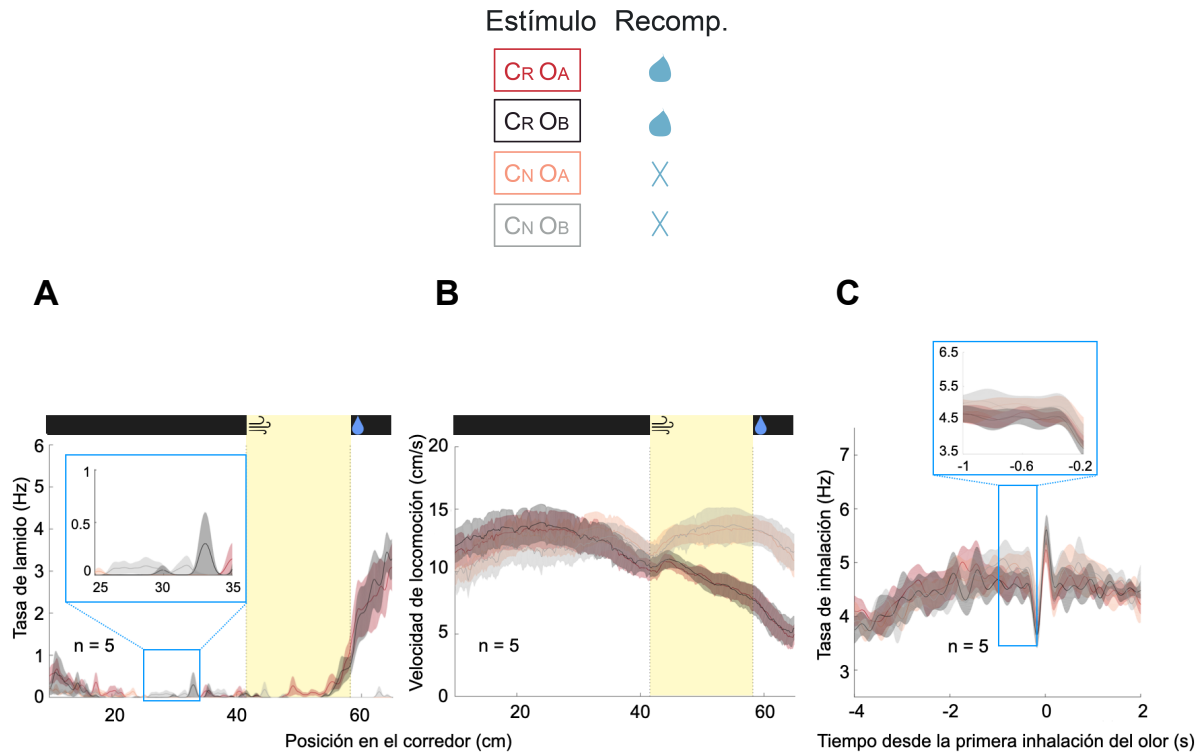


Figura 2.2: Tasa de lamido (A) y velocidad de locomoción (B) a lo largo de la posición en el corredor virtual, y tasa de inhalación (C) fijada a la primera inhalación del olor, para animales expertos en la nueva tarea sin asociación entre olores y contextos. Cada curva corresponde a un tipo de ensayo: roja, para ensayos de olor A y contexto recompensado ($O_A C_R$); negra, para olor B y contexto recompensado ($O_B C_R$); rosada, para olor A y contexto no recompensado ($O_A C_N$); gris, para olor B y contexto no recompensado ($O_B C_N$). El parche amarillo indica la posición en la que los animales están dentro del contexto visual. Nótese que la identidad del olor sigue estando definida por la gama de color (rojiza contra grisasea) y la del contexto por la intensidad dentro de cada color (oscuro contra pastel). El recuadro del panel izquierdo corresponde a una ampliación de la región del corredor virtual comprendida entre 25 y 35 cm, previa a la entrada al contexto visual. El recuadro del panel derecho corresponde a una ampliación del segundo anterior a percibir el olor.

Para caracterizar con más detalle cómo cambia el comportamiento con el aprendizaje de la nueva tarea, cuantificamos las mismas 3 variables comportamentales que en la primera parte: la tasa de lamidos, la velocidad de locomoción y la tasa de inhalación. Al

igual que los expertos en la tarea original, estos animales no lamieron a lo largo del corredor para ningún tipo de ensayo, mostrando que aprendieron la locación de la zona de recompensa (ver Figura 2.2.A, recuadro), y realizaron lamidos anticipatorios únicamente para los ensayos recompensados (ver Figura 2.2.A, curvas roja y negra).

En cuanto a la locomoción, redujeron la velocidad al acercarse al ingreso del contexto visual para todos los tipos de ensayo (ver Figura 2.2.B, previo a la entrada del contexto). Llamativamente y contrastando con la tarea anterior, sólo luego de ingresar al contexto y recibir la estimulación olfativa, los animales modificaron su velocidad según el tipo de ensayo: aceleraron en los ensayos no recompensados (curvas rosada y gris) y redujeron su velocidad en los recompensados (curvas roja y negra).

Por último, encontramos que estos animales no aumentaron su tasa de inhalación de forma anticipatoria a la estimulación olfativa, marcando una clara diferencia con los expertos de la tarea original (ver Figura 2.2.C, recuadro).

Estos resultados muestran que los animales adaptan su comportamiento según la demanda de la tarea en cuestión. Particularmente para esta tarea, lo hacen de forma liderada por las claves visuales del contexto, dando poca importancia a los estímulos desvinculados a la recompensa, es decir, a los olores.

Respuestas neuronales

Para evaluar si el protocolo de entrenamiento afecta la modulación contextual de la actividad neuronal de la PCx, realizamos registros electrofisiológicos agudos de la actividad neuronal de dicha región en animales expertos en los protocolos con (142 neuronas de 5 animales, 28 ± 18 neuronas por animal; media $\pm$ desvío estándar) y sin (148 neuronas de 11 animales, 14 ± 8 neuronas por animal; media $\pm$ desvío estándar) asociación de olores y contextos. Se utilizó el mismo abordaje que en la primera parte y, tanto para animales con como sin asociación O-C, se hizo el registro de actividad neuronal alrededor del séptimo día de entrenamiento. Se encontraron diferencias significativas entre las tasas de disparo de los dos protocolos (*test* de suma de rangos de Wilcoxon: p -valor $<0,05$), resultando mayores las del protocolo sin asociación de olores y contextos, mostrando una PCx más activa o, tal vez, más desinhibida (ver Figura 2.3.A). Particularmente, la subpoblación neuronal de entre 5 y 20 Hz (Figura 2.3.B) se vio enriquecida en el protocolo sin asociación O-C, consistente con las interneuronas *narrow-spiking* reportadas previamente (Poo & Isaacson, 2009).

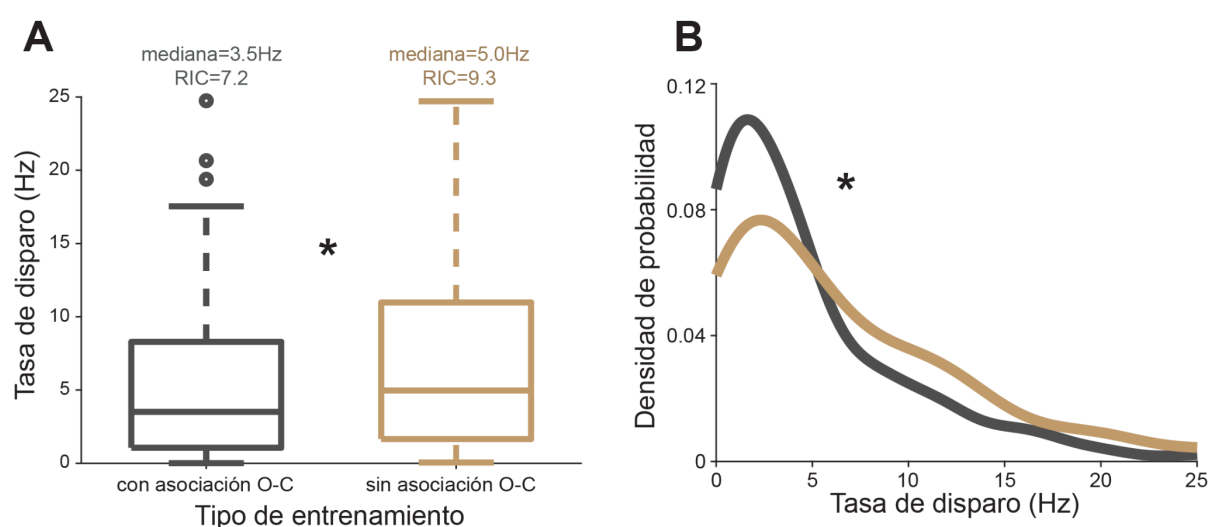


Figura 2.3: Distribución de las tasas de disparo de las neuronas registradas en animales expertos de los protocolos con (gris) y sin (marrón) asociación entre olores y contextos. **A**, *boxplots* de las tasas de disparo neuronal donde se explicita la mediana y el rango intercuartílico (RIC) de cada distribución. **B**, estimación de densidad de probabilidad por *kernels* (KDE, por sus siglas en inglés) de las tasas de disparo neuronal. Se encontraron diferencias significativas (mostradas por asteriscos) entre las distribuciones (*test* de suma de rangos de Wilcoxon: p -valor $<0,05$).

Con el fin de visualizar la actividad de todas las neuronas registradas para ambos protocolos de entrenamiento, y al igual que en la primera parte, se generaron mapas de color del cambio en la tasa de disparo respecto del basal alineado a cada posición relacionada a eventos importantes de la tarea (ver Figura 2.4). Para ambos protocolos de entrenamiento, las neuronas de la PCx mostraron típicas respuestas vinculadas al inicio de la inhalación del olor (ver Figura 2.4, actividad alrededor de 'O'). Notoriamente, encontramos una marcada ausencia de las respuestas olfativas inhibitorias en animales expertos entrenados sin asociación O-C, lo cual se evidencia en los mapas de color y los componentes principales de la actividad neuronal (ver Figura 2.4.B, actividad alrededor de 'O'). Mientras que para animales expertos en la tarea con asociación las neuronas respondieron (en su gran mayoría de forma excitatoria) al ingreso del contexto visual, para los expertos en la tarea sin asociación la respuesta comenzó recién al momento de la inhalación del olor (ver Figura 2.4.A [actividad alrededor de 'C'] contra y 2.4.B [actividad alrededor de 'O']).

La ausencia de respuestas neuronales a información contextual en la corteza piriforme de animales entrenados sin asociación entre olores y contextos resultó intrigante. Para continuar analizando cómo la actividad neuronal dependía del tipo de ensayo, correlacionamos la actividad poblacional entre los tipos de ensayos, en animales expertos entrenados con y sin asociación O-C, al igual que en la primera parte. La similitud entre los vectores de actividad poblacional se cuantificó mediante el coeficiente de correlación de Pearson. Como se vio previamente, los patrones poblacionales de animales expertos en la tarea con asociación pueden agruparse al comienzo según el contexto visual (ver Figura 2.5, panel superior, patrón de tablero de ajedrez que emerge antes de la estimulación olfativa), luego pueden discriminar entre olores (ver Figura 2.5, panel superior, bloques diagonales alrededor de 0,3 s) y, 1,2s después de la primera inhalación de olor, diferencian los ensayos recompensados del resto de las condiciones (ver Figura 2.5, panel superior, ensayo $O_R C_R$). Para los expertos en la tarea sin asociación el panorama es cualitativamente distinto: los patrones de actividad poblacional entre tipos de ensayos se encuentran altamente

decorrelacionados, salvo a los 1,5s luego de la inhalación del olor, momento en el cual puede discriminarse según si los ensayos están o no recompensados (ver Figura 2.5, panel inferior). Notablemente, en estos animales no se puede discriminar entre olores ni contextos a nivel poblacional.

