



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Programa de Maestría en Ciencias (Neurobiología)

**CARACTERIZACIÓN DE ENSAMBLES NEURONALES EN LA REGIÓN CA1 DEL
HIPOCAMPO DURANTE UNA TAREA DE NAVEGACIÓN ESPACIAL**

TESIS

Que para obtener el grado de
Maestro en Ciencias (Neurobiología)

PRESENTA:

MOISÉS ALTAMIRA CAMACHO

Tutor:

Dr. José Gerardo Rojas Piloni
Instituto de Neurobiología, UNAM

Comité tutor:

Dra. Martha Lilia Escobar Rodríguez
Facultad de Psicología, UNAM
Dr. Luis Alberto Carrillo Reid
Instituto de Neurobiología, UNAM

Querétaro Qro., Agosto 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

El desarrollo de este proyecto fue gracias al apoyo económico otorgado por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) becas nacionales 934183 y por la subvención PAPIIT-DGAPA IN201518 y CONACyT Fronteras de la Ciencia No. 846.

Le agradezco el apoyo y soporte técnico durante el transcurso de este proyecto a Cutberto Dorado Mendieta, quien además me ha dejado un ejemplo de disciplina y trabajo constante.

Le agradezco a la Dra. Deisy Gasca Martínez, responsable de la unidad de conducta del INB por su apoyo en todo momento.

Por brindar un servicio de calidad durante nuestras clases, le agradezco a la Lic. Ma. de Lourdes Lara Ayala responsable de la unidad de videoconferencia del INB.

Le agradezco al Ing. Ramón Martínez Olvera, responsable de la unidad de cómputo del INB por su ayuda y amabilidad.

Le agradezco al MVZ. José Martín García Servín, responsable del laboratorio universitario de bioterio, por proporcionarnos los animales y cuidar de ellos.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A todos los profesores que participaron en nuestra formación académica.

Un profundo agradecimiento al Dr. Gerardo Rojas Piloni, por instruirme, por su atención y por tener siempre tiempo para sus alumnos.

A los miembros del comité tutor, Dra. Martha Escobar y Dr. Luis Carrillo por la disponibilidad de colaborar en este proyecto, les agradezco sus comentarios y observaciones que siempre estuvieron en pro de enriquecer el proyecto.

A los miembros del jurado, Dra. Gina Lorena Quirarte, Dr. Luis Carrillo, Dr. Luis Téllez y al Dr. Juan Antonio Pichardo por acceder y colaborar en la revisión de este trabajo.

A todo el equipo de trabajo del laboratorio de Integración Sensoriomotora. Al Dr. Piloni y a la Dra. Mónica, que con su trabajo y ejemplo nos han mostrado el valor de la familia. A Rafa, o como nunca le digo al Dr. Rafa, por estar siempre dispuesto a enseñar y por compartir con entusiasmo su conocimiento de manera desinteresada. A ellos que han abierto en mi una nueva perspectiva en la ciencia. A mis compañeros de laboratorio, Pao, Laura, Vero, Angie, Barbara, Frida, Martín y Ale que siempre estuvieron ahí para brindar su ayuda cuando se necesitaba. A Cut, por apoyarnos en todo lo necesario y por desempeñarse de manera ejemplar en su trabajo.

A mis compañeros y amigos de generación. A Pao, Francisco y Jose que hicieron más amena la maestría.

A Ernesto y Delia, un matrimonio ejemplar, quienes nos hicieron sentir parte de su familia.

A la familia Villalobos por sus consejos y apoyo durante este proceso.

DEDICATORIA

Con gran cariño dedico este trabajo a mi familia, que sin su apoyo esto no hubiera sido posible. Para mi madre, quien supo criar, formar y educar a sus cinco hijos sola, con una visión firme y una voluntad incorruptible siempre velo por nuestros estudios. En sus palabras *“El estudio es lo único que puedo darles”*. Para mis hermanos que siempre están ahí de forma incondicional.

Para Carolina y Genaro, que han formado esta pequeña familia y han compartido su tiempo y cariño.

En memoria de
Héctor Villalobos García y Ernesto De Luna Santana

9.3.1. Características del laberinto.....	25
9.3.2. Diseño del entrenamiento.....	26
9.4. ADQUISICIÓN DE IMÁGENES Y PROCESAMIENTO.....	28
9.4.1. Imágenes de conducta.....	28
9.4.2. Imágenes de calcio.....	28
9.5. DETERMINACIÓN DE ENSAMBLES NEURONALES.....	29
9.6. HISTOLOGÍA.....	30
9.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	31
10. RESULTADOS.....	32
10.1. CONDUCTA.....	32
10.1.1. Restricción de alimento.....	32
10.1.2. Curvas de aprendizaje.....	33
10.1.3. Velocidad y coordinación motora.....	34
10.2. ENSAMBLES NEURONALES EN LA NAVEGACIÓN ESPACIAL.....	37
10.2.1. Imagenología de calcio.....	37
10.2.2. Número de neuronas a través del entrenamiento.	38
10.2.3. Perfiles de activación neuronal durante los ensayos.	39
10.2.4. Determinación de ensambles neuronales.	41
10.2.4.1. Ensambles durante la fase de aprendizaje.....	45
10.2.4.2. Ensambles durante la fase del nuevo aprendizaje.....	49

10.2.4.3. Ensamblés: Aprendizaje vs Nuevo aprendizaje.	
Mismo estímulo diferente trayectoria.....	51
10.2.4.4. Ensamblés: Aprendizaje vs Nuevo aprendizaje	
Diferente estímulo misma trayectoria.....	53
11. DISCUSIÓN.....	57
11.1. CONDUCTA.....	57
11.1.1. Curvas de aprendizaje.....	57
11.1.2. Velocidad y coordinación motora.	57
11.2. ENSAMBLES NEURONALES EN LA NAVEGACIÓN ESPACIAL.....	59
11.2.1. Imagenología de calcio.....	59
11.2.2. Número de neuronas a través del entrenamiento.....	60
11.2.3. Perfiles de activación neuronal durante los ensayos.....	61
11.2.4. Determinación de ensamblés neuronales.....	63
11.2.5. Ensamblés neuronales durante la navegación espacial.....	64
12. CONCLUSIONES.....	68
13. BIBLIOGRAFÍA.....	69

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vías del hipocampo.....	11
Figura 2. Principales células espaciales.....	13
Figura 3. Conectividad de ensamblajes neuronales.....	18
Figura 4. Implante de lente GRIN en la región CA1 del hipocampo.	24
Figura 5. Peso durante las sesiones.....	32
Figura 6. Curvas de aprendizaje.	34
Figura 7. Velocidad y coordinación motora.....	36
Figura 8. Imágenes de la actividad de calcio.	37
Figura 9. Número de neuronas y aciertos durante el entrenamiento.....	39
Figura 10. Perfiles de activación neuronal.....	41
Figura 11. Eventos de calcio y distancia de centroides.....	44
Figura 12. Ensamblajes neuronales para el estímulo y la trayectoria.....	47
Figura 13. Ensamblajes neuronales durante la fase de aprendizaje.....	48
Figura 14. Ensamblajes neuronales durante la fase del nuevo aprendizaje	50
Figura 15. Ensamblajes neuronales, aprendizaje vs nuevo aprendizaje. Mismo estímulo, diferente trayectoria	52
Figura 16. Ensamblajes neuronales, aprendizaje vs nuevo aprendizaje. Diferente estímulo, misma trayectoria.....	55
Figura 17. Ensamblajes neuronales presentes en la conducta.....	56

1 RESUMEN

Una tarea fundamental de las neurociencias es entender como el cerebro procesa la información. En años recientes, nuevas herramientas han permitido seguir la actividad de múltiples neuronas y ha quedado patente que las funciones de alto orden son procesadas por conjuntos de neuronas o ensamblajes neuronales. Sin embargo, los mecanismos de cómo se forman y cómo se reconfiguran estos ensamblajes son poco entendidos. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la actividad de poblaciones de neuronas de la región CA1 del hipocampo durante el proceso de un aprendizaje, así como caracterizar la formación de ensamblajes neuronales y analizar cómo se reconfiguran por efecto de un nuevo aprendizaje. Para ello, se emplearon ratones transgénicos C57BL que expresan el indicador de calcio fluorescente GCaMP6f bajo el promotor Thy1 que permite la expresión de este indicador en neuronas piramidales. Los animales fueron entrenados en una tarea de navegación espacial guiada por estímulos sensoriales en un laberinto en "Y", mientras se registraba la actividad de calcio en neuronas mediante microscopios miniatura. Nuestros resultados muestran que hay diferentes poblaciones de neuronas que codifican para los estímulos y los recorridos, lo que permite diferenciar el entorno teniendo diferentes representaciones a nivel neuronal. Además, encontramos que hay una reconfiguración en los ensamblajes neuronales durante un nuevo aprendizaje, lo que sugiere que hay una dinámica neuronal que permite que distintos eventos se almacenen a lo largo de los días, generando una huella de memoria particular para cada experiencia.

2 RESUMEN EN INGLÉS

A fundamental question in neuroscience is to understand how the brain processes information. In recent years, the development of new tools has enabled tracking the activity of multiple neurons, and it has become apparent that high-order functions are processed by sets of neurons or neural ensembles. However, the mechanisms of how these ensembles are formed and how they are reconfigured is poorly understood. The aim of the present work was to analyze the activity of populations of neurons of the CA1 region of the hippocampus during the learning process, as well as to characterize the formation of neural ensembles and analyze how they are reconfigured due to new learning. For this, transgenic C57BL mice were used, that express the fluorescent calcium indicator GCaMP6f under the Thy1 promoter that allows the expression of this indicator in pyramidal neurons. The animals were trained in a sensory stimulus-guided spatial navigation task in a "Y" maze, while neural activity was followed using miniature microscopes and calcium imaging. Our results show that there are different populations of neurons that code for the stimuli and trajectories, which allows differentiating the environment by having different representations at the neuronal level. Furthermore, we found that there is a reconfiguration in the neural ensembles during relearning, suggesting that there are neuronal dynamics that allows different events to be stored throughout the days, generating a particular memory trace for each experience.

3 INTRODUCCIÓN

Las neurociencias contemporáneas intentan entender cómo se procesa la información en el sistema nervioso. En este sentido, la formación hipocampal de diversos mamíferos como la de primates y roedores presentan características anatómicas únicas (Andersen et al., 2006), que favorecen el estudio de procesos cognitivos de alto orden, como lo es la memoria episódica (Scoville & Milner, 1957) y la navegación espacial (O'Keefe & Nadel, 1978). El estudio de estos procesos ha sido posible gracias a aproximaciones experimentales como la ablación y lesiones de tejido cerebral (Scoville & Milner, 1957), así como la combinación de estudios conductuales con neurofisiología (O'Keefe & Nadel, 1978). Así, siguiendo un enfoque neurofisiológico con registros de célula única se ha podido relacionar la actividad de distintos tipos celulares con la codificación de características particulares del entorno, como lo son los bordes, la métrica, la dirección de la cabeza y pistas espaciales (Hartley et al., 2014). Sin embargo, a medida en que ha sido posible el registro simultáneo de varias células en el hipocampo, ha quedado patente que a mayor cantidad de información (en términos de actividad celular), la precisión en la predicción de la conducta también aumenta (Wilson & McNaughton, 1993).

Se ha sugerido que la conectividad recurrente y la actividad reverberante de las neuronas son elementos necesarios para el procesamiento de la información en el sistema nervioso (Lorente de Nó, 1933). De tal manera que se ha propuesto que conjuntos de neuronas o ensambles neuronales con actividad reverberante y sincrónica representan el sustrato básico para el procesamiento de la información

sensorial y de mecanismos cognitivos internos que producen conductas específicas (Hebb, 1949). Sin embargo, debido a las limitantes metodológicas que existían para monitorear la actividad neuronal por un largo periodo de tiempo durante la conducta, aún se desconoce cómo se construyen los ensambles neuronales bajo un proceso de aprendizaje y cómo se reconfiguran a lo largo de un nuevo aprendizaje.

Para indagar en el proceso de construcción y reconstrucción de los ensambles neuronales, se usaron ratones transgénicos C57BL que expresan el indicador de calcio fluorescente GCaMP6f en neuronas piramidales del hipocampo. Con microscopios miniatura, se siguió la actividad de calcio de poblaciones de neuronas de la región CA1 del hipocampo a lo largo de semanas en animales en libre movimiento. Se implementó una tarea conductual que consiste en un aprendizaje y un nuevo aprendizaje espacial en un laberinto en “Y”, en donde la conducta es guiada por estímulos sensoriales. Así, los animales fueron entrenados en un paradigma en donde un tono les indicaba que la recompensa estaba en el brazo derecho del laberinto y una luz en el brazo izquierdo. Cuando los animales aprendieron la tarea, se llevó a cabo un nuevo aprendizaje y los estímulos fueron invertidos, ahora la relación estímulo recorrido es: tono izquierda y luz derecha. Con esta aproximación fue posible monitorear la formación de ensambles neuronales y los cambios que presentan durante un aprendizaje.

Nuestros resultados muestran que cuando los animales son expertos, los estímulos y su respectivo recorrido son codificados por diferentes poblaciones de neuronas, lo que permite diferenciar el entorno teniendo diferentes representaciones a nivel neuronal en la región CA1 del hipocampo. Asimismo, encontramos que hay una

reconfiguración en los ensambles neuronales (en cuanto a las neuronas que los conforman) durante el nuevo aprendizaje, lo que sugiere que hay una dinámica neuronal que permite que distintos eventos se almacenen a lo largo de los días, generando una huella de memoria particular para cada experiencia.

4 ANTECEDENTES

4.1 EI HIPOCAMPO

El hipocampo es una de las regiones que, junto con el giro dentado, el subiculum, presubiculum, parasubiculum y la corteza entorrinal comprenden la formación hipocampal (Andersen et al., 2006). El hipocampo propiamente dicho a su vez se subdivide en tres regiones: CA1, CA2 y CA3 (Cornu Ammonis) (Lorente de Nó, 1934). De esta manera, mientras que en otras regiones del cerebro existen conexiones recíprocas entre las neuronas, en la formación hipocampal existe una intrínseca y compleja red de vías unidireccionales y excitatorias (David & Lavenex, 2009). Esta vía comienza en las capas superficiales de la corteza entorrinal, la cual a través de la vía perforante manda proyecciones hacia las células granulares del giro dentado y al hipocampo (**Figura 1**). Después, el giro dentado manda proyecciones a la región CA3 por la vía de las fibras musgosas. Posteriormente, la región CA3 conecta con la región CA1 mediante las colaterales de Schaffer. Por último, el ciclo se cierra cuando la región CA1 y el subiculum mandan sus axones hacia las capas profundas de la corteza entorrinal (David & Lavenex, 2009). La alta organización anatómica del hipocampo, la disposición laminar de sus principales entradas y la vía excitatoria unidireccional que presenta (Andersen et al., 2006), han

propiciado que la formación hipocampal se use como un sistema modelo en la neurobiología moderna, abarcando temas como la memoria, plasticidad sináptica, modelos de redes neuronales y computacionales, entre otros.

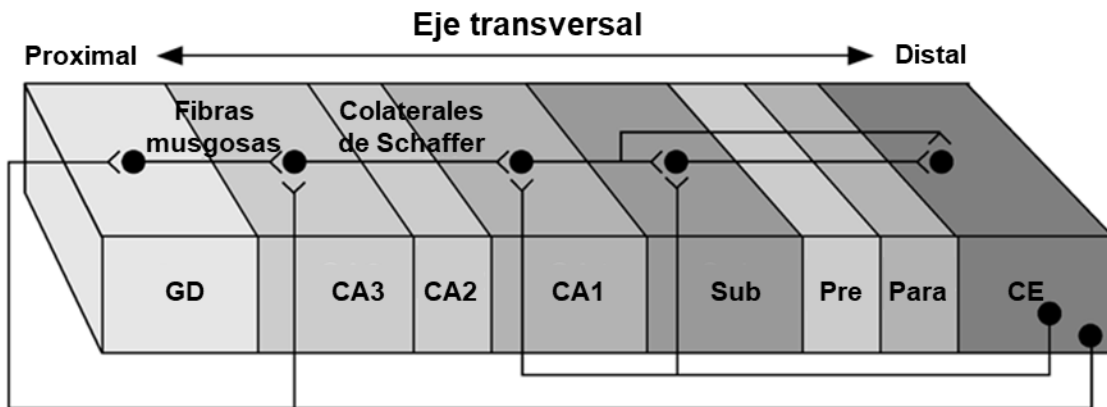


Figura 1. Vías de la formación hipocampal. Esquema representativo en dos planos de la formación hipocampal. De derecha a izquierda, CE, corteza entorrinal. Para, parasubiculum. Pre, presubiculum. Sub, subiculum. Región CA1, CA2, CA3. GD, giro dentado. Imagen modificada de Andersen et al., (2006).

4.2 FUNCIONES RELACIONADAS CON EL HIPOCAMPO

La memoria episódica y la navegación espacial son las principales funciones de la formación hipocampal que, aunque se abordan por separado, se cree que desempeñan una función de memoria asociativa (Burgess, 2007).

4.2.1 Memoria episódica

La formación hipocampal es una estructura íntimamente relacionada con el proceso de adquisición de la memoria (Scoville & Milner, 1957), sobre todo con la memoria de tipo episódica, es decir, aquella información que se recuerda de manera consciente sobre dónde y cuándo ocurrieron las experiencias (Tulving & Schacter 1990).

4.2.2 Navegación espacial

Desde un punto de vista cognitivo, la navegación espacial es el proceso por el cual un individuo integra información sensorial para orientarse y desplazarse en su entorno (Chersi & Burgess, 2015). La formación hipocampal y los ganglios basales son sistemas que modulan de manera complementaria la navegación espacial, sin embargo, cada uno de ellos implementa diferentes reglas de aprendizaje, ajustándose a las demandas específicas de cada tarea (Chersi & Burgess, 2015). Así, dependiendo del sistema podrían emplearse distintas estrategias cognitivas, por ejemplo, mediado por los ganglios basales puede disponerse de una estrategia de “*pilotaje*” siguiendo una señal sensorial que indica la ubicación específica de un lugar (Morris et al., 1982), o siguiendo una secuencia de acciones motoras aprendidas “*response learning*” (Hull, 1943). Mientras que el hipocampo se encuentra más relacionado con un sistema que permite la representación interna de las características del entorno, empleando un mapa cognitivo “*place learning*” (Tolman, 1948; O’Keefe & Nadel, 1978).

