



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA BIOFÍSICA Y
NEUROCIENCIAS**

**“Identificación de posibles patrones de conexión del Giro
Dentado con el área CA3 del hipocampo, por medio de
registros electrofisiológicos de alta densidad”**

TESIS

Que presenta

ISABEL ROMERO MALDONADO

Para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS
EN LA ESPECIALIDAD DE
NEUROBIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR**

Director de la Tesis:

Dr. Rafael Gutiérrez Aguilar

Ciudad de México

Agosto, 2020

Agradezco al CONACYT por proveer la beca que me ayudó a realizar
este trabajo de tesis

Contenido

Dedicatorias	1
Contenido.	2
Resumen.	4
Abstract	5
introduccion	6
Giro Dentado.	8
Fibras Musgosas	9
Hipocampo	9
Sinapsis formadas por las fibras musgosas en el área CA3. .12	
Estudio de los patrones de conexión entre el área CA3 y el Giro Dentado	16
Justificación	19
Hipótesis	19
Objetivo General.	20
Objetivos específicos	20
Material y Métodos.	20
Preparación in vitro.	20
Fármacos.	22
Registros electrofisiológicos	22
Resultados.	23
Herramientas de análisis	23
1. Detección de electrodos funcionales y eliminación de electrodos no funcionales.	24
1.1 Medición de la actividad generalizada por cada cuadro muestral (4096 canales, 1 cuadro muestral) durante la duración total del registro.	25
1.2 Detección de eventos que sobrepasan un umbral de voltaje adaptativo en cada electrodo	27
1.3 Vectores de peso de actividad	28

1.4 Delimitación de regiones anatómicas de Interés	29
2. Determinación de características para describir la actividad multiunitaria.	30
3. Clasificación de las espigas detectadas	33
4. Eliminación de la redundancia.	34
5. Simulación de registro compuesto.	35
6. Simulaciones de Monte Carlo	37
Número de células registradas, aplicación del SPC	38
Controles.	39
Patrones espacio-temporales entre las regiones Giro Dentado y CA3.	40
Discusión.	41
Perspectivas	47
Referencias.	48

Resumen

No ha sido sino hasta recientemente que se han desarrollado técnicas que permiten estudiar un gran número de neuronas simultáneamente, tanto in vitro como in vivo. Para el registro de rebanadas, in vitro, se han desarrollado matrices de alta densidad de microelectrodos (4096 en 4 mm²) con tecnología CMOS. Debido a la novedad de esta técnica, nuestro grupo de investigación ha desarrollado una serie de herramientas que permiten, a partir de registros extracelulares, determinar la anatomía del hipocampo a partir de la actividad captada por los electrodos. Esto permite el análisis correlacional de la actividad en función del espacio y tiempo con muy alta resolución. En este trabajo de tesis, desarrollé una serie de herramientas que permiten avanzar, con mayor precisión estas tareas. Estas herramientas permiten: a) discriminar la señal, celular o de campo, con respecto al ruido, b) determinar el número y tipo de células registradas clasificándolas por la morfología de los potenciales de acción extracelulares; c) determinar la variación de la actividad multiunitaria o de campo en diferentes condiciones farmacológicas; d) definir la coactivación de células y su posición que nos permite deducir la presencia de ensambles neuronales y la actividad de red.

En este trabajo de tesis abordo cada paso del análisis con la intención de mostrar que esta nueva tecnología permite estudiar las propiedades emergentes de las redes neuronales. En particular, los métodos aquí discutidos pueden ser escalados a diferentes sistemas de registro con menor o mayor cantidad de electrodos, desde tetrodos hasta matrices de 4096 electrodos. Nuestra metodología ha sido diseñada para usarse en el análisis de señales obtenidas con matrices de alta densidad que, por ser el sistema con mayor densidad de microelectrodos del mercado, permite estudiar la propagación de información en el hipocampo con una alta resolución espacio-temporal.

Abstract

It has not been until recently that techniques have been developed that allow a large number of neurons to be studied simultaneously, both in vivo and in vitro. For the registration of slices, in vitro, arrays of high density microelectrodes (4096 in 4 mm²) with CMOS technology have been developed. Due to the novelty of this technique, our research group has developed a series of tools that allow, from extracellular records, determine the anatomy of the hippocampus from the activity captured by the electrodes. This allows the correlational analysis of the activity based on space and time with very high resolution. In this thesis work, I developed a series of tools that allow these tasks to be advanced with greater precision. These tools allow: a) discriminate the signal, cellular or field, with respect to noise, b) determine the number and type of cells recorded by classifying them by the morphology of the extracellular action potentials; c) determine the variation of multi-unit or field activity in different pharmacological conditions; d) define the coactivation of cells and their position that allows us to deduce the presence of neuronal assemblies and network activity. In this thesis I approach each step of the analysis with the intention of showing that this new technology allows to study the emergent properties of neural networks. In particular, the methods discussed here can be scaled to different recording systems with a smaller or greater number of electrodes, from tetrodes to matrices of 4096 electrodes. Our methodology has been designed to be used in the analysis of signals obtained with high density matrices that, being the system with the highest density of microelectrodes in the market, allows us to study the propagation of information in the hippocampus with a high spatio-temporal resolution.

Introducción

La formación hipocampal es una estructura cortical que forma parte del sistema límbico y que integra información proveniente de diferentes estructuras cerebrales. Funcionalmente se ha relacionado con tareas cognitivas como la navegación espacial, procesos de aprendizaje y formación de memoria (Scoville y Milner, 1957; Squire y Zola, 1996; O'keefe, 1976).

Alteraciones de la estructura y funcionamiento del complejo corteza entorrinal-hipocampo se han relacionado con procesos patológicos como la esquizofrenia, la depresión (Sheline y cols., 2002), la enfermedad de Alzheimer (Jack C. y cols, 1998) y la epilepsia (Babb, 1999; Magloczky y Freund, 2005).

La formación hipocampal comprende a la corteza entorrinal, el parasubiculum, el presubiculum, el subíulum, el Giro Dentado y el hipocampo. Figura 1

La principal entrada de información al hipocampo es la corteza entorrinal, a la que llegan fibras aferentes de diversas áreas corticales (Burwell y Amaral, 1998). De esta región, las neuronas de la capa II dan origen a la vía perforante, que atraviesa el subiculum y termina en el Giro Dentado y el área CA3 del hipocampo.

los *stratum pyramidale* y *radiatum* (Forster y cols., 2006; Amaral y Witter, 1989).

El Giro Dentado a su vez se divide en tres capas: *stratum moleculare*, *stratum granulare* y el hilus o capa polimórfica.

Giro Dentado

El Giro Dentado está compuesto por tres capas: *stratum moleculare*, *stratum granulare* y el hilus o capa polimórfica.

El *stratum moleculare* se divide en proximal, medial y superficial y en él se encuentran las dendritas de las células granulares, las células principales del Giro Dentado. Esta capa contiene pocas interneuronas GABAérgicas y algunas colinérgicas (Blaker y cols., 1988; Frotscher y cols., 2000; Romo-Parra y cols., 2003). Además, contiene axones provenientes de las células piramidales de la capa II de la corteza entorrinal, que en su conjunto son conocidos como vía perforante. Liberan glutamato como neurotransmisor y terminan en la capa molecular medial y superficial del Giro Dentado. La capa molecular proximal (más cercana al soma) recibe la entrada de fibras comisurales de asociación provenientes de las células musgosas en el hilus (Andersen, 2007).

Bajo la capa molecular se encuentra la capa granular, formada por los somas de las células granulares. Las capas molecular y granular forman una estructura en forma de U en el hipocampo ventral, o V en el hipocampo dorsal. En el área que encierra la capa granular se encuentra la capa celular polimórfica o hilus. Las células en esta última capa son variadas. Incluyen células musgosas que son glutamatérgicas y una amplia variedad de interneuronas GABAérgicas. Estas interneuronas, así como las células musgosas inervan a las células granulares.

Fibras Musgosas

Los axones de las células granulares se denominan fibras musgosas, son amielínicas y tienen tres tipos de terminaciones: 1) los botones gigantes, 2) las extensiones filopoidales que se originan en los botones gigantes, y 3) las varicosidades *en passant*. Los botones gigantes tienen un tamaño de 4 a 8 micrómetros y terminan en las células musgosas del hilus y en las células piramidales de CA3, mientras que las extensiones filopoidales y las varicosidades *en passant* (2-3 micrómetros) inervan a interneuronas del hilus y CA3 (Acsády y cols., 1998). Las fibras musgosas corren a lo largo del área CA3, en el *stratum lucidum*, donde hacen sinapsis con las dendritas apicales de las células piramidales. Una célula piramidal del área CA3 puede recibir hasta 50 entradas sinápticas provenientes de las fibras musgosas (Amaral y cols., 1990; Claiborne y cols., 1986), mientras que las interneuronas reciben hasta 50 veces más contactos de las fibras musgosas comparado con las células piramidales de CA3 (Acsády y cols., 1998). Es por ello que se ha propuesto que los principales blancos sinápticos de las fibras musgosas son las interneuronas y no las células piramidales de CA3.

Las fibras musgosas en el roedor adulto son glutamatérgicas, sin embargo, bajo condiciones de hiperexcitabilidad y durante el desarrollo, también liberan GABA como neurotransmisor (Gutiérrez, 2016).

Hipocampo

El hipocampo se divide en tres áreas: CA1, 2 y 3. Sus células principales son las células piramidales, cuyos somas forman la capa piramidal que se extiende a todas las áreas del hipocampo. Por encima de la capa piramidal se extienden tres estratos: el *Stratum lucidum*, que correspondiente únicamente al área CA3, el

Stratum radiatum y el *Stratum lacunosum moleculare*. En estos estratos se encuentran las dendritas apicales de las células piramidales. Por debajo de la capa piramidal se extiende el *Stratum oriens* y el *Stratum alveus*. En estos estratos se encuentran las dendritas basales y axones de las células piramidales.

Las dendritas de las células piramidales del área CA3, como las del área CA1, contienen espinas dendríticas. A diferencia de otras neuronas del hipocampo y neocorticales, las células del área CA3 poseen un tipo peculiar de espinas dendríticas llamadas excrescencias espinosas que pueden tener de 1 a 16 ramificaciones con el mismo origen dendrítico. Usualmente estas espinas están rodeadas por un solo botón sináptico gigante proveniente de las fibras musgosas que puede establecer sinapsis con múltiples ramificaciones de la misma o varias excrescencias espinosas de la misma dendrita (Acsády y cols., 1998).

Diversos estudios sugieren que las células piramidales en el hipocampo son anatómica y funcionalmente heterogéneas (Li y cols., 1994; Witter, 2007). En el hipocampo dorsal, por ejemplo, éstas tienen un diámetro de aproximadamente 20 μm , mientras que en el hipocampo ventral tienen un diámetro de aproximadamente 30 μm , además de árboles dendríticos y axonales más extensos (Turner y cols., 1995). En el eje transversal también hay diferencias en la morfología y conexiones de las células piramidales de CA3. En CA3 proximal, el árbol dendrítico es menos extenso y no entra en el *Stratum lacunosum moleculare*, mientras que en CA3 intermedio y distal, éste es más extenso y llega hasta el *Stratum lacunosum moleculare*. No hay una correspondencia entre la extensión del árbol dendrítico y la extensión del árbol axonal. Las células

piramidales de CA3 proximal, por ejemplo, presentan los árboles axonales más extensos.

Las células piramidales del hipocampo también se encuentran inervadas por una variedad de interneuronas, y mientras que las primeras se encuentran organizadas en una sola capa, éstas últimas no tienen una organización aparente y se encuentran distribuidas en todas las áreas y estratos del hipocampo. Conforman aproximadamente el 10 por ciento de todas las células en el hipocampo y presentan una gran diversidad morfológica y funcional (Freund y Buzsáki, 1996; Somogyi y Klausberger, 2005).

