



Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Ciencias Biológicas
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I
Tesis doctoral

Estudio de los circuitos neuronales
responsables de ritmopatías y déficit
cognitivo en modelos experimentales de
epilepsia del lóbulo temporal

Manuel Valero García
Dirigida por: Liset Menéndez de la Prida
Madrid, 2017



Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Ciencias Biológicas

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I

Programa de doctorado en Bioquímica, Biología Molecular y
Biomedicina

Tesis doctoral con «Mención Europea»

Estudio de los circuitos neuronales responsables de
ritmopatías y déficit cognitivo en modelos
experimentales de epilepsia del lóbulo temporal

Memoria de investigación presentada por Manuel Valero
García para optar al grado de Doctor

Dirigida por: Liset Menéndez de la Prida

Madrid, 2017

En portada, composición de la reconstrucción bidimensional de un rayo eléctrico.



MINISTERIO
DE ECONOMÍA Y
COMPETITIVIDAD
Instituto Cajal



CONSEJO SUPERIOR DE
INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS

Dña. Liset Menéndez de la Prida, Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas e Investigador del Instituto Cajal

CERTIFICA

Que el presente trabajo de investigación titulado: 'Estudio de los circuitos neuronales responsables de ritmopatías y déficit cognitivo en modelos experimentales de epilepsia del lóbulo temporal', ha sido realizado bajo mi tutela y supervisión por el doctorando Manuel Valero García, Licenciado en Ciencias Biológicas por la Universidad Complutense de Madrid y Máster en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina por la Universidad Complutense de Madrid.

Este trabajo reúne las condiciones de calidad y rigor científico para ser presentado y defendido como Tesis en opción al Grado de Científico de Doctor

Madrid, a 5 de marzo de 2017

Dr. L. Menéndez de la Prida
Instituto Cajal - CSIC
Ave. Doctor Arce, 37
Madrid 28002
ESPAÑA
Tel: 91 585 4359
Fax: 91 585 4754
lmprioda@cajal.csic.es
<http://www.hippo-circuitlab.es>

Avda Doctor Arce, 37
28002 Madrid ESPAÑA

Los resultados originales expuestos en la presente tesis doctoral han sido compilados en las siguientes publicaciones científicas:

- **Valero, M.**, Cid, E., Averkin, R.G., Aguilar, J., Sanchez-Aguilera, A., Viney, T.J., Gomez-Dominguez, D., Bellistri, E y Menendez de la Prida, L. (2015). *Determinants of different deep and superficial CA1 pyramidal cell dynamics during sharp-wave ripples*. **Nature Neuroscience** 18, 1281-1290 (Anexo A.1, pág 119). La exposición de este trabajo en el Congreso internacional *1st IN PhD Student & Postdoc Meeting* (Alicante, España) fue premiada como «Mejor conferencia».
- **Valero, M.**, Averkin R.G., Fernandez-Lamo, I., Aguilar, J., Lopez-Pigozzi, D., Brotons-Mas, J.R., Cid, E., Tamas, G. y Menendez de la Prida, L. (2017). *Mechanisms for selective single-cell reactivation during offline sharp-wave ripples and their distortion by fast ripples*. **Neuron** 94 (6), 1234-1247 (Anexo A.2, pág 135). La exposición de este trabajo en el Congreso internacional *ENCODS 2017* (Benidorm, España) fue premiada como «Mejor conferencia».

Adicionalmente, en el marco de esta tesis se obtuvieron resultados para otros proyectos que, hasta la fecha, han derivado en la participación del doctorando en las siguientes publicaciones:

- Aivar, P., **Valero, M.**, Bellistri, E. y Menendez de la Prida, L. (2014). *Extracellular calcium controls the expression of two different forms of ripple-like hippocampal oscillations*. **The Journal of Neuroscience** 34 (8), 2989–3004.
- Laurent, F., Brotons-Mas, J. R., Cid, E., Lopez-Pigozzi, D., **Valero, M.**, Gal, B. and de la Prida, L. M. (2015). *Proximodistal structure of theta coordination in the dorsal Hippocampus of Epileptic Rats*. **The Journal of Neuroscience** 35 (11), 4760-4775.
- Lopez-Pigozzi, D., Laurent, F., Brotons-Mas J.R., Valderrama, M., **Valero, M.**, Fernandez-Lamo, I., Cid, E., Gomez-Dominguez, D., Gal, B. y Menendez de la Prida, L. (2016). *Altered oscillatory dynamics of CA1 parvalbumin basket cells during theta-gamma rhythmopathies of temporal lobe epilepsy*. **eNeuro** 3 (6), 0284-16.2016.

Este trabajo se realizó con la ayuda económica del Ministerio de Economía y Competitividad (BFU2012-37156-C03-01 y BFU2015-66887-R). El doctorando fue dotado con una Ayuda Predoctoral para la formación de profesorado universitario (FPU) del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (FPU12/03776), y dos ayudas del mismo Ministerio para sendas estancias breves, la primera, de 12 semanas, en el laboratorio del Prof. Peter Somogyi (EST13/01046), y la segunda, de 10 semanas, en el laboratorio del Prof. György Buzsaki (EST14/00472).

«Estos hombres intentan averiguar
cómo funciona el mundo no mediante
la magia o la religión, sino metiendo su
cerebro en la primera grieta que
encuentran y usándolo como palanca
para separar los bordes...»

Terry Pratchett, *Pirómidas*

Agradecimientos

M^E incorporé al laboratorio de Liset el 25 de Junio de 2012, en una situación personal cuanto menos emocionante, y con las expectativas en la (neuro)ciencia, y en particular en la *electrofisiología* (gracias a Li et al., 2009), por la estratosfera. Y entonces, el motor no-lineal del laboratorio se puso en marcha, pulverizó mis expectativas, y giró todos los ángulos de mi vida. Gracias Liset por dejarme formar parte de un microcircuito en el que soy brutalmente feliz, por enseñarme más allá de lo soy capaz de entender, y por llevarme a un mundo en el que quiero quedarme. Es un honor sentirme miembro de tu escuela.

De sobra sé que *no* soy el compañero ideal, pero sí tengo el orgullo de estar rodeado de los mejores compañeros imaginables (y no imaginables). Elena es una PC_{prof} – combina caracteres tales como alta frecuencia de disparo basal, preferencia a estar inhibida durante los *ripples* y proyecciones límbicas –; es una lección humana: inagotable capacidad, impulso emocional e infinita humildad. Iván es PC_{sup} incontestable, no sólo es brillante en los *ripples* e inalcanzable a los retos (y, nótese, llegó posterior a las PC_{prof} en el neurodesarrollo, pág 15), es además la mejor conexión local concebible de nuestro circuito, el *amigo* que cualquier célula querría tener. Dani es mi hermano celular (de hecho, mi hermano mayor: aquel lunes, 25 de Junio, vi un registro por primera vez de su mano), y además tiene la fortuna de ser una PC de CA2, tremadamente interesante y polifacética. Beatriz es una célula granular de DG, de baja frecuencia de disparo pero con sinapsis enormes sobre el resto de células. Andrea ejemplifica los neuroblastos subgranulares: es inspirador cerrar este capítulo y percibir que el relevo te aventajará con creces¹.

Eferencias fundamentales han sido Jorge, François, Alberto, Laura, Elisa, Paloma, Diego y Giuditta. Gracias Jorge por habértelas ingeniado para ser un amigo, un maestro y un referente como investigador para mí, a pesar de que no hayamos coincidido entre las mismas paredes más de un par de semanas.

Pocos potenciales de acción habrían disparado mis células (con y sin comillas) de no ser por las *aferencias* de las que disfruta este microcircuito. No imagino mi identidad profesional sin las aportaciones de Juan; y *además*, me enseñó Electrofisiología. Gracias a Jose Manuel por arreglar y mejorar tanto este microcircuito. Muchas gracias Ismael, por Li et al., 2009, por la confianza que depositaste en mi como profesor, y por lanzarme a este

¹En caso de merecerlo, yo sería sin lugar a dudas una PC epiléptica.

laboratorio.

Gracias a los mentores y compañeros de mis estancias, especialmente a los prof. György Buzsáki y Peter Somogyi, y a Robert Averkin, Daniel English y Tim Viney.

Y como bien nos enseñan nuestros compañeros del instituto, poco puede hacer un microcircuito sin el soporte estructural, funcional y emocional de la glía. Muchas gracias a Sara, Silvia, Gaby, Paloma, Simo, Antonio, Gonzalo, Eva, Çağla, Estíbaliz, Guille, Sonia, Carolina, Irene, Raquel, Anna, etc.

Mi familia siempre ha tratado mis sueños como su cometido, su esfuerzo desmedido como si fuese mío, y mis errores como sus fallos. Gracias por dejarme usar vuestros límites y vuestro coraje para apostar por esto. Muchas gracias a Fernando y Ana, por regalarme una familia en Madrid. Isa es el punto de partida de mis esfuerzos y el contrapeso de mis miedos; gracias Isa por aceptar convertirte en el proyecto de tesis de mi vida.

Gracias a todos. Con tal grado de esfuerzo externo esta tesis no puede ser más que un filtro; y mi mérito ha sido ponerle los errores.

Índice general

Agradecimientos	V
Acrónimos	XVI
Resumen	XVII
<i>Summary</i>	XIX
1. Introducción	1
1.1. El atlas hipocampal	3
1.1.1. El circuito trisináptico extendido	4
1.1.2. La adición de la inhibición	13
1.1.3. Laminación en las PC hipocampales	15
1.2. Estados hipocampales	18
1.2.1. <i>Theta</i>	20
1.2.2. <i>LIA</i> y <i>SPW-r</i>	23
1.3. El hipocampo epiléptico	26
1.3.1. Oscilaciones de alta frecuencia en el hipocampo epiléptico	27
1.3.2. <i>Fast ripples</i> y deterioro cognitivo	29
Objetivos	31
2. Métodos	33
2.1. Sujetos experimentales	33
2.1.1. Modelo experimental de TLE	33
2.1.2. Tareas de reconocimiento de objetos	33
2.2. Procedimientos electrofisiológicos <i>in vivo</i>	35
2.2.1. Registros <i>in vivo</i> bajo anestesia	35
2.2.2. Farmacología <i>in vivo</i> bajo anestesia	36
2.2.3. Registro yuxta-celular en animales con libertad de movimiento	36
2.2.4. Registros extracelulares multi-canal en animales con libertad de movimiento	38
2.3. Histología e inmunohistoquímica	38
2.3.1. Anticuerpos	40

2.3.2. Adquisición y procesado de imágenes confocales	40
2.3.3. Revelado histológico con diaminobenzidina de las células registradas	41
2.3.4. Análisis morfológico de las células registradas	41
2.4. Análisis de datos	42
2.4.1. Análisis espectral de las señales extracelulares	42
2.4.2. Análisis de los registros intracelulares	44
2.4.3. Análisis de los registros yuxtagelulares	46
2.4.4. Análisis SOM	48
2.5. Procedimientos estadísticos	50
3. Resultados	53
3.1. Heterogeneidad hipocampal durante los SPW-r	53
3.2. Determinantes anatómicos de la heterogeneidad	57
3.3. Dinámica celular a lo largo del Asta de Ammon	58
3.4. Estado cerebral y codificación espacial	61
3.5. Papel cognitivo de los SPW-r y su distorsión en epilepsia	64
3.6. Los SPW-r epilépticos son patológicos	66
3.7. Perfil espectral de los SPW-r	67
3.8. Los SPW-r epilépticos tienen menos selectividad	70
3.9. Mecanismos sinápticos de la selectividad celular	70
3.10. Mecanismos de la pérdida de selectividad	73
3.11. La manipulación del V_{rev} en la selectividad	77
3.12. Rescate de la selectividad y el déficit cognitivo	77
4. Discusión	83
4.1. Los circuitos superficial y profundo de CA1	83
4.2. Reclutamiento de PC en ripples y <i>fast ripples</i>	87
Conclusiones	91
Conclusions	93
Bibliografía	95
A. Artículos de investigación	119
A.1. Determinants of different deep and superficial CA1 pyramidal cell dynamics during sharp-wave ripples	119
A.2. Mechanisms for single-cell reactivation	135

Índice de figuras

1.1. Ejes y coordenadas de la formación hipocampal	4
1.2. Proyecciones de salida desde EC	6
1.3. El circuito hipocampal como una red separadora y generalizadora de patrones	9
1.4. Conectoma de las células principales de la formación hipocampal	12
1.5. Poblaciones de células GABAérgicas de CA1	16
1.6. Secuencia de eventos de un ciclo <i>theta</i> en la formación hipocampal	22
2.1. Paradigmas comportamentales dependientes de hipocampo	34
2.2. Tinción yuxtagelular de las células registradas en animales con libertad de movimiento	38
2.3. Evaluación de la inmunoreactividad de CB en una célula registrada <i>in vivo</i>	42
2.4. <i>Fast ripple index</i> como parámetro para evaluar el contenido en altas frecuencias	43
2.5. Estabilidad a lo largo de los registros yuxtagelulares	46
2.6. Predicción de la posición en capa para células no-marcadas	47
2.7. Definición de los estados comportamentales/electrográficos en los registros yuxtagelulares con libertad de movimiento	48
2.8. Definición de clústers a partir de mapas SOM	50
3.1. Respuestas heterogéneas de las PC de CA1 durante los SPW-r	53
3.2. Las respuestas evocadas por la estimulación eléctrica en CA3 reproducen el comportamiento de las PC durante los SPW-r	54
3.3. Una combinación diferencial de excitación e inhibición segregan los modos de respuesta durante los SPW-r	54
3.4. Las PC _{desp} experimentan en mayor medida los sumideros de corriente en SR inducidos por los SPW-r	55
3.5. Componente <i>ripple</i> en PC _{desp} y PC _{hiper}	56
3.6. Identidad de las PC _{desp} y las PC _{hiper}	57
3.7. Respuesta a los SPW-r en el eje radial de SP	58
3.8. Innervación GABAérgica somática de las PC	59
3.9. PC de CA3 durante los SPW-r	60

3.10. PC de CA2 durante los SPW-r	60
3.11. Actividad supra-umbral de las PC hipocampales en los SPW-r	61
3.12. Modulación del reclutamiento de las PC en CA1 en el eje radial	61
3.13. Mecanismos de la dinámica de las PC hipocampales durante los SPW-r . .	62
3.14. Control comportamental de la participación durante los SPW-r	63
3.15. Modulación espacial de las PC de CA1	63
3.16. Efectos del eje radial en la actividad de las PC en condiciones de libertad de movimiento	64
3.17. Los animales epilépticos presentan alteraciones cognitivas	64
3.18. SPW-r en ratas normales y epilépticas	65
3.19. Las puntas epilépticas pueden ser separadas de los eventos de tipo SPW-r .	65
3.20. Diferencias espectrales entre SPW-r controles y epilépticos	66
3.21. Las alteraciones en los SPW-r subyacen al déficit cognitivo en los animales epilépticos	67
3.22. Registros yuxtagelulares en ratas controles y epilépticas	68
3.23. Aumento del reclutamiento celular en los SPW-r epilépticos	69
3.24. Los eventos más desorganizados exhiben más participación y menos infor- mación	69
3.25. Las PC ^{Epi} son menos selectivas que las PC ^{Con}	71
3.26. Registros simultáneos intracelulares y de LFP multi-canal e intracelulares en ratas controles y epilépticas anestesiadas	72
3.27. Diferencias en la respuesta de PC ^{Con} y PC ^{Epi} registradas intracelularmente	73
3.28. Las PC ^{Epi} pierden la ortogonalidad respecto a la excitación total del circuito	74
3.29. Caracterización de la respuesta de membrana en los clústers SOM	75
3.30. Matrices de correlaciones simples y parciales para los factores considerados en la participación por clústeres	76
3.31. Generalización de la relación entre los parámetros intracelulares y extrace- lulares	76
3.32. Control farmacológico de la respuesta celular durante los SPW-r	78
3.33. Recuperación farmacológica de los SPW-r epilépticos	79
3.34. Rescate farmacológico de las características espectrales de los SPW-r y el déficit mnésico en las ratas epilépticas	80

Índice de tablas

3.1. Propiedades intrínsecas de las células registradas.	72
3.2. Efecto de la carbamazepina en las propiedades intrínsecas de las células registradas.	80

Acrónimos

- CN** Carga neta. 45
- C** Capacitancia de membrana. 44, 73, 77
- G** Conductancia de membrana. 46, 74, 81
- I_{Total}** Corriente de membrana. 74, 81
- R** Resistencia de membrana. 44, 45, 73, 74, 77
- V_{rev}** Potencial de reversión. VIII, 45, 46, 50, 54, 56–60, 73–75, 81
- AAx** Célula axo-axónica, también llamadas célula candelabro. 14, 16, 22, 24
- AC** Corriente alterna, por *alternating current*. 35
- ACSF** Fluido cerebroespinal artificial, por *artificial cerebrospinal fluid*. 36
- AP** Antero-posterior. 35, 36, 38
- BS** Célula biestratificada. 14, 22, 25, 89
- CA** Del latinismo *cornu ammonis*. 3
- CB** Calbindina. IX, 17, 42, 43, 56, 57
- CB1R** receptor cannabinoidre tipo 1, por *cannabinoid receptor type 1*. 14, 23, 39–41, 58, 59
- CCK** Colecistokinina, generalmente referido a inmunoreactividad. 14, 15, 95
- CCKbc** Célula cesto inmunoreactiva a colecistokinina, por *Colecistokinin-immunoreactive basket cell*. 14, 16, 21, 22, 25, 58, 59, 62, 64, 89
- CSD** Densidad de fuentes de corriente, por *current source density*. 42, 44, 55, 80, 88
- DAB** Diaminobenzidina. 57
- DG** Giro dentado, por *dentate gyrus*. 3–9, 11, 12, 15, 21–23, 27, 35, 44, 66, 90
- DI** Índice de discriminación, por *Discrimination index*. 52
- EC** Corteza entorrinal, por *entorhinal cortex*. IX, 3–15, 17, 20–23, 27, 28, 90
- FBS** suero fetal bovino, por *fetal bovine serum*. 39, 41
- FIR** Respuesta finita al impulso, referida a filtros digitales, por *finite impulse response*. 42
- FrecIO** Frecuencia de potenciales de acción a pulsos cuadrados despolarizantes, generalmente de 0.3 nA. 44

GECI Indicadores de calcio genéticamente codificados, por <i>genetic encoded calcium indicators.</i> 18	MUA Actividad multi-unidad, por <i>multi-unit activity.</i> 35, 45, 50, 74–76, 80–82, 91, 92
GEVI Indicadores de voltaje genéticamente codificados, por <i>genetic encoded voltage indicators.</i> 18, 19	NHS Suero de caballo, por <i>normal horse serum.</i> 39
GLM Modelo lineal general, por <i>generalized linear model.</i> 52, 68	NOS Óxido nítrico sintasa, por <i>nitric oxide synthase</i> , generalmente referido a inmunoreactividad. 15
HFO Oscilación de alta frecuencia, por <i>high frequency oscillation.</i> 28, 29, 42, 46, 50, 68	NPY Neuropéptido Y, generalmente referido a inmunoreactividad. 15
Htr3a Receptor de serotonina 3a, generalmente referido a inmunoreactividad. 14	OLM Célula <i>oriens-lacunosum-moleculare.</i> 14, 16, 21, 22, 25, 89
IP Intra-peritoneal. 33, 35, 36, 76, 77	OR Tarea de reconocimiento de objetos de una muestra. 34, 68, 69, 77, 85
IPSP potenciales post-sinápticos inhibitorios, por <i>inhibitory postsynaptic potential.</i> 24	PAU Umbral de disparo del potencial de acción. 45
LEC Corteza entorrial lateral, por <i>lateral entorhinal cortex.</i> 4, 6, 10, 18	PB Tampón fosfato, por <i>phosphate buffer.</i> 39
LFP Potencial de campo local, por <i>local field potential.</i> X, 19, 20, 23, 25, 28, 34, 38, 42, 44, 48, 50, 69, 70, 72, 79, 91	PBS Tampón fosfato-salino, por <i>phosphate buffered saline.</i> 38, 39, 41
LIA Actividad irregular de alta amplitud, por <i>large irregular activity.</i> 20, 23	PBS-Tx Tampón fosfato-salino con Triton X-100. 39, 41
LTP Potenciación a largo plazo, por <i>long term potentiation.</i> 2, 26	PC Células piramidales, por <i>pyramidal cells.</i> IX, X, XIII–XV, 5–15, 17–26, 28, 53–65, 69–80, 87–93
MEC Corteza entorrial medial, por <i>medial entorhinal cortex.</i> 4, 6, 10, 13, 18, 90	PC^{Con} Células piramidales de CA1 registrada en una rata control. 74–76, 81, 82, 92
ML Medio-lateral. 35, 36, 38, 41	PC^{Epi} Células piramidales de CA1 registrada en una rata epiléptica. 74–76, 81, 82, 92
MS-DBB <i>Septum</i> medial/banda diagonal de Broca, por <i>medial septum – diagonal band of Broca.</i> 20, 21, 23	

- PC_{Prof}** Células piramidales de CA1 profunda. 17, 62, 64, 87–91, 93
- PC_{Sup}** Células piramidales de CA1 superficial o *CA1 pyramidal superficial cells*. XIII, 17, 62, 87–93
- PETH** Histograma peri-evento, por *peri-event histogram*. 45, 46, 60, 61, 64, 70, 71
- PFA** Paraformaldehido. 38
- PPa** Célula asociada al tracto perforante, por *perforant pathway associated cell*. 14, 22
- PV** Parvalbúmina, generalmente referido a inmunoreactividad. 14, 39–41, 58, 59, 95
- PVbc** Célula cesto inmunoreactiva a parvalbúmina, por *parvalbumin-inmunoreactive basket cell*. 14, 16, 18, 21, 22, 24, 25, 58, 62, 64, 88–90, 92
- REM** Sueño de movimientos oculares rápidos, también denominado sueño paradógico, por *rapid eye movement*. 20, 47, 69
- RMP** Potencial de membrana en reposo, por *resting potential*. 45, 54, 55, 60, 73
- ROI** Regiones de interés, por *region of interest*. 43
- RT** Temperatura ambiental, por *room temperature*. 39
- SCa** Célula asociada a la colateral de Schaffer, por *Schaffer collateral associated cell*. 14, 22
- SD** Desviación estándar, por *standard deviation*. 42, 45, 49, 52, 54, 72, 73, 77, 78
- SIA** actividad irregular de baja amplitud, por *small irregular activity*. 20
- SL** Del latinismo *stratum lacunosum*. 5
- SLM** Del latinismo *stratum lacunosum moleculare*. 7, 8, 11, 12, 14, 15, 18, 21–23, 44, 55
- SLu** Del latinismo *stratum lucidum*. 8, 10, 12
- SM** Del latinismo *stratum moleculare*. 5, 6
- SO** Del latinismo *stratum oriens*. 7–12, 14, 15, 20, 55, 59
- SOM** Mapas auto-organizativos, por *self organizing maps*, un algoritmo de agrupación no-supervisada. 46, 72, 78, 91, 92
- SP** Del latinismo *stratum pyramidale*. IX, 7, 10–15, 20–24, 28, 35, 37, 42, 45, 50, 55–58, 63, 65–67, 71, 79, 81, 88
- SPW** Eventos *sharp wave*. 23, 24, 28, 35, 42, 46, 53, 66, 67
- SPW-r** Complejos *sharp wave-ripples*. VIII–X, XIII–XV, 3, 23–26, 28, 31, 35, 37, 42, 45–47, 49–51, 53–80, 83–85, 87–93
- SR** Del latinismo *stratum radiatum*. IX, 7–12, 14, 15, 20, 22, 23, 28, 35, 41–43, 45–47, 50, 53, 55, 56, 58, 59, 61, 66, 67, 70, 71, 73–76, 80–82, 88, 91, 92
- Sst** Somatostatina, generalmente referido a inmunoreactividad. 11, 14, 15

TBS-Tx Solución salina tamponada con Tris y Triton X-100. 39

TLE Epilepsia del lóbulo temporal, por *temporal lobe epilepsy*. XIII, 3, 27–29, 66, 67, 72

VIP Péptido intestinal vasoactivo, por *vasoactive intestinal peptide*, generalmente referido a inmunoreactividad. 14

WWW Test de conducta episódica, por *what-where-when*. 66–69

Resumen

En periodos de inmovilidad y sueño de ondas lentas emerge en el hipocampo el patrón de actividad más síncrono del cerebro mamífero: los eventos *sharp wave-ripple* (SPW-r). Un gran número de trabajos han demostrado que el reclutamiento celular durante tales eventos recopila secuencias neuronales computacionalmente relevantes, fenómeno que subyace a la consolidación de la memoria. Todas las condiciones que cursan con déficit cognitivos han sido asociadas a alteraciones en los SPW-r, incluyendo el envejecimiento, la enfermedad de Alzheimer y la epilepsia del lóbulo temporal (TLE).

El **objetivo** de esta tesis doctoral es comprender las reglas de reclutamiento de las células piramidales glutamatérgicas (PC) de CA1 durante los SPW-r, así como su alteración en los SPW-r epilépticos, con énfasis en los mecanismos que determinan su función cognitiva. Adicionalmente, se pretendió explotar tal conocimiento básico en la búsqueda de estrategias de rescate funcional para la TLE.

Para el abordaje de estos objetivos se empleó una combinación multi-disciplinar de **métodos** experimentales y analíticos, que incluyen: registros extracelulares durante paradigmas comportamentales de memoria, registros simultáneos de célula única y extracelulares *in vivo*, identificación histológica de entidades celulares registradas y estudios estereológicos de botones perisomáticos GABAérgicos, así como otras estrategias de neurofisiología clásica y análisis computacional.

En oposición al modelo vigente, nuestros **resultados** mostraron el comportamiento heterogéneo de las (PC) de CA1 durante los SPW-r, con correspondencia a su identidad celular como PC superficiales – próximas al *stratum radiatum* – y PC profundas – adyacentes al *stratum oriens* –. Mecanismos circuitales específicos basados en la conectividad perisomática GABAérgica y glutamatérgica intra-hipocampal explicaron la diferente selección de las PC superficiales y profundas durante los SPW-r. Utilizando un método de agrupación no-supervisado se demostró que el control dinámico del balance excitación e inhibición subyace a la selectividad celular, y que su preciso antagonismo independiza la respuesta de las PC individuales respecto a la excitación general del circuito.

Los eventos SPW-r que emergen en el hipocampo epiléptico presentaron una dinámica circuital distinta: el incremento del reclutamiento de las PC canceló la tendencia superficial-profunda y alteró las características espectrales de los SPW-r. Tales alteraciones estuvieron

asociadas a la pérdida de selectividad celular en el hipocampo epiléptico y con un déficit cognitivo. Manipulaciones farmacológicas que atenúan el reclutamiento excesivo de las PC hippocampales restablecieron los parámetros circuitales relacionados con la selectividad celular y rescataron la función.

Se **concluye** que las PC hippocampales exhiben heterogeneidad durante los SPW-r, y su reclutamiento está exquisitamente regulado como función de la dinámica interna del sistema, su contexto y su historia.

Summary

Hippocampal sharp wave-ripple (SPW-r) complexes emerge during immobility and slow-wave-sleep, being the most synchronous activity pattern of the mammalian brain. A number of studies have pointed out that cell recruitment during such events comprises relevant neuronal sequences during memory consolidation. Moreover, alterations of the SPW-r pattern have been related to memory impairment in normal aging and in several disorders, including Alzheimer's disease and temporal lobe epilepsy. The mechanisms however remain elusive.

The major **goal** of this doctoral thesis is to understand the synaptic and cellular rules determining participation of CA1 glutamatergic pyramidal cells (PC) during SPW-r, as well as their distortion in the epileptic hippocampus.

To address these goals, we used a combination of experimental and analytical **methods**, including hippocampal multi-site silicon probe recordings in normal and epileptic rats during behavioural tasks, simultaneous single-cell and multi-site extracellular recording *in vivo*, unbiased histological profiling of recorded cells, and stereological studies of the GABAergic perisomatic boutons PC.

In contrast to the current model, our **results** show a heterogeneous behaviour of CA1 PC during SPW-r according to their superficial PC – closer to *stratum radiatum* – or deep location PC – closer to *stratum oriens*. Circuit specific mechanisms, including perisomatic GABAergic and intra-hippocampal glutamatergic connectivity, explain the different selection of deep and superficial PC. An un-supervised clustering method discloses the role of the excitatory/inhibitory balance in determining cellular selectivity.

SPW-r exhibited a different circuit dynamics in the epileptic hippocampus with more PC recruited during events across the deep-superficial axis and higher frequency components characterizing SPW-r. Such spectral features were associated with a loss of selectivity and memory impairment in epileptic animals. Pharmacological manipulations that decrease excessive PC recruitment, improved cell and network parameters related to cell selectivity, and restored memory function.

In **conclusion**, hippocampal PC have different responses during SPW-r, and their recruitment is exquisitely regulated as function of the system internal dynamic, its context and its history.

XX

SUMMARY

1 | Introducción

La formación hipocampal es considerada una piedra Rosetta neural (Andersen et al., 2009). Durante las últimas décadas ha cautivado el interés de todos los gremios de la neurociencia: clínicos explorando las bases neurales de la enfermedad de Alzheimer (Selkoe, 2001; Sheng et al., 2012) o la epilepsia (Jefferys et al., 2012; Menendez de la Prida et al., 2015); psicólogos examinando la estructura de la memoria (Lacy y Stark, 2013; Moser et al., 2014); fisiólogos detallando los mecanismos sinápticos (Südhof, 2013) y la plasticidad estructural (Leuner y Gould, 2010) y sináptica (Neves et al., 2008); histólogos catalogando la diversidad de interneuronas de sus circuitos (Klausberger y Somogyi, 2008); biofísicos examinando sus ritmos y la coreografía de sus poblaciones celulares (Buzsáki, 2015; Buzsáki y Draguhn, 2004); y neurocientíficos computacionales modelando sus redes y funciones (Burgess y Hitch, 2005). Las células piramidales hipocampales son actualmente las neuronas más comprendidas del cerebro (Andersen et al., 2009).

Son diversas las razones que explican esta *sobrerrepresentación* del hipocampo en el panorama científico actual, si bien, atendiendo al perfil de estas contribuciones destaca una recurrente combinación de factores históricos e intrínsecos. En «Estructura del asta de Ammon y fascia dentata», Santia-

go Ramón y Cajal (1893) ya formuló la moderna noción de estratificación de los distintos *inputs* sobre las dendritas apicales de las células principales de CA1, indudablemente asistido y fascinado por su compacta distribución y su simple organización en monocapa. No obstante, no fue hasta los trabajos de Alf Brodal (1947) y sobre todo gracias a «A proposed mechanism of emotion» de James Papez (1937) cuando el hipocampo pasa de ‘lidiar con alguna fase de la función olfativa’ (pág 743) a ‘construir el proceso emotivo central de origen cortical’ (pág 728), y por tanto a estar involucrado en funciones *superiores* cerebrales. Esta tendencia culminó notablemente en los años 50 con la vigente asociación del hipocampo a los procesos de memoria gracias a las observaciones de los neurocirujanos William Scoville y Brenda Milner (1957) en sus pacientes, entre ellos el célebre Henry Molaison¹. Concurrentemente, la formación hipocampal se constituyó como el estándar de las prepara-

¹En palabras de los autores (Scoville y Milner, 1957): ‘Ha habido un sorprendente y totalmente inesperado resultado comportamental: una grave pérdida de la memoria reciente en aquellos casos en los cuales la resección del lóbulo temporal medial fue tan extensa que involucró la porción mayor del complejo hipocampal bilateralmente (...). Tras la operación este joven no parece recordar nada de los eventos cotidianos de su vida en el hospital, (...) [no obstante,] sus recuerdos previos están vívidos e intactos.’

ciones *in vitro* en virtud de su estabilidad y la preservación de sus circuitos en las rodajas de tejido gracias a su organización laminar (Schwartzkroin, 1975). De este modo, es en el hipocampo donde Kandel y colaboradores (1961) detallan la identidad de las sinapsis excitatorias e inhibitorias, y donde Tim Bliss y Terje Lomo (1970) describen la potenciación a largo plazo (LTP, por el anglicismo *long term potentiation*), con el consiguiente golpe de efecto para su entonces debatida función en los procesos de memoria. Los circuitos hipocampales son excelentes generadores de potencial de campo eléctrico (Schwartzkroin, 1975) – de nuevo gracias a la estructura compacta y monolaminar de sus células principales – lo que guió la temprana caracterización de sus ritmos, comenzando con la descripción del ritmo *theta* (θ) por Richard Jung y Alois Kornmüller (1938) y su posterior asociación con patrones comportamentales (Dement y Kleinman, 1957; Grastyan et al., 1959). Estos estudios motivaron el hallazgo de las células dependientes de lugar (*place cells*) en 1971 por O’Keefe y Dostrovsky (O’Keefe y Dostrovsky, 1971), tras lo cual comenzó a ser evidente la necesidad del registro simultáneo de grandes poblaciones neuronales. Una vez más, la propia idiosincrasia anatómica del hipocampo impulsó el desarrollo de los tetrodos (O’keefe y Recce, 1993), y más recientemente las sondas multi-canal basadas en silicio (*silicon probes*), que facilitan el registro simultáneo de diferentes áreas y grupos celulares interconectados (Csicsvari et al., 2003).

En la formación hipocampal se han propuesto un gran número de fundamentos de la neurociencia moderna. Aún actualmente diferentes laboratorios y escuelas lidian con las redes hipocampales intentando pro-

poner principios generales en materias que versan desde el juicio del tiempo (Eichenbaum, 2014) y la toma de decisiones (Redish, 2016), a la estructura de la memoria (Tonegawa et al., 2015) e incluso la conciencia (Koch et al., 2016). Si bien, la generalidad de estos fundamentos depende de las diferencias entre la formación hipocampal y otras regiones cerebrales. Por considerar unos ejemplos: la práctica ausencia de conexiones recíprocas en los circuitos hipocampales comparados con los neocorticales (Andersen et al., 2009); o la conocida neurogénesis adulta restringida al nicho subgrangular (Spalding et al., 2013). Un conocimiento más profundo del hipocampo se torna necesario, tanto para consolidar la aplicabilidad de los fundamentos que ofrece, como para comprender las razones subyacentes a sus particularidades.

Con el advenimiento de nuevos métodos, impulsados por el desarrollo tecnológico y la biología molecular, en las últimas décadas un creciente número de trabajos están ampliando nuestra comprensión sobre la formación hipocampal, en materias tan fundamentales como (i) la identidad de sus neuronas y (ii) el mapa de sus conexiones. Una reciente oleada de estudios muestran la heterogeneidad de las células principales en términos de su desarrollo, morfología, expresión génica, modulación por neurotransmisores, actividad, proyecciones, e incluso sus funciones (Introducción, sección 1.1.3, pág 15). En referencia al conectoma hipocampal, además del hallazgo de nuevas proyecciones cortico-hipocampales (Melzer et al., 2012; Rajasethupathy et al., 2015) destaca la re-irrupción de CA2 en el esquema (introducción, sección 1.1.1, pág 9). En relación con ambas constelaciones de resultados, la primera par-

te de esta tesis doctoral (Resultados 3.1-3.4, pág 53; Valero et al., 2015) examina la heterogeneidad en la contribución de las células principales hipocampales a los complejos *sharp wave-ripples* (SPW-r), eventos de alta frecuencia con máxima expresión en CA1, y que presuntamente articulan la consolidación de la memoria hipocampo-dependiente (Buzsáki, 1989; Nádasdy et al., 1999; Girardeau et al., 2009; Buzsáki, 2015).

La formación hipocampal es además particularmente vulnerable a diferentes enfermedades, tal y como fue apreciado por los primeros neuropatólogos (Alzheimer, 1906), y las razones de éstas vulnerabilidad bien podrían residir en las particularidades anatomo-funcionales aludidas en párrafos precedentes. El hipocampo es característicamente sensible a isquemia, estrés crónico, neurodegeneración y epilepsia, entre otras patologías (Bartsch y Wulff, 2015). Con respecto a la epilepsia del lóbulo temporal (por sus siglas en inglés, TLE), contribuciones previas del laboratorio de la Dra. Liset Menéndez de la Prida (Foffani et al., 2007; Ibarz et al., 2010; Aivar et al., 2014) han examinado los mecanismos subyacentes a los *fast ripples*, eventos asociados a los SPW-r específicos de regiones epileptogénicas y que pueden preceder los ataques. La segunda parte de esta tesis doctoral (Resultados 3.5-3.12, pág 64; Valero et al., 2017) explora las repercusiones cognitivas de estos eventos epilépticos, y emplea las diferencias en la actividad celular entre *ripples* fisiológicos y *fast ripples* para extraer mecanismos subyacentes a su roles en la consolidación de la memoria.

En las subsiguientes secciones del apartado *Introducción* se describe brevemente el conectoma hipocampal (sección 1.1), con

mayor énfasis en las últimas contribuciones, sus principales tipos neuronales y su función. Posteriormente se examinan los ritmos hipocampales, en especial los SPW-r (sección 1.2, pág 18). Por último, se explora la emergencia de los *fast ripples* en los cerebros epilépticos (sección 1.3, pág 26).

1.1. El atlas hippocampal

La formación hipocampal es un grupo de áreas cerebrales situadas en el lóbulo temporal que comprenden el giro dentado (DG, por las siglas del anglicismo *dentate gyrus*), el hipocampo propiamente dicho, el complejo subiccular y la corteza entorrinal (EC, de *entorhinal cortex*)². Los autores más relevantes de la terminología hipocampal son Santiago Ramón y Cajal (1893) y su estudiante Rafael Lorente de Nó (1934), quienes trazaron sus fronteras, regiones e incluso la direccionalidad de sus proyecciones basados únicamente en tinciones de Golgi.

En roedores, la formación hipocampal presenta una morfología alargada que parte de una posición medial en las proximidades del *septum*, se extiende dorsalmente en dirección caudal, y termina girando lateralmente para descender por el lóbulo temporal. De esta manera, el eje mayor, o longitudinal, de la formación hipocampal es el eje «septo-temporal», paralelo para todas las regiones hipocampales. En otras palabras, una sec-

²La bibliografía de la formación hipocampal presenta gran número de ambigüedades e imprecisiones terminológicas. En esta tesis doctoral emplearemos las convenciones adoptadas por Andersen et al. (2009) en *The hippocampus book*, que reservan el término «hipocampo» para el asta de Ammon, esto es las regiones CA (CA1, CA2 y CA3, del latinismo *Cornu Ammonis*).

ción transversal del eje septotemporal bien podría contener todas las áreas de la formación hipocampal. Ortogonales al eje septotemporal se definen un eje «proximo-distal» y un eje «radial». En el eje proximo-distal, las regiones hippocampales discurren seriadamente desde DG en el extremo proximal, al complejo subicicular en el polo distal. Como en el resto de estructuras corticales la dimensión radial frecuentemente se especifica como eje superficial-profundo, desde la superficie pial, o externa, de la corteza, a la superficie interna o subventricular. Consistentemente con esta convención, las áreas adyacentes al extremo pial de la formación hippocampal – esto es, la fisura hippocampal – son las superficiales. Dado que el hipocampo no deja de ser una corteza plegada hacia el interior del cráneo, este esquema puede resultar paradójico en áreas tales como CA1 y el complejo subicicular, cuyas regiones *superficiales* se disponen hacia el interior del cerebro, mientras que sus áreas profundas son más *externas* o próximas a la corteza cerebral. Todo el sistema de coordenadas del atlas hippocampal ha sido esquematizado en la figura 1.1.

1.1.1. El circuito trisináptico extendido

El conectoma del hipocampo es una de sus características más peculiares y sugestivas, y probablemente el argumento más importante para incluir este conjunto de regiones bajo el epíteto «hipocampal». El mismo esquema básico se conserva a través del eje septotemporal y entre diferentes especies (Strange et al., 2014). A lo largo de esta sección recorreremos el circuito hippocampal, describiendo concisamente sus principales poblaciones

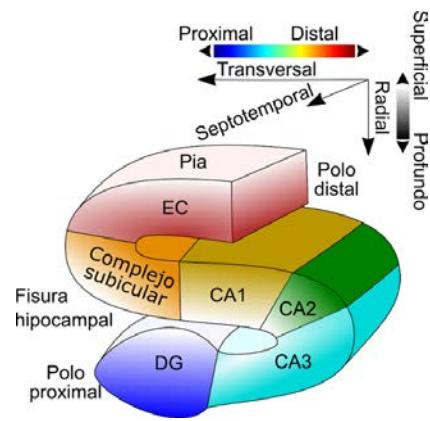


Figura 1.1: Ejes y coordenadas de la formación hippocampal. Esquema de la sección transversal del eje septo-temporal. El eje transversal (o proximo-distal, en gradiente de colores) recorre todas las áreas hippocampales, desde DG (en azul) a EC (en rojo). El eje radial «superficial-profundo» (en escala de grises, superpuesto en la figura al gradiente de colores) se invierte según la región, debido al plegamiento de la estructura.

principales y funciones.

Corteza entorrinal (EC). Consideremos por conveniencia EC como el punto de partida del circuito. EC se divide, generalmente, en 2 regiones referidas como corteza entorrinal lateral (LEC) y medial (MEC) (Amaral et al., 1987; Andersen et al., 2009; ver Witter, 2007; Insausti et al., 1997 para digresiones sobre la regionalización de la corteza entorrinal en roedores y otras especies). EC presenta 4 capas celulares (II, III, V y VI) y dos capas plexiformes o acelulares (I y IV), ocupadas por haces de axones y dendritas. Estudios clásicos demostraron que EC es el origen de una potente conexión al hipocampo y a DG (Raisman et al., 1965). Los axones de las

células de las capas superficiales de EC (II y III) forman un haz compacto conocido como *angular bundle* (Ramón y Cajal, 1893) que gira bruscamente en el plano transversal para dar lugar al denominado tracto perforante, el cual atraviesa –perfora– el complejo subicular y la fisura hipocampal, y posteriormente se distribuye en DG y el hipocampo (Amaral y Witter, 1989). Recientes estudios han examinado la hodología³ y la función de los distintos tipos celulares que constituyen el tracto perforante. La capa II de EC (ECII) incluye dos tipos de células excitatorias: células estrelladas (*stellate cells*) y piramidales (PC) (Alonso y Klink, 1993). Las células estrelladas, también denominadas células océano (*ocean cells*; Kitamura et al., 2014) son mayoritarias (67%; Gatome et al., 2010), expresan reelina y proyectan a DG y CA3 (Kitamura et al., 2014; Ray et al., 2014; Varga et al., 2010). Cabe destacar que las células estrelladas parecen ser responsables de la función más popular de EC: se comportan como *grid cells* (Burgalossi et al., 2011; Ray et al., 2014; Tang et al., 2014), –células cuya frecuencia de disparo está modulada espacialmente según un patrón regular hexagonal (Hafting et al., 2005; Moser et al., 2014)–. De hecho, estudios recientes han demostrado que las células estrelladas de ECII son capaces de codificar contextos específicos (Kitamura et al., 2015). Dado su perfil de conexiones con otras áreas corticales (Andersen et al., 2009), su conectividad intrínseca y su actividad, las células estrelladas de ECII son

las principales responsables de suministrar a la formación hipocampal el contenido sensorial del mundo que discurrirá a través de su circuitería.

Por su parte, las PC (17% de la población de ECII; Gatome et al., 2010) o células isla (*island cells*) expresan Wfs1 y calbindina (Tamamaki y Nojyo, 1993) y agrupan sus somas en clústeres que proyectan sobre interneuronas de la región superficial de CA1, área conocida como *stratum lacunosum* (SL, Kitamura et al., 2014). De esta manera, las células piramidales de ECII son capaces de inhibir –con intermediación de las interneuronas de SL⁴– las dendritas apicales de las células principales de CA1.

ECIII contiene mayoritariamente PC (Andersen et al., 2009; ver Canto et al. (2008) para una descripción extensiva de otros tipos celulares de ECIII), que proyectan directamente a la región más apical de CA1 y el subículo denominada *stratum moleculare* (SM, Gloveli et al., 1997). Aún no han sido descritos marcadores inmunohistoquímicos inequívocos de esta capa, si bien sus PC no expresan ninguno de los marcadores de la capa II –calbindina, Wfs1, o reelina– (Kitamura et al., 2015, 2014), y están Enriquecidas en genes específicos como *kitl*, *pich1* o *kctd4* (Ramsden et al., 2015). Se ha propuesto que las PC de ECIII ingresan en CA1 y el subículo información de contenido temporal (Suh et al., 2011). Según el modelo actual, la actividad coordinada de las PC de capa II y

³La *hodología* se define como el perfil de conexiones entre tipos celulares genéticamente definidos (Harris y Shepherd, 2015), esto es, los motivos circitales.

⁴Este micro-circuito neuronal, PC→interneurona→PC, es un motivo general del sistema nervioso conocido como inhibición *feed-forward*. Por contra, inhibición *feed-back* es un micro-circuito similar, en el que la población que recluta las interneuronas es la misma que recibe su inhibición, PC↔interneurona.

de capa III, a través de sus eferencias excitatorias sobre SM e inhibitoria (*feed-forward*) sobre SM de CA1, respectivamente, orquestan la asociación temporal de la memoria. Nótese que, de acuerdo a esta propuesta conceptual, el contenido explícito de las trazas de memoria hipocampales es aportado por las células estrelladas de capa II, mientras que las PC de capa II y III añaden el marco temporal⁵. El haz monosináptico que conecta EC – células estrelladas y PC de capa II y III – con CA1 es conocido como vía temporoammonática (Witter et al., 2000). La matriz de conexiones entre EC, DG y el hipocampo ha sido esquematizada en la figura 1.2.

Giro dentado (DG). El destino mayoritario de las eferencias de EC es DG, sorprendentemente en ausencia de una conexión directa recíproca desde DG a EC (Ramón y Cajal, 1893; Lorente de Nó, 1934; Amaral y Witter, 1989). DG es una alocorteza (corteza trilaminada). En su capa más superficial, conocida como capa molecular, los axones excitatorios del tracto perforante sinaptan con las espinas dendríticas apicales de las células granulares (Nafstad, 1967) siguiendo un arreglo topográfico: las fibras de LEC (el denominado tracto perforante lateral) terminan en el tercio más superficial, y las provenientes de MEC (o tracto perforante medial) en el tercio medio (figura 1.3; Andersen et al., 2009). Adyacente a la capa molecular, una densa lámina de células granulares – las células principales de DG, que expresan

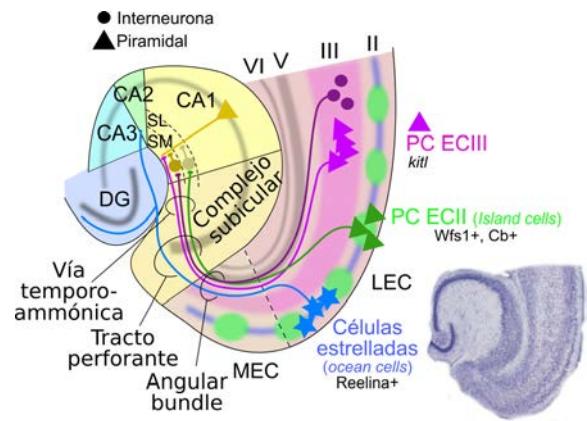


Figura 1.2: Proyecciones de salida desde EC. Los axones de las células de EC forman el tracto perforante, que se distribuye por el resto de regiones hipocampales. La células estrelladas de ECII proyectan extensivamente sobre DG en el primer eslabón del circuito hipocampal. Las PC de ECII y III, y una recientemente descrita población de interneuronas (Basu et al., 2016), sinaptan sobre la región apical de CA1 y el subículo.

marcadores característicos como calbinidina y Prox1 – definen la capa granular. Capa molecular y capa granular integran una estructura en forma de V que cierra entre sus bordes la capa plexiforme o hilus, poblada por diferentes tipos celulares entre los que destaca las enigmáticas células musgosas (*mossy cells*; Senzai et al., 2017; GoodSmith et al., 2017, ver Scharfman, 2016 para una exhaustiva revisión sobre esta población celular), inmunoreactivas para el péptido asociado al gen de la calcitonina (CGRP; Scharfman, 2016), y que sinaptan ipsi- y contralateralmente sobre granulares e interneuronas de DG.

En lo referente a las proyecciones de DG, tradicionalmente se ha asumido que el des-

⁵ Recientemente ha sido descrita una población de interneuronas de LECIII que proyectan sobre otras interneuronas del borde apical de CA1, desinhibiendo las células principales de esta región (Basu et al., 2016), en una suerte de antagonistas funcionales de las células piramidales excitatorias de capa III.

tino exclusivo del haz axónico de las células granulares – las fibras musgosas (no confundir con las células musgosas, cuyos axones no abandonan DG) – era el área CA3 hipocampal (Lorente de Nò, 1934; Andersen et al., 2009), sin embargo en el 2014 un influyente trabajo del laboratorio de Sumusu Tonegawa reveló sinapsis funcionales con la región CA2 (Kohara et al., 2014)⁶. En cualquier caso, las fibras musgosas principalmente realizan sinapsis excitatorias sobre las espinas dendríticas de las células de CA3 y, al igual que en el caso de la conexión desde EC a DG, no existe una proyección recíproca de CA3 (o CA2) a DG (Andersen et al., 2009).

Hasta este punto, el circuito hipocampal exhibe dos eslabones excitatorios en serie «EC→DG→CA3» cuyo perfil de conexiones ha inspirado multitud de teorías sobre la formación hipocampal. (Marr, 1971; McNaughton y Morris, 1987; Hasselmo y Wyble, 1997). El primer tramo de este circuito (EC→DG) es esencialmente divergente: 2×10^5 células estrelladas de ECII proyectan sobre 1.2×10^6 células granulares en DG (Amaral et al., 1990), un orden de magnitud más numerosas. Tal fenómeno de divergencia, en combinación con la baja frecuencia de disparo de las células granulares – dado su hiperpolarizado potencial de membrana (Ylinen et al., 1995) — condujo a la hipótesis de que DG amplifica las diferencias de la información contextual codificada en EC (O'Reilly y McClelland, 1994), función característica de circuitos de alta fidelidad conocida como *separación de patrones* (Neuñuebel y Knierim, 2014). En otras palabras, DG es capaz de ver diferencias entre dos con-

⁶Este trabajo además desestimó las aferencias de ECIII sobre CA2, clásicamente consideradas.

textos que para EC son fundamentalmente semejantes. Reforzando esta teoría, recientemente ha sido demostrado que poblaciones reducidas y dispersas (2-4 %) de células granulares codifican contexto específicos o *en-gramas* (Tonegawa et al., 2015; Liu et al., 2012).

Hipocampo. El área eferente más importante de las fibras musgosas, CA3, nos introduce por primera vez en el hipocampo propiamente dicho. De acuerdo a la nomenclatura propuesta por Lorente de Nò (1934) el hipocampo se subdivide en tres porciones próximo-distales: CA3, CA2 y CA1⁷. La capa principal que recorre todo el hipocampo (CA1, CA2 y CA3) está formada mayoritariamente por células piramidales (PC) empaquetadas. Profundo a la capa piramidal (SP, de *stratum pyramidale*) se encuentra el *stratum oriens* (SO), que contiene varias poblaciones dispersas de interneuronas así como las dendritas basales de las PC. Sobre el plano superior de SP se extiende el *stratum radiatum* (SR) compuesto por las dendritas apicales de las PC entremezcladas con somas de interneuronas. La capa más superficial del hipocampo es el *stratum lacunosum moleculare* (SLM, engloba las anteriormente citadas subcapas *stratum lacunosum* y *stratum moleculare*), donde las aferencias desde EC sinaptan con el extremo distal de las dendritas de las PC. En las regiones CA2 y CA3 el ingreso de las fibras musgosas define una capa adicional entre SP y SR denominada *stratum lucidum* (SLu).

CA3. Si bien las PC de CA3 expresan ge-

⁷El esquema original propuesto por Rafael Lorente de Nò delineaba una cuarta región proximal a CA3, CA4, que para la anatomía moderna corresponde a la porción proximal de CA3, embebida en el hilus de DG (Blackstad, 1956; Amaral, 1978)

nes específicos tales como *lyd* y *coch*, aún no han sido desarrollados marcadores inmunoreactivos exclusivos de esta región. CA3 recibe las fibras musgosas provenientes de la región DG, cuyos axones sinaptan con las espinas dendríticas presente en las PC de CA3, (conocidas como *thorny excrescences*) en SO, SLu y SR (Amaral y Witter, 1989), además de una proyección más modesta desde las células estrelladas de ECII en SLM vía tracto perforante (Andersen et al., 2009). En lo referente a sus eferencias, CA3 es la principal fuente de excitación de CA1 a través un haz de fibras no mielinizadas conocido como *colateral de Schaffer* (Schaffer, 1892), y proyecta un denso plexo axónico auto-asociativo sobre sí mismo (ipsi- y contralateralmente) y CA2. CA3 es considerado el mayor sistema asociativo del cerebro (Wittner et al., 2007). No obstante, un reciente estudio basado en poli-registros simultáneos *in vitro*, realizado en ratón, ha reportado una autoconectividad mucho más dispersa de la esperada (0.92 % para CA3-CA3), si bien altamente enriquecida en motivos di-sinápticos (Guzman et al., 2016), configurando un ejemplo paradigmático de organización en *mundos pequeños*⁸.

Las PC de CA3 reciben una proyección de DG fuertemente convergente – 1.2×10^6 células granulares proyectan sobre 2.5×10^5 PC de CA3 (Andersen et al., 2009) –,

además presentan una relativamente alta frecuencia de disparo (Oliva et al., 2016b) y tienen un perfil alto de auto-conectividad (Guzman et al., 2016). Tal cóctel de características hacen de CA3 una excelente red generalizadora o *recuperadora de patrones* (Marr, 1971; McNaughton y Morris, 1987). En otras palabras, dos contextos dados (o engramas, por citar la terminología moderna), semejantes y codificados por distintas poblaciones granulares podrán ser generalizados en CA3. Es más, la disposición en serie de un sistema de alta fidelidad, separadora de patrones (EC → DG), con una red de baja fidelidad, recuperadora de patrones (DG → CA3), presenta inestimables ventajas algorítmicas: en caso de que DG pretenda, sin éxito, evocar un contexto episódico dado, por ejemplo durante la activación incompleta de una constelación de células granulares, la red asociativa de CA3 será capaz de absraer la información perdida (figura 1.3).

CA2. Las PC de CA2 expresan PCP4, RGS14 y α -actinina2, entre otros marcadores (Kohara et al., 2014). Reciben proyecciones de DG vía fibras musgosas y, al igual que CA3, presenta aferencias desde las células estrelladas de ECII en SLM (Kohara et al., 2014). A su vez, las células principales de CA2 proyectan sobre sí mismas y sobre CA3 (Ishizuka et al., 1990), en cierta manera insertadas en la red auto-asociativa de CA3, y sobre SO de CA1 (Lorente de Nó, 1934), donde tanto el número de espinas como la extensión de sus arborizaciones dendríticas es mayor para las PC más profundas. Por tanto, CA2 excita preferentemente al sector profundo de las células piramidales de CA1 (Kohara et al., 2014; Valero et al., 2015). La circuitería de CA2 representa información episódica o contextual, si bien, tras su

⁸Mundos pequeños, comúnmente referido con anglicismo *small-worlds* (Watts y Strogatz, 1998), es una estrategia de organización topográfica que siguen los sistemas complejos para optimizar la conectividad entre sus elementos. Se basa en una combinación de cierto grado de conexiones al azar con un alto nivel de conexiones locales. En conjunto, los sistemas organizados como mundos pequeños mantienen un alto perfil de conectividad con un bajo número de conexiones.