En los apartados siguientes se aborda el aporte del hipocampo en la navegación espacial a nivel de neuronas individuales y a nivel de poblaciones de neuronas.

4.2.2.1 Códigos neuronales: “células espaciales”

En la **Figura 2** se resumen las principales células espaciales que se han descrito en la formación hipocampal, las cuales participan en la codificación de distintos aspectos del espacio (Hartley et al., 2014).

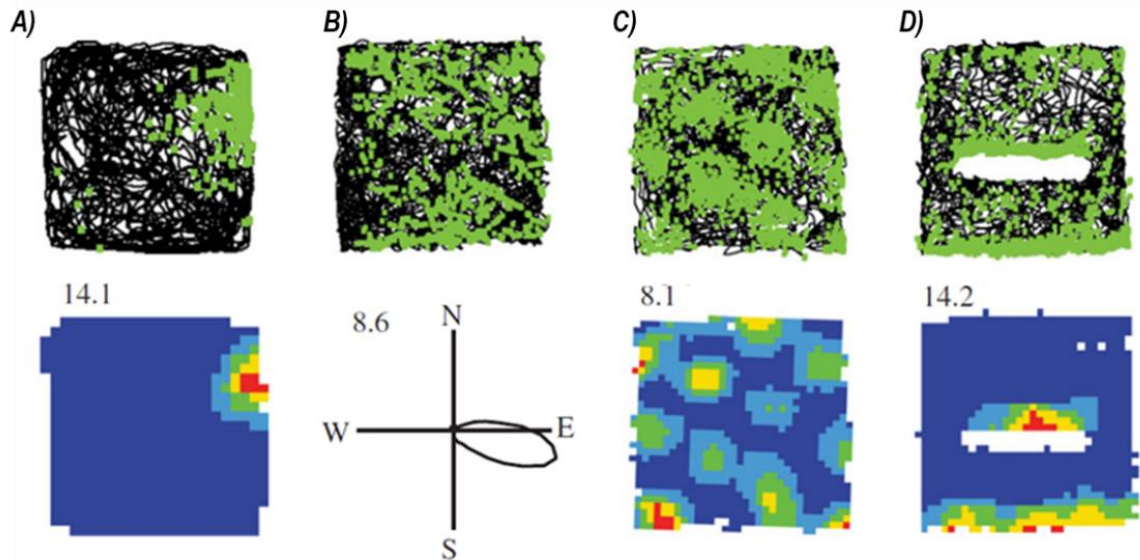


Figura 2. Principales células espaciales. A) Célula de lugar. B) Célula de dirección de la cabeza. C) Célula en rejilla. D) Célula de borde. Arriba. Se muestra el recorrido de un animal (línea negra) y el lugar en donde la célula presentó actividad (puntos verdes). Abajo. Mapas espaciales (A, C y D) y mapa polar (B) originados con la tasa de disparo neuronal. La frecuencia de disparo (en Hz) se muestra arriba de cada imagen. Imagen modificada de Hartley et al. (2014).

Las células de lugar¹, descritas en la región CA1 del hipocampo fueron las primeras de este tipo que se identificaron (O'Keefe & Dostrovsky, 1971). Las células de lugar son las principales neuronas del hipocampo y del giro dentado que por lo general presentan una tasa de disparo baja a lo largo de todo el ambiente, excepto cuando el individuo entra al campo preferente de activación², donde aumenta la tasa de disparo (**Figura 2A**) (O'Keefe, 1976). Se ha sugerido que estas células están integrando dos tipos de información, los estímulos sensoriales o pistas espaciales y otra dada por la posición misma del animal (O'Keefe, 1976). Asimismo, se ha visto que las células de lugar se asocian rápido con su campo de activación y que este

En inglés

¹ Place cells

² Place field

se mantiene estable a lo largo del tiempo, siempre que el individuo se encuentre en el mismo ambiente (Thompson & Best, 1990). Una propiedad que surge de la estabilidad del campo de activación, es que cuando el entorno presenta cierto grado de perturbación, las células de lugar son capaces de completar el patrón³ de activación solo con una parte de la información espacial (Guzowski et al., 2004), lo que explicaría la capacidad de reconocer un entorno que ha presentado modificaciones. Alternativamente, se ha reportado que las células de lugar pueden reasignar su campo⁴ de activación cuando un ambiente familiar ha sido lo suficientemente alterado, es decir, los campos de activación pueden presentar modificaciones de lugar o tamaño (Mankin et al., 2012; Muller & Kubie, 1987). Por efecto de la reasignación del campo, se lleva a cabo el proceso complementario, la separación del patrón⁵, mecanismo por el cual la representación de un mismo entorno diverge en representaciones diferentes, permitiendo disminuir la probabilidad de ejecutar una conducta inapropiada al distinguir entre dos contextos (Guzowski et al., 2004; Rolls, 2013).

Por otro lado, en tareas de campo abierto, se ha observado que los campos de activación están presentes desde que el animal está en contacto con la arena y se ha visto que no están relacionados con una acción o tarea en particular (Muller et al., 1994). Finalmente, a pesar de que las células de lugar han sido definidas por presentar tasas de disparo altas en lugares definidos, se ha visto que también

En inglés

³ Pattern completion

⁴ Remapping

⁵ Pattern separation

estímulos sensoriales olfativos, visuales (cambios de color) y auditivos pueden guiar la actividad de estas neuronas (Anderson & Jeffery, 2003)

Otro tipo celular que participa en la integración de información espacial son las células de dirección de la cabeza⁶ descritas por primera vez en el presubiculum dorsal (Taube et al., 1990). Posteriormente también se encontraron en la corteza entorrinal y fuera de la formación hipocampal en el núcleo talámico y en los cuerpos mamilares (Hartley et al., 2014). Estas células presentan una actividad alta, sintonizada con una dirección preferente de la cabeza en el eje horizontal (**Figura 2B**) (Taube et al., 1990). Se ha sugerido que las células de lugar dependen de la información direccional que proveen las células de dirección de la cabeza, ya que cambios que afecten su actividad también se ven reflejados en la inestabilidad del campo de activación de las células de lugar (Calton et al., 2003).

Como se mencionó anteriormente, la corteza entorrinal provee una de las principales entradas al hipocampo dorsal (David & Lavenex, 2009). En esta región se encuentra un tercer tipo de célula espacial, las células en rejilla⁷ (Hafting et al., 2005). Se les dio este nombre ya que al igual que las células de lugar, presentan campos de activación, pero con la diferencia de que estas presentan múltiples campos de activación dispuestos en forma de triángulos equiláteros que cubren todo el ambiente, similar a una reja (**Figura 2C**) (Hafting et al., 2005). Dadas las características de los campos de activación de cada tipo celular, ambos sistemas podrían estar funcionando en paralelo, así mientras que las células de lugar aportan

En inglés:

⁶ Head direction cells

⁷ Grid cells

información discreta de cada lugar, las células en rejilla podrían estar brindando información de la métrica del espacio en términos de la distancia, dirección, y velocidad (Moser et al., 2008). Dicho de otra manera, las células de lugar participan en la integración de las pistas espaciales y las células en rejilla en la integración del movimiento del individuo para determinar su posición (proceso llamado integración de la ruta⁸) (Moser et al., 2008).

Por último, la actividad de las células de lugar también se ve afectada por la geometría y los límites del ambiente (Muller & Kubie, 1987). Las células de borde⁹, encargadas de procesar este tipo de información se encontraron por primera vez en el subiculum (Lever et al., 2009), pero ahora se sabe que se encuentran en todas las regiones de la formación hipocámpal con excepción del hipocampo (Hartley et al., 2014). Estas células como su nombre lo indica, presentan campos de activación en los bordes del entorno (**Figura 2D**) (Lever et al., 2009).

En resumen, estos tipos celulares en conjunto podrían estar llevando a cabo la integración de información espacial. Por un lado, por el reconocimiento de pistas espaciales por parte de las células de lugar y la orientación particular del individuo por las células de dirección de la cabeza y, por otro lado, la métrica y los límites del espacio por las células en rejilla y las células de borde respectivamente.

A continuación, se describen algunos mecanismos por los cuales un conjunto de células del hipocampo procesa información durante la navegación espacial.

⁸ Path integration

⁹ Border cell

4.2.2.2 Navegación espacial: Desde la perspectiva de ensambles neuronales

La citoarquitectura del sistema nervioso está dada por conexiones múltiples y recurrentes entre las neuronas que pueden provocar actividad reverberante (**Figura 3A**) (Lorente de Nó, 1933). Bajo esta perspectiva se ha propuesto que las neuronas pueden agruparse en conjuntos celulares o *ensambles neuronales* que muestran actividad sincrónica (**Figura 3B**) (Hebb, 1949). En este supuesto, la actividad reverberante y sincrónica de los ensambles neuronales sería la responsable del procesamiento de la información sensorial y de mecanismos cognitivos internos para producir conductas específicas (Hebb, 1949). En este sentido, se han descrito propiedades estructurales y funcionales para los ensambles neuronales (Wickelgren, 1999; Sakurai, 1999):

1. Superposición: Una misma neurona puede formar parte de diferentes ensambles.
2. Codificación escasa: Un grupo pequeño de neuronas pueden codificar de manera eficiente diferente tipo de información.
3. Persistencia: La activación del ensamble persistirá en el tiempo a través de la retroalimentación debido a las sinapsis excitadoras entre las neuronas.
4. Completamiento del patrón: La activación de una parte del ensamble lo suficientemente grande podrá resultar en la activación del ensamble completo.
5. Construcción y reconstrucción dinámica: Un conjunto de neuronas que pueden estar interconectadas temporalmente por sinapsis funcionalmente flexibles.

Se ha demostrado que las neuronas de la región CA1 del hipocampo forman ensambles neuronales para procesar información espacial (Harris et al., 2003b; Wilson & McNaughton, 1993). En donde las células de lugar que forman parte del ensamble se encuentran distribuidas a lo largo de CA1 (Harris et al., 2003b). Igualmente, se ha visto que la precisión en la predicción de la trayectoria de un animal es mayor si se considera un número creciente de neuronas (Wilson & McNaughton, 1993). Lo que muestra que la conducta puede explicarse mejor si se cuenta con una mayor cantidad de información en términos de actividad neuronal.

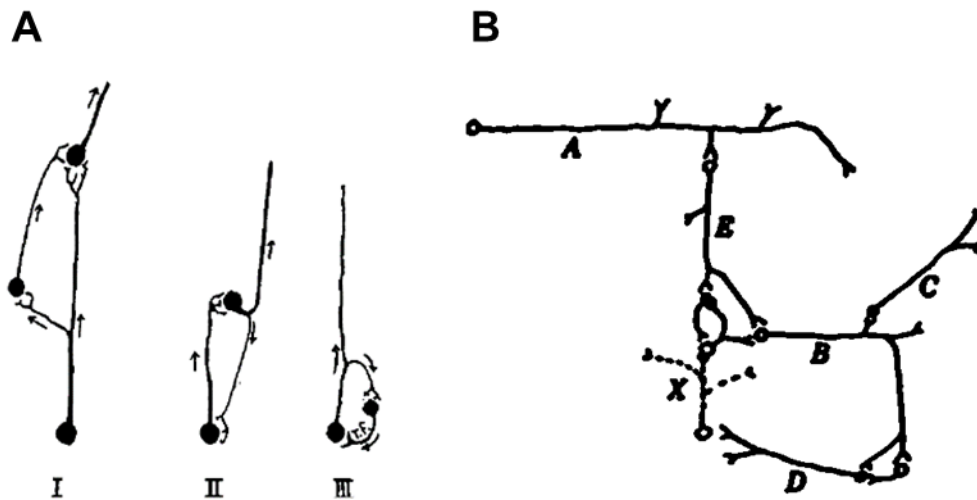


Figura 3. Conectividad de ensambles neuronales. A) Leyes de conectividad entre cadenas de neuronas, descritas por Lorente de Nó. I. Representa la ley de la conectividad múltiple. II y III representan la ley de la conectividad recíproca. Las flechas indican la dirección de la transmisión de información. B) Ilustración de un ensamble neuronal por Hebb, representado con seis elementos (en letras A-E y X). Imágenes modificadas de (Lorente de Nó ,1933) y (Hebb, 1949).

Asimismo, estudios recientes han señalado que las propiedades estructurales y funcionales de los ensambles neuronales están presentes en el hipocampo durante tareas con una demanda espacial (Cai et al., 2016; Liu et al., 2012; Rickgauer et al., 2014; Ziv et al., 2013). Así, se ha observado que la probabilidad de que haya

superposición entre dos ensambles, es mayor cuando dos memorias contextuales (adquiridas en ambientes distintos) se originan más cercanas en el tiempo (Cai et al., 2016). Sugiriendo que este mecanismo promueve un vínculo entre memorias (Cai et al., 2016).

Alternativamente, se ha encontrado que distintos grupos de neuronas se activan a lo largo de los días y que una fracción pequeña de células de lugar se mantiene constante (Rubin et al., 2015; Ziv et al., 2013), las cuales son suficientes para preservar la representación espacial a lo largo del tiempo (Ziv et al., 2013). Esto muestra que los ensambles neuronales del hipocampo codifican información empleando una mínima cantidad de elementos neuronales.

Por otro lado, si un ensamble corresponde a una huella de memoria, entonces, la activación de esta población de neuronas también puede evocar dicha memoria (Silva et al., 2009). Esto implicaría que la activación del ensamble neuronal se relaciona con una respuesta conductual. En este sentido, si se parea la activación artificial por optogenética de neuronas del giro dentado con un estímulo aversivo mientras un ratón explora una arena, es posible hacer que el animal relacione la arena con el estímulo aversivo y a su vez que se vea reflejado a nivel neuronal (Liu et al., 2012). Al paso de algunos días es posible evocar la memoria de miedo al reactivar el ensamble artificialmente sin que el animal se encuentre en la arena (Liu et al., 2012). Por un lado, esto muestra que el ensamble persiste de forma latente hasta el momento de su activación y por otro lado, que es posible evocar la conducta de miedo por el completamiento del patrón del ensamble (Cai et al., 2016; Liu et al., 2012).

Finalmente, las propiedades en la dinámica de los ensambles neuronales en el hipocampo se han estudiado en rangos de tiempo de semanas (Cai et al., 2016; Kinsky et al., 2018; Rubin et al., 2015; Ziv et al., 2013), empleando tareas de navegación espacial que van desde recorridos en arenas lineales (Ziv et al., 2013) y discriminación paralela entre dos arenas (Rubin et al., 2015), hasta tareas espaciales que implican un discriminación geométrica de las arenas (Cai et al., 2016; Kinsky et al., 2018). Tomando estas estrategias conductuales y registrando de centenas a miles de células en el transcurso de todo el entrenamiento, se ha observado que en los diferentes días el ensamble está conformado por un subconjunto diferente de neuronas (Rubin et al., 2015; Ziv et al., 2013). Se ha planteado que la información espacial puede preservarse solo con un 20% de las células que se mantienen constantes (Ziv et al., 2013). Mientras que un evento determinado puede ser representado de manera puntual con el 80% de las células restantes que cambian en el transcurso de los días (Ziv et al., 2013). Asimismo, se ha visto que la dinámica neuronal a nivel de la tasa de disparo es relevante para la discriminación entre dos ambientes (Kinsky et al., 2018; Rubin et al., 2015). Bajo este esquema, podría entenderse cómo se generan distintas huellas de memoria de eventos que ocurrieron en el mismo ambiente, pero en tiempos diferentes.

El estudio de la dinámica de los ensambles neuronales permitirá entender con mayor detalle el papel del hipocampo en la memoria episódica y particularmente en la codificación del espacio (Burguess, 2007; Rubin et al., 2015). En este trabajo se presenta una tarea de navegación espacial condicionada a estímulos sensoriales, mientras se monitorean cientos de neuronas del hipocampo. Nosotros proponemos,

que si los animales pueden acceder a un conocimiento previamente adquirido (Tosun et al., 2016) y la representación de un evento y el espacio están codificados en el hipocampo, entonces el progreso del aprendizaje de los animales quedará representado por la actividad neuronal de estas células.

5 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En sus inicios, el estudio del sistema nervioso se centró en sentar las bases fisiológicas de las neuronas, con lo que se obtuvo un amplio conocimiento para abordar innumerables patologías y entender en términos generales como se procesa la información a nivel cerebral. Con el desarrollo de nuevas tecnologías que permiten seguir la actividad de múltiples neuronas, ha quedado patente qué, para entender estadios más complejos como la memoria, el comportamiento o procesos cognitivos de alto orden, es necesario comprender como unidad funcional a un grupo de neuronas o ensambles. Por tanto, con este trabajo se pretende analizar la evolución que sigue la conectividad funcional entre grupos de neuronas del hipocampo durante el proceso de un aprendizaje espacial.

6 HIPÓTESIS

Hipótesis 1: Diferentes ensambles neuronales del hipocampo representan contextos distintos durante un proceso de aprendizaje espacial.

Hipótesis 2: Los ensambles neuronales del hipocampo formados en el aprendizaje, se reconfiguran como producto de un nuevo aprendizaje espacial.

7 OBJETIVO GENERAL

Analizar la construcción de ensambles neuronales en la región CA1 del hipocampo en una tarea de navegación espacial y su reconstrucción como producto de un nuevo aprendizaje.

8 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analizar la dinámica de la actividad de calcio en grupos de neuronas de la región CA1 del hipocampo durante un proceso de aprendizaje espacial.

Identificar a los elementos neuronales que conforman un ensamble neuronal de la región de CA1 del hipocampo durante un proceso de aprendizaje espacial.

Analizar la reconfiguración de los elementos neuronales que conforman un ensamble neuronal ante un cambio de paradigma que involucra un nuevo aprendizaje.

9 METODOLOGÍA

Con la finalidad de analizar la actividad de calcio en poblaciones de neuronas en la región CA1 del hipocampo, se utilizaron microscopios miniatura de fluorescencia mientras los animales realizaban una tarea de navegación espacial en libre movimiento.

9.1 ANIMALES EXPERIMENTALES

Se utilizaron ratones machos transgénicos de 3 - 5 meses de edad de la cepa C57BL que expresan el indicador de calcio fluorescente GCaMP6f bajo el promotor Thy1 (Thy1-GCaMP6f GP5.1Dkim/J; The Jackson Laboratory). Los ratones se mantuvieron en cajas individuales en un ciclo de 12 horas luz/obscuridad con agua libre y alimento controlado hasta que los animales presentaron el 85% de su peso corporal inicial. Los animales se habituaron al vivario durante una semana y se registró el peso y consumo de alimento.