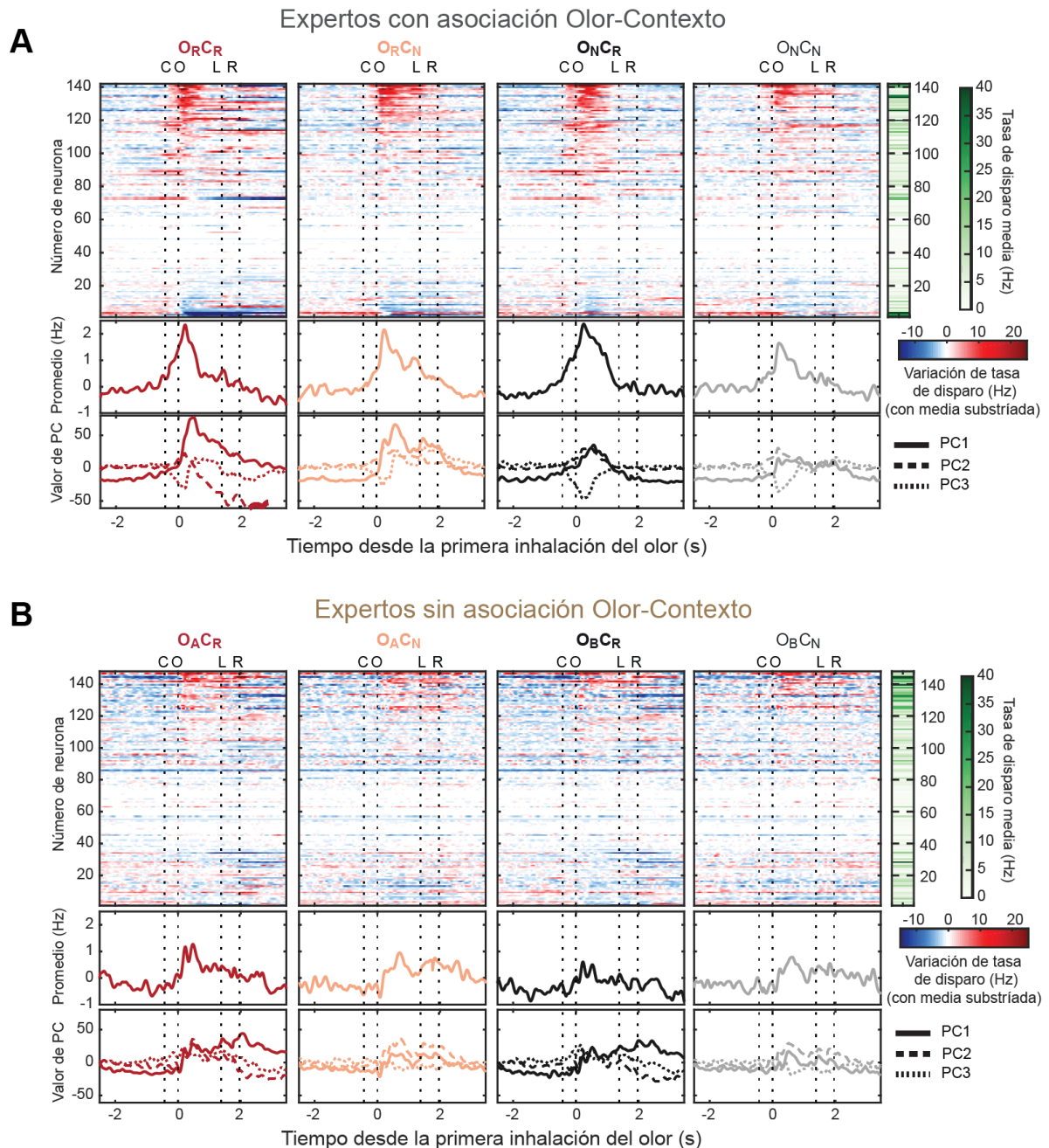


Figura 2.4: Actividad poblacional de la corteza piriforme de animales expertos en los protocolos con **(A)** y sin **(B)** asociación entre olores y contextos. Dentro de cada panel, la **fila superior** muestra los mapas de color con la variación promedio de la tasa de disparo de cada neurona con respecto a su tasa promedio (substrayendo la tasa promedio de la actual) fijada al momento en que los animales perciben el olor por

primera vez. Cada columna corresponde a un tipo de ensayo distinto. Las líneas punteadas verticales muestran el alineamiento a los tiempos medianos de los siguientes eventos: C entrada al contexto, O estimulación olfativa, L respuesta de lamido previa a la entrega de la recompensa, R entrega de la recompensa (gota de agua). Tasa de disparo con sustracción de la media ‘cosida’ para su visualización (ver Materiales y Métodos). La columna en escala de verdes de la derecha muestra la tasa de disparo media de cada neurona. Las neuronas se ordenaron según la respuesta media en los ensayos $O_R C_R$ y $O_A C_R$, respectivamente. La **fila central** muestra el promedio de la variación de la tasa de disparo poblacional y la **fila inferior** los primeros 3 componentes principales (PCs) de la actividad poblacional, los cuales tienden a separar las contribuciones excitatorias e inhibitorias.

En conjunto, estos resultados muestran que, al romper la asociación entre olores y contextos, la población neuronal de la PCx se vería menos influenciadas por la información contextual y olfativa.

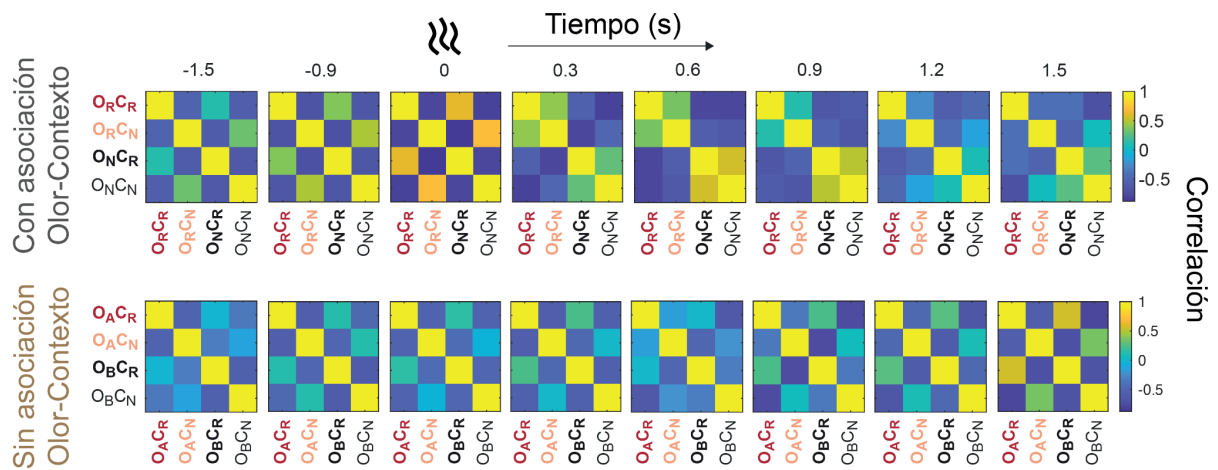


Figura 2.5: Matriz de correlación de Pearson entre tipos de ensayos para neuronas provenientes de animales expertos en los protocolos con (**fila superior**) y sin (**fila inferior**) asociación de olores y contextos. Las matrices se construyeron a partir de las series temporales de los vectores de actividad poblacional que contienen la cuenta de disparos para cada neurona, calculada en secuencias de intervalos temporales (*bins*) alrededor de la estimulación olfativa.

Codificación neuronal: GLM

Para probar si es necesario que los animales aprendan a asociar específicamente la información olfativa a la contextual para que emerja la información del contexto en la PCx, caracterizamos la mezcla de variables sensoriales y comportamentales que modulan la actividad de sus neuronas individuales mediante el mismo enfoque de GLM de codificación neuronal que en la primera parte. Los modelos ajustados revelan que esa diversidad de variables olfativas y no olfativas que modulaban la actividad de las neuronas de animales expertos en la tarea original cambia rotundamente en la tarea sin asociación de estímulos. Las respuestas neuronales de animales entrenados con la asociación de estímulos era dominada por las inhalaciones y la estimulación olfativa, y había mostrado la incorporación de modulaciones contextuales y asociativas luego del aprendizaje (ver Figura 1.11). Los modelos ajustados revelan que las de animales entrenados sin la asociación presentan una reducción significativa de las variables de olor, contexto y asociación, presentando valores cercanos a cero para las contribuciones absoluta y relativa (ver Figura 2.6, paneles A, B y C; prueba de suma de rangos de Wilcoxon, $p\text{-valor}<0.05$). También se vio una disminución significativa en la contribución absoluta de la velocidad y un aumento significativo en la contribución relativa de la inhalación en animales entrenados sin asociación (prueba de suma de rangos de Wilcoxon, $p\text{-valor}<0.05$). En la misma sintonía, sus neuronas fueron moduladas por un menor número de parámetros que en los expertos con asociación. Esta disminución de la multiplexación o selectividad mixta se confirmó estimando el porcentaje de neuronas moduladas por la cantidad de variables (ver Figura 2.6.D; prueba de suma de rangos de Wilcoxon: $p\text{-valor}<0,001$), la contribución absoluta y relativa de las variables al modelo (ver Figura 2.6, paneles A, B y C,) y la amplitud de los filtros obtenidos (ver Figura 2.6.E).

Estos resultados muestran que, al interferir en la asociación de olores y contextos, la información contextual pierde relevancia en las neuronas individuales de la PCx. Sorpresivamente, también pierde representatividad la modulación por olores.

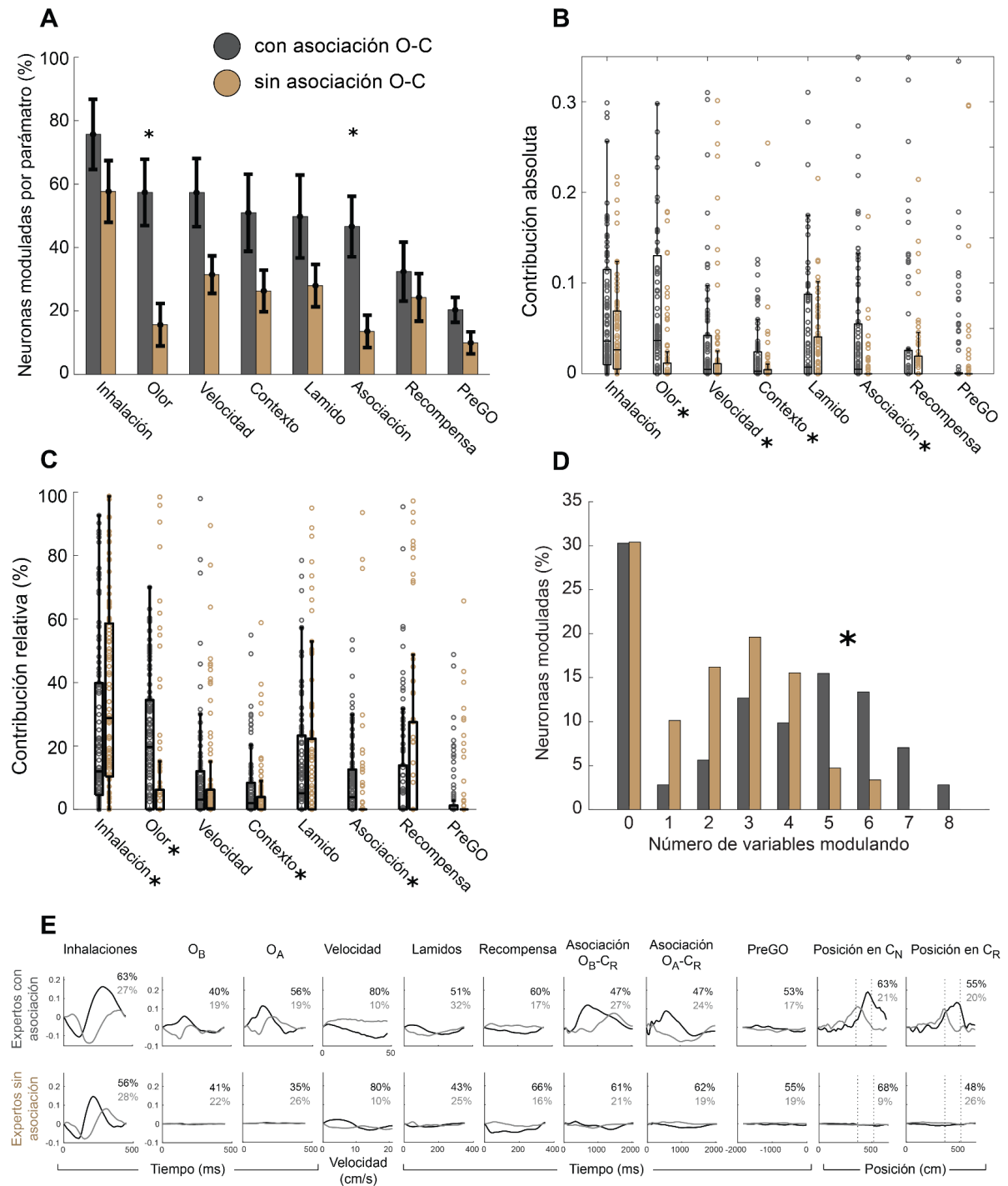


Figura 2.6: Resultados del modelo de codificación neuronal de la PCx utilizando animales expertos de los protocolos con (gris, 5 animales y 142 neuronas) y sin (marrón, 11 animales y 148 neuronas) asociación entre olores y contextos. **A**, porcentaje de neuronas moduladas por cada variable. **B**, *Boxplot* de la contribución absoluta (aumento de log-verosimilitud, *bits*/disparo) de cada variable al modelo. **C**, *Boxplot* de la contribución relativa (de forma tal que las contribuciones de todas las neuronas de un mismo grupo sumen 100%) de cada variable al modelo. Las variables incorporadas al modelo fueron: las inhalaciones, la estimulación con olores, la velocidad de locomoción, la posición del animal en los contextos visuales, los lamidos, la asociación dada por la modulación de las respuestas olfativas por la presencia de un contexto

recompensado, el consumo de la recompensa y la anticipación a la respuesta *GO* (PreGo), respectivamente. Los asteriscos muestran diferencias significativas entre ambos protocolos para cada variable. **D**, distribución del número de variables que modula la actividad de cada neurona. El asterisco muestra diferencias significativas entre ambos protocolos para cada variable. **E**, Primer (negro) y segundo (gris) componente de PCA de los *kernels* pooleados para inhalación, olor sin recompensa y con recompensa (O_N y O_R), velocidad, lamido, recompensa, asociación del contexto recompensado con O_N y O_R , actividad previa a una decisión *GO* (PreGo) y posición en el corredor para ensayos de contexto sin recompensa y con recompensa (C_N y C_R). La varianza explicada por cada componente se indica en porcentajes, registros de animales expertos de los protocolos con (fila superior) y sin (fila inferior) asociación entre olores y contextos.