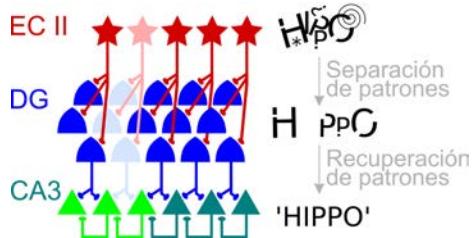


Figura 1.3: El circuito hipocampal como una red separadora y generalizadora de patrones. La proyección divergente desde EC, sumado a su baja tasa de disparo, hacen de DG un circuito de gran fidelidad, capaz de segregar patrones no discernibles por EC. No obstante, un sistema de tales características es poco tolerante al ruido. Su posterior proyección convergente a la red asociativa de CA3 completa un circuito optimizado para identificar patrones.

«re-descubrimiento» en 2014, varios laboratorios han abordado el contenido estricto de tal información episódica. CA2 parece ser capaz de representar regiones del espacio en inmovilidad, e incluso durante el sueño (Kay et al., 2016), y parece además ser esencial para la memoria social (Hitti y Siegelbaum, 2014).

CA1. Distal a CA2, las PC de CA1 presentan una gran variabilidad genética que incluso rivaliza con las diferencias existentes entre CA1 y CA3 (Cembrowski et al., 2016a). Tanto es así que, a pesar de haberse descrito marcadores específicos para áreas anatómicamente coherentes de CA1 – calbindina para la sección superficial de las células de CA1 (Slomianka et al., 2011), Wfs1 para CA1 dorsal (Dong et al., 2009; Valero et al., 2015), Dcn para CA1 ventral, entre otros (ver Dong et al., 2009 y Cembrowski et al., 2016a para estudios extensivos de las diferencias genéticas existentes en CA1; Cembrowski et al., 2016b introduce el recurso online *Hipposeq*, con los datos de secuenciación de RNA de sus experimentos) – pocos genes distinguen inequívocamente CA1 del resto de áreas del hipocampo (Cembrowski et al., 2016a,b), y aún no han sido descritos antígenos inmunoreactivos característicos de *toda* la región.

CA1 es el principal destino de la colateral de Schaffer proveniente de CA3 en SO y SR, de las proyecciones de CA2 en SO, y de las PC de ECII y ECIII a través de la vía temporoammónica. Todas estas proyecciones siguen diferentes y complejos arreglos anatómicos (figura 1.4): (i) la colateral de Schaffer (1892) es la proyección neural más estudiada hasta la fecha (Andersen et al., 2009). Es la principal fuente de excitación de CA1 y fue extensamente delineada por Amaral y colaboradores (Ishizuka et al., 1990) empleando trazadores clásicos retrógrados y anterógrados, y posteriormente revisada en un trabajo conjunto de los laboratorios de los húngaros Peter Somogy y György Buzsaki (Li et al., 1994) empleando tinciones intracelulares. El área proximal de CA3 (CA3c, contigua a DG) proyecta preferentemente a niveles septales y distales (próximos al complejo subicilar) de CA1 en el segmento superficial de SR; mientras que las PC emplazadas en la zona distal de CA3 (CA3a, fronteriza a CA2) tienden a enviar sus axones a regiones temporales y proximales de CA1 (más cercanas a CA2 y al propio CA3) sobre SO y la zona profunda de SR (Ishizuka et al., 1990)⁹. (ii) Las PC de CA2 envían sus

⁹El trabajo original de Ishizuka (1990) define CA2 según la noción clásica, contiguo a CA3 y distal a las fibras musgosas y a SLU (Lorente de Nò, 1934), e incluso ilustra algunas células presumiblemente de CA3 en su extremo más distal que bien podrían ser

terminales axónicos al SO del sector proximal de CA1, como ya mostraron los trabajos pioneros del hipocampo (Lorente de Nó, 1934; Ishizuka et al., 1990). (iii) Por último, la organización de la vía temporoammónica proveniente de EC III es fundamentalmente diferente de las aferencias desde ECII sobre CA3/2. Mientras que las últimas se extienden difusamente sobre toda la extensión de SLM de CA3/2, las proyecciones de EC sobre CA1 (Witter et al., 1988) se organizan topográficamente: las fibras originadas en MEC terminan en las porciones proximales de CA1 (cercañas a CA2), mientras que las fibras originadas en LEC proyectan sobre la región distal de CA1 (anterior al complejo subicilar), ambas formando conexiones uno-a-uno entre células (Witter et al., 1988; Andersen et al., 2009; Masurkar et al., 2017).

CA1 da lugar a dos proyecciones intrahipocampales: la primera es una proyección al adyacente complejo subicilar, y la segunda termina en las capas profundas de EC, cerrando el bucle hipocampal. En lo referente a las eferencias hacia el subículo, los axones de las PC descienden hasta el *alveus*, en el borde profundo ventricular del hipocampo, avanzan distalmente, y posteriormente retornan hacia SP del subículo de acuerdo a un arreglo topográfico: las PC proximales de CA1 envían proyecciones de gran longitud sobre la porción distal del subículo, mientras que las eferencias desde CA1 distal terminan en el contiguo borde proximal (Amaral et al., 1991). Respecto a las conexiones con EC, CA1 manda proyecciones de retorno a sus capas V y VI (Witter et al., 1988; Kloosterman et al., 2003), pobladas por distintos

adjudicadas hoy en día a CA2 (pág 591, figuras 3K y L).

tipos celulares, mayoritariamente de morfología piramidal, aunque también hay proporciones notables de células polimórficas, horizontales, etc (Hamam et al., 2002). Pese a que aún se desconoce el perfil de conectividad de CA1 con los distintos tipos celulares de EC, estas proyecciones están de nuevo topográficamente organizadas: las regiones septales y distales de CA1 envían sus aferencias mayoritariamente a LEC, mientras que CA1 temporal y proximal conectan preferentemente con MEC (Dolorfo y Amaral, 1998; Strange et al., 2014). En fuerte contraste a lo descrito para CA3, CA1 apenas presenta conexiones de asociación directas entre sus PC, pero sí envía gran número de eferencias extrahipocampales a amígdala, corteza perirrininal, septum y corteza prefrontal (Andersen et al., 2009).

Tras los trabajos pioneros de John O'Keefe y su estudiante Johnatan Dostrovsky (1971) donde fueron reportadas, de forma meramente cualitativa, células que disparaban en determinadas regiones del espacio – *place cells* –, el enfoque funcional sobre esta región se ha volcado en su capacidad de generar un mapa dinámico isomórfico al espacio externo (McNaughton et al., 2006; Moser et al., 2014). Estudios ulteriores han ampliado el contenido del mapa cognitivo hipocampal, incluyendo objetos (O'Keefe y Nadel, 1978), la dimensión temporal (O'Keefe y Nadel, 1978; Pastalkova et al., 2008; Eichenbaum, 2014) y el contexto social (Tavares et al., 2015). Los paradigmas tecnológicos y conceptuales desarrollados para el análisis de estas células favorecieron el descubrimiento de otros modos de modulación episódica en las PC de todas las regiones hipocampales – *grid cells*, *speed cells* (células de velocidad), *head direction cells* (células de direc-

ción de la cabeza), *time cells* (células moduladas regularmente durante el tiempo), etc –. Si bien, la actividad dependiente de lugar – *place cell* – está presente en otras regiones hipocampales como CA3 y DG, las células de CA1 presentan la mayor proporción de *place cells* de toda la formación hipocampal (Oliva et al., 2016b). Sorprendentemente, las *place cells* de CA1 siguen comportándose como tales cuando son desaferentadas de CA3 (Mizumori et al., 1989; Brun et al., 2002) o DG ha sido dañado (McNaughton et al., 1989), pero requieren de la proyección temporoammónica de ECIII (Brun et al., 2008). Por tanto, la *vía directa* «ECIII→CA1» es necesaria para la generación de mapas cognitivos isomórficos a la información sensorial disponible; mientras que la *vía indirecta trisináptica* «ECII→DG→CA3→CA1», que implica un importante procesado y reverberación de la información a través de los circuitos hipocampales, es esencial para el posterior recuerdo de estos mapas (Brun et al., 2002). En general, el modelo descrito recopila la visión más extendida sobre la función hipocampal (Moser et al., 2014; Buzsáki y Moser, 2013), la cual, no obstante, implica ciertas inconsistencias. Cabría considerar que la actividad dependiente de lugar que surge en las *place cells* de CA1 es posterior a la actividad en patrones repetitivos hexagonales de las células estrelladas de ECII, donde la proporción de *grid cell* es mayor (Burgalossi et al., 2011; Tang et al., 2014; Ray et al., 2014). En otras palabras, la actividad espacialmente regular de las *grid cells* generaría una *cuadrícula* del mapa espacial externo, sobre la cual las *place cell* señalarían regiones discreta. Sin embargo, tal y como fue descrito anteriormente, las ECII no resulta ser la población que proyecta directamente

desde ECII (figura 1.2, pág 6), sino que mandan sus axones a DG, comenzando la *vía indirecta trisináptica*. Necesitamos un mejor entendimiento del comportamiento de las distintas poblaciones EC, su conectividad, así como de la computación realizada en CA1, para comprender los mecanismos que explican la actividad de *grid cells* y *place cells*.

Complejo subicula. El complejo subicula se subdivide en 3 áreas: subículo, presubículo y parasubículo (Ramón y Cajal, 1893). La citoarquitectura de estas regiones ha sido estudiada en menos detalle que en las precedentes regiones hipocampales (Andersen et al., 2009). El límite CA1/ subículo está marcado por un abrupto ensanchamiento de SP, que pasa a estar poblada por grandes PC que expresan Nr4a2 (Arimatsu et al., 2003) clasificadas en dos tipos en base a sus características intrínsecas de disparo (Greene y Totterdell, 1997; Menendez de la Prida et al., 2003): *regular spiking cells* (células de disparo regular) – situadas más superficialmente y que expresan NADPH-diaphorasa/NO sintetasa – y *bursting cells* (células de disparo en ráfagas) – profundas e inmunoreactivas para somatostatina (Sst) –. Las capas SR y SLM de CA1 también terminan en este borde, y son reemplazadas por la capa molecular del subículo. La porción profunda de dicha capa molecular es una continuación de SR y recibe aferencias de CA1, mientras que la porción superficial es una continuación de SLM, y como tal, recibe aferencias de ECIII. SO no está presente en el subículo (Andersen et al., 2009). El subículo es la región de proyección más importante de la formación hipocampal (Swanson y Cowan, 1975; Kloosterman

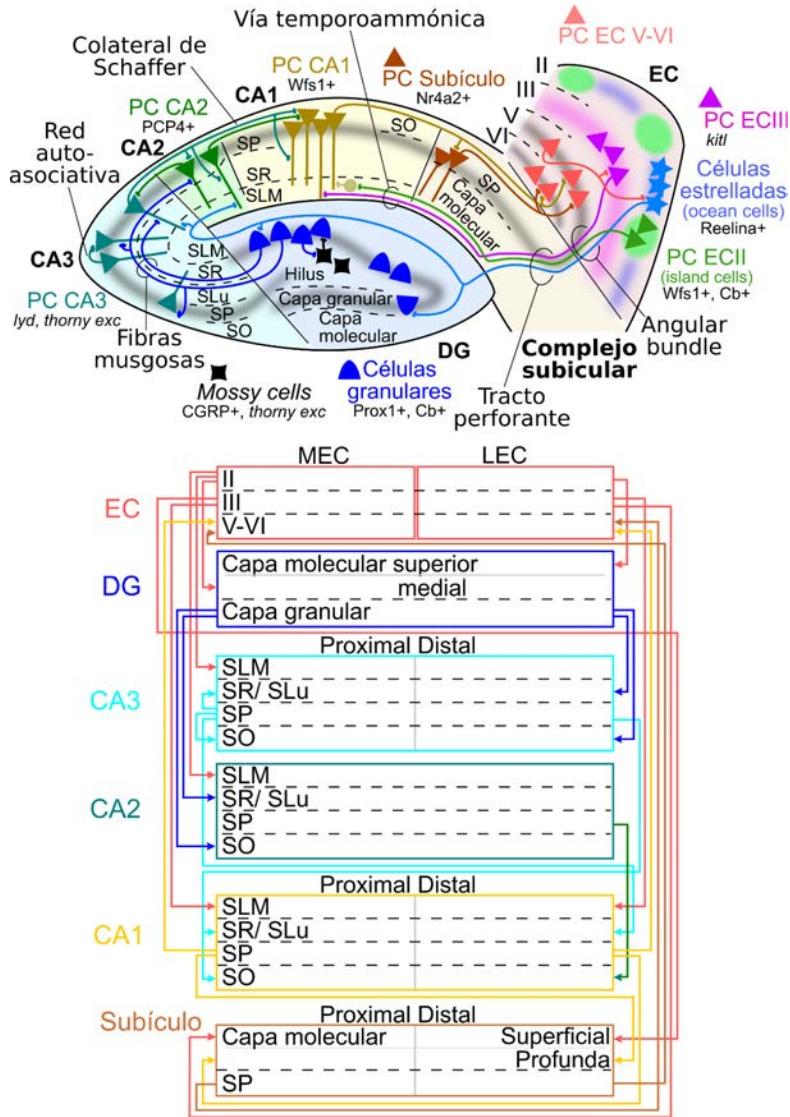


Figura 1.4: Conectoma de las células principales de la formación hipocampal. PC: célula piramidal, EC: corteza entorrinal, DG: giro dentado, *thorny exc*: *thorny excrescences*, SO: *stratum oriens*, SLu: *stratum lucidum*, SR: *stratum radiatum*, SP: *stratum pyramidale*, SLM: *stratum lacunosum-moleculare*.

et al., 2003): además de enviar sus axones al presubículo y a las capas profundas de EC, proyecta a corteza prefrontal (Verwer et al., 1997), corteza cingulada y retroesplenial (Wyss y Van Groen, 1992), al complejo amigdalino (Canteras y Swanson, 1992), los núcleos mamílares hipotalámicos y el núcleo reuniens, entre otros núcleos de la línea media talámicos (Meibach y Siegel, 1977).

La transición entre el subículo y el presubículo está definida por la irrupción de dos nuevas capas de células principales: una capa superficial conocida como capa II y una capa profunda o capa V. La continuación de SP subicular queda profunda a la capa II y pasa a denominarse capa III. Estas capas están pobladas por PC y células estrelladas que proyectan sus axones sobre MECIII, la corteza retroesplenial (Van Groen y Wyss, 1990) y los núcleos mamílares (Thompson y Robertson, 1987). El parasubículo tiene una estructura citoarquitectónica y un perfil de eferencias similares al del presubículo, pero sus proyecciones a EC terminan en ECII en lugar de MECIII (Andersen et al., 2009).

De vuelta a la corteza entorrinal. Como ha sido mencionado, CA1 y el complejo subicular envían proyecciones recíprocas mayoritariamente a las capas profundas de EC. De acuerdo a las descripciones clásicas de Lorente de Nò (1934) apuntaladas por revisiones más modernas (Hamam et al., 2002), las capas V y VI de EC están ocupadas por varios tipos de células principales: piramidales, horizontales y polimórfica, aunque se desconoce la población celular de destino de las aferencias recíprocas hipocampales. Estas células proyectan a la amígdala, el estriado e incluso pueden contribuir al tracto perforante, no obstante parte de sus axones quedan confinados

localmente y realizan sinapsis con las capas II y III de la corteza entorrinal, cerrando columnarmente el bucle hipocampal (Alexander et al., 2009).

En la figura 1.4 se han esquematizado las conexiones intrínsecas de las células principales de la formación hipocampal.

1.1.2. La adición de la inhibición

Los circuitos excitatorios son inherentemente inestables. La dinámica cerebral excitatoria está balanceada por la contribución de poblaciones especializadas inhibitorias. A medida que aumenta la demanda computacional de un circuito cerebral aumenta la especialización de sus tipos neuronales. Las regiones corticales, además de una modesta diversificación de sus células principales, han sido objeto de un asombroso proceso de especialización de su población inhibitoria local o *interneuronas*, capaces de multiplexar la actividad de las células excitatorias y que fue percibido por primera vez en el hipocampo por las escuelas húngaras de Tamás Freund, Peter Somogyi y György Buzsaki (Halasy y Somogyi, 1993; Freund y Buzsáki, 1996). La gran diversificación de las células GABAérgicas es incluso más sorprendente si se considera que representan una fracción mínima de la población total neuronal (~7-11 % de la población neuronal de CA1, Bezaire y Soltesz, 2013). Los fundamentos de conectividad extraídos de las interneuronas hipocampales parecen ser similares en la neocorteza (Markram et al., 2004). La clasificación de esta diversidad es un tema candente y de gran interés para la comunidad científica (ver DeFelipe et al., 2013¹⁰ y Jiang et al.,

¹⁰Se trata de una revisión de 42 autores, todos ellos investigadores principales de destacados labo-

2015¹¹). Actualmente está emergiendo un esquema simple basado en unos 15 subtipos celulares agrupados en tres grandes familias genéticamente definidas (Rudy et al., 2011; Harris y Shepherd, 2015): células inmunoreactivas para parvalbúmina (PV), somatostatina (Sst) o receptor de serotonina 3a (Htr3a, que incluye las células que expresan el péptido intestinal vasoactivo, VIP)¹². No obstante, en la presente tesis doctoral emplearemos el esquema propuesto en CA1 por Peter Somogyi y Thomas Klausberger (Klausberger y Somogyi, 2008; Klausberger, 2009) de amplio consenso en la formación hipocampal, y fundamentado en la expresión inmunohistológica, la conectividad y la actividad durante los ritmos cerebrales (sección 1.2).

Células PV+.

Los diferentes miembros de ratorios, en el que presentan una ‘ posible solución taxonómica para la clasificación de las interneuronas GABAérgicas’, basada en un recurso *on-line* interactivo, algoritmos de clusterización y análisis Bayesiano.

¹¹El trabajo de Jiang et al. (2015) supone probablemente el mayor esfuerzo experimental realizado hasta la fecha con el objeto de sistematizar la diversidad de interneuronas. Combinaron registros *whole-cell* óctuple de 11.000 pares de células identificadas y reconstruidas cuya variabilidad fue capturada por un modelo basado en tres grandes grupos celulares. Este estudio fue enérgicamente revisado en Barth et al. (2016) por varios de los autores de DeFelipe et al. (2013).

¹²Aunque hay cierto grado de solapamiento, estas tres familias no coinciden completamente con los tres grupos de Jiang et al. (2015). Nótese que la primera pretende ser una clasificación taxonómica real de la población de interneuronas, mientras que la segunda – basada en criterios morfológicos, conectivos y de actividad – es funcional, y por tanto, no sensible a fenómenos de convergencia evolutiva. Esto es, dos tipos de neuronas con diferente origen embrionario que se hayan adaptado a una función circuitual similar, serán consideradas similares para el modelo de Jiang et al. (2015).

esta familia inervan distintos dominios subcelulares: (i) las *células axo-axónicas* o *células candelabro* (AAx, Szentágothai, 1975) sinaptan exclusivamente con el segmento inicial del axón de las células principales; (ii) las *células cesto PV+* (*bucket cells*, en adelante PVbc; Kosaka et al., 1987) suministran inhibición al soma celular y las dendritas proximales; (iii) las *células biestratificadas* (BS, Buhl et al., 1994), que coexpresan Sst (Sst+), innervan las dendritas basales y apicales de las células piramidales en SR y SP, coalineandas con los terminales excitatorios glutamatérgicos provenientes de CA3; (iv) por último las *células oriens-lacunosum-moleculare* (OLM, (Ramón y Cajal, 1893; McBain et al., 1994), también Sst+, envían sus axones desde SO hasta SLM, donde sinaptan con el extremo distal dendrítico de las PC, proporcionando inhibición alineada con el input excitatorio de ECIII.

Células CCK+. Las *células cesto CCK+* (CCKbc) inervan el soma y las dendritas proximales de las células principales, como las PVbc. Sus terminales axónicos son inmunoreactivos para el receptor cannabinoido de tipo 1 (CB1R) (Freund et al., 2003). A su vez, se distinguen dos subtipos de CCKbc: (v) aquellas localizadas en SP que expresan el transportador vesicular de glutamato VGLUT3 (Nunzi et al., 1985), y (vi) las situadas en el borde superficial de SR, inmunoreactivas para VIP (Acsády et al., 1996). Se han reportado al menos otros tres tipos de células CCK+: (vii) las *célula asociadas a la colateral de Schaffer* (SCa), cuyo soma se encuentra en la porción superficial de SR, y que sinaptan en SR y en menor medida SO, en el dominio de excitación de los axones de CA3 (Cossart et al., 1998); (viii) las *células inervantes de la dendrita apical*, similares a las

asociadas a la colateral de Schaffer pero que preferentemente sinaptan en la dendrita apical (Klausberger et al., 2005); (ix) y las *células asociadas al tracto perforante* (PPa), del borde entre SR y SLM, y cuyos terminales axónicos solapan con las aferencias excitatorias provenientes de ECIII (Hájos y Mody, 1997). Dado que el árbol dendrítico de las células asociadas al tracto perforante puede permanecer confinado a SLM (Klausberger, 2009) y son CCK+, ésta podría tratarse de la población de interneuronas reclutada por células inhibitorias de proyección desde ECIII (Basu et al., 2016), mencionadas anteriormente (pág 6).

Interneuronas con axones

densamente empaquetados. Dos tipos de células GABAérgicas son agrupadas dentro de esta subclase, caracterizada por evocar respuestas lentas en las PC (Klausberger, 2009): (x) *células con forma de neuroglia* (*neurogliaform cells*; Khazipov et al., 1995), con el soma y las arborizaciones confinadas a SLM, y que expresan neuropéptido Y (NPY) y α -actinina; y (xi) las *células hiedra* (*ivy cells*; Fuentealba et al., 2008), paradójicamente la población más numerosa de interneuronas inhibitorias en CA1 (~37 %) y la última en ser descubierta. Su soma, inmunoreactivo para NPY y óxido nítrico sintasa (NOS), se encuentra en SP y SR, y su densa nube axónica cubre SR y SO.

Células inhibitorias de proyección. Esta familia integra al menos 5 tipos de células inhibitorias, de muchas de las cuales se desconoce el patrón de disparo *in vivo* y el perfil inmunohistológico: las (xii) *neuronas de proyección radiatum-retrohipocampales* y (xiii) *oriens-retrohipocampales* (Jinno et al., 2007), que envían gruesos axones mielini-

zados al complejo subicular y a la corteza retroesplenial; (xiv) las *células trilaminares* (Sik et al., 1995), localizadas en SO, y que sinaptan con el soma y las dendritas de las PC de CA1 y subículo; (xv) las *células de retro-proyección* (*backprojection cells*; Sik et al., 1994), con el soma Sst+ ubicado en SO, y cuyos axones principales cruzan la figura hipocampal e inervan CA3 y DG; y (xvi) las *células de proyección doble* (Alonso y Köhler, 1982; Jinno et al., 2007), las cuales proyectan extensivamente al *septum* y al subículo.

Los dominios de inervación y perfil inmunohistoquímico de las distintas poblaciones de células inhibitorias de CA1 han sido esquematizados en la figura 1.5.

1.1.3. Laminación en las PC hippocampales

El recorrido bibliográfico hipocampal se focalizó en primer lugar en el eje transversal, resultando la adopción de la nomenclatura CA3a-c–CA2–CA1a-c. No obstante la variabilidad en el eje longitudinal (esto es, dorso-ventral) ha sido extensamente reconocida (Racine et al., 1977): hipocampo dorsal y ventral exhiben diferencias conectivas y funcionales (Fanselow y Dong, 2010; Strange et al., 2014); de hecho, un reciente estudio de secuenciación de RNA reportó mayor variación de expresión génica en el eje longitudinal de CA1 que para cualquier otro eje, del orden de la observada entre las regiones CA1–CA2–CA3 (Cembrowski et al., 2016a), quizás no tan inesperado considerando que es el eje de mayor extensión. En cualquier caso, los conceptos de organización en el plano tangencial, ampliamente reconocidos en las subdivisión en áreas funcionales de la neo-

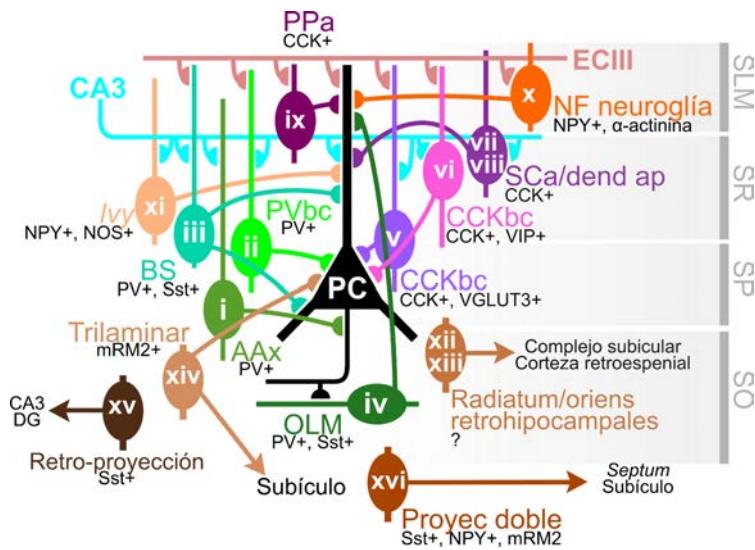


Figura 1.5: Poblaciones de células GABAérgicas de CA1. AAx: célula axoaxónica; PVbc: célula cesto PV+; BS: célula biestratificada; OLM, célula oriens-lacunosum-moleculare; CCKbc: célula cesto CCK+; SCA: célula asociada a la colateral de Schaffer; dend ap: célula asociada a la dendrita apical; PPa: célula asociada al tracto perforante; NF neuroglía: célula con forma de neuroglía; mRM2: receptor muscarínico tipo 2. Los números romanos corresponden a la enumeración del texto.

corteza, parecen ser de gran aplicabilidad al hipocampo (Slomianka et al., 2011).

A finales del siglo XIX el anatomista húngaro Károly Schaffer (1892) entendió SP como la unión de dos capas, una lámina superficial de células más pequeñas y compactas, y una capa profunda más dispersa y de células de mayor tamaño. Cuatro décadas más tarde Rafael Lorente de Nó (1934) destacaba la importancia de comprender estos dos tipos celulares por dos relevantes razones: las células profundas son menos numerosas en lo que él llamaba *mamíferos inferiores* (roedores, conejos, perros, gatos) respecto a los primates, y ambos tipos celulares presentan diferente conectividad con las interneuronas locales y con otras regiones. No obs-

tante, hasta la presente década el eje radial ha permanecido notablemente inexplorado.

Existen diferencias en el tamaño relativo y la distribución de ambas capas a lo largo de la filogenia. Especies relativamente distantes como el conejo (*Oryctolagus cuniculus*), y el conejillo de indias (*Cavia porcellus*) no parecen exhibir ningún tipo de subdivisión laminar en la capa CA1 piramidal (Geneser, 1987; Geneser-Jensen et al., 1974), todas ellas además inmuno-negativas a calbindina (Rami et al., 1987). En rata y ratón ambas subcapas son histológicamente aparentes en la mitad temporal del hipocampo (Ramón y Cajal, 1893; Slomianka et al., 2011) y pueden ser identificadas a lo largo de todo el eje longitudinal por la expresión diferencial de cal-

bindina (CB+) y Zinc (Slomianka y Geneser, 1991; Slomianka, 1992) en la lámina superficial. Una región CA1 bilaminar en mayor o menor medida ha sido descrito en ciertas especies de murciélagos (*Myotis montivagus*, *Nicterus macrotis*), algunos roedores (*Cryptomys hottentotus*), marsupiales (*Macropus parma*), perros, delfines (*Tursiops truncatus*) y primates (ver Slomianka et al., 2011 para una descripción más detallada de la laminación de CA1 a lo largo de la filogenia y la bibliografía especializada asociada). Ambos tipos celulares presentan mayor o menor desarrollo en diferentes especies no emparentadas, lo que probablemente refleja una distinta presión evolutiva respecto a sus funciones.

Las PC superficiales (PC_{Sup}) y profundas (PC_{Prof}) exhiben también distintas ventanas de desarrollo. Estudios clásicos realizados con timidina tritiada mostraron que la neurogénesis de las PC_{Prof} de CA1 es más temprana (~17-18 días gestacionales en ratas, Bayer, 1980; ~14-15 en ratón, Angevine, 1970; Cembrowski et al., 2016a que para la subcapa superficial (~18-19 días gestacionales en rata, ~16-17 en ratón), siguiendo el clásico patrón cortical de migración radial. Si bien, la variabilidad en la expresión génica entre ambas capas es modesta comparado con la descrita para el eje longitudinal (265 genes Enriquecidos diferencialmente dorso-ventralmente respecto a 71 superficial-profundos), dobla la observada en el clásico eje próximo-distal (33 genes; Cembrowski et al., 2016a¹³). Varios estudios de traza-

dores retrógrados han descrito además una diferente proporción de marcaje en PC_{Sup} o PC_{Prof}. En general, las PC_{Prof} proyectan preferentemente al núcleo accumbens (McGeorge y Faull, 1989; Okuyama et al., 2016) y la corteza prefrontal (Barbas y Blatt, 1995; Cavada et al., 2000; Lee et al., 2014), mientras que las conexiones recíprocas con EC parecen ser más abundantes en la capa superficial (Yukie, 2000; Lee et al., 2014).

En el año 2011, un estudio del laboratorio de György Buzsaki mostraría por primera vez diferencias funcionales entre ambas subcapas empleando registros extracelulares de alta densidad en CA1 (Mizuseki et al., 2011), lo que supondría un golpe de efecto para la consideración del eje superficial-profundo en la comunidad científica¹⁴. Una mayor proporción de las PC_{Prof} exhiben actividad dependiente de lugar, es decir, son *place cells*¹⁵. Unos años más tarde, varios estudios independientes pusieron en relevancia motivos circuitales específicos para las subcapas superficiales y profundos de CA1 (figura 3.13, pág 62): (i) las PVbc son reclutadas

Calb1-EGFP para las piramidales proximales de CA1 y Sim1-Cre x Ai9 para CA1 distal –, mientras que hacen uso de las ventanas de neurodesarrollo específicas para las subcapas superficial y profunda. A pesar de surgir en diferentes oleadas de neurodesarrollo, existe un notable solapamiento entre la generación de ambas poblaciones (Bayer, 1980) por lo que el análisis en este eje podría estar relativamente subestimado.

¹⁴Paradójicamente, se trata de un estudio enteramente extracelular donde no es posible validar ni calibrar el muestreo de las subcapas superficial y profunda de sus unidades.

¹⁵Cabe destacar que, al menos, un estudio previo ha reportado una respuesta diferencial de los genes de expresión temprana *c-fos* y *junB* en las PC_{Prof} tras una exposición a paradigmas de memoria contextual (Strelakova et al., 2003).

¹³Cabe mencionar que en Cembrowski et al., 2016a emplean diferente tecnología para los distintos ejes anatómicos. Emplean tres líneas de ratón para los ejes longitudinal y próximo distal – Vipr2-Cre con expresión diferencial en las PC de CA1 dorsales,

en mayor medida por las PC_{Sup} (Lee et al., 2014) y a su vez (*ii*) inhiben preferentemente a las PC_{Prof} (Lee et al., 2014; Valero et al., 2015); (*iii*) si bien CA3 proyecta por igual sobre PC_{Sup} y PC_{Prof} (Valero et al., 2015; Masurkar et al., 2017), el reclutamiento de las PVbc tanto monosinápticamente, por las fibras de CA3, como di-sinápticamente, a través de las PC_{Sup}, reduce la respuesta de las PC_{Prof} ante el *input* de CA3 (Valero et al., 2015); (*iv*) las CCKbc inervan mayoritariamente el soma de las PC_{Sup} (Valero et al., 2015); (*v*) las PC_{Prof} reciben a nivel de SLM más aferencias desde MEC, especialmente en niveles proximales; y por su parte (*vi*) LEC proyecta preferentemente sobre las PC_{Sup} en regiones distales (Masurkar et al., 2017). Ambas predicciones de Lorente de Nó (1934) – diferente función y conectividad para PC_{Sup} y PC_{Prof} – se confirmaban.

En conjunto, la conectividad preferente con MEC, que provee información espacial, explica la mayor fracción de *place cells* en la subcapa profunda (Mizuseki et al., 2011; Danielson et al., 2016; Fernández-Ruiz et al., 2017) mientras que mayor excitación neta desde CA3 en las PC_{Sup} postula un rol relevante en los procesos de memoria y consolidación para esta población (Valero et al., 2015; Danielson et al., 2016; Geiller et al., 2017). Así, las dos grandes funciones propuestas para la formación hipocampal — la representación del espacio y la memoria episódica — se reconcilan y segregan en las subcapas de CA1.

1.2. Estados hipocampales

El sistema nervioso ha adquirido a lo largo de la evolución un lenguaje electroquímico para codificar y manipular información. La mera transcripción de su funcionamiento requiere el empleo de tecnologías sensibles a procesos eléctricos y/o químicos. Hasta el advenimiento de las técnicas de imagen y los sensores codificados genéticamente, el único método disponible para monitorizar la actividad de las neuronas en cerebros funcionales era el registro de la actividad eléctrica¹⁶. En las secciones previas se ha aludido a funciones cartesianas atribuidas a las células principales de la formación hipocampal: *place cells*, *grid cells*, *speed cells*, *time cells*, etc; cabría pensar que las representaciones cerebrales se basan en una combinación independiente y dinámica de estos elementos. Según este diseño, la información en el cerebro se encuentra completamente *segregada* en estas células, y por tanto un evento episódico concreto sería una acumulación particu-

¹⁶Aún actualmente el uso de las técnicas de imagen involucra importantes limitaciones técnicas. Los más usados son los indicadores de calcio genéticamente codificados (GECI) capaces de transducir Ca²⁺ libre en fluorescencia. Los GECI se encuentran en el lumen celular, donde pueden alcanzar altas concentraciones funcionales, y además son brillantes, fotoestables, tienen un buen rango dinámico y una cinética rápida (Looger y Griesbeck, 2012). Sin embargo, la cinética del Ca²⁺ intracelular es varios órdenes de magnitud más lenta que la actividad eléctrica que la induce (Helmchen et al., 1996), limitando severamente la resolución temporal con la que los GECI pueden resolver la actividad neuronal. Por su parte, los indicadores de voltaje genéticamente codificados (GEVI) transducen los niveles de Na⁺ o K⁺, más rápidos y representativos de la actividad neuronal, pero deben estar insertados necesariamente en la membrana (Kralj et al., 2011). Por consiguiente, alcanzan relativamente bajas concentraciones en las células, lo que unido a unas subóptimas características como fluoróforos (ver Yang y St-Pierre, 2016 para una revisión del estado de desarrollo y perspectivas de los GEVI) restringen, en su actual estado de desarrollo, su uso *in vivo*.

lar de sus elementos constituyentes en una imagen (Craik, 1967). Un diseño de estas características es finito y difícilmente plástico. Un punto de vista alternativo sería asumir que los sistemas cerebrales están organizados según principios holísticos, codificando la información de una forma *distribuida*. La representación cerebral de cualquier elemento del mundo real supondría una combinación no lineal de toda la población neuronal, esto es, una oleada de actividad. Un cerebro en tal régimen caótico tendría una capacidad de almacenamiento mucho mayor y sería altamente plástico, así como más ruidoso e impredecible.

La formación hipocampal – y los circuitos cerebrales en general – probablemente emplean una estrategia combinada: existen amplias evidencias de que las *place cell* representa localizaciones específicas del ambiente – codificación segregada –, pero parte de la representación del espacio involucra también la sincronización de los disparos de las célula con la actividad del resto de la población neuronal – codificación distribuida – que se traduce, en suma, en oleadas *informativas* de actividad. Por tanto, decodificar íntegramente la información que porta una célula requiere monitorizar la actividad de todo el circuito en el que está insertada, tarea imposible con las técnicas de que disponemos actualmente. Ahora bien, las oleadas de actividad celular pueden reflejarse en el medio extracelular como variaciones locales de voltaje, conocidas como potencial de campo local (LFP). El estudio de la relación temporal entre la actividad de células individuales y el LFP ha resultado ser un valioso recurso para comprender las estrategias de codificación que emplea el cerebro (O'keefe y Recce, 1993; Skaggs y McNaughton, 1996; Buzsáki,

2002).

El LFP tiene su origen en las corrientes de las membranas celulares fluyendo a través del tejido entre un electrodo de registro y un electrodo de referencia. En consecuencia, el LFP es la superposición lineal de todos los procesos iónicos de una región tisular determinada: actividad sináptica (Trevelyan, 2009), potenciales de acción (Schomburg et al., 2012), espigas de calcio (Wong et al., 1979), corrientes intrínsecas (Llinás, 1988), etc (ver Buzsáki et al., 2012 para una revisión del origen del LFP). Las características del LFP dependen de la contribución temporal de dichos procesos iónicos, la localización de los electrodos de registro y la geometría del tejido cerebral. Si bien, todos los tipos celulares contribuyen teóricamente al LFP, su peso relativo depende notablemente de la arquitectura celular (Buzsáki et al., 2012). Las PC son las células más numerosas del cerebro, y presentan una gruesa y extensa dendrita apical. Gracias a su morfología alargada, al ser excitadas en su dendrita apical el flujo de corriente hacia el interior celular inducirá una corriente de retorno, pasiva, alrededor del soma. La deslocalización de ambas corrientes – sumidero activo dendrítico y fuente de retorno a nivel somático — genera un dipolo eléctrico, y por ende, un flujo iónico en el medio extracelular entre ambos polos, que puede ser captado por un electrodo. Neuronas con morfologías esféricas, como ciertos tipos de interneuronas, inducen sumideros y fuentes de corriente con un alto grado de solapamiento espacial, que se cancelan entre sí, por lo que su contribución al LFP es menor. Nótese que la estructura laminada del hipocampo orienta las dendritas de todas las células piramidales apiladas en SR y SO, mientras sus so-

mas se encuentran altamente compactados en SP. Los dipolos de las PC individuales se suman espacial y temporalmente, generando grandes corrientes extracelulares. Por tanto, el LFP de la formación hipocampal es una buena medida de su actividad global, e incluso de la computación que realiza (Agarwal et al., 2014; Taxidis et al., 2015).

Un potente abordaje para el estudio de las funciones de los circuitos cerebrales es relacionar su actividad eléctrica – LFP y/o actividad de sus células – con determinados aspectos de la conducta o la cognición inferida (Andersen et al., 2009). En los años 60 Case Vanderwolf instaló electrodos de acero en el hipocampo de varias ratas, registró su actividad durante un amplio espectro de conductas y observó una clara asociación entre las señales eléctricas cerebrales y los comportamientos desplegados por los animales (Vanderwolf, 1969). Vanderwolf categorizó los perfiles eléctricos registrados en tres estados: actividad altamente oscilatoria *theta*, actividad irregular de alta amplitud (LIA) y actividad irregular de baja amplitud (SIA). *Theta* emerge en el hipocampo durante la locomoción y el sueño de movimientos oculares rápidos (REM). LIA aparece en el hipocampo en períodos de inmovilidad y durante el sueño de ondas lentas, mientras que SIA es característico de fases de transición entre *theta* y LIA, y ha sido considerablemente menos explorado (pero ver Hulse et al., 2017). A continuación se describirán las teorías más extendidas sobre la generación de los estados *theta* y LIA y sus funciones.

1.2.1. *Theta*

El estado oscilatorio hipocampal está dominado por la banda espectral *theta* (6-12 Hz) que le da nombre (Jung y Kornmüller, 1938). *Theta* es el ritmo cerebral más estudiado (Andersen et al., 2009), es considerado el estado *on-line* del hipocampo, una actividad altamente rítmica que actúa como mecanismo sincronizador global, imponiendo un reloj general para el procesamiento en todas las regiones hipocampales (Buzsáki, 2002; Hasselmo, 2005). El ritmo *theta* parece coordinar los procesos de codificación y recuperación de la información episódica (Hasselmo, 2005; O'Keefe y Burgess, 2005; Jensen y Lisman, 2005). Los modelos actuales para la generación del ritmo *theta* incluyen una combinación de generadores extra- e intra-hipocampales. Entre los generadores extrahipocampales, clásicamente el más reconocido ha sido el *septum medial/banda diagonal de Broca* (MS-DBB) (Petsche et al., 1962; Stewart y Fox, 1990). MS-DBB inhibe fácticamente gran parte de los tipos reconocidos de interneuronas del hipocampo y EC (Unal et al., 2015), desinhibiendo rítmicamente las células principales, así como aferencias colinérgicas que proveen despolarización lenta a PVbc, CCKbc y PC (Buzsáki, 2002). Un reciente estudio ha reportado que, además, las aferencias glutamatérgicas del MS-DBB juegan un papel crucial para la transición y el mantenimiento de *theta* (Fuhrmann et al., 2015). Estas aferencias excitatorias septales sinaptan con interneuronas de tipo OLM (Klausberger y Somogyi, 2008), que a su vez inhiben rítmicamente a interneuronas asociadas a la collateral de Schaffer y células biestratificadas (Leão et al., 2012). Entre los generadores in-

trahipocampales, el más considerado clásicamente ha sido EC debido a que las oscilaciones theta exhiben su máxima amplitud alrededor de la fisura hipocampal (Mitchell y Ranck, 1980; Buzsáki, 2002). En conjunto, dos sumideros de corriente aparecen en cada ciclo *theta* debidos a EC, uno en la capa molecular de DG, y el otro en SLM, completamente en anti-fase (180°) entre sí, y reflejando las aferencias de las células estrelladas de ECII y las PC de ECIII respectivamente (Buzsaki et al., 1983; Brankack et al., 1993). El hecho de que ambos sumideros se encuentren en anti-fase evidencia el disparo igualmente en anti-fase de las células principales de ECII y ECIII (Montgomery et al., 2009), y define un excelente ejemplo de la capacidad del ritmo *theta* para segregar espacial y temporalmente la computación de los circuitos hipocampales. El sumidero de SLM coincide con una fuente de corriente en SP compuesta tanto de componentes pasivos – la corriente de retorno provocada por la excitación – y activos – inhibición perisomática¹⁷ –, generando la conocida inversión de fase de *theta* a nivel de SP (Brankack et al., 1993).

Hasta principios del XXI el modelo más extendido para la generación de las oscilaciones theta implicaba la interacción rítmica del generador *septal* y entorinal (Buzsáki, 2002), pero adolecía de varias inconsistencias. La más grave de estas paradojas es

¹⁷Por conveniencia, la perdida de iones de carga positiva se considera un sumidero de carga, mientras que la pérdida de iones de carga negativa es una fuente, al igual que en los circuitos eléctricos. Por contra, la salida local de cationes es una fuente, y de aniones, un sumidero. Nótese que el análisis de sumideros y fuentes de corriente es ambiguo al signo y al sentido de los iones, o a si su flujo es activo o pasivo, únicamente mide la dinámica temporal de las cargas.

que la probabilidad de disparo de las PC del hipocampo es mínima cuando el sumidero de corriente de SLM es máximo (Kamondi et al., 1998; Csicsvari et al., 2000; Buzsáki, 2002). En otras palabras, las células piramidales del hipocampo no disparan cuando sus dendritas apicales están sufriendo el mayor flujo de corriente despolarizante. De hecho, prácticamente todas las regiones de la formación hipocampal están *theta*-moduladas (Bland et al., 1975; Fox et al., 1986), pero los retrasos temporales entre sus picos de actividad no se corresponden con el esperado para velocidad de conducción axónica, la constante de tiempo sináptica y la iniciación de los potenciales de acción (Mizuseki et al., 2009). Para ilustrar esta paradoja, asumamos un retraso entre el disparo de dos neuronas conectadas lento, de 5 ms (Wayner y Emmers, 1958); la trayectoria sináptica más larga en la formación hipocampal incluye 5 sinapsis (EC→DG→CA3→CA1→Subículo→EC), lo que corresponde a un lapso total de 25 ms, que contrasta con el periodo de *theta*, de entre 100–150 ms.

Estas paradojas se resuelven si consideramos a los generadores locales: *theta* no es una avalancha de excitación que se propaga, sino un régimen de actividad que se va evocando secuencialmente en los circuitos hipocampales, y cuya duración completa es, precisamente, un ciclo *theta*. Tal régimen de actividad supone el reclutamiento ordenado de distintos tipos celulares, cuyas corrientes pueden ser responsables de otros ritmos más rápidos embebidos sobre las oscilaciones *theta*, más lentas. De esta manera, concurrentemente a *theta* es posible registrar en CA1 otras oscilaciones de mayor frecuencia como (i) *gamma* rápido (60-120 Hz), en el pico de

theta en SP, e inducido por ECIII en SLM; (ii) *gamma* lento (30-80 Hz), en la fase descendente de *theta*, asociado a la colateral de Schaffer de CA3; y (iii) *gamma* ultra-rápido (>100 Hz), que refleja los potenciales de acción locales (Colgin et al., 2009; Schomburg et al., 2014). En la misma línea de razonamiento, los disparos preferentes de los distintas tipos celulares *theta*-modulados se reparten a lo largo del ciclo de *theta*. Consideremos la secuencia de eventos de un ciclo *theta* en CA1 (figura 1.6): las CCKbc disparan en la fase ascendente y el pico del *theta* en SP, en coincidencia con la activación de las PC de ECIII y por tanto su sumidero de corriente en SLM. Posteriormente disparan las PC de CA3, que generan un sumidero en SR, y las AAx. En la fase descendente de *theta* se activan las PVbc. En el valle de *theta* confluye la actividad de varios tipos celulares: PC de CA1, OLM, BS y células *ivy*. Simultáneamente, son activadas las células estrelladas de ECII, que provocan un sumidero de corriente en la capa molecular de DG. Finalmente en la fase ascendente de *theta* son reclutadas las SCa y las PPa (Klausberger y Somogyi, 2008; Klausberger, 2009; Mizuseki et al., 2009). La irrupción de la bi-lamiradidad de CA1 extendió este esquema: durante el *theta* REM (y en menor medida durante la locomoción, Schomburg et al., 2014), el grueso de PC superficiales dispara en el valle de *theta*, tal y como ha sido descrito anteriormente, mientras que las PC profundas se activan preferente en el pico (Mizuseki et al., 2011), empujadas por el sumidero de corriente en SLM y resolviendo su aparente paradoja¹⁸.

¹⁸PC superficiales y profundas también guardan diferente relación de fase respecto a los ciclos *gamma*: las PC superficiales disparan preferentemente en los

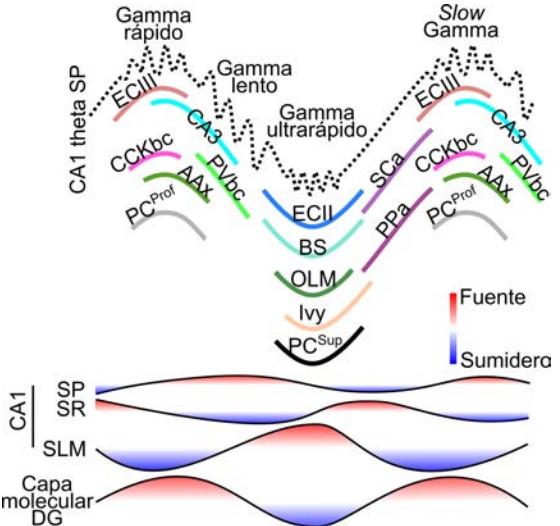


Figura 1.6: Secuencia de eventos de un ciclo *theta* en la formación hipocampal. Nótese la correspondencia temporal entre ECIII, el sumidero que induce en SLM, y el *gamma* lento que induce. *Idem* para CA3, el sumidero en SR y el *gamma* rápido. *Idem* para ECII y el sumidero en la capa molecular de DG. El *gamma* ultra rápido tiene origen en las corrientes producidas por los disparos de las PC.

Durante los periodos de locomoción, las aferencias desde ECIII organizadas en ciclos *theta* son necesarias para la emergencia de la actividad dependiente de lugar de las *place cell* en CA1 (Brun et al., 2008). El ritmo *theta* provee un sistema periódico para sincronizar la actividad hipocampal (Buzsáki, 2002), pero la relación de fase entre los disparos de las células individuales y el *theta* circundante no es constante, sino que puede variar entre ciclos consecutivos. A medi-

valles y las profundas se activan en la fase ascendente (Senior et al., 2008; Mizuseki et al., 2011; Schomburg et al., 2014).

da que un animal se desplaza a través del *place field* (campo de lugar) de una PC, sus potenciales de acciónemergerán en fases anteriores de *theta*, fenómeno denominado precesión de fase (O'keefe y Recce, 1993; Skaggs y McNaughton, 1996). En consecuencia, no solo la razón de disparo de las células hipocampales es informativa para el circuito — código de ratio, esto es, *cuanto* dispara las células —, sino que su instante exacto de disparo respecto a los ciclos theta también implica información espacial — código temporal, *cuando* dispara una PC respecto a otras PC — (Jensen y Lisman, 2005; Wilson y McNaughton, 1994).

1.2.2. LIA y SPW-r

El estado LIA es notablemente más aleatorio que *theta* (Vanderwolf, 1969), sin ninguna banda de frecuencia prominente en un espectro dominado por la relación $1/f^\alpha$ (donde f es la frecuencia, y el valor de α es ~ 2 , si bien varía según la banda de frecuencia considerada Buzsáki y Draguhn, 2004). A pesar de su aspecto irregular, en LIA emerge el patrón de actividad más sincronizado del cerebro mamífero, los complejos *sharp wave-ripple* (SPW-r, Jouvet et al., 1959; Vanderwolf, 1969; Buzsaki et al., 1983; Suzuki y Smith, 1987; ver Buzsáki, 2015 para una extensa revisión sobre los SPW-r), compuestos por un gran deflexión negativa (1-3 mV, 40-100 ms) en SR conocida como *sharp wave* (SPW) y un evento oscilatorio de alta frecuencia (110-200 Hz) en SP denominado *ripple* (O'Keefe, 1976; Suzuki y Smith, 1987). Los SPW-r son eventos transitorios (50-70 ms) cuyo principal generador excitatorio es la red asociativa de CA3 (Buzsaki et al., 1983; Sullivan et al., 2011; pero ver

Oliva et al., 2016a para la implicación de CA2), cuya activación induce un gran sumidero de corriente sobre las dendritas apicales de las PC de CA1 en SR capaz de reclutar alrededor del 10 % de la población de CA1 (Buzsáki, 2015). Dicho sumidero, localizado por tanto en SR, se refleja en el LFP como la SPW, y se encuentra necesariamente acoplado a una fuente de corriente pasiva en SP (Buzsáki et al., 1983; Suzuki y Smith, 1987). La red axónica recurrente de CA3 es un sistema óptimo para la generación de eventos poblacionales (Traub et al., 1989): la excitación discurre en oleadas, reclutando sucesivamente más-y-más elementos neuronales, y pasado determinado umbral genera una salida masiva, responsable de la SPW en CA1. En condiciones basales, la propagación de la excitación en CA3 se encuentra restringida mediante diferentes mecanismos: el control de la liberación de glutamato por los receptores muscarínicos de acetilcolina activados por células colinérgicas del MS-DBB (Hasselmo y Giocomo, 2006; Vandecasteele et al., 2014) y los CB1R (Robbe et al., 2006)¹⁹. En periodos de inmovilidad y durante el sueño de ondas lentas los niveles de estos neuromoduladores disminuyen, y el sistema asociativo excitatorio de CA3 es *liberado* (Buzsáki, 2015). Cabe destacar que la inhibición juega, también, un papel esencial en la generación de SPW y el control de la excitación en CA3. Tim Viney y colaboradores (2013) identificaron una subpoblación de células GABAérgicas *septales* que proyectan selectivamente sobre interneuronas AAx de CA3, e incrementan su actividad durante los SPW-r, des-inhibiendo por tanto las PC

¹⁹En consonancia con los efectos amnésicos de los cannabinoides (Elphick y Egertová, 2001).

locales.

La avalancha excitatoria – esto es, la SPW – sobre CA1 se disipa en SP como un evento oscilatorio – el *ripple* – de alrededor de 150 Hz, la frecuencia de resonancia del circuito. Se han propuesto varios modelos que explican la generación de los *ripples*, si bien todos ellos convergen en el papel esencial de las PVbc (Buzsáki et al., 1992; Ylinen et al., 1995; Draguhn et al., 1998; Stark et al., 2014). Las PVbc son reclutadas tanto directamente por CA3 como por las PC de CA1, y por tanto proveen inhibición *feed-forward* y *feed-back*, respectivamente, sobre la región perisomática de las PC. La rápida apertura de canales GABA_A somáticos evoca la entrada de Cl⁻, y por ende, una fuente de corriente activa en SP. Aarne Ylinen y colaboradores (Ylinen et al., 1995) mostraron, mediante registros simultáneos intra- y extracelulares en ratas anestesiadas, que los disparos de las PVbc están sincronizados con la fase ascendente de las deflexiones positivas de los *ripples* en SP, y sugirieron que dichas deflexiones son *potenciales post-sinápticos inhibitorios* (IPSP) poblacionales. De esta manera, su constante temporal de reclutamiento (Ylinen et al., 1995; Klausberger et al., 2003), sus propiedades de resonancia (Tikidji-Hamburyan et al., 2015) y sus conexiones recíprocas (Cobb et al., 1997) sincronizan toda la población de PVbc de CA1 disparando a alta frecuencia durante los SPW-r. Es más, considerando su extensa matriz axónica sobre SP (Kosaka et al., 1987), la activación rítmica de las PVbc suministra inhibición coordinada a todas las PC de CA1.

En conjunto, durante los SPW-r la inhibición rítmica que inunda el soma de las células principales compite con la excitación proveniente de las dendritas. Entre dos IPSPs

sucesivos se genera una ventana de oportunidad de alrededor de 5 ms en la cual la excitación dendrítica puede anegar la región somática, y alcanzar eventualmente el umbral de disparo (Buzsáki, 2015). Los potenciales de acción de las PC estarán por tanto altamente sincronizados en los valles de los *ripples*, y sus flujos de corriente asociados – debido a la entrada de Na⁺ por los canales dependientes de voltaje – genera sumideros o espigas poblacionales en SP. En conjunto, el trazo oscilatorio del *ripple* refleja una sucesión de IPSPs – en sus deflexiones positivas – y espigas poblacionales – en sus deflexiones negativas – de las PC de CA1.

Los diferentes modelos para la generación de los SPW-r extienden, de distintas formas, el esquema propuesto. Por ejemplo, algunos autores revindican la importancia de las sinapsis eléctricas entre las PC para su sincronización durante las espigas poblacionales (Draguhn et al., 1998; Traub y Bibbig, 2000). Otros autores aducen no hallar ningún potencial de acción antidirómicamente generado (mediado por sinapsis eléctrica), mientras que enfatizan el papel del reclutamiento *feed-forward* y *feed-back* de las PVbc (Buzsáki et al., 1992; Ylinen et al., 1995; Brunel y Wang, 2003; Klausberger et al., 2003), la inhibición recíproca entre interneuronas (Whittington et al., 1995; Rácz et al., 2009; Taxidis et al., 2012) o la combinación de ambas (Stark et al., 2014; Buzsáki, 2015). Un estudio reciente, obtenido mediante registros intracelulares en animales no anestesiados, describe un carácter oscilatorio para la excitación proveniente de CA3 (Hulse et al., 2016), y propone que los *ripples* son generados por la interacción de un oscilador excitatorio y otro inhibitorio sobre el eje somato-dendrítico de las PC. Por con-

tra, otro estudio independiente, empleando la misma técnica (y publicado en la misma revista científica), resalta el papel exclusivo de la inhibición rítmica (Gan et al., 2017).