9.2 CIRUGÍA, IMPLANTE DEL LENTE GRIN Y BASE MAGNETICA

Posterior a la habituación los animales fueron sometidos a una cirugía estereotáxica. Las cirugías fueron realizadas utilizando como anestésico una mezcla de isoflurano (1%) y oxígeno. Previo a cualquier manipulación se inyectó lidocaína (2 % s.c.) después de la anestesia. Al finalizar la cirugía y un día después se proporcionó una dosis de tramadol (0.5mg/kg) como analgésico. Las cirugías fueron realizadas bajo asepsia general. No se requirió el uso de antibióticos.

Posterior a la inducción se procedió a descubrir la parte dorsal del cráneo. Se realizó una craneotomía lateral derecha de 2 mm de diámetro a 2.05 mm anteroposterior y 1.25 mm lateral respecto a bregma. La corteza cerebral fue retirada por medio de succión bajo una constante irrigación de solución salina estéril hasta llegar a las fibras anteroposteriores del cuerpo calloso. Se continuó con la irrigación hasta controlar por completo el sangrado. El lente GRIN (en inglés *gradient-index*.) fue colocado lentamente con un manipulador. El GRIN fue sujetado con pegamento tisular (Vetbond) y acrílico dental (**Figura 4**). El GRIN se protegió con silicón hasta que se colocó la base magnética.

Implante de lente GRIN

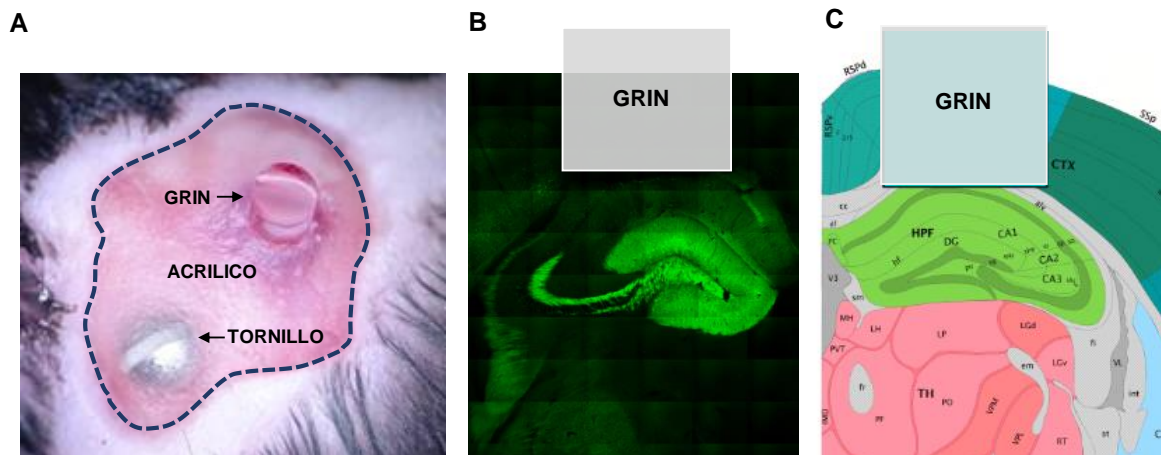


Figura 4. Implante de lente GRIN en la región CA1 del hipocampo. A) Lente GRIN en el hipocampo derecho. El tornillo se coloca para aumentar la superficie de contacto y evitar que el acrílico se desprenda. Las líneas punteadas señalan el área de remoción de piel. B) y C) corte coronal del cerebro. GRIN sobre la capa piramidal de la región CA1. C) Esquema modificado de Allen Brain Atlas, (2020)

Después de 3 a 4 semanas de recuperación se implantó la base magnética que permite fijar el microscopio. Para este procedimiento los animales fueron anestesiados como se indicó anteriormente. El campo de visión fue seleccionado

donde había vasculatura o donde se encontraron eventos de calcio de neuronas. Una vez seleccionado el campo la base se fijó con acrílico dental.

Posteriormente los animales fueron sometidos a una restricción de alimento hasta alcanzar el 85% de su peso inicial en un intervalo de una semana. En este tiempo se ajustó el campo de visión y se buscó la mayor actividad neuronal posible mientras los animales se desplazaban por su caja. Este procedimiento también sirvió para que los animales se habituaran a la manipulación y al peso del microscopio antes de ser entrenados.

9.2.1 Prueba de coordinación motora con Rotarod

Se utilizó el rotarod (eje rotatorio de 8cm de diámetro) para determinar si los animales presentaban algún daño en la coordinación motora debido a la cirugía. Se empleó un protocolo en rampa de 5 a 20 rpm en un minuto. Se realizó una sesión de habituación, una sesión antes de la cirugía y otra tres días después, cuantificando el tiempo de permanencia en el eje. Cada uno de los animales tuvo cuatro ensayos por sesión.

9.3 CONDUCTA

9.3.1 Características del laberinto

La tarea se llevó a cabo en un laberinto en Y de acrílico negro situado en un cuarto iluminado con luz blanca, aislado y libre de ruido. Las dimensiones del laberinto son; 26 cm de alto, 10 cm de ancho, 37 cm de largo para el brazo principal y 55 cm de largo para el brazo izquierdo y derecho. El brazo principal cuenta con una estación

de inicio de 18X10 cm aislada de la luz, por donde se controla la salida del animal con una compuerta manual. Fijado al techo se encuentra una cámara web para monitorear al animal. La parte superior de la estación de inicio tiene acoplado un led de luz blanca y un buzzer que emite un tono puro de 700 Hz, ambos son activados por 3 segundos. Para determinar el momento del estímulo, a un costado del laberinto se encuentran dos leds de luz blanca que encienden simultáneamente con los estímulos pero que los animales no pueden ver.

9.3.2. Diseño del entrenamiento

Para analizar el proceso de construcción del ensamble neuronal se entrenaron animales en una tarea de navegación espacial, en donde una señal de luz le indica al animal que la recompensa se encuentra al final del brazo izquierdo, mientras que una señal de tono le indica que la recompensa se encuentra al final del brazo derecho. Una vez aprendida la tarea los animales fueron sometidos a un nuevo aprendizaje para analizar la reconstrucción del ensamble. En esta segunda fase del entrenamiento las señales de salida se invierten, es decir, la luz le indica al animal que la recompensa se encuentra en el brazo derecho y el tono en el brazo izquierdo. La puerta se abre cuando la señal termina. Como recompensa se proporcionó un pellet de sacarosa de 20 mg al final de cada trayecto correcto. Con la finalidad de eliminar los olores depositados por cada animal, entre cada sesión se limpió la arena con alcohol al 70%.

El entrenamiento se llevó a cabo por aproximaciones sucesivas y consistió en dos fases (aprendizaje y nuevo aprendizaje) cómo se describe a continuación:

Fase 1 aprendizaje: Se llevó a cabo en dos etapas con una sesión por día con 16 ensayos:

- Etapa 1 (no aleatoria): Se realizó solo con un brazo del laberinto bloqueando el opuesto con una pared de acrílico para que los animales se familiarizaran con el recorrido que tenían que hacer según la señal de salida. Se llevaron a cabo un total de 5 sesiones. En cada sesión se realizaron 8 ensayos consecutivos con el estímulo auditivo mientras que el brazo izquierdo permanecía cerrado. Asimismo, se realizaron 8 ensayos consecutivos con la luz mientras que el brazo derecho permanecía cerrado.
- Etapa 2 (Aleatoria): Se realizó con ambos brazos del laberinto libres. Se llevaron a cabo un total de 25 sesiones. Los estímulos se presentaron de manera pseudoaleatoria, es decir, conservando la proporción de 8 estímulos con luz, 8 con tono y sin repetir un estímulo más de tres veces. Los animales se consideraron expertos cuando sobrepasaron el azar por más de cuatro días consecutivos.

Fase 2. Se realizó el mismo procedimiento de la Etapa 2 de la fase 1. En esta fase la luz le indica al animal que la recompensa está en el lado derecho y el tono en el lado izquierdo.

9.4 ADQUISICIÓN DE IMÁGENES Y PROCESAMIENTO

9.4.1 Imágenes de conducta

La conducta fue grabada con una cámara web Logitech B525 con una tasa de adquisición de 20 fotos por segundo. La posición de los animales fueron obtenidas con el software idTracker (Pérez-Escudero et al., 2014), mientras que el análisis de velocidad y la detección del estímulo se realizaron con código personalizado en MATLAB R2018a. En base a los leds externos, el inicio y final del estímulo fue determinado por la primera y última imagen respectivamente, que superaron el nivel de saturación de 2.5 desviaciones estándar respecto al promedio.

9.4.2 Imágenes de calcio

Las imágenes de calcio fueron adquiridas con el microscopio miniatura V2 desarrollado por la UCLA. El microscopio es conectado a una tarjeta de adquisición de datos por medio de un cable coaxial y esta a su vez transmite los datos a una computadora. Se sincronizó la señal del microscopio y la de la cámara conductual a través del software de Miniscope.

Todas las imágenes de calcio fueron procesadas con el software MIN1PIPE (Lu et al., 2018), el cual realza las huellas neuronales, corrige el movimiento en el eje "X,Y", determina las regiones de interés (ROIs) y extrae los transitorios de calcio para cada una de ellas. El tamaño del ROI se fijó a un diámetro de 5 píxeles (10 micras), tamaño aproximado de las neuronas. Para cuantificar el número de neuronas por sesión, se aplicó un factor de resolución a las imágenes de 0.5, redimensionando la

imagen a un tamaño de 240 x 376 píxeles (Lu et al., 2018). Mientras que para determinar el ensamble neuronal, se aplicó un factor de 1, dejando la imagen del tamaño original 480 x 252 píxeles.

9.5 DETERMINACIÓN DE ENSAMBLES NEURONALES

Para determinar los ensambles neuronales se tomaron en cuenta los ensayos correctos de dos sesiones, una al final del aprendizaje y otra al final del nuevo aprendizaje, cuando los animales son expertos.

Se extrajeron las huellas celulares para cada ensayo, usando como referencia el tamaño del ROI. Las huellas se alinearon usando la función “Non-rigid” del software CellReg con un factor de suavización de 0.5 (ver, Sheintuch et al., 2017).

Se consideró la primera derivada para obtener los eventos de calcio, que se definen como los valores que se encuentran por arriba del 20% de la derivada (**Figura 11A**). Dichos valores representan el incremento rápido en el transitorio de calcio (Carrillo-Reid et al., 2008). Se contabilizaron al menos tres eventos de calcio para determinar si una neurona se activó durante el estímulo o durante la trayectoria. De esta manera, se encontraron neuronas activas durante el estímulo, durante la trayectoria y en ambos momentos (**Figura 11C**).

Para determinar si una neurona se activa a través de los diferentes ensayos se tomó en cuenta la distancia euclidiana de los centroides. La distancia óptima se determinó en base a dos supuestos: 1) El tamaño del ROI es fijo (5 píxeles). Lo que implica que no se puede distinguir entre dos neuronas que están a menos de 5

pixeles de distancia. 2) La probabilidad de encontrar a un par de neuronas que estén a una distancia igual o menor que 5 pixeles en un ensayo es muy baja (9%) (**Figura 11B, 11D y 11E**). Por tanto, al buscar la presencia de una neurona entre los ensayos se consideró como la misma neurona si la distancia era menor o igual a 5 pixeles.

En primer lugar, se determinaron los ensambles que se activan durante la presencia de cada tipo de estímulo y durante las trayectorias, para la fase de aprendizaje y la del nuevo aprendizaje (Luz \cap Luz y Tono \cap Tono, también definidas como *intraensayo*) (**Figura 11F**). Para ello, se consideró que una neurona forma parte del ensamble sí estuvo presente por lo menos el 80% de los ensayos. Una vez definido el ensamble, se cuantificaron las neuronas que estuvieron compartidas para cada tipo de estímulo y trayectoria (Luz \cap Tono, también definidas como *interensayo*) (**Figura 11F**). Finalmente se cuantificaron las neuronas compartidas para la fase del aprendizaje y la del nuevo aprendizaje (ver resultados).

El procedimiento para la determinación del ensamble se realizó con códigos personalizados en MATLAB 2018a con excepción de la alineación de las imágenes.

9.6 HISTOLOGÍA

Al finalizar el entrenamiento los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (6.3 mg) y perfundidos con paraformaldehído (PFA) al 4% y buffer de fosfato con cloruro de calcio a 0.9 mmol. El cerebro fue extraído y fue fijado por 24 hrs. Posteriormente fue almacenado en sacarosa al 30% para su criopreservación. Se realizaron cortes de 50 μ m con criotomo. Las fotografías fueron tomadas con un microscopio de fluorescencia.

9.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los análisis estadísticos se hicieron con GraphPad Prisma 7. Los detalles se explican en el pie de figura. Según el caso, se aplicó una prueba de Wilcoxon, t-student para una muestra o una ANOVA de dos vías con prueba post hoc de Sidak's. En todos los casos se usó un nivel de significación de 0.05.

10 RESULTADOS

Para los resultados conductuales se consideraron 3 ratones, la cirugía y las manipulaciones experimentales se hicieron de la misma manera. Por la calidad de las imágenes, solo dos ratones se utilizaron para el análisis de las imágenes de calcio.

10.1 CONDUCTA

10.1.1 Restricción de alimento

Para mantener motivados a los animales se restringieron de alimento hasta llegar al 85% de su peso corporal (**Figura 5**), el cual se mantuvo de esta manera hasta el final del entrenamiento.

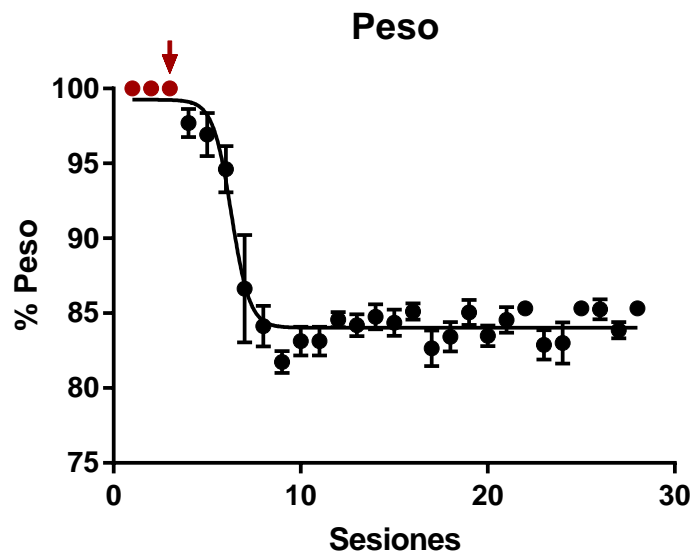


Figura 5. Peso durante las sesiones. Los tres primeros puntos (en rojo) señalan el peso basal en porcentaje. La flecha señala el inicio de la restricción de alimento. Se muestra la media \pm error estándar. $n=3$

10.1.2 Curvas de aprendizaje

Los animales fueron evaluados en dos fases, durante el aprendizaje (luz-izquierda y tono-derecha) y nuevo aprendizaje (luz-derecha y tono-izquierda), en donde se cuantificó el número de aciertos por sesión (**Figura 6**).

Para ambos casos (aprendizaje y nuevo aprendizaje) los animales superaron el azar (50% de aciertos) alrededor de la primera semana. Al comparar el desempeño obtenido durante las primeras dos sesiones contra las últimas dos, se encontraron diferencias significativas en el número de aciertos obtenidos (aprendizaje, día 1 y 2; $39.45 \pm 7.49\%$ vs experto; $66.66 \pm 5.10\%$. Nuevo aprendizaje, día 1 y 2; $38.54 \pm 8.30\%$ vs experto; $67.70 \pm 4.70\%$). Por lo tanto, se consideraron como expertos cuando alcanzaron entre 65 y 70% para el final del entrenamiento y mantuvieron este desempeño por lo menos cuatro días consecutivos (**Figura 6**).