Las fibras recurrentes y comisurales terminan en las dendritas basales así como en el resto de los segmentos de las dendritas apicales. Esto se conoce como las colaterales de asociación de CA3 (Ishizuka y cols., 1990; Li y cols., 1994). Esta extensa red de conexiones recurrentes ha dado pie a hipótesis del funcionamiento del área CA3 como una red auto-asociativa involucrada en el almacenamiento y evocación de la información (Bennett y cols., 1994; Rolls, 1996). Un efecto secundario de esta extensa interconectividad es que el área CA3 es altamente excitable y susceptible de generar actividad epiléptica cuando la inhibición se suprime.

Por otro lado, los axones de las células piramidales de la parte proximal de CA3 (la más cercana al Giro Dentado) se arborizan extensamente en el hilus, haciendo contacto con interneuronas y células musgosas que, a su vez, hacen sinapsis con las células granulares del Giro Dentado, por lo cual se ha sugerido que hay una proyección de CA3 hacia el Giro Dentado (Scharfman, 1994a, 1996; Scharfman, 2007; Ortiz et al., 2018). Finalmente, hay

diversas interneuronas que modulan la transmisión sináptica en el circuito (Acsády y cols., 1998).

El área CA3 del hipocampo es una región crucial para el procesamiento de información en el cerebro, pues las células de esta región pueden modificar la información entrante a través de sus conexiones recurrentes y transmitir el mensaje modificado al área CA1. La información proveniente de la corteza entorrinal es transmitida a las dendritas apicales distales de CA3 directamente a través de la vía perforante e indirectamente a través de las células granulares del Giro Dentado, cuyos axones (fibras musgosas) terminan en la segmento proximal de las dendritas apicales (Lee y Kesner, 2004; Myers y Scharfman, 2011). La evidencia experimental indica que la corteza entorrinal es necesaria para la evocación de información, mientras la proyección de Giro Dentado a CA3 es esencial para la codificación de información (Lassalle y cols., 2000; Lee y Kesner, 2004; Rolls, 1996; Treves y Rolls, 1992, 1994).

Sinapsis formadas por las fibras musgosas en el área CA3

Estudios realizados en roedores han mostrado que existen gradientes anatómicos a lo largo del eje transversal de CA3, que pudieran tener consecuencias funcionales. Las neuronas de la parte proximal de CA3 reciben entradas de las fibras musgosas de ambas hojas del Giro Dentado, supra e infra piramidal. Las zonas intermedia y distal de CA3 reciben entradas de las fibras musgosas solo de la hoja suprapiramidal (Claiborne et al., 1986; Witter, 2007). Las neuronas de la región CA3 proximal, particularmente aquellas rodeadas por las hojas del Giro Dentado, reciben entradas de la vía perforante (Ishizuka et al., 1990, 1995; Witter, 2007).

Las neuronas de esta última región, no contribuyen a las colaterales recurrentes que van a las zonas intermedias y distales, pero proyectan hacia atrás, al hilus y a sí mismas. Las neuronas de la zona intermedia y distal proveen colaterales recurrentes a lo largo de todo el eje transversal de CA3, pero las proyecciones al área proximal presentan menor actividad (Ishizuka et al., 1990; Li et al., 1994; Witter, 2007).

La sinapsis formada entre las células piramidales de CA3 y las fibras musgosas del Giro Dentado ha sido considerada como una sinapsis “detonadora”, en referencia a la idea de que el disparo de una sola célula granular es suficiente para hacer disparar a una célula piramidal de CA3 (Brown and Zador, 1986; McNaughton and Morris, 1987; Andersen and Loyning, 1962; Guzman y cols, 2016)

Sin embargo, la formación de un potencial de acción por parte de las células piramidales de CA3 no es un evento simple, ya que depende de la actividad previa de la célula, los cambios recientes en el potencial de membrana y la proporción de entradas inhibitorias y excitatorias que reciben (Koch y cols., 1995; Mainen y cols., 1995; Stevens y Zador, 1998).

Las células granulares se generan de manera continua durante toda la vida en los roedores (Altman y Das, 1965; Cameron y McKay, 2001; Ming y Song, 2011). Se ha sugerido que las células generadas en el adulto contribuyen al proceso de separación de patrones, como se describe abajo (Vivar y van Praag, 2013).

En general, las células granulares de nueva formación reciben entradas de células granulares maduras, proyecciones retrogradas directas del área CA3, e inervación desigual de la corteza

entorrinal lateral y medial. Estas regiones de la corteza entorrinal proveen diferentes tipos de información. Las entradas más robustas que provienen de la corteza entorrinal lateral llevan información sobre signos externos y contextuales, y sus proyecciones al Giro Dentado se asocian al procesamiento de la información no ambiental, mientras que la zona medial provee información sobre la posición espacial (Vivar y van Praag, 2013).

Los patrones de entrada son la representación de la actividad de un subgrupo de axones de la vía perforante, almacenados en CA3 vía sinapsis plásticas entre células piramidales. Los patrones almacenados son transmitidos por co-actividad en estas células piramidales, apoyando la idea de los ensamblajes celulares propuestos por Hebb en 1949. Para almacenar nuevos patrones y su posterior recuperación, la mayoría de los modelos computacionales de CA3 asumen la presencia de señales de entrenamiento, entradas que son lo suficientemente fuertes para disparar actividad postsináptica y a su vez plasticidad de largo plazo entre células postsinápticas y otras células presinápticas coincidentalmente activas.

Ha sido especulado por mucho tiempo que las fibras musgosas, las cuales forman sinapsis extraordinariamente largas y fuertes con las dendritas apicales de las células piramidales de CA3, podrían servir como señales de entrenamiento. Evidencia experimental que apoya esta idea viene de registros fisiológicos en los cuales, trenes de espigas en una sola fibra musgosa pueden provocar que una piramidal postsináptica de CA3 alcance su umbral de disparo (Henze D, et. al, 2000).

De acuerdo con esto, la entrada de la corteza entorrinal a través de la vía perforante tiene sus blancos en las células piramidales de CA3 directamente, e indirectamente vía las fibras musgosas.

Las células granulares generalmente presentan escasa actividad, sin embargo, esa escasa actividad alcanza las fibras musgosas, y es lo suficientemente fuerte para evocar una actividad postsináptica en las células piramidales con las que conecta, permitiendo el reforzamiento de las sinapsis entre esas células piramidales y sus entradas entorrinales coactivas, almacenando el patrón.

Posteriormente, si se presenta una versión incompleta o “ruidosa” del patrón almacenado, la actividad de las células piramidales de los patrones previamente reforzados puede generar una reintegración o completar el patrón según lo almacenado (proceso denominado *pattern completion* en inglés). Evidencia experimental que sostiene esta idea es que el hipocampo está relacionado (y específicamente CA3) con comportamientos que requieren el reconocimiento de estímulos familiares, y eso permite asumir que se requiere la capacidad de completar patrones en base a las representaciones neurales almacenadas. (Scharfman 2015)

Además del rol de señal de entrenamiento asociada, muchos modelos también proponen que el Giro Dentado realiza un procesamiento previo de las entradas de la corteza entorrinal, realizando una separación de patrones, alterando las representaciones de patrones de entrada para hacerlos escasos y disminuir el solapamiento. Esto facilita el subsecuente almacenamiento y recuperación en CA3. Los datos experimentales que apoyan esta idea, implican al Giro

Dentado en tareas que requieren estímulos similares que deben ser separados. (Scharfman, 2015).

Numerosos estudios han aportado evidencia que soporta estas funciones propuestas para el Giro Dentado y el área CA3, pero la mayoría de ellos son estudios conductuales indirectos o estudios fisiológicos que no miden directamente la correlación entrada-salida que es requerida para demostrar esta hipótesis. (Santoro, 2013; Yassa y Stark, 2011).

Estudio de los patrones de conexión entre el área CA3 y el giro dentado

Se han utilizado diversos enfoques para estudiar un posible orden o patrón de conexión entre estas áreas, en vías de demostrar una compartimentalización que explique la distribución de tareas asociadas a las diversas regiones.

Neunuebel Y Knierim (2014) presentaron evidencia directa de separación de patrones en el Giro Dentado, y complementación/generalización de patrones en CA3, en un estudio en el cual CA3 produce un patrón de salida similar a la representación originalmente almacenada cuando se presenta una señal incompleta desde el Giro Dentado (Neunuebel y Knierim, 2014). En ese estudio, los registros de CA3 fueron confinados a la región intermedia y distal. Sin embargo, una parte importante que tomar en cuenta, es el hecho de que las propiedades estructurales en las que se basa este estudio, mencionadas previamente como características generales, se mantienen en el nivel estructural de la red, sin tomar en cuenta los aspectos funcionales ni efectivos, que no necesariamente deben corresponder a las características anatómicas descritas para explicar las funciones emergentes.

Claiborne y colaboradores en 1986 realizaron un mapa estructural de las proyecciones de los axones de las células granulares del Giro Dentado, utilizando microscopios computarizados. Inyectaron intracelularmente peroxidasa de rábano dentro de las células granulares en rebanadas de hipocampo de rata (Claiborne y cols., 1986) para identificar a las fibras musgosas en su camino hacia CA3. Con esta técnica, se observó un patrón espacial de proyecciones de las fibras musgosas al área CA3, que se muestra a continuación. Las proyecciones de las células granulares de la hoja infrapiramidal del Giro Dentado, proyectan hacia la región CA3 proximal. Y las proyecciones provenientes de la hoja suprapiramidal, avanzan directamente sobre el *stratum radiatum* hasta alcanzar el *stratum lucidum*, hacia la parte media y distal de CA3. Posteriormente, Galimberti y col. (2010) describieron la posición tanto del cuerpo como de las arborizaciones axonales de células granulares del Giro Dentado, tanto *in vitro* como *in vivo*, usando microscopia para seguir el curso temporal del cultivos organotípicos de rebanadas de hipocampo de roedores, que sobre expresaban la proteína fluorescente verde membranal (mGFP por sus siglas en inglés) *in vitro*, e induciendo la expresión de mGFP mediante transducción de lentivirus en células granulares de una subregión del Giro Dentado (ej., hoja infrapiramidal). Esto les permitió seguir las trayectorias de proyección de las fibras musgosas. Utilizando ambas metodologías, Galimberti y col. observaron un patrón de distribución espacial de las proyecciones anatómicas (Galimberti y cols., 2010).

Al contrastar los hallazgos de este estudio con aquellos descritos por Caliborne en 1986, se observa que el patrón de proyección espacial es consecuente, manteniendo la hoja infrapiramidal

proyecciones preferentemente hacia la región CA3 proximal, y la hoja suprapiramidal preferentemente proyecta hacia la zona distal.

La información que se posee sobre las funciones del área CA3 y su comunicación con el Giro Dentado y con otras estructuras de la formación hipocampal, provienen de estudios *in vivo* e *in vitro* registrando potenciales de campo locales o registros de célula única, monitoreando el potencial intracelular de una neurona, o de algunos cientos con la microscopía de 2-fotones. Esto implica mediciones directas de la actividad celular, pero que solo son posibles a pequeña escala. Este tipo de enfoque excluye la detección de la actividad neuronal en regiones adyacentes, no exhiben evidencia de la propagación de la actividad neuronal a través del circuito neuronal completo.

Es crucial poder combinar una descripción detallada de los patrones de conexión anatómicos, con los parámetros fisiológicos necesarios para establecer cómo las propiedades funcionales de la red emergen de que configuración estructural a escala celular (Ullo et al, 2014).

El uso de técnicas que permitan obtener información de la actividad neuronal en múltiples áreas, registrando cientos de células simultáneamente significa lograr registros electrofisiológicos de alta resolución a gran escala, aumentando el área de registro y manteniendo la resolución espacio temporal. Esto asegura alta fidelidad en la dinámica de red observable (Ferrea et al, 2012).

La implementación de arreglos de micro electrodos (MEAs por sus siglas en inglés), o MEA de alta densidad (HD-MEA) con 4096

microelectrodos, introducidos por Berdondini y col. (2009) permiten registrar simultáneamente la actividad eléctrica de miles de neuronas con una resolución temporal de sub-milisegundos y espacial, a nivel de célula única. Esta técnica está en uso actualmente en el laboratorio donde fue realizado este trabajo de tesis.