Probablemente los SPW-r reflejen, en realidad, una combinación compleja de todos estos elementos. Sí existe consenso sobre la importancia de la contribución de otras interneuronas, clásicamente menos consideradas. Las células biestratificadas (BS) disparan a alta frecuencia durante la fase ascendente de los *ripples* (Klausberger et al., 2004), al igual que las PVbc, y dada su inervación sobre las dendritas apicales de las PC, serían capaces de regular el acceso de la excitación hacia el soma. Los primeros experimentos que analizaron la contribución de las células OLM, en ratas anestesiadas, reportaron una reducción de su tasa de disparo durante los SPW-r (Klausberger et al., 2003; Klausberger y Somogyi, 2008). Estudios más modernos, obtenidos en ausencia de anestesia, han descrito cierto aumento de su actividad (Varga et al., 2012b). Al parecer las OLM exhiben modos de disparo diferentes en inmovilidad y sueño de ondas lentas (Katona et al., 2014), lo cual podría explicar estos resultados contradictorios. Otros tipos de interneuronas parecen permanecer relativamente impasibles ante los SPW-r, a pesar incluso de recibir aferencias de CA3, como las CCKbc (Klausberger et al., 2005; Lasztóczki et al., 2011) y las células *ivy* (Fuentelba et al., 2008; Lapray et al., 2012). No está claro porque estos tipos celulares no responden, de una u otra forma, a un evento tan enérgico de su circuito circundante. Tras el *ripple* (unos 60 ms), el complejo SPW-r concluye con una hiperpolarización visible en el LFP, que impone un corto periodo refractario (Buzsáki, 2015). Dicha hiperpolarización

post-SPW-r revierte a ~ -80 mV, sugiriendo la implicación de corrientes activas, posiblemente de K^+ vía receptores de GABA_B (English et al., 2014).

En cualquier caso, la particularidad más sorprendente de los SPW-r es su contenido de potenciales de acción. En 1994 Matthew Wilson y Bruce MacNaughton observaron que *place cells* moduladas por regiones espaciales solapantes durante un periodo exploratorio, eran co-reclutadas en los mismos SPW-r del posterior sueño de ondas lentas, en contraste con lo ocurrido durante el sueño previo a la exploración (Wilson y McNaughton, 1994). Dos años después, un estudio del mismo laboratorio mostró que la reactivación de *place cells* durante los SPW-r conserva incluso la misma estructura temporal del periodo exploratorio (Skaggs y McNaughton, 1996). Dicho de otro modo, los SPW-r evocaban secuencias de *place cells* con significado. Dado que las *place cells* codifican regiones específicas, cualquier trayectoria en el espacio puede ser codificado por una sucesión de estas células. Tales sucesiones emergen activamente durante la exploración, organizadas por las oscilaciones *theta*, y *comprimidas* temporalmente por el fenómeno de precesión de fase en «secuencias neuronales». Así, durante el ritmo *theta*, y mediante procesos *hebbianos*, se fortalecen las conexiones sinápticas de las PC reclutadas concurrentemente, esculpiéndose tales secuencias neuronales. Más tarde, el hipocampo evoca trayectorias pasadas en forma de sus secuencias neuronales durante los SPW-r. Considerando las regiones eferentes de estas células (ver pág 10), este insólito fenómeno condujo a la hipótesis de que los SPW-r recapitulan secuencias neuronales comprimidas y las transferían a la neocorteza, para su almacenamiento.

miento a largo plazo (Wilson y McNaughton, 1994; Skaggs y McNaughton, 1996; Lee y Wilson, 2002). Este esquema había sido conceptualmente delineado por György Buzsáki en 1989, basándose en la semejanza entre la frecuencia de los SPW-r y los protocolos de LTP y la matriz de conexiones descrita entonces para la formación hipocampal, en lo que denominó ‘modelo de dos etapas para la formación de las trazas de memoria’ (Buzsáki, 1989, 2015). Los SPW-r se convertían en el engranaje fisiológico de la consolidación de la memoria. Nuevas observaciones en modelos computacionales, roedores, primates y pacientes, han expandido la función cognitiva de los SPW-r en las últimas dos décadas (Axmacher et al., 2008; Jahnke et al., 2015; Gupta et al., 2010). Además de un papel pasiva sobre las secuencias neuronales pasadas, se ha descrito la capacidad del hipocampo para combinar y explorar nuevas trayectorias durante los SPW-r (Gupta et al., 2010), e incluso planificar rutas (Pfeiffer y Foster, 2013, 2015), mientras que sofisticados estudios empleando *close-loop* han descrito alteraciones mnésicas tras la disrupción selectiva de estos eventos (Girardeau et al., 2009; Jadhav et al., 2012; van de Ven et al., 2016, pero ver Kovács et al., 2016).

1.3. El hipocampo epiléptico

La epilepsia es una de las enfermedades neurológicas más comunes, con una prevalencia del 3 % sobre la población mundial (Chang y Lowenstein, 2003). Abarca un amplio conjunto de síndromes cuya característica común es la predisposición a presentar convulsiones (International League Against

Epilepsy, 1981), esto es, episodios de hiper-sincronización de los circuitos cerebrales. Una plétora de mecanismos sinápticos y no-sinápticos pueden subyacer a tal fenómeno: excitación exacerbada, disfunción inhibitoria, interacciones efápticas²⁰, acoplamiento eléctrico entre neuronas y difusión de iones y neuromoduladores (Dichter y Ayala, 1987; Buzsáki et al., 1991). Varios de estos mecanismos han sido extensivamente estudiados en modelos experimentales y/o considerados en los abordajes clínicos. Cualquier cerebro es capaz de sufrir un episodio epiléptico, si en un momento dado su excitación escapa a los mecanismos de control, pero esto no implica *per se* el diagnóstico de un síndrome epiléptico. La condición epiléptica ocurre cuando uno o varios de los factores antes mencionados sitúan al sistema cerebral cerebrales en una nueva «solución» o «estado de equilibrio», más propensa a desencadenar convulsiones. Los circuitos *epileptogénicos* son, evidentemente, los mismos que producen la rica colección de oscilaciones fisiológicas. Por tanto, es esperable que la transformación de *cerebro normal* a *cerebro epiléptico* impacte transversalmente en todos sus ritmos. Así, la epilepsia del lóbulo temporal (TLE) cursa con alteraciones en las oscilaciones *theta* (Inostroza et al., 2013; Laurent et al., 2015), *gamma* (Lopez-Pigozzi et al., 2016) y los *ripples* (Bragin et al., 1999), aún en periodos inter-ictales, es decir, en ausencia

²⁰Dado que las neuronas están bañadas por un medio conductivo, los flujos de corrientes extracelulares inducidos por su propia actividad tienen un efecto emergente: alteran la relación de carga entre el interior y el exterior de la membrana, imponiendo una no-linealidad en la definición simplista de potencial eléctrico. Se estima que los campos extracelulares generan respuestas de ~0.5 mV (Anastassiou et al., 2011).

de ataques epilépticos. Cabe esperar que estas modificaciones en los ritmos cerebrales sean concurrentes al deterioro de sus funciones, lo que explica el amplio espectro de comorbilidades cognitivas de la epilepsia, principalmente en lo que respecta a la memoria (Holmes y Lenck-Santini, 2006; Inostroza et al., 2013).

La formación hipocampal es la estructura cerebral más epileptogénica (Buzsáki, 2015), lo cual puede ser explicado atendiendo a sus idiosincrasias. En primer lugar, su esquema de conexiones presenta una (*i*) notable ausencia de «reciprocidad». La reciprocidad es un principio básico del la organización del sistema nervioso (Harris y Shepherd, 2015). Si una región *X* envía proyecciones a *Y*, *Y* envía eferencias *X*, controlando la actividad que recibe. A grandes rasgos, no es éste el caso del tracto perforante desde ECII al DG, ni de DG a CA3, ni de CA3 a CA1, ni de CA2 a CA1, ni de CA1 al subículo (ver sección 1.1). Toda la circuitería hipocampal puede ser contemplada como una secuencia unidireccional de vías excitatorias (Ramón y Cajal, 1893; Andersen et al., 2009), un diseño particularmente sensible a incrementos circunstanciales de excitación. En segundo lugar, (*ii*) el hipocampo presenta la mayor red auto-asociativa del cerebro, el plexo axónico de CA3 (ver sección 1.1, pág 8; (Witter, 2007)), conceptualmente una verdadera *bomba de relojería* en términos de hiper-sincronización neuronal²¹. En un sistema de estas características, los incrementos coyunturales de excitación pueden aumentar supra-linealmente,

²¹Nótese que, además, la ingente red autoasociativa de CA3 es inmediatamente posterior al mayor paso convergente de la circuitería hipocampal, DG→CA3.

escapando rápidamente a los mecanismos de control. Por último, (*iii*) la situación de CA1 como uno de los *hub* hipocampales más importantes (Andersen et al., 2009) le atribuye gran vulnerabilidad ante fenómenos de hiper-sincronización. CA1 es el destino de la red auto-asociativa de CA3, es la primera región que cierra el bucle hipocampal gracias a la proyección a EC²² y proyecta a múltiples regiones extra-hipocampales.

1.3.1. Oscilaciones de alta frecuencia en el hipocampo epiléptico

Las tres características que explican la vulnerabilidad de la formación hipocampal a la epilepsia – a saber, escasa reciprocidad, la red auto-asociativa de CA3 y la situación de CA1 como eje hipocampal – despliegan su máxima expresión durante los SPW-r. Los SPW-r son un evento crítico del cerebro; con el objeto de inducir plasticidad a largo plazo el sistema es forzado al máximo. De este modo, las sutiles alteraciones que conlleva la condición epiléptica, son capaces de transformar los SPW-r en eventos patológicos. El incremento de sincronización durante la SPW en SR se puede manifestar como puntas epilépticas (Buzsáki et al., 1991; Buzsáki, 2015), mientras que los *ripples* en SP se distorsionan en forma de oscilaciones de alta frecuencia (HFO) patológicas conocidas como *fast ripples* (*ripples* rápidos; Bragin et al., 1999; Foffani et al., 2007; Ibarz

²²Curiosamente, CA1 es también la primera región del bucle hipocampal que tiene conexiones recíprocas con EC debido a la vía temporoammónica. Es tentativo pensar que tal configuración es un conato del diseño cerebral para mantener las fugas de excitación contenidas entre DG y CA3: un *cortafuegos* neuronal.

et al., 2010; Menendez de la Prida et al., 2015). Los *fast ripples*, registrados en el LFP de SP, tanto en modelos experimentales de TLE como en pacientes (Ben-Ari et al., 1980; Bragin et al., 1999) deben su nombre a sus similitudes con los *ripples* fisiológicos, pero su potencia espectral se extiende a bandas de mayor frecuencia (250-800 Hz; Bragin et al., 1999; Menendez de la Prida et al., 2015).

Existe un amplio consenso acerca de que los *fast ripples* reflejan mayor reclutamiento celular, principalmente desde CA3 y, en menor medida, EC (Jefferys et al., 2012), aunque los mecanismos subyacentes son en gran medida desconocidos. Si bien, la emergencia de *fast ripples* suele ir acompañada de modificaciones de la conectividad anatómica (Foffani et al., 2007; Jefferys et al., 2012), es posible generar estos eventos mediante manipulaciones de las propiedades intrínsecas de los circuitos (Dzhala y Staley, 2004; Aivar et al., 2014). En 2014, Aivar y colaboradores (2014) demostraron que las mismas rodajas de hipocampo podían provocar *ripples* fisiológicos o *fast ripples*, y que tal fenómeno podía ser controlado modificando la concentración de Ca^{2+} extracelular de 3 mM a 1 mM, respectivamente, que a su vez controla el ratio de liberación GABA/glutamato. Concluyeron que a la aparición de *fast ripples* subyace un incremento en la excitabilidad intrínseca, que provoca la disminución de la inhibición disináptica, por tanto una combinación de factores intrínsecos y circuitales. Los *fast ripples* pueden ser contemplados como una solución degenerada del hipocampo a los *ripples*, cualquiera que sea las causas que las inducen (Foffani et al., 2007; Buzsáki, 2015).

En los últimos años, la comprensión de la comunidad científica sobre los *fast ripples*

ha lidiado con varias inconsistencias. Entre ellas, cabe destacar que los *fast ripples* presentan contenido espectral por encima de la frecuencia máxima a la que disparan las PC (~ 300 Hz) (Bragin et al., 1999). La explicación de este fenómeno radica en que los *fast ripples* parecen ser generados por subpoblaciones de PC disparando fuera de fase entre sí, más que por la mera hiper-sincronización de toda la población hipocampal (Foffani et al., 2007; Ibarz et al., 2010). En otras palabras, durante los *fast ripples* las PC forman subgrupos, cada uno de los cuales produce un *pseudo-ripple*, sin componentes espectrales de alta frecuencia. La superposición en el LFP de estos eventos parciales es el *fast ripple*. De este modo, adicionalmente a su contenido en altas frecuencias, la entropía, como medida de la desorganización espectral, es un valioso parámetro para caracterizar los *fast ripples* (Ibarz et al., 2010).

No obstante, distinguir en términos clínicos una HFO fisiológica de una patológica es una tarea compleja (Menendez de la Prida et al., 2015). Ambos eventos suelen presentar los mismos máximos espectrales (Aivar et al., 2014), con un alto grado de variabilidad interna. Los *fast ripples* son patológicos por definición, pero no todas las HFO son *fast ripples* (Menendez de la Prida et al., 2015). Cualquier abordaje dirigido a esclarecer las diferencias entre ambos eventos tiene una gran relevancia clínica, dado que los *fast ripples* son específicamente generados por las regiones epileptogénicas (Engel Jr et al., 2009). En pacientes con convulsiones resistentes a fármacos, la resección quirúrgica de los núcleos epileptogénicos es actualmente el único tratamiento posible (Staba et al., 2004; Engel Jr et al., 2009). De hecho, estas operaciones son la prueba más feha-

ciente de que los *fast ripples* están asociados a los procesos epileptogénicos, en tanto en cuanto la eliminación satisfactoria del tejido que los induce elimina la condición epiléptica (Wu et al., 2010; Jacobs et al., 2012).

1.3.2. *Fast ripples* y deterioro cognitivo

Una de las co-morbilidades más frecuentes en pacientes con TLE es el deterioro cognitivo (Buzsáki, 2015). Sin embargo, hasta la fecha todos los estudios que han abordado el declive cognitivo asociado a la epilepsia se han focalizado en las puntas epilépticas (Holmes y Lenck-Santini, 2006; Kleen et al., 2010; Gelinás et al., 2016). Las puntas epilépticas contribuyen al deterioro cognitivo con independencia de la gravedad o la incidencia de las convulsiones (Kleen et al., 2010). De hecho, una única punta epiléptica es capaz desestabilizar la computación cortical en pacientes epilépticos, incrementando el tiempo de reacción a los estímulos externos (Shewmon y Erwin, 1988). Aunque, en general, se desconocen los mecanismos de sus efectos deletérios en la memoria, un reciente estudio ha descrito que las puntas epilépticas están asociadas, como los *ripples* fisiológicos, a los *spindles*. Los *spindles* son eventos talamocorticales oscilatorios (12-14 Hz) cuya sincronización con los *ripples* parece ser imprescindible para la correcta transferencia de la información hipocampal a la corteza cerebral (Diekelmann y Born, 2010). Así, las puntas epilépticas parecen competir con los *ripples* fisiológicos por los *spindles*, ocultando el canal de salida hipocampo-cortical (Gelinás et al., 2016).

A pesar de la estrecha asociación entre *fast ripples* y *ripples* fisiológicos, ningún trabajo

hasta la fecha ha abordado su potencial impacto en el deterioro cognitivo.

* * *

La comprensión de la formación hipocampal ha supuesto, en muchos aspectos, el frente de onda del entendimiento del sistema nervioso. En relación con su rol central en la memoria episódica, varias de las poblaciones hipocampales parecen codificar selectivamente elementos concretos del mundo. Tal función emerge en las células tanto por sus mapas de conexiones con el resto de regiones hipocampales (sección 1.1.1 El circuito trisinápático extendido, pág 4) como por los regímenes de actividad coordinada entre estas regiones (sección 1.2 Estados hipocampales, pág 18). Varios estudios independientes – entre los que se halla la presente tesis doctoral – han descrito, recientemente, la importancia del eje superficial-profundo en la organización estructural y funcional del hipocampo.



Objetivos

El objetivo de la presente tesis doctoral es la comprensión de los procesos que gobiernan la emergencia de los SPW-r fisiológicos y los *fast ripples*, con especial énfasis en sus diferentes capacidades algorítmicas, así como las implicaciones cognitivas asociadas. Tal propósito ha sido estructurado en los siguientes objetivos específicos.

- Describir la contribución de las células piramidales de CA1 durante los SPW-r.
- Analizar los mecanismos de la participación diferencial de las células piramidales superficiales y profundas e CA1 en los SPW-r.
- Evaluar la influencia del estado cerebral y la codificación espacial en la participación de las células piramidales de CA1 durante los SPW-r.
- Explorar el papel cognitivo de los SPW-r fisiológicos y su distorsión en el hipocampo epiléptico.
- Comprender las bases sinápticas de la selectividad de disparo de las células piramidales de CA1 durante los SPW-r y su distorsión en epilepsia del lóbulo temporal.
- Evaluar estrategias de rescate funcional de la selectividad del disparo celular y la función cognitiva en epilepsia del lóbulo temporal.



2 | Métodos

Todos los protocolos y procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con la legislación española vigente (RD 1201/2005 y L.32/2007), las Directivas del Consejo de Europa de 1986 (86/609/EEC) y 2003 (2003/65/CE) para la investigación animal, y fueron aprobados por el Comité de Ética del Instituto Cajal (CSIC). Los registros de célula única en ratas con libertad de movimiento fueron obtenidos tanto en Madrid como en la Universidad de Szeged, Hungría. Los experimentos realizados en Hungría fueron aprobados por el Comité Ético de Investigación Animal en la Universidad de Szeged.

2.1. Sujetos experimentales

2.1.1. Modelo experimental de TLE

Ratas *Wistar* macho adultas (180 - 200 g) fueron sometidas a múltiples inyecciones intraperitoneales (IP) de kainato (5 mg/kg, Sigma) a intervalos de una hora hasta evocar el *status* epiléptico. Una hora tras el *status* se les suministro diazepam (IP, 4 mg/kg, Sigma) para detener las convulsiones. En los siguientes 2 o 3 días los animales recibieron inyecciones IP de 2,5 ml de dextrosa al 5% en solución salina, y su dieta se supplementó con fruta y leche en polvo. Típicamente 4

o 5 días después del *status* inducido los animales estaban recuperados y fueron alojados individualmente. Algunas ratas fueron inyectadas con solución salina en lugar de kainato, y recibieron un tratamiento similar a los animales del grupo epiléptico. Ratas normales no tratadas completaron el grupo control al no detectarse diferencias estadísticas entre los animales no tratados y los inyectados con salino en los parámetros electrofisiológicos evaluados. Todos los procedimientos experimentales comenzaron al menos 8 semanas tras el *status* inducido, con los animales en fase crónica epiléptica, mostrando convulsiones recurrentes espontáneas. En estos animales, períodos de actividad electrográfica aparentemente normal se alternan con fases dominadas por eventos epileptiformes, crisis convulsivas o subclínicas y descargas interictales (Inostroza et al., 2013). Para los análisis electrofisiológicos únicamente se consideraron sesiones libres de cualquier signo de actividad epileptiforme. Únicamente datos obtenidos en periodos de ± 1 hora en ausencia de actividad epileptiforme fueron considerados para los análisis.

2.1.2. Tareas de reconocimiento de objetos

Se usaron dos paradigmas comportamentales basados en reconocimiento de objetos,

el test «*what-where-when*» (*WWW*), que examina la memoria de tipo episódica, y el test de reconocimiento de objetos una muestra (OR) (Inostroza et al., 2013). Ambas pruebas fueron realizadas en una caja cuadrada ($80 \times 80 \times 50$ cm) emplazada en una habitación uniformemente iluminada y con señales visuales en las paredes circundantes. Los sonidos ambientales fueron enmascarados con ruido blanco. Las señales olorosas fueron eliminadas después de cada sesión con lavados de ácido acético al 0,1 %. Previo al test comportamental los animales fueron habituados por 3-4 días a la arena experimental y a los registros de LFP.

El test *what-where-when* consiste en dos sesiones de exploración seguidas de una sesión test. Las tres sesiones duran 3 minutos y están separadas entre sí por un periodo *intertrial* de 50 minutos en los cuales los animales eran realojados en una arena con viruta, a la cual estaban previamente habituados. En la primera fase de exploración los animales exploran cuatro copias de un objeto durante 3 minutos (objeto familiar *A*); 50 minutos después, en la segunda fase de exploración, las ratas exploran cuatro copias de un objeto diferente (objeto nuevo, *B*). La sesión test consiste en la exploración, por parte del animal, de 2 objetos familiares (*A*) y 2 nuevos (*B*), con uno de cada tipo (un *A* y un *B*) desplazado respecto a la posición que ocupó durante las sesiones de exploración (figura 2.1A). Las ratas entraron en la caja desde una posición aleatoria. Simultáneamente a todas las etapas de la tarea se obtuvieron registros electrofisiológicos con sondas multi-sitio en el hipocampo dorsal (métodos, sección 2.2.4, pág 38) (figura 2.1B). El desempeño en la tarea fue evaluado mediante un índice de discriminación,

*DI*_{WWW}, que consiste en el cociente entre el tiempo exploración de cada objeto respecto al tiempo de exploración total, contrastado estadísticamente contra la probabilidad esperada (0.25).

Por su parte, el test OR (Ennaceur, 2010; Inostroza et al., 2013) se basa en una sesión de exploración y una sesión test, ambas de 3 minutos y con dos objetos idénticos, uno de los cuales es desplazado en la sesión test (figura 2.1A). Se emplearon dos períodos de *intertrial* entre las sesiones de exploración, 50 y 100 minutos. Los animales accedieron a la caja alocéntricamente respecto a los objetos ensayados. La realización de la tarea fue parametrizada mediante un índice de discriminación (*DI*_{OR}), definido como el cociente entre la diferencia del tiempo de exploración entre ambos objetos (objeto desplazado – objeto estacionario) y el tiempo de exploración total.

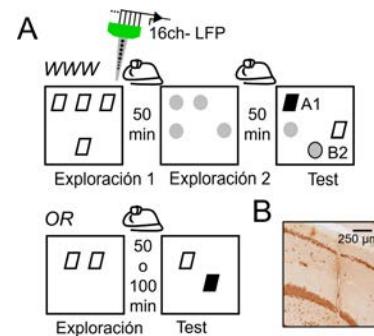


Figura 2.1: Paradigmas comportamentales dependientes de hipocampo. (A) Se obtuvieron registros hippocampales durante tareas de reconocimiento de objetos, *what-where-when* (*WWW*, arriba) y test de objetos de una muestra (*OR*, abajo). (B) Inmunoreactividad para el marcador neuronal *NeuN* en la zona de registro en el hipocampo, mostrando el tracto de la sonda de registro multi-sitio.

2.2. Procedimientos electrofisiológicos *in vivo*

2.2.1. Registros *in vivo* bajo anestesia

Machos y hembras (250-450 g) de ratas *Wistar* fueron anestesiados con uretano (1.2 g/Kg, IP) e instalados en el sistema esteerotáxico. La temperatura corporal se mantuvo constante a 37 °C. Se realizaron dos craneotomías bilaterales de ~1 mm de diámetro por encima de ambos hipocampos para la estimulación en CA3 (AP: -1.2 mm, ML: 2.9 mm) y se perforó una ventana de ~2 mm de diámetro para los registros en las áreas CA1, CA2 y CA3 (AP: -3.7 mm, ML: 3 mm). La duramadre se retiró para facilitar la penetración del electrodo de vidrio. Con objeto de atenuar las pulsaciones cardíacas en el parénquima cerebral se expuso y drenó la cisterna magna.

Dos electrodos de estimulación bipolar concéntrica fueron avanzados 3.5 mm con 30° en el plano coronal para alcanzar CA3. El protocolo de estimulación consistió en pulsos cuadrados bifásicos de 0.2 ms de duración y amplitudes de 0.050-1.2 mA cada 5 s. Se insertó un cable de Ag/AgCl en los músculos del cuello como electrodo de referencia.

Un sistema de electrodos lineal de 16 canales (*silicon probes* de NeuroNexus Tech, espaciado inter-electrodo de 100 µm) fue introducido a lo largo del perfil hipocampal CA1-DG-CA3c, con monitorización continua de la posición mediante estimulación extracelular en CA3 y marcadores electrofisiológicos típicos, a saber: (i) actividad multi-unidad (MUA, del anglicismo *multi-unit activity*) de SP en CA1 y CA3 y de la capa de células

granulares de DG; (ii) SPW-r espontáneos para identificar la capa de células principales de CA1 y SPW para localizar SR; y (iii) la distribución espacial de las oscilaciones *theta* y la actividad *gamma*. Las señales extracelulares fueron pre-amplificadas (×4) mediante un *headstage* situado sobre la cabeza del animal, y posteriormente amplificadas adicionalmente (×100) mediante un amplificador de corriente alterna (AC) de 16 (32) canales (Multichannel Systems), filtradas analógicamente entre 1 Hz y 5 kHz, y muestreadas a 20 kHz/canal con precisión de 12 bits (Digidata®1440, MolecularDevices, LLC; sólo fueron almacenados 14 canales para permitir el registro simultáneo de las señales extracelulares más el voltaje y la corriente intracelular). La posición de registro y estímulo fue confirmada en análisis histológicos *post hoc* (ver más adelante).

Para el registro y la tinción intracelular se prepararon pipetas de borosilicato de vidrio de 1.5 mm/0.86 mm de diámetro exterior/interior (AM Systems, Inc) en configuración *sharp* mediante un *puller* Flaming-Brown (Sutter Instruments), que fueron posteriormente llenadas con acetato potásico 1.5 M y neurobiotina al 2% (Vector Labs, Inc). Las impedancias de las pipetas variaron entre 50 y 100 MΩ. Los registros intracelulares se obtuvieron ciegamente, aproximando el electrodo a las capas celulares mediante un micro-manipulador hidráulico (Narishige), y monitorizando el avance con la estimulación extracelular. Las señales se adquirieron con un amplificador intracelular (Axoclamp 900A) con una ganancia de ×100 y en modo de fijación de voltaje (*current clamp*). Previamente a la obtención de los registros, la craneotomía fue cubierta con agar al 3% para incrementar la estabilidad mecánica. El

potencial de reposo, la resistencia de entrada y la amplitud de los potenciales de acción fueron monitorizados a lo largo del experimento. Tras la recolección de datos, la neurobiotina contenida en la solución interna de la pipeta fue electro-expelida mediante pulsos despolarizantes de 1-3 nA y 500 ms a 1 Hz durante 10-45 min. Por último, el electrodo fue retraído suavemente, controlando la integridad celular. La identidad piramidal de las células fue en primera instancia inferida por criterios electrofisiológicos – actividad espontánea, morfología del potencial de acción, respuesta de disparo a pulsos de corriente despolarizantes y respuesta antidiáfrámica/ortodiáfrámica al estímulo en CA3 – y posteriormente confirmada por análisis morfológicos.

2.2.2. Farmacología *in vivo* bajo anestesia

Para las manipulaciones farmacológicas *in vivo* de infusión local, se empleó un sistema de electrodos lineal de 8 canales con un tubo fluídico adherido (serie D, NeuroNexus Tech). En estos experimentos se liberó en el parénquima hipocampal entre 1 y 2 µL de un cóctel de antagonistas de los receptores de glutamato ionotrópicos CNQX/AP5 (3 mM/30 mM, Sigma) y el trazador dextran-Texas Red (0.1 mg/ml, Molecular Probes) en ACSF (fluído cerebroespinal artificial, sus siglas en inglés; en mM: 124 NaCl, 5 KCl, 1.5 MgSO₄, 26 NaHCO₃, 3 CaCl₂, 10 glucosa, pH 7.3, se burbujeó con O₂ al 5% de CO₂ al 95%) mediante una jeringa Hamilton acoplada al tubo fluídico del sistema de electrodos por una cánula impermeable al O₂ Tygon®(R-3603, Cole-Parmer). Tras completar los experimentos, los animales fueron

perfundidos para la interpretación del alcance de la difusión del fármaco.

En los experimentos de diálisis intracelular, la solución de la pipeta fue complementada con 1 mM del antagonista no competitivo de GABA_A picrotoxina (Sigma). Para las inyecciones sistémicas del antagonista de Na⁺ carbamazepina (20 mM/kg, Sigma) se implantó una cánula IP.

2.2.3. Registro yuxta-celular en animales con libertad de movimiento

En referencia a los registros yuxta-celulares de célula única en ratas con libertad de movimiento se emplearon dos tecnologías: un micro-manipulador manual adaptado para albergar electrodos de vidrio (Korshunov, 1995) y un micro-manipulador motorizado montado según el diseño de Long et al., 2010.

En primer lugar se detallarán los procedimientos concernientes al micro-manipulador manual. Los animales debidamente anestesiados (isoflurano 1.5-2 %, con oxígeno 30 %) fueron implantados con un soporte de resina alineado con la craneotomía previamente practicada sobre el hipocampo (AP: 4.3 mm, ML 2.5 mm). Durante la cirugía se conservó la integridad de la duramadre. A término del procedimiento quirúrgico, la craneotomía fue lavada con Mitomicina C (Sigma) 0.05-0.07 mg/ml para reducir el crecimiento de tejido, y se cubrió con agar (2.5-3.5 %) para evitar el secado de tejido cerebral. Como referencia se implantó un cable de platino/iridio (125 µm) (A-M Systems, Inc) epidural sobre el cerebelo. Los días posteriores a la cirugía (4-5) se habituó a los animales a la caja de registro (40 × 40 × 23

cm o $25 \times 25 \times 35$ cm) ~ 5 horas/día con agua y alimento *ad libitum*. Durante estas sesiones los animales eran adicionalmente familiarizados con el montaje/retirada del micro-manipulador en ausencia de anestesia y en la arena de registro. El día de registro se instaló en el micro-manipulador una pipeta de vidrio (1.0 mm/0.58 mm, ref 601000, A-M Systems, Inc) con una solución de 1.5-2.5 % de Neurobiotina en NaCl 0.5 M (impedancia 8-15 M Ω) y fue introducida en el cerebro del animal hasta el hipocampo ($350\text{ }\mu\text{m}$ por revolución con una resolución de 3-5 μm). En algunos animales se atornilló un electrodo de acero cortical ipsilateral en la corteza prefrontal, y se insertó un hilo de tungsteno intrahipocampal contralateral (122-350 μm) dirigido a SR para validar la definición de estados comportamentales y electrográficos (métodos, sección 2.4.3). Adicionalmente, en algunas ratas se utilizó una versión del micro-manipulador adaptada para alojar un electrodo de tungsteno adicional para el registro simultáneo extracelular de SP (distancia entre pipeta y tungsteno de 100-400 μm).

El micro-manipulador motorizado esta basado en un motor miniaturizado de corriente continua (CC) sin escobillas, con reducción de engranaje 125:1 (Microcomo, Faulhaber Group) cuyo vástago es un tornillo sin-fin (paso de 0.2 mm, 1.6 mm de diámetro). A dicho tornillo se enrosca una tuerca, a su vez anclada a un soporte que se desplaza por un rail, lo que permite la transformación del movimiento rotatorio en lineal. Para el control del motor se desarrolló un dispositivo basado en una placa Arduino que permite pasos de movimiento vertical de 1, 10, 100 y 1000 μm . Todo el dispositivo está acabado en plástico impreso y era cementa-

do al cráneo durante una cirugía similar a la descrita para el micro-manipulador manual, con la misma configuración de tierras y electrodos extracelulares. Durante los 2-3 días posteriores a la cirugía, las ratas fueron habituadas a la caja de registro. El día del registro, los animal eran sedados brevemente con isofluorano (1.5 % en oxígeno al 30 %) para el montaje de una pipeta de vidrio en el micro-manipulador. Los registros de célula única no comenzaban antes de 3-4 horas después, cuando las ratas se comportaban normalmente y la electroencefalografía era similar a la observada previamente a la sedación.

Para ambas metodologías, los registros se obtuvieron con un pre-amplificador miniaturizado (mini-preamplificador ELC, NPI Electronic) montado con LEDs para la localización espacial durante los registros, y personalizado para su conexión en un amplificador Axoclamp-2B (Molecular Devices). Se empleó una videocámara para monitorizar el comportamiento de los animales (sueño, vigilia y locomoción) y para obtener su posición en el tiempo en la caja de registro. Las video-grabaciones fueron adquiridas a 27 fotogramas/s. La posición de profundidad de las pipetas durante el experimento se estimó a partir de la escala micrométrica del micro-manipulador (Korshunov, 1995) en el modelo manual o del monitor del controlador Arduino en el motorizado, además de señales electrográficas relevantes, incluyendo complejos *K* y *spindles* en corteza, oscilaciones *theta* y SPW-r hipocampales.

Tras el registro, las células fueron teñidas electro-expeliendo la Neurobiotina con pulsos de corriente positiva (500 ms, 5-18 nA, figura 2.2) mientras se monitorizaba su respuesta, tal como se describe en Pinault

(1996). Las células registradas fueron identificadas mediante fluoróforos conjugados con Streptavidina en secciones histológicas.

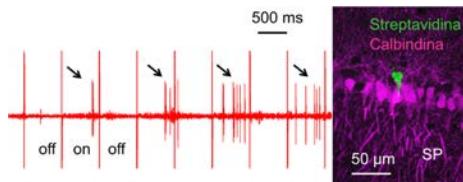


Figura 2.2: Tinción yuxtagelular de las células registradas en animales con libertad de movimiento. Nótese los potenciales de acción evocados por los pulsos de corriente (*ON-OFF*, izquierda), 5 ms, 5-18 nA, indicativos de una satisfactoria incorporación de la Neuromodulina (derecha).

2.2.4. Registros extracelulares multi-canal en animales con libertad de movimiento

Ratas tratadas con salino y ratas epilépticas (6-7 semanas tras el tratamiento, métodos, sección 2.1.1) fueron debidamente anestesiadas con isoflurano (1.5-2 %) en oxígeno (30 %) e immobilizadas en un marco esterotáxico para neurocirugía. En el hipocampo dorsal de cada animal se implantó un sistema lineal de electrodos de silicio de 16 o 32 canales (NeuroNexus, 0.3-1.2 MΩ de impedancia por electrodo, 50-100 μm de resolución y 413 μm² de área), entre 3.9 y 6 mm AP y entre 2 y 5 mm ML. Los sistemas de electrodos estaban tanto anclados al cráneo como montados en un micro-manipulador (o bien ensamblado en el laboratorio, o utilizando el modelo ®dDrive de NeuroNexus). Dos electrodos de acero atornillados al hueso occipital fueron empleados como referencia

y tierra. Tras la cirugía los animales recibieron un tratamiento agudo de enrofloxacina 10 mg/kg, metilprednisolona 10 mg/kg y buprenorfina 0.05 mg/kg. No se realizó ningún procedimiento experimental en al menos 7 días tras las intervenciones.

Para los registros electrofisiológicos se empleó un amplificador multi-canal (®DacqUSB, Axona). Las señales de LFP fueron amplificadas ×400, digitalizadas a 4800 Hz con 24 bits de precisión, y filtradas en paso banda entre 1-2400 Hz. La posición de los animales durante el registro se obtuvo a partir del LED infrarrojo que montaba el *headstage* de pre-amplificación, registrada con una videocámara de alta velocidad desde el techo (100 Hz, 300 píxeles/metro). Los registros se realizaron diariamente, entre las 2 pm y 7 pm y durante 1-3 semanas, mientras los animales realizaban los paradigmas comportamentales (métodos, sección 2.1).

2.3. Histología e inmunohistoquímica

De 1 a 2 horas después de los registros electrofisiológicos *in vivo* las ratas fueron perfundidas trans-cardialmente con paraformaldehído al 4 % (PFA) y ácido pícrico saturado al 15 % en una solución de tampón fosfato-salino (PBS) 0.1 M, pH 7.4. Los cerebros fueron extraídos y mantenidos en solución fijadora durante 12 horas a temperatura ambiente (RT). Posteriormente fueron lavados en PBS y cortados en secciones coronales de 70 μm (vibratomo Leica VT1000S). Para los contejos de botones sinápticos, las ratas fueron fijadas con PFA al 4 %, ácido pícrico saturado al 15 % y glutaraldehído al 0.05 %

en tampón fosfato (PB) 0.1 M, sin posterior fijación. Las secciones cerebrales que contenían los tractos de los electrodos de estimulación y registro se identificadas y analizaron en un estereo-microscopio (R_®S8APO, Leica).

Las secciones que potencialmente contenían células marcadas con Neurobiotina fueron incubadas en Streptavidina-Alexa Fluor488 1:400 (Jackson ImmunoResearch 016-540-084) con Triton X-100 al 0.5 % en PBS (PBS-Tx) durante 2 horas a RT. Tras tres lavados, las secciones fueron examinadas en un microscopio de epi-fluorescencia invertido (R_®DMI6000B, Leica). Aquellas que contenían el soma de las células registradas fueron seleccionadas para los análisis de inmunoreactividad. Dichas secciones se bloquearon con suero bovino fetal (FBS) al 10 % en tampón fosfato-salino PBS y Triton-X100 al 1 % (PBS-Tx), y posteriormente fueron incubadas durante 12 h a temperatura ambiente (RT) con la solución de anticuerpo primario pertinente: *rabbit anti-calbindina* (1:1000, CB D-28k, Swant CB-38), *mouse anticalbindina* (1:1000, CB D-28k, Swant 300) o *rabbit anti-PCP4* (1:300, Sigma HPA005792); todos ellos en FBS al 1 % en PBS-Tx. Posteriormente, y tras tres lavados en PBS-Tx, las secciones fueron incubadas durante 2 horas a RT con los anticuerpos secundarios apropiados: *goat anti-rabbit Alexa Fluor633* (1:500, Molecular Probes, A21070), *goat anti-mouse Alexa Fluor488* (Jackson Immunoresearch 115-545 - 003) o *goat anti-mouse Rhodamine Red* (1:200, Jackson ImmunoResearch, 115-295-003) en PBS-Tx-FBS1 %. Después de 10 min de incubación en bisbenzimida H33258 (1:10000 en PBS, Sigma, B2883) para el marcado de los núcleos celulares, las seccio-

nes fueron lavadas y montadas sobre porta-objetos de vidrio con *Mowiol* (17 % de alcohol polivinílico 4-88, 33 % de glicerina y 2 % de timerosal en PBS).

Para el contajes de botones sinápticos por métodos inmunohistoquímicos, las secciones fueron *bloqueadas* con suero de caballo (NHS, por *normal horse serum*) al 20 % en solución salina tamponada con Tris y Triton X-100 al 0,3 % (TBS-Tx), seguido por la incubación con los anticuerpos primarios en NHS al 1 % en TBS-Tx durante al menos 3 días a 4 °C. Después de 3 lavados de 10 min en TBS-Tx, las secciones fueron incubadas con los anticuerpos secundarios en TBS-Tx NHS 1 % 12 h a 4 °C. Posteriormente las secciones fueron lavadas 3 x 10 min en TBS-Tx y montadas en porta-objetos de vidrio con R_®VectaShield (Vector Laboratories). Los anticuerpos primarios utilizados en estos experimentos fueron: *mouse anti-gephyrin* (1:500, Synaptic Systems, 147 011), *goat anti-PV* (1:1000, Swant, PVG-214), *guinea pig anti-CB1R* (1:1000, Frontier Institute Co. Ltd, Hokkaido, Japón CB1-GP-Af530), *rabbit anti-Wfs1* (1:500, Proteintech 11558-1-AP). A su vez, los anticuerpos secundarios empleados fueron (todos ellos *donkey*): DyLight405 anti-*mouse* o anti-*rabbit* (1:250 y 1:400, Jackson ImmunoResearch, 715-475-151 y 711-475-152, respectivamente) anti-*mouse*, anti-*goat*, anti-*guinea pig* Alexa Fluor 488 (1:400, Jackson ImmunoResearch Laboratories, 715-546-150, 705-546-147 y 706485148, respectivamente); anti-*goat* y anti-*guinea pig* Cy3 (1:400, Jackson ImmunoResearch; 705-165-147 y 706-165-148, respectivamente); y anti-*rabbit*, anti-*goat* o anti-*guinea pig* Cy5 (1:400, Jackson ImmunoResearch, 711-175-152, 705-175-147 o 706-175-148, respectivamente). Para el análisis

de *gephyrin* en las células registradas se implementaron protocolos de recuperación antígenica. En todos los lotes de procedimientos inmunohistoquímicos se incluyeron controles negativos, sin anticuerpos primarios.

2.3.1. Anticuerpos

A continuación se detalla la especificidad reportada de los anticuerpos primarios empleados: calbindina, polyclonal *rabbit* generado por inmunización con calbindina de rata recombinante D-28k, antisuero; caracterizado en rata por Sloviter (1989); sin señal en *knockout* de ratón (Airaksinen et al., 1997). Calbindina, monoclonal *mouse* de calbindina de pollo D-28k, sobrenadante de hibridoma; generado y caracterizado por Celio et al. (1990); inmunorreactividad similar al *rabbit*. PCP4, polyclonal *rabbit* de 6-58 aa de PCP4 humano recombinante, inmunorreactividad similar al PCP4 usado por San Antonio et al. (2014). *Gephyrin*, monoclonal *mouse* del *N*-terminal de *gephyrin rat*, 100 µg/ml; IgG purificada, generada por Pfeiffer et al. (1984); sin señal en *knockout* de ratón (Feng et al., 1998). PV, polyclonal *goat* de PV de rata, antisuero; similar inmunoreactividad a otros anticuerpos de PV (Sloviter, 1989); sin señal en *knockout* de ratón (Schwaller et al., 1999). CB1R, polyclonal *guinea pig* a partir de *C-terminal* 31 aa de CB1R de ratón, 200 µg/ml; inmunorreactividad similar a la de otros anticuerpos CB1R y banda única en *Western blot* a 52 kDa (Fukudome et al., 2004). Wfs1, polyclonal *Western blot* de la proteína de fusión 1-314 aa del Wfs1 humano recombinante, 280 µg/ml; inmunoreactividad en cerebro de rata, peso molecular (~100 kDa) similar al anti-WFS1C *rabbit* generado por Takeda et al. (2001).

2.3.2. Adquisición y procesado de imágenes confocales

Para la adquisición de *stacks* confocales multi-canal de las células registradas se empleó un microscopio confocal (SP5®, Leica) controlado por el software LAS AF2.6.0 7266 (Leica). Para estudios de célula única se utilizaron los siguientes canales (fluoróforo, láser de excitación, banda de emisión): (i) bisbenzimida, diodo 405 nm, 415-485 nm; (ii) Alexa Fluor488, Argon 488 nm, 499-535 nm; (iii) Rhodamine/Red/Alexa Fluor568/Texas Red, DPSS 561 nm, 571-620 nm; (iv) Alexa Fluor633, HeNe 633 nm, 652-738 nm; y los siguientes objetivos: HC PL APO CS 10.0×0.40 UV DRY, HCX PL APO lambda blue 20.0×0.70 IMM UV y HCX PL APO CS 40.0×1.25 OIL UV.

En los experimentos de contejo de botones sinápticos se usó un microscopio confocal LSM710 (Axio Imager.Z1®, Zeiss) bajo el software ZEN 2008 v5.0 (Zeiss), y los siguientes canales lumínicos (fluoróforo, láser de excitación, banda de emisión): (i) DyLight405, 405 nm, 409-499 nm; (ii) Alexa Fluor 488, 488 nm, 493-542 nm; Cy3, 543 nm, 552-639 nm; (iii) Cy5, 633 nm, 637-757 nm; y un objetivo DIC M27 Plan-APOCHROMAT 63×/1,4 NA OIL. Los canales se adquirieron secuencialmente con un rango dinámico de 8 bits y un *pinhole* de 1 Airy para la longitud de onda más corta. El tamaño de *pinhole* en los otros canales se ajustó para dar el mismo grosor de sección óptica (que fue de 0.6 µm). El láser de 405 nm generó una resolución de muestreo de 12.7 píxeles/µm, 0.08×0.08×0.43 µm/voxel.

La asignación de los fluoróforos para los anticuerpos se basó en minimizar la superposición espectral entre sus canales. A los

marcadores sinápticos se les asignó el canal de mayor resolución (menor longitud de onda).

2.3.3. Revelado histológico con diaminobenzidina de las células registradas

Tras los análisis de microscopía confocal, las secciones marcadas con Neurobiotina fueron desmontadas y, junto con las secciones restantes fueron aclaradas en PBS-Tx al 0.5 % y tratadas con 0.3 % de H₂O₂ para la inactivación de peroxidases endógenas. Tras tres lavados adicionales con PBS-Tx, las secciones fueron incubadas en una solución al 1 % de B del kit ABC (complejo de peroxidasa biotinilada, kit ®Vectastain ABC Elite, Vector Laboratories, PK6100) en PBS-Tx 0.5 % y FBS 2 % durante 4 horas a RT, y después en 1 %A/1 %B en PBS-Tx-FBS durante 3 días a 4°C. Posteriormente, y tras tres lavados de PBS-Tx, los cortes fueron procesados con diaminobencidina (DAB, Sigma) empleando el método de glucosa oxidasa, con o sin intensificación de níquel: 0.05 % de DAB, 0.2 % de glucosa, 0.004 % de ClNH₄, 0.04 % de Ni((NH₄)₂)SO₄ 0.002 % de glucosa oxidasa en PBS. La reacción fue monitorizada en un estereo-microscopio, y eventualmente fue detenida con abundante PBS. Las secciones fueron entonces montadas en portaobjetos, deshidratadas (serie creciente de etanol 70 %-95 %-100 % y xilol) y cubiertas con DPX (VWR). Posteriormente las células marcadas fueron examinadas y fotografiadas en un microscopio de campo claro (Nikon Eclipse 80i) acoplado a una cámara digital (Mbf). Algunas de las células fueron reconstruidas bidimensionalmente en cámara lúcida y/o digitalizadas en neurolúcida.

2.3.4. Análisis morfológico de las células registradas

La identificación de la ubicación de las células registradas y del trato de los electrodos extracelulares se basó en puntos de referencia anatómicos (Paxinos y Watson, 2007). La distancia mediolateral (ML) se evaluó directamente, desde la línea media. La distancia ortogonal de la células al trato del electrodo extracelular se estimó mediante triangulación. La distancia entre el centro de los somas celulares y SR se evaluó a partir de los dibujos de cámara lúcida (1 sección de 70 µm a 40×). El límite entre CA1 y CA2 fue identificado empleando la inmunoreactividad de PCP4.

Para la cuantificación estereológica de los botones sinápticos inmunoreactivos para gephyrin, se seleccionaron al azar células piramidales de CA1 inmunopositivas para Wfs1 en 4 secciones (4 *stacks* confocales). Se contaron todas los botones sinápticos co-inmunoreactivos para gephyrin/PV y gephyrin/CB1R de 11 secciones ópticas alrededor de los soma, empleando la primera imagen del *stack* como sección de búsqueda para el disector óptico. El área de muestreo se estimó a partir del producto de la circunferencia media somática y los 10 cortes ópticos (11 – 1). La distancia de cada soma respecto al borde con SR fue evaluada para cada sección.

Respecto a la evaluación de la inmunoreactividad de calbindina se adoptó un enfoque paramétrico (figura 2.3): en cada imagen confocal que contenía el soma de una célula registrada se evaluó la intensidad media somática de CB (Alexa Fluor633) de ≥10 células piramidales colindantes en la misma sección óptica. La intensidad de CB para la

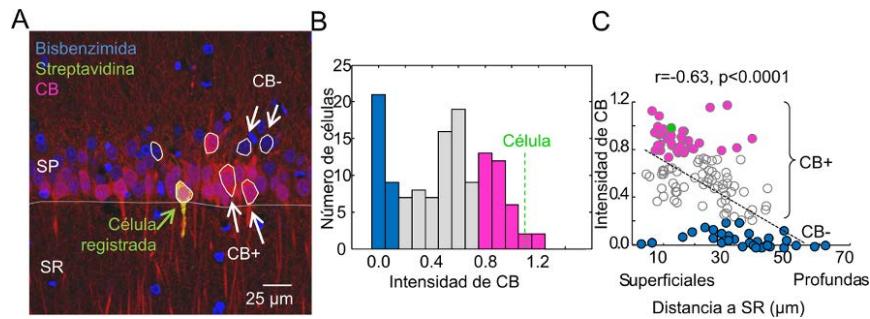


Figura 2.3: Evaluación de la inmunoreactividad de CB en una célula registrada *in vivo*. (A) Se trazaron regiones de interés (ROI) para ≥ 5 células claramente negativas a CB (azul en C) y las ≥ 5 células CB+ de mayor intensidad (magenta en C) en imágenes confocales de una única sección óptica (grosor de 0,97-1,88 μm) a 20 \times o 40 \times . Empleando la intensidad media de cada ROI se normalizó el valor de inmunoreactividad para CB de la célula problema entre 0 (CB-) y 1 (CB+). (B) Distribución de inmunoreactividad estimada para todas los somas en una imagen representativa (20 \times , 1 sección óptica de 1,7 μm , $n = 129$ células). La célula registrada (en verde) fue CB+. (C) Correlación negativa entre los valores normalizados de intensidad y la distancia de los correspondientes centros somáticos a SR ($n=129$ células, $p<0,0001$, $r=-0,6251$, correlación de Pearson).

célula registrada fue normalizada empleando la familia de valores obtenidos (figura 2.3B). Posteriormente se adoptó una clasificación binaria para células piramidales, definiendo la inmunonegatividad para CB (CB-) por un valor de intensidad normalizado ≤ 0.2 y la imunopositividad (CB+) por encima de dicho umbral (figura 2.3B,C). En lo referente a la clasificación en el eje radial, se consideró la posición del centro somático con respecto a la subcapa CB+. Las células piramidales de CA1 eran definidas como «profundas» si sus somas se localizaban externos a la subcapa CB+, independientemente de su inmunoreactividad para CB¹. Las células principales de CA1 fueron consideradas «superficiales» si su centro somático estaba incluido en la

¹En la figura 2.3A han sido resaltadas 3 células superficiales, todas ellas CB+, y 4 profundas, 3 de las cuales son CB+.

subcapa CB+ local.

Todas las imágenes confocales fueron gestionadas y procesadas en ImageJ (Schneider et al., 2012). La colocalización entre distintos marcadores se evaluó en todo momento en la misma sección óptica.

2.4. Análisis de datos

Todos los análisis se realizaron utilizando rutinas escritas *ad hoc* para ®MATLAB 7.10 (MathWorks).

2.4.1. Análisis espectral de las señales extracelulares

Se empleó un filtro paso bajo de 100 Hz sobre el LFP de SR para el análisis de las SPW, y un filtro paso banda de entre 100-600 Hz para los eventos HFO locales en SP – SPW

y *fast ripples* –. En ambos casos se usaron filtros *forward-backward-zero-phase* de respuesta finita a impulso (FIR) para preservar las relaciones temporales entre canales y señales.

Para la detección de SPW, las señales filtradas fueron suavizadas mediante un *kernel* gaussiano y los eventos candidatos se detectaron por umbral (>3 desviaciones estándar [SD] de la señal). Para la detección de HFO, la señal filtrada de SP se suavizó mediante un filtro polinomial Savitzky-Golay y los eventos candidatos fueron detectados, también por umbral (>2 SD). Únicamente se emplearon en los análisis eventos SPW asociadas a *ripples* o *fast ripples*, esto es, genuinos SPW-r. Los SPW-r detectados fueron visualmente confirmados y alineados por el mínimo voltaje de SPW en SR, o por el valor máximo local del *ripple* (según se indique). Ambos métodos de alineación generan resultados similares.

Las señales de CSD se obtuvieron a partir de la segunda derivada espacial del LFP. La interpolación de los CSD fue aplicada únicamente en la confección de las figuras. La conductividad del tejido hipocampal se consideró isotrópica, y se le asignó un valor arbitrario de 1 para expresar las señales de CSD como mV mm^{-2} . Las señales LFP y CSD se presentan como promedios de ≥ 10 eventos individuales.

Los análisis de tiempo-frecuencia para los *ripples* y *fast ripples* extracelulares (e intracelulares) fueron realizados por el método *multitaper* en ventanas móviles con 97.7% de solapamiento y una resolución de 10 Hz entre 90-600 Hz en las trazas alineadas (± 1 s). El *power* espectral normalizado fue considerado una distribución estadística $p(f)$ de la cual se extrajo la moda, para estimar el

máximo de frecuencia característico, y la entropía (S , en bits) según la siguiente expresión (Foffani et al., 2007):

$$S = - \sum_f p(f) \log_2 p(f) \quad (2.1)$$

La entropía, S , no depende de la frecuencia (f) y es máxima para un espectro plano (ruido) con $\log_2 N = 5.12$, con $N = 35$ bins. De la distribución espectral $p(f)$ fue también estimado el *fast ripple index* (FR index) como la integral de la función del espectro por encima de una frecuencia dada (se tomó el valor de 250Hz, ver figura 2.4). El *fast ripple index* captura la proporción del espectro en la banda *fast ripple* (Ibarz et al., 2010). Para el análisis de coordinación entre los *ripples* intracelulares y extracelulares se computó la función de cros-correlación entre ambas señales temporales, y se estimó el *power* espectral del trazo resultante.

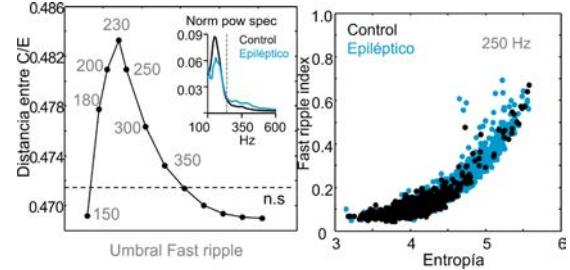


Figura 2.4: *Fast ripple index* como parámetro para evaluar el contenido en altas frecuencias. (A) El *fast ripple index* es la integral del espectro normalizado sobre un umbral de frecuencia arbitrario (línea discontinua de los espectros control y epiléptico). Se muestra la distancia (izquierda) entre las constelaciones de eventos controles (C) y epilépticos (E) en el espacio bidimensional de entropía/*fast ripple index* (derecha).

Para cuantificar los parámetros asociados a la actividad *theta* exploratoria, en registros obtenidos durante las fases exploratorias de las pruebas de conducta se identificaron, en el LFP de SLM, segmentos no solapantes (1 s) con oscilaciones continuas en la banda *theta* (4-12 Hz). Se estimó el *power* de *theta* (en dB) y la coherencia entre SLM y la capa molecular de DG empleando el método Thomson *multitaper* (Inostroza et al., 2013; Laurent et al., 2015). Adicionalmente, se obtuvo un índice de modulación *theta-gamma* a partir del CSD en la banda 30-60 Hz, según lo reportado previamente en Lopez-Pigozzi et al., 2016.

2.4.2. Análisis de los registros intracelulares

Se evaluaron las propiedades electrofisiológicas (resistencia de entrada, R , capacitancia de membrana, C , y constante de tiempo, τ , frecuencia de potenciales de acción, Frec_{IO}, y el umbral del potencial de acción, PA_U) para todas las neuronas registradas intracelularmente *in vivo* durante su respuesta a pulsos cuadrados de corriente de 500 ms en fijación de voltaje (*current clamp*). Se excluyeron aquellas células cuya amplitud de potencial de acción fue inferior a 40 mV. Se evaluaron las características del disparo esperado para células piramidales por medio de autocorrelogramas ($bin=0.5$ ms). Las células piramidales de CA1 suelen disparar en ráfagas, lo que arroja picos máximos en estos histogramas a los 4-5 ms. Los análisis electrofisiológicos se realizaron una vez dada por concluida la base de datos, en una única serie. Los grupos celulares referidos (células despolarizadas/hiperpolarizadas, profundas/superficiales, CB+/CB-) se realizaron

independientemente.