En la primera parte habíamos encontrado que los animales expertos en la tarea con asociación de olores y contextos recibían el efecto de multiplexación sobre las neuronas olfativas de la PCx luego del aprendizaje (ver Figura 1.12). Nos preguntamos, entonces, si la asociación entre estímulos olfativos y contextuales reorganiza las neuronas de la PCx en nuevos grupos funcionales. Para responderlo utilizamos el mismo abordaje de *clustering* jerárquico que en la primera parte. El *clustering* de neuronas según la contribución relativa de variables que codifica (ver Figura 2.7) mostró que los perfiles del protocolo sin asociación de estímulos pasan a estar dominados típicamente por variables únicas (ver Figura 2.7, panel derecho, 84,4% de las células agrupadas) y por la inhalación o la recompensa (ver Figura 2.7, panel derecho, columnas ‘Inhalación’ y ‘Recompensa’, 41,5% y 15,6% de las células agrupadas, respectivamente). En este grupo sólo se encontró 1 *cluster* dominado por olores, sin contribución de otras variables y con muy baja representatividad (ver Figura 2.7, panel derecho, columna ‘Olor’, 5,2% de las células agrupadas). Entonces, ese perfil de selectividad mixta adquirido luego del aprendizaje de la asociación entre olores y contextos sobre las neuronas olfativas de la PCx (ver Figura 2.7, panel izquierdo) pasa a uno dominado por variables únicas cuando se rompe la asociación entre dichos estímulos (ver Figura 2.7, panel derecho), perdiendo principalmente los grupos de neuronas dominados por estímulos olfativos.

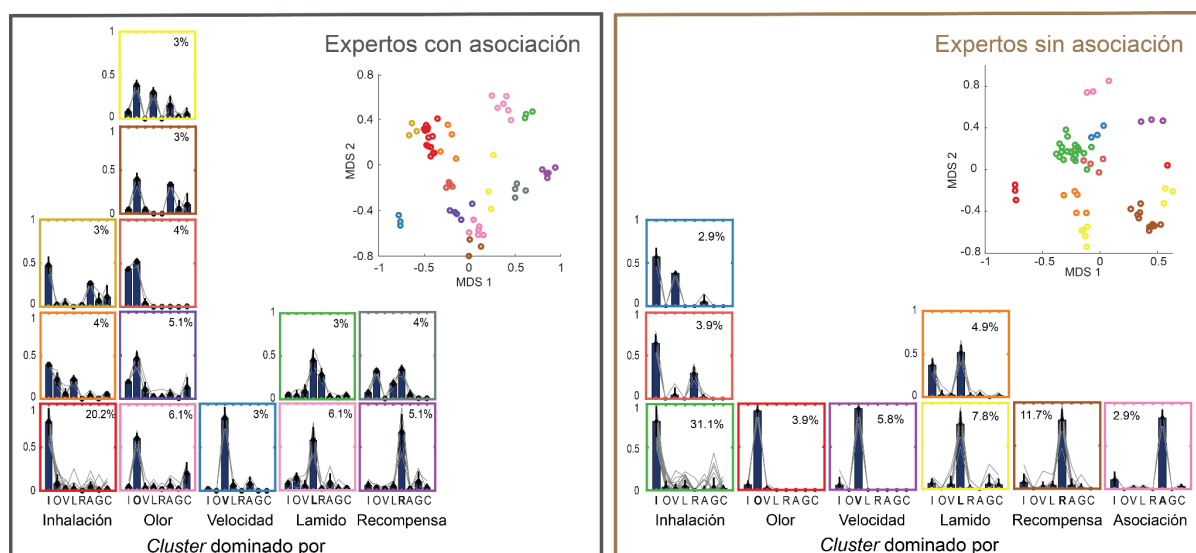


Figura 2.7: *Clustering* de neuronas ajustadas por el GLM según la contribución relativa de cada variable utilizando animales expertos de los protocolos con (gris, 5 animales y 142 neuronas) y sin (marrón, 11 animales y 148 neuronas) asociación entre olores y contextos. Los gráficos de barras dentro de los cuadrados de color representan la contribución relativa media de las variables a cada *cluster* individual (promedio $\pm$ desviación estándar). Las líneas grises muestran las neuronas individuales del *cluster*. Los porcentajes indican la proporción de neuronas incluidas en relación con la población total. Las columnas de los gráficos de barras están ordenadas según la variable dominante (indicada debajo de cada columna, I: inhalación, O: olor, V: velocidad, L: lamido, R: recompensa, A: modulación del olor por el contexto (asociación), G: modulación PreGO, C: contexto). El recuadro superior derecho muestra la proyección del escalado multidimensional (MDS) de estos datos. Cada punto es una neurona codificada por color según su *cluster*, y las neuronas con contribuciones relativas similares ocupan regiones similares del plano MDS.

Decodificación neuronal

Luego, nos preguntamos si la disociación entre olores y contextos tiene consecuencias funcionales, afectando la cantidad de información sensorial que transmiten las neuronas de la PCx. Para ello, utilizamos el mismo enfoque que en la primera parte para decodificar (a nivel de clasificación) la identidad de los contextos y los olores en cada ensayo (ver Materiales y Métodos).

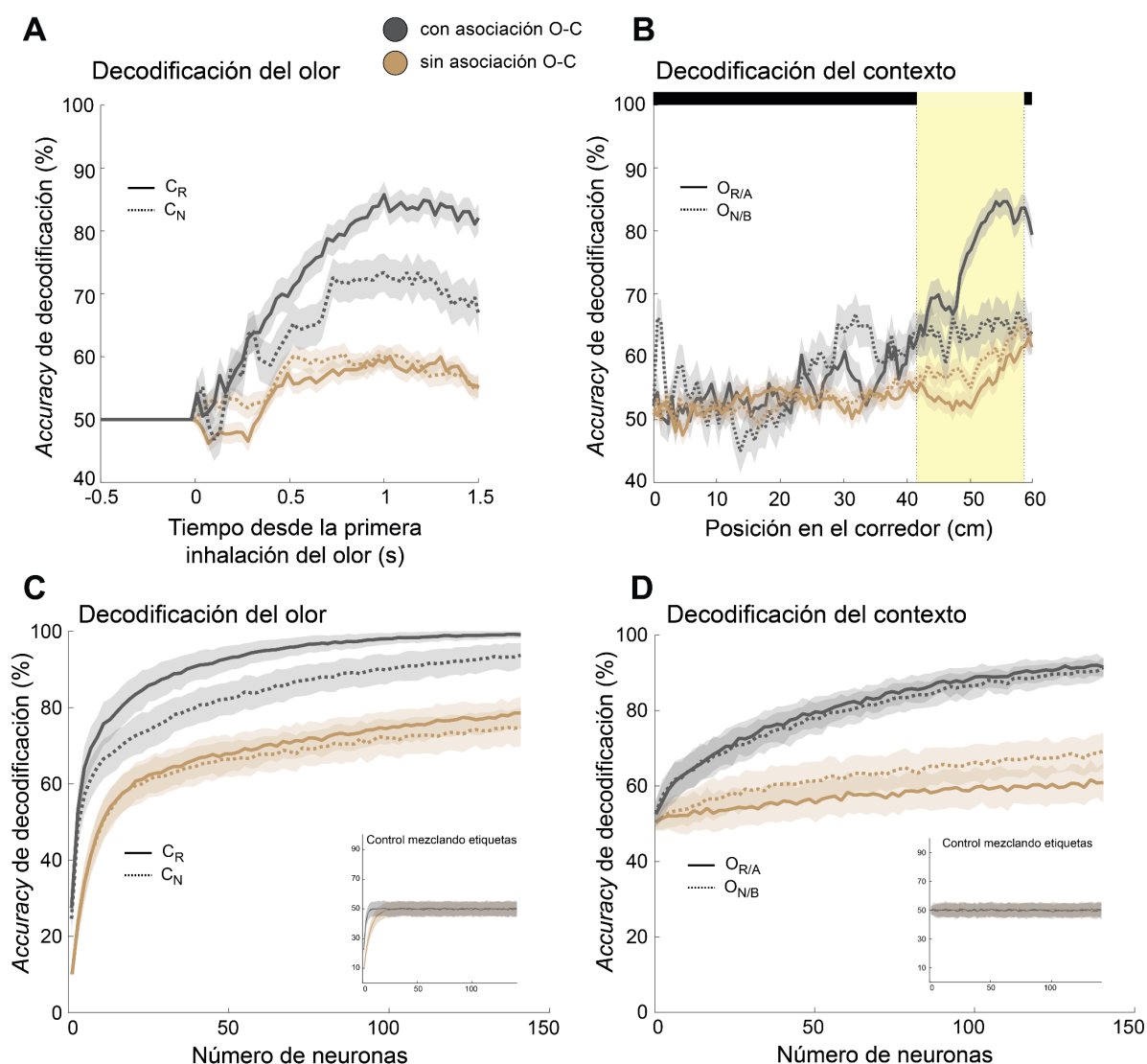


Figura 2.8: Decodificación, ensayo a ensayo, de la identidad del olor (**A** y **C**) y el contexto (**B** y **D**) a partir de los modelos GLM ajustados sobre la actividad neuronal de animales entrenados con (gris) y sin (marrón) asociación entre olores y contextos visuales. Se grafican los valores medios (línea) con el error estándar (sombreado) de la *accuracy* de decodificación las categorías binarias (contexto visual recompensado frente a no recompensado, olor recompensado frente a no recompensado, respectivamente) en función del tiempo desde la primera inhalación del olor (**A**), de la posición en el corredor virtual (**B**) y el tamaño de la población de neuronas utilizada para la decodificación (**C** y **D**). En **C** se estimó la *accuracy* de decodificación 0,8 s después de la primera inhalación del olor, mientras que en **D**

se estimó aproximadamente a los 44 cm del corredor virtual, dentro del contexto pero previo a la primera inhalación del olor. Las curvas continuas fueron construidas únicamente con ensayos de olor recompensado u olor A ($O_{R/A}$, 'Decodificación del contexto') y contexto recompensado (C_R , 'Decodificación del olor'), mientras que las discontinuas con ensayos de olor no recompensado u olor B ($O_{N/B}$, 'Decodificación del contexto') y contexto no recompensado (C_N , 'Decodificación del olor'). El parche amarillo corresponde a la posición en la que los animales se encuentran dentro del contexto visual. El número de ensayos utilizados para el ajuste del modelo y el análisis de decodificación se igualó entre los diferentes tipos de ensayos. *Insets*: controles realizando los mismos análisis pero con las etiquetas mezcladas.

En línea con los resultados anteriores, mientras que la actividad ensayo a ensayo de las neuronas de animales expertos en la tarea con asociación de estímulos permite decodificar la identidad de los contextos visuales de forma robusta, la de animales entrenados sin la asociación se mantiene en el nivel de chance (ver Figura 2.8, B y D, curva gris contra marrón, respectivamente). Los valores de decodificación de contextos no difieren al utilizar ensayos con distintos olores (ver Figura 2.8, B y D, curvas continuas contra discontinuas).

En conjunto, los resultados de esta segunda parte muestran que, al romper la asociación entre olores y contextos, la corteza piriforme deja de tener modulaciones contextuales, refutando H_0 y, por ende, dejando H_1 cómo la hipótesis que mejor explica el fenómeno. Esto evidencia la necesidad de un mecanismo asociativo entre las aferencias que traen la información contextual y las neuronas que se activan frente a la estimulación olfativa en la PCx para que esta región codifique la información del contexto, dándole así una especificidad olfativa coherente con la naturaleza de esta corteza.

Una vez más y sin dejar de sorprendernos, la actividad ensayo a ensayo de las neuronas de la corteza olfativa piriforme de animales expertos en la tarea sin asociación olor-contexto apenas permitió decodificar la identidad de los olores por encima del nivel de chance (ver Figura 2.8, A y C, curvas marrones), evidenciando una PCx notoriamente disminuída en información olfativa en comparación a los 3 estadios del aprendizaje estudiados en la primera parte.

Olores dentro de la realidad virtual vs estimulación pasiva

A lo largo de esta segunda parte se vio que, a nivel de actividad poblacional (ver Figura 2.4.B; ver Figura 2.5, panel inferior), de los filtros ajustados al modelo GLM (ver Figura 2.6), de *clustering* (ver Figura 2.7, panel derecho) y de decodificación neuronal (ver Figuras 2.8.A y 2.8.C), la corteza piriforme de animales expertos en la tarea sin asociación olor-contexto prácticamente no muestra modulaciones olfativas. Así mismo, estos animales no aumentaron su tasa de inhalación de forma anticipatoria a la estimulación olfativa (ver Figura 2.2.C, recuadro), marcando una clara diferencia con los 3 estadios del aprendizaje de la tarea original (ver Figura 1.4). Pensamos, entonces, que la PCx podría estar siendo silenciada activamente, siendo que en este nuevo paradigma comportamental los olores podrían ser interpretados como un distractor para recibir la recompensa. Más formalmente:

- H_2 : la PCx es silenciada activamente durante la tarea sin asociación olor-contexto.

Para poner a prueba dicha hipótesis, entrenamos un subgrupo de animales en esta misma tarea sin asociación olor-contexto. Cuando llegaron al nivel de *expertise* deseado registramos su actividad neuronal (con el mismo abordaje electrofisiológico de toda la tesis; ver Materiales y Métodos) mientras estaban inmersos en la realidad virtual (durante aproximadamente 1 hora) e inmediatamente después la apagamos y estimulamos a los animales de forma pasiva con los mismos dos olores (ver Figura 2.9A). Al visualizar los mapas de color con la actividad de todas las neuronas registradas, encontramos que la estimulación olfativa mostró tendencias a generar más y mayores respuestas neuronales excitatorias durante la estimulación pasiva que mientras los animales estaban inmersos en la realidad virtual (ver Figura 2.9.B, ' O_{ACR} ' contra ' O_A pasivo', actividad alrededor de ' O ').