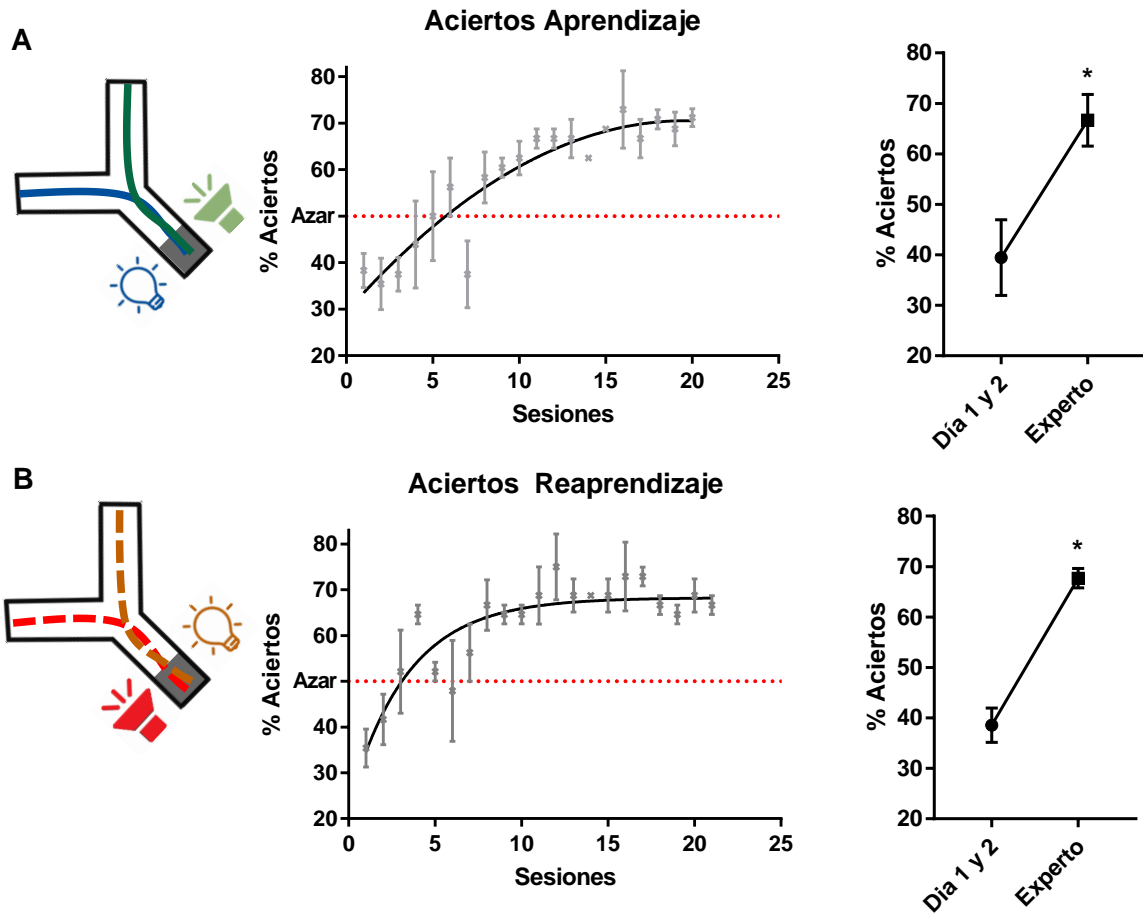


Figura 6. Curvas de aprendizaje. Izquierda, se ilustran los esquemas de entrenamiento. A) En el centro, porcentaje de aciertos durante la fase 1 en el aprendizaje. B) En el centro, porcentaje de aciertos durante la fase 2 en el nuevo aprendizaje. A y B) Derecha, comparación entre las primeras dos sesiones y las últimas dos, cuando los animales son expertos. La línea punteada representa el azar con 50% de aciertos. Se muestra la media \pm error estándar. Para ambos casos prueba t pareada, () $p < 0.0008$. $n=3$.*

10.1.3 Velocidad y coordinación motora

Para analizar si el microscopio afecta el desempeño de los animales, se evaluó la velocidad de desplazamiento en el laberinto en animales sin y con microscopio que tuvieron las mismas intervenciones quirúrgicas. Al inicio del entrenamiento, todos los animales presentan una conducta de reconocimiento del lugar, haciendo

paradas continuas a lo largo del laberinto. Esto se ve reflejado en trayectorias irregulares, que pasan a ser más refinadas una vez que el animal está familiarizado con el laberinto (**Figura 7**). Como consecuencia de lo anterior, en las primeras sesiones ambos grupos tienen una curva de velocidad baja e irregular (**Figura 7A**). Asimismo, una vez que los animales están familiarizados con la tarea, la curva de velocidad presenta un comportamiento bimodal y estereotipado para ambos grupos. Sin embargo, los animales con microscopio presentan una velocidad de desplazamiento menor (**Figura 7B**). Del mismo modo, puede observarse que la velocidad promedio va aumentando progresivamente para ambos grupos (**Figura 7C**), siendo significativamente menor para los animales con microscopio en algunas sesiones. La velocidad promedio final (Sin microscopio, 30.48 ± 6.18 cm/s; Con microscopio, 22.22 ± 1.99 cm) fue significativamente mayor que la inicial (Sin microscopio, 8.64 ± 0.68 cm/s; Con microscopio, 11.03 ± 2.62 cm/s). Lo anterior implica que los animales estuvieron motivados durante el entrenamiento, ya que su velocidad para alcanzar la recompensa siempre fue en aumento.

Aunado a esto, se puso a prueba la coordinación motora en un grupo de 7 animales para ver si la cirugía tenía algún efecto adverso motor. Para esta prueba se cuantificó el tiempo que tardan los animales en caer del rotarod (**Figura 7D**). Los puntajes obtenidos antes de la cirugía (34.96 ± 10.97 s) fueron significativamente menores que los obtenidos tres días después de la cirugía (46.14 ± 5.56), debido a que los animales perfeccionaron la tarea.

En conjunto, lo anterior indica que los animales son capaces de aprender la tarea propuesta y que su desempeño y motivación se mantiene a lo largo del

entrenamiento. Asimismo, se muestra que los animales no se ven afectados de manera directa por la cirugía y que la disminución de la velocidad probablemente se debe al peso del microscopio.

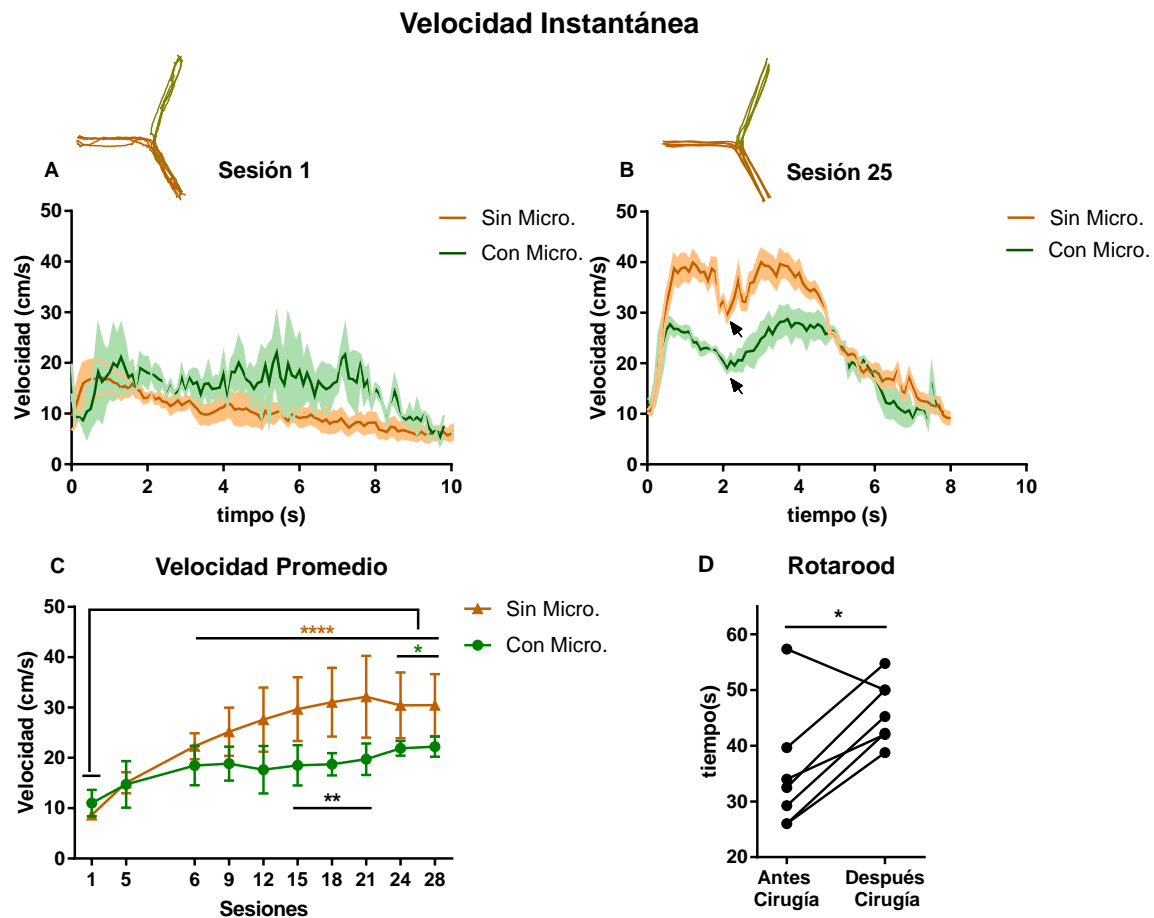


Figura 7. Velocidad y coordinación motora. A y B) Velocidad instantánea. Arriba, trayectorias representativas para cada sesión. A) Sesión 1 y B) Sesión 25. Las flechas señalan el momento en donde el animal llega a la bifurcación del laberinto. C) Velocidad promedio a lo largo del entrenamiento. D) Coordinación motora con rotarood, cada punto representa un animal (n=7). Se muestra la media \pm error estándar. Para velocidad ANOVA de dos vías, $F = 16.37$ $p < 0.0001$. Prueba post hoc de Sidak's (*) $p < 0.05$, () $p < 0.05$ y (***) $p < 0.0001$. Con microscopio $n = 3$. Sin microscopio $n = 4$. Para coordinación motora prueba de Wilcoxon pareada $W = 26$. (*) $p = 0.0313$.**

10.2 ENSAMBLES NEURONALES EN LA NAVEGACIÓN ESPACIAL

10.2.1 Imagenología de calcio

Para estudiar la actividad neuronal se utilizó un microscopio miniaturizado de un fotón. Esta técnica nos permitió obtener imágenes a lo largo del entrenamiento en animales en libre movimiento (**Figura 8**). Asimismo, tomando como referencia la vasculatura del cerebro, fue posible capturar el mismo campo de visión (**Figura 8A y 8C**). Una vez obtenidas las imágenes, se procesaron para obtener las regiones de interés y los transitorios de calcio (**Figura 8A**). Una ventaja de esta técnica es que se puede determinar la presencia y posición de las neuronas que se activan durante la tarea de acuerdo a la huella que se queda plasmada en la imagen, al mismo tiempo que se obtiene información temporal de su actividad.

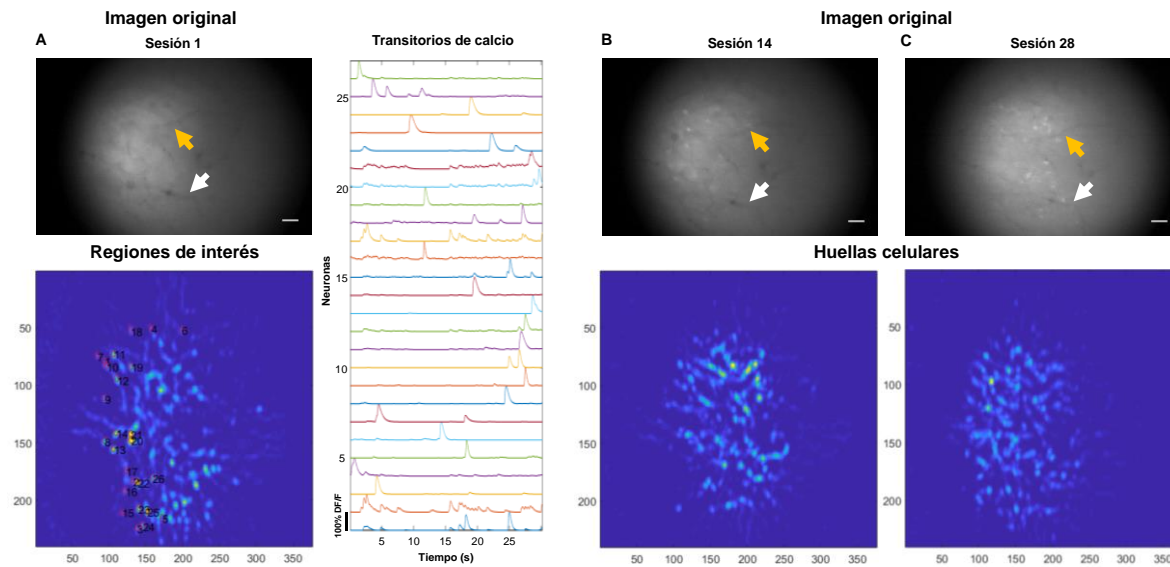


Figura 8. Imágenes de la actividad de calcio. Arriba, ejemplos representativos del campo de visión original para las sesiones 1, 14 y 28. Abajo, huellas celulares dadas por su actividad celular promedio. A) Sesión 1, ejemplo de algunas regiones de interés y sus transitorios de calcio. B y C) Sesión 14 y 28 respectivamente. Las flechas señalan pistas espaciales comunes. Barra de escala = 30 μ m.

10.2.2 Número de neuronas a través del entrenamiento

Se cuantificaron las neuronas durante todo el entrenamiento para dos ratones **(Figura 9)**. Para ambos ratones puede observarse que el número de neuronas que se activan durante la tarea fluctúa a lo largo de las sesiones. En el aprendizaje, al inicio del entrenamiento se observó un número equivalente de neuronas (116 ± 21.38) respecto al final (130 ± 20.50), cuando los animales ya son expertos. Para el nuevo aprendizaje, se observa una ligera disminución durante las primeras sesiones (118 ± 3.44) con un posterior aumento al final del entrenamiento (142 ± 7.07). Asimismo, se analizó la variabilidad del número de neuronas que se activan durante la tarea en términos de desviaciones estándar (DE) a lo largo de las sesiones **(Figura 9B)**. Por un lado, se observó que la variabilidad promedio se mantiene constante durante todas las sesiones que dura el entrenamiento. Por otro lado, ambos ratones presentaron los mismos valores de variabilidad (R6; 12.28 ± 3.45 DE, R7; 12.64 ± 3.29 DE). Estos datos sugieren que la fluctuación en el número de neuronas está relacionada con el proceso de aprendizaje de los animales, ya que ocurren en momentos específicos del entrenamiento y tiende a aumentar con el desempeño de los animales.

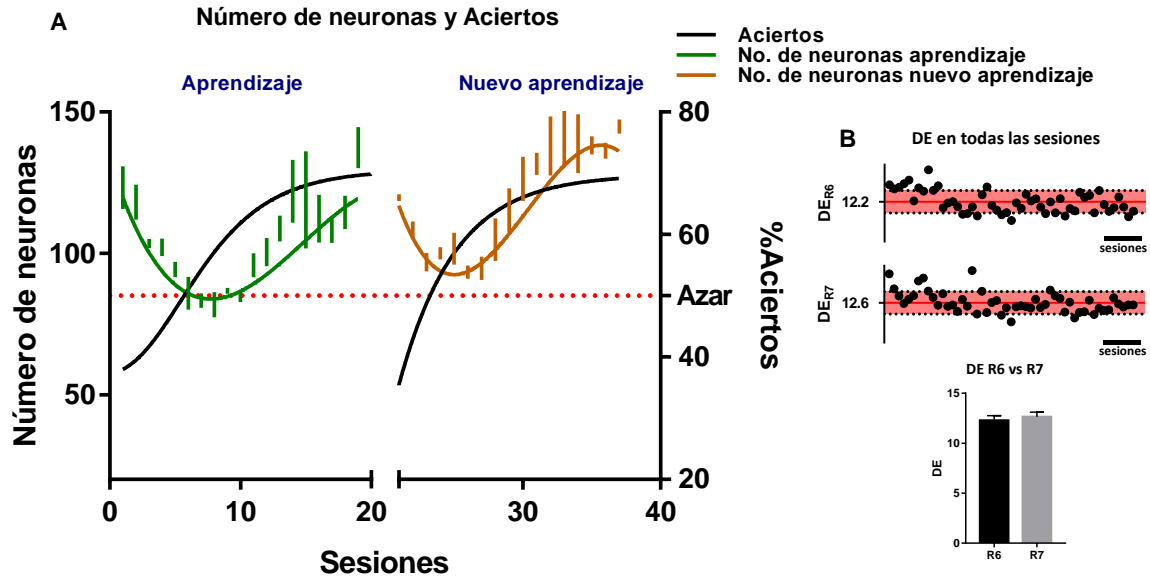


Figura 9. Número de neuronas y aciertos durante el entrenamiento. A) Aciertos (en negro) y promedio del número de neuronas (en color) en la fase de aprendizaje y nuevo aprendizaje. En verde, aprendizaje. En marrón, nuevo aprendizaje. B) Desviación estándar (DE) del número de neuronas en todas las sesiones. La franja roja representa la DE promedio. Abajo, comparación de la DE entre ambos ratones.

10.2.3 Perfiles de activación neuronal durante los ensayos

Para explorar los patrones de activación de las neuronas se tomaron ensayos de la fase de aprendizaje en la etapa 1, es decir, cuando la conducta es guiada (no aleatorio) y en la etapa 2 (aleatorio) una vez que los animales son expertos (**Figura 10**). En la etapa no aleatoria se observó un patrón inespecífico, en donde la actividad neuronal se presenta de manera dispersa a lo largo de los ensayos (**Figura 10A**). Por el contrario, una vez que el animal aprende la tarea, se aprecia que la actividad neuronal tiende a presentarse en lugares específicos de la trayectoria, sobre todo, cuando los animales se encuentran cerca del sitio de bifurcación del laberinto (**Figura 10B**). Asimismo, en los ensayos correctos puede

observarse la presencia de actividad neuronal durante el estímulo. Mientras que ocurre muy poco en ensayos incorrectos.

Para analizar con mayor detalle el patrón de activación de las neuronas, se promedió la actividad de calcio de cada uno de los ensayos, con lo que se obtuvieron patrones de activación como los que se muestran en la **Figura 10C y 10D**. Así, para la etapa no aleatoria, puede apreciarse un patrón de activación en donde la fluorescencia promedio es baja durante todo el ensayo (**Figura 10C**). Sin embargo, cuando el ratón es experto en la etapa aleatoria, se observa que la actividad neuronal promedio se ve incrementada momentos antes de que el animal llegue a la bifurcación (**Figura 10D**). Asimismo, pueden observarse patrones de activación similares en ensayos equivalentes, es decir, cuando el ratón hace el mismo recorrido.

Estas observaciones revelan que la actividad poblacional de las neuronas se modifica debido al entrenamiento de los animales, es decir, que como producto del aprendizaje la actividad se organiza en momentos específicos para codificar los distintos recorridos.

Los resultados descritos anteriormente motivaron a caracterizar a mayor profundidad a los elementos neuronales que participan en la codificación en cada sección del recorrido.