Para el análisis de las respuestas intracelulares asociadas a SPW-r, las respuestas intracelulares fueron alineadas empleando los valores de los mínimos de voltaje en SR o los máximos en SP como plantilla. Ambos métodos arrojan resultados similares para todos los análisis. Las respuestas evocadas por estimulación en CA3 fueron alineadas asignando el tiempo 0 al artefacto eléctrico del estímulo, y se construyeron curvas *input-output* con las trazas de voltaje para un rango de intensidades de estimulación (50-500 μ A). El potencial de membrana en reposo (RMP) y la resistencia de entrada, R , fueron calculados mediante regresión lineal entre las trazas de respuesta y la corriente aplicada.

El potencial de reversión (V_{rev}) durante los eventos y las respuestas evocadas por CA3 se estimaron mediante regresión lineal entre la respuesta intracelular en los mínimos de voltaje en SR (o los máximos en SP), y el potencial de membrana medio en una ventana de ± 1 s. A su vez, V_{rev} en el tiempo se estimó de forma similar, pero sobre todos los instantes (20000 samples/segundo) de las señales intracelulares alineadas. Se obtuvieron a partir de las trazas de reversión los siguientes parámetros cinéticos: (i) $rise_{20-80\%}$, como el tiempo en ms entre el 20 y el 80 % de la respuesta; (ii) $delay_{IE}$, como la diferencia en ms entre el máximo y el mínimo de V_{rev} ; y (iii) el $decay_{63\%}$, tiempo en ms que toma el descenso de la respuesta desde el valor máximo hasta el 63 %. La *driving force* de las respuestas intracelulares se estimó como $V_{rev} - RMP$. La carga neta CN , en pC, se obtuvo a partir de los trazos promedio a RMP de los eventos, según la siguiente

ecuación (Ulrich y Stricker, 2000):

$$CN = \int_a^b V(t)dt/R \quad (2.2)$$

Donde a y b es ± 30 ms respecto al evento extracelular, V es el promedio de los trazos en el tiempo, t , y R es la resistencia de entrada característica de la célula.

Se obtuvieron histogramas peri-evento (PETH) por binneado ($bin=20$ o 30 s) del los potenciales de acción registrados – intracelularmente, extracelularmente o como MUA – a RMP. Los potenciales de acción fueron identificados mediante un umbral (>2 SD) en la señal filtrada en paso alto de 1000 Hz. Únicamente SPW-r aislados en ventanas de ± 1 s fueron considerados para los PETH (al menos 10 eventos por célula). En consecuencia, no todas las células satisficieron tales condiciones. Se estimó el *grand-average* de los PETH individuales para los grupos considerados. También fueron evaluadas las diferencias entre la frecuencia de disparo durante los SPW-r (± 30 ms) con respecto al comportamiento celular basal, entre los 500 y 100 ms previos al evento (como el promedio de 6 ventanas de 60 ms cogidas al azar en estos 400 ms). Previamente se usaron diferentes tamaños de ventana ($20, 40, 60, 100$ ms), hallándose que 60 ms ($\sum \pm 30$ ms) capturaba mejor las diferencias estadísticas, consistente con la duración esperada de los SPW-r ($50-70$ ms; Sullivan et al., 2011).

Respecto al reclutamiento celular por los SPW-r, fueron estimados los siguientes parámetros: (i) la *participación celular* (P), número de eventos con al menos un potencial sobre el total de eventos; (ii) los *disparos por evento*, promedio de potenciales de acción para todos los eventos (± 30 ms); (iii) la *frecuencia de disparo durante las HFO*, como

el cociente entre los disparos y la duración de la ventana (60 ms); y (iv) el contenido de información, como $-\log_2 P$ (donde, como ha sido señalado en (i), P es la participación celular).

Para el análisis temporal de los cambios sinápticos asociados a los SPW-r agrupados por SOM (ver sección 2.4.4) se adoptó una generalización del método general de Borg-Graham, 2001. Debido a la complejidad inherente a definir el potencial de reversión del GABA_A en las condiciones epilépticas, las corrientes excitatorias e inhibitorias no fueron modeladas por separado, sino estimadas en base al signo de la corriente sináptica compuesta (de la Prida, 2004). Se generó un modelo lineal del potencial de membrana en el tiempo (respecto al valor mínimo de voltaje de la SPW en SR, ± 500 ms) con respecto a la corriente suministrada, a partir del cual se extrajo el potencial de inversión, $V_{rev}(t)$ y la conductancia, $G(t)$, reportando el incremento de conductancia en los SPW-r, respecto al valor basal. La evolución temporal en la corriente total $I_{Total}(t)$ se estimó como:

$$I_{Total} = G(t)(V - V_{rev}(t)) \quad (2.3)$$

Donde V es el potencial de membrana en reposo. Nótese que $V - V_{rev}(t)$ es la evolución temporal de la *driving force*. En tal modelo, las corrientes excitatorias – flujo neto hacia el interior celular – generan despolarización, mientras que las corrientes inhibitorias – flujo neto hacia el exterior celular – resultan en la hiperpolarización de la membrana.

2.4.3. Análisis de los registros yuxtapacelulares

Para las células registradas con pipetas de vidrio en condiciones de libertad de movimiento, la señal fue procesada de forma idéntica a lo aludido en la sección 2.4.2 respecto a la detección de eventos, potenciales de acción, autocorrelogramas y PETH. Aquellas células cuya anchura de potencial de acción fue superior a 1 ms fueron descartadas, y se monitorizó su estabilidad a lo largo de todo el registro (figura 2.5).

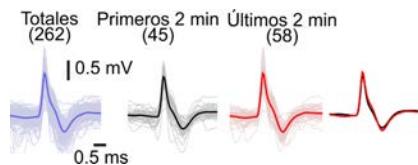


Figura 2.5: Estabilidad a lo largo de los registros yuxtapacelulares. La figura compara los potenciales de acción espontáneos de los primeros y últimos dos minutos de registro con los totales.

Para evaluar la relación entre el disparo celular y los índices espectrales (entropía y *fast ripple index*) únicamente se consideraron aquellos eventos que evocaron potenciales de acción. En n bins de 0.1 bits de entropía y 0.05 unidades arbitrarias de *fast ripple index* se calculó el promedio de potenciales de acción disparados por las células registradas. Posteriormente se computó la correlación de Pearson entre el número promediado de potenciales de acción y los parámetros espectrales. Se reporta el *grand average* y el intervalo de confianza al 95 % (IC95) de los datos individuales.

Respecto a la predicción de la ubicación radial (superficial-profunda) de las neuronas registradas no-marcadas, está basado en la

reversión de la señal extracelular a lo largo de la capa celular de CA1 durante los eventos SPW-r (Mizuseki et al., 2011). En la construcción del modelo se computó la integral del promedio de los eventos para cada célula histológicamente identificada filtrada en paso bajo a 10, 50, 100, 250 y 600 Hz y evaluada en diferentes ventanas temporales (± 25 ms; ± 50 ms, ver figura 2.6). Los valores obtenidos se correlacionaron con la distancia conocida al borde de SR, y posteriormente se seleccionó el mejor modelo lineal obtenido (<10 Hz y 50-0 ms). Dicho modelo fue entonces empleado en las células no-marcadas para predecir su posición en la monocapa de CA1, y por ende, su condición superficial/profunda.

En los experimentos de célula única en libertad de movimiento se definieron los estados cerebrales concurrentes a los registros, adoptando un enfoque integrado electrográfico/conductual. Sueño y vigilia fueron identificados mediante la visualización de los videos, independientemente a los datos electrofisiológicos. Posteriormente estos juicios fueron refinados con la señal del acelerómetro dispuesto en el *headstage* y mediante análisis electrográfico. El sueño de ondas lentas fue delimitado por actividad de onda lenta (deflexiones <3 Hz y alta amplitud), y el sueño REM por la presencia de *theta* en ausencia de locomoción o actividad exploratoria. La posición de los animales en la caja durante los registros se obtuvo empleando el software *idTracker* (Pérez-Escudero et al., 2014). Tales procedimientos fueron validados en dos animales con dos tornillo quirúrgico sobre la corteza prefrontal, a modo de electrodo cortical, adicionales al tungsteno y la pipeta de vidrio (figura 2.7).

En el análisis de la modulación espacial

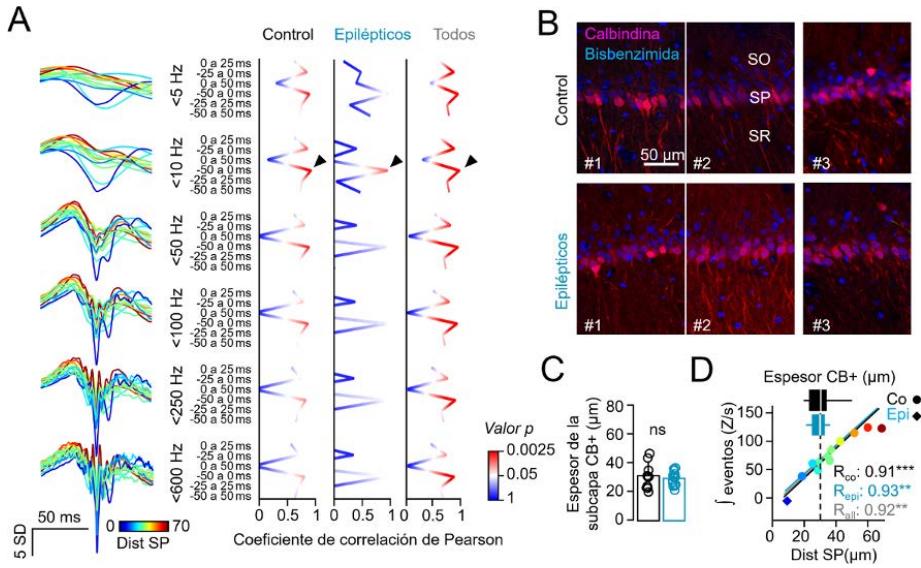


Figura 2.6: Predicción de la posición en capa para células no-marcadas. (A) El dipolo – sumidero y fuente – que evocan las células piramidales en su eje somato-dendrítico revierte el LFP en la capa piramidal. Este fenómeno permite correlacionar la posición del electrodo de registro con la integral del trazo medio de los eventos. Se probaron varias ventanas y filtros, y se seleccionó el mejor modelo lineal, $y = \beta_0 + \beta_1 x$, (triángulos negros) que arrojó los siguientes coeficientes: $\beta_0 = -13.47$ y $\beta_1 = 2.49$ para todas las células registradas ($n=12$, $r=0.92$, $p=2.33 \times 10^{-5}$); $\beta_0 = -17.77$ y $\beta_1 = 2.55$ para las células control (n=8, $r=0.92$, $p=0.001$); y $\beta_0 = -9.03$ y $\beta_1 = 2.50$ para las células epilépticas ($n=4$, $r=0.96$, $p=0.008$). A partir de la estimación del espesor de la subcapa piramidal (B y C) es posible asignar las células no-marcadas a los grupos superficial y profundo (D).

se identificaron aquellos animales que exhibieron actividad exploratoria, definida ésta como deambulación por al menos 3 *bins* virtuales de 10×10 cm en una caja de 40×40 cm ($4 \times 4 = 16$ *bins* en total). Se computó la frecuencia de disparo total, el número de SPW-r, la participación durante los SPW-r y la frecuencia de disparo durante los eventos en cada *bin*. Se realizó un test de permutación Fisher-Pitman, que consiste en permutar los valores de ubicación al azar para cada evento (100 repeticiones), y posteriormente contrastar la diferencia estadística entre el

valor observado y la distribución aleatoria. También se contrastó si la distribución de SPW-r estuvo espacialmente sesgada. Para la modulación espacial de la frecuencia de disparo se procedió de forma similar pero permutando la posición del animal (vector espacial completo). Finalmente, para considerar los efectos espaciales sobre la variación de la participación y el reclutamiento por los SPW-r se estimó el coeficiente de variación (SD /media) en función del número de *bins* visitados para todas las células.

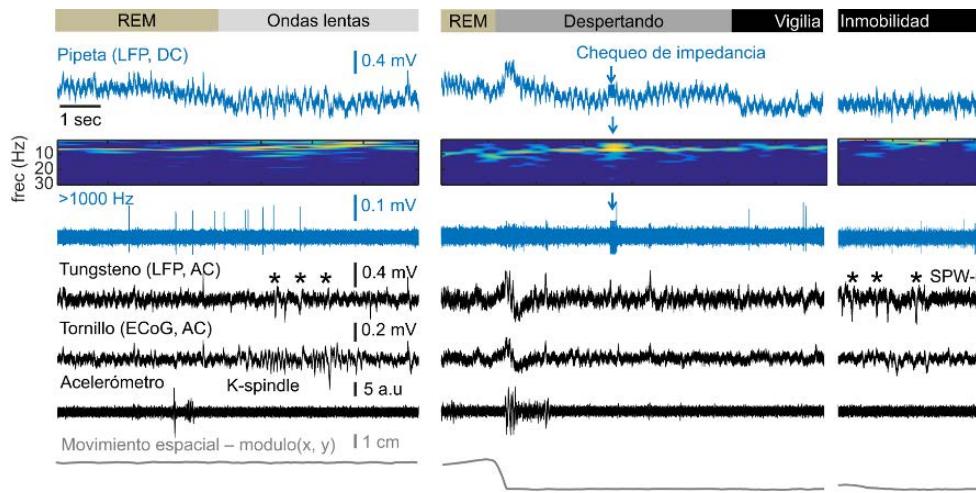


Figura 2.7: Definición de los estados comportamentales/electrográficos en los registros yuxtacelulares con libertad de movimiento. En asterisco se marcan los eventos SPW-r.

2.4.4. Análisis SOM

Se empleó un algoritmo de aprendizaje no supervisado – SOM (*self organizing maps*) – para explorar la selectividad celular durante los SPW-r y los *fast ripples*. SOM es capaz de colapsar la multidimensionalidad de un problema en dos ejes, conservando la distancia topológica de los elementos originales (Kohonen, 2001). Este método ha sido previamente aplicado en neurociencia para el estudio de la orientación de las corteza visual (Shouno y Kurata, 2001; Obermayer y Blasdel, 1993a) y el reclutamiento en los SPW-r *in vitro* (Reichinnek et al., 2010). Para implementar SOM se usó la *toolbox* «Matlab SOM open source» (Universidad de Tecnología de Helsinki, <http://www.cis.hut.fi/projects/somtoolbox/>).

Previo a la aplicación de SOM en los eventos SPW-r se debe definir el número de muestras a clasificar, las dimensiones o características de estas muestras, y el formato del mapa bidimensional en el que SOM

colapsará el problema. Para cada célula un total de N eventos individuales (≥ 50) constituyeron la muestra. Los datos suministrados al algoritmo SOM consistieron en el LFP filtrado en paso banda entre 10-600 Hz y subsampleado a 5 kHz. De cada evento se extrajeron los 10 primeros componentes principales (PCA, que representaban alrededor del 75 % de la varianza), que posteriormente fueron normalizados. Por tanto, al algoritmo se le presentaba un problema de clasificación de 10 dimensiones (los 10 componentes principales de los eventos). La reducción de dimensionalidad que ejecuta SOM sigue un proceso iterativo y competitivo que preserva las distancias euclidianas del espacio original en el mapa reducido. Una vez aplicado el algoritmo con 1000 iteraciones, los SPW-r quedaron organizadas y agrupadas en la matrices SOM bidimensionales según sus relaciones topológicas. Todos los eventos integrados en un elemento dada de la matriz presentaban una morfología semejante, y a su vez son

similares a los elementos de los *bins* vecinos. Se computaron los siguientes parámetros celulares y extracelulares asociados a cada *bin*: (i) frecuencia de potenciales de acción de la célula registrada y (ii) participación, en los experimentos yuxtagcelulares en libertad de movimiento; y adicionalmente en los registros intracelulares con LFP simultáneo: (iii) *driving force* intracelular, (iv) sumidero de corriente en SR, (v) fuente de corriente en SP, (vi) frecuencia de MUA de SP en CA3, (vii) *fast ripple index* y (viii) entropía espectral.

Para profundizar en la distribución de las HFO generada por SOM se analizó la matriz de distancia unificada (matriz *U*), generada por el algoritmo durante la reducción de dimensionalidad. La matriz *U* parametriza las distancias euclídeas, duplicando los elementos del mapa SOM en sus bordes (figura 2.8). En otras palabras, una distancia significativa advertida por la matriz *U* refleja notables diferencias entre los elementos que separa. La exploración de la matriz *U* reveló ciertas constelaciones discretas de eventos en los mapas bidimensionales, por lo que se aplicó un algoritmo estándar de clasificación *k-means* sobre los elementos de SOM. Una vez realizado este paso todos los SPW-r registradas para cada célula quedaban agrupadas en un número reducido (3-12) de clústers. En cada clúster se computaron los parámetros celulares y extracelulares aludidos en los elementos de SOM, y aprovechando el considerable aumento de eventos por grupo (al emplearse como clasificador los clústers en vez de los elementos) se estimó V_{rev} en el tiempo por clústers, además de todos los parámetros cinéticos descritos en la sección 2.4.2. Para evaluar la preferencia de las células registradas por determina-

dos clústers se estimaron dos parámetros: la «selectividad celular», definida como:

$$\text{Selectividad Celular} = SD(p(P_K)) \quad (2.4)$$

y la información de la participación por clúster (Información_K), como:

$$\text{Información}_K = \sum p(P_K) - 1/\log_2 P_K \quad (2.5)$$

donde P_K es la participación por clúster. Ambos parámetros fueron contrastados estadísticamente contra 1000 permutaciones de la organización de eventos por clúster, y posteriormente Z normalizados por su media y la desviación estándar obtenida por las 1000 permutaciones.

Cabe destacar que SOM implícitamente segregá grupos que podrían no existir en el problema multidimensional original. SOM representa un modelo probabilístico que debe ser validado. En general, los algoritmos de clasificación están basados en procesos iterativos capaces de hallar grupos independientemente de la varianza de los datos de entrada. Si ésta es muy pequeña, el resultado puede estar fuertemente condicionado por las condiciones aleatorias iniciales y el número de iteraciones. Por tanto, el número de clústers de SPW-r obtenidos en SOM no refleja necesariamente entidades discretas (Reichinnek et al., 2010). No obstante, la gradación y consistencia en la morfología de los eventos agrupados, y el comportamiento celular son los factores que contribuyen a la validación neurofisiológica del método.

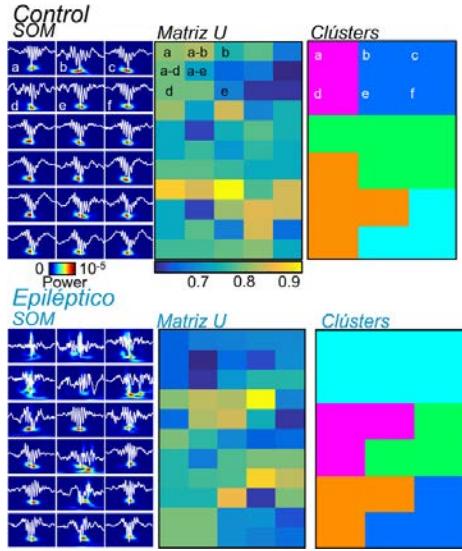


Figura 2.8: Definición de clústers a partir de mapas SOM. La matriz U muestra la distancia euclídea ($a-b$, $b-c$, etc...) entre elementos vecinos (a,b,c,...). Nótese, en el ejemplo control (arriba), la distancia estimada entre a y d respecto b y e , y la consiguiente definición de clústers.

2.5. Procedimientos estadísticos

Las células de las diferentes regiones y subregiones hipocampales fueron asignadas a diferentes grupos según los siguientes criterios: (i) CA1, CA2 y CA3, en base a su posición anatómica y el perfil inmunohistoquímico; (ii) células de CA1 despolarizadas e hiperpolarizadas durante los SPW-r, según su respuesta de membrana sub-umbral a los eventos registrados; (iii) células de CA1 profundas y superficiales, según la localización (o la predicción asociada, véase figura 2.6) de su centro somático respecto a la subcaba CB+; (iv) CB+ y CB-, según el procedi-

miento descrito en la sección 2.3, página 38; (v) las células registradas yuxtagelularmente en ratas con libertad de movimiento fueron clasificadas como células de CA1 piramidales, en base a la similitud de su potencial de acción y autocorrelograma con los obtenidos de células confirmadas histológicamente.

Los estadísticos descriptivos por grupo han sido reportados como media \pm SD o IC95, generalmente con todos los datos individuales representados, o cuartiles Q_1 , Q_2 y Q_3 y valores máximo y mínimo como diagrama de cajas y bigotes. No se utilizaron métodos estadísticos para determinar el tamaño de las muestras, pero los tamaños muestrales son similares a los reportados en estudios previos (Aivar et al., 2014; Viney et al., 2013). Los análisis estadísticos fueron realizados en MATLAB, y consistieron en ANOVA de dos vías, ANOVA de medidas repetidas, correlación de Pearson, t de Student (pareado o no pareado), U de Mann-Whitney, prueba χ^2 y test de permutación Fisher-Pitman, considerando un valor $p < 0.05$ como estadísticamente significativo. Como prueba *post hoc* se empleó la prueba Tukey-Kramer de dos colas.

Para el modelo lineal general (GLM) del desempeño cognitivo en función de diferentes parámetros electrofisiológicos, el índice de discriminación DI obtenido en las tareas comportamentales fue modelado como una combinación lineal de las siguientes variables: *fast ripple index*, entropía, coherencia de *theta*, *power* de *theta* y modulación *theta-gamma*, empleando la función **fitglm** de Matlab, y asumiendo su distribución normal. El impacto de cada variable en el GLM construido fue contrastado con un ANOVA de tantas vías como número de variables, y del cual se extrajo un valor p , corregido

según Tukey-Kramer. Se considera que las variables explicativas presentan un impacto significativo en DI siempre y cuando $p < 0.05$.



3 | Resultados

3.1. Heterogeneidad hipocampal durante los SPW-r

SE combinaron registros intracelulares con pipetas afiladas (*sharp*) con sistemas de registro multi-canal de 16 canales (métodos, sección 2.2.1) con objeto de examinar el comportamiento y la identidad inmunohistoquímica de células piramidales (PC) de CA1 dorsal en ratas normales antestesiadas ($n=22$). Sorprendentemente, observamos dos perfiles opuestos de respuesta a potencial de membrana en reposo (RMP) durante los eventos SPW-r: despolarización (figura 3.1; 4.1 ± 2.3 mV, $n=12$; respuesta medida en el pico negativo en SR) e hiperpolarización (-2.4 ± 1.2 mV). El potencial de membrana en reposo fue similar en estos grupos ($PC_{desp}: -63.8\pm5.1$ mV, $PC_{hiper}: -61.4\pm2.9$ mV, $t_{20}=1.68$, $p=0.17$; t de Student no pareada). Las respuestas intracelulares eran sistemáticas a través de todos los SPW-r registrados, aunque de amplitud variable.

La estimulación eléctrica contralateral (cCA3) e ipsilateral (iCA3) de CA3 reprodujo tal comportamiento para intensidades de corriente inferiores a $500\mu V$ (figura 3.2A; cCA3: 11 PC_{desp} /7 PC_{hiper} , $F_{1.22,3.69}=15.24$, $p=0.019$; iCA3: 4 PC_{desp} /

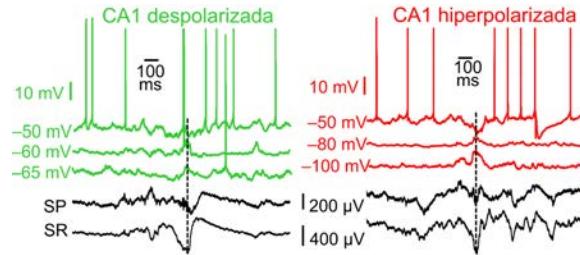


Figura 3.1: Respuestas heterogéneas las PC de CA1 durante los SPW-r. A la izquierda trazos de una PC_{desp} representativa (en verde) exhibiendo excitación neta durante los eventos SPW-r simultáneamente registrados (trazos negros). A la derecha, ejemplo de PC_{hiper} (en rojo) experimentando hiperpolarización durante el evento. En líneas discontinuas se muestra el método de alineamiento, en este caso por el *pico negativo* de la SPW.

4 PC_{hiper} , $F_{1.07,4.27}=6.33$, $p=0.060$; ANOVA de medidas repetidas), consistente con respuestas evocadas por la proyección excitatoria de CA3, y con el origen de los SPW-r en su sistema colateral. Tales supuestos se confirmaron mediante infusión local de antagonistas de glutamato CNQX/AP5 (figura 3.2B-D, 3 mM/30 mM, Sigma).

De hecho, el potencial de reversión (V_{rev}) de las respuestas durante los SPW-r y para la estimulación de cCA3 arrojaba diferencias estadísticas entre PC_{desp} y PC_{hiper}

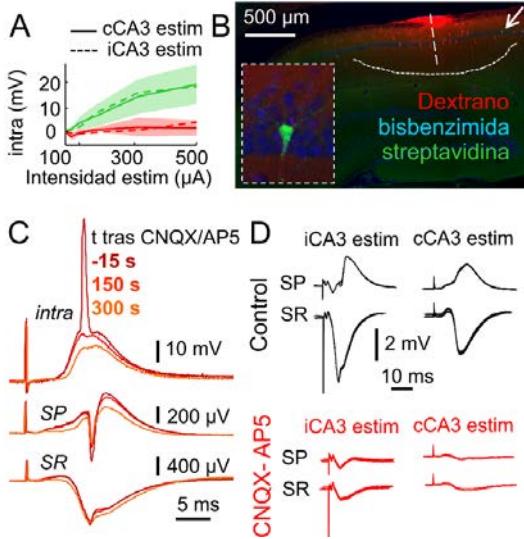


Figura 3.2: Las respuestas evocadas por la estimulación eléctrica en CA3 reproducen el comportamiento de las PC durante los SPW-r. (A) Diferencias en las curvas *input/output* de entre PC_{desp} (verde) y PC_{hiper} (rojo) para un amplio rango de corrientes aplicadas a CA3. Se muestra la media \pm SD. (B) Micrografía de la infusión local de CNQX/AP5, que disminuyó la respuesta de las célula simultáneamente registrada a una distancia de 1 mm, durante la duración de su registro (5 min, C) y a término del experimento (D, \sim 15 min) ocluyó completamente la respuesta extracelular evocada por CA3.

que co-variaban entre las células (figura 3.3A). En PC_{hyper} , el V_{rev} estimado durante las respuestas a SPW-r era de -65.9 ± 4.4 mV, relativamente próximo al potencial de reversión del GABA_A (-70 mV), mientras que en PC_{hiper} reflejaba una combinación de componentes excitatorios e inhibitorios (-58.6 ± 4.8 mV) (figura 3.3A,B). La *driving force* ($V_{rev} - RMP$) fue notablemen-

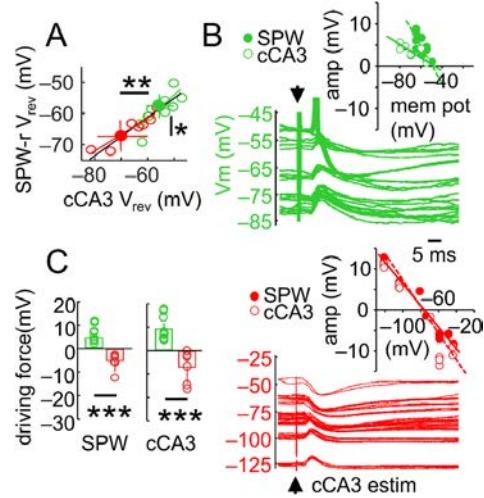


Figura 3.3: Una combinación diferencial de excitación e inhibición segregó los modos de respuesta durante los SPW-r. (A) V_{rev} durante los SPW-r y la estimulación de CA3 co-varía entre las células, es eminentemente GABAérgico en las PC_{hiper} (B'), y excitatorio e inhibitorio para las PC_{desp} (B). (C) Diferencias significativas en la *driving force* que inducen tanto los estímulos espontáneos como los evocados. ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0001$

te diferente para ambos perfiles de respuesta (figura 3.3C; SPW-r: $t_{19}=7.85$, $p < 0.0001$; cCA3: $t_{16}=5.09$, $p=0.0001$; t de Student no pareada para 11 PC_{desp} /10 PC_{hiper}). Estos datos sugieren una diferente participación de las neuronas glutamatérgicas de la región CA1 durante los eventos celulares básicos asociados a los procesos de consolidación de la memoria dependiente de hipocampo.

Posteriormente se abordó la relación entre la dinámica intracelular y los componentes extracelulares asociados a los SPW-r. Si bien el sentido de la respuesta intracelular fue consistente entre eventos, su amplitud fue variable. Para examinar las re-

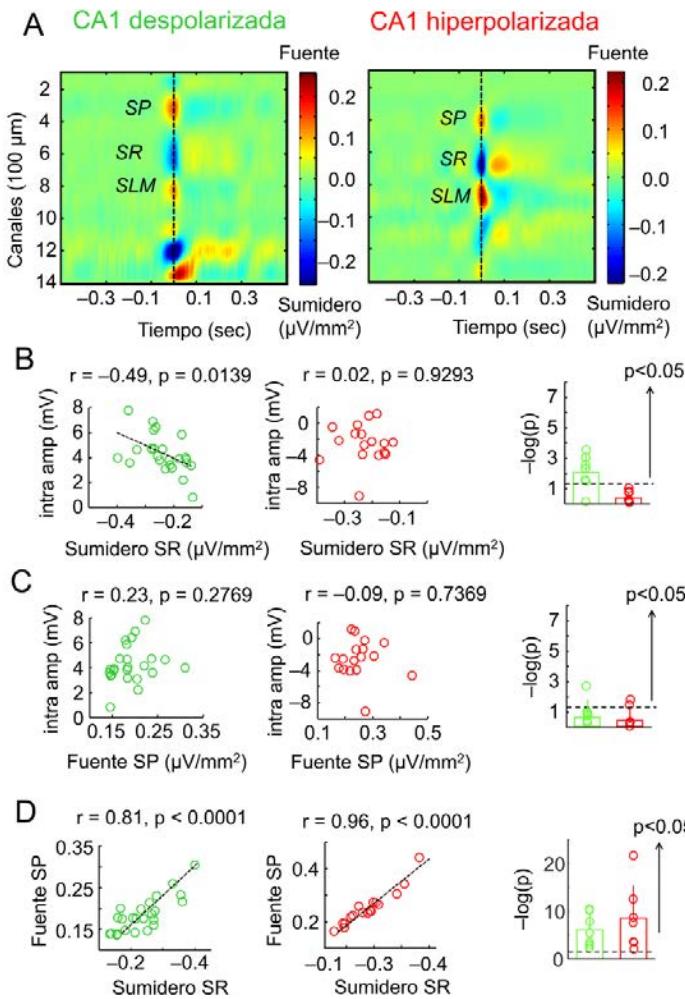


Figura 3.4: Las PC_{desp} experimentan en mayor medida los sumideros de corriente en SR inducidos por los SPW-r. (A) Perfil de sumideros y corrientes durante los SPW-r para una PC_{desp} y una PC_{hiper} representativas. Los paneles en B muestran la correlación entre la respuesta intracelular y el sumidero de corriente en SP (izquierda PC_{desp} y centro PC_{hiper}) para los experimentos de A, y el logaritmo del valor p de las correlaciones de Pearson para todas las células consideradas ($n = 7$ PC_{desp} y $n = 7$ PC_{hiper}). Nótese la asociación entre la respuesta extracelular y las PC_{desp}. (C) *Idem* a B pero para la fuente de corriente en SP. (C) *Idem* a B pero para la relación entre fuente y sumidero.

glas circuitales asociadas tal varianza, se estimaron los sumideros y fuentes de corriente durante los SPW-r mediante CSD en aquellos experimentos en los cuales el sistema de electrodos extracelular recorrió todo perfil hipocampal (desde SO a SLM,

$n=7$ PC_{desp} y $n=7$ PC_{hiper}). La amplitud de la respuesta intracelular a RMP correlacionó con el sumidero de corriente en SR para las PC_{desp}, y no así para las PC_{hiper} (figura 3.4A,B; $\chi^2_{3.14}=10.50$, $p=0.0012$; test χ^2), consistente con un mayor influjo de excitación proveniente de CA3 alcanzando el soma de las PC_{desp}. Los sumideros y las fuentes de corriente para ambos grupos celulares fueron similares (Sumidero en SR: $t_{12}=-0.04$, $p=0.9671$; fuente en SP: $t_{12}=0.59$, $p=0.5651$). Llamativamente, se halló poca co-variación entre la repuesta intracelular y la fuente de corriente en SP, a pesar de la fuerte correlación entre los flujos de corriente entre SP y SR (figura 3.4C,D).

El segundo elemento extracelular que compone los SPW-r son los *ripples* de SP, que se propone están compuestos de un fuerte componente inhibitorio rítmico (Ylinen et al., 1995). Por tanto, se evaluó si las oscilaciones intracelulares asociadas a estos eventos se manifestaban diferentemente entre ambos tipos de respuesta, PC_{desp} y PC_{hiper}. Durante los SPW-r, y a RMP, la respuesta de las células exhibió oleadas de actividad sináptica con máximos espectrales en la banda de frecuencia *ripple*, 90-200 Hz. El power de los *ripples* intracelulares fue significativamente menor en las PC_{desp} respecto a las PC_{hiper} (figura 3.5; $t_{19}=-2.76$, $p=0.0124$; t de Student no pareada). Es más, la cros-correlación entre los trazos intracelulares y extracelulares sugirió menor interacción con los *ripples* extracelulares para las PC_{desp} (figura 3.5; $t_{19}=-2.68$, $p=0.0147$; t de Student no pareada). Ninguno de estos parámetros fue dependiente del RMP ni de la distancia al sistema de electrodos extracelular (figura 3.5F; $n=9$ PC_{desp}: $510\pm347\text{ }\mu\text{m}$; $n=5$ PC_{desp}: $417\pm170\text{ }\mu\text{m}$; $t_{12}=0.55$, $p=0.5892$; t de Stu-

dent no pareada). En consecuencia, los componentes de alta frecuencia – *ripples* – asociados a los SPW-r extracelulares reflejan, en mayor medida, los flujos de corriente a través de la membrana de las PC_{hiper} que de las PC_{desp}.

Si bien, clásicamente se ha sumido que las piramidales de CA1 constituyen un conjunto homogéneo durante los SPW-r (Klausberger y Somogyi, 2008), estos datos evidencian la contribución heterogénea de las PC de CA1.

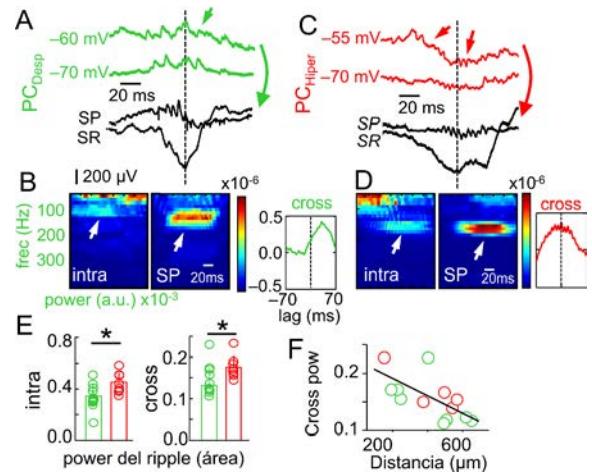


Figura 3.5: Componente *ripple* en PC_{desp} y PC_{hiper}. (A) Ejemplo de la actividad sináptica de una PC_{desp} durante los eventos SPW-r. (B) Espectro tiempo-frecuencia y cros-correlación de A. (C,D) *Idem* a A y B para una PC_{hiper}. (E) Power intracelular y cros-correlación en la banda *ripple* para todas las PC. (F) Relación entre la de cros-correlación y la distancia al electrodo extracelular ($p=0.0137$, $r_{12}=-0.64$; Correlación de Pearson). * $p<0.05$.

3.2. Determinantes anatómicos de la heterogeneidad piramidal en CA1

A continuación, se examinaron los posibles mecanismos anatómicos subyacentes a la diversidad en la respuesta a los SPW-r en aquellas células que fueron satisfactoriamente marcadas (figura 3.6 $n=11$ PC_{desp}, $n=7$ PC_{hiper}). Ni la posición anteroposterior ($t_{16}=-0.43$, $p=0.6713$), ni la mediolateral ($t_{16}=0.35$, $p=0.7262$), ni la distancia a CA2 ($t_{16}=-0.11$, $p=0.9159$) exhibieron diferencias entre PC_{desp} y PC_{hiper}. Por contra, se hallaron notables efectos de la distancia celular al borde con SP ($t_{16}=-2.72$, $p=0.0152$; t de Student no pareada), con las PC_{desp} ubicadas superficialmente (adyacentes al borde con SP) y las PC_{hiper} más profundas. Típicamente, las células superficiales muestran mayor inmunoreactividad para el marcador calbinina (CB; Slomianka et al., 2011), y en consecuencia las PC_{desp} fueron mayoritariamente immunopositivas para CB (CB+; 8 de 11), mientras que gran parte de las PC_{hiper} fueron immunonegativas (CB-; 5 de 7; $\chi^2=3.18$, $p=0.0660$; test χ^2) (figura 3.6).

Con objeto profundizar en la relación entre los ejes de heterogeneidad descritos – respuesta a los SPW-r e identidad histológica – se correlacionó la expresión de CB y la posición en la capa piramidal con los parámetros electrofisiológicos, V_{rev} y *driving force* durante los SPW-r. V_{rev} mostró diferencias estadísticas para la posición superficial o profunda de las células (figura 3.7; PC_{Sup}: -63.2 ± 4.1 mV; PC_{Prof}: -58.8 ± 5.0 mV; $t_{16}=1.86$, $p=0.0405$; t de Stu-

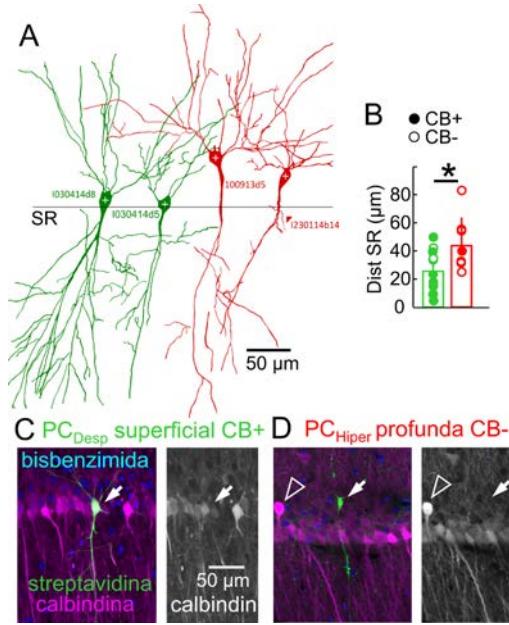


Figura 3.6: Identidad de las PC_{desp} y las PC_{hiper}. (B) Dibujos de cámara lúcida a partir de secciones reveladas con DAB. (B) Diferencias entre PC_{desp} y PC_{hiper} en su distancia al borde con SP. La expresión de CB se muestra como círculos y puntos. (C) PC_{desp} superficial CB+. PC_{hiper} profunda CB-. Con un triángulo abierto se muestra una PC_{prof} claramente CB+. * $p<0.05$.

dent no pareada), definida según la posición del soma celular respecto a la subcapa CB+ local. Tales efectos fueron incluso mayores cuando, en vez del V_{rev} , la *driving force* fue considerada (figura 3.7; PC_{Sup}: 4.18 ± 4.62 mV; PC_{Prof}: -2.41 ± 3.56 mV; *rank sum* = 140, $p=0.0135$; *U* de Mann-Whitney). Sin embargo, en ambos casos las diferencias fueron marginales para la inmunoreactividad a CB+, debido tanto a la dispersión de los datos, como a outliers CB+ en la subcapa profunda (ver 3.6, ver triángu-

lo). En cualquier caso, estos datos describen una clara ortogonalización laminar de las dinámicas intracelulares respecto al eje radial de SP en CA1.

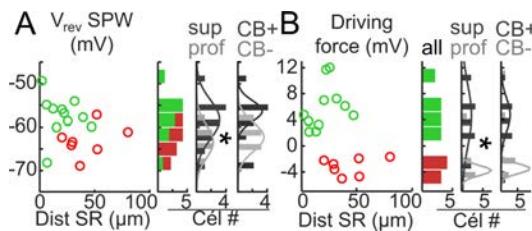


Figura 3.7: Respuesta a los SPW-r en el eje radial de SP. (A) Relación entre V_{rev} y la distancia a SR agrupada según PC_{desp} y PC_{desp}, PC_{sup} y PC_{prof} y CB+ y CB-. (B) *Idem* para la driving force durante los SPW-r. * $p<0.05$.

Posteriormente se exploraron los mecanismos subyacentes a la heterogeneidad circuital descrita. Considerando las diferencias en el V_{rev} y el fuerte componente *ripple* en la membrana de las PC_{Prof}, la inhibición GABAérgica parece ser un factor capital en nuestras observaciones. Para contrastar tal hipótesis, se examinó la distribución espacial de las sinapsis GABAérgicas, inmunoreactivas para *gephyrin* (*gephyrin*+) en SP. En estos estudios se consideraron los botones sinápticos procedentes de las interneuronas cesto que expresan parbalvúmina (PVbc) o colecistokinina (CCKbc), dado que ambas poblaciones engloban la práctica totalidad de la inhibición somática de CA1 (Freund y Buzsáki, 1996). Se evaluó estereológicamente la densidad de botones post-sinápticos *gephyrin*+ que colocalizaban con la expresión presináptica de PV y CB1R (este último característico de las CCKbc; Katona et al., 1999) so-

bre la membrana de PC identificadas con el marcador específico Wfs1 (figura 3.8A). Se encontró mayor abundancia de sinápsis de PVbc (*gephyrin*+/PV+) sobre las PC_{Prof} (figura 3.8B-D; $n = 34$ células de 3 ratas; $r_{32}=0.39$, $p=0.0162$) y un perfil inverso para las CCKbc (*gephyrin*+/CB1R+), más numerosas sobre las PC_{Sup} (figura 3.8B,C,E; $r_{32} = -0.46$, $p=0.0046$; correlación de Pearson). Cabe destacar que, si bien, la mayoría de las sinápsis somáticas sobre las PC de CA1 provienen de PVbc o CCKbc (Takács et al., 2014), otras áreas perisomáticas adyacentes de las PC (tales como las dendritas proximales) reciben inhibición de distintas poblaciones GABAérgicas (Freund y Buzsáki, 1996). En cualquier caso, la contribución diferencial de inhibición mediada por PVbc y CCKbc entre PC_{Sup} y PC_{Prof} contribuye a explicar la respuesta heterogénea durante los SPW-r, sobretodo considerando que las PVbc son enérgicamente reclutadas por estos eventos mientras que las CCKbc raramente disparan (sección 1.2.2, Klausberger y Somogyi, 2008). Estos resultados fueron confirmados por otros miembros del laboratorio en registros *whole-cell in vitro*, bloqueando específicamente la actividad de las PVbc (empleando el agonista μ -opiode DAMGO) y las CCKbc (mediante el agonista cannabinoide WIN55,212) (Valero et al., 2015).

3.3. Dinámica celular a lo largo del Asta de Ammon

Posteriormente se examinó la contribución de la actividad de las PC de CA3 y CA2 durante las SPW-r. Todas las PC de

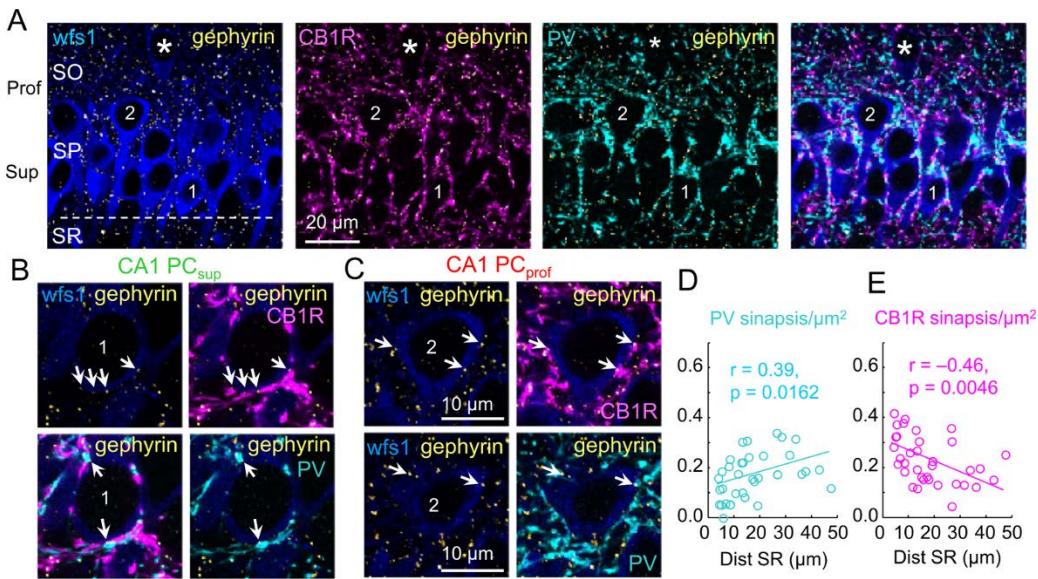


Figura 3.8: Innervación GABAérgica somática de las PC. (A) 1 y 2 identifican una PC_{sup} y una PC_{prof}, respectivamente. En asterisco una PC de SO. (B) Sección óptica (0.29 μm) de PC_{sup} 1 con 4 botones sinápticos gephyrin+/CB1R+, probablemente provenientes de CCKbc, y 2 peri-sinápsis de gephyrin+/PV+. (C) *Idem* para PC_{prof} 2. (D) Correlación de la densidad de gephyrin+/PV+ y distancia a SR. (E) Tendencia opuesta para gephyrin+/CB1R+.

CA3 confirmadas histológicamente exhibieron despolarización y potenciales de acción durante los SPW-r registrados en CA1 (figura 3.9; $n=4$; $V_{\text{rev}}: -59.2 \pm 7.9 \text{ mV}$, *driving force*: $0.6 \pm 0.3 \text{ mV}$).

Sorprendentemente, todas las células de CA2, cuya identidad fue confirmada mediante el marcador PCP4 (Kohara et al., 2014), mostraron una respuesta hiperpolarizada a los SPW-r ($n=4$; $V_{\text{rev}}: -62.4 \pm 2.1 \text{ mV}$, *driving force*: $-1.4 \pm 0.3 \text{ mV}$), y resultaron inhibidas por la estimulación eléctrica de CA3 ($V_{\text{rev}}: -63.1 \pm 1.4 \text{ mV}$, *driving force*: $-3.9 \pm 1.3 \text{ mV}$) (figura 3.10).

Una vez estudiada la respuesta intracelular de las poblaciones PC_{desp}, PC_{hiper}, PC

de CA2 y PC de CA1, se procedió a evaluar su dinámica de disparo durante los SPW-r registrados en CA1 construyendo histogramas peri-evento (PETH) de los potenciales de acción obtenidos a RMP. Consistente con el origen de los SPW-r en la red auto-asociativa de CA3, las PC de CA3 fueron significativamente reclutadas por los SPW-r (figura 3.11; $t_3 = -3.27$, $p = 0.0464$; t de Student pareada), y el máximo de su respuesta era $-23.7 \pm 9.5 \text{ ms}$ anterior a los SPW-r extracelulares de CA1 (estimado a partir de histogramas con un tamaño de *bin* de 5 ms; $t_3 = -6.48$, $p = 0.0074$; t de Student de una muestra). En contraste, las células de CA2 consistentemente suprimie-

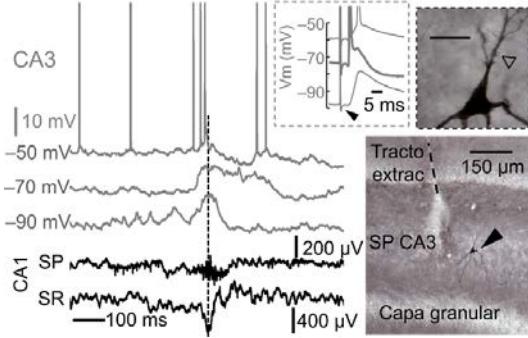


Figura 3.9: PC de CA3 durante los SPW-r. Despolarización concurrente a los eventos registrados en CA1. El sub-eje en recuadro discontinuo muestra la respuesta para la estimulación eléctrica de CA3 contralateral. Nótese el potencial de acción antidirómico. En triángulo abierto, las *thorny excrescences*.

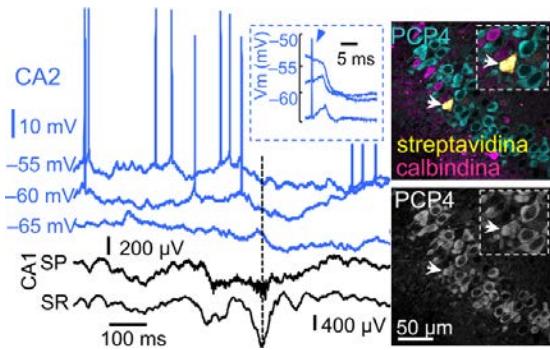


Figura 3.10: PC de CA2 durante los SPW-r. Respuesta hiperpolarizada de una célula de CA2, inmunoreactiva para PCP4, durante los SPW-r CA1.

ron su actividad supra-umbral (figura 3.11; $t_2=3.13$, $p=0.0441$; t de Student pareada). Por su parte, las PC_{desp} fueron notablemente reclutadas durante los SPW-r ($t_7=3.13$, $p=0.0441$; t de Student pareada), mientras que las PC_{desp} disminuyeron su frecuencia

de disparos (figura 3.11; $t_6=2.89$, $p=0.0275$; t de Student pareada). Todos los valores obtenidos son consistentes con los reportados para registros extracelulares de PC de CA3 y CA1 (Csicsvari et al., 2000; Klausberger et al., 2003; Tukker et al., 2007).

En consecuencia, la participación de las PC de CA1 durante los SPW-r, definida como la proporción de eventos con al menos un potencial de acción, fue significativamente mayor para las PC_{desp} que para las PC_{hiper} ($t_{12}=3.63$, $p=0.0034$; t de Student no pareado) y estuvo positivamente asociada a la *driving force* experimentada por las células (figura 3.12A,B). Es más, en el subconjunto de células recuperadas histológicamente, se confirmó que su participación y frecuencia de potenciales de acción, durante los SPW-r, correlacionaba con la distancia a SR (figura 3.12C).

En conjunto, estos datos muestran una importante heterogeneidad en CA1 durante los SPW-r, eventos fundamentales para los procesos de consolidación de la memoria dependiente de hipocampo (Girardeau et al., 2009; Buzsáki, 2015). A tal heterogeneidad subyacen dos identidades celulares opuestas, PC_{Sup} y PC_{Prof}, ubicadas en diferente posición laminar en CA1 y enclavadas en distintos micro-circuitos hipocampales. Las PC_{Prof} reciben más aferencias inhibitorias de las PVbc locales (Lee et al., 2014; Valero et al., 2015), fuertemente reclutadas por los SPW-r (Klausberger y Somogyi, 2008), así como proyecciones excitatorias desde CA2 (Kohara et al., 2014), inhibidas durante los *ripples*. Ambos factores contribuyen a explicar su respuesta hiperpolarizada y la supresión de sus disparos. Por contra, las PC_{Sup} presentan más inhibición somática proveniente de las CCKbc, escasamente

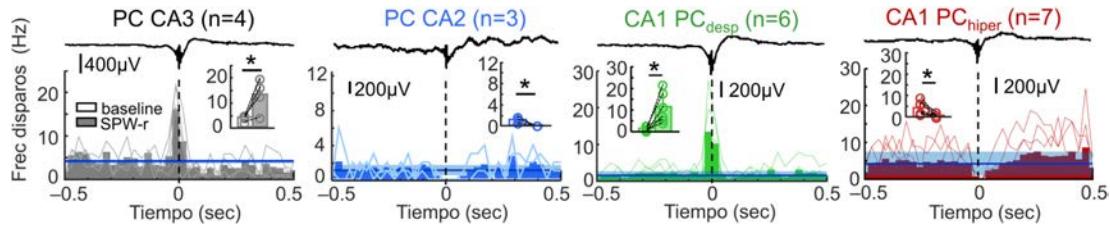


Figura 3.11: Actividad supra-umbral de las PC hipocampales en los SPW-r. PETH de los potenciales de acción de PC de CA3, CA2 y CA1 registradas intracelularmente *in vivo* durante los eventos espontáneos. * $p<0.05$.

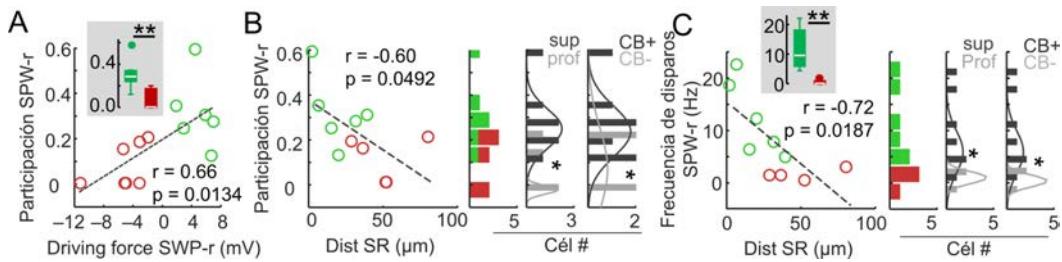


Figura 3.12: Modulación del reclutamiento de las PC en CA1 en el eje radial. (A) La *driving force* que experimentan las células explica su participación en los SPW-r (ratio de eventos con al menos un potencial de acción respecto al total). (B) La participación de las PC durante los SPW-r está negativamente modulada por la distancia a SP. Este efecto es capturando tanto cuando las células se agrupan como PC_{sup} y PC_{prof}, como por su expresión de CB. (C) *Idem* para la frecuencia de disparos. * $p<0.05$.

moduladas por los SPW-r, y experimentan menos inhibición *feed forward* reclutada por CA3. En consecuencia se despolarizan y disparam durante los SPW-r.

3.4. Influencia del estado cerebral y la codificación espacial

El reclutamiento celular durante los SPW-r es un proceso dinámico. Depende de varios factores, entre los que destacan el estado comportamental (Katona et al., 2014), la historia previa de las células individua-

les (Wilson y McNaughton, 1994), la posición espacial del animal (O'Neill et al., 2006; Roumis y Frank, 2015) y la integridad del circuito (Bragin et al., 1999). Nuestras condiciones experimentales – animales uretanizados – constituyen en sí mismo un estado cerebral, con su característico cóctel de neurotransmisores y balance de excitación/inhibición. Es más, gran número de fármacos afectan la emergencia de SPW-r¹.