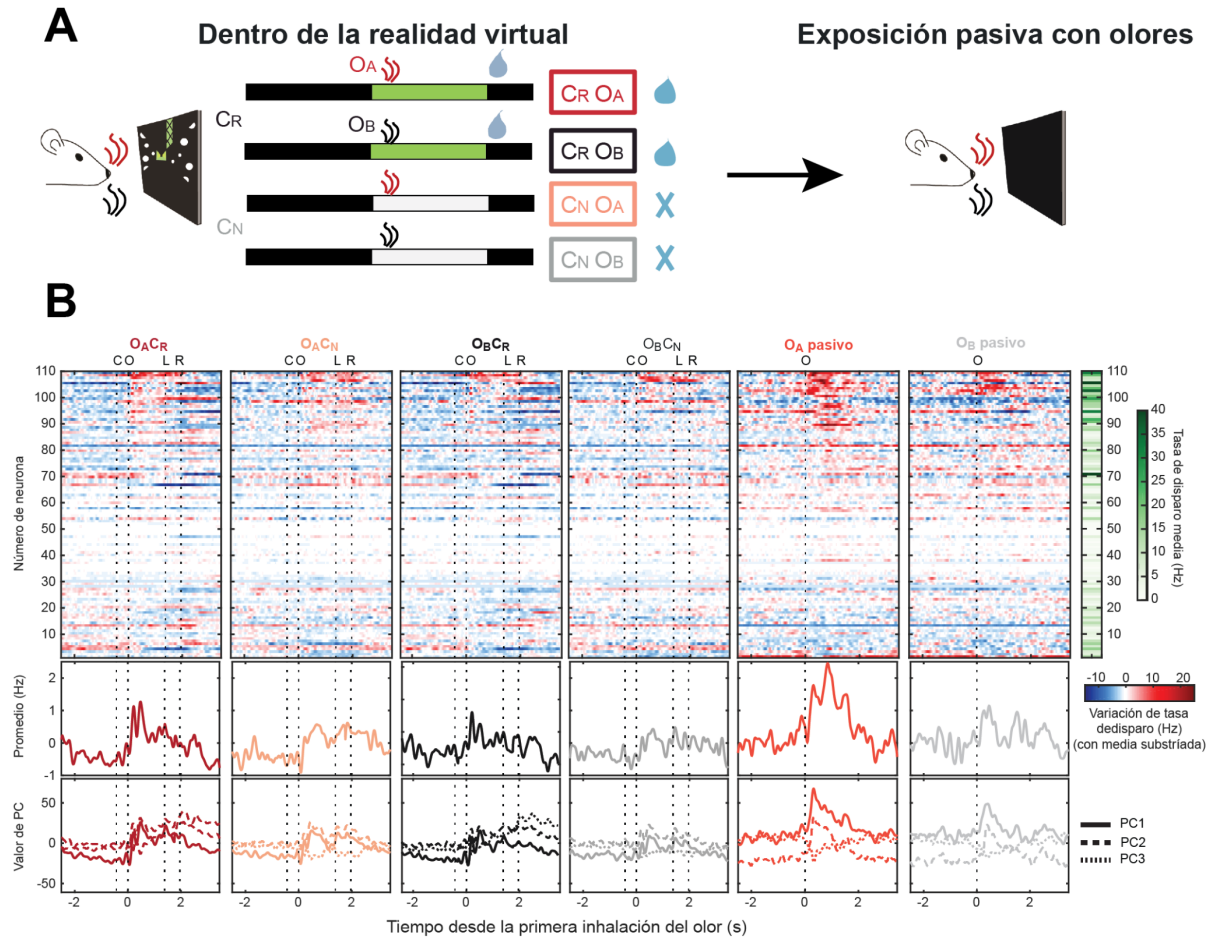


Figura 2.9: A, esquema del protocolo de entrenamiento sin asociación entre olores y contextos. El día del registro neuronal primero se colocó a los animales en la realidad virtual y luego se les hizo estimulación pasiva con los mismos dos olores. **B**, Actividad poblacional de la corteza piriforme de animales expertos en este protocolo que pasaron tanto por la realidad virtual como por la estimulación pasiva. Dentro de cada panel, la **fila superior** muestra los mapas de color con la variación promedio de la tasa de disparo de cada neurona con respecto a su tasa promedio (sustrayendo la tasa promedio de la actual) fijada al momento en que los animales perciben el olor por primera vez. Cada columna corresponde a un tipo de ensayo distinto. Notar que se agregan los ensayos en que se estimula con los olores A y B pasivamente. Las líneas punteadas verticales muestran el alineamiento a los tiempos medianos de los siguientes eventos: C entrada al contexto, O estimulación olfativa, L respuesta de lamido previa a la entrega de la recompensa, R entrega de la recompensa (gota de agua). Tasa de disparo con sustracción de la media ‘cosida’ para su visualización (ver Materiales y Métodos). La columna en escala de verdes de la derecha muestra la tasa de disparo media de cada neurona. Las neuronas se ordenaron según la respuesta media en los ensayos O_AC_R. La **fila central** muestra el promedio de la variación de la tasa de disparo poblacional y la **fila inferior** los primeros 3 componentes principales (PCs) de la actividad poblacional.

Dado que este esquema experimental nos permite evaluar la actividad de las mismas neuronas en dos entornos olfativos cualitativamente distintos, decidimos analizar las neuronas individuales de la PCx de estos animales. En general y como mencionamos previamente, encontramos que las neuronas de la PCx de animales expertos en la tarea sin asociación olor-contexto no responden a olores mientras están inmersos en la realidad virtual (ver Figura 2.6). Sorpresivamente, un subgrupo de neuronas presentó modulaciones olfativas durante la estimulación pasiva pero no durante la realidad virtual (ver Figura 2.10), mostrando que, a nivel de neurona única, una subpoblación neuronal olfativa puede cambiar de ‘modo’ de actividad según la tarea comportamental en que se encuentre inmerso el animal, sugiriendo un control dinámico de la discriminación olfativa.

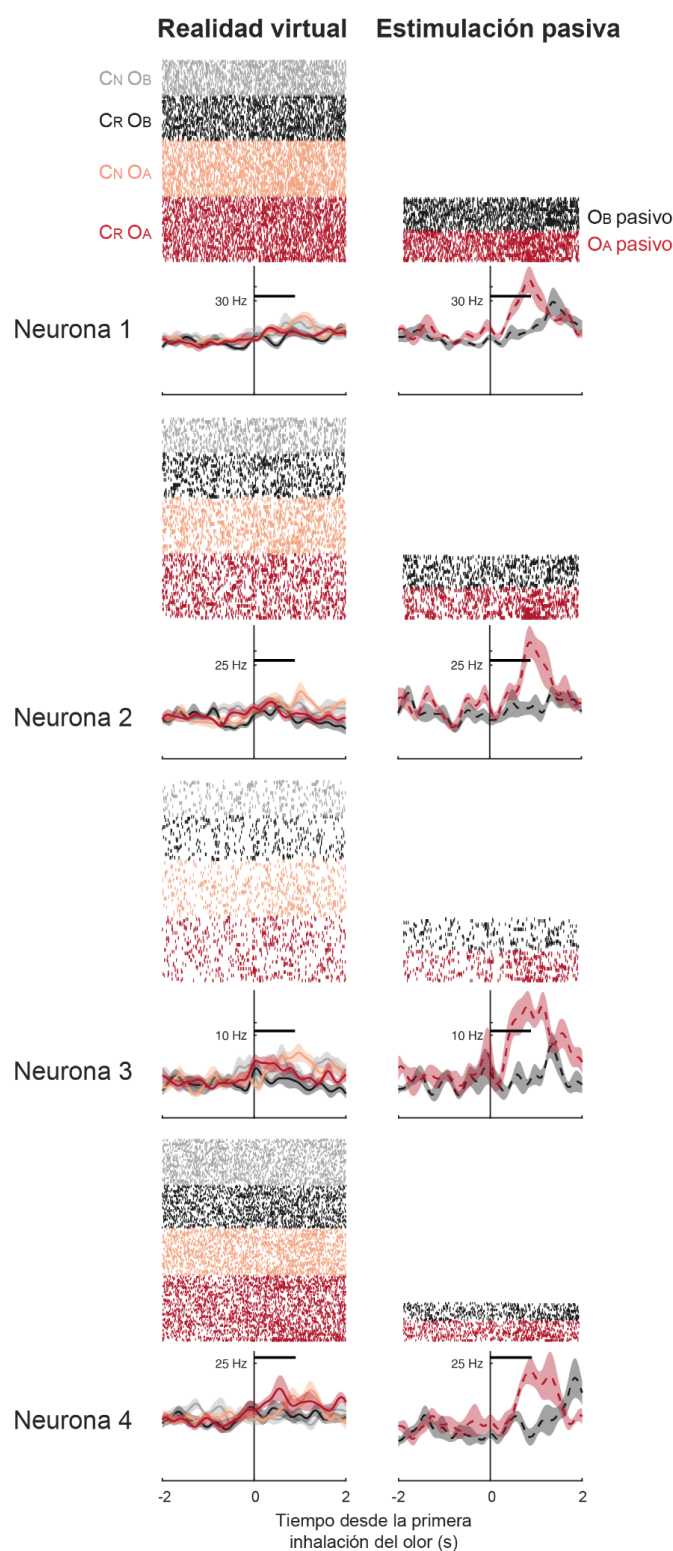


Figura 2.10: Ejemplos de neuronas registradas durante la realidad virtual (columna izquierda) y la estimulación pasiva (columna derecha). Se muestran en gráficos rasterizados de potenciales de acción (cada marca) codificados por colores según el tipo de ensayo. La duración del estímulo olfativo se indica con una barra negra horizontal y equivale a 1s. Los paneles que se encuentran por debajo de los gráficos rasterizados muestran la frecuencia de disparo promedio (valor medio $\pm$ error estándar) para cada tipo de ensayo de esa misma neurona.

Para corroborar si las neuronas olfativas de la PCx son moduladas dinámicamente a nivel funcional, utilizamos las respuestas neuronales alrededor de la estimulación olfativa dentro de la realidad virtual (ver Figura 2.11, curvas gris y negra) y durante la estimulación pasiva (ver Figura 2.11, curva violeta) para decodificar la identidad de los odorantes. Dado que no es posible utilizar el mismo modelo GLM sobre los datos pasivos, utilizamos un método de clasificación (ver Materiales y Métodos). En línea con lo mostrado anteriormente, encontramos que es posible clasificar la identidad del odorante utilizando la actividad neuronal durante la estimulación pasiva pero no con la actividad durante la realidad virtual.

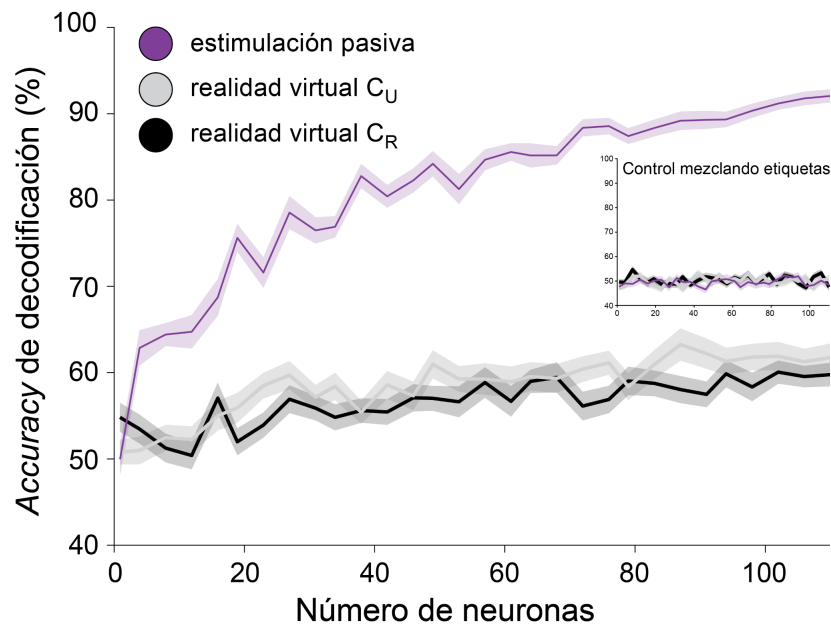


Figura 2.11: Decodificación, ensayo a ensayo, de la identidad de los olores utilizando una regresión logística sobre la actividad neuronal registrada durante los ensayos de contexto recompensado (gris oscuro) y no recompensado (gris claro) en la realidad virtual, y durante la estimulación pasiva con olores (violeta). Para todos los casos, se decodificó la identidad de los odorantes 1,3s luego de la primera inhalación del olor y la actividad neuronal perteneció a animales expertos en el protocolo sin asociación entre olores y contextos visuales. Se grafican los valores medios (línea) con el error estándar (sombreado) de la *accuracy* de decodificación de las categorías binarias (olor A frente a olor B) en función del tamaño de la población de neuronas utilizada para la decodificación. *Inset:* control realizando el mismo análisis pero con las etiquetas mezcladas.

En conjunto, estos resultados muestran que la PCx es silenciada activamente durante la tarea sin asociación olor-contexto, sugiriendo un mecanismo de control dinámico según la demanda comportamental.