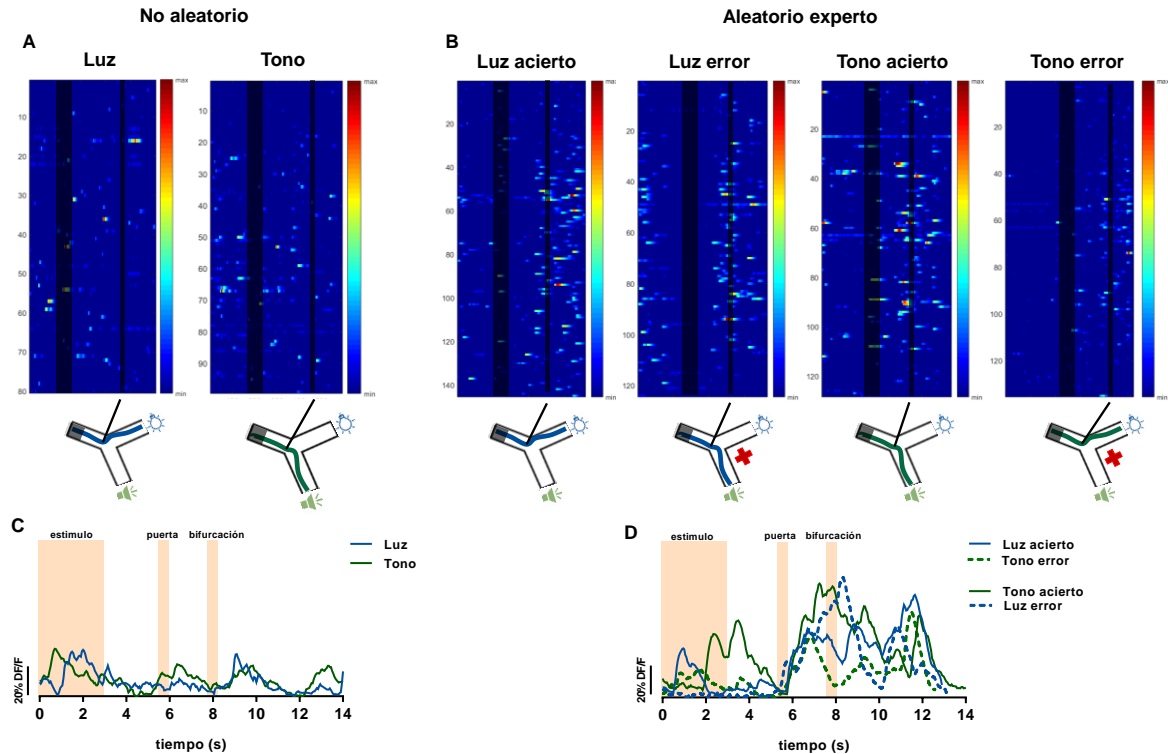


Figura 10. Perfiles de activación neuronal. A y C) Etapa no aleatoria B y D) Aprendizaje, etapa aleatoria. Arriba. mapas de colores. El eje “y” representa las neuronas, el eje “x” el tiempo y en código de color la intensidad de la fluorescencia. La primera sombra señala el estímulo. La segunda sombra señala cuando el ratón llega a la bifurcación del laberinto. Representaciones de los recorridos, en azul trayectoria con luz, en verde trayectoria con tono. Abajo, actividad neuronal promedio. Primera sombra estímulo. Segunda sombra apertura de la puerta. Tercera sombra cuando el ratón llega a la bifurcación.

10.2.4 Determinación de ensambles neuronales

Para caracterizar las neuronas que están participando en cada uno de los recorridos se tomaron en cuenta ensayos correctos de dos sesiones, una de la fase de aprendizaje y otra de la fase del nuevo aprendizaje, cuando los animales son expertos. Asimismo, el ensayo se dividió en dos grandes ventanas de tiempo, una durante el estímulo y la otra durante el recorrido (ver métodos). Posteriormente se procedió a determinar las neuronas activas para cada ventana de tiempo mediante la cuantificación de los eventos de calcio a partir del cálculo de la primera derivada

de la fluorescencia. De esta forma, se definieron los eventos de calcio como los valores que se encuentran por arriba del 20% de la derivada (**Figura 11A**). Estos valores representan la tasa de cambio rápida en los transitorios cuando la neurona se activa (Carrillo-Reid et al., 2008), mientras que los valores de la caída lenta de calcio quedan por debajo de este umbral. De esta manera se lograron distinguir tres grupos de neuronas, activas durante el estímulo, activas durante la trayectoria y activas en ambas ventanas de tiempo (**Figura 11C**).

Para determinar la presencia de una neurona a través de los ensayos se extrajeron los centroides de las regiones de interés (**Figura 8A y Figura 11B**) y se calculó la distancia euclidiana de cada neurona a través de los ensayos. Se consideró como la misma neurona si esta presentaba una distancia igual o menor que 5 píxeles. Este umbral fue definido tomando en cuenta que el tamaño del ROI es de 5 píxeles y es fijo, por lo que resultaría difícil discriminar dos neuronas que estén a una distancia menor. Además, este umbral se consideró adecuado ya que la probabilidad de encontrar a un par de neuronas en un mismo ensayo que estén a esta distancia o menor es muy baja (9%) y la media de las distancias es significativamente mayor que 5 píxeles (**Figura 11B, 11D y 11E**). En seguida, se consideró a una neurona como parte del ensamble si esta presentaba actividad en por lo menos el 80% de los ensayos. Para determinar el ensamble neuronal, los datos fueron agrupados por ensayos equivalentes. Por ejemplo, si se toman en cuenta los ensayos con luz para el aprendizaje, se puede encontrar a un grupo de neuronas activas de manera consistente. En la **Figura 11F** dichas neuronas están representadas de color blanco. En rojo, son aquellas neuronas que no estuvieron

por lo menos el 80% de los ensayos y no fueron tomadas en cuenta. Este procedimiento se realizó tanto para los periodos de estimulación (luz y sonido) como para las trayectorias. Se consideró una comparación *intraensayo* a aquellas que ocurrieron en ensayos equivalentes (también representados como Luz \cap Luz, Tono \cap Tono). Una vez definido el ensamble para cada tipo de ensayo, se realizó el mismo análisis para determinar si los ensambles entre los dos tipos de ensayo (luz y tono) eran diferentes. Este procedimiento se realizó para el estímulo y para la trayectoria y es considerado una comparación *interensayo* ya que se toman en cuenta ambos tipos de ensayo (también representados como Luz \cap Tono).

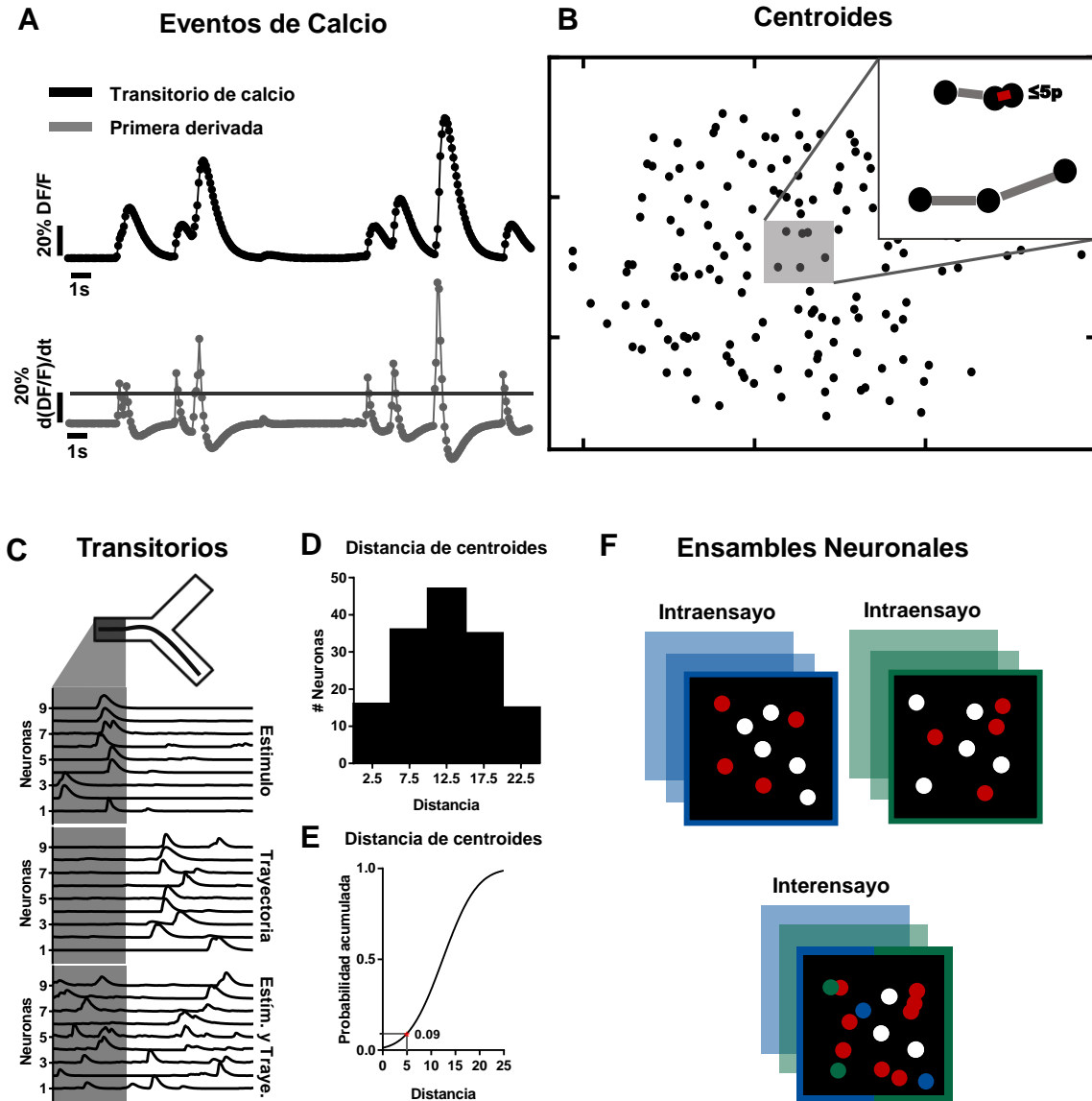


Figura 11. Eventos de calcio y distancia de centroides. A) Inferencia de eventos de calcio por primera derivada. Línea horizontal, 20% respecto a la derivada. B) Representación de la distancia mínima entre los centroides. En ampliación, línea gris $>5_{\text{pixeles}}$, línea roja $\leq 5_{\text{pixeles}}$. C) Transitorios representativos de neuronas activas durante el estímulo, la trayectoria y en ambos momentos. El área sombreada representa el momento del estímulo. D) Histograma de la distancia mínima para cada centroide para un ensayo. Prueba t para una muestra, $\mu > 5$, $p < 0.0001$. Ancho de bin = 5. E) Función de densidad de probabilidad acumulada. Para una distancia $\leq 5_{\text{pixeles}}$, $p = 0.09$. F) Representación del ensemble neuronal. En blanco, ensemble (neuronas que se activaron por lo menos el 80% de los ensayos). En rojo, neuronas activas por debajo del 80%. Intraensayo, comparaciones entre ensayos equivalentes (Luz \cap Luz, Tono \cap Tono). Interensayo comparaciones a través de los ensayos (Luz \cap Tono).

En la **Figura 11F** se ilustra la comparación interensayo, en donde las neuronas presentes por lo menos el 80% de los ensayos están de color blanco, en verde aquellas que solo se activaron en el ensayo con tono y en azul aquellas que solo se activaron en el ensayo con luz.

10.2.4.1 Ensamblajes durante la fase de Aprendizaje.

Se analizó la última sesión de la fase de aprendizaje para caracterizar los ensamblajes neuronales que se activan durante el estímulo y durante la trayectoria (**Figura 12**). Las neuronas que estuvieron activas por lo menos el 80% de los ensayos fueron consideradas parte del ensamblaje, tanto para el momento del estímulo como para la trayectoria (**Figura 12**).

En la condición aprendizaje experto (**Figura 13A**), se cuantificó el número de neuronas activas para el estímulo y la trayectoria. De esta forma se encontró un número semejante de neuronas activas para los ensayos con luz (147.46 ± 69.36) y con tono (147.25 ± 60.87). Sin embargo, la cantidad de neuronas activas durante el estímulo es menor que las que se activaron durante la trayectoria (**Figura 13B**). En este sentido, el número total de neuronas que se activaron durante el periodo de estimulación fue similar para ensayos con luz (111 ± 42.70) y con tono (109.75 ± 30.93), así como durante las trayectorias para ensayos con luz (141.45 ± 64.70) y con tono (142.41 ± 55.45) (**Figura 13B**). Con el número de neuronas se obtuvo un porcentaje de similitud, en donde los valores altos representan mayor cantidad de neuronas compartidas. Así, el grupo de neuronas que se activa durante el estímulo es ~76% similar al que se activa durante la trayectoria, tanto para la luz como para el tono (**Figura 13B**).

En la **Figura 13C** puede apreciarse un ejemplo del ensamble activo durante el estímulo con luz (azul), durante el estímulo con tono (verde) y neuronas que se activaron en los dos estímulos (blanco). De esta manera, para los ensambles que se activan durante el periodo de estimulación se encontró un número semejante de neuronas tanto para el estímulo luminoso (33.81 ± 3.47) como el auditivo (34.75 ± 2.73). Sin embargo, el número de neuronas compartidas que se activan durante ambos tipos de estimulación (*interensayo*) fue significativamente menor (luz 15 ± 2.7 ; tono 16.41 ± 2.10) (**Figura 12 y Figura 13D**), presentando una similitud entre los ensambles de ~46%. Asimismo, en la **Figura 13E** puede apreciarse un ejemplo para los ensambles que se activan durante la trayectoria. De esta manera, se observó un número semejante de neuronas en los ensayos correspondientes al estímulo luminoso (luz 54 ± 11.37) y para los correspondientes al tono (52.91 ± 22.23). Nuevamente se observó de manera significativa una menor cantidad de neuronas compartidas al comparar los dos tipos de ensayo (luz; 29.36 ± 5.93 , tono; 28.1 ± 5.99), con una similitud de ~50%. (**Figura 12 y Figura 13F**)

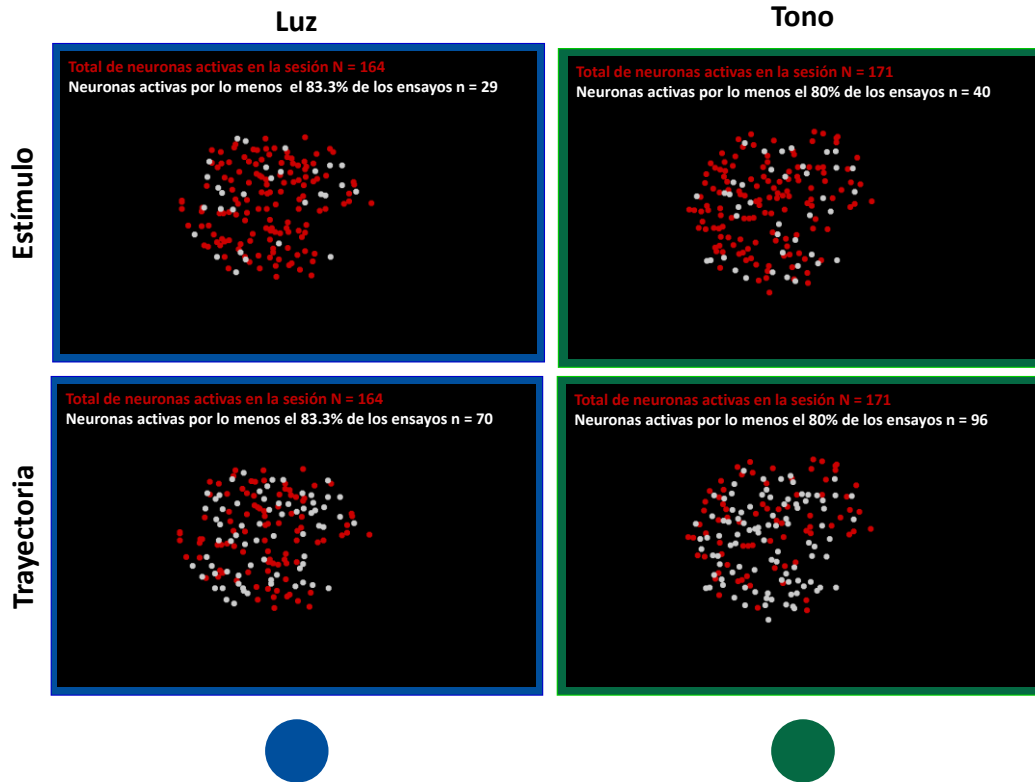


Figura 12. Ensamblajes neuronales para el estímulo y la trayectoria. Ejemplos representativos para un ensayo de luz y uno de tono obtenido en un ratón. En blanco, neuronas activas por lo menos el 80% de los ensayos. En rojo, neuronas que no estuvieron activas el 80% de los ensayos.

Lo anterior sugiere que hay una especificidad en las neuronas que se activan durante los dos tipos de ensayo (luz y tono). De igual manera, estos datos también señalan que los recorridos son codificados por poblaciones diferentes de neuronas ya que como puede apreciarse, las neuronas que se comparten entre los dos tipos de ensayo se encuentran en menor proporción (**Figura 13E y 13F**).