¹Aunque los animales anestesiados con uretano exhiben transiciones cerebrales similares al sueño, este fármaco afecta la mayoría de los sistemas neuromoduladores en los que ha sido testado. Concretamente incrementa la transmisión de los receptores de

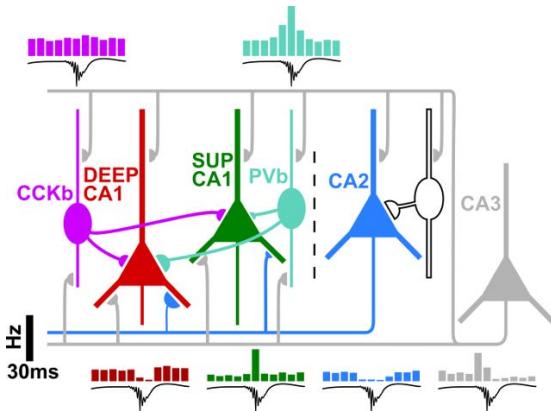


Figura 3.13: Mecanismos de la dinámica de las PC hipocampales durante los SPW-r. La actividad proveniente de CA3 (en gris) se propaga a las PC e interneuronas de CA2 y CA1. La actividad de las PC de CA2 (en azul) es suprimida por las interneuronas locales. Las PVbc (cian) inhiben a las PC_{Prof} (rojas), previamente liberadas de la excitación de las PC de CA2. La oleada excitatoria de CA3 domina sobre las PC_{sup} (verdes), inervadas por las CCKbc, que disparan erráticamente durante los SPW-r.

Para contrastar el efecto *real* del eje de variabilidad superficial-profundo descrito en los experimentos precedentes, se implementaron registros yuxtagelulares de célula única con pipeta de vidrio en animales con libertad de movimiento ($n=11$ células). Para ello, se usó un micro-manipulador manual, que permitía su ensamblado en condiciones completamente exentas de anestesia (Korshunov, 1995). Tras los registros, que englobaron períodos de locomoción, vigilia y sueño (ver métodos, figura 2.7), las células fueron electroporadas con neurobiotina para su posterior identifi-

glicina y de GABA_A, y antagoniza receptores glutamatérgicos como los NMDA (Hara y Harris, 2002).

cación y análisis histológico. La morfología del potencial de acción y el perfil de los autocorrelogramas de las células identificadas fue empleada para concluir la identidad piramidal de aquellas células que no incorporaron satisfactoriamente la neurobiotina.

En primer lugar, se examinó el efecto del estado comportamental en la participación celular durante los SPW-r registrados en condiciones de sueño de ondas lentas y vigilia para la misma célula y animal (figura 3.14A-D; ≥ 10 eventos por condición, $n=6$ PC de CA1; 1 histológicamente confirmada). Si bien no hubo efecto del estado comportamental en la frecuencia de disparos basal ($t_5=-1.52$, $p=0.1887$) o durante los SPW-r ($t_5=0.18$, $p=0.8661$), las PC de CA1 aumentaron su participación durante los SPW-r que emergen en vigilia respecto a sueño de ondas lentas (figura 3.14E; $t_5=-2.17$, $p=0.0420$; t de Student no pareada).

Con objeto de estudiar la modulación espacial en las respuestas de las PC, se consideraron aquellos registros en los que los animales mostraron actividad exploratoria en al menos más de dos ubicaciones de la caja de registro (figura 3.15A-D; $n=6$, 3 histológicamente confirmadas). Un test de permutación (100 réplicas) confirmó modulación espacial de la frecuencia de disparos durante los SPW-r para un tercio de estas células (2 de 6). Es más, la variabilidad de la actividad durante los SPW-r estaba fuertemente correlacionada con la actividad exploratoria desplegada por los animales (figura 3.15E, $r_{11}=0.71$, $p=0.0134$; correlación de Pearson), confirmando el impacto espacial sobre el reclutamiento celular durante los SPW-r.

A continuación se consideró la posición laminar de las células como variable explicati-

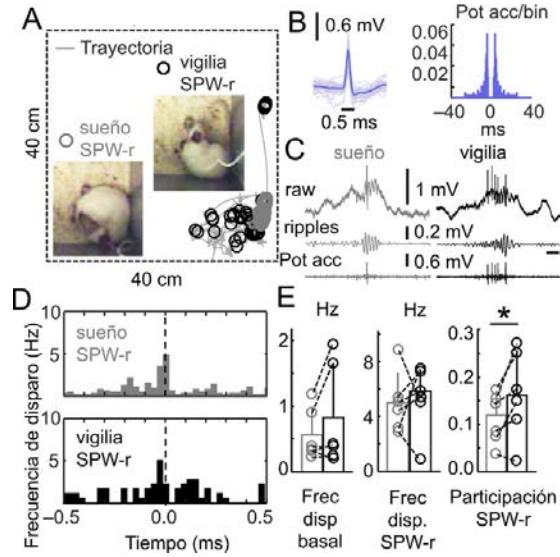


Figura 3.14: Control comportamental de la participación durante los SPW-r. (A) Potenciales de acción obtenidos mediante registros yuxtacelulares en animales con libertad de movimiento durante periodos de sueño (en gris) y vigilia (en negro). El trazo gris muestra la trayectoria del animal. (B) Potenciales de acción y autocorrelograma de la célula referida en A. (C) Ejemplos representativos de SPW-r en sueño y vigilia para la célula de A. (D) PETH para los eventos que emergen en sueño y vigilia en A. (E) Los efectos de estado únicamente fueron significativos para la participación durante los SPW-r, positivamente modulada durante la vigilia. $*p<0.05$.

va de su actividad durante los SPW-r. Ni la participación, ni la frecuencia de disparos, ni la modulación espacial mostraron diferencias para el eje superficial-profundo ($n=6$ PC histológicamente identificadas; participación: $r_6=-0.68$, $p=0.312$; frecuencia de disparo: $r_6=-0.69$, $p=0.3$; correlación de Pearson). No obstante, cuando se consideraron todos

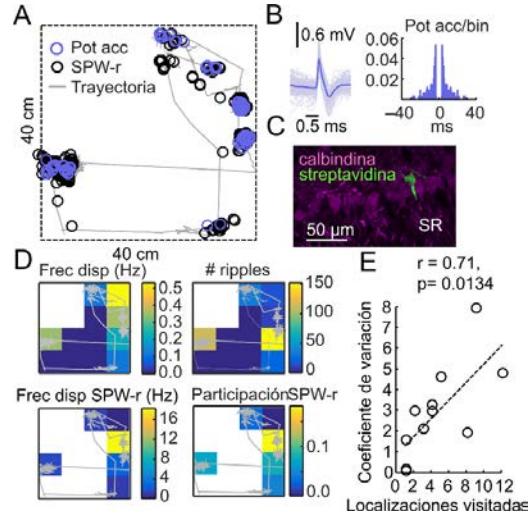


Figura 3.15: Modulación espacial de las PC de CA1. (A) Registro y obtenido en condiciones de libertad de movimiento. En azul se muestran los potenciales de acción y en negro los SPW-r. El trazo gris muestra la trayectoria del animal. (B) Potenciales de acción y autocorrelograma de la célula referida en A. (C) Marcaje yuxtacelular de la célula en A, confirmando su identidad como una PC_{prof} CB-. (D) Modulación espacial de la actividad y el reclutamiento durante los SPW-r de la célula en A. (E) Relación entre el coeficiente de variación de la frecuencia de disparo y el número total de localizaciones visitadas por el animal. $*p<0.05$.

los eventos registrados (sueño, vigilia, eventos de todas las localizaciones espaciales visitadas), como una estimación total del comportamiento celular durante los SPW-r, se halló una correlación significativa con la distancia de los somas celulares al borde con SP tanto para la participación ($r_6=-0.82$, $p=0.0423$) como para la frecuencia de potenciales de acción (figura 3.16; $r_6=-0.85$,

$p=0.0306$). En consecuencia, el comportamiento de las PC de CA1 durante los SPW-r no sólo es función del estado cerebral y del espacio, sino también del gradiente profundo-superficial de CA1.

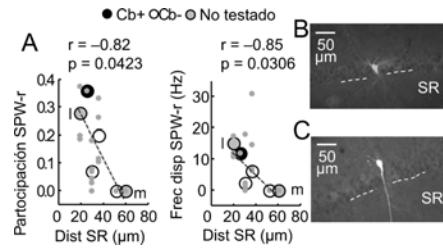


Figura 3.16: Efectos del eje radial en la actividad de las PC en condiciones de libertad de movimiento. (A) Participación (izquierda) y frecuencia de disparo (derecha) durante los SPW-r con respecto a la distancia somática a SP para todas las células histológicamente confirmadas ($n=6$). Los valores individuales para los diferentes estados comportamentales y las distintas ubicaciones visitadas por los animales se muestran en gris. También se reporta la inmunoreactividad para CB. (B,C) Ejemplos de dos células incluidas en A, registradas y marcadas en animales con libertad de movimiento. * $p<0.05$.

3.5. Papel cognitivo del los SPW-r y su distorsión en el hipocampo epiléptico

Uno de los objetivos de esta tesis doctoral es explorar el papel de las alteraciones de la dinámica de los SPW-r en el hipocampo epiléptico en la función cognitivo. Para ello se implantaron sondas de electrodos de 16 o

32 canales en el hipocampo dorsal de ratas normales y con epilepsia del lóbulo temporal (TLE) crónica (métodos, sección 2.1.1, pág 33). Se obtuvieron señales de LFP de CA1, CA3 y DG mientras los animales realizaban paradigmas comportamentales de memoria, como el test «what-where-when» (WWW) (métodos, figura 2.1, pág 34).

En conformidad con resultados previos (Inostroza et al., 2013), los animales con TLE discriminaron peor los objetos desplazados – A1 y B2 – en la tarea WWW (figura 3.17; diferencias de grupo: $F_{1,10}=15.14$, $p=0.002$; pero no para objetos: $F_{1,10}=0.67$, $p=0.428$; ni interacción entre ambos factores: $F_{1,10}=3.42$, $p=0.089$; ANOVA de dos vías). Para explorar el efecto de los eventos electrofisiológicos registrados en estas diferencias cognitivas, se analizaron los registros obtenidos durante la tarea. Considerando los trabajos previos del laboratorio, focalizados en los efectos del ritmo *theta* durante esta tarea (Inostroza et al., 2013; Laurent et al., 2015; Lopez-Pigozzi et al., 2016), inicialmente el estudio estuvo dirigido a los períodos de *intertrial*, cuando presuntamente tienen lugar los procesos de consolidación.

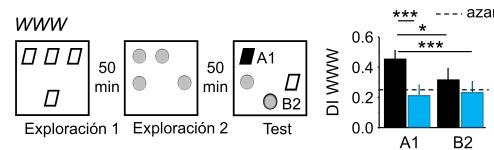


Figura 3.17: Los animales epilépticos presentan alteraciones cognitivas. En contra de lo reportado en controles, el desempeño de las ratas epilépticas en la prueba WWW – parametrizado como DI_{WWW} – está a nivel del azar. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$. Prueba *post hoc* Tukey-Kramer.

Las ratas controles exhibieron eventos SPW-r en períodos de inmovilidad y sueño de ondas lentas, cuyas *sharp waves* (SPW) desplegaron la máxima amplitud en SR (1.03 ± 0.24 mV), y estuvieron asociados a *ripples* en SP a un ratio de 0.55 ± 0.24 s $^{-1}$. Se obtuvieron espectros de tiempo-frecuencia de la señal de SP, en los cuales los SPW-r se mantuvieron estables y restringidos a la banda *ripple*, 100-250 Hz (figura 3.18). Adicionalmente se indentificaron SPW asociados a oscilaciones *gamma* (Sullivan et al., 2011), que no fueron incluidas en los posteriores análisis, dada la relevancia de la banda *ripple* en la condición epiléptica (Bragin et al., 1999; Worrell et al., 2008; Ibarz et al., 2010; Alvarado-Rojas et al., 2015).

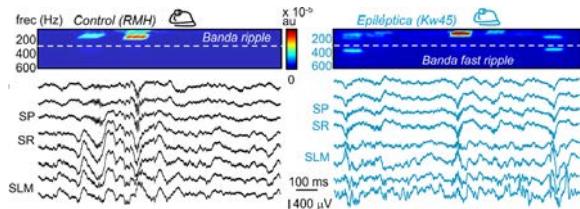


Figura 3.18: SPW-r en ratas normales y epilépticas. Ejemplos de SPW-r registrados a lo largo de todo el hipocampo dorsal de una rata normal (izquierda, trazos negros) y epiléptica (derecha, trazos azules).

En las ratas epilépticas se registraron eventos análogos a SPW-r, pero cuyos perfiles espectrales eran notablemente distintos (figura 3.18). La amplitud de las SPW en SR asociados a estos eventos no fue estadísticamente diferente a las SPW-r controles (0.82 ± 0.20 mV; $n=7$ ratas epilépticas; $t_{12}=-1.42$, $p=0.18$), ni el ratio de eventos (0.37 ± 0.16 s $^{-1}$; $t_{12}=-1.53$, $p=0.19$; t de Student no pareada). Cabe destacar que los SPW-r epilépticos fueron claramente distin-

tos a las *puntas epilépticas*, de mucha más amplitud (figura 3.19). Dado que nuestro diseño experimental pretendía comparar *ripples* controles y patológicos, se excluyeron los animales con puntas epilépticas durante los registros.

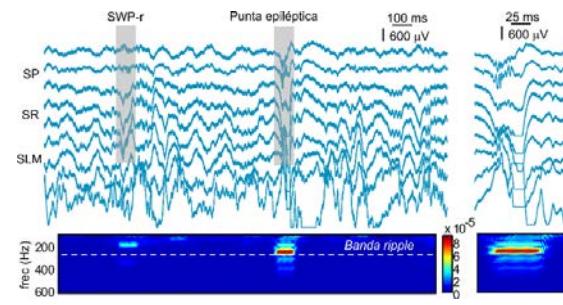


Figura 3.19: Las puntas epilépticas pueden ser separadas de los eventos de tipo SPW-r. Nótese a la izquierda la altísima amplitud saturante en SP del evento comparado con un SPW-r. A la derecha el mismo evento a mayor resolución temporal.

Con objeto de parametrizar las diferencias entre los SPW-r controles y epilépticas se definió un índice – *fast ripple index* – como la proporción de *power* espectral por encima de un umbral arbitrario (Ibarz et al., 2010). Los eventos controles y epilépticos pueden ser diferenciados con umbrales entre 180 y 350 Hz (ver métodos, figura 2.4, pág 43), seleccionándose un valor de 250 Hz. Los animales epilépticos exhibieron *ripples* más rápidos ($t_{12}=-2.74$, $p=0.0177$), de mayor *fast ripple index* ($t_6=-2.82$, $p=0.0153$) y más desorganizados, esto es, con más entropía espectral ($t_6=2.76$, $p=0.0170$; t de Student no pareada) (figura 3.20A,B). Tales diferencias se mantuvieron en eventos registrados tanto en inmovilidad como en sueño de ondas lentas (figura 3.20C).

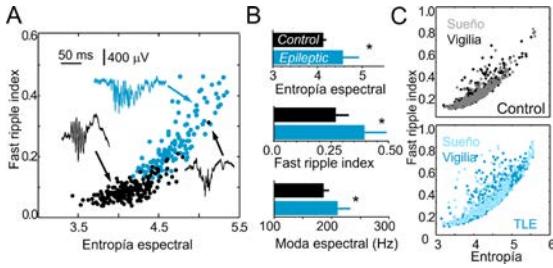


Figura 3.20: Diferencias espectrales entre SPW-r controles y epilépticos. (A) Todos los eventos registrados en los animales mostrados en 3.18 en el espacio bidimensional empleado para caracterizar las HFO. (B) Diferencias de grupo para todos los índices espectrales empleados entre los animales controles y epilépticos. (C) Las particularidades de los eventos se mantienen entre sueño y vigilia. * $p<0.05$.

Estos dos conjuntos de datos – las diferencias obtenidas en la tarea WWW y las observadas en los eventos SPW-r – podrían sugerir una relación entre las perturbaciones de los eventos SPW-r epilépticos y el peor desempeño cognitivo. No obstante, tal relación podría también reflejar la conjunción de una serie de cambios asociados a la condición epiléptica, más que algún componente causal o mecanístico entre los cambios en los SPW-r y la función de la memoria.

3.6. Los SPW-r registrados en ratas epilépticas son patológicos

En consecuencia, se evaluó paramétricamente la relación entre las alteraciones de los SPW-r y el desempeño cognitivo en ratas controles y epilépticas. Se encontró una

fuerte correlación entre el *fast ripple index* y el índice de discriminación (DIwww), variable que estima el desempeño de los animales en la tarea (figura 3.21A). Ahora bien, los animales TLE presentan alteraciones en virtualmente todos los ritmos hipocampales, algunos de las cuales han sido previamente asociados a la capacidad de resolver tareas de reconocimiento de objetos: el *power* de theta (Inostroza et al., 2013), la coherencia de theta (Inostroza et al., 2013; Laurent et al., 2015) y la modulación *theta-gamma* (Lopez-Pigozzi et al., 2016) ¿En qué medida las perturbaciones en los SPW-r no estarían reflejando (o co-reflejando) precisamente algunas de estas alteraciones? Cabe mencionar que los sustratos circuitales de todos estos ritmos son comunes entre sí, y por tanto cualquier perturbación que impacte o sea preferentemente percibida en un ritmo – como el caso de los *fast ripples* en la condición epiléptica –, afectará necesariamente al resto de *modos* del circuito. Con objeto de aislar los efectos de los *fast ripples* en el déficit de memoria reportado por el WWW se emplearon dos estrategias: un modelo lineal general (GLM) y el paradigma comportamental OR.

El GLM es una generalización de la regresión lineal que permite de-correlacionar los efectos estadísticos de múltiples factores explicativos. Se construyó un GLM para la variable dependiente DIwww con todos los parámetros espectrales que han sido asociados a la tarea como variables independientes. Interesantemente, el factor *fast ripples index* fue el más explicativo, lo que refuerza su papel capital en el déficit mnésico descrito (figura 3.21B).

En segundo lugar, se evaluó el perfil temporal de consolidación de memoria mediante el test OR con diferentes intervalos de *in-*

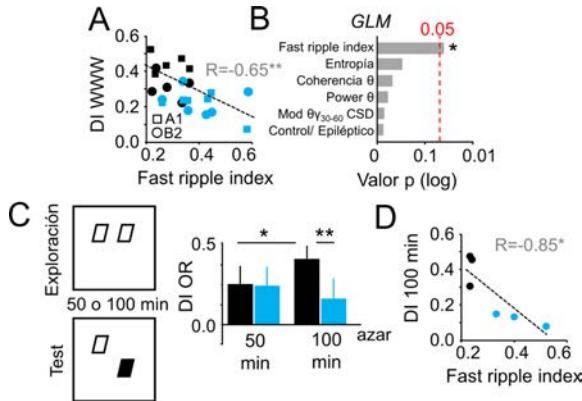


Figura 3.21: Las alteraciones en los SPW-r subyacen al déficit cognitivo en los animales epilépticos. (A) DI_{WWW} correlaciona con el *fast ripple index* de los SPW-r registrados durante los *intertrial*. (B) El *fast ripple index* es el factor explicativo más relevante del resultado conductual durante la prueba. (C) Diferencias entre animales controles y epilépticos a 100 min de *intertrial*. (D) Correlación entre el *fast ripple index* y el DI_{OR}. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$. Prueba *post hoc* Tukey-Kramer.

tertrial (50 y 100 min) en una cohorte independiente de animales. Las potenciales diferencias existentes entre la discriminación a 50 y 100 min reflejan distinta combinación de memoria a corto plazo y consolidación (Ennaceur, 2010). Como en el WWW, se encontraron efectos de grupo en el DI_{OR} (figura 3.21C; $n=7$ controles y $n=9$ epilépticas; por grupo: $F_{1,12}=4.32$, $p=0.047$; por duración del *intertrial*: $F_{1,12}=0.38$, $p=0.541$; interacción entre ambos factores $F_{1,12}=3.59$, $p=0.068$; ANOVA de dos vías). Los controles mostraron efecto de la duración de *intertrial*, compatible con el perfil temporal de consolidación: mejoraron la discriminación del ob-

jeto desplazado a 100 min ($p=0.002$); no así los epilépticos ($p=0.913$). En consecuencia, las diferencias entre grupo se concentraron para la duración de *intertrial* de 100 min ($p=0.011$; prueba *post hoc* Tukey-Kramer). Nótese que los resultados obtenidos difícilmente evidencian una ritmopatía del ritmo *theta* en la tarea, pues la cantidad de exploración – *id est*, *theta* locomotor – y de sueño REM (controles: 22-164 s; epilépticos: 43-147 s) fue la misma para ambos grupos. No obstante, nuevamente DI_{OR} correlacionó con el *fast ripple index* para 100 min de *intertrial* (figura 3.21D). Por tanto, múltiples test y análisis apuntan al impacto específico de los SPW-r epilépticos en la memoria.

3.7. El perfil espectral de los SPW-r refleja la dinámica neuronal

¿Qué mecanismos celulares explican la correlación entre los índices espectrales característicos de los SPW-r y los efectos cognitivos? Para abordar tal pregunta se estudió la dinámica neuronal durante los SPW-r controles y epilépticos en registros yuxtapacelulares de PC de CA1 obtenidos en libertad de movimiento. En primer lugar, se confirmó las diferencias de grupo entre los índices espectrales – entropía y *fast ripple index* – descritas con los electrodos de silicio (entropía: controles, 4.30 ± 0.30 bits, epilépticas, 4.66 ± 0.36 bits, $t_{19}=-2.38$, $p=0.028$; *fast ripple index*: controles, 0.19 ± 0.08 ua, epilépticas, 0.33 ± 0.14 ua, $t_{19}=-2.93$, $p=0.008$; t de Student no pareada). Las PC de CA1 de ratas controles (PC^{Con}) dispararon típicamente entre 1-3 potenciales de acción durante los SPW-r (figura 3.22A; $n=14$ PC en total;

$n=8$ identificadas histológicamente). Por su parte, las PC de CA1 registradas en animales epilépticos (PC^{Epi}) estuvieron más positivamente moduladas por los SPW-r (figura 3.22B; $n=7$ PC en total; $n=5$ identificadas histológicamente).

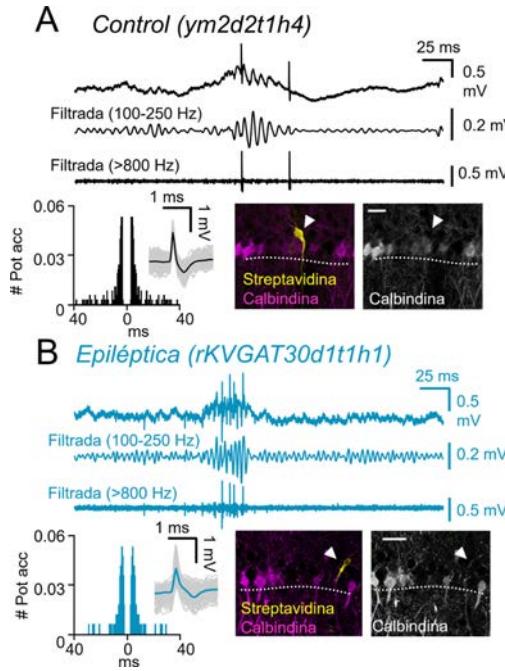


Figura 3.22: Registros yuxtagelulares en ratas controles y epilépticas. (A) PC^{Con} , auto-correlograma, morfología de sus potenciales de acción (abajo izquierda) y caracterización histológica (abajo derecha). Barra de escala de $25\ \mu m$. (B) *Idem* para una PC^{Epi} .

Con el objetivo de evaluar la funcionalidad superficial-profunda en el hipocampo epiléptico descrita en Valero et al. (2015), se generó un modelo para predecir la distancia a radiado de las PC no recuperadas histológicamente, empleando el perfil extracelular de los eventos registrados ($r=0.92$, $p=2.33 \times 10^{-5}$, ver métodos, figura 2.5, pág

46). En la figura 3.23 se muestran los PETH medios de todas las PC^{Con} y PC^{Epi} durante los SPW-r, ordenados según su distancia a SR. Se corroboró la fuerte correlación entre la posición radial de las células y su actividad durante los SPW-r para la PC^{Con} ($n=8$ PC^{Con} histológicamente confirmadas: $r=-0.80$, $p=0.017$; $n=14$ PC^{Con} en total, correlación con datos predichos: $r=-0.71$, $p=0.0044$; correlación de Pearson), mientras que la sobreactivación de las PC^{Epi} ocluyó el efecto del gradiente radial de CA1 ($n=4$ PC^{Epi} histológicamente confirmadas: $r<0.01$, $p=0.9996$; $n=7$ PC^{Epi} en total: $r=0.34$, $p=0.4544$; correlación de Pearson). Consecuentemente, los efectos de grupo dominaron en la frecuencia de disparo durante los SPW-r (PC^{Sup} : 10.18 ± 5.15 Hz, PC^{Prof} : 3.61 ± 2.66 Hz, PC^{Epi} : 26.33 ± 16.70 Hz, PC^{Epi} : 29.94 ± 15.37 Hz; $F_{1, 17} = 29.99$, $p = 1.36 \times 10^{-4}$), en ausencia de efectos de subcapa ($F_{1, 17} = 0.12$, $p = 0.7361$) o interacción ($F_{1, 17} = 1.37$, $p = 0.2573$; ANOVA de dos vías).

El aumento de actividad de las PC^{Epi} en los SPW-r epilépticos estuvo estrechamente asociado a los cambios en los índices espectrales registradas directamente con las pipetas de vidrio usadas yuxta-celularmente (figura 3.24A). Estos resultados fueron replicados en tres experimentos con electrodos extracelulares a $150-400\ \mu m$ de las células. Por tanto, el *fast ripple index* y la entropía espectral son buenos indicadores de la actividad colectiva local, tal y como ha sido reportado en estudios previos (Foffani et al., 2007; Ibarz et al., 2010): a más células reclutadas, más desorden emerge en los eventos. En el hipocampo epiléptico la probabilidad de que cualquier célula sea reclutada en un evento dado – esto es, la participación – au-

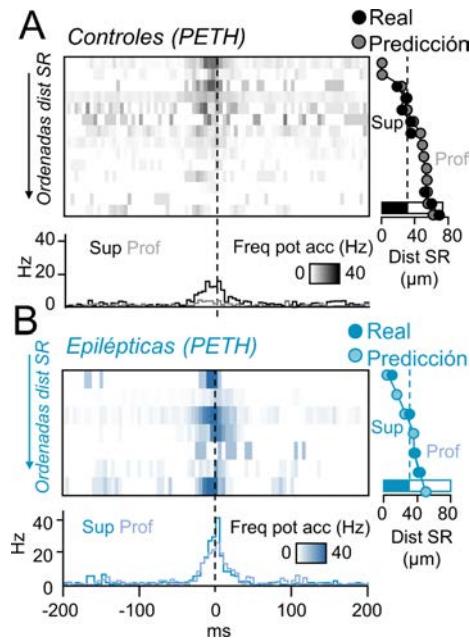


Figura 3.23: Aumento del reclutamiento celular en los SPW-r epilépticos. (A) PETH medio de todas la PC_{Con} (motivos en negro) y (B) PC_{Epi} (motivos en azul) registradas en libertad de movimiento. El eje acceso... derecha indica la distancia a SP (real y predicha) de la PC individual cuya fila corresponde en el mapa principal. Nótese la correlación de la actividad celular y la posición en el eje radial. En la parte inferior, el PETH medio para las PC_{Sup} y PC_{Prof} de ambos grupos. Las diferencias estadísticas por grupo dominaron sobre los efectos de capa e interacción (ver texto).

menta. Puesto que probabilidad e información mantienen una relación inversa (Shannon, 1948)², la cantidad de información en

²Claude Shannon demostró que los sucesos más probables, tales como las letras más comunes del abecedario o las palabras más usadas, son los menos informativos (Shannon, 1948).

los *fast ripples* es necesariamente menor que en los SPW-r normales (figura 3.24B).

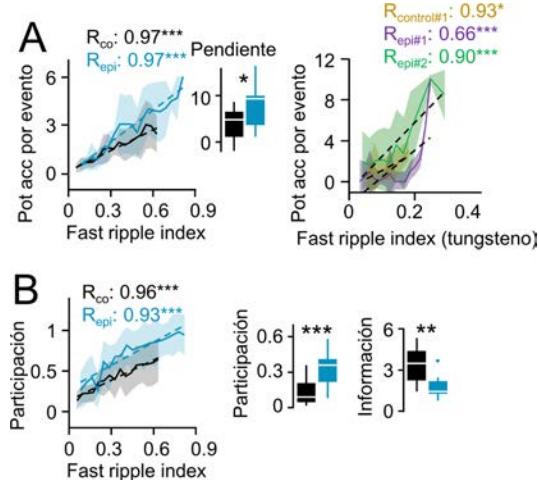


Figura 3.24: Los eventos más desorganizados exhiben más participación y menos información. (A) Correlación entre el *fast ripple index* y el número de potenciales de acción reclutados para todas las células (figura 3.24) registradas en libertad de movimiento (izquierda) y para un subconjunto de células en las cuales el LFP se obtuvo mediante un electrodo extracelular (tungsteno), a la derecha). La relación es más acusada para las PC_{Epi} . (B) *Idem* para la participación. Diferencias de grupo en participación e información (en bits), estimada como $-\log_2$ participación. $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$.

En resumen, estos datos sugieren que los índices espectrales de los SPW-r son un reflejo mesoscópico de la dinámica neuronal, y por tanto, están relacionados con aspectos elementales del reclutamiento de las PC durante estos eventos.

3.8. Los SPW-r epilépticos tienen menos selectividad

La baja participación media reportada para los SPW-r fisiológicos (Csicsvari et al., 2000; Buzsáki, 2015) evidencia la activación de micro-circuitos específicos asociados. En otras palabras, un conjunto de PC únicamente serán reclutadas cuando la combinación precisa de células presinápticas disparen coordinadamente. Ahora bien, dado que LFP refleja en gran medida – y sobretodo a altas frecuencias – los potenciales de acción de las células circundantes (Schomburg et al., 2012; Taxidis et al., 2015), es posible detectar la co-activación de un micro-circuito local (Reichinnek et al., 2010; Taxidis et al., 2015) y evaluar la selectividad que las células despliegan por él.

Para tal propósito, todos los eventos de cada sesión de registro (de al menos 50 eventos; $n=8$ PC^{Con} y $n=5$ PC^{Epi}) fueron organizados en mapas bidimensionales utilizando el método SOM (figura 3.25; métodos, sección 2.4.4, pag 48). Los mapas SOM están configurados topológicamente, esto es, los eventos próximos son semejantes entre sí, y en consecuencia son agrupados por algoritmos de *clustering* (*k-means*, métodos, sección 2.4.4). Por tanto, la selectividad de las PC debe manifestarse como preferencia de su actividad por determinadas regiones del mapa y/o clústeres.

Las PC^{Con} dispararon específicamente sobre ciertos SPW-r (figura 3.25A,C). Este fenómeno fue parametrizado en términos de la *selectividad* (estimada como la SD de la participación por clúster) y la información (ver métodos, sección 2.4.4, pág 48) de las

células (figura 3.25C). Las PC^{Epi} fueron menos selectivas; de hecho, su contenido de información no fue mayor a los esperados por el azar (contrastado con 1000 permutaciones de potenciales de acción/SPW-r) (figura 3.25B,C; selectividad: $t_{11}=-2.78$, $p=0.021$; información: $t_{11}=2.7$, $p=0.018$; t de Student no pareada). Consistentemente con los resultados previos, la participación celular por clúster estuvo influenciada por el gradiente superficial-profundo ($F_{1,41}=4.27$, $p=0.042$), y dominada por las diferencias entre grupos ($F_{1,41}=6.8$, $p=0.012$; ANOVA de dos vías) (figura 3.25D).

Estos datos muestran selección en el reclutamiento de las PC de CA1 durante los SPW-r, que a su vez se ve degradada en el hipocampo epiléptico.

3.9. Mecanismos sinápticos de la selectividad celular

En conjunto, los SPW-r epilépticos, asociados a déficit de memoria (figuras 3.17 y 3.21), implicaron más participación (figura 3.24) y menos selectividad celular (figura 3.25). Para analizar los mecanismos circuitales de tales alteraciones, se utilizaron registros simultáneos intracelulares y extracelulares multi-canal en ratas antestesiadas controles (figura 3.26A; $n=23$ PC^{Con}; 8 PC^{Prof}, 11 PC^{Sup} y 4 no recuperadas histológicamente) y TLE (figura 3.26B; $n=21$ PC^{Epi}; 8 PC^{Prof}, 9 PC^{Sup} y 4 no recuperadas).

Los SPW-r registrados en animales *uretanizados* controles y epilépticos mostraron diferencias espectrales similares a las obtenidas en animales no anestesiados (figura 3.26C).

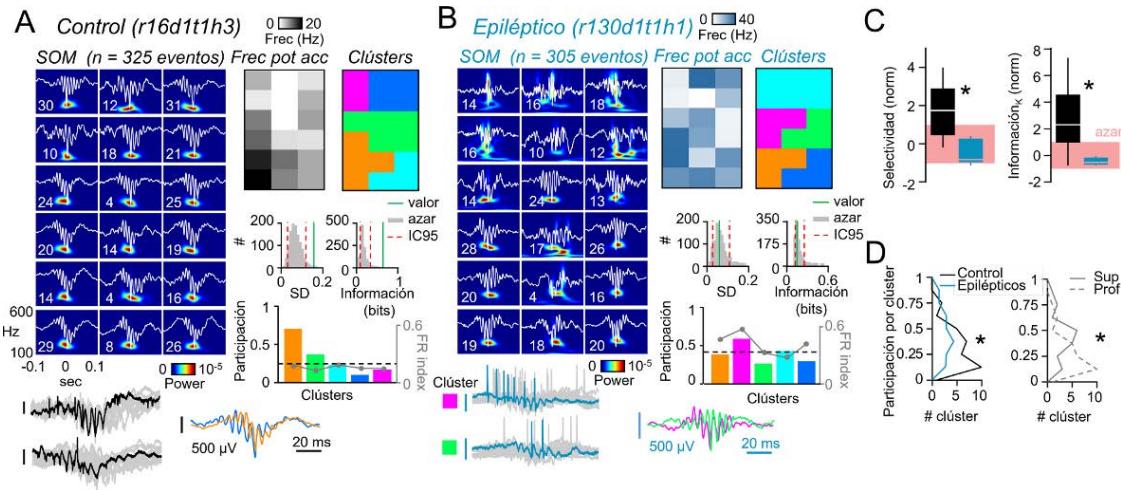


Figura 3.25: Las PC^{Epi} son menos selectivas que las PC^{Con}. (A) SOM para una PC^{Con}. Trazo medio y número de eventos sobre el espectro tiempo-frecuencia para cada elemento de la matriz SOM. La distribución de la frecuencia de disparo de la célula simultáneamente registrada se muestra en escala de grises. Se evaluó la preferencia de las células por determinados clústers de eventos (en diferentes colores: morado, naranja, etc). La selectividad (SD) y el contenido de información por célula se probó contra 1000 permutaciones al azar de potenciales de acción/SPW-r. En la parte inferior se muestran ejemplos de los clústers naranja y azul. (B) *Idem* para una PC^{Epi}. (C) Diferencias de grupo en selectividad e información. (D) Diferencias por posición en el eje superficial-profundo y por grupo en la participación por clúster. * $p<0.05$.

Como fue reportado en la sección 3.2 (pag 53, Valero et al., 2015), en animales normales las PC de CA1 profundas y superficiales exhibieron respuestas de membrana opuestas durante los SPW-r. Las PC^{Con} estuvieron más despolarizadas, mientras que las PC^{Prof} experimentaron una respuesta promedio hiperpolarizada (figura 3.27A, izquierda; correlación entre V_{rev} y distancia a SR: $r=-0.63$, $p=9.1 \times 10^{-4}$; correlación de Pearson). En contraste, y similar a lo descrito en los registros yuxtagelulares, todas las PC^{Epi} se despolarizaron consistentemente durante los SPW-r (figura 3.27, derecha), ocluyendo el gradien-

te superficial-profundo ($r=-0.37$, $p=0.5303$; correlación de Pearson) y sugiriendo que la acción excitatoria glutamatérgica impone sobre la inhibición GABAérgica en el circuito epiléptico. Se confirmaron diferencias por grupo y correlación con el *fast ripple index* en el número de potenciales de acción (PC^{Con}: $r=0.87$, $p=5.13 \times 10^{-5}$; PC^{Epi}: $r=0.94$, $p=5.10 \times 10^{-9}$, correlación de Pearson; $t_{27}=4.65$, $p=5.15 \times 10^{-5}$, t de Student no pareada), la participación (PC^{Con}: $r=0.83$, $p=6.14 \times 10^{-5}$; PC^{Epi}: $r=0.78$, $p=1.67 \times 10^{-9}$; correlación de Pearson; $t_{27}=5.02$, $p=2.84 \times 10^{-5}$, t de Student no pareada) y el contenido de in-

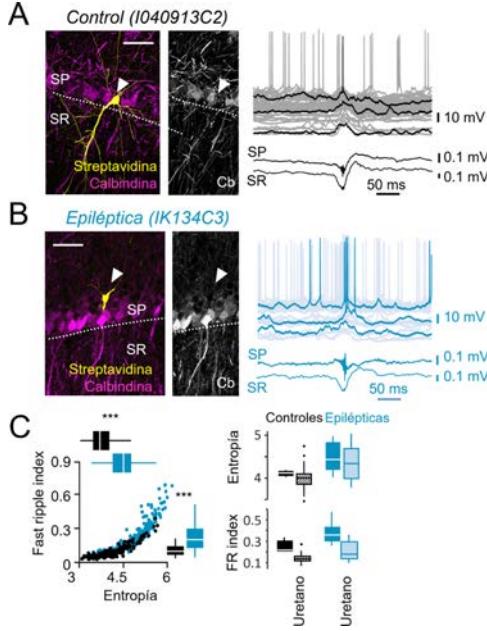


Figura 3.26: Registros simultáneos intracelulares y de LFP multi-canal e intracelulares en ratas controles y epilépticas anestesiadas. (A) PC^{Con} identificada histológicamente como una PC^{Con}_{Sup} y registrada en múltiples SPW-r a distintos potenciales de membrana. (B) *Idem* para una PC^{Epi}. (C) Las SPW-r bajo uretano son espectralmente similares a las registradas en ausencia de anestésicos. *** $p<0.001$.

formación durante los eventos ($t_{27}=-6.79$, $p=2.74 \times 10^{-7}$; t de Student no pareada) (figura 3.27B). Cabe destacar que las propiedades intrínsecas de las células no explican estos resultados: no se hallaron diferencias por grupo en la resistencia de membrana (R), ni en la capacitancia (C), ni en la constante de tiempo (τ). En todo caso las PC^{Epi} mostraron fenómenos compensatorios, como el incremento del umbral de disparo (tabla 3.1).

Tabla 3.1: Propiedades intrínsecas de las células registradas.

	RMP (mV)	R (MΩ)	C (μF)	τ (ms)	PA _U (mV)
PC ^{Con}	-62.8 ± 5.1	24.4 ± 9.3	0.7 ± 0.7	19.2 ± 21.7	-50.9 ± 5.9
PC ^{Epi}	-61.2 ± 2.9	25.5 ± 7.8	1.0 ± 1.1	26.8 ± 28.1	-46.9 ± 5.2
p	0.336	0.749	0.402	0.429	0.037

PA_U: umbral del potencial de acción. Se reporta media ± SD y p de t de Student no pareada.

Se construyeron mapas SOM de los SPW-r concurrentes a los registros intracelulares con más de 50 eventos a RMP ($n=7$ PC^{Con} y $n=6$ PC^{Epi}) y se confirmaron las diferencias de selectividad ($t_{12}=3.71$, $p=0.016$) e información ($t_{12}=2.45$, $p=0.028$; t de Student no pareada) (figura 3.27C) descritas en los registros yuxtapacelulares.

Posteriormente se examinaron las reglas circuitales asociadas a la preferencia de las PC por determinados clústers de SPW-r. Se correlacionaron diversos parámetros intracelulares y extracelulares de todos los clústers y de todas las PC entre sí (figura 3.28). Como se esperaba, se halló una fuerte relación entre *driving force* y participación: en sus clústers preferentes, las PC reciben un insufo masivo de excitación que rebasa la inhibición y las recluta. Nótese tal relación en la similitud entre los mapas SOM de frecuencia de potenciales de acción y *driving force* (ver figura 3.28A,C,E; correlación bidimensional entre las matrices de frecuencia de disparo y participación para las PC^{Con}: $r=0.71\pm 0.06$; PC^{Epi}: $r=0.81\pm 0.16$; $t_{12}=-1.0.5$, $p=0.31$; t de Student no pareada). No obstante, la *driving force* por clúster de las PC^{Con} no co-

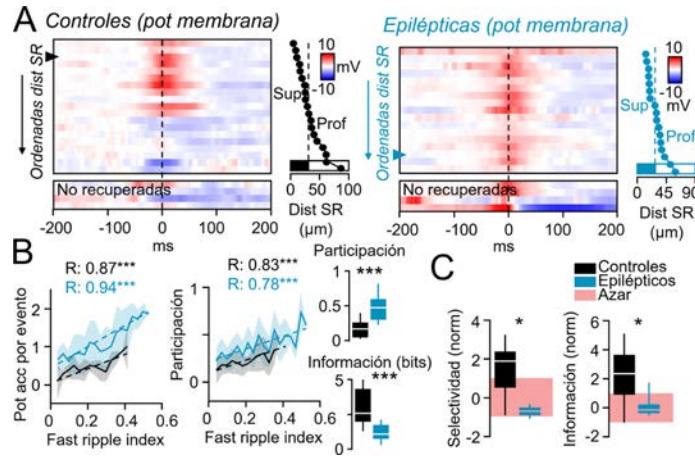


Figura 3.27: Diferencias en la respuesta de PC^{Con} y PC^{Epi} registradas intracelularmente. (A) Trazo intracelular medio para todas las PC^{Con} (izquierda, negro) y PC^{Epi} (derecha, azul), y distancia a SP. Nótese el gradiente superficial-profundo de despolarización-hiperpolarización en el caso control y su alteración en epilepsia. (B) correlación entre *fast ripple index* y el número de potenciales de acción y la participación exhibida por las células. Diferencias de grupo para la participación y el contenido de información, como en 3.24. (C) Menor selectividad e información en las PC^{Epi} respecto a las PC^{Con} registradas intracelularmente *** $p<0.001$.

rrelacionó ni con el sumidero de corriente en SR ($r=0.29$, $p=0.19$), ni con la actividad multi-unidad ($r=-0.35$, $p=0.11$; correlación de Pearson), responsable de tal sumidero (figura 3.28A,B,G). En otras palabras, la respuesta experimentada por las PC^{Con} durante las SPW-r es en gran medida independiente – *id est*, ortogonal – a la cantidad de excitación total enviada desde CA3. En tales condiciones, el reclutamiento de una PC^{Con} presumiblemente refleja la activación de su propio micro-circuito más que la activación general del circuito. En fuerte contraste, tanto el MUA de CA3 como el sumidero de corriente en SR correlacionaron con la *driving force* de las PC^{Epi} (figura 3.28C,D,G; sumidero en SR: $r=0.61$, $p=0.0490$; MUA de CA3: $r=-0.52$, $p=0.0416$; correlación de

Pearson). Por tanto, la activación de las PC^{Epi} está influenciada por la excitación neta del circuito. Las PC^{Epi} aparentemente adolecen de la independencia micro-circuital de las PC^{Con} , lo que contribuye a explicar tanto su aumento de participación como su pérdida de selectividad durante los SPW-r.

3.10. Mecanismos de la pérdida de la selectividad en los SPW-r epilépticos

Para profundizar en los mecanismos de la selectividad celular, se estimó el V_{rev} en el tiempo, la conductancia (G) y la corriente de membrana (I_{Total}) de las respuestas por

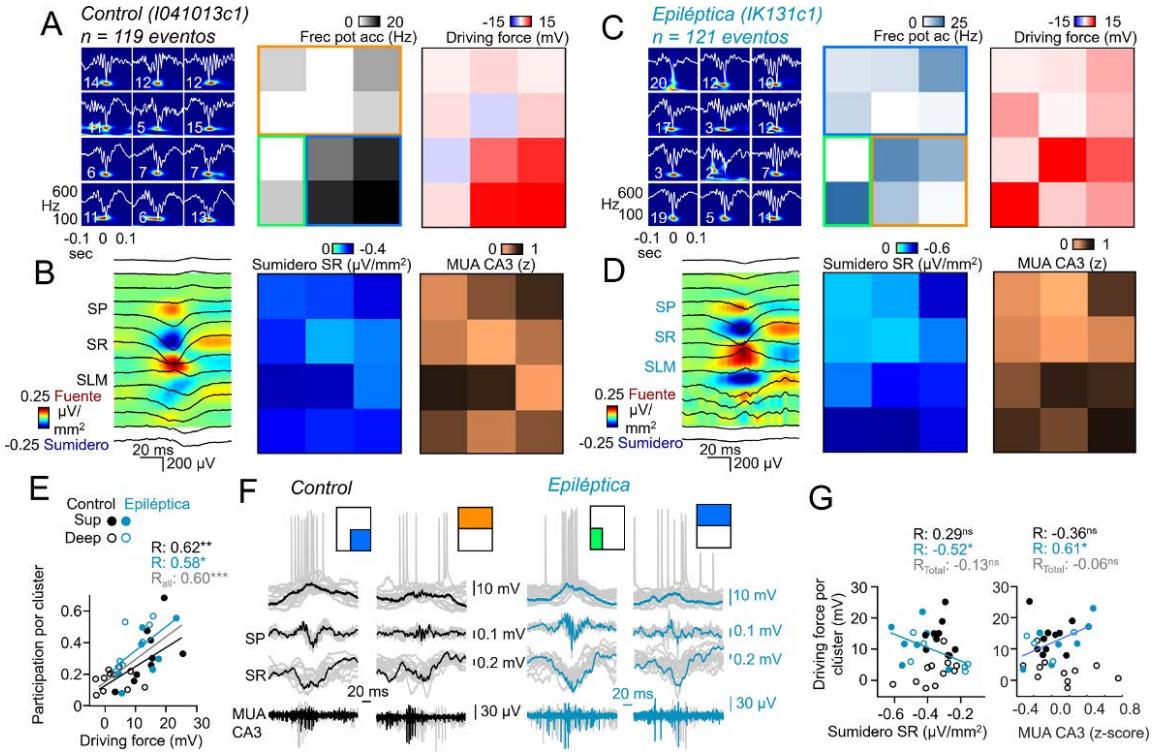


Figura 3.28: Las PC^{Epi} pierden la ortogonalidad respecto a la excitación total del circuito. (A) SOM de SPW-r, frecuencia de disparos y *driving force* para una PC^{Con}. Los mapas de *driving force* y potenciales de acción son semejantes, dado que la PC es reclutada en aquellos eventos más despolarizantes (clúster azul). (B) CSD promedio, y organización SOM del sumidero en SR y MUA en CA3 de todos los eventos de A. Dado que CA3 induce el sumidero en SR de CA1, ambas matrices son similares. Sin embargo, la excitación experimentada por la PC^{Con} (en A) y la desplegada todo por el circuito en CA1 (en B) son notablemente dispares. (C,D) *Idem* a A,B para una PC^{Epi}. Nótese cierta similitud entre los mapas intracelulares (en C) y extracelulares(en D). (E) Correlación entre *driving force* y participación por clúster. (F) Ejemplos de los clústers indicados. (F) Correlación entre *driving force*, sumidero de SR y MUA de CA3. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

clúster. Consistente con los resultados previos, los SPW-r preferentes estuvieron asociados a incrementos de conductancia e influxos de corriente, que en el caso de las PC^{Con} fueron independientes a las respuestas extracelulares (figura 3.29). Los trazos de corriente mostraron una dinámica secuencial de ex-

citación e inhibición, visiblemente atenuada en las PC^{Epi} (ver triángulos en figura 3.29).

Con objeto de examinar el efecto de tales dinámicas, a partir de las trazas de V_{rev} se estimaron varios parámetros cinéticos: carga neta (en pC, integral en el tiempo de V_{rev} entre R), el incremento del poten-

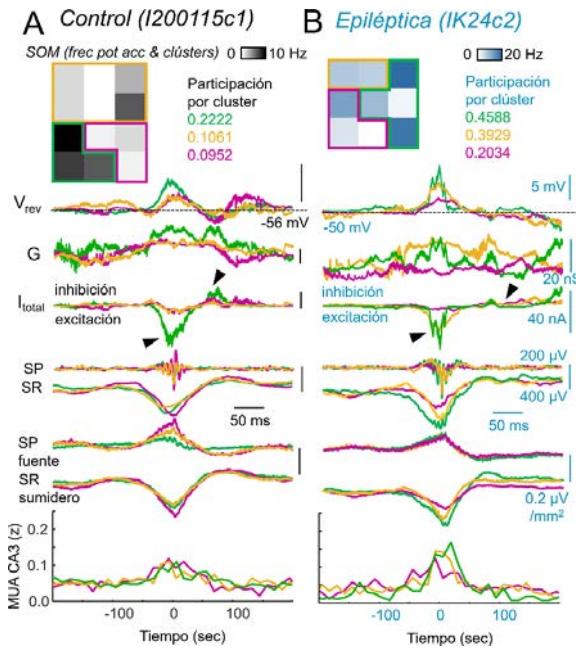


Figura 3.29: Caracterización de la respuesta de membrana en los clústers SOM. (A) V_{rev} , conductancia (G), corriente de membrana (I_{Total}), y parámetros extracelulares – sumidero en SR, fuente en SP de CA1 y MUA de CA3 – para una PC^{Con}. (B) *Idem* para una PC^{Epi}. Nótese la respuesta excitatoria intracelular, alineada con las máximas deflexiones de corriente extracelulares, y seguida de una corriente inhibidora proporcional a la despolarización experimentada.

cial de membrana al 20%-80 % de la amplitud máxima (en ms, referido al lapso entre el 20 y el 80 % de la señal), la constante de tiempo de los SPW-r (τ de SPW-r, en ms, lapso entre el máximo y la reducción del 63 %) y el intervalo excitación-inhibición (EI, en ms, lapso entre el máximo y el mínimo del trazo). Posteriormente se obtuvieron las matrices de correlaciones cruzadas para todos estos factores en PC^{Con} y

PC^{Epi} (figura 3.30). Nuevamente, se observó un cúmulo de relaciones para los parámetros intracelulares en todas las PC: la carga eléctrica experimentada por las membranas celulares induce una respuesta de voltaje, en términos de *driving force*, que al alcanzar los correspondientes umbrales de disparo desemboca en la participación celular. Llamativamente, tal sucesión de relaciones «carga→*driving force*→participación», puede ser capturada tomando las correlaciones parciales de los factores³: en las matrices de correlaciones parciales de la figura 3.30 (fila inferior) la carga esta significativamente correlacionada con la *driving force* «carga→*driving force*», y a su vez la *driving force* con la participación «*driving force*→participación», habiéndose suprimido la relación indirecta «carga↔participación».

En las PC^{Con} se obtuvieron correlaciones en los parámetros cinéticos – incremento 20 %-80 %, constante de tiempo e intervalo EI – (figuras 3.30), lo que probablemente refleje el concierto preciso de excitación e inhibición de SPW-r fisiológicos. Dicho de otro modo, los eventos más despolarizantes tienden a reclutar más inhibición *feed-back*, controlando el balance excitatorio del circuito. Por su parte, las PC^{Epi} no exhibieron tales relaciones, sugiriendo un fallo entre el balance excitatorio-inhibitorio en el circuito epileptico. Por último, se confirmó la constelación de relaciones entre los parámetros extracelulares – sumidero en SR y MUA en CA3 – e intracelulares en las PC^{Epi} (señala-

³Las correlaciones parciales estiman la relación entre dos variables, una vez cancelados los efectos de otras co-variables. Concretamente la correlación parcial entre A y B desestimando C, $r_{AB,C}$, es la correlación simple entre los residuos de A y B previamente correlacionados con C.

dos como triángulos negros en la figura 3.30).

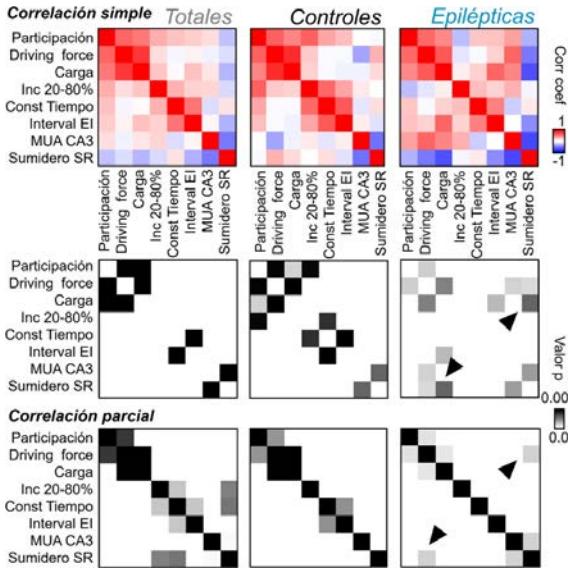


Figura 3.30: Matrices de correlaciones simples (fila superior y media) y parciales (abajo) para los factores considerados en la participación por clústeres.

Posteriormente se generalizaron estas observaciones en la base de datos completa ($n=23$ PC^{Con} y $n=21$ PC^{Epi}) en ausencia de procedimiento alguno de clasificación de eventos. Llamativamente, las respuestas intracelulares «evento a evento» tendieron a estar más asociadas al sumidero de SR y al MUA de CA3 en las PC^{Epi} (figura 3.31A; contraste de r de Pearson para la *driving force* y el sumidero de SR: $t_{42}=2.78$, $p=0.014$; para la *driving force* y el MUA de CA3: $t_{28}=1.79$, $p=0.079$; t de Student no pareada; comparación del número de PC cuya correlación fue estadísticamente significativa para la *driving force* y el sumidero de SR: $\chi^2_{42}=5.77$, $p=0.0162$; para la *driving force* y el MUA de CA3: $\chi^2_{28}=1.07$, $p=0.301$; test χ^2), y un mayor número de PC^{Con} exhibie-

ron una relación significativa entre el incremento 20 %-80 % y la constante de tiempo de los SPW-r (figura 3.31A; $t_{42}=1.25$, $p=0.22$; $\chi^2_{42}=4.38$, $p=0.0368$; t de Student no pareada y test χ^2).

En conjunto, la selectividad de las PC^{Con} emerge en el circuito fruto de su independencia – ortogonalidad – de la excitación global. En condiciones normales, la excitación de CA3 y la inhibición local están balanceadas, lo que posibilita la ruptura de simetría entre las células individuales del circuito. En caso contrario – PC^{Epi} – todas las células del circuito son reclutadas sincrónamente durante los eventos y por tanto pierden su selectividad individual: la información se hace redundante, y deviene el déficit cognitivo (figura 3.31B).

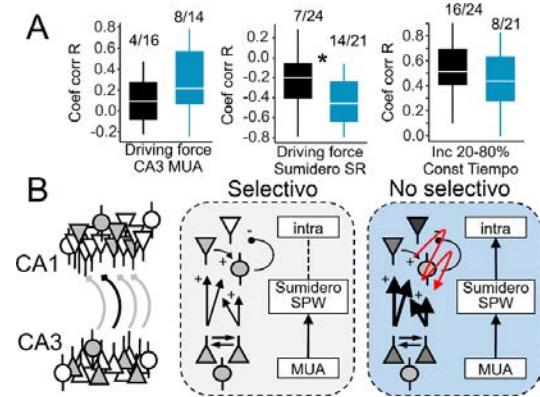


Figura 3.31: Generalización de la relación entre los parámetros intracelulares y extracelulares para la base de datos completa de PC^{Con} y PC^{Epi}. (A) Comparación por grupos, y ratio de células cuya correlación fue significativa (números sobre las gráficas), para MUA de CA3 y sumidero de SR con *driving force*. (B) Esquema de la hipótesis propuesta. * $p<0.05$.