Justificación

La información existente sobre los patrones de conexión entre las células granulares del giro dentado con las células piramidales e interneuronas del área CA3 del hipocampo ha sido limitada al arreglo espacial descrito con técnicas anatómicas. Sin embargo, el posible patrón espacial de conexiones funcionales entre estas dos estructuras no se conoce (Jonas 2016 - 2017??; Ortiz et al., 2018). Para identificar patrones de conexiones neuronales se requiere de una estrategia experimental que permita obtener información fidedigna del disparo neuronal del mayor número de células posible. Actualmente contamos con la posibilidad de hacer registros electrofisiológicos de miles de neuronas simultáneamente, con lo que será posible determinar si hay algún patrón de conexión funcional entre el giro dentado y la zona CA3.

Hipótesis

A partir de la información que sugiere que existe un arreglo anatómico en las proyecciones del giro dentado al área CA3 proponemos que existe un patrón topológico de conexiones funcionales de las células granulares del giro dentado con las células piramidales del área CA3 del hipocampo.

Objetivo General

Identificar patrones espaciales de las conexiones funcionales de las células granulares del giro dentado con el área CA3 del hipocampo.

Objetivos específicos

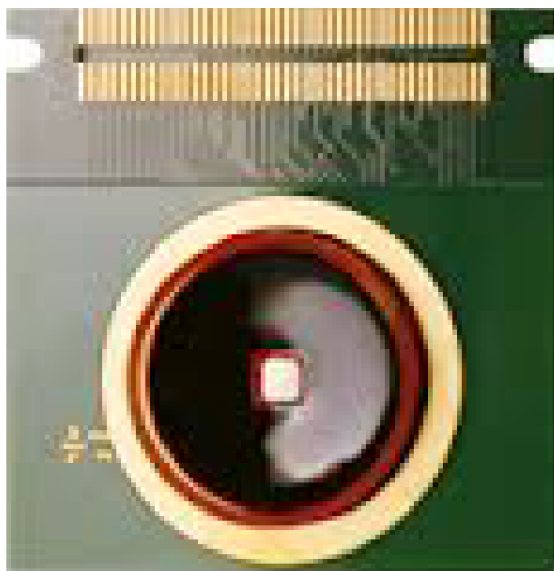
- Determinar el estado de actividad de los electrodos de la matriz de multielectrodos de alta densidad, aplicar algoritmos de detección para separar aquéllos con actividad fisiológica y descartar electrodos defectuosos o saturados.
- Detectar potenciales de acción extracelularmente captados por los electrodos correspondientes al Giro Dentado y CA3 del hipocampo.
- Determinar el número de células registradas en cada región aplicando métodos de clasificación de los potenciales de acción.
- Determinar si la actividad unitaria registrada presenta patrones espacio-temporales entre las regiones Giro Dentado y CA3.

Material y Métodos

Preparación in vitro

Se usaron ratas Wistar de 25 a 30 días de edad que fueron anestesiadas con fenobarbital sódico (50 mg/kg). Las ratas fueron decapitadas y el cerebro fue removido rápidamente y colocado en líquido céfalo-raquídeo (LCRA) con sacarosa a 4° C. La composición

del LCRA fue la siguiente (en mM): sacarosa, 210; KCl, 2.8; MgSO₄, 4; NaH₂PO₄, 1.25; NaHCO₃, 26; glucosa, 10; CaCl₂, 1; y MgCl₂, 1; a 4° C; pH 7.35 mantenido en burbujeo constante de carbógeno (O₂, 95%; CO₂, 5%). Posteriormente se prepararon rebanadas horizontales de hipocampo ventral de 350 micrómetros de espesor con un vibratomo (Leica VT1200) manteniendo el cerebro sumergido en el LCRA. Tras la obtención de las rebanadas, éstas fueron transferidas a un contenedor con pozos individuales e incubadas a 37° C con LCRA oxigenado con la siguiente composición (en mM): NaCl, 129; KCl, 3; NaH₂PO₄, 1.25; MgSO₄, 1.8; CaCl₂, 1.6; glucosa, 10; y NaHCO₃, 20; pH 7.35, hasta ser usadas para los registros electrofisiológicos.



Electrodos

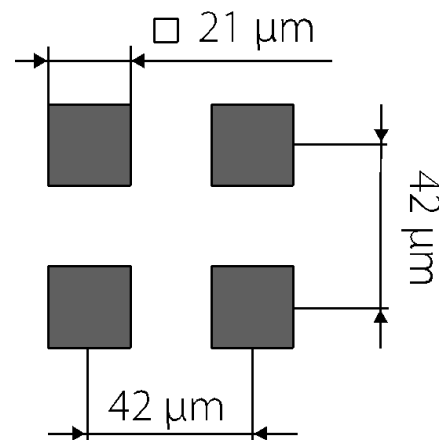


Figura 2 Cámara de registro. La cámara de registro viene integrada en un chip C-MOS. El área activa se encuentra al centro en la fotografía de la izquierda y está conformada por 4096 electrodos dispuestos en una matriz de 64 X 64.

Fármacos

Se utilizaron los siguientes fármacos: antagonista del receptor NMDA de glutamato, ácido DL-2-amino-5-fosfonoaléxico (APV, 30 μM); el antagonista de los receptores no-NMDA, 6-nitro-7-sulfamoibenzo[f]quinoxaline-2,3-diona (NBQX, 10 μM), antagonista de los receptores GABA_A bicuculina (15 μM), Tri-Metil Amonio para modificar el pH del medio extracelular (5mM, pH = 7.8), y mefloquina (15 μM).

Registros electrofisiológicos

Las rebanadas fueron colocadas en un chip de registro de 4096 microelectrodos, en un arreglo cuadrado de 64 por 64 electrodos que abarcan 4mm², dentro de una matriz de microelectrodos de alta densidad (BioCamX; 3Brain, Suiza). La frecuencia de muestreo es de 7.022 KHz con una tasa de generación de datos de 0.37 GBit/s o 2.8 GB/min (Muthmann y cols., 2015). (Figura 2)

Se obtuvo la actividad extracelular de campo en presencia de LCRA de registro (mM: NaCl 129, KCl 3, MgSO₄ 1.8, NaH₂PO₄ 1.25, NaHCO₃ 20, Glucosa 10, CaCl₂ 1.6) manteniendo la temperatura en 34-36°C y la velocidad de flujo en 10-12 ml/min. El experimento siguió 4 etapas:

1. La rebanada se colocó sobre la matriz de 4096 electrodos, constantemente perfundida por LCRA burbujeado con carbógeno (95 % O₂, 5% de CO₂), a 34-36 ° C y con una velocidad de flujo de 10-12 ml/min.

De esta condición referida en adelante como condición CONTROL, se obtuvo un registro de, por lo menos, 4 minutos de actividad espontánea.

2. Se añadieron bloqueadores a receptores a glutamato (30 μM de APV, 10 μM de NBQX) y GABA 10 μM de bicuculina) al LCRA control. En lo sucesivo, me referiré a esta condición como BLOQUEO. La rebanada se expuso a los bloqueadores durante al menos 20 minutos antes de que se iniciara el registro tras lo que se registraron al menos 4 minutos de actividad espontánea.

3. Posteriormente se indujo una variación en el pH del LCRA (variación del pH extracelular), llevándolo desde pH fisiológico (~ 7.3) a 7.8 con TMA por 3 - 5 minutos.

4. El paso final fue agregar 10 μM de Mefloquina a la solución anterior (control + bloqueadores + pH). La actividad espontánea de las células en la nueva condición llamada MEFLOQUINA se registró después de 40 minutos de interacción entre el tejido y la droga. Se obtuvieron registros de al menos 4 minutos.

Resultados

Una de las metas principales de este trabajo de tesis fue desarrollar los métodos analíticos que nos permitirían cumplir el objetivo principal planteado en este trabajo, es decir, la identificación de patrones espaciales de las conexiones funcionales de las células granulares del giro dentado con el área CA3 del hipocampo. Para ello, diseñamos diversas herramientas que nos arrojaron actividad unitaria de los electrodos de registro por área de interés.

Herramientas de análisis

Los análisis descritos a continuación fueron realizados, una vez capturada la actividad electrofisiológica con los programas de

captura y análisis del fabricante (3Brain), por programas diseñados y escritos en nuestro laboratorio con Matlab 2018b y con en el lenguaje de programación Julia-Lang 1.0.1.

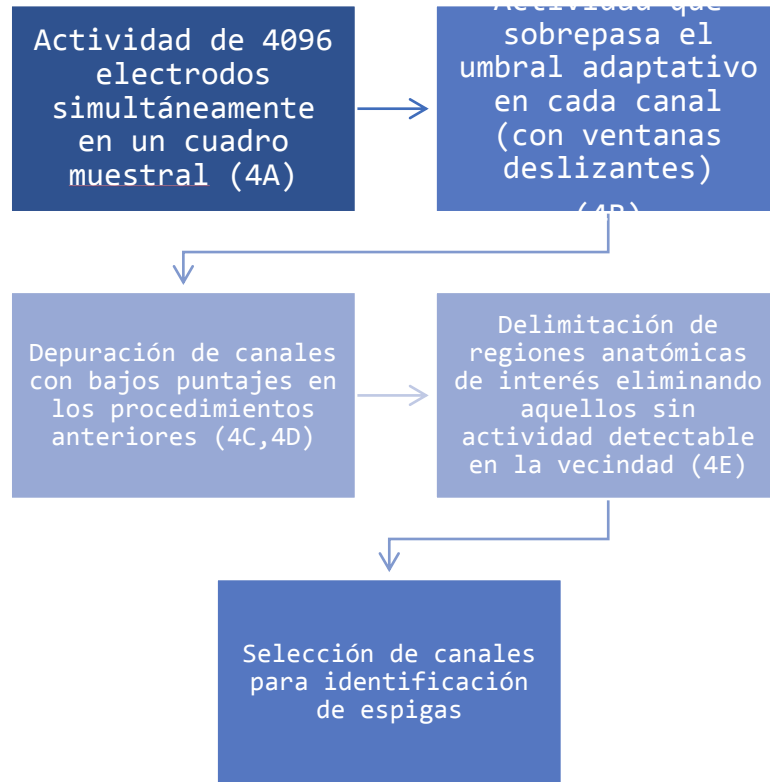


Figura 3. Esquema que resume los pasos realizados para detectar los canales de interés en la matriz de 4096 electrodos

1. Detección de electrodos funcionales y eliminación de electrodos no funcionales

Los 4096 electrodos de registro de la matriz pueden presentar las siguientes condiciones durante el experimento, que requieren especial atención para llegar a tener la “limpieza” de señales que debe preceder al análisis:

a) saturación o actividad eléctrica aberrante causada por daño al chip de registro o cambios bruscos en la actividad global

generados por burbujas o cambios en la velocidad de flujo del líquido cefalorraquídeo artificial.

b) registro de actividad fisiológica localizada en áreas correspondientes a tejido nervioso. Este puede presentar eventos de saturación pasajeros.

c) registro de actividad eléctrica basal localizada en áreas que no cubren el tejido de la rebanada registrada o localizada en áreas donde no se generan cambios de voltaje de la amplitud necesaria para ser registrados por el electrodo más cercano.