Discusión - Parte 2

En la segunda parte de esta tesis nos propusimos adentrarnos en el mecanismo subyacente a la aparición de la información contextual en la corteza piriforme. Encontramos que los animales entrenados en la tarea sin asociación entre olores y contextos se vuelven expertos en la misma en aproximadamente 4 sesiones de entrenamiento (Figura 2.1), más rápidamente que la tarea original, y que las variables comportamentales medidas (tasa de lamidos, velocidad de locomoción y tasa de inhalación) son adaptadas de forma diferencial según la nueva demanda comportamental (Figura 2.2), mostrando un claro dominio de las claves visuales del contexto por sobre los olores. Cuando el olor no está asociado al contexto visual y a la recompensa, la PCx no muestra modulaciones contextuales, lo cual fue corroborado a nivel poblacional (Figuras 2.4 y 2.5), a nivel de los filtros ajustados por el modelo de codificación GLM (Figura 2.6) y a nivel de la cantidad de información decodificable (Figura 2.8, A y C). Esto demuestra que es necesario un mecanismo asociativo para que se vuelva evidente la información contextual en esta corteza olfativa, refutando la hipótesis H_0 . Sorpresivamente, encontramos que, cuando se rompe la asociación olor-contexto-recompensa y el olor pasa a ser un distractor a la hora de desambiguar la información contextual, la PCx disminuye notoriamente la codificación de información olfativa, lo cual también fue corroborado a nivel poblacional (Figuras 2.4 y 2.5), a nivel de los filtros ajustados por el modelo de codificación GLM (Figura 2.6) y a nivel de la cantidad de información decodificable (Figura 2.8, B y D). Al entrenar un subgrupo de animales con la misma tarea hasta llegar al nivel de *expertise* deseado y registrar su actividad neuronal durante la realidad virtual y durante la estimulación pasiva con los mismos dos olores, encontramos neuronas que sólo tenían respuestas olfativas frente a la estimulación pasiva (Figura 2.10), sustentado también a nivel poblacional (Figura 2.9). Finalmente, sólo fue posible clasificar la identidad de los odorantes utilizando la actividad neuronal durante la estimulación pasiva (Figura 2.11). Esto evidencia que las respuestas olfativas de la PCx pueden ser suprimidas de forma activa y dinámica, adaptando su procesamiento en función de la experiencia comportamental.

Las propiedades funcionales de las neuronas corticales no son fijas, sino que pueden pensarse como procesadores adaptativos que cambian su función según el contexto

comportamental (Gilbert & Li, 2013). A nivel de los circuitos neuronales, la influencia del contexto suele llegar a las cortezas sensoriales mediante proyecciones *top-down* provenientes de regiones cerebrales de alta jerarquía, mediante conexiones horizontales dentro de un área o mediante *inputs* neuromodulatorios (Khan & Hofer, 2018). Como se mencionó previamente, la corteza piriforme se encuentra recíproca y extensamente conectada con áreas alta jerarquía de procesamiento, asociadas con la toma de decisiones, el aprendizaje emocional, procesos mnemónicos y de navegación, como la corteza orbitofrontal (Illig, 2005), la amígdala (Majak et al., 2004) y las cortezas perirrinal y entorrinal (Haberly & Price, 1978; Kerr et al., 2007) (Figura I.1.B). Esto hace que sea especialmente interesante estudiarla en el marco del aprendizaje, pensándola como una corteza asociativa (Johnson et al., 2000). En esta parte de la tesis demostramos que es necesario un proceso asociativo entre la información que codifica principalmente la corteza piriforme (es decir, olfativa) y la contextual para que la información del contexto visuo-espacial se vuelva evidente en esta región. Especulamos que el mecanismo subyacente consiste en un proceso *hebbiano* en el que se coactivan las proyecciones *top-down* que traen la información del contexto espacial y las neuronas olfativas de la PCx, generando una potenciación a largo término de las sinápsis involucradas. Este tipo de plasticidad asociativa sobre los pesos sinápticos ya se evidenció luego de un aprendizaje sensoriomotor en la corteza somatosensorial (*barrel cortex*) de roedores, producto de la llegada coincidente de *inputs* de largo alcance desde la corteza motora y las señales sensoriales *bottom-up* sobre las neuronas piramidales de dicha región (Xu et al., 2012). Particularmente, pensamos que las aferencias *top-down* con información del contexto espacial proviene de la corteza entorrinal lateral (LEC, por sus siglas en inglés), la cual se sabe está fuertemente conectada con el hipocampo, región ampliamente conocida por sus funciones mnemónicas y en navegación espacial (Ekstrom & Hill, 2023), y que ha sido asociada al procesamiento de la localización espacial de objetos en el pasado y en el presente (Beer et al., 2013; Chao et al., 2016; Deshmukh & Knierim, 2011; Hunsaker et al., 2013; Tsao et al., 2013; Van Cauter et al., 2013; D. I. G. Wilson, Langston, et al., 2013; D. I. G. Wilson, Watanabe, et al., 2013), al reconocimiento de las combinaciones asociativas de objetos, lugares y contextos con episodios (D. I. G. Wilson, Watanabe, et al., 2013) y a la asociación de atributos que conforman un ambiente o contexto local (Kuruvilla & Ainge, 2017). Dada la fuerte influencia espacio-contextual, resulta intuitivo pensar que esta calidad de información

llega a la PCx desde la LEC. Queda pendiente el disgregado de la vía LEC-PCx en animales realizando esta misma tarea para ahondar en el mecanismo de este proceso.

Un desafío fundamental de la neurociencia es entender cómo el cerebro selecciona la información sensorial relevante. Una de las vías principales de esta selección llega a las cortezas sensoriales mediante aferencias de regiones de alta jerarquía de procesamiento o *top-down* (Gilbert & Li, 2013). En este sentido, las cortezas sensoriales pueden cambiar la relación entre sus aferencias *bottom-up* y *top-down* con el aprendizaje de forma dinámica. Un ejemplo de esto en el marco del aprendizaje asociativo es el trabajo de Makino y Komiyama, quienes mostraron, haciendo *imaging* de 2 fotones crónico del circuito de la corteza visual del ratón (neuronas de la capa 2 de V1, la aferencia sensorial *bottom-up* de la capa 4 y la aferencia *top-down* de larga distancia de la corteza retrosplenial) a lo largo de los días y durante un aprendizaje asociativo, que las respuestas sensoriales *bottom-up* se debilitaron y las proyecciones *top-down* de la corteza retrosplenial se fortalecen gradualmente con el aprendizaje (Makino & Komiyama, 2015). Aparte de seleccionar la información relevante, el cerebro debe ser capaz de suprimir estímulos distractores. La evidencia actual acerca de cómo el cerebro genera este tipo de supresión fue estudiada en una tarea de discriminación atencional entre estímulos visuales y auditivos (*cross-modal two-alternative forced choice*) en ratones (Rikhye et al., 2018; Schmitt et al., 2017; Wimmer et al., 2015). Al estudiar el circuito neuronal involucrado en detalle mediante distintas perturbaciones optogenéticas, este grupo demostró que la supresión selectiva frente a estímulos distractores sucede al nivel del tálamo sensorial y es mediada por el núcleo reticulado talámico (TRN, por sus siglas en inglés), corroborando que no hay una inhibición global *top-down* entre la corteza prefrontal (PFC, por sus siglas en inglés) y la corteza visual (Wimmer et al., 2015). Encontraron que la PFC, en cambio, controla la selectividad sensorial mediante la modulación del TRN, que a su vez controla la ganancia del tálamo sensorial mediante una inhibición *feedforward*, controlando la información visual siquiera antes de llegar a la corteza. En esta parte de la tesis encontramos que, cuando se rompe la asociación olor-contexto-recompensa y el olor puede ser interpretado como un distractor, la corteza piriforme disminuye notoriamente la codificación de información olfativa, aumenta la tasa de disparo de sus neuronas (Figura 2.3) y, al estimular de forma pasiva con los mismos dos olores, las respuestas

olfativas son recuperadas. El sistema olfativo, a diferencia de la gran parte de los sistemas sensoriales, no tiene relevo en el tálamo (Gottfried, 2010). Esto implica que el mecanismo actual para explicar la supresión selectiva de la información sensorial distractora no es consistente con lo que encontramos en este trabajo. Especulamos que el proceso subyacente a nuestras observaciones se puede explicar por un mecanismo novedoso en el que se recluta dinámica y de forma estado-dependiente a las interneuronas inhibitorias locales, mediante proyecciones de largo alcance provenientes de regiones de alta jerarquía de procesamiento, que a su vez suprimen las respuestas de las neuronas principales. Nuestros resultados muestran que los animales expertos en la tarea sin asociación presentan un enriquecimiento en las neuronas con tasas de disparo de entre 5 y 20 Hz (Figura 2.3, *inset*), consistente con las interneuronas *narrow-spiking* reportadas previamente (Poo & Isaacson, 2009), siendo estas menos sintonizadas a estímulos olfativos, lo cual tiene sentido en el marco de la hipótesis planteada. Una posibilidad es que la aferencia *top-down* llegue de la corteza prefrontal, particularmente de la corteza orbitofrontal, la cual se mostró tener conexiones directas con la corteza piriforme (Illig, 2005). Por último, se propuso que la supresión activa no sólo silencia al estímulo distractor, sino que protege las trazas corticales para su uso futuro (Rikhye et al., 2018). Para nuestro problema de estudio, la inhibición activa de la PCx durante la tarea aseguraría que los circuitos olfativos se mantengan estables y listos para cuando se produzca un cambio de contexto comportamental donde el olor tome otra relevancia. Dicho de otro modo, garantizaría que, cuando los ratones vuelven a exponerse a un contexto relevante desde el punto de vista olfativo, las representaciones de la PCx se conserven y puedan reactivarse rápidamente. En nuestro caso, esto se evidencia en la presencia de respuestas a la estimulación olfativa pasiva inmediatamente después de la sesión en la tarea virtual.

En conjunto, estos resultados muestran cómo el aprendizaje asociativo puede modificar las representaciones corticales olfativas según la demanda comportamental, fortaleciendo conexiones con información relevante (como las del contexto visuo-espacial) o suprimiendo aquellas que impiden el correcto desarrollo de la tarea. Sería particularmente interesante poder estudiar los circuitos neuronales involucrados en la supresión mediante inactivaciones programadas con optogenética y, también, poder disecar las contribuciones de las distintas subpoblaciones neuronales excitatorias

e inhibitorias. Así mismo, futuros experimentos podrían hacer foco en un estudio longitudinal para poder estudiar los cambios circuitales involucrados a lo largo del aprendizaje.

Conclusiones

El marco general de este trabajo de tesis es comprender cómo el aprendizaje asociativo modifica las representaciones corticales olfativas de acuerdo con la demanda comportamental. Nos enfocamos específicamente en la plasticidad generada por un aspecto específico de la experiencia sensorial: el contexto espacial donde suceden los estímulos olfativos. Acá planteamos la hipótesis de que las representaciones neuronales en la corteza piriforme no son estáticas ni dependen exclusivamente de las propiedades físico-químicas de los odorantes, sino que se modulan dinámicamente no solo por la presencia de olores sino también por otras variables relacionadas al contexto en el que el olor se presenta y por el aprendizaje. Utilizamos dos abordajes experimentales para estudiarlo.

En la primera parte de la tesis, entrenamos animales en una tarea de discriminación olfativa en contextos visuales para obtener una recompensa y medimos la actividad neuronal de la corteza piriforme en tres estadios distintos del aprendizaje. Mostramos que los animales aprenden la tarea de forma secuencial, discriminando primero los olores y luego los contextos. Este proceso de aprendizaje induce una reorganización de las contribuciones sensoriales y comportamentales en las neuronas de la PCx, incorporando información del contexto visual espacial. Encontramos que la capacidad de decodificar información contextual en la PCx solo es posible tras el aprendizaje, lo que genera una mejora funcional en la discriminación de los olores. Este fenómeno es de naturaleza estrictamente asociativa y no puede explicarse por un mero aprendizaje perceptual.

Asimismo, determinamos que una característica distintiva de esta reorganización es la adquisición de selectividad mixta, principalmente en las neuronas olfativas. Este mecanismo favorece la construcción de representaciones de alta dimensionalidad, lo que otorga al sistema la flexibilidad necesaria para procesar olores de forma estado-dependiente. Así, la PCx facilita la separabilidad de los estímulos, promoviendo la discriminación y evitando la generalización de un mismo olor en diferentes contextos.

En la segunda parte, indagamos en el mecanismo subyacente a la aparición de dicha información contextual. Para ello, utilizamos el mismo abordaje experimental que en la primera parte pero entrenamos a los animales hasta ser expertos en una tarea levemente distinta: presentamos los mismos dos olores y contextos visuo-espaciales pero sólo la identidad del contexto predijo la recompensa, es decir, rompimos la asociación olor-contexto-recompensa. Demostramos que es necesario un mecanismo asociativo para que la información contextual se vuelva evidente en la PCx; cuando el olor no está asociado al contexto y la recompensa, las modulaciones contextuales desaparecen. Sorprendentemente, descubrimos que cuando el olor actúa como un distractor, la PCx suprime activa y dinámicamente la codificación de información olfativa.

Para evaluar cuán dinámica es la supresión de la información olfativa en la PCx, registramos la actividad neuronal durante la tarea y durante la estimulación pasiva con los mismos dos olores, encontrando que dichas respuestas se recuperan cuando los animales no están inmersos en la tarea. Especulamos que esta supresión selectiva se podría explicar por un mecanismo novedoso que involucre el reclutamiento de interneuronas inhibitorias locales posiblemente mediante proyecciones *top-down* desde regiones de alta jerarquía, como la corteza orbitofrontal. Esta inhibición activa no sólo silencia el estímulo distractor, sino que podría estar protegiendo las trazas corticales olfativas, garantizando que las representaciones de la PCx se conserven y puedan reactivarse rápidamente cuando el contexto olfativo toma otra relevancia.

Concluimos que la corteza piriforme presenta una notable plasticidad y versatilidad, siendo capaz de fortalecer conexiones con información relevante o suprimir aquellas que impiden el correcto desarrollo de una tarea. Este trabajo sienta las bases para un nuevo tipo de supresión activa olfativa en la corteza piriforme y deja abierta la puerta hacia futuras investigaciones longitudinales y mecanísticas sobre cómo los cambios circuitales permiten al cerebro seleccionar la información sensorial relevante en entornos complejos.