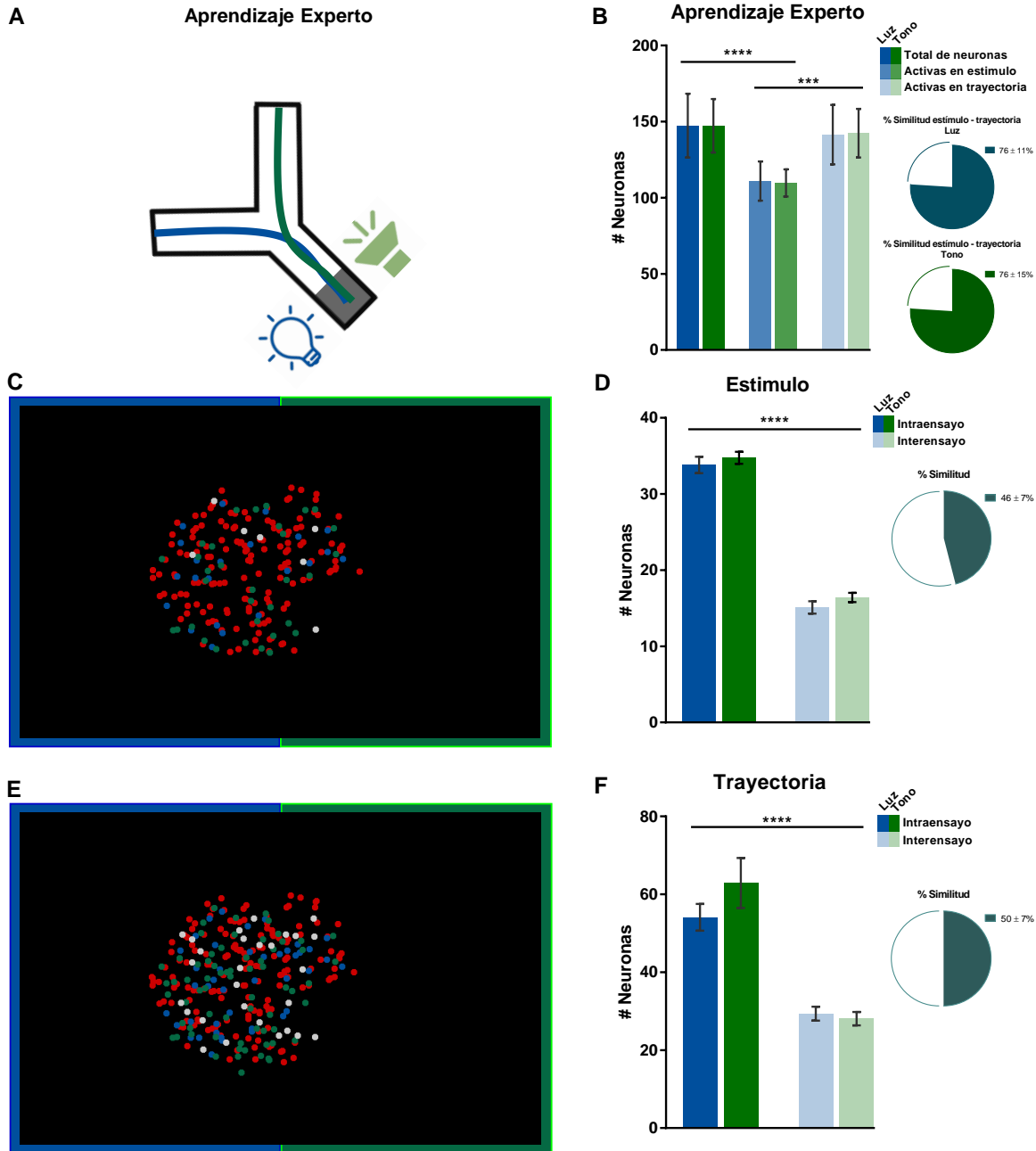


Figura 13. Ensamblas neuronales durante la fase de aprendizaje. A) Representación del esquema de entrenamiento en el aprendizaje. Luz izquierda, tono derecha. B) Neuronas activas durante el estímulo y la trayectoria (ver Figura 11A). C y E) Ejemplos representativos de las neuronas activas para la luz (azul), para el tono (verde) y en ambos momentos (blanco), para el estímulo y trayectoria respectivamente. D) Número de neuronas que forman el ensamble para el estímulo. F) Número de neuronas que forman el ensamble para la trayectoria. Intraensayo, neuronas activas por lo menos el 80% en ensayos equivalentes (Luz \cap Luz, Tono \cap Tono). Interensayo, neuronas compartidas a través de los ensayos (Luz \cap Tono). ANOVA de dos vías, $p < 0.0001$. Prueba post hoc Sidak's, (***) $p < 0.001$ y (****) $p < 0.0001$. Los gráficos de pastel representan el porcentaje de similitud entre los ensambles dado por las neuronas que comparten.

10.2.4.2 Ensamblas durante la fase de Nuevo aprendizaje.

Al igual que en el aprendizaje, en la fase de nuevo aprendizaje se caracterizaron los ensambles durante el estímulo y durante la trayectoria para la última sesión (**Figura 14A**). No hubo diferencias significativas en cuanto al número de neuronas activas para cada tipo de ensayo (luz; 127.91 ± 27.28 , tono; 127.8 ± 32.8), ni tampoco para el estímulo (luz; 111.25 ± 19.24 , tono; 107.7 ± 22.12) y para la trayectoria (luz; 124.83 ± 25.92 , tono; 122.3 ± 32.40). Al igual que en la fase de aprendizaje, el número de neuronas activas durante el estímulo para ambos tipos de ensayo fue significativamente menor que las activas en la trayectoria. Sin embargo, ambas condiciones (luz - tono) presentaron un porcentaje de similitud superior al 80% (**Figura 14B**). En cuanto a los ensambles neuronales activos durante el estímulo, se encontró un número de neuronas equivalente para ambos tipos de ensayo (*intraensayo*) (luz; 42.75 ± 3.07 , tono; 42.8 ± 3.1) (**Figura 14C**). Al comparar los ensambles activados durante el estímulo (*interensayo*) se observó que hay una disminución significativa en el número de neuronas que se comparten (luz; 16.83 ± 5.25 , tono; 16.9 ± 5.25), con una similitud de ~40%. Indicando que la cantidad de neuronas compartidas entre ambos ensambles es baja (**Figura 14C**).

De igual manera, los ensambles activados durante la trayectoria (*intraensayo*) presentaron un número equivalente de neuronas activas para ambos ensayos (luz; 53.66 ± 10.13 , tono; 60 ± 13.63). Al comparar las neuronas que se activan en las distintas trayectorias (*interensayo*), nuevamente se observó que comparten una baja cantidad de neuronas (luz; 23.66 ± 1.82 , tono; 23.7 ± 1.53) y que son similares en ~44% (**Figura 14D**).

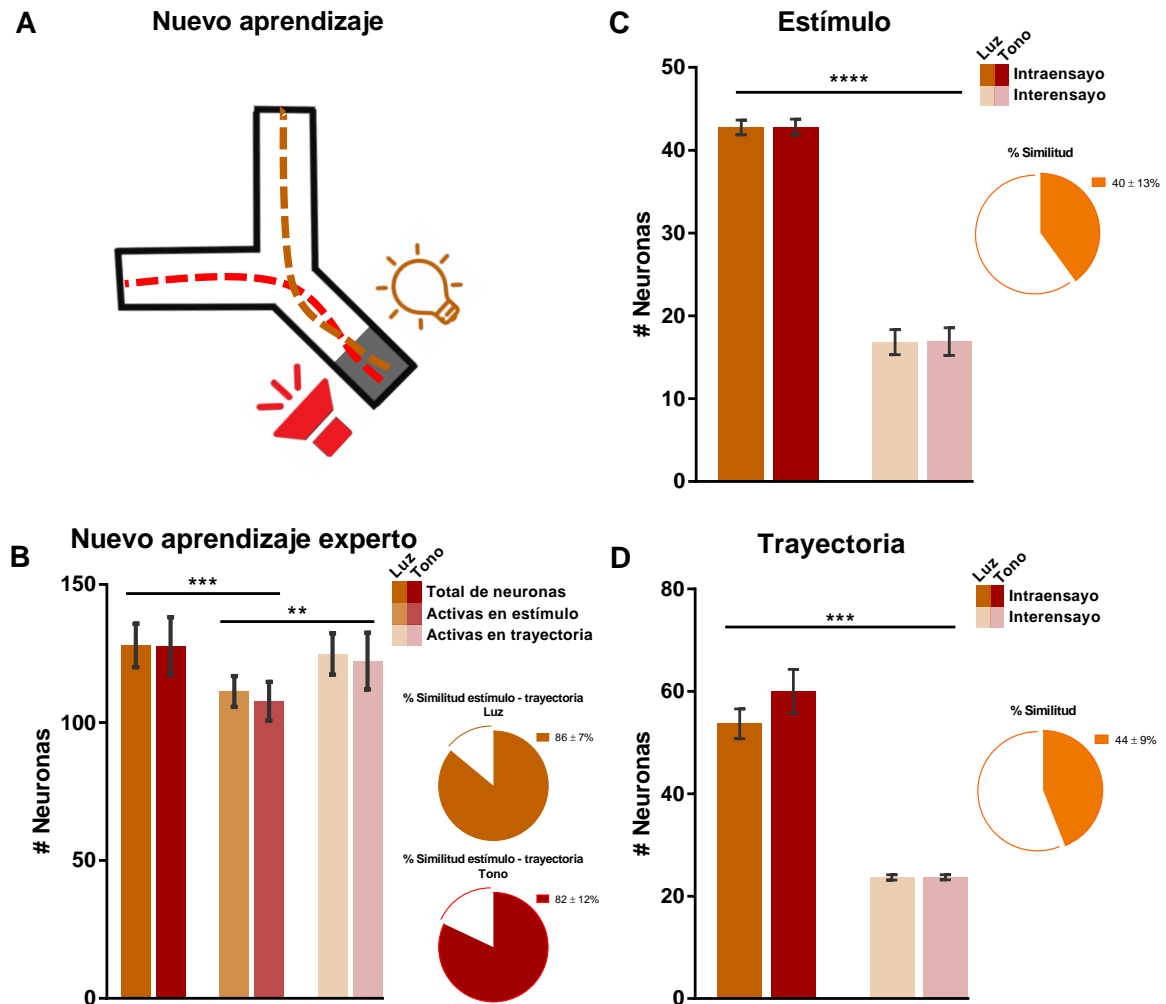


Figura 14. Ensamblajes neuronales durante la fase de nuevo aprendizaje. A) Representación del esquema de entrenamiento en el nuevo aprendizaje. Luz derecha, tono izquierda. B) Neuronas activas durante el estímulo y la trayectoria (ver Figura 11A). C) Número de neuronas que forman el ensamble para el estímulo. D) Número de neuronas que forman el ensamble para la trayectoria. Intraensayo, neuronas activas por lo menos el 80% en ensayos equivalentes (Luz \cap Luz, Tono \cap Tono). Interensayo, neuronas compartidas a través de los ensayos (Luz \cap Tono). ANOVA de dos vías, $p < 0.0001$. Prueba post hoc Sidak's, (**) $p < 0.01$, (***) $p < 0.001$ y (****) $p < 0.0001$. Los gráficos de pastel representan el porcentaje de similitud entre los ensambles dado por las neuronas que comparten.

Al igual que en el aprendizaje estos datos muestran que los ensambles para cada tipo de ensayo (luz y tono) están representados por una cantidad equivalente de neuronas. Además de que los diferentes tipos de ensayo se mantienen codificados por ensambles diferentes, tanto en el estímulo como en la trayectoria. En conjunto esto sugiere que se emplea un mecanismo similar en el aprendizaje y en el nuevo aprendizaje para diferenciar entre los distintos recorridos.

10.2.4.3 Ensambles: Aprendizaje vs Nuevo aprendizaje.

Mismo estímulo diferente trayectoria.

Una vez que se determinaron los ensambles neuronales que se activan para la etapa del aprendizaje y el nuevo aprendizaje, la pregunta fue ¿Los ensambles neuronales que codifican para el estímulo y la trayectoria durante el aprendizaje, son los mismos que en el nuevo aprendizaje?. Para responder a esta pregunta se procedió a comparar los ensambles que se activan en ensayos equivalentes (luz aprendizaje vs luz nuevo aprendizaje y tono aprendizaje vs tono nuevo aprendizaje), es decir, el mismo estímulo pero diferentes trayectorias **(Figura 15)**.

En cuanto a los ensayos con luz, se observó que el ensamble que representa el estímulo en el aprendizaje (luz A) tiene una menor cantidad de neuronas que el ensamble del nuevo aprendizaje (luz N) (luz A; 33.88 ± 3.57 , luz N; 42.75 ± 3.07). Al realizar la comparación interensayo se observó que presentan muy pocas neuronas en común (luz A; 4 ± 1.6 , luz N; 3.91 ± 1.5) y que son similares en ~10% **(Figura 15A)**.

En cuanto a la trayectoria, se observó que los ensambles presentaron un número equivalente de neuronas (luz A; 54.1 ± 11.3 , luz N; 53.6 ± 10.13) y que comparten pocas neuronas entre ellos (luz A; 9.2 ± 4.4 , luz N; 8.5 ± 4.39), siendo similares en ~16% (Figura 15B).

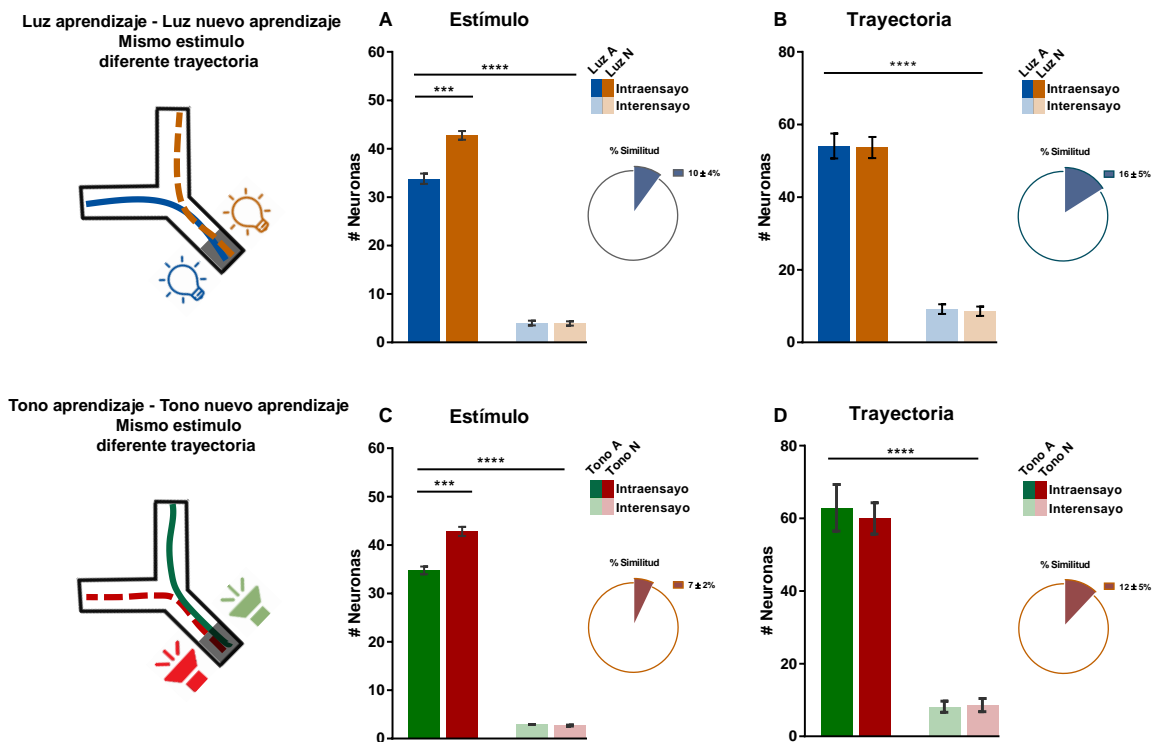


Figura 15. Ensambls neuronales, aprendizaje vs nuevo aprendizaje. Mismo estímulo, diferente trayectoria. A-B) Ensambls durante el estímulo y la trayectoria para luz aprendizaje y luz nuevo aprendizaje. C-D) Ensambls durante el estímulo y la trayectoria para tono aprendizaje y tono nuevo aprendizaje. Intraensayo, neuronas activas por lo menos el 80% en ensayos equivalentes (Luz A \cap Luz N y Tono A \cap Tono N). Interensayo, neuronas compartidas entre los ensayos, respecto a las que se activaron el 80% (Luz A \cap Luz N, Tono A \cap Tono N). ANOVA de dos vías, $p < 0.0001$. Prueba post hoc Sidak's, (*) $p < 0.001$ y (****) $p < 0.0001$. Los gráficos de pastel representan el porcentaje de similitud entre los ensambles dado por las neuronas que comparten.**

Para los ensayos donde se utilizó el tono, puede apreciarse un caso similar (**Figura 15C y 15D**). Los ensambles neuronales que representan el estímulo en el aprendizaje (tono A) tienen menos neuronas que el ensamble del nuevo aprendizaje (tono N) (tono A; 34.75 ± 2.73 , tono N 42.8 ± 3) y presentan una similitud de ~7% entre ellos. Asimismo, los ensambles de las trayectorias presentaron un número de neuronas equivalente (tono A; 62.91 ± 22.23 , tono N; 60 ± 13.6) y comparten pocas neuronas (tono A; 8.16 ± 5.34 , tono N; 8.6 ± 5.6), siendo similares en ~12%.

Estos resultados muestran que, aunque los ensambles que representan el estímulo en el nuevo aprendizaje tienen mayor cantidad de neuronas, los ensambles se mantienen segregados para codificar el mismo estímulo. Esto pudiera deberse a que el estímulo tiene dos significados diferentes en las dos fases del entrenamiento. Mientras que los ensambles de las trayectorias se mantienen segregados debido a que las trayectorias se mantienen diferentes.

10.2.4.4 Ensambles: Aprendizaje vs Nuevo aprendizaje.

Diferente estímulo misma trayectoria.

Debido a que anteriormente se observó que el mismo estímulo puede ser codificado por dos ensambles neuronales, surgió la siguiente pregunta ¿Las trayectorias del nuevo aprendizaje son codificadas por el mismo ensamble que codifica las trayectorias en el aprendizaje? Para responder a esta pregunta se procedió a comparar los ensambles de ensayos equivalentes (luz aprendizaje vs tono nuevo aprendizaje y tono aprendizaje vs luz nuevo aprendizaje), es decir, diferente estímulo pero la misma trayectoria (**Figura 16**).

Los ensambles del estímulo para las trayectorias del lado izquierdo, luz aprendizaje y tono nuevo aprendizaje (luz A y tono N), así como para las trayectorias del lado derecho, tono aprendizaje y luz nuevo aprendizaje (tono A y luz N) se mantuvieron segregados, con valores de similitud de ~12% y 4%, ya que compartieron pocas neuronas (luz A; 4.4 ± 2.8 , tono N; 4.5 ± 2.9) y (tono A; 1.5 ± 0.9 , luz N; 1.8 ± 1.1) respectivamente, ver **Figura 16A y 16C**. Este resultado era esperado ya que se había observado que los estímulos diferentes son codificados por ensambles distintos (**Figura 13 y Figura 14**).

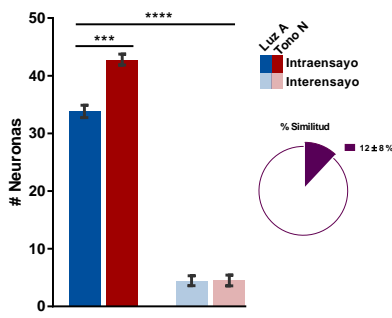
En cuanto a los ensambles neuronales que se activan durante las trayectorias, pudo observarse que, a pesar de que los recorridos son iguales, los ensambles presentan una similitud baja de ~12% y 11%, con muy pocas neuronas en común (luz A; 10.3 ± 6.2 , tono N; 10.1 ± 6.1) y (tono A; 6.5 ± 2.4 , luz N; 6.9 ± 2.4), ver **Figura 16B y 16D**.

En conjunto, estos resultados sugieren que las neuronas del hipocampo pueden codificar información similar como lo es el mismo estímulo y la misma trayectoria con poblaciones neuronales diferentes, cuando esta información es adquirida en momentos diferentes y representa contextos distintos.