Para poder discriminar los electrodos que presentan la condición b) y eliminar los eventos de saturación pasajeros, se aplicaron los siguientes criterios:

1.1 Medición de la actividad generalizada por cada cuadro muestral (4096 canales, 1 cuadro muestral) durante la duración total del registro.

$$U = 4\sigma$$

Ecuación 1. Umbral estático

$$\sigma = \text{median}\left\{\frac{|x|}{0.6745}\right\}$$

Ecuación 2. Media del ruido con distribución gaussiana

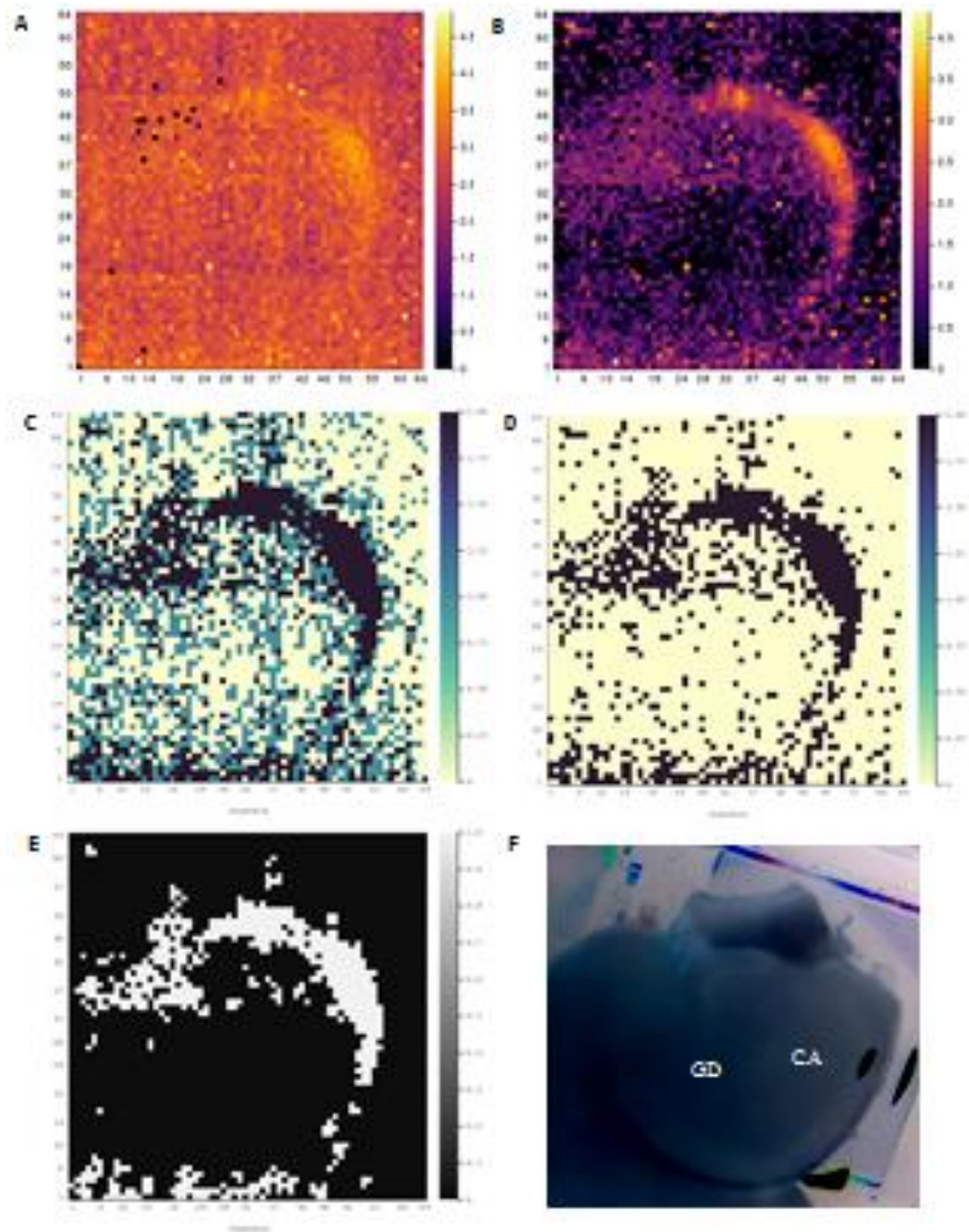


Figura 4 A. actividad generalizada por cada cuadro muestral, B. Eventos supra umbral por canal, C. Sobre posición de canales detectados por A y B, D. Únicamente eventos detectados en A y B, E. Aplicación de criterio de delimitación de regiones anatómicas de interés, F. Fotografía de la rebanada de la cual se obtuvo el análisis previo a su registro.

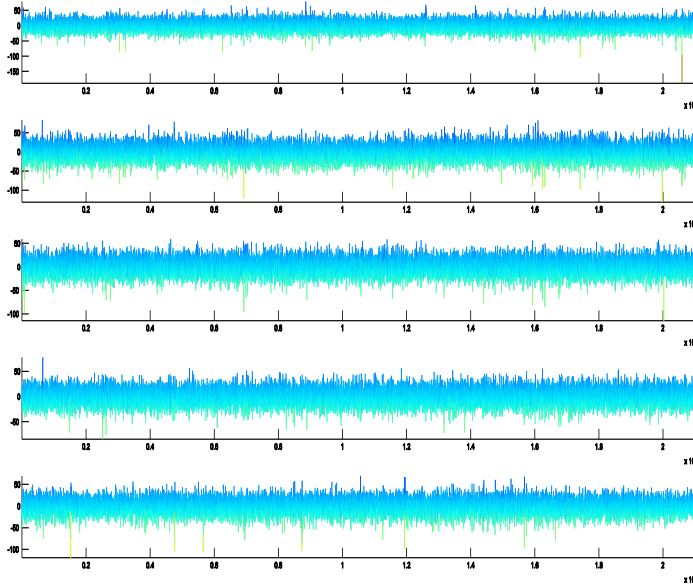


Figura 5. Actividad de canales detectados en el área CA3 que contienen variaciones de voltaje que sobrepasan el umbral(x = 3 minutos, y = microvolts)

que sobresalían del ruido basal generalizado, que consideramos como posible actividad unitaria. Figura 4A

1.2 Detección de eventos que sobrepasan un umbral de voltaje adaptativo en cada electrodo.

Se aplicó un filtro Hubber (X. Wang et al. 2011) a cada canal. El algoritmo mejorado de filtro Huber (filtro Kalman adaptativo) modela el error y el ruido de señales no caracterizadas. El algoritmo adaptativo es obtenido analizando matrices de covarianza con un test de hipótesis estadística chi-square. La medición del ruido es estimada en cada paso del filtrado. Es aplicable en señales que presentan ruido gaussiano y no-gaussiano aleatorio. (Frecuencias de corte = 400 a 3500 Hz, correspondientes a la banda de actividad multiunitaria de registros extracelulares) Figura 6.

Se seleccionan como potenciales canales de interés aquellos que presentaron actividad de mayor voltaje con respecto a un umbral estático (Ecuación 1 y 2, Quiran Quiroga, et, al. 2004) con media correspondiente al ruido basal. Los momentos de actividad que superan este umbral corresponden a variaciones de voltaje

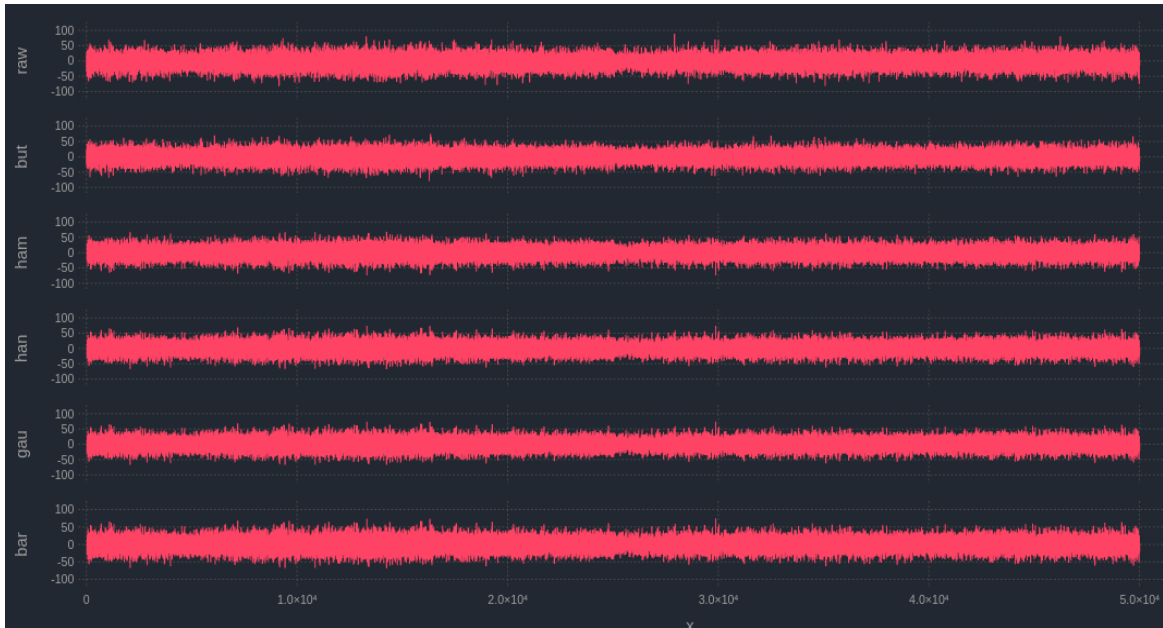


Figura 6. Aplicación de diferentes filtros para la extracción de las espigas. Se muestran en orden descendente: trazo crudo de un canal ejemplo, filtro butterworth orden 6, filtro ham orden 63, filtro han orden 64, filtro gaussiano y filtro bartlet-han diseñados en julia-lang ($x = 3$ minutos, $y =$ microvolts)

Tomando una ventana de 5 mseg se determinó el umbral de voltaje basado en la desviación estándar de la actividad de esa ventana. Se buscó que el máximo global de la ventana superara el umbral y además que no se presentara otro máximo local supra umbral. Estos casos se consideran eventos cuantificables y generan una segunda distribución de actividad por canal. La ventana se recorre entonces 1 mseg y continúa la detección hasta que se abarca el tiempo total de registro. Figura 4B

1.3 Vectores de peso de actividad

Se genera un vector general de peso de actividad para cada electrodo considerando los dos criterios anteriores y se seleccionan aquellos canales que presentan elevados puntajes en

ambos casos. Esto genera un mapa de actividad que refleja la dinámica del voltaje tanto en electrodos constitutivamente activos, que podría ser el caso de electrodos que registren células piramidales o interneuronas, así como electrodos que presentaron actividad supra umbral en pocas ocasiones, como podría ser el caso de células granulares presentes en el giro dentado.

Figura 4C

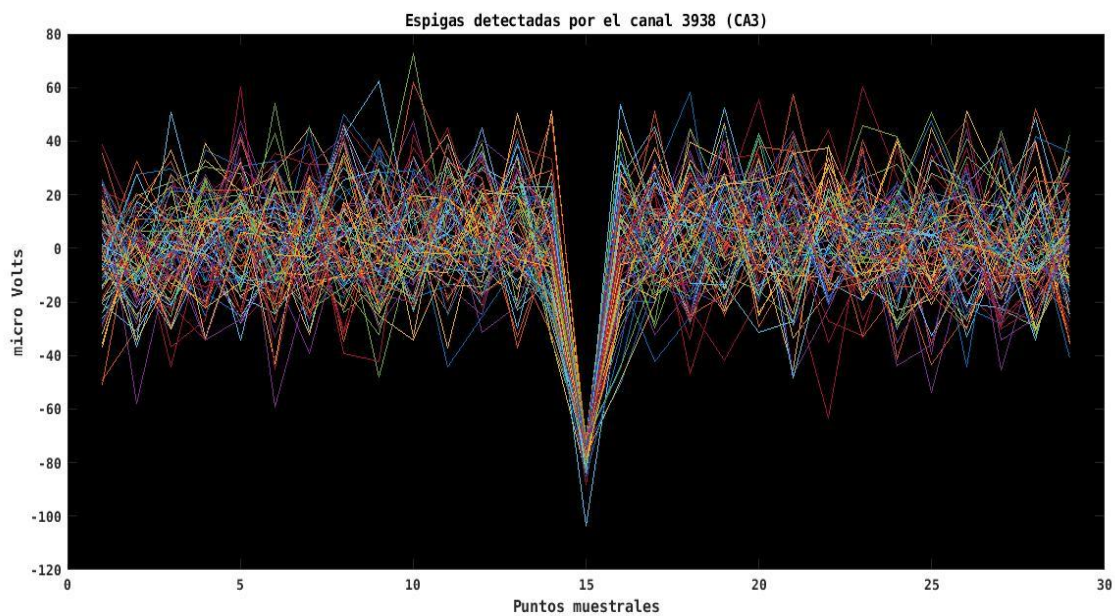


Figura 7. Extracción de espigas detectadas en cada canal posterior al filtrado. (x = segundos, y = microvolts)

1.4 Delimitación de regiones anatómicas de interés

Cuando sucede una variación de voltaje supra umbral cercana a un electrodo de registro, la distribución de los electrodos y la distancia entre ellos (21 micras) permiten el registro del evento en los electrodos de la 8 vecindad. Los criterios de selección previamente descritos son capaces de detectar la actividad

simultanea de un conjunto de electrodos vecinos, por lo que el mayor peso de activación se adjudica al electrodo central (más cercano a la variación de voltaje y disminuye con la distancia hasta desaparecer en un radio de 42 micrómetros. Esto se debe al decaimiento del voltaje respecto a la distancia que corresponde a $\sim 1/r^2$ donde r es la distancia.