Referencias

- Ache, B. W., & Young, J. M. (2005). Olfaction: Diverse Species, Conserved Principles. *Neuron*, 48(3), 417–430. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.10.022>
- Adrian, E. D. (1942). Olfactory reactions in the brain of the hedgehog. *The Journal of Physiology*, 100(4), 459–473. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1942.sp003955>
- Aoi, M. C., Mante, V., & Pillow, J. W. (2020). Prefrontal cortex exhibits multidimensional dynamic encoding during decision-making. *Nature Neuroscience*, 23(11), 1410–1420. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-0696-5>
- Bao, S., Chan, V. T., & Merzenich, M. M. (2001). Cortical remodelling induced by activity of ventral tegmental dopamine neurons. *Nature*, 412(6842), 79–83. <https://doi.org/10.1038/35083586>
- Barkai, E., & Wilson, D. A. (2014). *Odor Memory and Perception*. Elsevier.
- Barnes, D. C., Hofacer, R. D., Zaman, A. R., Rennaker, R. L., & Wilson, D. A. (2008). Olfactory perceptual stability and discrimination. *Nature Neuroscience*, 11(12), 1378–1380. <https://doi.org/10.1038/nn.2217>
- Beer, Z., Chwiesko, C., Kitsukawa, T., & Sauvage, M. M. (2013). Spatial and stimulus-type tuning in the LEC, MEC, POR, PrC, CA1, and CA3 during spontaneous item recognition memory. *Hippocampus*, 23(12), 1425–1438. <https://doi.org/10.1002/hipo.22195>
- Bekkers, J. M., & Suzuki, N. (2013). Neurons and circuits for odor processing in the piriform cortex. *Trends in Neurosciences*, 36(7), 429–438. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.04.005>
- Bolding, K. A., & Franks, K. M. (2017). Complementary codes for odor identity and intensity in olfactory cortex. *eLife*, 6, e22630. <https://doi.org/10.7554/eLife.22630>
- Bolding, K. A., & Franks, K. M. (2018). Recurrent cortical circuits implement concentration-invariant odor coding. *Science (New York, N.Y.)*, 361(6407). <https://doi.org/10.1126/science.aat6904>
- Briley, P. M., & Krumbholz, K. (2013). The specificity of stimulus-specific adaptation in human auditory cortex increases with repeated exposure to the adapting stimulus. *Journal of Neurophysiology*, 110(12), 2679–2688. <https://doi.org/10.1152/jn.01015.2012>
- Buzsáki, G. (2004). Large-scale recording of neuronal ensembles. *Nature Neuroscience*, 7(5), 446–451. <https://doi.org/10.1038/nn1233>

- Calu, D. J., Roesch, M. R., Stalnaker, T. A., & Schoenbaum, G. (2007). Associative encoding in posterior piriform cortex during odor discrimination and reversal learning. *Cerebral Cortex (New York, N.Y. : 1991)*, 17(6), 1342–1349. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhl045>
- Canto-Bustos, M., Friason, F. K., Bassi, C., & Oswald, A.-M. M. (2022). Disinhibitory Circuitry Gates Associative Synaptic Plasticity in Olfactory Cortex. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 42(14), 2942–2950. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1369-21.2021>
- Carey, R. M., Verhagen, J. V., Wesson, D. W., Pérez, N., & Wachowiak, M. (2009). Temporal structure of receptor neuron input to the olfactory bulb imaged in behaving rats. *Journal of Neurophysiology*, 101(2), 1073–1088. <https://doi.org/10.1152/jn.90902.2008>
- Carmichael, S. T., Clugnet, M. C., & Price, J. L. (1994). Central olfactory connections in the macaque monkey. *The Journal of Comparative Neurology*, 346(3), 403–434. <https://doi.org/10.1002/cne.903460306>
- Chanauria, N., Bharmauria, V., Bachatene, L., Cattani, S., Rouat, J., & Molotchnikoff, S. (2016). Comparative effects of adaptation on layers II-III and V-VI neurons in cat V1. *The European Journal of Neuroscience*, 44(12), 3094–3104. <https://doi.org/10.1111/ejn.13439>
- Chao, O. Y., Huston, J. P., Li, J.-S., Wang, A.-L., & de Souza Silva, M. A. (2016). The medial prefrontal cortex-lateral entorhinal cortex circuit is essential for episodic-like memory and associative object-recognition. *Hippocampus*, 26(5), 633–645. <https://doi.org/10.1002/hipo.22547>
- Chapuis, J., & Wilson, D. A. (2011). Bidirectional plasticity of cortical pattern recognition and behavioral sensory acuity. *Nature Neuroscience*, 15(1), 155–161. <https://doi.org/10.1038/nn.2966>
- Choi, G. B., Stettler, D. D., Kallman, B. R., Bhaskar, S. T., Fleischmann, A., & Axel, R. (2011). Driving opposing behaviors with ensembles of piriform neurons. *Cell*, 146(6), 1004–1015. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.041>
- Cooke, S. F., Komorowski, R. W., Kaplan, E. S., Gavornik, J. P., & Bear, M. F. (2015). Visual recognition memory, manifested as long-term habituation, requires synaptic plasticity in V1. *Nature Neuroscience*, 18(2), 262–271. <https://doi.org/10.1038/nn.3920>
- Courtio, E., & Wilson, D. A. (2017). The Olfactory Mosaic: Bringing an Olfactory Network Together for Odor Perception. *Perception*, 46(3–4), 320–332. <https://doi.org/10.1177/0301006616663216>

- Daniel J. Millman & Venkatesh N. Murthy. (2020). Rapid Learning of Odor-Value Association in the Olfactory Striatum. *The Journal of Neuroscience*, 40(22), 4335. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2604-19.2020>
- Davison, I. G., & Ehlers, M. D. (2011). Neural Circuit Mechanisms for Pattern Detection and Feature Combination in Olfactory Cortex. *Neuron*, 70(1), 82–94. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.02.047>
- Deshmukh, S. S., & Knierim, J. J. (2011). Representation of non-spatial and spatial information in the lateral entorhinal cortex. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 5, 69. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2011.00069>
- Donato, F., Rompani, S. B., & Caroni, P. (2013). Parvalbumin-expressing basket-cell network plasticity induced by experience regulates adult learning. *Nature*, 504(7479), 272–276. <https://doi.org/10.1038/nature12866>
- Dragoi, V., Sharma, J., & Sur, M. (2000). Adaptation-Induced Plasticity of Orientation Tuning in Adult Visual Cortex. *Neuron*, 28(1), 287–298. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)00103-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)00103-3)
- Eichenbaum, H. (2017). On the Integration of Space, Time, and Memory. *Neuron*, 95(5), 1007–1018. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.06.036>
- Eisthen, H. L. (2002). Why Are Olfactory Systems of Different Animals So Similar? *Brain Behavior and Evolution*, 59(5–6), 273–293. <https://doi.org/10.1159/000063564>
- Ekstrom, A. D., & Hill, P. F. (2023). Spatial navigation and memory: A review of the similarities and differences relevant to brain models and age. *Neuron*, 111(7), 1037–1049. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2023.03.001>
- Federman, N., Romano, S. A., Amigo-Duran, M., Salomon, L., & Marin-Burgin, A. (2024). Acquisition of non-olfactory encoding improves odour discrimination in olfactory cortex. *Nature Communications*, 15(1), 5572. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-49897-4>
- Fiser, A., Mahringer, D., Oyibo, H. K., Petersen, A. V., Leinweber, M., & Keller, G. B. (2016). Experience-dependent spatial expectations in mouse visual cortex. *Nature Neuroscience*, 19(12), 1658–1664. <https://doi.org/10.1038/nn.4385>

- Franks, K. M., Russo, M. J., Sosulski, D. L., Mulligan, A. A., Siegelbaum, S. A., & Axel, R. (2011). Recurrent circuitry dynamically shapes the activation of piriform cortex. *Neuron*, 72(1), 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.08.020>
- Fritz, J., Shamma, S., Elhilali, M., & Klein, D. (2003). Rapid task-related plasticity of spectrotemporal receptive fields in primary auditory cortex. *Nature Neuroscience*, 6(11), 1216–1223. <https://doi.org/10.1038/nn1141>
- Froemke, R. C. (2015). Plasticity of cortical excitatory-inhibitory balance. *Annual Review of Neuroscience*, 38, 195–219. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-071714-034002>
- Fu, Y., Tucciarone, J. M., Espinosa, J. S., Sheng, N., Darcy, D. P., Nicoll, R. A., Huang, Z. J., & Stryker, M. P. (2014). A cortical circuit for gain control by behavioral state. *Cell*, 156(6), 1139–1152. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.050>
- Fulton, K. A., Zimmerman, D., Samuel, A., Vogt, K., & Datta, S. R. (2024). Common principles for odour coding across vertebrates and invertebrates. *Nature Reviews Neuroscience*, 25(7), 453–472. <https://doi.org/10.1038/s41583-024-00822-0>
- Fusi, S., Miller, E. K., & Rigotti, M. (2016). Why neurons mix: High dimensionality for higher cognition. *Current Opinion in Neurobiology*, 37, 66–74. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2016.01.010>
- Gdalyahu, A., Tring, E., Polack, P.-O., Gruver, R., Golshani, P., Fanselow, M. S., Silva, A. J., & Trachtenberg, J. T. (2012). Associative Fear Learning Enhances Sparse Network Coding in Primary Sensory Cortex. *Neuron*, 75(1), 121–132. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.04.035>
- Ghosh, S., Reuveni, I., Lamprecht, R., & Barkai, E. (2015). Persistent CaMKII Activation Mediates Learning-Induced Long-Lasting Enhancement of Synaptic Inhibition. *Journal of Neuroscience*, 35(1), 128–139. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2123-14.2015>
- Gilbert, C. D., & Li, W. (2013). Top-down influences on visual processing. *Nature Reviews. Neuroscience*, 14(5), 10.1038/nrn3476. <https://doi.org/10.1038/nrn3476>
- Gilbert, C. D., Sigman, M., & Crist, R. E. (2001). The Neural Basis of Perceptual Learning. *Neuron*, 31(5), 681–697. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00424-X](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00424-X)
- Gire, D. H., Whitesell, J. D., Doucette, W., & Restrepo, D. (2013). Information for decision-making and stimulus identification is multiplexed in sensory cortex. *Nature Neuroscience*, 16(8), 991–993. <https://doi.org/10.1038/nn.3432>

- Gottfried, J. A. (2010). Central mechanisms of odour object perception. *Nature Reviews. Neuroscience*, 11(9), 628–641. <https://doi.org/10.1038/nrn2883>
- Gourévitch, B., & Eggermont, J. J. (2008). Spectro-temporal sound density-dependent long-term adaptation in cat primary auditory cortex. *The European Journal of Neuroscience*, 27(12), 3310–3321. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06265.x>
- Haberly, L. B. (1983). Structure of the piriform cortex of the opossum. I. Description of neuron types with golgi methods. *Journal of Comparative Neurology*, 213(2), 163–187. <https://doi.org/10.1002/cne.902130205>
- Haberly, L. B. (2001). Parallel-distributed Processing in Olfactory Cortex: New Insights from Morphological and Physiological Analysis of Neuronal Circuitry. *Chemical Senses*, 26(5), 551–576. <https://doi.org/10.1093/chemse/26.5.551>
- Haberly, L. B., & Price, J. L. (1978). Association and commissural fiber systems of the olfactory cortex of the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 178(4), 711–740. <https://doi.org/10.1002/cne.901780408>
- Hagiwara, A., Pal, S., Sato, T., Wienisch, M., & Murthy, V. (2012). Optophysiological analysis of associational circuits in the olfactory cortex. *Frontiers in Neural Circuits*, 6, 18. <https://doi.org/10.3389/fncir.2012.00018>
- Hardcastle, K., Maheswaranathan, N., Ganguli, S., & Giocomo, L. M. (2017). A Multiplexed, Heterogeneous, and Adaptive Code for Navigation in Medial Entorhinal Cortex. *Neuron*, 94(2), 375–387.e7. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.03.025>
- Hasselmo, M. E., & Barkai, E. (1995). Cholinergic modulation of activity-dependent synaptic plasticity in the piriform cortex and associative memory function in a network biophysical simulation. *Journal of Neuroscience*, 15(10), 6592–6604. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-10-06592.1995>
- Hawkins, R. D., Abrams, T. W., Carew, T. J., & Kandel, E. R. (1983). A Cellular Mechanism of Classical Conditioning in Aplysia: Activity-Dependent Amplification of Presynaptic Facilitation. *Science*, 219(4583), 400–405. <https://doi.org/10.1126/science.6294833>
- Hebb, D.O. (1949). *The Organization Of Behavior*. <http://archive.org/details/in.ernet.dli.2015.226341>
- Helfrich, R. F., & Knight, R. T. (2019). Cognitive neurophysiology of the prefrontal cortex. *Handbook of Clinical Neurology*, 163, 35–59. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804281-6.00003-3>