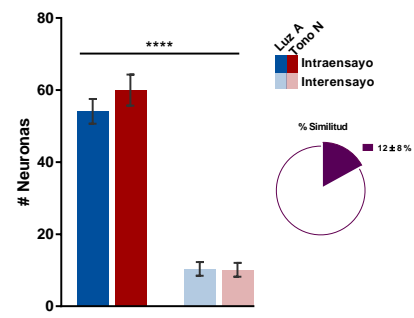
Luz aprendizaje - Tono nuevo aprendizaje
Diferente estímulo
misma trayectoria



A Estímulo



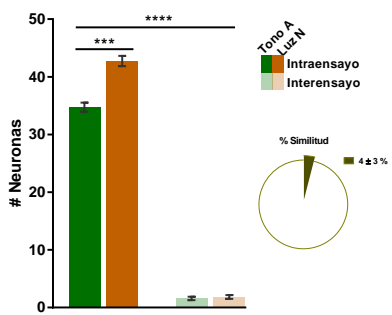
B Trayectoria



Tono aprendizaje - Luz nuevo aprendizaje
Diferente estímulo
misma trayectoria



C Estímulo



D Trayectoria

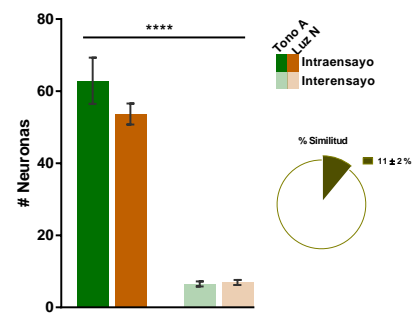


Figura 16. Ensamblas neuronales, aprendizaje vs nuevo aprendizaje. Diferente estímulo, misma trayectoria. A-B) Ensamblas durante el estímulo y la trayectoria para luz aprendizaje y tono nuevo aprendizaje. C-D) Ensamblas durante el estímulo y la trayectoria para tono aprendizaje y luz nuevo aprendizaje. Intraensayo, neuronas activas por lo menos el 80% en ensayos equivalentes (Luz \cap Luz y Tono \cap Tono). Interensayo, neuronas compartidas entre los ensayos, respecto a las que se activaron el 80% (Luz \cap Tono). ANOVA de dos vías, $p < 0.0001$. Prueba post hoc Sidak's, (***) $p < 0.001$ y (****) $p < 0.0001$. Los gráficos de pastel representan el porcentaje de similitud entre los ensambles dado por las neuronas que comparten.

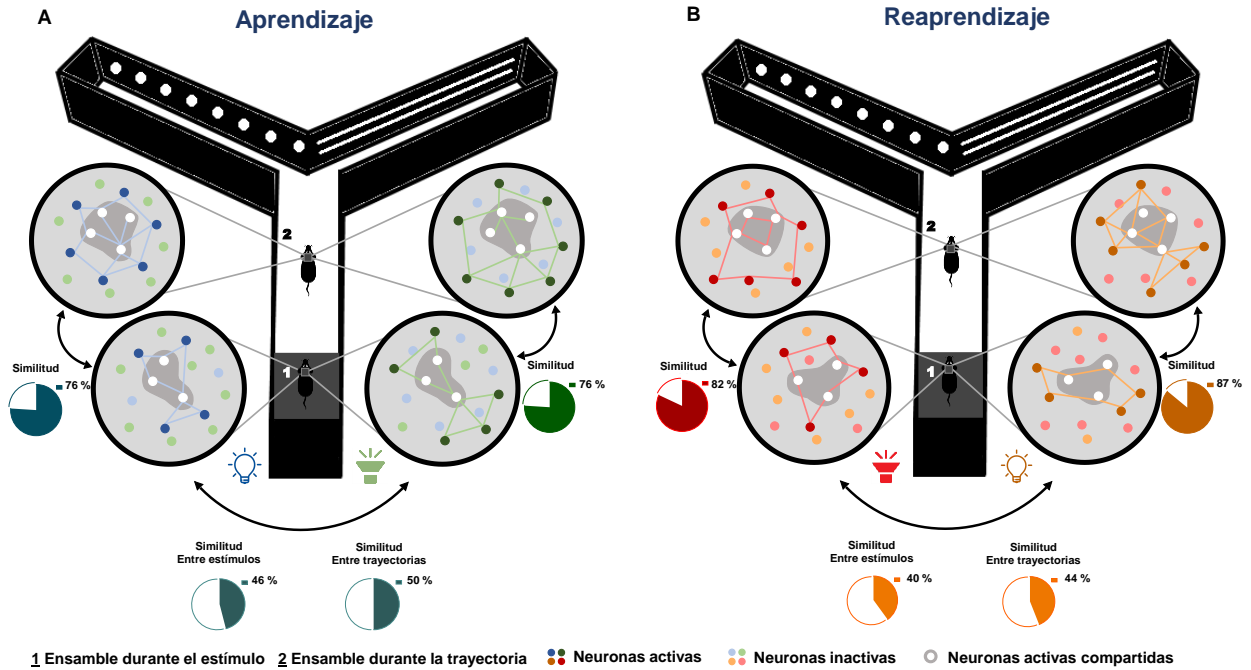


Figura 17. Representación de ensambles neuronales presentes en la conducta. En código de color se ilustran los ensambles relacionados con el estímulo y la trayectoria correspondiente. A) Ensambles durante el aprendizaje. B) Ensambles durante el nuevo aprendizaje. Se muestran los ensambles para cada tipo de ensayo (luz, tono) durante el estímulo en la estación de salida (1) y en la trayectoria (2). Las neuronas activas se representan con colores intensos y el ensamble se resaltó con líneas. Las neuronas inactivas se muestran con colores suaves. La superposición de los ensambles se ilustra con una sombra y neuronas de color blanco. La similitud indica que tan semejantes son los ensambles en cuanto a la proporción de neuronas que se comparten. Nótese que hay mayor similitud en ensambles durante el estímulo y su trayectoria correspondiente, que entre los distintos estímulos y trayectorias. Además, observe que los ensambles en el aprendizaje son notablemente diferentes que los del nuevo aprendizaje.

11 DISCUSIÓN

11.1 CONDUCTA

11.1.1 Curvas de aprendizaje

Nuestros resultados demuestran que los ratones son capaces de aprender una tarea conductual de navegación espacial guiada por estímulos sensoriales. En un estudio realizado por Barnes et al., (2004) en donde evalúan el aprendizaje espacial y no espacial en ratones, reportan un desempeño muy semejante (del 65 al 85% en las distintas pruebas) al de nuestros sujetos de estudio (**Figura 6**). Cabe resaltar que, en nuestra tarea, los animales tienen que relacionar un estímulo sensorial (luz o tono) con un recorrido específico (izquierda o derecha), lo que supondría un reto importante para los animales, ya que tiene que descifrar el significado del estímulo. Por otra parte, en las curvas de desempeño (**Figura 6A y 6B**) puede apreciarse que en la fase de aprendizaje el progreso de los animales es de una manera más gradual, mientras que en la fase de nuevo aprendizaje los animales superan el azar en menos sesiones. En concordancia con esta observación, se ha visto que los ratones previamente entrenados pueden utilizar el conocimiento adquirido y ajustarlo para desempeñarse mejor y maximizar la recompensa (Tosun et al., 2016).

11.1.2 Velocidad y coordinación motora

Aunado al aprendizaje de los animales, la ejecución de la tarea fue moldeándose hasta alcanzar una ejecución estereotipada (**Figura 7A y 7B**). Este parámetro se ha considerado como un indicador tanto de la motivación como del desempeño de los animales para determinar si la tarea se está realizando de manera adecuada

(Rubin et al., 2015). De esta manera, nuestros resultados sugieren que los animales estuvieron motivados y que su desempeño fue mejorando en el transcurso del entrenamiento **(Figura 7C)**.

Por otro lado, en varios estudios en donde emplean lentes GRIN para seguir la actividad de calcio en regiones profundas del cerebro como CA1 o la amígdala (Cai et al., 2016; Grewe et al., 2017; Kinsky et al., 2018; Rubin et al., 2015; Ziv et al., 2013), no se reporta ningún efecto motor contraproducente derivado de la cirugía, pero tampoco muestran alguna prueba para evaluarlo. Debido a ello, en este trabajo, se realizó una prueba de coordinación motora con el rotarod y se demuestra que el aspecto motor no se ve alterado por la intervención quirúrgica y la implantación de los lentes GRIN **(Figura 7D)**. Mientras que algunos estudios enfocados en el análisis de lesiones de la corteza sensoriomotora muestran que hay deterioro en las funciones motoras (Piot-Grosjean et al., 2001; Saatman et al., 2006) en otros (Hannay et al., 1999; Mettler et al., 1935) esto no se observa, o bien hay una recuperación rápida al paso de los días. Esto puede ser explicado por la variabilidad en las técnicas para producir el daño y en la batería de tareas conductuales con las que se mide el daño (Saatman et al., 2006). Para fines de este estudio, puede decirse que la actividad motora gruesa no se ve afectada y que los animales pueden desplazarse por el laberinto y desarrollar la tarea de manera adecuada.

11.2 ENSAMBLES NEURONALES EN LA NAVEGACIÓN ESPACIAL

11.2.1 Imagenología de calcio

Herramientas como el microscopio miniatura han permitido analizar la actividad de poblaciones de neuronas a lo largo de un entrenamiento en animales en libre movimiento. Nuestros datos se ajustan a estudios recientes y muestran que es posible obtener un campo de registro estable (**Figura 8**) a lo largo de semanas siguiendo como referencia los vasos sanguíneos en una buena preparación (Kinsky et al., 2018; Rubin et al., 2015; Ziv et al., 2013).

Por otro lado, las células que presentan una fluorescencia mayor que el fondo pueden detectarse y extraer su posición e inferir su actividad temporal (**Figura 8**). Sin embargo, actualmente no hay un procedimiento estándar para obtener esta información, lo cual es importante para una mayor reproducibilidad de los datos. Para este estudio se empleó el algoritmo MIN1PIPE de acceso libre (Lu et al., 2018) que cuenta con subrutinas para resaltar las huellas celulares, corregir el movimiento y extraer la señal de calcio. Además de contener todas las herramientas básicas de procesamiento de imágenes en un solo paquete, resultó ser superior en cuanto a la velocidad de cómputo a otros métodos para corregir el movimiento como NoRMCorre (Pnevmatikakis & Giovannucci, 2017) y a CNMF-E para extraer la señal de calcio (Zhou et al., 2018). Cabe resaltar que el procesamiento es automático y requiere de la mínima intervención por el usuario, en comparación, CAVE (Tegtmeier et al., 2018), un algoritmo que requiere la selección de cada neurona, impráctico cuando se tiene un gran volumen de datos.

11.2.2 Número de neuronas a través del entrenamiento

El aporte de la actividad de las células de lugar de CA1 en la memoria espacial fue caracterizado electrofisiológicamente por O'Keefe & Dostrovsky, (1971). A pesar de que la identificación de células de lugar quedo fuera del alcance de este estudio, se ha reportado que es posible determinarlas utilizando la señal de calcio (Ziv et al., 2013). Para este trabajo, en cambio se cuantificó el total del número de células en presentes en cada sesión como una manera indirecta de monitorear la dinámica de la población neuronal a lo largo de las sesiones (**Figura 9A**). Con esta aproximación es claro que el estado del ensamble, en términos del número de neuronas que le conforman, fluctúa a lo largo del entrenamiento. Aunado a esto, un aspecto interesante es que la variabilidad del número de neuronas se mantiene constante y es equivalente para ambos ratones (**Figura 9B**). Se ha sugerido que el hipocampo puede estar codificando simultáneamente información temporal e información espacial mediante códigos independientes (Leutgeb et al., 2005). De tal manera que, la dinámica del número de neuronas podría explicar la representación temporal de diferentes sucesos, dado por subconjuntos de neuronas diferentes y permitiendo que no haya interferencia en los recuerdos. Asimismo, la variabilidad constante podría estar relacionada con aspectos comunes de la memoria, en este caso, con la memoria espacial, ya que se ha reportado que la proporción de células de lugar se mantiene constante a lo largo de las semanas (Rubin et al., 2015; Ziv et al., 2013).

Lo anterior ha sido estudiado con más detalle por Rubin et al., (2015) con ambas aproximaciones, considerando solo células de lugar y tomando en cuenta toda la

población de neuronas. En ambos casos se ha observado que la dinámica del ensamble a lo largo de los días representa una línea del tiempo en donde las experiencias pueden ser vinculadas o desasociadas según su escala temporal.

11.2.3 Perfiles de activación neuronal durante los ensayos.

Una de las principales características de las células de lugar es que exhiben una tasa de disparo alta en un lugar específico, o campo de activación (O'Keefe, 1976), el cual, también puede ser definido como la cantidad de información que una célula aporta para predecir la ubicación del animal (Markus et al., 1994). Aunque este concepto se caracterizó con estudios electrofisiológicos, se ha podido adaptar a trabajos con señales de calcio a pesar de que se sabe que un transitorio de calcio dependa de un tren de potenciales de acción (Ziv et al., 2013). Una manera de aproximarse al campo de activación, es visualizando el momento en el que se activan las células durante la conducta (**Figura 10A y 10B**). Se ha reportado que alrededor del 46% en CA1 son células de lugar (Rubin et al., 2015). A pesar de que en nuestro estudio no identificamos si las neuronas analizadas eran células de lugar, quisimos analizar los perfiles de activación e indagar en el proceso de construcción de un ensamble neuronal. Por tal razón, se monitorearon las neuronas desde el inicio del entrenamiento (**Figura 10A**) hasta que los animales son expertos y dominan la tarea (**Figura 10B**). Con esta aproximación es claro que la dinámica de las neuronas cambia como producto del aprendizaje.

Al inicio del entrenamiento los campos de activación de las neuronas se encuentran dispersos a lo largo del recorrido (**Figura 10A**). Mientras que en animales expertos la actividad se alinea alrededor de la bifurcación del laberinto (**Figura 10B**). Estos

resultados se asemejan a los reportados por Pastalkova et al., (2008) en el que observaron que en condiciones control (tarea sin aprendizaje) las células de lugar se encuentran activas de manera inespecífica en todo el ensayo. Sin embargo, mostraron que cuando la tarea tiene una demanda de aprendizaje espacial, las células de lugar disparan en un lugar determinado y con una secuencia específica.

Al promediar la actividad de las neuronas puede obtenerse un perfil de activación global (**Figura 10C y 10D**). Así, cuando los animales comienzan el entrenamiento puede observarse que se presenta poca coactividad de las neuronas (**Figura 10C**). Si los campos de activación cambian como producto del aprendizaje, entonces los perfiles de activación de ensayos correctos serán semejantes en los ensayos incorrectos, al tratarse del mismo recorrido. Con esta aproximación puede verse que en ensayos equivalentes (por ejemplo; luz acierto y tono error) los perfiles presentan una dinámica similar (**Figura 10D**). De tal manera que se ha sugerido que una secuencia particular de neuronas puede activarse de manera confiable en un orden temporal específico una vez que se ejecuta una conducta aprendida (Pastalkova et al., 2008).

11.2.4 Determinación de ensamblajes neuronales.

Utilizando electrofisiología en combinación con imágenes de calcio se ha demostrado que la primera derivada de la señal de calcio corresponde al momento de activación de la célula con un tren de potenciales de acción (Carrillo-Reid et al., 2008). En este trabajo se tomó este criterio y se consideraron a los eventos de calcio como los valores que alcanzaron más allá del 20% de la derivada de la señal de fluorescencia de calcio (**Figura 11A**). De esta manera se determinó si una célula estuvo activa en el estímulo y/o en el recorrido.

Por otro lado, al calcular la distancia euclidiana dentro de un mismo ensayo para determinar la proximidad entre las células (**Figura 11B, 11D y 11E**), se encontró que una proporción del 9% está a una distancia igual o menor que 5 píxeles. Se ha reportado que es confiable asumir que una célula es la misma en un ensayo diferente, si ésta se encuentra a una distancia igual o menor que 7 píxeles (Rubin et al., 2015). De esta forma, para los análisis siguientes, con este método se determinó si una célula estaba activa durante el periodo del estímulo, durante la trayectoria o en ambos momentos. Además, únicamente se consideraron para el análisis a aquellas células que presentaron actividad en por lo menos el 80% de los ensayos.

11.2.5 Ensamblajes neuronales durante la navegación espacial

Si bien una célula de lugar que se activa en un lugar específico es suficiente para informar acerca de la posición (O'Keefe & Dostrovsky, 1971), se ha visto que al registrar la actividad de varias (decenas a centenas) de neuronas y al considerar su dinámica interna, se puede predecir con mayor precisión la trayectoria o posición de un animal (Harris et al., 2003a; Wilson & McNaughton, 1993). Esto implica que la actividad coordinada dentro y entre grupos de células que se encuentran distribuidas y conectadas anatómicamente (ensamblajes neuronales) representa un sustrato fundamental para la codificación de la información sensorial y de mecanismos cognitivos internos (Hebb, 1949). De ser así, los distintos entornos tendrían que ser representados por subconjuntos de neuronas o por dinámicas de ensamble diferentes. Siguiendo la segunda perspectiva, nuestros resultados muestran que para los dos estímulos (luz y tono) y para los dos recorridos (izquierda y derecha) hay poblaciones diferentes de neuronas que codifican para cada uno de ellos (**Figura 13D y 13F**). De tal manera que cuando un animal es experto en la fase de aprendizaje hay una representación a nivel neuronal para cada estímulo y para cada recorrido, permitiéndole al animal distinguir entre ambos contextos.

En paralelo se han propuesto otros mecanismos para explicar cómo los ratones pueden diferenciar entre contextos diferentes o para vincular experiencias comunes entre ellos. En ese sentido, se ha mostrado que mediante mapas espaciales comunes (conjunto de campos de activación que representan un lugar), los animales pueden representar o vincular diferentes arenas a pesar de las diferencias ambientales (Kinsky et al., 2018). Asimismo, los animales pueden discriminar entre

las arenas mediante la modulación en la tasa de activación de las neuronas (Kinsky et al., 2018). Así, los ratones pueden emplear a nivel hipocampal conjuntos de neuronas diferentes, mapas espaciales o modular la actividad neuronal, para diferenciar o vincular experiencias en contextos diferentes.