Aquellos electrodos que no presentaron elevados criterios en los pasos anteriores en su 8 vecindad pueden presentar las siguientes condiciones:

- registrar variaciones de voltaje correspondientes a potenciales de acción de una o varias células a una distancia lejana del electrodo de registro.
- registrar variaciones de voltaje correspondientes a potenciales de acción de una célula homogéneamente distribuida en la anatomía del tejido registrado

Ninguno de estas condiciones son de interés para el análisis posterior, por lo que para poder delimitar las regiones anatómicas de interés, se estableció como requisito mínimo de 2 miembros de la 8 vecindad de un canal activo sean capaces de medir las variaciones de voltaje supra umbral. Figura 4E

2. Determinación de características para describir la actividad multiunitaria

Una vez detectados los eventos supra umbral en los canales de interés (figura 7), se generó un conjunto de coeficientes de cada evento detectado en el paso anterior. Estos coeficientes corresponden a variables como la amplitud del voltaje registrado, la amplitud del evento en el tiempo, la presencia de colas de

repolarización posteriores al pozo de amplitud, etc. Estos coeficientes fueron obtenidos de la aplicación de descomposición de función de onda en paquetes (Wavelet Packet Decomposition WPD)

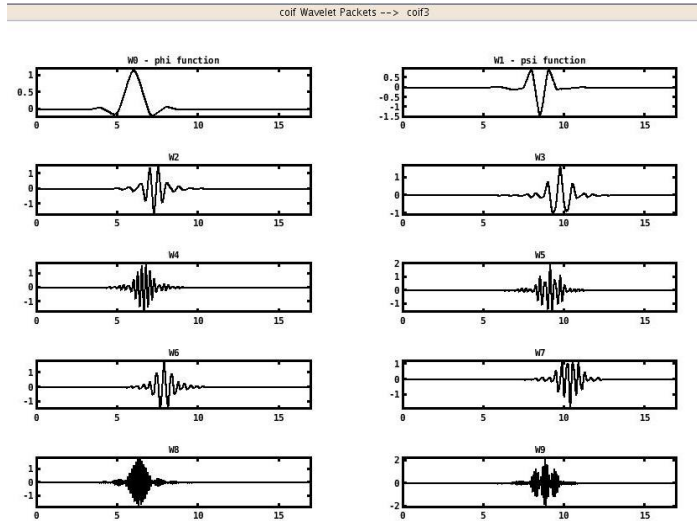


Figura 8. Miembros de las familias de funciones de onda Coiflets.

de nivel 9, con la familia de funciones de onda Coiflet de tercer orden. (Hulata, et al., 2002)

En comparación los métodos comúnmente usados, donde se aplica la descomposición de funciones de onda en paquetes con la familia Haar, los miembros de la familia Coiflet son casi simétricos y presentan poco solapamiento con sus vecinos tanto en frecuencia como en tiempo, por lo que se propone que pueden ser una mejor aproximación en la caracterización de morfologías de onda tipo potenciales de acción extracelulares (Figura 8).

La determinación de qué paquetes que preservaron las características de la señal usando el menor número de coeficientes posibles fue detectado aplicando un algoritmo discriminante que

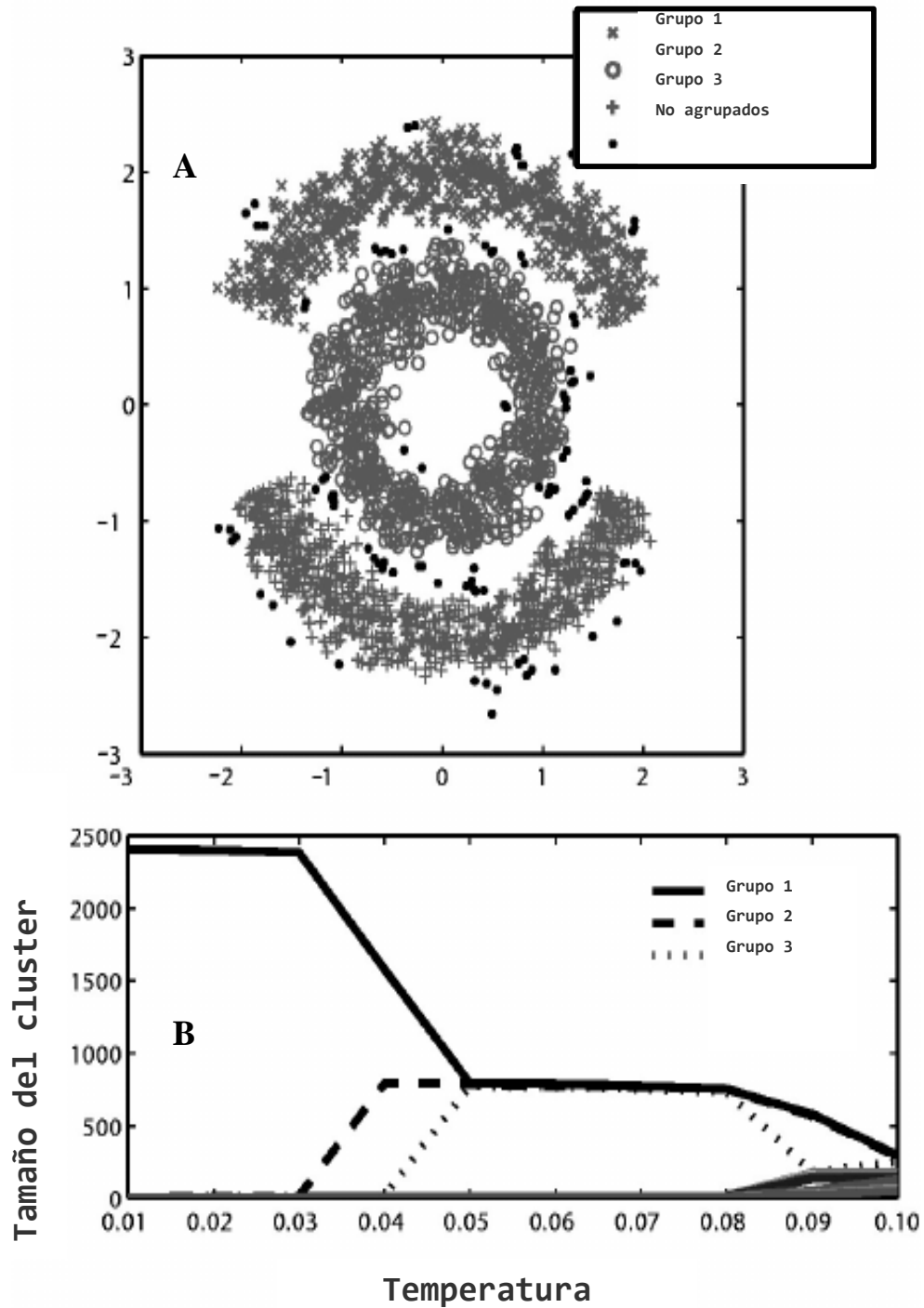


Figura 9. Ejemplo del funcionamiento del algoritmo SPC. En A se muestra un conjunto de datos simulados en grupos distinguibles pero difíciles de separar por algoritmos basados en la covarianza de los datos. En B se muestra como dentro de la simulación de variación de temperatura, se alcanza el punto superparamagnetico en 0.05 (adimensional) y los 3 grupos claramente se separan.

selecciona aquellos paquetes que contengan la mayor información correspondiente a la descripción de la función de onda (Coifman et al., 1992; Coifman and Wickerhauser, 1992; Saito, 1994; Mallat, 1998).

3. Clasificación de las espigas detectadas

Una vez detectados los parámetros óptimos que describen mejor a cada potencial de acción, se aplicó una versión modificada del programa `Wave_clus v.2.0`. (Quiroga y cols., 2004). Los coeficientes previamente seleccionados se utilizan como la información de entrada para alimentar el *algoritmo de agrupamiento superparamagnético* (SPC por sus siglas en inglés), que consiste en generar una partícula m dimensional, donde m equivale al número de coeficientes detectados previamente. Cada partícula representa una espiga, y se simulan sus interacciones con el K -ésimo vecino más cercano.

Esté método es una aplicación de la iteración de Monte Carlo a un modelo de Potts, que es una generalización de un modelo de Ising. Se obtienen la criticalidad del evento donde cada iteración corresponde a la modificación una variable que determina un estado diferente para la partícula de interés, y a sí mismo considera la probabilidad de que al alterar el estado de la partícula, se alteren los estados de las partículas vecinas.

La simulación se repite hasta que los estados de la partícula y sus vecinos no se modifiquen, por lo que se alcanza la fase ferromagnética. El estado opuesto es cuando los estados de las partículas se alteran de forma completamente azarosa, conocido como fase paramagnética. El estado ideal que se obtiene con la

simulación es una fase intermedia conocida como super paramagnética, donde sólo aquellas partículas que estén relacionadas entre sí alteran sus estados de manera relacionada, y se mantienen de esa forma, por lo que representan un grupo. En el caso de los eventos detectados, corresponden a aquellos que son morfológicamente similares y se asume que son generados por la misma unidad funcional o célula. **(Figura 9)**

4. Eliminación de la redundancia

Se considera que la distancia entre electrodo y electrodo en el arreglo espacial de la matriz, así como el tamaño del electrodo mismo, es muy similar al diámetro promedio del soma de una célula piramidal (~20 uM), por lo que es posible que un evento lo suficientemente amplio en voltaje generado en el soma de una célula sea registrado por más de un electrodo simultáneamente. **(Figura 10)**

Tabla 1. Características electrofisiológicas de las células granulares y piramidales del hipocampo

	Periodo refractario mínimo (ms)	Frecuencia máxima de disparo (Hz)	Amplitud del potencial de acción (mV)	Amplitud del potencial de acción (ms)	Referencias
Célula granular de Giro Dentado	2.0	72.0	69.4	0.87	[1, 2, 3, 4]
Célula piramidal de CA3	2.5	40.0	97.6	1.00	[5,6]

Para eliminar aquellas espigas detectadas con la misma morfología pero variación en la amplitud, se detectaron en la 8-vecindad de cada electrodo aquellos disparos que sucedieron en el mismo cuadro muestral.

Con estos datos se construyó un registro artificial que consiste en una mezcla de las espigas detectadas como posible redundancia, y se aplicó de nuevo el algoritmo de clasificación (SPC). De ser encontradas como miembros de la misma unidad, la espiga se asignó al canal que registró la mayor amplitud. Una vez reclasificadas las espigas, se consideraron los grupos finales como células independientes.

Una vez detectadas las unidades por región anatómica, se depuraron considerando las características correspondientes a los tipos celulares de interés.

Tabla 1.