- Herrero, J. L., Roberts, M. J., Delicato, L. S., Gieselmann, M. A., Dayan, P., & Thiele, A. (2008). Acetylcholine contributes through muscarinic receptors to attentional modulation in V1. *Nature*, 454(7208), 1110–1114. <https://doi.org/10.1038/nature07141>
- Hubel, D. H., & Wiesel, T. N. (1962). Receptive fields, binocular interaction and functional architecture in the cat's visual cortex. *The Journal of Physiology*, 160(1), 106–154. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1962.sp006837>
- Hubel, D. H., & Wiesel, T. N. (1977). Ferrier lecture—Functional architecture of macaque monkey visual cortex. *Proceedings of the Royal Society of London. B. Biological Sciences*, 198(1130), 1–59. <https://doi.org/10.1098/rspb.1977.0085>
- Hunsaker, M. R., Chen, V., Tran, G. T., & Kesner, R. P. (2013). 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(5), 380–391. <https://doi.org/10.1002/hipo.22097>
- Illig, K. R. (2005). Projections from orbitofrontal cortex to anterior piriform cortex in the rat suggest a role in olfactory information processing. *The Journal of Comparative Neurology*, 488(2), 224–231. <https://doi.org/10.1002/cne.20595>
- Insausti, R., Marcos, P., Arroyo-Jiménez, M. M., Blaizot, X., & Martínez-Marcos, A. (2002). Comparative aspects of the olfactory portion of the entorhinal cortex and its projection to the hippocampus in rodents, nonhuman primates, and the human brain. *Brain Research Bulletin*, 57(3–4), 557–560. [https://doi.org/10.1016/s0361-9230\(01\)00684-0](https://doi.org/10.1016/s0361-9230(01)00684-0)
- Jaramillo, S., & Zador, A. M. (2011). The auditory cortex mediates the perceptual effects of acoustic temporal expectation. *Nature Neuroscience*, 14(2), 246–251. <https://doi.org/10.1038/nn.2688>
- Johnson, B. A., & Leon, M. (2007). Chemotopic odorant coding in a mammalian olfactory system. *The Journal of Comparative Neurology*, 503(1), 1–34. <https://doi.org/10.1002/cne.21396>
- Johnson, D. M., Illig, K. R., Behan, M., & Haberly, L. B. (2000). 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. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 20(18), 6974–6982. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-18-06974.2000>

- Jordan, R., Kollo, M., & Schaefer, A. T. (2018). Sniffing Fast: Paradoxical Effects on Odor Concentration Discrimination at the Levels of Olfactory Bulb Output and Behavior. *eNeuro*, 5(5), ENEURO.0148-18.2018. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0148-18.2018>
- Kadohisa, M., & Wilson, D. A. (2006). Separate encoding of identity and similarity of complex familiar odors in piriform cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(41), 15206–15211. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604313103>
- Kandel, E. R., Koester, J. D., Mack, S. H., & Siegelbaum. (2021). *Principles of Neural Science*. <https://neurology.mhmedical.com/book.aspx?bookid=3024>
- Kapur, A., Pearce, R. A., Lytton, W. W., & Haberly, L. B. (1997). GABAA-Mediated IPSCs in Piriform Cortex Have Fast and Slow Components With Different Properties and Locations on Pyramidal Cells. *Journal of Neurophysiology*, 78(5), 2531–2545. <https://doi.org/10.1152/jn.1997.78.5.2531>
- Kato, H. K., Gillet, S. N., & Isaacson, J. S. (2015). Flexible Sensory Representations in Auditory Cortex Driven by Behavioral Relevance. *Neuron*, 88(5), 1027–1039. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.10.024>
- Kaufman, M. T., Benna, M. K., Rigotti, M., Stefanini, F., Fusi, S., & Churchland, A. K. (2022). The implications of categorical and category-free mixed selectivity on representational geometries. *Current Opinion in Neurobiology*, 77, 102644. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2022.102644>
- Kehl, M. S., Mackay, S., Ohla, K., Schneider, M., Borger, V., Surges, R., Spehr, M., & Mormann, F. (2024). Single-neuron representations of odours in the human brain. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-08016-5>
- Kerr, K. M., Agster, K. L., Furtak, S. C., & Burwell, R. D. (2007). Functional neuroanatomy of the parahippocampal region: The lateral and medial entorhinal areas. *Hippocampus*, 17(9), 697–708. <https://doi.org/10.1002/hipo.20315>
- Khan, A. G., & Hofer, S. B. (2018). Contextual signals in visual cortex. *Current Opinion in Neurobiology*, 52, 131–138. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.05.003>
- Kohn, A. (2007). Visual Adaptation: Physiology, Mechanisms, and Functional Benefits. *Journal of Neurophysiology*, 97(5), 3155–3164. <https://doi.org/10.1152/jn.00086.2007>

- Kuchibhotla, K. V., Gill, J. V., Lindsay, G. W., Papadoyannis, E. S., Field, R. E., Sten, T. A. H., Miller, K. D., & Froemke, R. C. (2017). Parallel processing by cortical inhibition enables context-dependent behavior. *Nature Neuroscience*, 20(1), 62–71. <https://doi.org/10.1038/nn.4436>
- Kuruvilla, M. V., & Ainge, J. A. (2017). Lateral Entorhinal Cortex Lesions Impair Local Spatial Frameworks. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 11, 30. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2017.00030>
- Lanting, C. P., Briley, P. M., Sumner, C. J., & Krumbholz, K. (2013). Mechanisms of adaptation in human auditory cortex. *Journal of Neurophysiology*, 110(4), 973–983. <https://doi.org/10.1152/jn.00547.2012>
- Large, A. M., Vogler, N. W., Mielo, S., & Oswald, A.-M. M. (2016). Balanced feedforward inhibition and dominant recurrent inhibition in olfactory cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(8), 2276–2281. <https://doi.org/10.1073/pnas.1519295113>
- Lee, A. M., Hoy, J. L., Bonci, A., Wilbrecht, L., Stryker, M. P., & Niell, C. M. (2014). Identification of a brainstem circuit regulating visual cortical state in parallel with locomotion. *Neuron*, 83(2), 455–466. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.06.031>
- Letzkus, J. J., Wolff, S. B. E., & Lüthi, A. (2015). Disinhibition, a Circuit Mechanism for Associative Learning and Memory. *Neuron*, 88(2), 264–276. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.09.024>
- Letzkus, J. J., Wolff, S. B. E., Meyer, E. M. M., Tovote, P., Courtin, J., Herry, C., & Lüthi, A. (2011). A disinhibitory microcircuit for associative fear learning in the auditory cortex. *Nature*, 480(7377), 331–335. <https://doi.org/10.1038/nature10674>
- Li, W., Howard, J. D., Parrish, T. B., & Gottfried, J. A. (2008). Aversive Learning Enhances Perceptual and Cortical Discrimination of Indiscriminable Odor Cues. *Science*, 319(5871), 1842–1845. <https://doi.org/10.1126/science.1152837>
- Litaudon, P., Amat, C., Bertrand, B., Vigouroux, M., & Buonviso, N. (2003). Piriform cortex functional heterogeneity revealed by cellular responses to odours. *European Journal of Neuroscience*, 17(11), 2457–2461. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02654.x>
- Luna, V. M., & Morozov, A. (2012). Input-specific excitation of olfactory cortex microcircuits. *Frontiers in Neural Circuits*, 6, 69. <https://doi.org/10.3389/fncir.2012.00069>

- Majak, K., Rönkkö, S., Kemppainen, S., & Pitkänen, A. (2004). Projections from the amygdaloid complex to the piriform cortex: A PHA-L study in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 476(4), 414–428. <https://doi.org/10.1002/cne.20233>
- Makino, H., & Komiyama, T. (2015). Learning enhances the relative impact of top-down processing in the visual cortex. *Nature Neuroscience*, 18(8), 1116–1122. <https://doi.org/10.1038/nn.4061>
- Marshall, W. H., Woolsey, C. N., & Bard, P. (1941). Observations on cortical somatic sensory mechanisms of cat and monkey. *Journal of Neurophysiology*, 4(1), 1–24. <https://doi.org/10.1152/jn.1941.4.1.1>
- McGann, J. P. (2015). Associative learning and sensory neuroplasticity: How does it happen and what is it good for? *Learning & Memory*, 22(11), 567–576. <https://doi.org/10.1101/lm.039636.115>
- McGinley, M. J., Vinck, M., Reimer, J., Batista-Brito, R., Zagha, E., Cadwell, C. R., Tolias, A. S., Cardin, J. A., & McCormick, D. A. (2015). Waking State: Rapid Variations Modulate Neural and Behavioral Responses. *Neuron*, 87(6), 1143–1161. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.09.012>
- McNaughton, B. L., & Morris, R. G. M. (1987). Hippocampal synaptic enhancement and information storage within a distributed memory system. *Trends in Neurosciences*, 10(10), 408–415. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(87\)90011-7](https://doi.org/10.1016/0166-2236(87)90011-7)
- Merzenich, M. M., Knight, P. L., & Roth, G. L. (1973). Cochleotopic organization of primary auditory cortex in the cat. *Brain Research*, 63, 343–346. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(73\)90101-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(73)90101-7)
- Miura, K., Mainen, Z. F., & Uchida, N. (2012). Odor representations in olfactory cortex: Distributed rate coding and decorrelated population activity. *Neuron*, 74(6), 1087–1098. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.04.021>
- Mombaerts, P., Wang, F., Dulac, C., Chao, S. K., Nemes, A., Mendelsohn, M., Edmondson, J., & Axel, R. (1996). Visualizing an olfactory sensory map. *Cell*, 87(4), 675–686. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81387-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81387-2)
- Morris, J. S., Friston, K. J., & Dolan, R. J. (1998). Experience-dependent modulation of tonotopic neural responses in human auditory cortex. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 265(1397), 649–657. <https://doi.org/10.1098/rspb.1998.0343>
- Musall, S., Kaufman, M. T., Juavinett, A. L., Gluf, S., & Churchland, A. K. (2019). Single-trial neural dynamics are dominated by richly varied movements. *Nature Neuroscience*, 22(10), 1677–1686. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0502-4>

- Nagappan, S., & Franks, K. M. (2021). Parallel processing by distinct classes of principal neurons in the olfactory cortex. *eLife*, 10. <https://doi.org/10.7554/eLife.73668>
- Nagayama, S., Enerva, A., Fletcher, M. L., Masurkar, A. V., Igarashi, K. M., Mori, K., & Chen, W. R. (2010). Differential Axonal Projection of Mitral and Tufted Cells in the Mouse Main Olfactory System. *Frontiers in Neural Circuits*, 4. <https://doi.org/10.3389/fncir.2010.00120>
- Neville, K. R., & Haberly, L. B. (2004). Olfactory Cortex. In G. M. Shepherd (Ed.), *The Synaptic Organization of the Brain* (p. 0). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780195159561.003.0010>
- Niell, C. M., & Stryker, M. P. (2010). Modulation of visual responses by behavioral state in mouse visual cortex. *Neuron*, 65(4), 472–479. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.01.033>
- Ogando, M. B., Pedroncini, O., Federman, N., Romano, S. A., Brum, L. A., Lanuza, G. M., Refojo, D., & Marin-Burgin, A. (2021). Cholinergic modulation of dentate gyrus processing through dynamic reconfiguration of inhibitory circuits. *Cell Reports*, 36(8), 109572. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109572>
- Ohl, F. W., & Scheich, H. (2005). Learning-induced plasticity in animal and human auditory cortex. *Current Opinion in Neurobiology*, 15(4), 470–477. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2005.07.002>
- Ottenheimer, D. J., Hjort, M. M., Bowen, A. J., Steinmetz, N. A., & Stuber, G. D. (2023). A stable, distributed code for cue value in mouse cortex during reward learning. *eLife*, 12, RP84604. <https://doi.org/10.7554/eLife.84604>
- O'Reilly, R. C., & Rudy, J. W. (2001). Conjunctive representations in learning and memory: Principles of cortical and hippocampal function. *Psychological Review*, 108(2), 311–345. <https://doi.org/10.1037/0033-295x.108.2.311>
- Park, I. M., Meister, M. L. R., Huk, A. C., & Pillow, J. W. (2014a). Encoding and decoding in parietal cortex during sensorimotor decision-making. *Nature Neuroscience*, 17(10), 1395–1403. <https://doi.org/10.1038/nn.3800>
- Park, I. M., Meister, M. L. R., Huk, A. C., & Pillow, J. W. (2014b). Encoding and decoding in parietal cortex during sensorimotor decision-making. *Nature Neuroscience*, 17(10), 1395–1403. <https://doi.org/10.1038/nn.3800>

- Parker, P. R. L., Brown, M. A., Smear, M. C., & Niell, C. M. (2020). Movement-Related Signals in Sensory Areas: Roles in Natural Behavior. *Trends in Neurosciences*, 43(8), 581–595. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2020.05.005>
- Pavlov (1927), P. I. (2010). Conditioned reflexes: An investigation of the physiological activity of the cerebral cortex. *Annals of Neurosciences*, 17(3), 136–141. <https://doi.org/10.5214/ans.0972-7531.1017309>
- Paxinos, G., & Franklin, K. B. J. (2012). *Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Elsevier Science.
- Pedroncini, O., Federman, N., & Marin-Burgin, A. (2024). Lateral entorhinal cortex afferents reconfigure the activity in piriform cortex circuits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 121(48), e2414038121. <https://doi.org/10.1073/pnas.2414038121>
- Pillow, J. W., Shlens, J., Paninski, L., Sher, A., Litke, A. M., Chichilnisky, E. J., & Simoncelli, E. P. (2008). Spatio-temporal correlations and visual signalling in a complete neuronal population. *Nature*, 454(7207), 995–999. <https://doi.org/10.1038/nature07140>
- Polley, D. B., Read, H. L., Storace, D. A., & Merzenich, M. M. (2007). Multiparametric auditory receptive field organization across five cortical fields in the albino rat. *Journal of Neurophysiology*, 97(5), 3621–3638. <https://doi.org/10.1152/jn.01298.2006>
- Poo, C., Agarwal, G., Bonacchi, N., & Mainen, Z. F. (2022). Spatial maps in piriform cortex during olfactory navigation. *Nature*, 601(7894), 595–599. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04242-3>
- Poo, C., & Isaacson, J. S. (2009). Odor Representations in Olfactory Cortex: “Sparse” Coding, Global Inhibition, and Oscillations. *Neuron*, 62(6), 850–861. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.05.022>
- Poo, C., & Isaacson, J. S. (2011). A major role for intracortical circuits in the strength and tuning of odor-evoked excitation in olfactory cortex. *Neuron*, 72(1), 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.08.015>
- Poort, J., Khan, A. G., Pachitariu, M., Nemri, A., Orsolic, I., Krupic, J., Bauza, M., Sahani, M., Keller, G. B., Mrsic-Flogel, T. D., & Hofer, S. B. (2015). Learning Enhances Sensory and Multiple Non-sensory Representations in Primary Visual Cortex. *Neuron*, 86(6), 1478–1490. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.05.037>