3.11. La manipulación del V_{rev} perturba la selectividad

Los resultados previos sugieren que la selectividad celular en CA1 emerge en condiciones únicas de excitación e inhibición. Durante los SPW-r las PC están sometidas a un bombardeo masivo de excitación dendrítica compensada por un influjo de inhibición somato-dendrítica. La selectividad emerge cuando ciertas combinaciones sinápticas excitatorias escapan al control inhibitorio, invaden el cuerpo celular y reclutan potenciales de acción (Harris et al., 2003; Stark et al., 2015). Demasiada excitación y todas las células serán reclutadas indeterminadamente, como en el caso de los *fast ripples* (Bragin et al., 1999; Aivar et al., 2014) o en presencia de antagonistas GABAérgicos (Buzsaki et al., 1983; Suzuki y Smith, 1988; Stark et al., 2014). Demasiada inhibición y los SPW-r no podrán organizarse (Suzuki y Smith, 1988; Ylinen et al., 1995; Papatheodoropoulos et al., 2007). En consecuencia, alterar el V_{rev} de una única célula en un circuito balanceado debería suponer la pérdida de su selectividad. Para contrastar esta hipótesis se utilizó la dialización intracelular del antagonista no competitivo de GABA_A picrotoxina (1mM) (figura 3.32A; Inomata et al., 1988, pero véase también Atherton et al., 2016) en animales controles.

Consistente con la disminución de la transmisión GABA_A, la respuesta de las PC a los SPW-r se hizo más despolarizante a lo largo del experimento (figura 3.32B; $n=6$ PC^{Con}, 4 PC^{Sup} y 2 PC^{Prof}). El comportamiento intracelular de las PC difirió significativamente tras 30 minutos de registro

(figura 3.32D): la *driving force* y la participación en los SPW-r aumentaron significativamente (*driving force*: $t_5=-2.64$, $p=0.0460$; participación: $t_5=-4.5052$, $p=0.0064$), con el consiguiente descenso del contenido de información ($t_5=3.05$, $p=0.0283$; t de Student pareada). Es más, tal y como fue descrito en el caso de las PC^{Epi}, desbalancear el ratio excitación/inhibición con picrotoxina intracelular incrementó la relación entre *driving force* y sumidero en SR ($t_5=3.68$, $p=0.0143$; $\chi^2_5=5.33$, $p=0.0209$; t de Student pareada y test χ^2). No hubo efecto alguno en los parámetros extracelulares (3.32B,C), ni en las propiedades espectrales de los eventos (entropía: $<20'$, 4.15 ± 0.17 bits, $>30'$, 4.22 ± 0.17 bits, $t_5=0.43$, $p=0.4368$; *fast ripple index*: $<20'$, 0.14 ± 0.02 ua, $30'$, 0.16 ± 0.03 ua, $t_5=-1.31$, $p=0.2480$; t de Student), ni en el MUA de CA3 ($t_4=-0.06$, $p=0.9543$), ni en el sumidero de SR ($<20'$: -0.20 ± 0.10 μ V mm⁻²; $>30'$: -0.16 ± 0.07 μ V mm⁻²; $t_5=-1.58$, $p=0.1759$; t de Student pareada), confirmando la especificidad intracelular de los efectos.

Esta aproximación unicelular ratifica nuestras conclusiones. Perturbar el equilibrio de excitación/inhibición de una PC^{Con} en un circuito normal le atribuye un fenotípico pro-excitatorio y no selectivo durante los SPW-r (3.32E).

3.12. Rescate de selectividad y déficit cognitivo en ratas TLE

Nuestros datos sugieren que el colapso sináptico glutamatérgico durante los SPW-

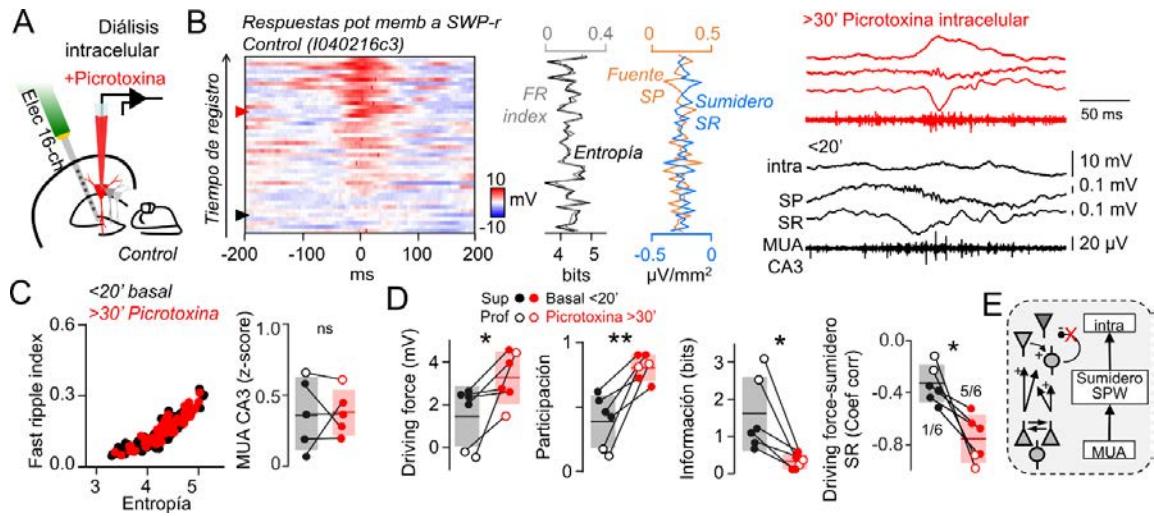


Figura 3.32: Control farmacológico de la respuesta celular durante los SPW-r. (A) PC^{Con} fueron intracelularmente dializadas con el antagonista GABAérgico picrotoxina (1 mM). (B) Curso completo de un experimento: se muestra el trazo intracelular para todos los SPW-r registrados (a la izquierda, eventos individuales por filas). Características espectrales y los flujos de corriente de los eventos correspondientes (centro). SPW-r y registros intra y extracelulares para los trazos señalados con triángulos (derecha). (C) Ausencia de efecto en los parámetros extracelulares. (D) Alteraciones en la respuesta intracelular causados por la picrotoxina. (E) El fallo inhibitorio inducido farmacológicamente rompe la independencia celular respecto a la excitación global. * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

Los epilepticos *acopla* los micro-circuitos hipocampales, degradando y mezclando la información que representan. Mesoscópicamente, tal proceso se manifiesta en la desorganización espectral y los componentes de alta frecuencia propios de los *fast ripples*. Se trató de restablecer la selectividad en el hipocampo epiléptico manipulando el tono excitador mediante un bloqueante específico del estado inactivado del canal de Na^+ , carbamazepina, con acción selectiva sobre las células piramidales (Pothmann et al., 2014).

La administración sistémica aguda de carbamazepina (20 mM, IP) alteró transversalmente la respuesta a los eventos

(figura 3.33A,B, $n=4$ PC^{Epi}, 3 PC^{Epi}_{Sup} y 1 PC^{Epi}_{Prof}). Congruente a la reducción de la actividad global en CA3 ($t_3=2.38$, $p=0.048$), los eventos recuperaron valores normales de sus características esenciales (*fast ripple index*: <20', 0.26 ± 0.08 ua, >20', 0.22 ± 0.07 , $t_3=6.61$, $p=0.0035$; entropía: <20', 4.48 ± 0.28 bits, >20', 4.20 ± 0.41 bits, $t_3=2.90$, $p=0.0312$; t de Student pareada de una cola) (figura 3.33C), aunque no alcanzó un efecto estadístico para los flujos de corriente totales (<20', $-0.44\pm0.17 \mu\text{V mm}^{-2}$, >20', $-0.42\pm0.12 \mu\text{V mm}^{-2}$, $t_3=0.30$, $p=0.3912$). La tendencia al descenso en la *driving force*

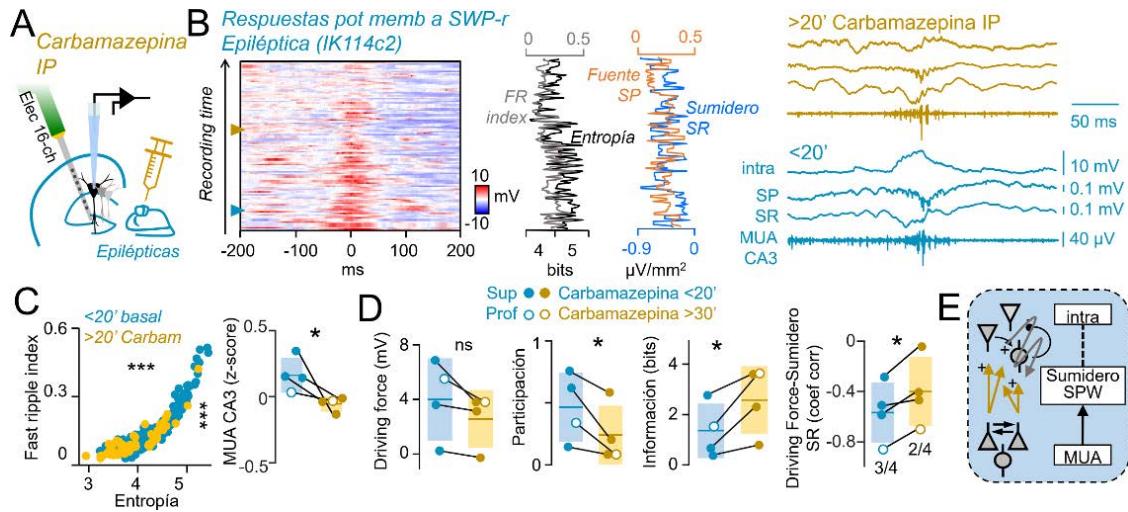


Figura 3.33: Recuperación farmacológica de los SPW-r epilépticos. (A) Administración sistémica de carbamazepina (20 mM) en ratas epilépticas anestesiadas con registro intracelular y extracelular simultáneo. (B) Curso completo de un experimento, *idem* a figura 3.34. Nótese en este caso el efecto paralelo en la respuesta intracelular (izquierda, derecha) y las características espectrales de los eventos (centro). (C) Efecto en los parámetros extracelulares. *Fast ripple index*, $t_{291}=6.30$, $p=1.07 \times 10^{-9}$; entropía, $t_{291}=4.03$, $p=7.25 \times 10^{-5}$; *t* de Student no pareada para todos los eventos. (D) Cambios intracelulares inducidos por el tratamiento agudo de carbamazepina. (E) La atenuación de la sobre-excitación del circuito epiléptico restaura la selectividad celular. * $p<0.05$, *** $p<0.001$.

experimentada por las PC^{Epi} disminuyó significativamente su probabilidad de participación durante los SPW-r, que en consecuencia incrementaron su contenido de información (figura 3.33D; *driving force*: $t_3=2.34$, $p=0.0508$; participación: $t_3=3.02$, $p=0.028$; información: $t_3=3.16$, $p=0.025$; *t* de Student pareada de una cola). Respecto a las características intrínsecas de las PC registradas, la carbamazepina únicamente alteró la frecuencia de disparo inducido por pulsos cuadrados positivos de corriente (tabla 3.2; Pothmann et al., 2014). Por tanto, neutralizar el exceso de excitación en el sistema CA3-CA1 aparentemente mejoró la precisión

celular durante los SPW-r, lo que podría incrementar el ratio señal/ruido de las representaciones hipocampales (figura 3.33E).

Finalmente, se contrastó el efecto funcional de la manipulación farmacológica con carbamazepina en la prueba OR a 100 min de *intertrial* (3.34). Llamativamente, se obtuvo una mejora significativa en la discriminación del objeto desplazado para las ratas epilépticas al ser tratadas con carbamazepina (10 mM, IP) tras la fase de exploración (figura 3.34A; $t_8=-2.77$, $p=0.0243$; *t* de Student pareada).

Ninguna co-variable conductual durante la sesión de test del OR parece explicar estos

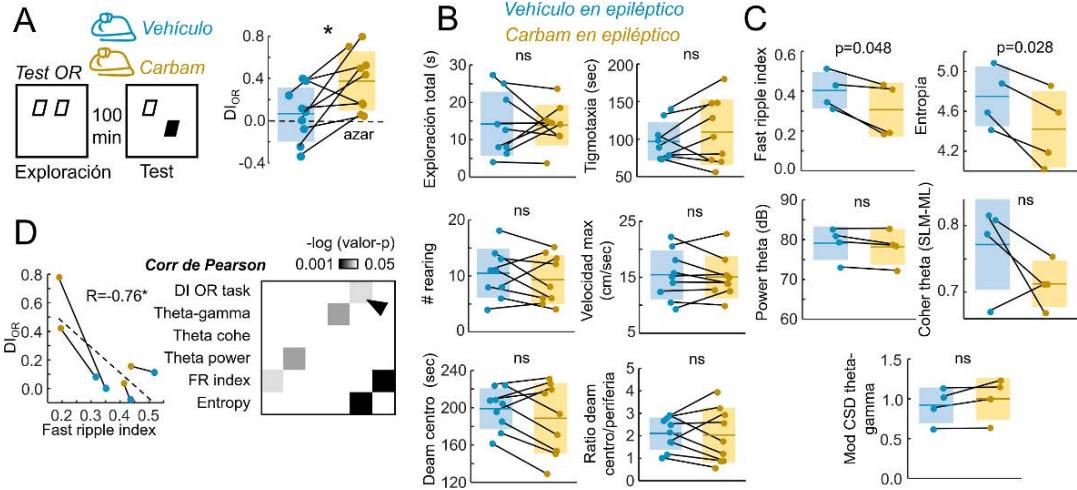


Figura 3.34: Rescate farmacológico de las características espetrales de los SPW-r y el déficit mnésico en las ratas epilépticas. (A) Efectos de la administración de carbamazepina tras la fase de exploración en la discriminación del objeto desplazado en la tarea OR. (B) Efectos de la administración de carbamazepina en las variables conductuales y (C) electrofisiológicas durante el test OR. * $p<0.05$. (D) Correlación cruzada de todos los parámetros espetrales asociados a la ejecución del test OR (derecha). El factor *fast ripple index* fue el único que correlacionó significativamente con el ID_{OR}.

Tabla 3.2: Efecto de la carbamazepina en las propiedades intrínsecas de las células registradas.

	<i>R</i> (MΩ)	<i>C</i> (μF)	τ (ms)	PA _U (mV)	FrecIO (Hz)
<	38.7	0.4	15.2	-52.9	21.5
20'	±6.2	±0.2	±4.4	±3.4	±3.6
<	34.8	0.4	10.1	-51.6	14.5
20'	±6.2	±0.3	±3.4	±9.9	±2.7
<i>p</i>	0.617	0.782	0.265	0.158	0.007

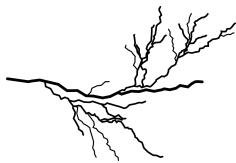
PA_U: umbral del potencial de acción. FrecIO: respuesta a pulsos cuadrados des polarizantes de 0.3 nA. Se reporta media ± SD y *p* de *t* de Student no pareada.

resultados (figura 3.34B; exploración de objetos: $t_8=0.12$, $p=0.908$; rearing: $t_8=0.93$,

$p=0.380$; velocidad máxima: $t_8=0.52$, $p=0.619$; tigmotaxis: $t_8=-1.29$, $p=0.234$; deambulación central: $t_8=1.30$, $p=0.23$; ratio centro/periferia: $t_8=0.26$, $p=0.801$; *t* de Student pareada). En un subconjunto de estos animales, previamente implantados con sondas multi-electrodo en el hipocampo dorsal, se analizaron los parámetros electrofisiológicos hipocampales asociados al desempeño de la prueba de memoria. Los efectos de la carbamazepina se concentraron en los eventos SPW-r, dejando aparentemente intactas las características del ritmo *theta* (3.34C; *fast ripple index*: $t_3=3.24$, $p=0.048$; entropía: $t_3=4.0$, $p=0.028$; *power of theta*: $t_3=1.70$, $p=0.144$; coherencia de *theta*: $t_3=-0.28$, $p=0.797$; modulación del CSD *theta-gamma*: $t_3=-1.72$, $p=0.183$; *t* de

Student pareada), lo cual es coherente con su impacto específico sobre los episodios de alta frecuencia de las células piramidales (figura 3.34, Pothmann et al., 2014).

Es más, evocando la asociación entre la desestabilización de los SPW-r y el déficit cognitivo reportado en la figura 3.20, la única variable cuya modificación correlacionó con los cambios en el DIOR inducidos por la carbamazepina fue precisamente el *fast rip-ple index* (figura 3.34D).



4 | Discusión

4.1. Los circuitos superficial y profundo de CA1

Los datos de la presente tesis doctoral revelan la contribución diferencial de las PC_{Prof} y PC_{Sup} a los SPW-r, desestimando la visión clásica de su participación uniforme durante estos eventos (Klausberger y Somogyi, 2008). Empleando registros simultáneos intracelulares y extracelulares multi-canal *in vivo*, en animales anestesiados, se describió una respuesta predominantemente hiperpolarizante en las PC_{Prof} durante los SPW-r, en contraste a la tendencia despolarizante de las PC_{Sup}. Cabe destacar que, la heterogeneidad de los distintos tipos de interneuronas es considerada como fundamental en la generación de los SPW-r (Klausberger et al., 2003; Lapray et al., 2012; Varga et al., 2012b; Viney et al., 2013; Katona et al., 2014). Es más, se ha descrito variabilidad de las PC en la respuesta de los SPW-r *in vitro*, asociada a varios factores distintos a la identidad histológica – el estado de excitabilidad del circuito, la conectividad por sinapsis eléctricas, etc (Ellender et al., 2010; Bähner et al., 2011; Aivar et al., 2014; Alvarado-Rojas et al., 2015) –. Adicionalmente, varios estudios intracelulares *in vivo* han destacado la concurrencia de inhibición somática y excitación dendrítica a la que son sometidas las PC (Ylinen et al.,

1995; Kamondi et al., 1998; English et al., 2014; Gan et al., 2017). No obstante, a la fecha de su publicación (Valero et al., 2015), los datos asociados a la presente tesis doctoral fueron, según nuestro conocimiento, la primera descripción de una respuesta hiperpolarizante *in vivo* de una PC durante los SPW-r.

Estos resultados fueron confirmados recientemente por varios estudios independientes (Hulse et al., 2016; Gan et al., 2017; Oliva et al., 2016a). Hulse y colaboradores (2016) confirmaron la heterogeneidad de las PC de CA1 durante los SPW-r en registros de *patch clamp* en modo de fijación de corriente, *in vivo* en ratón, y en ausencia de anestesia. Mediante la misma técnica, pero en presencia de Cesio¹ y en modo de fijación de voltaje, Gan y colaboradores (2017) han observado que, a pesar de la variabilidad, la inhibición supera la excitación en casi un orden de magnitud en la mayoría de sus células registradas (en su figura 2B, únicamente se advierte el caso de una PC donde el máximo de conductancia excitatoria supera la inhibitoria). Según sus observaciones cabría esperar que la mayoría de las PC estuvieran negativamente moduladas durante los SPW-r. Una potencial explicación para estas observaciones sería un

¹Las soluciones basadas en Cesio en los registros intracelulares mejoran el control del voltaje de las dendritas distales (Williams y Mitchell, 2008).

sesgo en la población muestral de células incluidas en su estudio hacia las PC_{Prof}, quizá facilitado por el tamaño relativamente grande de los electrodos de *patch clamp*². Oliva y colaboradores (2016a), mediante registros extracelulares con sistemas de electrodos de alta densidad en condiciones de libertad de movimiento, han descrito modulación negativa de los disparos de algunas células profundas, confirmando nuestra observación sobre el control de los potenciales de acción – el *output* del circuito – entre ambas subpopulaciones (figuras 3.11, 3.12 y 3.16A, pág 61, 61 y 64, respectivamente). Por último, la heterogeneidad descrita en CA1 parece extenderse al subículo, donde las células *bursting* (de disparo en ráfaga) son moduladas positivamente por los SPW-r, mientras que las *regular spiking* (de disparo regular) son consistentemente inhibidas (Bohm et al., 2015)³.

²Aunque evidentemente no es representativo, el único ejemplo histológico que reportan de sus PC registradas (Figura S1) es, claramente, una PC_{Prof}. A modo de observación personal, durante la realización de los experimentos descritos, se ha observado mayor facilidad para registrar PC_{Sup} con pipetas de alta impedancia (50-100 MΩ) – *id est*, de pequeño diámetro en su punta –, presumiblemente por la barrera física que supone su aglomeración en el borde con radiado. Y por su parte, relativamente mayor frecuencia de PC_{Prof} en registros yuxtagelulares, cuyas pipetas de gran tamaño (~1 μm en su extremo abierto) realizan un buen muestreo de la subcapa profunda, menos compacta pero primera en aparecer en la aproximación a CA1.

³Queda por confirmar la identidad histológica de las ambos tipos celulares en el subículo, no obstante podría haber una inversión respecto a lo descrito en CA1: las células *bursting* parecen encontrarse más profundas que las *regular spiking* (Menendez de la Prida et al., 2003). De esta forma, en ambas regiones las PC profundas tienden a presentar un disparo en ráfagas (son *bursting*), pero mientras que en CA1 su reclutamiento es suprimido durante los SPW-r, en el subículo es precisamente la población diferencial-

Una serie de observaciones interesantes corresponden a la relación de las trazas intracelulares con los eventos extracelulares registrados simultáneamente. En primer lugar, sorprendentemente, la amplitud intracelular experimentada por las PC durante los SPW-r no correlacionó sistemáticamente con la excitación total del circuito (Hulse et al., 2016; Gan et al., 2017), estimado mediante CSD del perfil hipocampal, como la fuente de corriente en SR (figura 3.4, pág 55), y en todo caso tal co-variación fue superior en las PC despolarizadas, contribuyendo a explicar su respuesta. Es más, a pesar la fuerte correlación entre fuente en SP y sumidero en SR, de corrientes extracelulares (figura 3.4D), únicamente se encontró una correlación marginal entre las fuentes extracelulares en SP y las respuestas intracelulares (figura 3.4C, pág 55). Por contra, la trazas intracelulares de las PC estuvieron considerablemente correlacionadas a la ritmicidad de los *ripples* propiamente dichos de SP, que supuestamente reflejan inhibición perisomática en las PVbc, sincronizada en la banda ripple (~150 Hz) (Gan et al., 2017), aunque en mayor medida para las PC hiperpolarizadas. La computación hipocampal de los SPW-r en CA1 emerge de la competición entre los aumentos transitorios excitación e inhibición (Ylinen et al., 1995; English et al., 2014; Buzsáki, 2015), aunque no conocemos con precisión las reglas que rigen la selección de las PC durante los eventos (Bähner et al., 2011; Stark et al., 2015). El reclutamiento de las PC durante los SPW-r está condicionado por la confluencia de varios mecanismos (Stark et al., 2015), entre los que destacan la combinación espacio-temporal de excitación que

mente activada por los eventos.

reciben desde CA3 (Both et al., 2008; Hulse et al., 2016) y su conectividad local (Csicsvari et al., 1999; Varga et al., 2012a; Lee et al., 2014; Masurkar et al., 2017). Así, en condiciones fisiológicas, excitación e inhibición se compensan y cancelan mutuamente, lo que explica la baja proporción de células que participan en un SPW-r dado (Csicsvari et al., 2000), aunque las diferencias intrínsecas observadas entre PC_{Sup} y PC_{Prof} condiciona severamente el modo de respuesta de las PC_{Sup} y PC_{Prof} (figura 3.11, pág 61; Oliva et al., 2016a), y probablemente defina los roles que ambos tipos celulares han asumido evolutivamente.

Los motivos circuitales responsables de las diferencias intrínsecas entre las PC_{Prof} y PC_{Sup} parecen ser la conectividad diferencial con las PVbc (Lee et al., 2014), como indican tanto los contajes de botones perisomáticos (figura 3.8) como experimentos adicionales realizados *in vitro* (Valero et al., 2015). Por su parte, las PC_{Sup} parecen preferentemente inervadas por las CCKbc (figura 3.8E, pág 59), interneuronas que disparan erráticamente durante los SPW-r. Estudios previos *in vitro* de pares neuronales en CA1 ventral de ratón no revelan diferencias en la conectividad entre CCKbc y PC_{Sup}/PC_{Prof} (Lee et al., 2014), lo que pone de relevancia disparidad inter-especie y/o regional (Masurkar et al., 2017) de la conectividad local hipocampal. Queda por determinar la potencial contribución de otros tipos de interneuronas, principalmente aquellas claramente moduladas por los eventos, como pueden ser las BS y las OLM (figura 1.5, sección 1.2.2, pág 23).

Considerando el perfil completo de respuesta de las diferentes poblaciones de PC (figura 3.11, pág 61), la circuitería del hi-

pocampo está precisamente controlada durante los SPW-r para segregar los modos de respuesta descritos (3.13, pág 62). Una vez cruzado el umbral de emergencia para un evento, la actividad de las PC de CA3 se propaga rápidamente a CA2 y CA3 (de la Prida et al., 2006). En CA2, la región hipocampal con mayor densidad de PVbc, se induce, por inhibición *feed-forward* (Chevaleyre y Siegelbaum, 2010; Mercer et al., 2007; Viney et al., 2013) la supresión del disparo de las PC (Kay et al., 2016). Dada la preferente conectividad de las PC de CA2 con las PC_{Prof}, la inhibición de las PC de CA2 suprime, consiguientemente, la excitación que aportan a las PC_{Prof}. Tal fenómeno, en conjunción con el reclutamiento de las PVbc (Klausberger et al., 2003, 2005; Varga et al., 2012b), eminentemente inervantes de las PC_{Prof} (Lee et al., 2014; Valero et al., 2015), resultan en la hiperpolarización y modulación negativa promedio que experimentan estas PC_{Prof} durante los SPW-r. En contraste, la conectividad local característica de las PC_{Sup} facilita una dominancia de la excitación dendrítica, y por tanto su participación en los eventos. En cualquier caso, nuestros datos muestran que la organización espacio-temporal de los circuitos hipocampales es aún más compleja de lo clásicamente postulado (Klausberger y Somogyi, 2008).

Cabe destacar la controversia del papel de CA2 durante los SPW-r. Nuestros datos evidencian una clara inflexión hiperpolarizante en los eventos (figura 3.10, pág 60) capaz de modular negativamente los potenciales de acción (figura 3.11, pág 61). Tales observaciones fueron reafirmadas en un estudio independiente usando registros extracelulares y confirmación anatómica *post hoc* (Kay et al., 2016). No obstante, otro reciente

trabajo, también basado en registros extracelulares, reportó heterogeneidad de las PC de CA2 en el eje radial y durante los SPW-r (Oliva et al., 2016a). Según este estudio las PC profundas de CA2 aumentan de forma gradual su actividad, pero se encuentran moduladas negativamente durante los eventos, tal y como ha sido descrito en nuestra base de datos de PC confirmadas histológicamente. Por contra, las PC superficiales de CA2 disparan potenciales de acción durante los SPW-r, aún antes que las PC de CA3 o CA1. Tal combinación de fenómenos les llevó a proponer CA2 como una zona de iniciación de SPW-r (Oliva et al., 2016a). Si bien, el estudio de Kay y colaboradores (2016) también muestran PC co-registradas en los mismos electrodos aumentando y suprimiendo su disparo durante los eventos, achacan la identidad de aquellas PC reclutadas a las regiones colidantes CA1 y/o CA3. Dado el tamaño relativamente pequeño de CA2, su localización fronteriza con el resto de áreas hipocampales y su disposición diagonal, probablemente sea necesaria una base de datos más extensa de registros confirmados histológicamente para ratificar la identidad y la respuesta de las PC de CA2.

PC_{Prof} y PC_{Sup} difieren en un número creciente de características. Las PC_{Prof} son más frecuentemente *place cells*, (Mizuseki et al., 2011; Oliva et al., 2016b; Fernández-Ruiz et al., 2017), al parecer debido a que reciben preferentemente más proyecciones desde MECIII (Masurkar et al., 2017), y en consecuencia, están más moduladas por el *gamma* rápido (Fernández-Ruiz et al., 2017). A su vez, proyectan en mayor medida a regiones neocorticales, como la corteza prefrontal (Cavada et al., 2000; Lee et al., 2014), así como al complejo amigdalino (Lee et al.,

2014). Por su parte, las PC_{Sup} se encuentran más moduladas por los SPW-r (Valero et al., 2015; Stark et al., 2014) y por el *gamma* lento, ambos eventos provenientes de CA3 (Csicsvari et al., 2000; Schomburg et al., 2014); y proyectan a las capas profundas de EC (Lee et al., 2014), cerrando el bucle hipocampal. De esta manera, las PC_{Sup} se postulan como una subcapa eminentemente «hipocampal»: reciben el contenido altamente procesado de la colateral de Schaffer, y proyectan a EC, donde su información se combina con los *inputs* multisensoriales corticales, y posteriormente continuará reverberando en el bucle hipocampal, depurándose, segregando *engramas* en DG y esculpiendo la red autoasociativa de CA3. Por su parte, las PC_{Prof} probablemente hacen las veces de interfaz hipocampo/neocorteza (o regiones subcorticales). Su excitabilidad está en gran medida controlada por las aferencias directas de MEC, de contenido episódico a *tiempo real*, que a su vez son discriminadas por la subcapa superficial «hipocampal» vía disinápsis inhibitoria PC_{Sup} → PVbc → PC_{Prof}. En conjunto, los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral, junto con otros recientes trabajos, soportan la noción de que las diferentes subcapas de CA1 articulan distintas funciones hipocampales: las PC_{Sup}, de acuerdo a la función hipocampal asociada a la memoria, conectan el hipocampo «consigo mismo»; mientras que las PC_{Prof}, según la noción cartográfica hipocampal, transmiten al resto de cortezas los mapas cognitivos.

4.2. Reclutamiento de PC en ripples y *fast ripples*

Los resultados obtenidos a partir de la sección 3.5 muestran que la selectividad durante los SPW-r puede ser comprendida en términos de reglas sinápticas específicas para los eventos y las PC participantes. Empleando SOM, un método de *clustering* no-supervisado, se reveló que parte de la variabilidad en la respuesta de las PC evento-a-evento está asociada a diferentes morfologías de SPW-r (figura 3.25 y 3.28, pág 71 y 74, respectivamente), lo que presuntamente refleja la activación de distintas combinaciones micro-circitales. En otras palabras, la activación de distintos microcircuitos genera trazas de LFP singulares, esculpidas por las interneuronas locales (Bazellot et al., 2016; Aivar et al., 2014) y las PC reclutadas (Schomburg et al., 2012; Taxidis et al., 2015). SOM reduce la dimensionalidad de los datos suministrados, encontrando patrones que explican la variabilidad de los datos. Por ejemplo, aplicado al sistema visual captura la organización neuronal selectiva a la orientación de los estímulos (Obermayer y Blasdel, 1993b; Shouno y Kurata, 2001). SOM aplicado a los SPW-r generó una organización de baja dimensionalidad de los eventos suministrados, en la que posteriormente se estudió el perfil de activación de las PC. En suma, la preferencia de una PC por ciertos SPW-r (vease PC en figura 3.25A para el clúster naranja) manifiesta la co-activación del micro-circuito en el que está específicamente insertada.

Considerando el alto grado de divergencia desde CA3 a CA1 (Wittner et al., 2007; Bezaire y Soltesz, 2013), y la abundante conectividad local de las interneuronas (Klausber-

ger y Somogyi, 2008; Lee et al., 2014), la pertenencia a un micro-círculo debe estar regulada con gran precisión, según la colisión de excitación e inhibición que experimentan las PC en su eje somato-dendrítico. En este sentido, en los animales controles las respuestas celulares fueron específicas, «privadas»: no correlacionaron ni con el MUA de CA3 ni con el sumidero de corriente asociado en SR (figura 3.28, 3.30 y 3.31, pág 74, 76 y 76, respectivamente), parámetros globales de la excitabilidad general del circuito.

En el antagonismo excitación *vs* inhibición radica la computación que realizan las PC. Ambas fuerzas se cancelan mutuamente, lo que explica la baja tasa de participación media de las PC durante los SPW-r (figura 3.24, pág 69; Csicsvari et al., 2000; English et al., 2014; Valero et al., 2015; Hulse et al., 2016) a pesar de las relativamente altas corrientes a las que es sometido el circuito, y en última instancia define y segregá la activación neta que experimenta cada PC. Tal fenómeno de neutralización mutua otorga independencia a las respuestas celulares, y por tanto, a la información que están representando los micro-circuitos (Malvache et al., 2016). En este sentido, la manipulación del balance entre excitación e inhibición que induce la picrotoxina – en favor de la primera – incrementa la correlación entre el sumidero de corriente en SR y las despolarizaciones intracelulares, y aumenta la participación en los eventos (figura 3.32, pág 78). En conjunto, estos datos manifiestan las reglas sinápticas de la ortogonalidad de los micro-circuitos hipocampales, probablemente imprescindibles en la generación de representaciones isomórficas al ambiente y la historia del sistema.

Tanto PC_{Sup} como PC_{Prof} exhibieron se-

lectividad durante los SPW-r, a pesar del mayor reclutamiento de las PC_{Sup} (figura 3.23, pág 69; Valero et al., 2015). Ambas poblaciones han desarrollado una diferente solución para el balance excitación/ inhibición (Lee et al., 2014; Stark et al., 2014; Valero et al., 2015; Fernández-Ruiz et al., 2017), mas aún durante los SPW-r (sección 3.1, pág 53; Valero et al., 2015). Las PC_{Sup} presentan mayor control de CA3 (Valero et al., 2015), y por tanto despliegan mayor participación en los eventos (figura 3.25D). Recientemente se han descrito diferencias en el contenido de información que manipulan ambos sub-circuitos (Valero et al., 2015; Danielson et al., 2016; Geiller et al., 2017; Fernández-Ruiz et al., 2017), que en general refuerzan la hipótesis de la existencia de dos sistemas paralelos de procesamiento en CA1: un sub-circuito «superficial», dominado por la dinámica interna hipocampal, y por tanto, cuyo reclutamiento es más estereotipado en todos los eventos y estados; y un sub-circuito «profundo», más gobernado por las aferencias sensoriales cambiantes, y por ende, más flexible.

Los datos revelaron una situación marcadamente diferente para el hipocampo epiléptico: las PC^{Epi} fueron reclutadas más azarosamente, incluso en eventos topológicamente distantes en los mapas SOM (figuras 3.25 y 3.28, pág 71 y 74, respectivamente) Los circuitos epilépticos presentan un desequilibrio constitutivo entre excitación e inhibición (Aivar et al., 2014; Buzsáki et al., 1991; Bragin et al., 1999) debido, entre otras razones, a alteraciones en la eficacia sináptica (Artinian et al., 2015), modificaciones operacionales en los circuitos GABAérgicos (Cossart et al., 2001; Peng et al., 2013; Lopez-Pigozzi et al., 2016) o cambios

en la excitabilidad (Su et al., 2002; Bernard et al., 2004). De hecho, en el hipocampo desinhibido, una única PC de CA3 es capaz de iniciar oleadas de actividad poblacional asociados a *fast ripples* patológicos (de la Prida et al., 2006). Como en el caso de las PC^{Con} dializadas con picrotoxina, las PC^{Epi} presentaron mayor participación en los SPW-r (figuras 3.24 y 3.27, pág 3.24 y 3.27, respectivamente) e incremento en la correlación entre los parámetros asociados a la excitación general del circuito – MUA en CA3 y sumidero de corriente en SR – y la respuesta celular – participación, *driving force* y carga – (figuras 3.28, 3.30 y 3.31, pág 74, 76 y 76, respectivamente).

En suma, se observó una pérdida de independencia de los micro-circuitos hipocampales que subyace tanto al aumento del reclutamiento celular, como a la menor selectividad durante los SPW-r (figura 3.31B, pág 76). De esta forma, la reorganización sináptica que sufren los circuitos epilépticos colapsa la independencia de sus micro-circuitos, lo que subyace al déficit de *calidad* de sus representaciones (Tyler et al., 2012; Feldt Muldoon et al., 2013). Manipulaciones que disminuyen el reclutamiento excesivo de las PC hipocampales, como la administración sistémica de carbamazepina, incrementaron parcialmente la ortogonalidad de los micro-circuitos, tal y como sugiere la disminución en la correlación entre el sumidero de corriente en SR y la *driving force*, y por tanto restablecieron en parte la selectividad celular (ver figura 3.33, pág 79).

Cabe destacar que, durante los SPW-r epilépticos, se ocultan en gran medida las diferencias entre las sub-capas profundas y superficiales en CA1 (figura 3.23 y 3.28), probablemente debido a un deficiente recluta-

miento de las PVbc (Cossart et al., 1998; Lopez-Pigozzi et al., 2016; Valero et al., 2015). Dado que PC_{Sup} y PC_{Prof} procesan información de distinta naturaleza, es sugerente interpretar la ecualización de sus respuestas durante los SPW-r como un ejemplo extremo del descenso en la ortogonalidad de los microcircuitos hipocampales.

Los cambios en la dinámica de las PC durante los SPW-r epilépticos se reflejan en sus características espectrales (figuras 3.20, 3.24 y 3.27, pág 66, 69 y 73, respectivamente) tales como el *fast ripple index* y la entropía (Foffani et al., 2007; Ibarz et al., 2010; Alvarado-Rojas et al., 2015; Menendez de la Prida et al., 2015). Estos índices son una buena aproximación mesoscópica a la actividad poblacional de los circuitos que los generan (Ibarz et al., 2010).

Llamativamente, en dos paradigmas comportamentales de memoria de reconocimiento, se encontró una correlación específica entre el desempeño de los animales y el *fast ripple index* (figuras 3.17 y 3.21, pág 64 y 67, respectivamente). En paralelo a su capacidad para restablecer parcialmente el reclutamiento y la selectividad celular, la carbamazepina fue capaz de recuperar las características espectrales de los SPW-r (figura 3.33, pág 79). Más aún, los cambios en el *fast ripple index* inducidos por la inyección sistémica de la carbamazepina correlacionaron con la mejora en el desempeño de los animales en las pruebas de conducta (figura 3.34, pág 80).

En conjunto, los resultados de la presente tesis doctoral revelan las reglas sinápticas que controlan la identidad celular y los modos de reclutamiento durante los SPW-r fisiológicos, así como los mecanismos específicos de su perturbación en el cerebro epilépti-

co, y reafirman la función cognitiva de estos eventos.



Figura 3.33. Recreación artística de un circuito de microcircuitos hipocampales.

Conclusiones

Considerando los resultados obtenidos, los análisis descritos en la sección 3 y según la interpretación expuesta en la sección 4, se concluye que:

1. Las células piramidales de la región CA1 hipocampal exhiben un comportamiento promedio heterogéneo durante los eventos *sharp wave-ripples*, bien despolarizándose y disparando potenciales de acción, bien hiperpolarizándose y modulando negativamente su reclutamiento.
2. Células con respuestas opuestas durante los *sharp wave-ripples* pertenecen a distintas entidades histológicas, las despolarizadas como células superficiales de CA1, las hiperpolarizadas como células profundas de CA1.
3. Células profundas y superficiales presentan diferente conectividad con las interneuronas locales responsables de la inhibición perisomática, las células superficiales más inervadas por las células cesto inmunoreactivas para CCK, y las células profundas con mayor número de botones sinápticos desde las células cesto inmunoreactivas para PV.
4. Las células de CA3 se despolarizan y disparan potenciales de acción durante los eventos *sharp wave-ripples*, mientras que las células de CA2 se hiperpolarizan y disminuyen su reclutamiento.
5. La conectividad local e inter-regional de las células superficiales y profundas de CA1 explica su diferente comportamiento durante los eventos *sharp wave-ripples*.
6. Los *sharp wave-ripples* que emergen en el hipocampo epiléptico presentan mayor reclutamiento celular, y en consecuencia, alteraciones en sus características espectrales respecto a los eventos controles, entre las que destacan desorganización y componentes de alta frecuencia.
7. Un método de agrupación no-supervisado revela un comportamiento selectivo de las células piramidales de CA1 para distintas morfologías de *sharp wave-ripple*.
8. Las células piramidales de CA1 en el cerebro epiléptico presentan menor selectividad que las células controles.

9. El control del balance entre excitación e inhibición que experimentan las células piramidales de CA1 durante los eventos *sharp wave-ripples* subyace a la selectividad celular.
10. El desequilibrio de excitación e inhibición en los circuitos hipocampales, ya sea constitutivo, como en el caso del cerebro epiléptico, o consecuencia de manipulaciones farmacológicas, disminuye los parámetros asociados a la selectividad celular.
11. Las características espectrales asociadas a los eventos *sharp wave-ripples* epilépticos subyace al deterioro cognitivo de los animales epilépticos experimentales.
12. Manipulaciones farmacológicas que disminuyen el reclutamiento excesivo en el cerebro epiléptico restablecen los parámetros celulares y circuitales asociados a la selectividad celular, y recuperan el desempeño de los animales epilépticos experimentales en las prueba de conducta.

Conclusions

Given the above results, the analysis described in section 3, and according to the interpretation presented in section 4, it is concluded that:

1. Pyramidal cells of the hippocampal CA1 region exhibit a heterogeneous average behavior during sharp wave-ripples events, either depolarizing and triggering action potentials, either hyperpolarizing and negatively modulating their recruitment.
2. Cells with opposite responses during sharp wave-ripples belong to different histological entities, depolarized as CA1 surface cells, hyperpolarized as deep CA1 cells.
3. Deep and superficial cells display different connectivity with local interneurons which are responsible of perisomatic inhibition, superficial cells are most innervated by basket cells immunoreactive for CCK, and deep cells have higher number of synaptic buttons from basket cells immunoreactive for PV.
4. CA3 cells are depolarized and trigger action potentials during sharp wave-ripples events, whereas CA2 cells hyperpolarize and decrease its recruitment.
5. The local and inter-regional connectivity of CA1 superficial and deep cells explains its different behavior during sharp wave-ripples events.
6. As compared to control events, sharp wave-ripples that emerge in the epileptic hippocampus have greater cellular recruitment and alterations in their spectral features, such as disorganization and high frequency components.
7. An unsupervised clustering method reveals selectivity of CA1 pyramidal cells for distinct sharp wave-ripple morphologies.
8. CA1 pyramidal cells in the epileptic brain have less selectivity than the control cells.
9. Excitation and inhibition balance experienced by CA1 pyramidal cells during sharp wave-ripples events underlies the cellular selectivity.

10. Disruption of the excitatory/ inhibitory balance in hippocampal circuits, whether constitutive, as in the case of the epileptic brain, or consequence of pharmacological manipulations, decreases the parameters value associated with cellular selectivity.
11. Spectral features associated to epileptic sharp wave-ripples underlie the cognitive impairment of experimental epileptic animals.
12. Pharmacological manipulations that decrease excessive recruitment in the epileptic brain restore the cellular and circuit parameters value associated with cell selectivity, and recover epileptic rats performance on behavioral tests.

Bibliografía

- Acsády, L., Arabadzisz, D., y Freund, T. F. (1996). Correlated morphological and neurochemical features identify different subsets of vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive interneurons in rat hippocampus. *Neuroscience*, 73(2):299–315.
- Agarwal, G., Stevenson, I. H., Berényi, A., Mizuseki, K., Buzsáki, G., y Sommer, F. T. (2014). Spatially Distributed Local Fields in the Hippocampus Encode Rat Position. *Science*, 344(6184).
- Airaksinen, M. S., Eilers, J., Garaschuk, O., Thoenen, H., Konnerth, A., y Meyer, M. (1997). Ataxia and altered dendritic calcium signaling in mice carrying a targeted null mutation of the calbindin D28k gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(4):1488–1493.
- Aivar, P., Valero, M., Bellistri, E., y Menendez de la Prida, L. (2014). Extracellular calcium controls the expression of two different forms of ripple-like hippocampal oscillations. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 34:2989–3004.
- Alexander, G. M., Rogan, S. C., Abbas, A. I., Armbruster, B. N., Pei, Y., Allen, J. a., Nonneman, R. J., Hartmann, J., Moy, S. S., Nicolelis, M. a., McNamara, J. O., y Roth, B. L. (2009). Remote control of neuronal activity in transgenic mice expressing evolved G protein-coupled receptors. *Neuron*, 63(1):27–39.
- Alonso, A. y Klink, R. (1993). Differential electroresponsiveness of stellate and pyramidal-like cells of medial entorhinal cortex layer II. *Journal of neurophysiology*, 70(1):128–43.
- Alonso, A. y Köhler, C. (1982). Evidence for separate projections of hippocampal pyramidal and non-pyramidal neurons to different parts of the septum in the rat brain. *Neuroscience letters*, 31(3):209–14.
- Alvarado-Rojas, C., Huberfeld, G., Baulac, M., Clemenceau, S., Sharpier, S., Miles, R., de la Prida, L. M., y Le Van Quyen, M. (2015). Different mechanisms of ripple-like oscillations in the human epileptic subiculum. *Annals of neurology*, 77(2):281–90.
- Alzheimer, A. (1906). Über einen eigenartigen schweren Erkrankungsprozeß der Hirnrinde. *Neurol Central.*, 25:1134.
- Amaral, D. G. (1978). A Golgi study of cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat. *The Journal of comparative neurology*, 182(4 Pt 2):851–914.

- Amaral, D. G., Dolorfo, C., y Alvarez-Royo, P. (1991). Organization of CA1 projections to the subiculum: A PHA-L analysis in the rat. *Hippocampus*, 1(4):415–435.
- Amaral, D. G., Insausti, R., y Cowan, W. M. (1987). The entorhinal cortex of the monkey: I. Cytoarchitectonic organization. *The Journal of Comparative Neurology*, 264(3):326–355.
- Amaral, D. G., Ishizuka, N., y Claiborne, B. (1990). Neurons, numbers and the hippocampal network. *Progress in brain research*, 83:1–11.
- Amaral, D. G. y Witter, M. P. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience*, 31(3):571–91.
- Anastassiou, C. A., Perin, R., Markram, H., y Koch, C. (2011). Ephaptic coupling of cortical neurons. *Nature Neuroscience*, 14(2):217–223.
- Andersen, P., Morris, R., Amaral, D., Bliss, T., y O' Keefe, J. (2009). *The Hippocampus Book*. Oxford University Press.
- Angevine, J. B. (1970). Time of neuron origin in the diencephalon of the mouse. An autoradiographic study. *The Journal of Comparative Neurology*, 139(2):129–187.
- Arimatsu, Y., Ishida, M., Kaneko, T., Ichinose, S., y Omori, A. (2003). Organization and development of corticocortical associative neurons expressing the orphan nuclear receptor Nurr1. *The Journal of Comparative Neurology*, 466(2):180–196.
- Artinian, J., Peret, A., Mircheva, Y., Martí, G., y Crépel, V. (2015). Impaired neuronal operation through aberrant intrinsic plasticity in epilepsy. *Annals of Neurology*, 77(4):592–606.
- Atherton, L. A., Burnell, E. S., y Mellor, J. R. (2016). Assessment of Methods for the Intracellular Blockade of GABA_A Receptors. *PloS one*, 11(8):e0160900.
- Axmacher, N., Elger, C. E., y Fell, J. (2008). Ripples in the medial temporal lobe are relevant for human memory consolidation. *Brain*, 131(7):1806–1817.
- Bähner, F., Weiss, E. K., Birke, G., Maier, N., Schmitz, D., Rudolph, U., Frotscher, M., Traub, R. D., Both, M., y Draguhn, A. (2011). Cellular correlate of assembly formation in oscillating hippocampal networks in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(35):E607–E616.
- Barbas, H. y Blatt, G. J. (1995). Topographically specific hippocampal projections target functionally distinct prefrontal areas in the rhesus monkey. *Hippocampus*, 5(6):511–533.
- Barth, A. L., Burkhalter, A., Callaway, E. M., Connors, B. W., Cauli, B., DeFelipe, J., Feldmeyer, D., Freund, T., Kawaguchi, Y., Kisvarday, Z., Kubota, Y., McBain, C., Oberlaender, M., Rossier, J., Rudy, B., Staiger, J. F., Somogyi, P., Tamás, G., y Yuste, R. (2016). Comment on ‘Principles of connectivity among morphologically defined cell types in adult neocortex’. *Science*, 353(6304):1108–1108.
- Bartsch, T. y Wulff, P. (2015). The hippocampus in aging and disease: From plasticity to vulnerability. *Neuroscience*, 309:1–16.

- Basu, J., Zaremba, J. D., Cheung, S. K., Hit-
ti, F. L., Zemelman, B. V., Losonczy, A.,
y Siegelbaum, S. A. (2016). Gating of hip-
pocampal activity, plasticity, and memory
by entorhinal cortex long-range inhibition.
Science, 351(6269):aaa5694–aaa5694.
- Bayer, S. A. (1980). Development of the
hippocampal region in the rat I. Neuro-
genesis examined with ³H-thymidine auto-
radiography. *The Journal of Comparative
Neurology*, 190(1):87–114.
- Bazélot, M., Teleńczuk, M. T., y Miles, R.
(2016). Single CA3 pyramidal cells trig-
ger sharp waves *in vitro* by exciting
interneurones. *The Journal of Physiology*,
594(10):2565–2577.
- Ben-Ari, Y., Tremblay, E., y Ottersen, O. P.
(1980). Injections of kainic acid into the
amygdaloid complex of the rat: an electro-
graphic, clinical and histological study in
relation to the pathology of epilepsy. *Neu-
roscience*, 5(3):515–28.
- Bernard, C., Anderson, A., Becker, A., Poo-
los, N. P., Beck, H., y Johnston, D.
(2004). Acquired Dendritic Channelo-
pathy in Temporal Lobe Epilepsy. *Sci-
ence*, 305(5683):532–535.
- Bezaire, M. J. y Soltesz, I. (2013). Quan-
titative assessment of CA1 local circuits:
knowledge base for interneuron-pyramidal
cell connectivity. *Hippocampus*, 23(9):751–
85.
- Blackstad, T. (1956). Commissural connec-
tions of the hippocampal region in the rat,
with special reference to their mode of
termination. *The Journal of comparative
neurology*, 105(3):417–537.
- Bland, B. H., Anderson, P., y Ganes, T.
(1975). Two generators of hippocampal
theta activity in rabbits. *Brain research*,
94(2):199–218.
- Bliss, T. V. y Lomo, T. (1970). Plasticity
in a monosynaptic cortical pathway. *The
Journal of physiology*, 207(2):61P.
- Bohm, C., Peng, Y., Maier, N., Winterer,
J., Poulet, J. F. A., Geiger, J. R. P., y
Schmitz, D. (2015). Functional Diversity
of Subicular Principal Cells during Hippo-
campal Ripples. *Journal of Neuroscience*,
35(40):13608–13618.
- Borg-Graham, L. J. (2001). The computa-
tion of directional selectivity in the retina
occurs presynaptic to the ganglion cell.
Nature Neuroscience, 4(2):176–183.
- Both, M., Bähner, F., von Bohlen und Hal-
bach, O., y Draguhn, A. (2008). Propaga-
tion of specific network patterns through
the mouse hippocampus. *Hippocampus*,
18(9):899–908.
- Bragin, A., Engel, J., Wilson, C. L., Vizen-
tin, E., y Mathern, G. W. (1999). Elec-
trophysiologic analysis of a chronic seizu-
re model after unilateral hippocampal KA
injection. *Epilepsia*, 40(9):1210–21.
- Brankack, J., Stewart, M., y Fox, S. E.
(1993). Current source density analysis of
the hippocampal theta rhythm: associated
sustained potentials and candidate synap-
tic generators. *Brain research*, 615(2):310–
27.
- Brodal, A. (1947). The hippocampus and
the sense of smell. A review. *Brain*,
70:179–222.