5. Simulación de registro compuesto

Se tomaron canales previamente clasificados como poseedores de una sola unidad por el algoritmo SPC. Los eventos detectados en estos canales fueron mezclados para generar un canal artificial del doble de largo con un número grande de eventos provenientes de “dos” unidades. A este canal se le aplicó el algoritmo de clasificación (SPC) para determinar su capacidad de distinguir entre dos unidades previamente identificadas. Figura 11

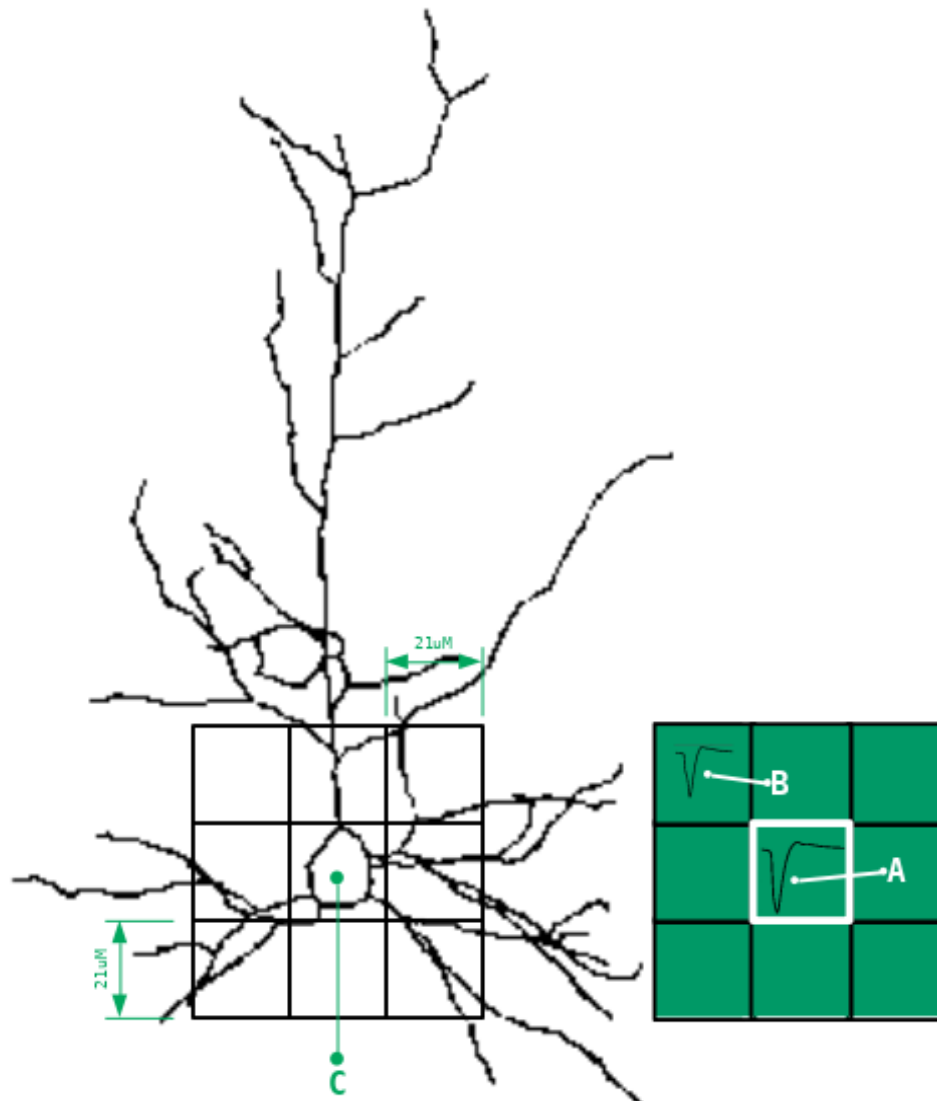


Figura 10. Comparación de los microelectrodos de registro con dimensiones aproximadas de una célula piramidal de CA3. En A se muestra el electrodo de referencia, quien registra la actividad extracelular de mayor amplitud en voltaje al encontrarse más cercano al soma de la célula piramidal mostrada en el esquema. En B se muestra un potencial extracelular que corresponde a la misma célula piramidal registrada por el electrodo de referencia, pero que es detectada en menor amplitud en voltaje. En C se muestra el tamaño aproximado de una célula piramidal de CA3 respecto a los electrodos presentes en el chip de registro. Hasta la 8-vecindad referente al electrodo central es apreciable un potencial de acción extracelular, por lo que existe redundancia en el registro.

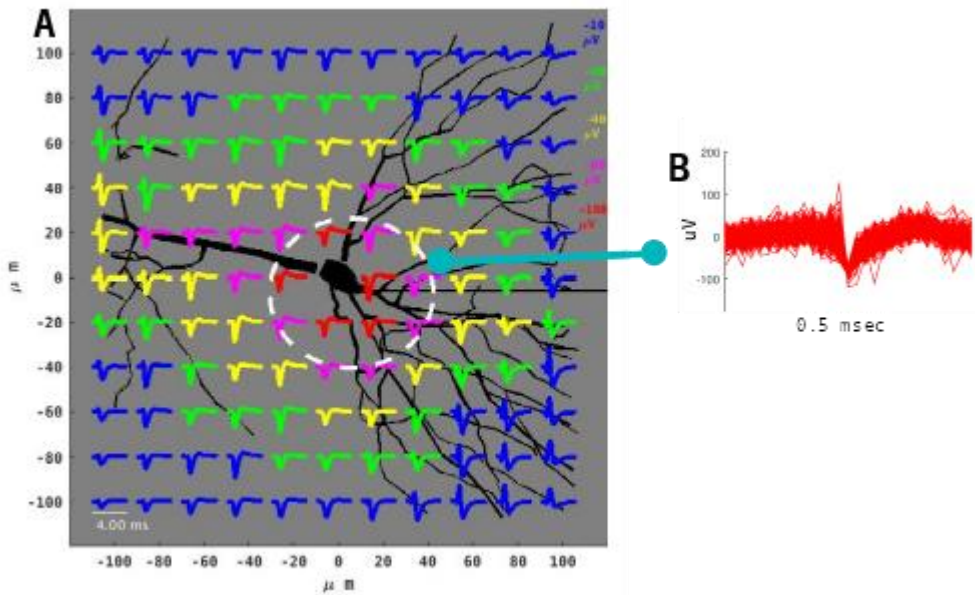


Figura 11. En A se muestra la morfología de espigas que se utilizaron para posterior análisis, dentro del círculo blanco. Los trazos extracelulares mostrados provienen de la simulación de una célula piramidal de CA3 siguiendo de acuerdo con el algoritmo publicado por Buzsáki y cols., 2004. En B se muestra un ejemplo de espigas detectadas que cumplen con las condiciones antes descritas.

6. Simulaciones de Monte Carlo

Una vez determinada la actividad de cada célula en las regiones anatómicas de interés, se buscó determinar si la actividad en Giro Dentado influenciaba la actividad de CA3, por lo que se usaron simulaciones de Montecarlo. En términos generales, las simulaciones de Montecarlo son un algoritmo computacional usado para generar distribuciones de probabilidad mediante el uso de valores aleatorios (Krauth, 2006).

Los tiempos del valor máximo de cada espiga fueron usados para hacer las simulaciones de Montecarlo.

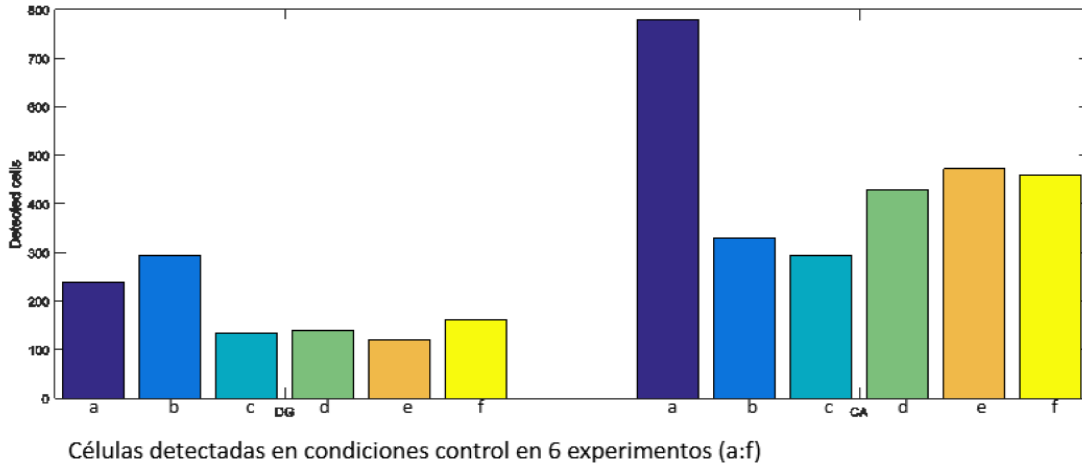
Se utilizó el generador de números aleatorios Marsenne Twister programado en C para revolver los intervalos inter espiga entre pares de trenes de espigas del giro dentado y CA3 que coincidían en una ventana de 3 ms y generar la distribución de probabilidad de esos intervalos. La posición que ocupa el número real de espigas que coinciden en la ventana antes mencionada indica el grado de significancia dentro de la distribución y por lo tanto, una posible influencia de las espigas de un área sobre la otra. Se determinó una significancia de $p < 0.05$.

Número de células registradas, aplicación del SPC

Número de células registradas por región por experimento

Se muestra en la figura el conteo de células obtenidas en casa experimento analizado. Se puede observar que en el área CA3 el número de células detectadas en promedio es 433 (+- 169 DE) entre las y en Giro Dentado 191 (+- 69 DE). Figura 12

Figura 12. Conteo de células detectadas en Giro Dentado y en CA3 en diferentes experimentos



Controles

Los resultados de la simulación se muestran en la tabla 2.

El algoritmo de clasificación probó ser consistente en el 87.3 % de los experimentos. Este valor refleja el nivel de confianza que se puede obtener al aplicar esta metodología en su estado actual, y si bien es mejorable, demostró ser eficiente. Tabla 2

Tabla 2. Simulación de canales artificiales y aplicación del método de clasificación SPC

Células simuladas	Iteraciones realizadas	Células detectadas	Aciertos (%)
5	100	4.3 ± 0.5	78.2
4	100	3.9 ± 0.8	81.4
3	100	3.2 ± 0.08	82.8
2	100	2.5 ± 0.3	91.2
1	100	1 ± 0.45	94.5

Patrones espacio-temporales entre las regiones Giro Dentado y CA3.

Se muestra la actividad de las regiones previamente descritas, cuantificadas en el tiempo. Figura 13 es un ejemplo de los registros analizados en las diferentes condiciones experimentales. Con base en estos registros, hemos podido observar actividad y supresión de actividad correlacionada entre las diferentes secciones de CA3 y GD. Cabe hacer mención que para completar la caracterización de la “anatomía de las conexiones funcionales” requeriremos de más registros tomados de rebanadas hechas con diferentes ejes de corte de la estructura hipocampal.