Si los ratones emplean diferentes conjuntos de neuronas para representar distintos contextos, entonces esta condición tiene que mantenerse también en el nuevo aprendizaje cuando los animales son expertos (**Figura 14A**). Nuestros datos muestran que durante el nuevo aprendizaje este mecanismo se conserva tanto para el estímulo como para el recorrido (**Figura 14C y 14D**), corroborando que solo con la participación de poblaciones diferentes de neuronas a nivel del hipocampo los animales pueden representar distintos contextos.

Por otro lado, las células del hipocampo pueden mantener su campo de activación relativamente constante a lo largo del tiempo (Thompson & Best, 1990), lo que implicaría que un contexto se mantuviera representado por la misma población de neuronas. Alternativamente, bajo ciertos cambios en el ambiente (Muller & Kubie, 1987), o en ambientes constantes (Jeantet & Cho, 2012; Ziv et al., 2013) las células de lugar pueden reasignarse en el entorno, es decir, se presentan cambios en las propiedades de los campos de activación como su ubicación, dirección y tamaño. Esto supondría que diferentes conjuntos de neuronas representen el mismo contexto adquirido en tiempos distintos. Para abordar esta cuestión se compararon los ensambles de ensayos del aprendizaje contra ensambles de ensayos del nuevo aprendizaje de dos maneras distintas; la primera tomando ensayos con el mismo estímulo pero con trayectorias diferentes (por ejemplo, estímulo de luz aprendizaje

y luz nuevo aprendizaje, recorrido izquierda y derecha) (**Figura 15**). Para esta comparación, nuestros datos indican que conjuntos de neuronas diferentes participan en la codificación del estímulo y de la trayectoria, a pesar de que el estímulo sensorial es el mismo (**Figura 15A y 15C**). La segunda comparación fue tomando en cuenta ensayos con diferente estímulo pero con la misma trayectoria (por ejemplo, estímulo de luz aprendizaje y tono nuevo aprendizaje, recorrido izquierda) (**Figura 16**). Nuevamente se encontró que conjuntos de neuronas diferentes codifican para el estímulo y para la trayectoria, en este caso a pesar de que la trayectoria es la misma. Estos resultados concuerdan con la segunda hipótesis y muestran que a nivel neuronal hay una reconfiguración del ensamble en cuanto a las células que están participando, permitiendo así la codificación de un contexto adquirido en tiempos distintos.

Estos resultados son consistentes con estudios recientes que muestran que la probabilidad de reactivación de un mismo conjunto de neuronas disminuye con el tiempo (Cai et al., 2016; Kinsky et al., 2018; Rubin et al., 2015; Ziv et al., 2013). Así, la dinámica neuronal del hipocampo en la escala de semanas también podría estar involucrada en la codificación y almacenamiento de cuándo y dónde ocurrieron los eventos, permitiendo que no haya interferencia entre la memoria a lo largo del tiempo (Leutgeb et al., 2005; Rubin et al., 2015). De esta manera, la reconfiguración constante del ensamble en función de las neuronas que participan, explicaría porque los animales pueden integrar nuevo conocimiento y reaprender una tarea para lograr maximizar la recompensa.

En resumen, este trabajo aporta nuevo conocimiento acerca de la actividad del hipocampo en términos de poblaciones de neuronas y su relación con la navegación espacial en la escala de semanas. Con esta aproximación es posible monitorear la construcción del ensamble mientras los animales aprenden una tarea espacial guiada por estímulos sensoriales y posteriormente analizar la reconstrucción del ensamble cuando hay un cambio en la tarea que implica un nuevo aprendizaje. Así, nuestros datos sugieren que; 1) la dinámica neuronal evoluciona a lo largo del tiempo como producto del aprendizaje (**Figura 10**), 2) la relación entre el estímulo y el recorrido se ve reflejada a nivel neuronal mediante la alta proporción de neuronas activas que se comparten, 3) los distintos estímulos, así como las trayectorias están representados por diferentes poblaciones de neuronas y 4) a lo largo del tiempo diferentes poblaciones de neuronas codifican distintos eventos (los puntos 2, 3 y 4 se resumen en la **Figura 17**). En concordancia con nuestra hipótesis, encontramos que distintos ensambles neuronales codifican para cada tipo de ensayo como producto del aprendizaje. Asimismo, encontramos que hay una reconfiguración de los ensambles en cuanto a las neuronas que le componen, debido al nuevo aprendizaje (**Figura 17**). En conjunto, estos hallazgos ayudan a entender mejor la relación entre la navegación espacial y la memoria y como se representan en el hipocampo a nivel de poblaciones de neuronas. Así, una representación discreta del entorno a nivel hipocampal (O'Keefe & Nadel, 1978) puede darse por un ensamble neuronal, lo que permite que los animales logren orientarse y desplazarse por su entorno. Mientras que la reconfiguración del ensamble a lo largo de un aprendizaje (Rubin et al., 2015), da lugar a que se generen distintas huellas de memoria para distinguir entre dos eventos adquiridos en tiempos diferentes.

12 CONCLUSIONES

La dinámica de la actividad de calcio en grupos de neuronas de la región CA1 del hipocampo cambia como producto de un aprendizaje espacial.

En el aprendizaje y en el nuevo aprendizaje, las neuronas que representan el estímulo sensorial se activan en gran medida durante la trayectoria.

En el aprendizaje y en el nuevo aprendizaje, los distintos contextos están codificados por diferentes poblaciones de neuronas.

A lo largo del entrenamiento, los ensambles neuronales se reconfiguran y están conformados por diferentes poblaciones de neuronas.

13 BIBLIOGRAFÍA

- Andersen, P., Morris, R., Amaral, D., Bliss, T., & O'Keefe, J. (2006). The hippocampus book. Oxford University Press.
- Anderson, M. I., & Jeffery, K. J. (2003). Heterogeneous Modulation of Place Cell Firing by Changes in Context. *Journal of Neuroscience*, 23(26), 8827–8835. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-26-08827.2003>
- Barnes, P., Hale, G., & Good, M. (2004). Intramaze and Extramaze Cue Processing in Adult APPSWE Tg2576 Transgenic Mice. *Behavioral Neuroscience*, 118(6), 1184–1195. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.118.6.1184>
- Burgess, N. (2007). The hippocampus book. Cap. 14 Oxford university press.
- Cai, D. J., Aharoni, D., Shuman, T., Shobe, J., Biane, J., Song, W., Wei, B., Veshkini, M., La-Vu, M., Lou, J., Flores, S. E., Kim, I., Sano, Y., Zhou, M., Baumgaertel, K., Lavi, A., Kamata, M., Tuszynski, M., Mayford, M., ... Silva, A. J. (2016) A shared neural ensemble links distinct contextual memories encoded close in time. *Nature*, 534(7605), 115–118. <https://doi.org/10.1038/nature17955>
- Calton, J. L., Stackman, R. W., Goodridge, J. P., Archev, W. B., Dudchenko, P. A., & Taube, J. S. (2003). Hippocampal Place Cell Instability after Lesions of the Head Direction Cell Network. *Journal of Neuroscience*, 23(30), 9719–9731. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-30-09719.2003>
- Carrillo-Reid, L., Tecuapetla, F., Tapia, D., Hernández-Cruz, A., Galarraga, E., Drucker-Colin, R., & Bargas, J. (2008). Encoding Network States by Striatal Cell Assemblies. *Journal of Neurophysiology*, 99(3), 1435–1450. <https://doi.org/10.1152/jn.01131.2007>

- Chersi, F., & Burgess, N. (2015). The Cognitive Architecture of Spatial Navigation: Hippocampal and Striatal Contributions. *Neuron*, 88(1), 64–77. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.09.021>
- David, A. & Lavenex, P. (2007). The hippocampus book. Cap. 3 Oxford university press.
- Grewe, B. F., Gründemann, J., Kitch, L. J., Lecoq, J. A., Parker, J. G., Marshall, J. D., Larkin, M. C., Jercog, P. E., Grenier, F., Li, J. Z., Lüthi, A., & Schnitzer, M. J. (2017). Neural ensemble dynamics underlying a long-term associative memory. *Nature*, 543(7647), 670–675. <https://doi.org/10.1038/nature21682>
- Guzowski, J. F., Knierim, J. J., & Moser, E. I. (2004). Ensemble Dynamics of Hippocampal Regions CA3 and CA1. *Neuron*, 44(4), 581–584. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.11.003>
- Hafting, T., Fyhn, M., Molden, S., Moser, M.-B., & Moser, E. I. (2005). Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. *Nature*, 436(7052), 801–806. <https://doi.org/10.1038/nature03721>
- Hannay, H. J., Feldman, Z., Phan, P., Keyani, A., Panwar, N., Goodman, J. C., & Robertson, C. S. (1999). Validation of a controlled cortical impact model of head injury in mice. *Journal of Neurotrauma*, 16(11), 1103–1114. <https://doi.org/10.1089/neu.1999.16.1103>
- Harris, K. D., Csicsvari, J., Hirase, H., Dragoi, G., & Buzsáki, G. (2003b). Organization of cell assemblies in the hippocampus. *Nature*, 424(6948), 552–556. <https://doi.org/10.1038/nature01834>

- Hartley, T., Lever, C., Burgess, N., & O'Keefe, J. (2014). (2014) Space in the brain: How the hippocampal formation supports spatial cognition. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 369(1635), 20120510. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0510>
- Hebb, D. O. (1949). *The organization of behavior: a neuropsychological theory*. J. Wiley; Chapman & Hall.
- Hull, C. (1943). *Principles of behavior*. New York: Appleton-Century-Crofts.
- Jeantet, Y., & Cho, Y. H. (2012). Evolution of hippocampal spatial representation over time in mice. *Neurobiology of Learning and Memory*, 98(4), 354–360. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2012.10.004>
- Kinsky, N. R., Sullivan, D. W., Mau, W., Hasselmo, M. E., & Eichenbaum, H. B. (2018). Hippocampal Place Fields Maintain a Coherent and Flexible Map across Long Timescales. *Current Biology*, 28(22), 3578-3588.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.09.037>
- Leutgeb, S., Leutgeb, J. K., Barnes, C. A., Moser, E. I., McNaughton, B. L., & Moser, M.-B. (2005). (2005) Independent Codes for Spatial and Episodic Memory in Hippocampal Neuronal Ensembles. *Science*, 309(5734), 619–623. <https://doi.org/10.1126/science.1114037>
- Lever, C., Burton, S., Jeewajee, A., O'Keefe, J., & Burgess, N. (2009). Boundary Vector Cells in the Subiculum of the Hippocampal Formation. *Journal of Neuroscience*, 29(31), 9771–9777. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1319-09.2009>
- Liu, X., Ramirez, S., Pang, P. T., Puryear, C. B., Govindarajan, A., Deisseroth, K., & Tonegawa, S. (2012). Optogenetic stimulation of a hippocampal engram

- activates fear memory recall. *Nature*, 484(7394), 381–385.
<https://doi.org/10.1038/nature11028>
- Lorente de Nó, R. (1933). Vestibulo-ocular reflex arc. *Archives of Neurology and Psychiatry*.30(2),245-291.
- Lorente de Nó, R. (1934). Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system. *Journal für Psychologie und Neurologie*.
- Lu, J., Li, C., Singh-Alvarado, J., Zhou, Z. C., Fröhlich, F., Mooney, R., & Wang, F. (2018). MIN1PIPE: A Miniscope 1-Photon-Based Calcium Imaging Signal Extraction Pipeline. *Cell Reports*, 23(12), 3673–3684.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.05.062>
- Mankin, E. A., Sparks, F. T., Slayeh, B., Sutherland, R. J., Leutgeb, S., & Leutgeb, J. K. (2012). Neuronal code for extended time in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(47), 19462–19467.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1214107109>
- Markus, E. J., Barnes, C. A., McNaughton, B. L., Gladden, V. L., & Skaggs, W. E. (1994). Spatial information content and reliability of hippocampal CA1 neurons: Effects of visual input. *Hippocampus*, 4(4), 410–421.
<https://doi.org/10.1002/hipo.450040404>
- Mettler, F. A., Mettler, C. C., & Culler, E. (1935). EFFECTS OF TOTAL REMOVAL OF THE CEREBRAL CORTEX. *Archives of Neurology & Psychiatry*, 34(6), 1238–1249. <https://doi.org/10.1001/archneurpsyc.1935.02250240107008>

- Morris, R. G. M., Garrud, P., Rawlins, J. N. P., & O'Keefe, J. (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*, *297*(5868), 681–683. <https://doi.org/10.1038/297681a0>
- Moser, E. I., Kropff, E., & Moser, M.-B. (2008). Place cells, grid cells, and the brain's spatial representation system. *Annual Review of Neuroscience*, *31*, 69–89. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.31.061307.090723>
- Muller, R. U., Bostock, E., Taube, J. S., & Kubie, J. L. (1994). On the directional firing properties of hippocampal place cells. *Journal of Neuroscience*, *14*(12), 7235–7251. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.14-12-07235.1994>
- Muller, R. U., & Kubie, J. L. (1987). The effects of changes in the environment on the spatial firing of hippocampal complex-spike cells. *Journal of Neuroscience*, *7*(7), 1951–1968. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.07-07-01951.1987>
- O'Keefe, J., & Dostrovsky, J. (1971). The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Research*, *34*(1), 171–175. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(71\)90358-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(71)90358-1)
- O'Keefe, J. (1976) Place units in the hippocampus of the freely moving rat. *Experimental Neurology*, *51*(1), 78–109. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(76\)90055-8](https://doi.org/10.1016/0014-4886(76)90055-8)
- O'Keefe, J., & Nadel, L. (1978). *The Hippocampus as a Cognitive Map* (Oxford University Press).
- Pastalkova, E., Itskov, V., Amarasingham, A., & Buzsáki, G. (2008). Internally Generated Cell Assembly Sequences in the Rat Hippocampus. *Science*, *321*(5894), 1322–1327. <https://doi.org/10.1126/science.1159775>

- Pérez-Escudero, A., Vicente-Page, J., Hinz, R. C., Arganda, S., & Polavieja, G. G. de. (2014). idTracker: Tracking individuals in a group by automatic identification of unmarked animals. *Nature Methods*, *11*(7), 743–748. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2994>
- Piot-Grosjean, O., Wahl, F., Gobbo, O., & Stutzmann, J. M. (2001). Assessment of sensorimotor and cognitive deficits induced by a moderate traumatic injury in the right parietal cortex of the rat. *Neurobiology of Disease*, *8*(6), 1082–1093. <https://doi.org/10.1006/nbdi.2001.0450>
- Pnevmatikakis, E. A., & Giovannucci, A. (2017). NoRMCorre: An online algorithm for piecewise rigid motion correction of calcium imaging data. *Journal of Neuroscience Methods*, *291*, 83–94. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2017.07.031>
- Rickgauer, J. P., Deisseroth, K., & Tank, D. W. (2014). Simultaneous cellular-resolution optical perturbation and imaging of place cell firing fields. *Nature Neuroscience*, *17*(12), 1816–1824. <https://doi.org/10.1038/nn.3866>
- Rolls, E. (2013). The mechanisms for pattern completion and pattern separation in the hippocampus. *Frontiers in Systems Neuroscience*, *7*. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2013.00074>
- Rubin, A., Geva, N., Sheintuch, L., & Ziv, Y. (2015) Hippocampal ensemble dynamics timestamp events in long-term memory. *eLife*, *4*, e12247. <https://doi.org/10.7554/eLife.12247>
- Saatman, K. E., Feeko, K. J., Pape, R. L., & Raghupathi, R. (2006). Differential Behavioral and Histopathological Responses to Graded Cortical Impact Injury

- in Mice. *Journal of Neurotrauma*, 23(8), 1241–1253.
<https://doi.org/10.1089/neu.2006.23.1241>
- Scoville, W. B. & Milner, B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 20, 11–21
- Sheintuch, L., Rubin, A., Brande-Eilat, N., Geva, N., Sadeh, N., Pinchasof, O., & Ziv, Y. (2017). Tracking the Same Neurons across Multiple Days in Ca²⁺ Imaging Data. *Cell Reports*, 21(4), 1102–1115.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.10.013>
- Silva, A. J., Zhou, Y., Rogerson, T., Shobe, J., & Balaji, J. (2009) Molecular and Cellular Approaches to Memory Allocation in Neural Circuits. *Science*, 326(5951), 391–395. <https://doi.org/10.1126/science.1174519>
- Taube, J. S., Muller, R. U., & Ranck, J. B. (1990). Head-direction cells recorded from the postsubiculum in freely moving rats. I. Description and quantitative analysis. *Journal of Neuroscience*, 10(2), 420–435.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.10-02-00420.1990>
- Tegtmeier, J., Brosch, M., Janitzky, K., Heinze, H.-J., Ohl, F. W., & Lippert, M. T. (2018). (2018) CAVE: An Open-Source Tool for Combined Analysis of Head-Mounted Calcium Imaging and Behavior in MATLAB. *Frontiers in Neuroscience*, 12. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00958>
- Thompson, L. T., & Best, P. J. (1990). Long-term stability of the place-field activity of single units recorded from the dorsal hippocampus of freely behaving rats. *Brain Research*, 509(2), 299–308. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)90555-P](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)90555-P)

- Tolman. E. C. (1948). Cognitive maps in rats and men. *Psychological Review*, 55, 189-208.
- Tosun, T., Gür, E., & Balcı, F. (2016). Mice plan decision strategies based on previously learned time intervals, locations, and probabilities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(3), 787–792. <https://doi.org/10.1073/pnas.1518316113>
- Tulving E, Schacter DL. (1990). Priming and human memory systems. *Science* 247:301–306.
- Wilson, M. A., & McNaughton, B. L. (1993). Dynamics of the hippocampal ensemble code for space. *Science*, 261(5124), 1055–1058. <https://doi.org/10.1126/science.8351520>
- Zhou, P., Resendez, S. L., Rodriguez-Romaguera, J., Jimenez, J. C., Neufeld, S. Q., Giovannucci, A., Friedrich, J., Pnevmatikakis, E. A., Stuber, G. D., Hen, R., Kheirbek, M. A., Sabatini, B. L., Kass, R. E., & Paninski, L. (2018) Efficient and accurate extraction of in vivo calcium signals from microendoscopic video data. *eLife*, 7, e28728. <https://doi.org/10.7554/eLife.28728>
- Ziv, Y., Burns, L. D., Cocker, E. D., Hamel, E. O., Ghosh, K. K., Kitch, L. J., Gamal, A. E., & Schnitzer, M. J. (2013) Long-term dynamics of CA1 hippocampal place codes. *Nature Neuroscience*, 16(3), 264–266. <https://doi.org/10.1038/nn.3329>