- Brun, V. H., Leutgeb, S., Wu, H.-Q., Schwartz, R., Witter, M. P., Moser, E. I., y Moser, M.-B. (2008). Impaired Spatial Representation in CA1 after Lesion of Direct Input from Entorhinal Cortex. *Neuron*, 57(2):290–302.
- Brun, V. H., Otnass, M. K., Molden, S., Steffenach, H.-A., Witter, M. P., Moser, M.-B., y Moser, E. I. (2002). Place Cells and Place Recognition Maintained by Direct Entorhinal-Hippocampal Circuitry. *Science*, 296(5576):2243–2246.
- Brunel, N. y Wang, X.-J. (2003). What Determines the Frequency of Fast Network Oscillations With Irregular Neural Discharges? I. Synaptic Dynamics and Excitation-Inhibition Balance. *Journal of Neurophysiology*, 90(1):415–430.
- Buhl, E. H., Halasy, K., y Somogyi, P. (1994). Diverse sources of hippocampal unitary inhibitory postsynaptic potentials and the number of synaptic release sites. *Nature*, 368(6474):823–828.
- Burgalossi, A., Herfst, L., von Heimendahl, M., Förste, H., Haskic, K., Schmidt, M., y Brecht, M. (2011). Microcircuits of functionally identified neurons in the rat medial entorhinal cortex. *Neuron*, 70(4):773–86.
- Burgess, N. y Hitch, G. (2005). Computational models of working memory: putting long-term memory into context. *Trends in Cognitive Sciences*, 9(11):535–541.
- Buzsáki, G. (1989). Two-stage model of memory trace formation: a role for ‘noisy’ brain states. *Neuroscience*, 31(3):551–70.
- Buzsáki, G. (2002). Theta Oscillations in the Hippocampus. *Neuron*, 33(3):325–340.
- Buzsáki, G. (2015). Hippocampal sharp wave-ripple: A cognitive biomarker for episodic memory and planning. *Hippocampus*, 25(10):1073–1188.
- Buzsáki, G., Anastassiou, C. A., y Koch, C. (2012). The origin of extracellular fields and currents — EEG, ECoG, LFP and spikes. *Nature Reviews Neuroscience*, 13(6):407–420.
- Buzsáki, G. y Draguhn, A. (2004). Neuronal Oscillations in Cortical Networks. *Science*, 304(5679).
- Buzsáki, G., Horváth, Z., Urioste, R., Hetke, J., y Wise, K. (1992). High-frequency network oscillation in the hippocampus. *Science (New York, N.Y.)*, 256:1025–1027.
- Buzsáki, G., Hsu, M., Slamka, C., Gage, F. H., y Horváth, Z. (1991). Emergence and propagation of interictal spikes in the subcortically denervated hippocampus. *Hippocampus*, 1(2):163–180.
- Buzsaki, G., Leung, L. W. S., y Vanderwolf, C. H. (1983). Cellular bases of hippocampal EEG in the behaving rat.
- Buzsáki, G. y Moser, E. I. (2013). Memory, navigation and theta rhythm in the hippocampal-entorhinal system. *Nature neuroscience*, 16(2):130–8.
- Canteras, N. S. y Swanson, L. W. (1992). Projections of the ventral subiculum to the amygdala, septum, and hypothalamus: A PHAL anterograde tract-tracing study

- in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 324(2):180–194.
- Canto, C. B., Wouterlood, F. G., y Witter, M. P. (2008). What does the anatomical organization of the entorhinal cortex tell us? *Neural plasticity*, 2008:381243.
- Cavada, C., Compañy, T., Tejedor, J., Cruz-Rizzolo, R. J., y Reinoso-Suárez, F. (2000). The Anatomical Connections of the Macaque Monkey Orbitofrontal Cortex. A Review. *Cerebral Cortex*, 10(3):220–242.
- Celio, M. R., Baier, W., Schärer, L., Greger sen, H. J., de Viragh, P. A., y Norman, A. W. (1990). Monoclonal antibodies directed against the calcium binding protein Calbindin D-28k. *Cell calcium*, 11(9):599–602.
- Cembrowski, M. S., Bachman, J. L., Wang, L., Sugino, K., Shields, B. C., y Spruston, N. (2016a). Spatial Gene-Expression Gradients Underlie Prominent Heterogeneity of CA1 Pyramidal Neurons. *Neuron*, 89(2):351–368.
- Cembrowski, M. S., Wang, L., Sugino, K., Shields, B. C., y Spruston, N. (2016b). Hipposeq: a comprehensive RNA-seq database of gene expression in hippocampal principal neurons. *eLife*, 5:e14997.
- Chang, B. S. y Lowenstein, D. H. (2003). Epilepsy. *New England Journal of Medicine*, 349(13):1257–1266.
- Chevaleyre, V. y Siegelbaum, S. A. (2010). Strong CA2 pyramidal neuron synapses define a powerful disynaptic cortico-hippocampal loop. *Neuron*, 66:560–572.
- Cobb, S. R., Halasy, K., Vida, I., Nyiri, G., Tamás, G., Buhl, E. H., y Somogyi, P. (1997). Synaptic effects of identified interneurons innervating both interneurons and pyramidal cells in the rat hippocampus. *Neuroscience*, 79(3):629–48.
- Colgin, L. L., Denninger, T., Fyhn, M., Häf ting, T., Bonnevie, T., Jensen, O., Moser, M.-B., y Moser, E. I. (2009). Frequency of gamma oscillations routes flow of information in the hippocampus. *Nature*, 462(7271):353–357.
- Cossart, R., Ben-Ari, Y., Dinocourt, C., Hirsch, J. C., Merchan-Perez, A., De Felipe, J., Esclapez, M., y Bernard, C. (2001). Dendritic but not somatic GABAergic inhibition is decreased in experimental epilepsy. *Nature Neuroscience*, 4(1):52–62.
- Cossart, R., Esclapez, M., Hirsch, J. C., Bernard, C., y Ben-Ari, Y. (1998). GluR5 kainate receptor activation in interneurons increases tonic inhibition of pyramidal cells. *Nature neuroscience*, 1(6):470–8.
- Craik, K. J. W. K. J. W. (1967). *The nature of explanation*. Cambridge University Press.
- Csicsvari, J., Henze, D. A., Jamieson, B., Harris, K. D., Sirota, A., Bartho, P., Wise, K. D., y Buzsaki, G. (2003). Massively parallel recording of unit and local field potentials with silicon-based electrodes. *J. Neurophysiol.*, 90(2):1314–1323.
- Csicsvari, J., Hirase, H., Czurkó, A., Mamiya, A., y Buzsáki, G. (1999). Oscillatory coupling of hippocampal pyramidal cells and interneurons in the behaving Rat. *The Journal of neuroscience : the official*

- journal of the Society for Neuroscience*, 19(1):274–87.
- Csicsvari, J., Hirase, H., Mamiya, A., y Buzsáki, G. (2000). Ensemble patterns of hippocampal CA3-CA1 neurons during sharp wave-associated population events. *Neuron*, 28:585–594.
- Danielson, N. B., Zaremba, J. D., Kaifosh, P., Bowler, J., Ladow, M., y Losonczy, A. (2016). Sublayer-Specific Coding Dynamics during Spatial Navigation and Learning in Hippocampal Area CA1. *Neuron*, 91(3):652–65.
- de la Prida, L. M. (2004). Synaptic Contributions to Focal and Widespread Spatiotemporal Dynamics in the Isolated Rat Subiculum In Vitro. *Journal of Neuroscience*, 24(24):5525–5536.
- de la Prida, L. M., Huberfeld, G., Cohen, I., Miles, R., Longacher, J., y O'Donovan, M. (2006). Threshold behavior in the initiation of hippocampal population bursts. *Neuron*, 49(1):131–42.
- DeFelipe, J., López-Cruz, P. L., Benavides-Piccione, R., Bielza, C., Larrañaga, P., Anderson, S., Burkhalter, A., Cauli, B., Fairén, A., Feldmeyer, D., Fishell, G., Fitzpatrick, D., Freund, T. F., González-Burgos, G., Hestrin, S., Hill, S., Hof, P. R., Huang, J., Jones, E. G., Kawaguchi, Y., Kisvárday, Z., Kubota, Y., Lewis, D. A., Marín, O., Markram, H., McBain, C. J., Meyer, H. S., Monyer, H., Nelson, S. B., Rockland, K., Rossier, J., Rubenstein, J. L. R., Rudy, B., Scanziani, M., Shepherd, G. M., Sherwood, C. C., Staiger, J. F., Tamás, G., Thomson, A., Wang, Y., Yuste, R., y Ascoli, G. A. (2013). New insights into the classification and nomenclature of cortical GABAergic interneurons. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(3):202–216.
- Dement, W. y Kleinman, N. (1957). The relation of eye movements during sleep to dream activity: An objective method for the study of dreaming. *Journal of Experimental Psychology*, 53(5):339–346.
- Dichter, M. y Ayala, G. (1987). Cellular mechanisms of epilepsy: a status report. *Science*, 237(4811):157–164.
- Diekelmann, S. y Born, J. (2010). The memory function of sleep. *Nature Reviews Neuroscience*, 11(2):114–26.
- Dolorfo, C. L. y Amaral, D. G. (1998). Entorhinal cortex of the rat: Organization of intrinsic connections. *Journal of Comparative Neurology*, 398(1):49–82.
- Dong, H.-W., Swanson, L. W., Chen, L., Fanselow, M. S., y Toga, A. W. (2009). Genomic-anatomic evidence for distinct functional domains in hippocampal field CA1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106:11794–11799.
- Draguhn, A., Traub, R. D., Schmitz, D., y Jefferys, J. G. R. (1998). Electrical coupling underlies high-frequency oscillations in the hippocampus in vitro. *Nature*, 394(6689):189–192.
- Dzhala, V. I. y Staley, K. J. (2004). Mechanisms of Fast Ripples in the Hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 24(40):8896–8906.
- Eichenbaum, H. (2014). Time cells in the hippocampus: a new dimension for map-

- ping memories. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(11):732–744.
- Ellender, T. J., Nissen, W., Colgin, L. L., Mann, E. O., y Paulsen, O. (2010). Priming of hippocampal population bursts by individual perisomatic-targeting interneurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 30(17):5979–5991.
- Elphick, M. R. y Egertová, M. (2001). The neurobiology and evolution of cannabinoid signalling. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 356(1407):381–408.
- Engel Jr, J., Bragin, A., Staba, R., y Mody, I. (2009). High-frequency oscillations: What is normal and what is not? *Epilepsia*, 50(4):598–604.
- English, D. F., Peyrache, A., Stark, E., Roux, L., Vallentin, D., Long, M. A., y Buzsaki, G. (2014). Excitation and Inhibition Compete to Control Spiking during Hippocampal Ripples: Intracellular Study in Behaving Mice. *Journal of Neuroscience*, 34(49):16509–16517.
- Ennaceur, A. (2010). One-trial object recognition in rats and mice: Methodological and theoretical issues. *Behavioural Brain Research*, 215(2):244–254.
- Fanselow, M. S. y Dong, H.-W. (2010). Are the Dorsal and Ventral Hippocampus Functionally Distinct Structures? *Neuron*, 65(1):7–19.
- Feldt Muldoon, S., Soltesz, I., y Cossart, R. (2013). Spatially clustered neuronal assemblies comprise the microstructure of synchrony in chronically epileptic networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(9):3567–72.
- Feng, G., Tintrup, H., Kirsch, J., Nichol, M. C., Kuhse, J., Betz, H., y Sanes, J. R. (1998). Dual requirement for gephyrin in glycine receptor clustering and molybdoenzyme activity. *Science (New York, N.Y.)*, 282(5392):1321–4.
- Fernández-Ruiz, A., Oliva, A., Nagy, G. A., Maurer, A. P., Berényi, A., Buzsáki, G., Buzsáki, G., Grosmark, A., Mao, D., Mizuseki, K., y al., e. (2017). Entorhinal-CA3 Dual-Input Control of Spike Timing in the Hippocampus by Theta-Gamma Coupling. *Neuron*, 93(5):1213–1226.
- Foffani, G., Uzcategui, Y. G., Gal, B., y Menéndez de la Prida, L. (2007). Reduced spike-timing reliability correlates with the emergence of fast ripples in the rat epileptic hippocampus. *Neuron*, 55(6):930–41.
- Fox, S., Wolfson, S., y Ranck, J. (1986). Hippocampal theta rhythm and the firing of neurons in walking and urethane anesthetized rats. *Experimental Brain Research*, 62(3):495–508.
- Freund, T. F. y Buzsáki, G. (1996). Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*, 6:347–470.
- Freund, T. F., Katona, I., y Piomelli, D. (2003). Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiological reviews*, 83(3):1017–66.
- Fuentealba, P., Begum, R., Capogna, M., Jinno, S., Márton, L. F., Csicsvari, J.,

- Thomson, A., Somogyi, P., y Klausberger, T. (2008). Ivy cells: a population of nitric-oxide-producing, slow-spiking GABAergic neurons and their involvement in hippocampal network activity. *Neuron*, 57(6):917–29.
- Fuhrmann, F., Justus, D., Sosulina, L., Kaneko, H., Beutel, T., Friedrichs, D., Schoch, S., Schwarz, M. K., Fuhrmann, M., y Remy, S. (2015). Locomotion, Theta Oscillations, and the Speed-Correlated Firing of Hippocampal Neurons Are Controlled by a Medial Septal Glutamatergic Circuit. *Neuron*, 86(5):1253–64.
- Fukudome, Y., Ohno-Shosaku, T., Matsui, M., Omori, Y., Fukaya, M., Tsubokawa, H., Taketo, M. M., Watanabe, M., Manabe, T., y Kano, M. (2004). Two distinct classes of muscarinic action on hippocampal inhibitory synapses: M2-mediated direct suppression and M1/M3-mediated indirect suppression through endocannabinoid signalling. *European Journal of Neuroscience*, 19(10):2682–2692.
- Gan, J., Weng, S.-M., Pernía-Andrade, A. J., Csicsvari, J., y Jonas, P. (2017). Phase-Locked Inhibition, but Not Excitation, Underlies Hippocampal Ripple Oscillations in Awake Mice In Vivo. *Neuron*, 93(2):308–314.
- Gatome, C., Slomianka, L., Lipp, H., y Amrein, I. (2010). Number estimates of neuronal phenotypes in layer II of the medial entorhinal cortex of rat and mouse. *Neuroscience*, 170(1):156–165.
- Geiller, T., Fattah, M., Choi, J.-S., y Royer, S. (2017). Place cells are more strongly tied to landmarks in deep than in superficial CA1. *Nature Communications*, 8:14531.
- Gelinas, J. N., Khodagholy, D., Thesen, T., Devinsky, O., y Buzsáki, G. (2016). Interictal epileptiform discharges induce hippocampal–cortical coupling in temporal lobe epilepsy. *Nature Medicine*, 22(6):641–648.
- Geneser, F. A. (1987). Distribution of acetylcholinesterase in the hippocampal region of the rabbit: II. Subiculum and hippocampus. *The Journal of Comparative Neurology*, 262(1):90–104.
- Geneser-Jensen, F. A., Haug, F. M., y Danesch, G. (1974). Distribution of heavy metals in the hippocampal region of the guinea pig. A light microscope study with Timm's sulfide silver method. *Zeitschrift fur Zellforschung und mikroskopische Anatomie (Vienna, Austria : 1948)*, 147(4):441–78.
- Girardeau, G., Benchenane, K., Wiener, S. I., Buzsáki, G., y Zugardo, M. B. (2009). Selective suppression of hippocampal ripples impairs spatial memory. *Nature Neuroscience*, 12(10):1222–1223.
- Gloveli, T., Schmitz, D., Empson, R. M., Du-gladze, T., y Heinemann, U. (1997). Morphological and electrophysiological characterization of layer III cells of the medial entorhinal cortex of the rat. *Neuroscience*, 77(3):629–48.
- GoodSmith, D., Chen, X., Wang, C., Kim, S. H., Song, H., Burgalossi, A., Christian, K. M., Knierim, J. J., Hen, R., McBain,

- C., y al., e. (2017). Spatial Representations of Granule Cells and Mossy Cells of the Dentate Gyrus. *Neuron*, 93(3):677–690.
- Grastyan, E., Lissak, K., Madarasz, I., y Donhoffer, H. (1959). Hippocampal electrical activity during the development of conditioned reflexes. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*, 11:409–430.
- Greene, J. R. y Totterdell, S. (1997). Morphology and distribution of electrophysiologically defined classes of pyramidal and nonpyramidal neurons in rat ventral subiculum in vitro. *The Journal of comparative neurology*, 380(3):395–408.
- Gupta, A. S., van der Meer, M. A., Touretzky, D. S., y Redish, A. D. (2010). Hippocampal Replay Is Not a Simple Function of Experience. *Neuron*, 65(5):695–705.
- Guzman, S. J., Schlogl, A., Frotscher, M., y Jonas, P. (2016). Synaptic mechanisms of pattern completion in the hippocampal CA3 network. *Science*, 353(6304):1117–1123.
- Hafting, T., Fyhn, M., Molden, S., Moser, M.-B., y Moser, E. I. (2005). Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. *Nature*, 436(7052):801–806.
- Hájos, N. y Mody, I. (1997). Synaptic communication among hippocampal interneurons: properties of spontaneous IPSCs in morphologically identified cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 17(21):8427–42.
- Halasy, K. y Somogyi, P. (1993). Distribution of GABAergic synapses and their targets in the dentate gyrus of rat: a quantitative immunoelectron microscopic analysis. *Journal fur Hirnforschung*, 34(3):299–308.
- Hamam, B. N., Amaral, D. G., y Alonso, A. A. (2002). Morphological and electrophysiological characteristics of layer V neurons of the rat lateral entorhinal cortex. *Journal of Comparative Neurology*, 451(1):45–61.
- Hara, K. y Harris, R. A. (2002). The anesthetic mechanism of urethane: the effects on neurotransmitter-gated ion channels. *Anesthesia and analgesia*, 94(2):313–8.
- Harris, K. D., Csicsvari, J., Hirase, H., Dragoi, G., y Buzsáki, G. (2003). Organization of cell assemblies in the hippocampus. *Nature*, 424(6948):552–556.
- Harris, K. D. y Shepherd, G. M. G. (2015). The neocortical circuit: themes and variations. *Nature Neuroscience*, 18(2):170–181.
- Hasselmo, M. E. (2005). What is the function of hippocampal theta rhythm?—Linking behavioral data to phasic properties of field potential and unit recording data. *Hippocampus*, 15(7):936–949.
- Hasselmo, M. E. y Giocomo, L. M. (2006). Cholinergic Modulation of Cortical Function. *Journal of Molecular Neuroscience*, 30(1-2):133–136.
- Hasselmo, M. E. y Wyble, B. P. (1997). Free recall and recognition in a network model of the hippocampus: simulating effects of

- scopolamine on human memory function. *Behavioural brain research*, 89(1-2):1–34.
- Helmchen, F., Imoto, K., y Sakmann, B. (1996). Ca₂₊ buffering and action potential-evoked Ca₂₊ signaling in dendrites of pyramidal neurons. *Biophysical Journal*, 70(2):1069–1081.
- Hitti, F. L. y Siegelbaum, S. A. (2014). The hippocampal CA2 region is essential for social memory. *Nature*, 508(7494):88–92.
- Holmes, G. L. y Lenck-Santini, P.-P. (2006). Role of interictal epileptiform abnormalities in cognitive impairment. *Epilepsy & Behavior*, 8(3):504–515.
- Hulse, B. K., Lubenov, E. V., y Siapas, A. G. (2017). Brain State Dependence of Hippocampal Subthreshold Activity in Awake Mice. *Cell Reports*, 18(1):136–147.
- Hulse, B. K., Moreaux, L. C., Lubenov, E. V., y Siapas, A. G. (2016). Membrane Potential Dynamics of CA1 Pyramidal Neurons during Hippocampal Ripples in Awake Mice. *Neuron*, 89(4):800–13.
- Ibarz, J. M., Foffani, G., Cid, E., Inostroza, M., y Menendez de la Prida, L. (2010). Emergent dynamics of fast ripples in the epileptic hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 30(48):16249–61.
- Inomata, N., Tokutomi, N., Oyama, Y., y Akaike, N. (1988). Intracellular picrotoxin blocks pentobarbital-gated Cl⁻ conductance. *Neuroscience research*, 6(1):72–5.
- Inostroza, M., Brotons-Mas, J. R., Laurent, F., Cid, E., y de la Prida, L. M. (2013). Specific impairment of "what-where-when" episodic-like memory in experimental models of temporal lobe epilepsy. *The Journal of Neuroscience*, 33(45):17749–62.
- Insausti, R., Herrero, M. T., y Witter, M. P. (1997). Entorhinal cortex of the rat: cytoarchitectonic subdivisions and the origin and distribution of cortical efferents. *Hippocampus*, 7(2):146–83.
- International League Against Epilepsy (1981). Proposal for Revised Clinical and Electroencephalographic Classification of Epileptic Seizures. *Epilepsia*, 22(4):489–501.
- Ishizuka, N., Weber, J., y Amaral, D. G. (1990). Organization of intrahippocampal projections originating from CA3 pyramidal cells in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 295(4):580–623.
- Jacobs, J., Staba, R., Asano, E., Otsubo, H., Wu, J., Zijlmans, M., Mohamed, I., Kahane, P., Dubeau, F., Navarro, V., y Gotman, J. (2012). High-frequency oscillations (HFOs) in clinical epilepsy. *Progress in Neurobiology*, 98(3):302–315.
- Jadhav, S. P., Kemere, C., German, P. W., y Frank, L. M. (2012). Awake Hippocampal Sharp-Wave Ripples Support Spatial Memory. *Science*, 336(6087):1454–1458.
- Jahnke, S., Timme, M., y Memmesheimer, R.-M. (2015). A Unified Dynamic Model for Learning, Replay, and Sharp-Wave/Ripples. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 35(49):16236–58.

- Jefferys, J. G., Menendez de la Prida, L., Wendling, F., Bragin, A., Avoli, M., Timofeev, I., y Lopes da Silva, F. H. (2012). Mechanisms of physiological and epileptic HFO generation. *Progress in Neurobiology*, 98(3):250–264.
- Jensen, O. y Lisman, J. E. (2005). Hippocampal sequence-encoding driven by a cortical multi-item working memory buffer. *Trends in Neurosciences*, 28(2):67–72.
- Jiang, X., Shen, S., Cadwell, C. R., Berens, P., Sinz, F., Ecker, A. S., Patel, S., y Tolias, A. S. (2015). Principles of connectivity among morphologically defined cell types in adult neocortex. *Science*, 350(6264):aac9462–aac9462.
- Jinno, S., Klausberger, T., Marton, L. F., Dalezios, Y., Roberts, J. D. B., Fuentealba, P., Bushong, E. A., Henze, D., Buzsaki, G., y Somogyi, P. (2007). Neuronal Diversity in GABAergic Long-Range Projections from the Hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 27(33):8790–8804.
- Jouvet, M., Michel, F., y Courjon, J. (1959). L'activité électrique du rhinencéphale au cours du sommeil chez le chat. *C R Soc Biol (Paris)*, 153:101:105.
- Jung, R. y Kornmüller, A. E. (1938). Eine Methodik der Ableitung lokalisierter Potentialschwankungen aus subcorticalen Hirngebieten. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten*, 109(1):1–30.
- Kamondi, A., Acsády, L., y Buzsáki, G. (1998). Dendritic spikes are enhanced by cooperative network activity in the intact hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 18:3919–3928.
- Kandel, E., Spender, W. A., y Brinley, F. J. (1961). Electrophysiology of hippocampal neurons. I. Sequential invasion and synaptic organization. *Journal of neurophysiology*, 24:225–42.
- Katona, I., Sperlágh, B., Sík, A., Käfalvi, A., Vizi, E. S., Mackie, K., y Freund, T. F. (1999). Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 19:4544–4558.
- Katona, L., Lapray, D., Viney, T. J., Oulhaj, A., Borhegyi, Z., Micklem, B. R., Klausberger, T., y Somogyi, P. (2014). Sleep and Movement Differentiates Actions of Two Types of Somatostatin-Expressing GABAergic Interneuron in Rat Hippocampus. *Neuron*, 82:872–886.
- Kay, K., Sosa, M., Chung, J. E., Karlsson, M. P., Larkin, M. C., y Frank, L. M. (2016). A hippocampal network for spatial coding during immobility and sleep. *Nature*, 531(7593):185–190.
- Khazipov, R., Congar, P., y Ben-Ari, Y. (1995). Hippocampal CA1 lacunosum-moleculare interneurons: comparison of effects of anoxia on excitatory and inhibitory postsynaptic currents. *Journal of neurophysiology*, 74(5):2138–49.
- Kitamura, T., Pignatelli, M., Suh, J., Kohara, K., Yoshiki, A., Abe, K., y Tonegawa, S. (2014). Island cells control temporal association memory. *Science*, 21(343):896–901.
- Kitamura, T., Sun, C., Martin, J., Kitch, L. J., Schnitzer, M. J., y Tonegawa,

- S. (2015). Entorhinal Cortical Ocean Cells Encode Specific Contexts and Drive Context-Specific Fear Memory. *Neuron*, 87(6):1317–1331.
- Klausberger, T. (2009). GABAergic interneurons targeting dendrites of pyramidal cells in the CA1 area of the hippocampus. *European Journal of Neuroscience*, 30(6):947–957.
- Klausberger, T., Magill, P. J., Márton, L. F., Roberts, J. D. B., Cobden, P. M., Buzsáki, G., y Somogyi, P. (2003). Brain-state- and cell-type-specific firing of hippocampal interneurons in vivo. *Nature*, 421:844–848.
- Klausberger, T., Márton, L. F., Baude, A., Roberts, J. D. B., Magill, P. J., y Somogyi, P. (2004). Spike timing of dendrite-targeting bistratified cells during hippocampal network oscillations in vivo. *Nature Neuroscience*, 7(1):41–47.
- Klausberger, T., Marton, L. F., O'Neill, J., Huck, J. H. J., Dalezios, Y., Fuentealba, P., Suen, W. Y., Papp, E., Kaneko, T., Watanabe, M., Csicsvari, J., y Somogyi, P. (2005). Complementary roles of cholecystokinin- and parvalbumin-expressing GABAergic neurons in hippocampal network oscillations. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 25:9782–9793.
- Klausberger, T. y Somogyi, P. (2008). Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. *Science (New York, N.Y.)*, 321:53–57.
- Kleen, J. K., Scott, R. C., Holmes, G. L., y Lenck-Santini, P. P. (2010). Hippocampal interictal spikes disrupt cognition in rats. *Annals of Neurology*, 67(2):250–257.
- Kloosterman, F., Witter, M. P., y Van Haeften, T. (2003). Topographical and laminar organization of subiculum projections to the parahippocampal region of the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 455(2):156–171.
- Koch, C., Massimini, M., Boly, M., y Tononi, G. (2016). Neural correlates of consciousness: progress and problems. *Nature Reviews Neuroscience*, 17(5):307–321.
- Kohara, K., Pignatelli, M., Rivest, A. J., Jung, H.-Y., Kitamura, T., Suh, J., Frank, D., Kajikawa, K., Mise, N., Obata, Y., Wickersham, I. R., y Tonegawa, S. (2014). Cell type-specific genetic and optogenetic tools reveal hippocampal CA2 circuits. *Nature neuroscience*, 17:269–79.
- Kohonen, T. (2001). *Self-Organizing Maps*, volume 30 of *Springer Series in Information Sciences*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Korshunov, V. A. (1995). Miniature microdrive for extracellular recording of neuronal activity in freely moving animals. *Journal of neuroscience methods*, 57(1):77–80.
- Kosaka, T., Katsumaru, H., Hama, K., Wu, J. Y., y Heizmann, C. W. (1987). GABAergic neurons containing the Ca²⁺-binding protein parvalbumin in the rat hippocampus and dentate gyrus. *Brain research*, 419(1-2):119–30.
- Kovács, K. A., O'Neill, J., Schoenenberger, P., Penttonen, M., Rangue Guerrero,

- D. K., y Csicsvari, J. (2016). Optogenetically Blocking Sharp Wave Ripple Events in Sleep Does Not Interfere with the Formation of Stable Spatial Representation in the CA1 Area of the Hippocampus. *PLOS ONE*, 11(10):e0164675.
- Kralj, J. M., Douglass, A. D., Hochbaum, D. R., Maclaurin, D., y Cohen, A. E. (2011). Optical recording of action potentials in mammalian neurons using a microbial rhodopsin. *Nature Methods*, 9(1):90–95.
- Lacy, J. W. y Stark, C. E. L. (2013). The neuroscience of memory: implications for the courtroom. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(9):649–658.
- Lapray, D., Lasztoczi, B., Lagler, M., Vinyet, T. J., Katona, L., Valenti, O., Hartwich, K., Borhegyi, Z., Somogyi, P., y Klausberger, T. (2012). Behavior-dependent specialization of identified hippocampal interneurons. *Nature neuroscience*, 15(9):1265–71.
- Lasztóczki, B., Tukker, J. J., Somogyi, P., y Klausberger, T. (2011). Terminal field and firing selectivity of cholecystokinin-expressing interneurons in the hippocampal CA3 area. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 31(49):18073–93.
- Laurent, F., Brotons-Mas, J. R., Cid, E., Lopez-Pigozzi, D., Valero, M., Gal, B., y de la Prida, L. M. (2015). Proximodistal Structure of Theta Coordination in the Dorsal Hippocampus of Epileptic Rats. *Journal of Neuroscience*, 35(11).
- Leão, R. N., Mikulovic, S., Leão, K. E., Munguba, H., Gezelius, H., Enjin, A., Patra, K., Eriksson, A., Loew, L. M., Tort, A. B. L., y Kullander, K. (2012). OLM interneurons differentially modulate CA3 and entorhinal inputs to hippocampal CA1 neurons. *Nature Neuroscience*, 15(11):1524–1530.
- Lee, A. K. y Wilson, M. A. (2002). Memory of sequential experience in the hippocampus during slow wave sleep. *Neuron*, 36(6):1183–94.
- Lee, S. H., Marchionni, I., Bezaire, M., Varga, C., Danielson, N., Lovett-Barron, M., Losonczy, A., y Soltesz, I. (2014). Parvalbumin-positive basket cells differentiate among hippocampal pyramidal cells. *Neuron*, 82:1129–1144.
- Leuner, B. y Gould, E. (2010). Structural Plasticity and Hippocampal Function. *Annual Review of Psychology*, 61(1):111–140.
- Li, S., Hong, S., Shepardson, N. E., Walsh, D. M., Shankar, G. M., y Selkoe, D. (2009). Soluble oligomers of amyloid Beta protein facilitate hippocampal long-term depression by disrupting neuronal glutamate uptake. *Neuron*, 62(6):788–801.
- Li, X. G., Somogyi, P., Ylinen, A., y Buzsaki, G. (1994). The hippocampal CA3 network: An in vivo intracellular labeling study. *Journal of Comparative Neurology*, 339(2):181–208.
- Liu, X., Ramirez, S., Pang, P. T., Puryear, C. B., Govindarajan, A., Deisseroth, K., y Tonegawa, S. (2012). Optogenetic stimulation of a hippocampal engram activates fear memory recall. *Nature*, 484(7394):381–5.

- Llinás, R. R. (1988). The intrinsic electrophysiological properties of mammalian neurons: insights into central nervous system function. *Science (New York, N.Y.)*, 242(4886):1654–64.
- Long, M. A., Jin, D. Z., y Fee, M. S. (2010). Support for a synaptic chain model of neuronal sequence generation. *Nature*, 468(7322):394–399.
- Looger, L. L. y Griesbeck, O. (2012). Genetically encoded neural activity indicators. *Current Opinion in Neurobiology*, 22(1):18–23.
- Lopez-Pigozzi, D., Laurent, F., Brotons-Mas, J. R., Valderrama, M., Valero, M., Fernandez-Lamo, I., Cid, E., Gomez-Dominguez, D., Gal, B., y Menendez de la Prida, L. (2016). Altered Oscillatory Dynamics of CA1 Parvalbumin Basket Cells during Theta–Gamma Rhythmopathies of Temporal Lobe Epilepsy. *eneuro*, 3(6).
- Lorente de Nó, R. (1934). *Studies on the Structure of the Cerebral Cortex: Continuation of the study of the ammonic system. II.* Johann Ambrosius Barth.
- Malvache, A., Reichinnek, S., Villette, V., Haimerl, C., y Cossart, R. (2016). Awake hippocampal reactivations project onto orthogonal neuronal assemblies. *Science*, 353(6305):1280–1283.
- Markram, H., Toledo-Rodriguez, M., Wang, Y., Gupta, A., Silberberg, G., y Wu, C. (2004). Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(10):793–807.
- Marr, D. (1971). Simple memory: a theory for archicortex. *Philosophical transactions* of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences, 262(841):23–81.
- Masurkar, A. V., Srinivas, K. V., Brann, D. H., Warren, R., Lowes, D. C., y Siegelbaum, S. A. (2017). Medial and Lateral Entorhinal Cortex Differentially Excite Deep versus Superficial CA1 Pyramidal Neurons. *Cell Reports*, 18(1):148–160.
- McBain, C. J., DiChiara, T. J., y Kauer, J. A. (1994). Activation of metabotropic glutamate receptors differentially affects two classes of hippocampal interneurons and potentiates excitatory synaptic transmission. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 14(7):4433–45.
- McGeorge, A. y Faull, R. (1989). The organization of the projection from the cerebral cortex to the striatum in the rat. *Neuroscience*, 29(3):503–537.
- McNaughton, B. y Morris, R. (1987). Hippocampal synaptic enhancement and information storage within a distributed memory system. *Trends in Neurosciences*, 10(10):408–415.
- McNaughton, B. L., Barnes, C. A., Meltzer, J., y Sutherland, R. J. (1989). Hippocampal granule cells are necessary for normal spatial learning but not for spatially-selective pyramidal cell discharge. *Experimental brain research*, 76(3):485–96.
- McNaughton, B. L., Battaglia, F. P., Jensen, O., Moser, E. I., y Moser, M.-B. (2006). Path integration and the neural basis of the 'cognitive map'. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(8):663–678.

- Meibach, R. C. y Siegel, A. (1977). Thalamic projections of the hippocampal formation: evidence for an alternate pathway involving the internal capsule. *Brain research*, 134(1):1-12.
- Melzer, S., Michael, M., Caputi, A., Elia-va, M., Fuchs, E. C., Whittington, M. A., y Monyer, H. (2012). Long-Range-Projecting GABAergic Neurons Modulate Inhibition in Hippocampus and Entorhinal Cortex. *Science*, 335(6075):1506-1510.
- Menendez de la Prida, L., Staba, R. J., y Dian, J. A. (2015). Conundrums of High-Frequency Oscillations (80-800 Hz) in the Epileptic Brain. *Journal of Clinical Neurophysiology*, 32(3):207-219.
- Menendez de la Prida, L., Suarez, F., y Pozo, M. (2003). Electrophysiological and morphological diversity of neurons from the rat subiculum complex in vitro. *Hippocampus*, 13(6):728-744.
- Mercer, A., Trigg, H. L., y Thomson, A. M. (2007). Characterization of neurons in the CA2 subfield of the adult rat hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 27(27):7329-38.
- Mitchell, S. J. y Ranck, J. B. (1980). Generation of theta rhythm in medial entorhinal cortex of freely moving rats. *Brain research*, 189(1):49-66.
- Mizumori, S. J., McNaughton, B. L., Barnes, C. A., y Fox, K. B. (1989). Preserved spatial coding in hippocampal CA1 pyramidal cells during reversible suppression of CA3c output: evidence for pattern completion in hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 9(11):3915-28.
- Mizuseki, K., Diba, K., Pastalkova, E., y Buzsáki, G. (2011). Hippocampal CA1 pyramidal cells form functionally distinct sublayers. *Nature Neuroscience*, 14(9):1174-1181.
- Mizuseki, K., Sirota, A., Pastalkova, E., y Buzsáki, G. (2009). Theta Oscillations Provide Temporal Windows for Local Circuit Computation in the Entorhinal-Hippocampal Loop. *Neuron*, 64(2):267-280.
- Montgomery, S. M., Betancur, M. I., y Buzsáki, G. (2009). Behavior-dependent coordination of multiple theta dipoles in the hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(5):1381-94.
- Moser, E. I., Roudi, Y., Witter, M. P., Kentros, C., Bonhoeffer, T., y Moser, M.-B. (2014). Grid cells and cortical representation. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(7):466-481.
- Nádasdy, Z., Hirase, H., Czurkó, A., Csicsvari, J., y Buzsáki, G. (1999). Replay and time compression of recurring spike sequences in the hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 19(21):9497-507.
- Nafstad, P. H. (1967). An electron microscope study on the termination of the perforant path fibres in the hippocampus and the fascia dentata. *Zeitschrift fur Zellforschung und mikroskopische Anatomie (Vienna, Austria : 1948)*, 76(4):532-42.

- Neunuebel, J. P. y Knierim, J. J. (2014). CA3 Retrieves Coherent Representations from Degraded Input: Direct Evidence for CA3 Pattern Completion and Dentate Gyrus Pattern Separation. *Neuron*, 81(2):416–427.
- Neves, G., Cooke, S. F., y Bliss, T. V. P. (2008). Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nature Reviews Neuroscience*, 9(1):65–75.
- Nunzi, M. G., Gorio, A., Milan, F., Freund, T. F., Somogyi, P., y Smith, A. D. (1985). Cholecystokinin-immunoreactive cells form symmetrical synaptic contacts with pyramidal and nonpyramidal neurons in the hippocampus. *The Journal of Comparative Neurology*, 237(4):485–505.
- Obermayer, K. y Blasdel, G. G. (1993a). Geometry of orientation and ocular dominance columns in monkey striate cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 13(10):4114–29.
- Obermayer, K. y Blasdel, G. G. (1993b). Geometry of orientation and ocular dominance columns in monkey striate cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 13(10):4114–29.
- O’Keefe, J. (1976). Place units in the hippocampus of the freely moving rat. *Experimental neurology*, 51(1):78–109.
- O’Keefe, J. y Burgess, N. (2005). Dual phase and rate coding in hippocampal place cells: theoretical significance and relationship to entorhinal grid cells. *Hippocampus*, 15(7):853–66.
- O’Keefe, J. y Dostrovsky, J. (1971). The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain research*, 34(1):171–5.
- O’Keefe, J. y Nadel, L. (1978). *The hippocampus as a cognitive map*. Clarendon Press.
- O’keefe, J. y Recce, M. L. (1993). Phase Relationship Between Hippocampal Place Units and the EEG Theta Rhythm. *Hippocampus*, 3(3):317–3303.
- Okuyama, T., Kitamura, T., Roy, D. S., Itohara, S., y Tonegawa, S. (2016). Ventral CA1 neurons store social memory. *Science*, 353(6307).
- Oliva, A., Fernández-Ruiz, A., Buzsáki, G., y Berényi, A. (2016a). Role of Hippocampal CA2 Region in Triggering Sharp-Wave Ripples. *Neuron*, 91(6):1342–1355.
- Oliva, A., Fernández-Ruiz, A., Buzsáki, G., y Berényi, A. (2016b). Spatial coding and physiological properties of hippocampal neurons in the Cornu Ammonis subregions. *Hippocampus*, 26(12):1593–1607.
- O’Neill, J., Senior, T., y Csicsvari, J. (2006). Place-selective firing of CA1 pyramidal cells during sharp wave/ripple network patterns in exploratory behavior. *Neuron*, 49(1):143–155.
- O’Reilly, R. C. y McClelland, J. L. (1994). Hippocampal conjunctive encoding, storage, and recall: Avoiding a trade-off. *Hippocampus*, 4(6):661–682.
- Papatheodoropoulos, C., Sotiriou, E., Kotzadimitriou, D., y Drimala, P. (2007). At clinically relevant concentrations the

- anaesthetic/amnesic thiopental but not the anticonvulsant phenobarbital interferes with hippocampal sharp wave-ripple complexes. *BMC Neuroscience*, 8(1):60.
- Papez, J. W. (1937). A proposed mechanism of emotion. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.*, 7(1):103–12.
- Pastalkova, E., Itskov, V., Amarasingham, A., y Buzsaki, G. (2008). Internally Generated Cell Assembly Sequences in the Rat Hippocampus. *Science*, 321(5894):1322–1327.
- Paxinos, G. y Watson, C. (2007). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. London: Academic Press.
- Peng, Z., Zhang, N., Wei, W., Huang, C. S., Cetina, Y., Otis, T. S., y Houser, C. R. (2013). A Reorganized GABAergic Circuit in a Model of Epilepsy: Evidence from Optogenetic Labeling and Stimulation of Somatostatin Interneurons. *Journal of Neuroscience*, 33(36):14392–14405.
- Pérez-Escudero, A., Vicente-Page, J., Hinz, R. C., Arganda, S., y de Polavieja, G. G. (2014). idTracker: tracking individuals in a group by automatic identification of unmarked animals. *Nature methods*, 11(7):743–8.
- Petsche, H., Stumpf, C., y Gogolak, G. (1962). The significance of the rabbit's septum as a relay station between the midbrain and the hippocampus I. The control of hippocampus arousal activity by the septum cells. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 14(2):202–211.
- Pfeiffer, B. E. y Foster, D. J. (2013). Hippocampal place-cell sequences depict future paths to remembered goals. *Nature*, 497(7447):74–9.
- Pfeiffer, B. E. y Foster, D. J. (2015). Autoassociative dynamics in the generation of sequences of hippocampal place cells. *Science*, 349(6244):180–183.
- Pfeiffer, F., Simler, R., Grenningloh, G., y Betz, H. (1984). Monoclonal antibodies and peptide mapping reveal structural similarities between the subunits of the glycine receptor of rat spinal cord. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(22):7224–7.
- Pinault, D. (1996). A novel single-cell staining procedure performed *in vivo* under electrophysiological control: morpho-functional features of juxtacellularly labelled thalamic cells and other central neurons with biocytin or Neurobiotin. *Journal of neuroscience methods*, 65(2):113–36.
- Pothmann, L., Muller, C., Averkin, R. G., Bellistri, E., Miklitz, C., Uebachs, M., Remy, S., Menendez de la Prida, L., y Beck, H. (2014). Function of Inhibitory Micronetworks Is Spared by Na⁺ Channel-Acting Anticonvulsant Drugs. *Journal of Neuroscience*, 34(29):9720–9735.
- Racine, R., Rose, P. A., y Burnham, W. M. (1977). Afterdischarge thresholds and kindling rates in dorsal and ventral hippocampus and dentate gyrus. *The Canadian journal of neurological sciences. Le jour-*

- nal canadien des sciences neurologiques*, 4(4):273–8.
- Rácz, A., Ponomarenko, A. A., Fuchs, E. C., y Monyer, H. (2009). Augmented hippocampal ripple oscillations in mice with reduced fast excitation onto parvalbumin-positive cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(8):2563–8.
- Raisman, G., Cowan, W. M., y Powell, T. P. S. (1965). The extrinsic afferent, commissural and association fibres of the hippocampus. *Brain*, 88(5):963–996.
- Rajasethupathy, P., Sankaran, S., Marshel, J. H., Kim, C. K., Ferenczi, E., Lee, S. Y., Berndt, A., Ramakrishnan, C., Jaffe, A., Lo, M., Liston, C., y Deisseroth, K. (2015). Projections from neocortex mediate top-down control of memory retrieval. *Nature*, 526(7575):653–659.
- Rami, A., Bréhier, A., Thomasset, M., y Rabié, A. (1987). The comparative immunocytochemical distribution of 28 kDa cholecalciferin (CaBP) in the hippocampus of rat, guinea pig and hedgehog.
- Ramón y Cajal, S. (1893). *Estructura del asta de ammon y fascia dentata*. tip. de Fortanet.
- Ramsden, H. L., Sürmeli, G., McDonagh, S. G., y Nolan, M. F. (2015). Laminar and dorsoventral molecular organization of the medial entorhinal cortex revealed by large-scale anatomical analysis of gene expression. *PLoS computational biology*, 11(1):e1004032.
- Ray, S., Naumann, R., Burgalossi, A., Tang, Q., Schmidt, H., y Brecht, M. (2014). Grid Layout and Theta Modulation of Layer 2 Pyramidal Neurons in Medial Entorhinal Cortex. *Science*, 343(6173):891–896.
- Redish, A. D. (2016). Vicarious trial and error. *Nature Reviews Neuroscience*, 17(3):147–159.
- Reichinnek, S., Kunsting, T., Draguhn, A., y Both, M. (2010). Field Potential Signature of Distinct Multicellular Activity Patterns in the Mouse Hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 30(46):15441–15449.
- Robbe, D., Montgomery, S. M., Thome, A., Rueda-Orozco, P. E., McNaughton, B. L., y Buzsaki, G. (2006). Cannabinoids reveal importance of spike timing coordination in hippocampal function. *Nature neuroscience*, 9(12):1526–33.
- Roumis, D. K. y Frank, L. M. (2015). Hippocampal sharp-wave ripples in waking and sleeping states. *Current Opinion in Neurobiology*, 35:6–12.
- Rudy, B., Fishell, G., Lee, S., y Hjerling-Leffler, J. (2011). Three groups of interneurons account for nearly 100 % of neocortical GABAergic neurons. *Developmental Neurobiology*, 71(1):45–61.
- San Antonio, A., Liban, K., Ikrar, T., Tsyganovskiy, E., y Xu, X. (2014). Distinct physiological and developmental properties of hippocampal CA2 subfield revealed by using anti-Purkinje cell protein 4 (PCP4) immunostaining. *Journal of Comparative Neurology*, 522(6):1333–1354.
- Schaffer, K. (1892). Beitrag zur Histologie der Ammonshornformation. *Arch Mikrosk Anat*, 39:611 – 632.

- Scharfman, H. E. (2016). The enigmatic mossy cell of the dentate gyrus. *Nature Reviews Neuroscience*, 17(9):562–575.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., y Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*, 9(7):671–5.
- Schomburg, E. W., Anastassiou, C. A., Buzsáki, G., y Koch, C. (2012). The Spiking Component of Oscillatory Extracellular Potentials in the Rat Hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 32(34).
- Schomburg, E. W., Fernández-Ruiz, A., Mizuseki, K., Berényi, A., Anastassiou, C. A., Koch, C., y Buzsáki, G. (2014). Theta Phase Segregation of Input-Specific Gamma Patterns in Entorhinal-Hippocampal Networks. *Neuron*, 84(2):470–485.
- Schwaller, B., Dick, J., Dhoot, G., Carroll, S., Vrbova, G., Nicotera, P., Pette, D., Wyss, A., Bluethmann, H., Hunziker, W., y Celio, M. R. (1999). Prolonged contraction-relaxation cycle of fast-twitch muscles in parvalbumin knockout mice. *The American journal of physiology*, 276(2 Pt 1):395–403.
- Schwartzkroin, P. A. (1975). Characteristics of CA1 neurons recorded intracellularly in the hippocampal in vitro slice preparation. *Brain research*, 85(3):423–36.
- Scoville, W. y Milner, B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 20(1):11–21.
- Selkoe, D. J. (2001). Clearing the brain's amyloid cobwebs. *Neuron*, 32(2):177–180.
- Senior, T. J., Huxter, J. R., Allen, K., O'Neill, J., y Csicsvari, J. (2008). Gamma oscillatory firing reveals distinct populations of pyramidal cells in the CA1 region of the hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 28:2274–2286.
- Senzai, Y., Buzsáki, G., Robitsek, R., Eichenbaum, H., Bostock, E., Muller, R., Kubie, J., Czurko, A., Hirase, H., Csicsvari, J., y al., e. (2017). Physiological Properties and Behavioral Correlates of Hippocampal Granule Cells and Mossy Cells. *Neuron*, 93(3):691–704.
- Shannon, C. E. (1948). A Mathematical Theory of Communication. *Bell System Technical Journal*, 27(3):379–423.
- Sheng, M., Sabatini, B. L., y Sudhof, T. C. (2012). Synapses and Alzheimer's Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(5):a005777–a005777.
- Shewmon, D. A. y Erwin, R. J. (1988). The effect of focal interictal spikes on perception and reaction time. I. General considerations. *Electroencephalography and clinical neurophysiology*, 69(4):319–37.
- Shouno, H. y Kurata, K. (2001). Formation of a direction map by projection learning using Kohonen's self-organization map. *Biological Cybernetics*, 85(4):241–246.
- Sik, A., Penttonen, M., Ylinen, A., y Buzsáki, G. (1995). Hippocampal CA1 interneurons: an in vivo intracellular labeling study. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 15(10):6651–65.

- Sik, A., Ylinen, A., Penttonen, M., y Buzsáki, G. (1994). Inhibitory CA1-CA3-hilar region feedback in the hippocampus. *Science (New York, N.Y.)*, 265(5179):1722–4.
- Skaggs, W. E. y McNaughton, B. L. (1996). Replay of neuronal firing sequences in rat hippocampus during sleep following spatial experience. *Science (New York, N.Y.)*, 271(5257):1870–1873.
- Slomianka, L. (1992). Neurons of origin of zinc-containing pathways and the distribution of zinc-containing boutons in the hippocampal region of the rat. *Neuroscience*, 48(2):325–352.
- Slomianka, L., Amrein, I., Knuesel, I., Sørensen, J. C., y Wolfer, D. P. (2011). Hippocampal pyramidal cells: The re-emergence of cortical lamination.
- Slomianka, L. y Geneser, F. A. (1991). Distribution of acetylcholinesterase in the hippocampal region of the mouse: II. Subiculum and hippocampus. *The Journal of Comparative Neurology*, 312(4):525–536.
- Sloviter, R. S. (1989). Calcium-binding protein (calbindin-D28k) and parvalbumin immunocytochemistry: Localization in the rat hippocampus with specific reference to the selective vulnerability of hippocampal neurons to seizure activity. *The Journal of Comparative Neurology*, 280(2):183–196.
- Spalding, K. L., Bergmann, O., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Huttner, H. B., Boström, E., Westerlund, I., Vial, C., Buchholz, B. A., Possnert, G., Mash, D. C., Druid, H., y Frisén, J. (2013). Dynamics of Hippocampal Neurogenesis in Adult Humans. *Cell*, 153(6):1219–1227.
- Staba, R. J., Wilson, C. L., Bragin, A., Jhung, D., Fried, I., y Engel, J. (2004). High-frequency oscillations recorded in human medial temporal lobe during sleep. *Annals of Neurology*, 56(1):108–115.
- Stark, E., Roux, L., Eichler, R., y Buzsáki, G. (2015). Local generation of multineuronal spike sequences in the hippocampal CA1 region. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(33):10521–10526.
- Stark, E., Roux, L., Eichler, R., Senzai, Y., Royer, S., y Buzsáki, G. (2014). Pyramidal cell-interneuron interactions underlie hippocampal ripple oscillations. *Neuron*, 83(2):467–480.
- Stewart, M. y Fox, S. E. (1990). Do septal neurons pace the hippocampal theta rhythm? *Trends in neurosciences*, 13(5):163–8.
- Strange, B. A., Witter, M. P., Lein, E. S., y Moser, E. I. (2014). Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(10):655–669.
- Strelakova, T., Zorner, B., Zacher, C., Sadowska, G., Herdegen, T., y Gass, P. (2003). Memory retrieval after contextual fear conditioning induces c-Fos and JunB expression in CA1 hippocampus. *Genes, Brain and Behavior*, 2(1):3–10.
- Su, H., Sochivko, D., Becker, A., Chen, J., Jiang, Y., Yaari, Y., y Beck, H. (2002).

- Upregulation of a T-type Ca₂₊ channel causes a long-lasting modification of neuronal firing mode after status epilepticus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 22(9):3645–55.
- Südhof, T. C. (2013). A molecular machine for neurotransmitter release: synaptotagmin and beyond. *Nature Medicine*, 19(10):1227–1231.
- Suh, J., Rivest, A. J., Nakashiba, T., Tomi-naga, T., y Tonegawa, S. (2011). Entorhinal Cortex Layer III Input to the Hippocampus Is Crucial for Temporal Association Memory. *Science*, 334(6061):1415–1420.
- Sullivan, D., Csicsvari, J., Mizuseki, K., Montgomery, S., Diba, K., y Buzsáki, G. (2011). Relationships between hippocampal sharp waves, ripples, and fast gamma oscillation: influence of dentate and entorhinal cortical activity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 31(23):8605–16.
- Suzuki, S. S. y Smith, G. K. (1987). Spontaneous EEG spikes in the normal hippocampus. I. Behavioral correlates, laminar profiles and bilateral synchrony. *Electroencephalography and clinical neurophysiology*, 67(4):348–59.
- Suzuki, S. S. y Smith, G. K. (1988). Spontaneous EEG spikes in the normal hippocampus. V. Effects of ether, urethane, pentobarbital, atropine, diazepam and bicuculline. *Electroencephalography and clinical neurophysiology*, 70(1):84–95.
- Swanson, L. y Cowan, W. (1975). Hippocampo-hypothalamic connections: origin in subiculum cortex, not ammon's horn. *Science*, 189(4199).
- Szentágothai, J. (1975). The 'module-concept' in cerebral cortex architecture. *Brain research*, 95(2-3):475–96.
- Takács, V. T., Szonyi, A., Freund, T. F., Nyiri, G., y Gulyás, A. I. (2014). Quantitative ultrastructural analysis of basket and axo-axonic cell terminals in the mouse hippocampus.
- Takeda, K., Inoue, H., Tanizawa, Y., Matsuzaki, Y., Oba, J., Watanabe, Y., Shinoda, K., y Oka, Y. (2001). WFS1 (Wolfram syndrome 1) gene product: predominant subcellular localization to endoplasmic reticulum in cultured cells and neuronal expression in rat brain. *Human molecular genetics*, 10(5):477–84.
- Tamamaki, N. y Nojyo, Y. (1993). Projection of the entorhinal layer II neurons in the rat as revealed by intracellular pressure-injection of neurobiotin. *Hippocampus*, 3(4):471–480.
- Tang, Q., Burgalossi, A., Ebbesen, C. L., Ray, S., Naumann, R., Schmidt, H., Spicher, D., y Brecht, M. (2014). Pyramidal and stellate cell specificity of grid and border representations in layer 2 of medial entorhinal cortex. *Neuron*, 84(6):1191–1197.
- Tavares, R. M., Mendelsohn, A., Grossman, Y., Williams, C. H., Shapiro, M., Trope, Y., y Schiller, D. (2015). A Map for Social Navigation in the Human Brain. *Neuron*, 87(1):231–243.

- Taxidis, J., Anastassiou, C. A., Diba, K., y Koch, C. (2015). Local Field Potentials Encode Place Cell Ensemble Activation during Hippocampal Sharp Wave Ripples. *Neuron*, 87(3):590–604.
- Taxidis, J., Coombes, S., Mason, R., y Owen, M. R. (2012). Modeling sharp wave-ripple complexes through a CA3-CA1 network model with chemical synapses. *Hippocampus*, 22(5):995–1017.
- Thompson, S. M. y Robertson, R. T. (1987). Organisation of subcortical pathways for sensory projections to the limbic cortex. I. Subcortical projections to the medial limbic cortex in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 265(2):175–188.
- Tikidji-Hamburyan, R. A., Martínez, J. J., White, J. A., y Canavier, C. C. (2015). Resonant Interneurons Can Increase Robustness of Gamma Oscillations. *The Journal of Neuroscience*, 35(47):15682–15695.
- Tonegawa, S., Liu, X., Ramirez, S., y Redondo, R. (2015). Memory Engram Cells Have Come of Age. *Neuron*, 87(5):918–931.
- Traub, R. D. y Bibbig, A. (2000). A model of high-frequency ripples in the hippocampus based on synaptic coupling plus axon-axon gap junctions between pyramidal neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 20(6):2086–93.
- Traub, R. D., Miles, R., y Wong, R. K. (1989). Model of the origin of rhythmic population oscillations in the hippocampal slice. *Science (New York, N.Y.)*, 243(4896):1319–25.
- Trevelyan, A. J. (2009). The direct relationship between inhibitory currents and local field potentials. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(48):15299–307.
- Tukker, J. J., Fuentealba, P., Hartwich, K., Somogyi, P., y Klausberger, T. (2007). Cell type-specific tuning of hippocampal interneuron firing during gamma oscillations in vivo. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 27(31):8184–8189.
- Tyler, A. L., Mahoney, J. M., Richard, G. R., Holmes, G. L., Lenck-Santini, P.-P., y Scott, R. C. (2012). Functional Network Changes in Hippocampal CA1 after Status Epilepticus Predict Spatial Memory Deficits in Rats. *Journal of Neuroscience*, 32(33):11365–11376.
- Ulrich, D. y Stricker, C. (2000). Dendrosomatic voltage and charge transfer in rat neocortical pyramidal cells \textit{in vitro}. *Journal of neurophysiology*, 84(3):1445–1452.
- Unal, G., Joshi, A., Viney, T. J., Kis, V., y Somogyi, P. (2015). Synaptic Targets of Medial Septal Projections in the Hippocampus and Extrahippocampal Cortices of the Mouse. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 35(48):15812–26.
- Valero, M., Averkin, R. G., Fernandez-Lamo, I., Aguilar, J., Lopez-Pigozzi, D., Brotons-Mas, J. R., Cid, E., Tamas, G., y Menendez de la Prida, L. (2017). Mechanisms for Selective Single-Cell Reactivation during Offline Sharp-Wave Rip-

- ples and Their Distortion by Fast Ripples. *Neuron*, 94(6):1234–1247.
- Valero, M., Cid, E., Averkin, R. G., Aguilera, J., Sanchez-Aguilera, A., Viney, T. J., Gomez-Dominguez, D., Bellistri, E., y de la Prida, L. M. (2015). Determinants of different deep and superficial CA1 pyramidal cell dynamics during sharp-wave ripples. *Nature Neuroscience*, 18(9):1281–1290.
- van de Ven, G. M., Trouche, S., McNamara, C. G., Allen, K., y Dupret, D. (2016). Hippocampal Offline Reactivation Consolidates Recently Formed Cell Assembly Patterns during Sharp Wave-Ripples. *Neuron*, 92(5):968–974.
- Van Groen, T. y Wyss, J. M. (1990). Extrinsic projections from area CA1 of the rat hippocampus: Olfactory, cortical, subcortical, and bilateral hippocampal formation projections. *The Journal of Comparative Neurology*, 302(3):515–528.
- Vandecasteele, M., Varga, V., Berényi, A., Papp, E., Barthó, P., Venance, L., Freund, T. F., y Buzsáki, G. (2014). Optogenetic activation of septal cholinergic neurons suppresses sharp wave ripples and enhances theta oscillations in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(37):13535–13540.
- Vanderwolf, C. (1969). Hippocampal electrical activity and voluntary movement in the rat. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 26(4):407–418.
- Varga, C., Golshani, P., y Soltesz, I. (2012a). Frequency-invariant temporal ordering of interneuronal discharges during hippocampal oscillations in awake mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(40):E2726–E2734.
- Varga, C., Golshani, P., y Soltesz, I. (2012b). PNAS Plus: Frequency-invariant temporal ordering of interneuronal discharges during hippocampal oscillations in awake mice.
- Varga, C., Lee, S. Y., y Soltesz, I. (2010). Target-selective GABAergic control of entorhinal cortex output. *Nature Neuroscience*, 13(7):822–824.
- Verwer, R. W., Meijer, R. J., Van Uum, H. F., y Witter, M. P. (1997). Collateral projections from the rat hippocampal formation to the lateral and medial prefrontal cortex. *Hippocampus*, 7(4):397–402.
- Viney, T. J., Lasztoczi, B., Katona, L., Crump, M. G., Tukker, J. J., Klausberger, T., y Somogyi, P. (2013). Network state-dependent inhibition of identified hippocampal CA3 axo-axonic cells in vivo. *Nature neuroscience*, 16:1802–11.
- Watts, D. J. y Strogatz, S. H. (1998). Collective dynamics of ‘small-world’ networks. *Nature*, 393(6684):440–442.
- Wayner, M. y Emmers, R. (1958). Spinal synaptic delay in young and aged rats. *The American journal of physiology*, 194(2):403–5.
- Whittington, M. A., Traub, R. D., y Jefferys, J. G. R. (1995). Synchronized oscillations in interneuron networks driven by metabotropic glutamate receptor activation. *Nature*, 373(6515):612–615.