Se muestra la actividad correlacionada entre giro dentado y CA3. En una ventana temporal de 3ms, se puede observar la comunicación entre células presentes en giro dentado y células presentes en CA3. Sin embargo, la separación entre áreas supra e infra piramidal de GD así como área proximal y distal de CA3 es arbitraria. Figura 14

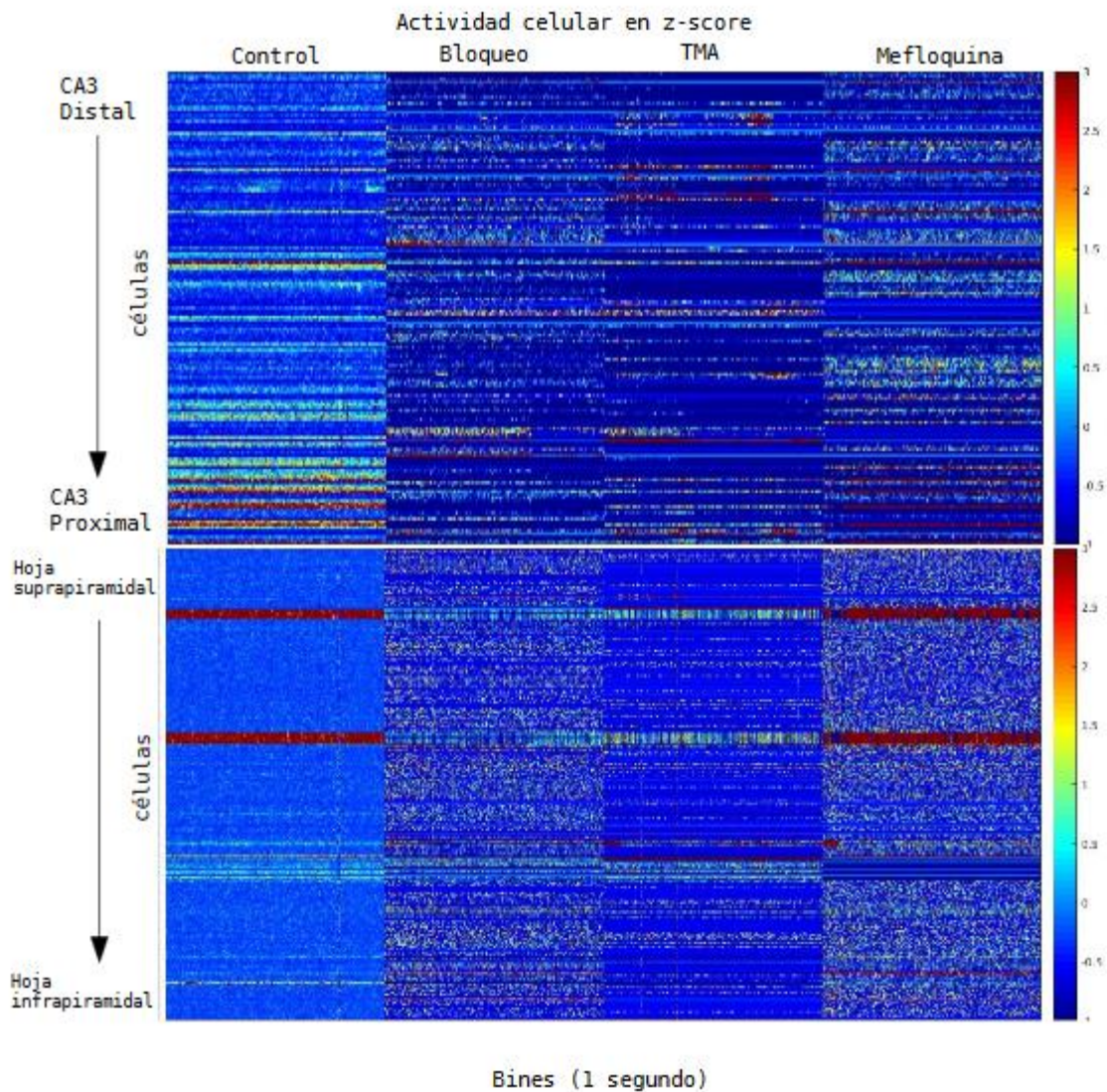


Figura 13. Actividad de cada región (panel superior CA3, panel inferior GD). Se obtuvo la actividad en relación a la unidad tipificada (z-score) de cada condición farmacológica.

Discusión

El número total de células registradas fue por mucho superior al que cualquier otro método de registro actual, lo que nos permite

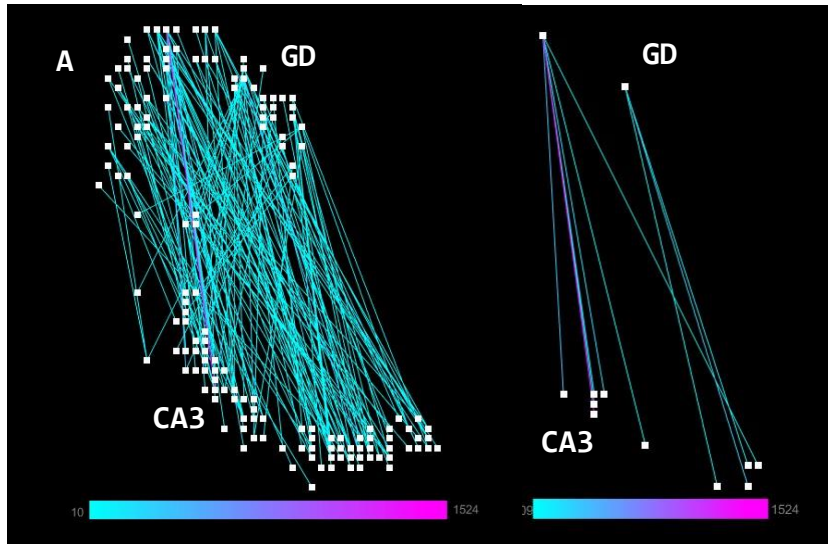


Figura 14. A. Análisis de Montecarlo de la actividad de Giro Dentado respecto a CA3. Se muestran todas las coincidencias no aleatorias de la actividad de CA3 respecto a la actividad de GD en una ventana temporal de 3 ms

B. Distribución de la actividad iniciadora en Giro Dentado, solo se conservan las conexiones no aleatorias que presentaron mayor incidencia.

estudiar la conducta de grandes poblaciones neuronales de zonas identificadas del hipocampo.

El uso de la matriz de microelectrodos para registrar rebanadas de hipocampo ha demostrado ser una herramienta única, de la cual se puede extraer información que compete directamente al estado funcional de una red neuronal. Esta ventaja no es compartida con otras técnicas de registro, que si bien sirven para caracterizar las propiedades celulares, como las que permiten la clasificación

por tipo celular y su posible estado funcional, no es sino hasta que se mapean estructuras simultáneamente que es posible ver la interacción entre estas.

La frecuencia de muestreo de la matriz oscila entre los 7 kilohertz hasta los 18 kilohertz. Esta resolución nos permite obtener, para posteriores análisis, tanto potenciales de acción, como potenciales de campo locales. Sin embargo, cada aumento en la resolución temporal corresponde a un aumento en el tiempo de procesamiento. Este problema fue abordado desarrollando herramientas computacionales rápidas o “paralelizables”, que nos permitieron trabajar con la frecuencia más elevada.

Debido a que el ruido de la matriz de registro podían enmascarar parte de la señal de interés, fue necesario desarrollar protocolos para analizar las componentes que este aporta y sus variaciones en diferentes condiciones, como por ejemplo variación del pH extracelular, variación de la temperatura, variación de la cantidad de presión ejercida sobre los electrodos, o de la velocidad de flujo. Esto permitió obtener características que permiten discriminar entre el componente gaussiano o semi gaussiano de ruido externo de la composición por única de las espigas extracelulares.

Los métodos de filtrado probaron ser un paso crucial en análisis de los trazos obtenidos con la matriz de microelectrodos, debido a que la relación señal-ruido en algunos casos es muy baja. Esto involucró el diseño de filtros robustos y especializados cuya componente de ripple fuera muy baja y cuya componente de delay fuera muy estricta para poder obtener señales analizables de canales particularmente ruidosos.

Al tratarse de registros de cambios de voltaje extracelulares, podemos clasificar la morfología de las espigas por sus componentes en varias dimensiones (temporales y en amplitud), lo que es la base del análisis que nos ha permitido la clasificación en grupos o SPC. Es importante direccionar los algoritmos hacia el tipo o tipos celulares de interés, tomando en cuenta factores como la frecuencia máxima registrada, el periodo refractario mínimo y la presencia o no de acomodamiento en un tren de disparos (piramidales de CA3). Estos criterios permiten refinar el análisis y obtener candidatos que representen con una alta probabilidad los tipos celulares de interés. Si bien el método probó ser consistente con las simulaciones realizadas, no es comparable a cuando se dispone de información adicional para evaluarlo, por ejemplo, conocer de antemano el número total de células

involucradas. Esta limitación corresponde a la aplicación del método a datos experimentales no simulados.

Las variaciones en la morfología del disparo de una célula pueden corresponder a diferentes estados de actividad de esta misma, por lo que es importante tomar en cuenta un rango en el cual las micro variaciones sean consideradas como originadas por la misma unidad y no por más de una célula. Consideramos que las variaciones en el estado de actividad de las células individuales dentro de la misma condición experimental no deben arrojar una variación significativa a gran escala y considerando un registro de larga duración (5-10 min).

Respecto a los registros en condición control se puede apreciar una elevada actividad de extracelular desde el principio del registro hasta que se realizan las modificaciones farmacológicas en la región CA3 próxima a distal. Una manera eficiente de discernir el final de CA3 distal fue observar que el patrón de disparo en la región que correspondería CA2 es casi nulo o muy bajo en comparación con la región vecina, por lo tanto este criterio fue utilizado como método de discernimiento de límites de la región.

Los análisis aquí desarrollados y descritos pueden ser aplicables a diferentes equipos de registro. Esto corresponde a la necesidad actual de desarrollar métodos de análisis enfocados a discriminar acertadamente tipos celulares y actividad de estos en registros masivos. De esta forma se abren nuevas posibilidades en el tipo de información y experimentos a realizar para discernir el comportamiento de un circuito neuronal completo y las interacciones entre sus elementos.

El algoritmo de detección de canales activos probó ser una aproximación muy cercana a la distribución fisiológica del tejido. Sin embargo algunos algoritmos de optimización podrían ayudar a que no sea necesaria la comparación con una fotografía en ningún momento lo cual permitirá que este tipo de estudio se realice en tejidos cuya distribución no se conoce como en cultivos celulares o en tejidos cuya distribución es homogénea aparentemente como en el estriado y la retina.

El método de clasificación de espigas aquí descrito está basado en una técnica de mecánica estadística para separar grupos por sus características representativas en algunos casos asimilar hacer un análisis por componentes principales sin embargo este provee la

ventaja de no basarse en la covarianza de los datos sino más bien en la variaciones puntuales de cada parámetro respecto a sus vecinos en múltiples dimensiones aborda el problema con un grado más de complejidad. Sin embargo resultó ser muy eficiente a la hora de trabajar con canales extraídos de una matriz de microelectrodos.

La modificación realizada en la selección de qué familia de funciones de onda se usaría para alimentar el algoritmo de clasificación fue realizada fue debido a la similitud entre la morfología de las ondas de la familia Coiflet En comparación con la morfología de las ondas de la familia Haar que es la cual se ha usado muy comúnmente en los análisis de registros electrofisiológicos y que es la que se escoge para aplicar el algoritmo de detección SPC. La selección de parámetros para alimentar el algoritmo de clasificación apoya la hipótesis de que esta familia de onda es más adecuada para el trabajo que anteriormente mencionada

Perspectivas

Este modelo podría permitirnos analizar el procesamiento de información que se lleva a cabo dentro de CA3, la separación e

identificar patrones como una hetero matriz de procesamiento, ya que podemos observar la propagación de la información dentro de los diferentes elementos de la estructura.

A su vez, el análisis de los patrones de disparo de las células granulares nos permitirá determinar si las células piramidales una vez identificados los blancos funcionan como detonadores o se requiere algún tipo de patrón en el disparo de las granulares para hacer funcionar o echar andar redes en dentro de CA3.