- Price, J. L. (1973). An autoradiographic study of complementary laminar patterns of termination of afferent fibers to the olfactory cortex. *The Journal of Comparative Neurology*, 150(1), 87–108. <https://doi.org/10.1002/cne.901500105>
- Recanzone, G. H., Merzenich, M. M., & Jenkins, W. M. (1992). Frequency discrimination training engaging a restricted skin surface results in an emergence of a cutaneous response zone in cortical area 3a. *Journal of Neurophysiology*, 67(5), 1057–1070. <https://doi.org/10.1152/jn.1992.67.5.1057>
- Recanzone, G. H., Merzenich, M. M., & Schreiner, C. E. (1992). Changes in the distributed temporal response properties of SI cortical neurons reflect improvements in performance on a temporally based tactile discrimination task. *Journal of Neurophysiology*, 67(5), 1071–1091. <https://doi.org/10.1152/jn.1992.67.5.1071>
- Recanzone, G. H., Schreiner, C. E., & Merzenich, M. M. (1993). Plasticity in the frequency representation of primary auditory cortex following discrimination training in adult owl monkeys. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 13(1), 87–103. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.13-01-00087.1993>
- Rennaker, R. L., Chen, C.-F. F., Ruyle, A. M., Sloan, A. M., & Wilson, D. A. (2007). Spatial and temporal distribution of odorant-evoked activity in the piriform cortex. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(7), 1534–1542. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4072-06.2007>
- Rigotti, M., Barak, O., Warden, M. R., Wang, X.-J., Daw, N. D., Miller, E. K., & Fusi, S. (2013). The importance of mixed selectivity in complex cognitive tasks. *Nature*, 497(7451), 585–590. <https://doi.org/10.1038/nature12160>
- Rikhye, R. V., Gilra, A., & Halassa, M. M. (2018). Thalamic regulation of switching between cortical representations enables cognitive flexibility. *Nature Neuroscience*, 21(12), 1753–1763. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0269-z>
- Roesch, M. R., Stalnaker, T. A., & Schoenbaum, G. (2007). Associative Encoding in Anterior Piriform Cortex versus Orbitofrontal Cortex during Odor Discrimination and Reversal Learning. *Cerebral Cortex*, 17(3), 643–652. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhk009>
- Rolls, E. T., & Treves, A. (1998). *Neural Networks and Brain Function*. Oxford University Press.

- Saleem, A. B., Diamanti, E. M., Fournier, J., Harris, K. D., & Carandini, M. (2018). Coherent encoding of subjective spatial position in visual cortex and hippocampus. *Nature*, 562(7725), 124–127. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0516-1>
- Schiltz, E., Broux, M., Aydin, C., Goncalves, P., & Haesler, S. (2025). Experience shapes the transformation of olfactory representations along the cortico-hippocampal pathway. *eLife*, 13. <https://doi.org/10.7554/eLife.103373.2>
- Schmitt, L. I., Wimmer, R. D., Nakajima, M., Happ, M., Mofakham, S., & Halassa, M. M. (2017). Thalamic amplification of cortical connectivity sustains attentional control. *Nature*, 545(7653), 219–223. <https://doi.org/10.1038/nature22073>
- Schneider, D. M., Nelson, A., & Mooney, R. (2014). A synaptic and circuit basis for corollary discharge in the auditory cortex. *Nature*, 513(7517), 189–194. <https://doi.org/10.1038/nature13724>
- Schoonover, C. E., Ohashi, S. N., Axel, R., & Fink, A. J. P. (2021). Representational drift in primary olfactory cortex. *Nature*, 594(7864), 541–546. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03628-7>
- Schoups, A., Vogels, R., Qian, N., & Orban, G. (2001). Practising orientation identification improves orientation coding in V1 neurons. *Nature*, 412(6846), 549–553. <https://doi.org/10.1038/35087601>
- Schreck, M. R., Zhuang, L., Janke, E., Moberly, A. H., Bhattarai, J. P., Gottfried, J. A., Wesson, D. W., & Ma, M. (2022). State-dependent olfactory processing in freely behaving mice. *Cell Reports*, 38(9), 110450. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110450>
- Shakhawat, A. M. D., Gheidi, A., Hou, Q., Dhillon, S. K., Marrone, D. F., Harley, C. W., & Yuan, Q. (2014). Visualizing the engram: Learning stabilizes odor representations in the olfactory network. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 34(46), 15394–15401. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3396-14.2014>
- Shepherd, G. M., Rowe, T. B., & Greer, C. A. (2021). An Evolutionary Microcircuit Approach to the Neural Basis of High Dimensional Sensory Processing in Olfaction. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 15, 658480. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.658480>
- Shipley, M. T., & Ennis, M. (1996). Functional organization of olfactory system. *Journal of Neurobiology*, 30(1), 123–176. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4695\(199605\)30:1%3C123::AID-NEU11%3E3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4695(199605)30:1%3C123::AID-NEU11%3E3.0.CO;2-N)

- Shusterman, R., Sirotin, Y. B., Smear, M. C., Ahmadian, Y., & Rinberg, D. (2018). Sniff Invariant Odor Coding. *eNeuro*, 5(6), ENEURO.0149-18.2018. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0149-18.2018>
- Shusterman, R., Smear, M. C., Koulakov, A. A., & Rinberg, D. (2011). Precise olfactory responses tile the sniff cycle. *Nature Neuroscience*, 14(8), 1039–1044. <https://doi.org/10.1038/nn.2877>
- Skinner, B. F. (2019). *The Behavior of Organisms: An Experimental Analysis*. B. F. Skinner Foundation.
- Soria-Gómez, E., Bellocchio, L., Reguero, L., Lepousez, G., Martin, C., Bendahmane, M., Ruehle, S., Remmers, F., Desprez, T., Matias, I., Wiesner, T., Cannich, A., Nissant, A., Wadleigh, A., Pape, H.-C., Chiarlone, A. P., Quarta, C., Verrier, D., Vincent, P., ... Marsicano, G. (2014). The endocannabinoid system controls food intake via olfactory processes. *Nature Neuroscience*, 17(3), 407–415. <https://doi.org/10.1038/nn.3647>
- Stettler, D. D., & Axel, R. (2009). Representations of odor in the piriform cortex. *Neuron*, 63(6), 854–864. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.09.005>
- Stokes, C. C. A., & Isaacson, J. S. (2010). From dendrite to soma: Dynamic routing of inhibition by complementary interneuron microcircuits in olfactory cortex. *Neuron*, 67(3), 452–465. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.06.029>
- Suzuki, N., & Bekkers, J. M. (2007). Inhibitory interneurons in the piriform cortex. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 34(10), 1064–1069. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2007.04723.x>
- Suzuki, N., & Bekkers, J. M. (2010). Distinctive classes of GABAergic interneurons provide layer-specific phasic inhibition in the anterior piriform cortex. *Cerebral Cortex (New York, N.Y. : 1991)*, 20(12), 2971–2984. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhq046>
- Suzuki, N., & Bekkers, J. M. (2012). Microcircuits Mediating Feedforward and Feedback Synaptic Inhibition in the Piriform Cortex. *Journal of Neuroscience*, 32(3), 919–931. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4112-11.2012>
- Tsao, A., Moser, M.-B., & Moser, E. I. (2013). Traces of experience in the lateral entorhinal cortex. *Current Biology : CB*, 23(5), 399–405. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.01.036>
- Tye, K. M., Miller, E. K., Taschbach, F. H., Benna, M. K., Rigotti, M., & Fusi, S. (2024). Mixed selectivity: Cellular computations for complexity. *Neuron*, 112(14), 2289–2303. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2024.04.017>

- Ulanovsky, N., Las, L., & Nelken, I. (2003). Processing of low-probability sounds by cortical neurons. *Nature Neuroscience*, 6(4), 391–398. <https://doi.org/10.1038/nn1032>
- Van Cauter, T., Camon, J., Alvernhe, A., Elduayen, C., Sargolini, F., & Save, E. (2013). Distinct roles of medial and lateral entorhinal cortex in spatial cognition. *Cerebral Cortex (New York, N.Y. : 1991)*, 23(2), 451–459. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhs033>
- Vanderwolf, C. H., & Zibrowski, E. M. (2001). Piriform cortex β -waves: Odor-specific sensitization following repeated olfactory stimulation. *Brain Research*, 892(2), 301–308. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)03263-7](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)03263-7)
- Verhagen, J. V., Wesson, D. W., Netoff, T. I., White, J. A., & Wachowiak, M. (2007). Sniffing controls an adaptive filter of sensory input to the olfactory bulb. *Nature Neuroscience*, 10(5), 631–639. <https://doi.org/10.1038/nn1892>
- Vogels, T. P., Sprekeler, H., Zenke, F., Clopath, C., & Gerstner, W. (2011). Inhibitory Plasticity Balances Excitation and Inhibition in Sensory Pathways and Memory Networks. *Science*, 334(6062), 1569–1573. <https://doi.org/10.1126/science.1211095>
- Wang, P. Y., Boboila, C., Chin, M., Higashi-Howard, A., Shamash, P., Wu, Z., Stein, N. P., Abbott, L. F., & Axel, R. (2020). Transient and Persistent Representations of Odor Value in Prefrontal Cortex. *Neuron*, 108(1), 209–224.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.07.033>
- Wilson, D. a., & Sullivan, R. M. (2011). Cortical processing of odor objects. *Neuron*, 72(4), 506–519. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.10.027>
- Wilson, D. A. (1998). Habituation of odor responses in the rat anterior piriform cortex. *Journal of Neurophysiology*, 79(3), 1425–1440. <https://doi.org/10.1152/jn.1998.79.3.1425>
- Wilson, D. A. (2000a). Comparison of odor receptive field plasticity in the rat olfactory bulb and anterior piriform cortex. *Journal of Neurophysiology*, 84(6), 3036–3042. <https://doi.org/10.1152/jn.2000.84.6.3036>
- Wilson, D. A. (2000b). Odor specificity of habituation in the rat anterior piriform cortex. *Journal of Neurophysiology*, 83(1), 139–145. <https://doi.org/10.1152/jn.2000.83.1.139>
- Wilson, D. A. (2003). Rapid, Experience-Induced Enhancement in Odorant Discrimination by Anterior Piriform Cortex Neurons. *Journal of Neurophysiology*, 90(1), 65–72. <https://doi.org/10.1152/jn.00133.2003>

- Wilson, D. A. (2009). Olfaction as a model system for the neurobiology of mammalian short-term habituation. *Neurobiology of Learning and Memory, Special Issue: Neurobiology of Habituation*, 92(2), 199–205. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2008.07.010>
- Wilson, D. A., & Barkai, E. (2017). Olfactory Cortex. In G. M. Shepherd, S. Grillner, G. M. Shepherd, & S. Grillner (Eds.), *Handbook of Brain Microcircuits* (p. 0). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/med/9780190636111.003.0026>
- Wilson, D. A., & Stevenson, R. J. (2003a). Olfactory perceptual learning: The critical role of memory in odor discrimination. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews, The Developmental Role of the Cholinergic Basal Forebrain*, 27(4), 307–328. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(03\)00050-2](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(03)00050-2)
- Wilson, D. A., & Stevenson, R. J. (2003b). The fundamental role of memory in olfactory perception. *Trends in Neurosciences*, 26(5), 243–247. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(03\)00076-6](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(03)00076-6)
- Wilson, D. I. G., Langston, R. F., Schlesiger, M. I., Wagner, M., Watanabe, S., & Ainge, J. A. (2013). Lateral entorhinal cortex is critical for novel object-context recognition. *Hippocampus*, 23(5), 352–366. <https://doi.org/10.1002/hipo.22095>
- Wilson, D. I. G., Watanabe, S., Milner, H., & Ainge, J. A. (2013). Lateral entorhinal cortex is necessary for associative but not nonassociative recognition memory. *Hippocampus*, 23(12), 1280–1290. <https://doi.org/10.1002/hipo.22165>
- Wimmer, R. D., Schmitt, L. I., Davidson, T. J., Nakajima, M., Deisseroth, K., & Halassa, M. M. (2015). Thalamic control of sensory selection in divided attention. *Nature*, 526(7575), 705–709. <https://doi.org/10.1038/nature15398>
- Xu, N., Harnett, M. T., Williams, S. R., Huber, D., O'Connor, D. H., Svoboda, K., & Magee, J. C. (2012). Nonlinear dendritic integration of sensory and motor input during an active sensing task. *Nature*, 492(7428), 247–251. <https://doi.org/10.1038/nature11601>
- Zelano, C., Mohanty, A., & Gottfried, J. A. (2011). Olfactory Predictive Codes and Stimulus Templates in Piriform Cortex. *Neuron*, 72(1), 178–187. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.08.010>
- Zhan, C., & Luo, M. (2010). Diverse Patterns of Odor Representation by Neurons in the Anterior Piriform Cortex of Awake Mice. *Journal of Neuroscience*, 30(49), 16662–16672. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4400-10.2010>

- Zhang, X., Yan, W., Wang, W., Fan, H., Hou, R., Chen, Y., Chen, Z., Ge, C., Duan, S., Compte, A., & Li, C. T. (2019). Active information maintenance in working memory by a sensory cortex. *eLife*, 8, e43191. <https://doi.org/10.7554/eLife.43191>
- Zohary, E., Celebrini, S., Britten, K. H., & Newsome, W. T. (1994). Neuronal Plasticity That Underlies Improvement in Perceptual Performance. *Science*, 263(5151), 1289–1292. <https://doi.org/10.1126/science.8122114>