Referencias

- Acsády, L., Kamondi, A., Sík, A., Freund, T., & Buzsáki, G. (1998). GABAergic cells are the major postsynaptic targets of mossy fibers in the rat hippocampus. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 18(9), 3386-3403
- Amaral, D. G., Ishizuka, N., & Claiborne, B. (1990). Neurons, numbers and the hippocampal network. *Progress in Brain Research*, 83, 1-11.
- Amaral DG., Witter MP. (1989). The three dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data . *Neuroscience* , 31:571-591.
- Amaral D, Lavenex P (2007) Hippocampal neuroanatomy. In: Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J, editors. *The Hippocampus Book*. Oxford University Press. pp. 37-114.
- Andersen, P. (Ed.). (2007). *The hippocampus book*. Oxford ; New York: Oxford University Press.
- Andersen P, Loynig Y. 1962. Interaction of various afferents on CA1 neurons and dentate granule cells. *Colloq Int CNRS* 107:23- 45.
- Babb, T. (1999). Synaptic reorganizations in human and rat hippocampal epilepsy. *Adv Neurol*, 79:763-79.
- Bennett, M. R., Gibson, W. G., & Robinson, J. (1994). Dynamics of the CA3 pyramidal neuron autoassociative memory network in the hippocampus. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 343(1304), 167-187. <https://doi.org/10.1098/rstb.1994.0019>

- Berdondini, Luca & Imfeld, Kilian & Maccione, Alessandro & Tedesco, Mariateresa & Neukom, Simon & Koudelka-Hep, Milena & Martinoia, Sergio. (2009). Active pixel sensor array for high spatio-temporal resolution electrophysiological recordings from single cell to large scale neuronal networks. *Lab on a chip*. 9. 2644-51. 10.1039/b907394a.
- Blaker, S. N., Armstrong, D. M., & Gage, F. H. (1988). Cholinergic neurons within the rat hippocampus: response to fimbria-fornix transection. *The Journal of Comparative Neurology*, 272(1), 127-138. <https://doi.org/10.1002/cne.902720109>
- Brown TH., Z. A. (1990). Hippocampus. In *The Synaptic Organization of the Brain*. Oxford University Press.
- Cameron, H. A. and McKay, R. D. (2001), Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.*, 435: 406-417.
doi:10.1002/cne.1040
- Claiborne, B. J., Amaral, D. G., & Cowan, W. M. (1986). A light and electron microscopic analysis of the mossy fibers of the rat dentate gyrus. *The Journal of Comparative Neurology*, 246(4), 435-458. <https://doi.org/10.1002/cne.902460403>
- Coifman R, Wickerhauser M. (1992). Entropy-based algorithms for best basis selection. *IEEE Trans Inform Theory* 1992;38(2):713
- Coifman R, Meyer Y, Wickerhauser M. (1992). Wavelet analysis and signal processing. In: *Wavelets and Their Applications*. Boston,.
- Foster, D. J., & Wilson, M. A. (2006a). Reverse replay of behavioural sequences in hippocampal place cells during the awake state. *Nature*, 440(7084), 680-683.
<https://doi.org/10.1038/nature04587>
- Formato R , (2012) Dynamic Threshold Optimization - A New Approach?, vol: 0414 (June) pp: 1-17
- Freund, T. F., & Buzsáki, G. (1996). Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*, 6(4), 347-470. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1063\(1996\)6:4<347::AID-IP01>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1063(1996)6:4<347::AID-IP01>3.0.CO;2-I)
- Frotscher, M., Vida, I., & Bender, R. (2000). Evidence for the existence of non-GABAergic, cholinergic interneurons in the rodent hippocampus. *Neuroscience*, 96(1), 27-31.
- Galimberti I, Bednarek E, Donato F, Caroni P. (2010). EphA4 signaling in juveniles establishes topographic specificity of structural plasticity in the hippocampus. *Neuron*, 65(5):627-42.
- Gutiérrez, R. (2016) The dual glutamatergic-GABAergic phenotype of hippocampal granule cells. *Trends Neurosci*. 2005 Jun;28(6):297-303. Review.
- Guzman SJ, Schlögl A, Frotscher M, Jonas P (2016) Synaptic mechanisms of pattern completion in the hippocampal CA3 network. *Science* 353:1117-1123
- Hebb, D.O. (1949). *The Organization of Behavior*. New York: Wiley & Sons.
- Henze D, Urban N, Barrionuevo G., (2000), The multifarious hippocampal mossy fiber pathway: A review. *Neuroscience* Vol. 98 No 3, pp 407-427
- Hulata E Segev R Ben-Jacob E., (2002), A method for spike sorting and detection based on

- wavelet packets and Shannon's mutual information. *Journal of Neuroscience Methods* vol: 117 (1) pp: 1-12
- Ishizuka, N., Weber, J., & Amaral, D. G. (1990). Organization of intrahippocampal projections originating from CA3 pyramidal cells in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 295(4), 580-623. <https://doi.org/10.1002/cne.902950407>
- Ishizuka, W.M. Cowan, D.G. Amaral, A quantitative analysis of the dendritic organization of pyramidal cells in the rat hippocampus, *J Comp Neurol*, 362 (1995), pp. 17-45
- Jack CR Jr, Petersen RC, Xu Y, O'Brien PC, Smith GE, Ivnik RJ, Tangalos EG, Kokmen E. (1998). Rate of medial temporal lobe atrophy in typical aging and Alzheimer's disease. *Neurology*, 51(4):993-9.
- Koch C., B. O. (1995). Do neurons have a voltage or a current threshold for action potential initiation? . *J. Comput. Neurosci.*, 2;63-82.
- Lassalle, J. M., Bataille, T., & Halley, H. (2000). Reversible inactivation of the hippocampal mossy fiber synapses in mice impairs spatial learning, but neither consolidation nor memory retrieval, in the Morris navigation task. *Neurobiology of Learning and Memory*, 73(3), 243-257. <https://doi.org/10.1006/nlme.1999.3931>
- Lee, I., & Kesner, R. P. (2004). Encoding versus retrieval of spatial memory: double dissociation between the dentate gyrus and the perforant path inputs into CA3 in the dorsal hippocampus. *Hippocampus*, 14(1), 66-76. <https://doi.org/10.1002/hipo.10167>
- Li, X. G., Somogyi, P., Ylinen, A., & Buzsáki, G. (1994). The hippocampal CA3 network: an in vivo intracellular labeling study. *The Journal of Comparative Neurology*, 339(2), 181-208. <https://doi.org/10.1002/cne.903390204>
- Lorente de Nó, R. (1934). Studies of the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system. *J. Psychol. Neurol.*, 46;113-177.
- Maglóczy Z, Freund TF. (2005). Impaired and repaired inhibitory circuits in the epileptic human hippocampus. *Trends Neurosci.* , 28(6):334-40.
- Mainen, ZF, Joerges, J, Huguenard, JR, Sejnowski, TJ (1995) A model of spike initiation in neocortical pyramidal neurons. *Neuron*, 15:1427-1439.
- Mallat S. (1998). *A wavelet tour of signal processing*. Academic Press,
- McNaughton BL., Morris RGM. (1987). Hippocampal synaptic enhancement and information storage within a distributed memory system. *Trends in Neurosciences*.
- Ming y Song, 2011, Adult neurogenesis in the mammalian brain: Significant answers and significant questions, *Neuron* 70, May 26.
- Muthmann JO., Amin H., Sernagor E., Maccione A., Panas D., Berdondini L., Bhalla US., Hennig MH. (2015). Spike Detection for Large Neural Populations Using High Density Multielectrode Arrays. *Front Neuroinform*, 9;28.
- Myers, C. E., & Scharfman, H. E. (2011). Pattern separation in the dentate gyrus: a role for the CA3 backprojection. *Hippocampus*, 21(11), 1190-1215. <https://doi.org/10.1002/hipo.20828>
- Neunuebel J.P. and J.J. Knierim. CA3 (2014) Retrieves Coherent Representations from Degraded Input: Direct Evidence for CA3 Pattern Completion and Dentate Gyrus Pattern

- Separation. *Neuron*. Jan 22; 81(2):416-27
- O'Keefe, J. (1976). Place units in the hippocampus of the freely moving rat. *Experimental Neurology*, 78-109.
- Ortiz et al., 2018 en prensa
- Quiran Quiroga, Z. Nadasdy and Y. Ben-Shaul (2004) Unsupervised spike sorting with wavelets and superparamagnetic clustering. *Neural Computation*, 16: 1661-1687; 2004.
- Rolls, E. T. (1996). A theory of hippocampal function in memory. *Hippocampus*, 6(6), 601-620. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1063\(1996\)6:6<601::AID-HIPO5>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1063(1996)6:6<601::AID-HIPO5>3.0.CO;2-J)
- Romo-Parra, H., Vivar, C., Maqueda, J., Morales, M. A., & Gutiérrez, R. (2003). Activity-dependent induction of multitransmitter signaling onto pyramidal cells and interneurons of hippocampal area CA3. *Journal of Neurophysiology*, 89(6), 3155-3167. <https://doi.org/10.1152/jn.00985.2002>
- Scharfman, H. E. (1994a). EPSPs of dentate gyrus granule cells during epileptiform bursts of dentate hilar "mossy" cells and area CA3 pyramidal cells in disinhibited rat hippocampal slices. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 14(10), 6041-6057.
- Scharfman, H. E. (1994b). Evidence from simultaneous intracellular recordings in rat hippocampal slices that area CA3 pyramidal cells innervate dentate hilar mossy cells. *Journal of Neurophysiology*, 72(5), 2167-2180.
- Scharfman, H. E. (1996). Conditions required for polysynaptic excitation of dentate granule cells by area CA3 pyramidal cells in rat hippocampal slices. *Neuroscience*, 72(3), 655-668.
- Scharfman, Helen E. (2007). The CA3 "backprojection" to the dentate gyrus. *Progress in Brain Research*, 163, 627-637. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(07\)63034-9](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(07)63034-9)
- Somogyi, P., & Klausberger, T. (2005). Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus. *The Journal of Physiology*, 562(Pt 1), 9-26. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.078915>
- Scoville, W. B., & Milner, B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 20(1), 11-21.
- Soriano, E., & Frotscher, M. (1994). Mossy cells of the rat fascia dentata are glutamate-immunoreactive. *Hippocampus*, 4(1), 65-69. <https://doi.org/10.1002/hipo.450040108>
- Saito N. (1994). Local Feature and Its Application Using a Library of Bases. Ph.D. Thesis, Yale University, New Haven.
- Stevens, C.F. and Zador, A. (1998) "Input synchrony and the irregular firing of cortical neurons, " *Nature Neuroscience*, 3:210-217
- Squire, L.R. and Zola, S.M. (1996) Structure and Function of Declarative and Nondeclarative Memory Systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, 93, 13515-13522. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.24.13515>
- Sheline, Yvette & Mittler, Brigitte & Mintun, MA. (2002). The hippocampus and depression. *European psychiatry : the journal of the Association of European*

- Psychiatrists. 17 Suppl 3. 300-5. 10.1016/S0924-9338(02)00655-7.
- Scharfman HE, Myers CE. (2015). Corruption of the dentate gyrus by “dominant” granule cells: Implications for dentate gyrus function in health and disease. *Neurobiol. Learn Mem* .
- Treves A., Rolls ET. (1992). Computational constraints suggest the need for two distinct input systems to the hippocampal CA3 network. *Hippocampus*, 2;189-199.
- Ullo, S., Nieuws, T. R., Sona, D., Maccione, A., Berdondini, L., and Murino, V. (2014). Functional connectivity estimation over large networks at cellular resolution based on electrophysiological recordings and structural prior. *Front. Neuroanat*. 8:137. doi: 10.3389/fnana.2014.00137
- Carmen Vivar, Benjamin D. Peterson, Henriette van Praag, Running rewires the neuronal network of adult-born dentate granule cells, *NeuroImage*, Volume 131, 2016, Pages 29-41, ISSN 1053-8119, [https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2015.11.031.\(http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1053811915010538\)](https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2015.11.031.(http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1053811915010538))
- Witter, M. P. (2007). Intrinsic and extrinsic wiring of CA3: indications for connective heterogeneity. *Learning & Memory* (Cold Spring Harbor, N.Y.), 14(11), 705-713. <https://doi.org/10.1101/lm.725207>
- Wang X, Gong D, Xu L, Shao X, Duan D., (2011) Laser radar based relative navigation using improved adaptive Huber filter, *Acta Astronautica* vol: 68 (11-12) pp: 1872-1880
- Yassa M. A. and C. E. L. Stark, “Pattern separation in the hippocampus,” *Trends in Neurosciences*, vol. 34, no. 10, pp. 515-525, 2011.