- Williams, S. R. y Mitchell, S. J. (2008). Direct measurement of somatic voltage clamp errors in central neurons. *Nature Neuroscience*, 11(7):790–798.
- Wilson, M. A. y McNaughton, B. L. (1994). Reactivation of hippocampal ensemble memories during sleep. *Science (New York, N.Y.)*, 265(5172):676–9.
- Witter, M. P. (2007). The perforant path: projections from the entorhinal cortex to the dentate gyrus. In *Progress in brain research*, volume 163, pages 43–61.
- Witter, M. P., Griffioen, A. W., Jorritsma-Byham, B., y Krijnen, J. L. M. (1988). Entorhinal projections to the hippocampal CA1 region in the rat: An underestimated pathway. *Neuroscience Letters*, 85(2):193–198.
- Witter, M. P., Naber, P. A., van Haeften, T., Machielsen, W. C., Rombouts, S. A., Barkhof, F., Scheltens, P., y Lopes da Silva, F. H. (2000). Cortico-hippocampal communication by way of parallel parahippocampal-subiculum pathways. *Hippocampus*, 10(4):398–410.
- Wittner, L., Henze, D. A., Záborszky, L., y Buzsáki, G. (2007). Three-dimensional reconstruction of the axon arbor of a CA3 pyramidal cell recorded and filled in vivo. *Brain structure & function*, 212(1):75–83.
- Wong, R. K., Prince, D. A., y Basbaum, A. I. (1979). Intradendritic recordings from hippocampal neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(2):986–90.
- Worrell, G. A., Gardner, A. B., Stead, S. M., Hu, S., Goerss, S., Cascino, G. J., Meyer, F. B., Marsh, R., y Litt, B. (2008). High-frequency oscillations in human temporal lobe: Simultaneous microwire and clinical macroelectrode recordings. *Brain*, 131:928–937.
- Wu, J. Y., Sankar, R., Lerner, J. T., Matsumoto, J. H., Vinters, H. V., y Mathern, G. W. (2010). Removing interictal fast ripples on electrocorticography linked with seizure freedom in children. *Neurology*, 75(19):1686–94.
- Wyss, J. M. y Van Groen, T. (1992). Connections between the retrosplenial cortex and the hippocampal formation in the rat: A review. *Hippocampus*, 2(1):1–11.
- Yang, H. H. y St-Pierre, F. (2016). Genetically Encoded Voltage Indicators: Opportunities and Challenges. *Journal of Neuroscience*, 36(39).
- Ylinen, A., Soltesz, I., Bragin, A., Penttonen, M., Sik, A., y Buzsaki, G. (1995). Intracellular correlates of hippocampal theta rhythm in identified pyramidal cells, granule cells, and basket cells. *Hippocampus*, 5:78–90.
- Yukie, M. (2000). Connections between the medial temporal cortex and the CA1 subfield of the hippocampal formation in the Japanese monkey (*Macaca fuscata*). *The Journal of comparative neurology*, 423(2):282–98.

A | Artículos de investigación

A.1. Determinants of different deep and superficial CA1 pyramidal cell dynamics during sharp-wave ripples

Nature Neuroscience 18, 1281-1290.

Determinants of different deep and superficial CA1 pyramidal cell dynamics during sharp-wave ripples

Manuel Valero^{1,6}, Elena Cid^{1,6}, Robert G Averkin^{2,6}, Juan Aguilar³, Alberto Sanchez-Aguilera^{1,4}, Tim J Viney⁵, Daniel Gomez-Dominguez¹, Elisa Bellistri¹ & Liset Menendez de la Prida¹

Sharp-wave ripples represent a prominent synchronous activity pattern in the mammalian hippocampus during sleep and immobility. GABAergic interneuronal types are silenced or fire during these events, but the mechanism of pyramidal cell (PC) participation remains elusive. We found opposite membrane polarization of deep (closer to stratum oriens) and superficial (closer to stratum radiatum) rat CA1 PCs during sharp-wave ripples. Using sharp and multi-site recordings in combination with neurochemical profiling, we observed a predominant inhibitory drive of deep calbindin (CB)-immunonegative PCs that contrasts with a prominent depolarization of superficial CB-immunopositive PCs. Biased contribution of perisomatic GABAergic inputs, together with suppression of CA2 PCs, may explain the selection of CA1 PCs during sharp-wave ripples. A deep-superficial gradient interacted with behavioral and spatial effects to determine cell participation during sleep and awake sharp-wave ripples in freely moving rats. Thus, the firing dynamics of hippocampal PCs are exquisitely controlled at subcellular and microcircuit levels in a cell type-selective manner.

Sharp waves (SPWs) are transient events recorded in the local field potentials of the mammalian hippocampus during periods of immobility, slow-wave sleep and anesthesia^{1,2}. They are maximally expressed in the CA1 stratum radiatum and presumably reflect net dendritic depolarization of CA1 PCs activated by the Schaffer collaterals of discharging CA3 neurons^{3,4}. In close temporal association with SPWs, high-frequency oscillations (ripples, 90–200 Hz) are confined around the stratum pyramidale, where they are likely to reflect phase-locked firing of CA1 PCs curtailed by fast runs of feedforward and feedback inhibitory potentials (IPSPs)^{1,5}. A plethora of hippocampal GABAergic interneuronal types exhibit specific phase-locked firing or are silent during SPW events^{6,7}. Excitatory and inhibitory potentials therefore compete to control spike timing of principal glutamatergic neurons^{8,9}.

The CA1 stratum pyramidale of the dorsal hippocampus can be differentiated into deep and superficial layers on the basis of cell density¹⁰, gene expression¹¹, immunoreactivity to CB¹² and the different shapes of PCs¹³. During development, CA1 PCs express genes (*Sox5*, *SatB2*, *Zbtb20*) that are known to specify the phenotypes of superficial and deep cells in the neocortex^{10,14}. All CA1 PCs are innervated directly by Schaffer collaterals from both the ipsilateral and contralateral CA3, but CA2 PCs activate deep CB-negative CA1 PCs preferentially¹⁵. Local GABAergic microcircuits discriminate between deep and superficial sublayers and distinctly regulate ventral hippocampal interaction with the amygdala and the prefrontal cortex¹⁶. Functional differences between PCs in these two sublayers have been shown to emerge in periods

of theta oscillations associated with exploration and REM sleep¹⁷ and during gamma activity accompanying theta¹⁸. In contrast, during SPW ripples, putative deep and superficial CA1 PCs appear to similarly participate and only a proportion of deep cells (that is, REM-shifting neurons) respond strongly¹⁷. More recently, silicon shank recordings have revealed a different entrainment of deep and superficial PCs during SPW ripples¹⁹. However, these extracellular recordings are biased toward subpopulations of firing cells, some of which are spatially modulated during these synchronous events²⁰, and poorly inform on their subthreshold dynamics or detailed molecular phenotype.

Using a combination of intracellular, extracellular and multi-site recordings and stimulation in conjunction with *post hoc* immunolabeling, we successfully identified a variety of PCs from the dorsal hippocampus of both anesthetized and freely moving rats. Our data unveil the mechanisms underlying the heterogeneous behavior of deep and superficial CA1 PCs during spontaneous SPW ripple events. We found an exquisitely controlled microcircuit operation of CA1 PCs that challenges the view of hippocampal dynamics during these events.

RESULTS

Heterogeneous intracellular dynamics of deep and superficial CA1 PCs

We combined sharp and 16-channel multi-site recordings in conjunction with *post hoc* immunohistochemistry to identify the intracellular dynamics and the molecular identity of CA1 PCs from the dorsal hippocampus of urethane anesthetized rats ($n = 22$ CA1 PCs;

¹Instituto Cajal, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain. ²Hungarian Academy of Sciences, University of Szeged Research Group for Cortical Microcircuits, Department of Physiology, Anatomy and Neuroscience, University of Szeged, Szeged, Hungary. ³Hospital Nacional de Parapléjicos, Servicio de Salud de Castilla-La Mancha, Toledo, Spain. ⁴Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid, Spain. ⁵Medical Research Council Brain Network Dynamics Unit, Department of Pharmacology, University of Oxford, Oxford, UK. ⁶These authors contributed equally to this work. Correspondence should be addressed to L.M.d.l.P. (lmprida@cajal.csic.es).

Received 4 May; accepted 26 June; published online 27 July 2015; doi:10.1038/nn.4074

Fig. 1a,b, Supplementary Fig. 1a and Supplementary Table 1. Notably, we observed two opposite intracellular behaviors of CA1 PCs at the SPW peak recorded in the stratum radiatum: a net depolarization (4.1 ± 2.3 -mV peak response, $n = 12$; **Fig. 1c**) and hyperpolarization (-2.4 ± 1.2 -mV peak response, $n = 10$; **Fig. 1d**) at similar resting membrane potentials (depolarized CA1 PCs: -63.8 ± 5.1 mV; hyperpolarized PCs: -61.4 ± 2.9 mV; $P = 0.176$, $t(20) = 1.68$; unpaired t test). Intracellular responses were systematic across several SPWs for a given cell. Contralateral (cCA3; ipsilateral, iCA3; **Fig. 1e** and **Supplementary Fig. 1b**) electrical stimulation of the upstream CA3 region reproduced this behavior for stimulation intensities lower than 500 μ A (cCA3: 11 depolarized/7 hyperpolarized, $P = 0.019$, $F(1.22, 3.69) = 15.24$; iCA3: 4 depolarized/4 hyperpolarized, $P = 0.060$, $F(1.07, 4.27) = 6.33$; repeated-measures ANOVA; **Fig. 1c,d**), suggesting that it reflects feedforward responses, as confirmed by local pharmacology (**Supplementary Fig. 1c–e**). Holding membrane potentials at several levels revealed similar reversal for the cCA3-evoked and the SPW-associated responses in a given cell (**Fig. 1c,d**), and also revealed differences between cell groups (**Fig. 1f**). The corresponding driving force was also different between groups (SPW-associated: $P < 0.0001$, $t(19) = 7.85$; cCA3-evoked: $P = 0.0001$, $t(16) = 5.09$; unpaired t test for 11 depolarized/10 hyperpolarized; **Fig. 1g**). The SPW-associated reversal potential of hyperpolarized cells was -65.9 ± 4.4 mV, relatively close to that of GABA_A-receptor reversal (-70 mV), whereas, in depolarized cells, the reversal potential was -58.6 ± 4.8 mV, reflecting a synaptic mixture of excitatory and inhibitory inputs. Note that the reversal potential of depolarized cells ensures that their firing will be modulated during suprathreshold current injections, as recently shown⁹.

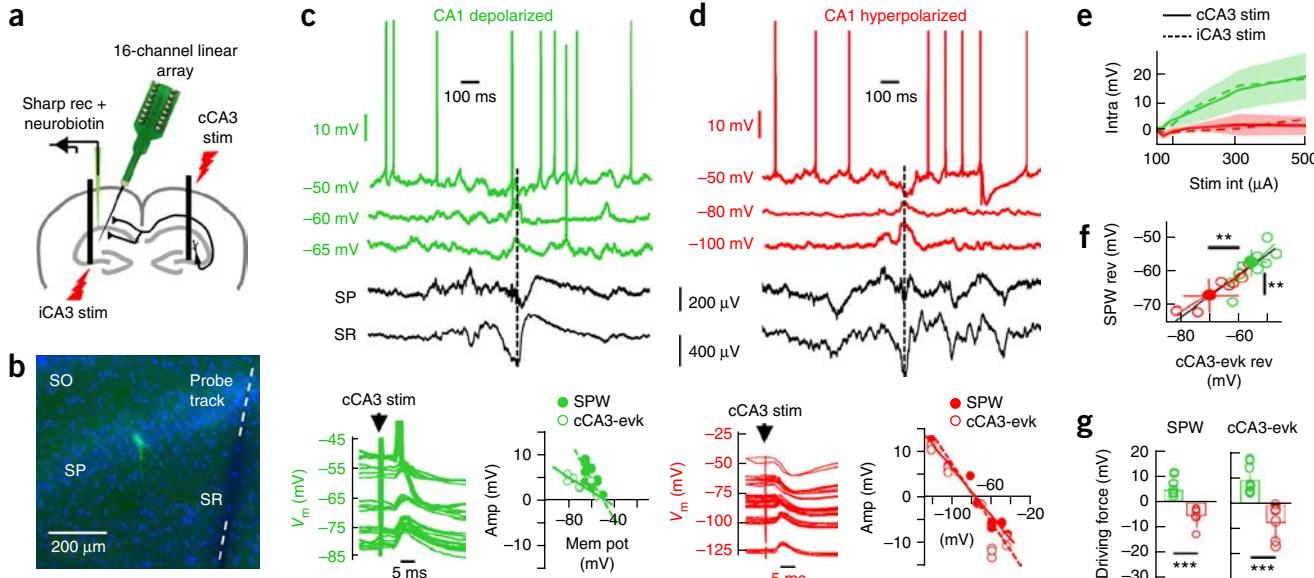


Figure 1 Heterogeneous responses of dorsal CA1 PCs during SPW ripples *in vivo*. **(a)** Summary of the experimental approach. CA1 PCs impaled with sharp pipettes were recorded simultaneously to local field potentials using 16-channel silicon probes in urethane anesthetized rats. cCA3 and iCA3 stimulation were applied to evaluate cell responses. **(b)** Subsequent morphological analysis allowed for evaluation of cell identity (green) and distance to probe track. Blue is bisbenzimide. **(c)** Representative CA1 PC exhibiting net depolarization during SPW ripples recorded at the stratum radiatum (SR) and pyramidale (SP). A discontinuous line marks the SPW peak used for alignment. Responses to cCA3 stimulation are shown at bottom (left), and the reversal potential estimation of the SPW-associated and cCA3-evoked (cCA3-evk) response are shown on the right. **(d)** Data are presented as in **c** for a representative hyperpolarized PC. **(e)** Group difference of input/output responses of hyperpolarized (red) and depolarized (green) cells to contralateral (solid; $n = 7$ red, $n = 11$ green) and ipsilateral (discontinuous; $n = 4$ red, $n = 4$ green) CA3 stimulation. Lines reflect mean values. s.d. values for iCA3 stimulation are shadowed. **(f)** Reversal potential of SPW- and cCA3-evoked responses were tightly correlated ($P < 0.0001$, $r(16) = 89.25$; Pearson correlation), but different between groups (SPW-reversal: $P = 0.0041$, $t(19) = 3.27$; cCA3-evoked reversal: $P = 0.0067$, $t(16) = 3.11$; $n = 11$ depolarized, $n = 7$ hyperpolarized cells; unpaired t test). Solid circles represent group mean \pm s.d. **(g)** Significant group differences for SPW- (left, $P < 0.0001$) and cCA3-evoked driving forces ($P < 0.0001$). ** $P < 0.005$, *** $P < 0.0001$.

We next addressed the intracellular correlation with the SPW and ripple components of associated events. Although the direction of the intracellular responses was consistent across events, their amplitudes were variable. To evaluate this further, we used data from a subset of cells with current source-density (CSD) signals spanning from the CA1 stratum pyramidale to the stratum lacunosum moleculare and a sufficient number of events at resting membrane potential ($n = 7$ depolarized, $n = 7$ hyperpolarized). We estimated the SPW-associated CSD sinks and sources known to reflect transmembrane currents flowing through the somatodendritic compartments^{3,5} (**Supplementary Fig. 2a**). The peak amplitude of the intracellular response measured at resting membrane potential and the SPW-associated sink at the stratum radiatum were strongly correlated event-to-event in depolarized, but not in hyperpolarized, PCs ($P = 0.0012$, $\chi^2(3.14) = 10.50$; χ^2 test; **Supplementary Fig. 2b**). No difference in mean CSD amplitude accounted for this effect ($P = 0.9671$, $t(12) = -0.04$ for SR sinks; $P = 0.5651$, $t(12) = -0.59$ for stratum radiatum sources; unpaired t test; **Supplementary Fig. 2a**). There was poor correlation between the intracellular response and the SPW-associated source at the stratum pyramidale ($P = 0.5148$, $\chi^2(3.14) = 0.42$, χ^2 test; **Supplementary Fig. 2c**), in spite of strong covariations in the magnitude of the sink and the sources (**Supplementary Fig. 2d**).

We then evaluated whether intracellular subthreshold oscillations associated with ripples recorded in the stratum pyramidale^{5,8} were differentially correlated in these two groups ($n = 12$ depolarized, $n = 9$ hyperpolarized; **Fig. 2** and **Supplementary Fig. 3**). At resting membrane potential, we found that barrages of intracellular synaptic activity contributed to a dominant spectral peak at the 90–200-Hz band in close association with extracellular ripples (**Fig. 2a–d**). Notably, the

power of the intracellular ripple was significantly smaller in depolarized versus hyperpolarized CA1 PCs ($P = 0.0124$, $t(19) = -2.76$, unpaired t test; **Fig. 2e**). A cross-correlation index between intracellular and extracellular ripples (**Supplementary Fig. 3b**) suggested lower interaction in depolarized cells ($P = 0.0147$, $t(19) = -2.68$, unpaired t test; **Fig. 2e**). This was not dependent on the holding membrane potential (**Supplementary Fig. 3c**) nor on the distance to the extracellular probe, as confirmed in a subset of experiments (depolarized: $510 \pm 347 \mu\text{m}$, $n = 9$; hyperpolarized: $417 \pm 170 \mu\text{m}$, $n = 5$; $P = 0.5892$, $t(12) = 0.55$; unpaired t test; **Fig. 2f**). Thus, extracellular signatures of associated ripples more likely reflect intracellular high-frequency synaptic activity (presumably IPSPs-excitatory post-synaptic potentials (EPSPs)) of hyperpolarized CA1 PCs. Together these data indicate heterogeneous contribution of CA1 PCs to spontaneous SPW-ripple events recorded in the rat dorsal hippocampus.

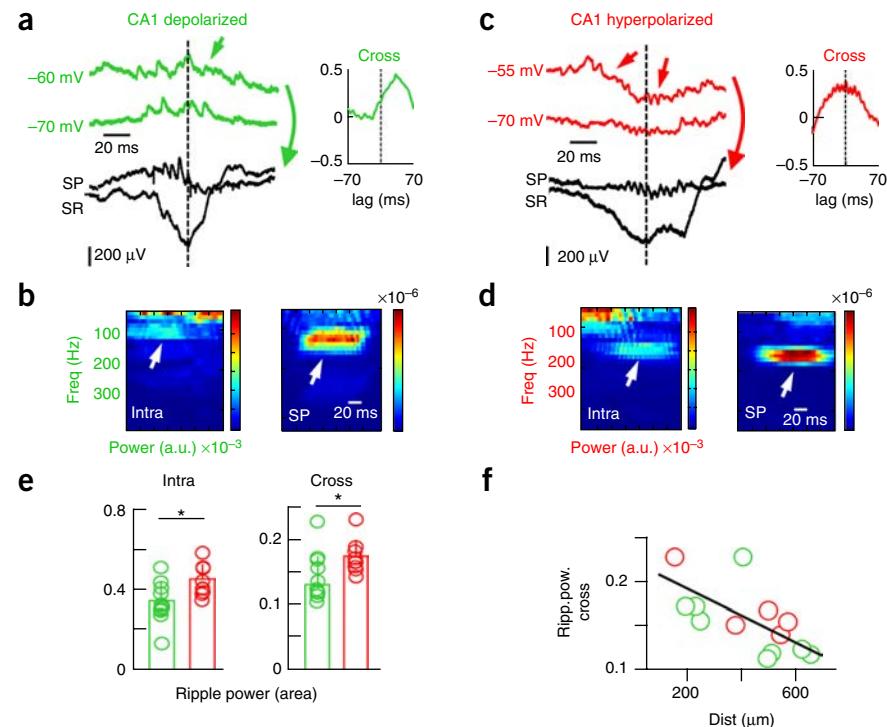
Anatomical determinants of CA1PC heterogeneity

We next looked for anatomical determinants of this heterogeneity in a subset of successfully labeled cells ($n = 11$ depolarized, $n = 7$ hyperpolarized; **Fig. 3a**). We did not find an anteroposterior ($P = 0.6713$, $t(16) = -0.43$, unpaired t test) or mediolateral ($P = 0.7262$, $t(16) = 0.35$, unpaired t test) effect in cell location or on their linear distance to CA2 ($P = 0.9159$, $t(16) = -0.11$, unpaired t test; **Supplementary Table 1**). In contrast, there was a strong effect of cell distance to the border with stratum radiatum ($P = 0.0152$, $t(16) = -2.72$, unpaired t test), with depolarized cells more typically being located closer (superficial layer) and hyperpolarized cells being located more distant (deep layers; **Fig. 3b**). This distribution at the single-cell level matched well with CB expression in the CA1 stratum pyramidale ($P = 0.0483$, $r(16) = -0.4713$, Pearson correlation; **Supplementary Fig. 4**). Depolarized CA1 PCs displayed varying levels of CB immunoreactivity (8 of 11 PCs; **Fig. 3b,c**), whereas most hyperpolarized cells (5 of 7) lacked detectable immunoreactivity ($P = 0.0660$, $\chi^2(3.18) = 3.38$, χ^2 test; **Fig. 3b,d**). Some depolarized CA1 PCs were CB-immunonegative (**Fig. 3e**). To gain further insight into the mechanisms surrounding different hyperpolarized

and depolarized responses, we compared the CB immunoreactivity and position in the pyramidal layer for each recorded cell to their SPW-associated reversal potential and driving force (**Supplementary Table 1**). The distribution of reversal potential values along the distance to stratum radiatum suggested a continuum (**Fig. 3f**). Notably, deep-superficial criteria revealed significant differences (deep: -63.2 ± 4.1 mV; superficial: -58.8 ± 5.0 mV; $P = 0.0405$, $t(16) = 1.86$, unpaired t test), but these were marginal when cells were classified according to their CB immunoreactivity resulting from dispersion (**Fig. 3f**). In contrast, the SPW-associated driving force exhibited clear differences between groups by clustering reversal potential values relative to the resting membrane potential (**Fig. 3g**). Driving force data were significantly different for deep (-2.41 ± 3.56 mV) and superficial PCs (4.18 ± 4.62 mV; $P = 0.0135$, rank sum = 140, Mann-Whitney test), but again remained marginally different for CB classification (**Fig. 3g**). These data indicate a laminar orthogonalization of intracellular dynamics along the hippocampal CA1 stratum pyramidale. What are the mechanisms underlying such a laminar dependence?

Given the strong correlation between the radiatum SPW sink and the intracellular response in depolarized, but not in hyperpolarized, PCs, and our reversal and driving force data, we reasoned that perisomatic GABAergic inhibition could unequally dominate the intracellular dynamics. To determine whether this factor accounts for opposite intracellular behavior, we examined the localization of gephyrin in GABAergic postsynaptic sites²¹ to evaluate perisomatic GABAergic inhibition quantitatively. Lack of gephyrin immunoreactivity in recorded cells prevented us from analyzing these signals on a single-cell basis (**Supplementary Fig. 5**), and we instead adopted a population approach. We focused on GABAergic boutons derived from basket cells that were immunoreactive to parvalbumin (PV) and cholecystokinin (CCK) and known to mediate the major perisomatic inhibitory signaling in CA1 (ref. 22). Thus, we stereologically evaluated the density of gephyrin-immunoreactive puncta that colocalized with presynaptic PV and the CCK-specific cannabinoid receptor CB1R²³ on PCs visualized with the CA1-specific marker Wfs1 (**Fig. 4a–c**). We found more abundant

Figure 2 Different correlation between intracellular and extracellular ripples in depolarized and hyperpolarized CA1 PCs. **(a)** Representative synaptic activity during SPW ripples in depolarized cells. **(b)** Time frequency spectrum of intracellular sweeps (green, arrows in **a**) suggested a contribution to the ripple frequency band simultaneously with the extracellular ripple recorded at the stratum pyramidale (black, SP). A cross-correlation analysis revealed coherent high-frequency oscillations between the intracellular and the extracellular ripple (shown at right in **a**). **(c)** Data are presented as in **a** for a representative hyperpolarized PC. **(d)** Data are presented as in **b** for the sweeps shown in **c** (arrows). **(e)** Group data of the mean ripple power confirmed stronger intracellular rhythmicity ($P = 0.0124$, $t(19) = -2.8$, left) and intra-extra ripple cross-correlation ($P = 0.0147$, $t(19) = -2.7$, right) in hyperpolarized ($n = 12$) versus depolarized ($n = 9$) cells. **(f)** Relationship between intra-extra ripple cross-correlation and the recording distance between the cell and the 16-channel probe ($P = 0.0137$, $r(12) = -0.6401$; Pearson correlation). * $P < 0.05$.



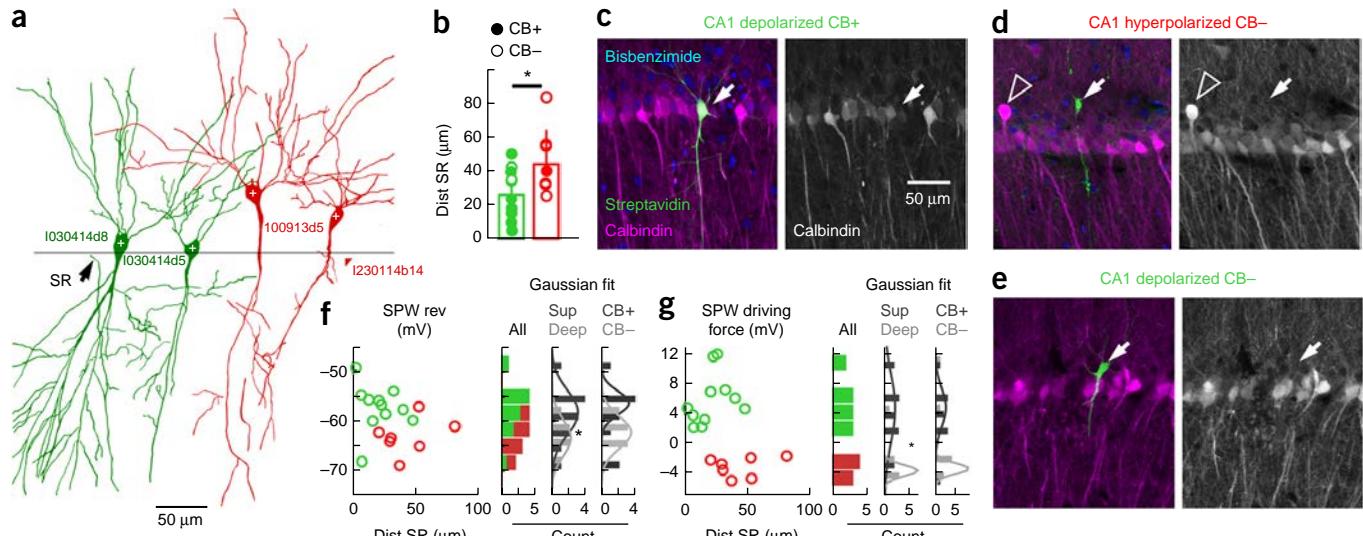


Figure 3 Identity of depolarized and hyperpolarized CA1 PCs. (a) Camera lucida drawing of DAB-revealed cells (1 section, 70 μm , 40 \times). The border between strata pyramidale and radiatum (line) was identified. (b) Group differences in the distance to stratum radiatum (SR, $P = 0.0152$, $t(16) = -2.72$; green, $n = 11$ depolarized; red, $n = 7$ hyperpolarized). CB immunoreactivity (CB+, filled dots) and the lack thereof (CB-, open) is indicated. (c) Example of a superficial depolarized CB+ cell (arrows) recorded close to radiatum and in the CB+ sublayer. Average intensity projection (five optical sections, 9.44 μm). (d) Example of a deep hyperpolarized CB- cell (arrows) located above the CB+ sublayer. Note the deep CB+ cells (open arrowhead, 12 optical sections, 11.88 μm). (e) Example of a deep depolarized CB- cell (arrow, 8 optical sections, 14.1 μm). (f) Relationship between the SPW-associated reversal potential and the cell distance to radiatum. Histograms for all cells without classification (individual counting from depolarized and hyperpolarized cells is visually identified) and classified according to location (deep/superficial) and immunoreactivity (CB+/CB-) are shown to the right. A Gaussian fit was tested (Shapiro-Wilk test) for deep ($P = 0.9859$, $W = 0.99$) and superficial ($P = 0.9378$, $W = 0.97$) PCs and means were significantly different ($P = 0.0405$, $t(16) = 1.86$, unpaired t test). Differences did not reach significance for CB classification (CB+: $P = 0.1394$, $W = 0.88$; CB-: $P = 0.8568$, $W = 0.96$; $P = 0.0923$, $t(16) = 1.38$, unpaired t test, not significant). (g) Data are presented as in d for SPW-associated driving force values (deep: $P = 0.0675$, $W = 0.81$; superficial: $P = 0.6691$, $W = 0.95$; means were significantly different, $P = 0.0135$, rank sum = 140, Mann-Whitney; CB+: $P = 0.2403$, $W = 0.91$; CB-: $P = 0.0113$, $W = 0.74$; n.s.). * $P < 0.05$.

perisomatic PV+ GABAergic boutons in deep CA1 PCs ($n = 34$ cells from 4 confocal stacks from 3 rats, $P = 0.0162$, $r(32) = 0.39$, Pearson correlation; Fig. 4d) and a marked inverse correlation with CB1R boutons, which were densest at superficial CA1 PCs ($P = 0.0046$, $r(32) = -0.46$, Pearson correlation; Fig. 4e). There was no trend when PV+ and CB1R+ boutons were considered together ($P = 0.5415$, $r(32) = -0.18$, Pearson correlation). It should be noted that, although the overwhelming majority of specifically somatic boutons on CA1

pyramidal cells are from PV and CCK basket cells²⁴, other perisomatic regions (such as the proximal dendrites) receive other GABAergic inputs²². Thus, uneven contribution of feedforward GABAergic inhibition mediated by PV+ and CCK+ basket cells following deep and superficial PCs could potentially explain functional differences during SPW ripples. In addition, a dominant inhibitory drive at perisomatic compartments of deep CA1 PCs could be masking visibility of dendritic glutamatergic potentials activated by upstream hippocampal principal cells.

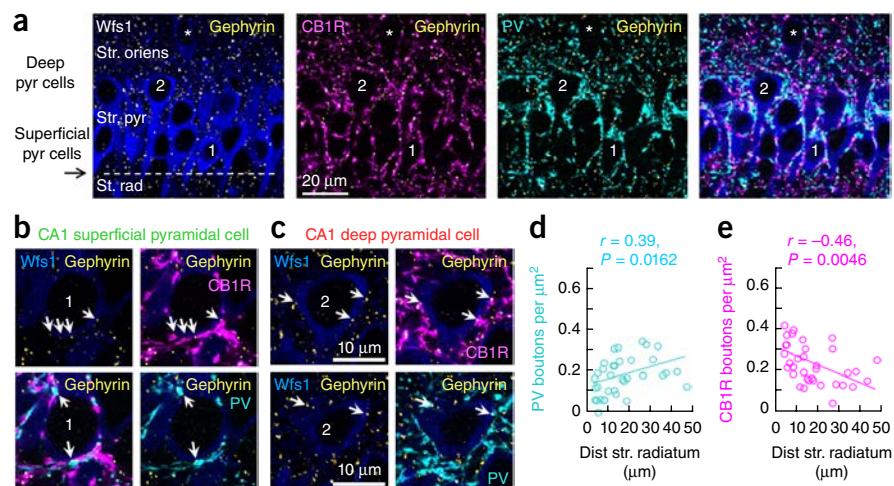


Figure 4 GABAergic perisomatic innervation of CA1 pyramidal cells. (a) Average intensity projection (five optical sections, 1.43 μm thick) of CA1 pyramidal cells immunoreactive for Wfs1 (blue). A typical superficial pyramidal cell close to the border with radiatum is marked 1. Cell 2 is a deep pyramidal cell. An example of oriens pyramidal cells (also counted as deep) is highlighted by an asterisk. Gephyrin immunolabeling allowed identification of GABAergic puncta (yellow). CB1R- (magenta) and PV-immunoreactive (cyan) terminals surrounded pyramidal cell somata and dendrites. (b) Superficial layer cell 1 from a (single 0.29- μm -thick optical section). Both PV (cyan) and CB1R (magenta) terminals were associated with gephyrin puncta (yellow, arrows) on the Wfs1-immunoreactive soma (blue). Top row, four gephyrin puncta and corresponding CB1R-immunoreactive terminals (arrows). Bottom row, two gephyrin puncta (arrows) associated with PV-immunoreactive terminals. (c) Data are presented as in b for deep layer cell 2 from b shown in single 0.29- μm -thick optical sections at two different depths. (d) Estimation of the density of PV+/gephyrin puncta over all Wfs1 pyramidal cells revealed a significant positive correlation with the distance to radiatum ($n = 34$ cells, 4 confocal stacks, $n = 3$ rats). (e) An opposite trend was found for CB1R+/gephyrin puncta in the same dataset.

Mechanisms of CA1 PC heterogeneity *in vitro*

To examine this point further, we prepared sagittal slices from juvenile (P15–25, $n = 38$) and adult rats (P39–58, $n = 5$) to evaluate synaptic responses of dorsal CA1 PCs to CA3 stimulation with patch-clamp recordings (Fig. 5a). CA1 PCs in deep and superficial layers were visually identified and their location was confirmed by complementary tests for CB immunoreactivity (Fig. 5b) and

Online Methods). Mild stimulation intensity of Schaffer collaterals was adjusted to elicit comparable extracellular responses in slices used to record deep and superficial cells ($P = 0.6831$, $t(18) = 0.41$; unpaired t test; 12 superficial/8 deep CA1 PCs; Fig. 5c), mimicking *in vivo* experiments (Supplementary Fig. 1b).

Similar to that reported *in vivo*, we found dominant hyperpolarized responses to CA3 stimulation in deep ($n = 8$) versus superficial

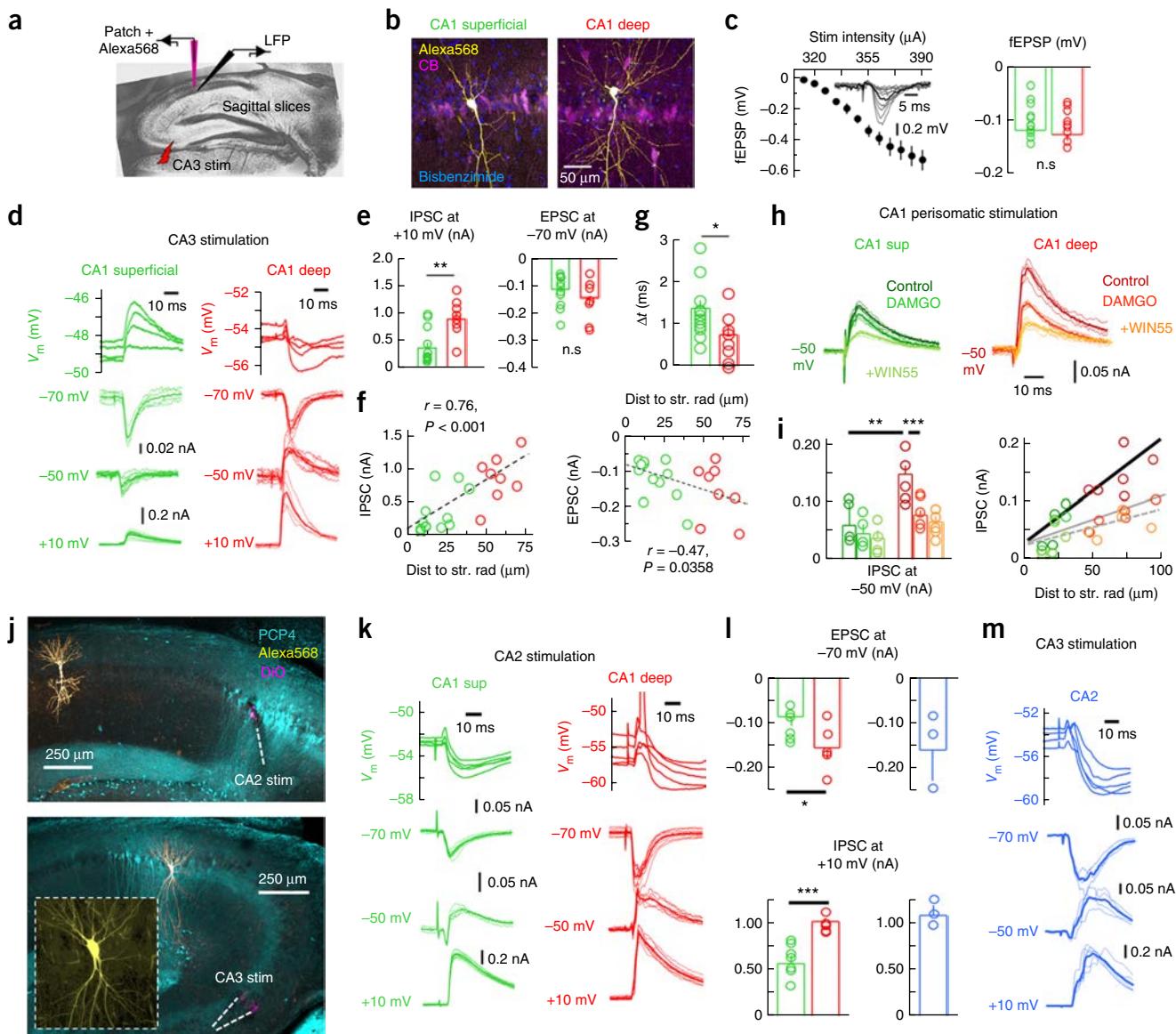


Figure 5 Mechanisms of CA1 PC heterogeneity studied *in vitro*. (a) Schematic representation of *in vitro* experiments. (b) Classification of CA1 PCs as deep and superficial. Average intensity projection from three (7.66 μm , deep) and seven optical sections (19.86 μm , superficial). (c) Stimulation intensity (inset, radiatum field excitatory postsynaptic potentials (fEPSP)) was adjusted to obtain similar fEPSPs in slices used to evaluate deep ($n = 8$) and superficial cells ($n = 12$, $P = 0.6831$, right). (d) Representative current- and voltage-clamp responses of deep and superficial CA1 PCs to CA3 stimulation. (e) Stronger ISPCs were evoked in deep PCs at +10 mV ($P = 0.0021$, $t(18) = -3.39$; $n = 8$ deep, $n = 12$ superficial). EPSCs at -70 mV was not significant ($P = 0.2221$). (f) Correlation between the amplitude of IPSC (left) and EPSC (right) and distance to radiatum. (g) Group differences of onset timing between excitation and inhibition ($P = 0.0431$, $t(18) = -2.18$). (h) Evaluation of perisomatic stimulation responses in deep and superficial PCs. Representative responses to perfusion with the μ -opioid receptor antagonist DAMGO (200 nM) and the CB1R agonist WIN55,212 (5 μM). (i) IPSC amplitude measured at -50 mV in deep ($n = 5$) and superficial PCs ($n = 4$) in response to pharmacological interventions. ** $P = 0.0061$, $t(7) = -3.87$; *** $P = 0.0055$, $t(4) = 5.44$. The relationship between the IPSC amplitude and the distance to radiatum (control, thick line, $r = 0.86$, $P = 0.0012$) was reduced by DAMGO (gray continuous line, $r = 0.78$, $P = 0.0131$) and remained non-significant after WIN55,212 (discontinuous line). (j) Confirmation of CA2 stimulation with DiO and PCP4 immunolabeling. Bottom, confirmation of CA2 PC identity. Images were taken at 10x. Inset, 40x. (k) Representative responses of deep and superficial CA1 PCs to CA2 stimulation. (l) Deep ($n = 5$) and superficial ($n = 7$) CA1 PC responses to CA2 stimulation (EPSCs: $P = 0.0474$, $t(10) = -2.25$; IPSCs: $P = 0.0007$, $t(10) = 4.81$). Right, similar data from CA2 cells in response to CA3 stimulation (blue, $n = 3$). (m) Responses of a representative CA2 pyramidal cell to CA3 stimulation. * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.0001$.

CA1 PCs ($n = 12$) at resting membrane potential in current-clamp conditions (Fig. 5d). We evaluated evoked synaptic currents (EPSC, IPSC) elicited in deep and superficial CA1 PCs using voltage-clamp conditions at different holding potentials (Fig. 5d and Supplementary Fig. 6a). Significant differences were detected between cell types for the amplitude of IPSCs recorded at +10 mV ($P = 0.0021$, $t(18) = 3.39$, unpaired t test; Fig. 5e), which were strongly correlated with the cell distance to radiatum ($P < 0.0001$, $r(18) = 0.76$; Pearson correlation; Fig. 5f). There was no statistical difference on the amplitude of the EPSC at -70 mV ($P = 0.2221$, $t(18) = 1.266$, unpaired t test; Fig. 5e), but we did observe a mild spatial correlation ($P = 0.0358$, $r(18) = 0.47$, Pearson correlation; Fig. 3f). Similar results were obtained for IPSCs and EPSCs measured at -50 mV (Supplementary Fig. 6b).

No correlation with age was detected (EPSC: $P = 0.3191$, $r(41) = -0.15$; IPSC: $P = 0.5891$, $r(41) = 0.08$; Pearson correlation). Blockage of glutamatergic transmission with CNQX (20 μ M) and AP5 (50 μ M) confirmed the feedforward nature of GABAergic IPSCs ($n = 6$ deep, $n = 6$ superficial; Supplementary Fig. 6c). We also considered the possibility that a different timing between excitation and inhibition (Δt) could contribute to functional differences between deep and superficial PCs (Supplementary Fig. 6d). Although no difference in the onset of the EPSCs and IPSCs survived in comparisons between groups (Supplementary Fig. 6d), they accumulated to show significant differences in Δt in deep versus superficial PCs ($P = 0.0431$, $t(18) = 2.18$, unpaired t test; Fig. 5g). Thus, a shorter time window of opportunity between excitation and inhibition,

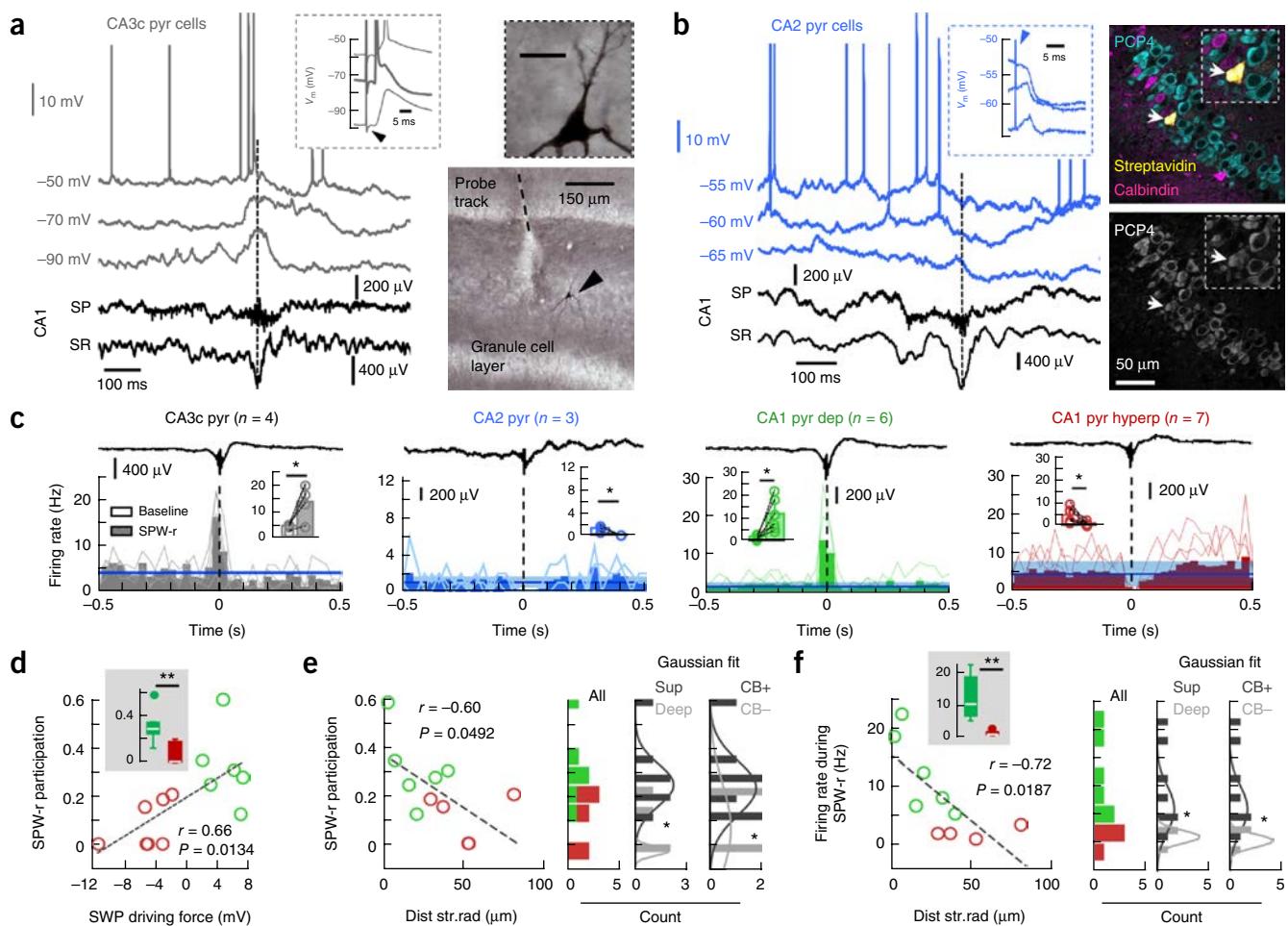


Figure 6 Microcircuit control of SPW-associated responses in dorsal PCs *in vivo*. **(a)** Representative response of a CA3c PC during SPWs recorded in CA1 (discontinuous line). Inset, orthodromic and antidromic (thick line) responses to cCA3 stimulation (arrowhead). Right, cell identification with DAB reaction at 10x and 100x (inset, scale bar represents 20 μ m). Note large spines (thorny excrescences). **(b)** Data are presented as in a for a representative CA2 PC. Right, validation with PCP4 immunolabeling (arrows, 3 optical sections, 2.92 μ m). **(c)** Firing rate histograms (bin size of 30 ms) of PCs recorded along the cornu ammonis at resting membrane potentials are aligned by CA1 SPW ripples. Blue lines represent mean firing rate (s.d. is shadowed) as estimated from baseline (-500 to -400 ms). Insets, firing rate modulation before (baseline) and around SPW peak (60-ms window). CA3c: $P = 0.0464$, $t(3) = -3.27$, $n = 4$; CA2: $P = 0.0441$, $t(2) = 3.13$, $n = 3$; CA1 depolarized: $P = 0.0173$, $t(5) = -3.49$, $n = 6$; CA1 hyperpolarized cells: $P = 0.0275$, $t(6) = 2.89$, $n = 7$. **(d)** Relationship between cell participation of SPW ripples and the associated driving force for all CA1 PCs shown before. Inset, significant group differences ($P = 0.0034$, $t(12) = 3.63$). **(e)** SPW participation against the distance to radiatum in histologically confirmed PCs ($n = 6$ depolarized, $n = 4$ hyperpolarized). Right, histograms from unclassified cells (all) and classified according to location (deep/superficial) and immunoreactivity (CB+/CB-) tested against a Gaussian distribution (Shapiro-Wilk test). Deep: $P = 0.1612$, $W = 0.82$; superficial: $P = 0.1609$, $W = 0.87$; means are significantly different at $P = 0.0431$, $t(8) = 2.35$, unpaired t test. For CB+: $P = 0.1749$, $W = 0.87$; CB-: $P = 0.060$, $W = 0.77$; means are significantly different at $P = 0.0302$, $t(8) = 2.146$ for an unpaired t test, but not for a Mann-Whitney test. **(f)** Data are presented as in e for firing rate data. Shapiro-Wilk test for deep: $P = 0.7804$, $W = 0.98$; superficial: $P = 0.5954$, $W = 0.93$; means are significantly different at $P = 0.043$, $t(8) = 1.94$, unpaired t test. For CB+: $P = 0.5954$, $W = 0.93$; CB-: $P = 0.7804$, $W = 0.98$; means are significantly different at $P = 0.043$, $t(8) = 1.94$, unpaired t test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.0001$.

together with stronger inhibition of deep CA1 PCs, support their dominant inhibitory drive in response to CA3 activation.

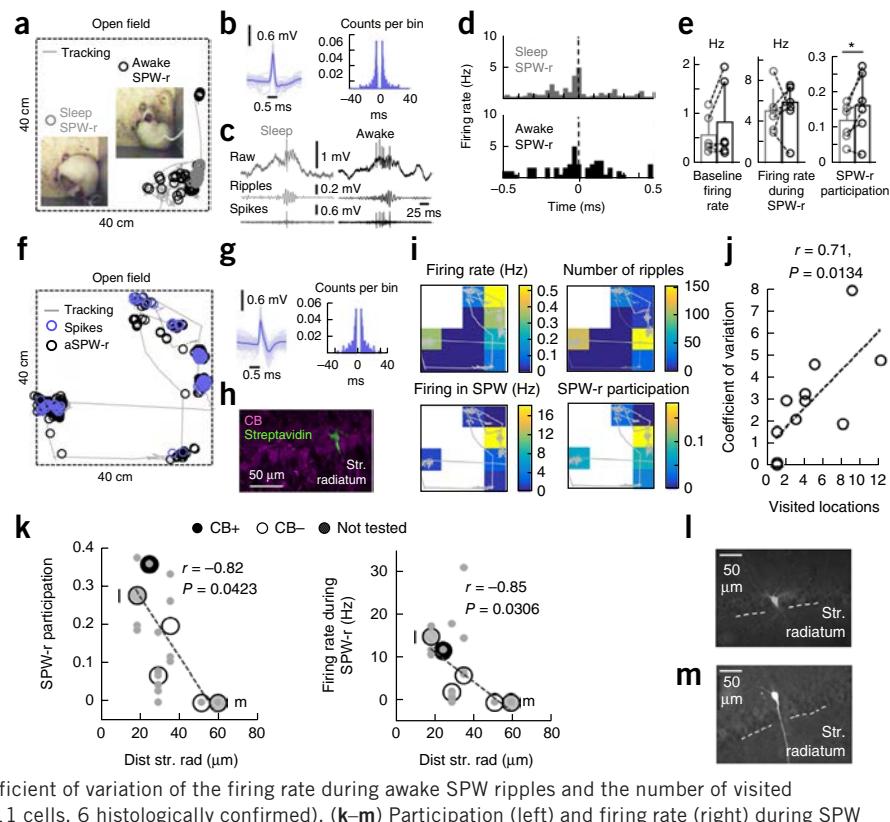
What is the nature of the dominant feedforward inhibition in deep CA1 PCs? Our gephyrin-associated presynaptic bouton counts suggest that PV-mediated perisomatic inhibition should dominate in deep cells. We tested this point directly by measuring IPSCs at -50 mV while stimulating the stratum pyramidale extracellularly in the presence of glutamate and GABA_A receptor antagonists. Consistent with our previous data, deep CA1 PCs ($n = 5$) exhibited larger IPSCs at -50 mV than superficial cells ($n = 4$, $P = 0.0061$, $t(7) = -3.872$, unpaired t test; Fig. 5h) and we observed a positive correlation with the distance to radiatum ($P = 0.0012$, $r(7) = 0.82$, Pearson correlation; Fig. 5i). Suppressing GABAergic release from PV+ basket cells with DAMGO (200 nM)²⁵ confirmed that there was a larger contribution from deep cells than superficial cells (IPSC reduction in deep: $50.1 \pm 5.1\%$; superficial: $29.3 \pm 7.2\%$; $P = 0.0284$, $t(4) = 3.981$, paired t test), consistent with our gephyrin data (Fig. 5i). Consistently, differences between cell groups were abolished by DAMGO ($P = 0.115$, $t(7) = -3.872$, unpaired t test). However, although the correlation between IPSC amplitude and the distance to radiatum was reduced by DAMGO, it was still positive ($P = 0.0131$, $r(7) = 0.78$, Pearson correlation; Fig. 5i), suggesting that the opposite trend by CCK innervation (Fig. 4e) was not enough to compensate for an overall predominant inhibition of deep CA1 PCs. Functional differences between PV- and CCK-mediated perisomatic inhibition in terms of fluctuations of amplitude, latency and fidelity of unitary IPSCs could also contribute²⁶. Further suppressing GABA release from CCK+ basket cells with WIN55-212 (5 μM)²³ occluded the relationship with distance to radiatum ($P = 0.0610$, Pearson correlation; Fig. 5i).

Figure 7 CA1 PC participation during SPW ripples in drug-free conditions. (a) Single-cell recording of CA1 PCs and LFPs in freely moving rats enabled identification of activity patterns during sleep (gray) and awake (black) conditions. Insets, representative behavior. (b) Action potential waveform and firing autocorrelogram of the cell recorded from the rat shown in a. (c) Representative examples of sleep and awake SPW ripples. Ripples: 100–200-Hz filtered raw signal; spikes: high-pass signals at 300 Hz. (d) Firing rate histograms (30-ms bins) of the cell shown before for all SPW ripples recorded during sleep (221) and awake (60). (e) State-dependent effects were not significant for the baseline firing rate ($P = 0.1887$, $t(5) = -1.52$) or the firing rate during SPW ripples ($P = 0.8661$, $t(5) = -0.18$), but reached significance for SPW ripple participation ($P = 0.0420$, $t(5) = -2.71$; $n = 6$ CA1 PCs, 1 histologically confirmed). * $P < 0.05$. (f) Recordings obtained from freely moving rats also allowed us to examine spatial effects in awake SPW ripple participation (black). Spikes are shown in blue. (g) Spike waveform and autocorrelation of the cell recorded in f. (h) Juxtacellular labeling and post hoc identification of the cell in g confirmed it was a deep CB- PC (3 optical sections, 6 μm). (i) Spatial dependence of activity of cell shown in g. (j) Relationship between the coefficient of variation of the firing rate during awake SPW ripples and the number of visited locations (4×4) in the 40-cm × 40-cm arena ($n = 11$ cells, 6 histologically confirmed). (k–m) Participation (left) and firing rate (right) during SPW ripples against the distance to radiatum for histologically confirmed cells ($n = 6$). Values represent means for the entire recording session. Individual values during different states (awake, sleep) and spatial locations for each cell are shown in gray. Calbindin classification is shown, except for two not tested cells indicated in by letters and shown in l and m.

We also examined the CA2-CA1 circuitry, given its preference for deep CA1 layer, as determined optogenetically in mice¹⁵. To this purpose we constrained mild extracellular stimulation to the CA2 stratum pyramidale, as confirmed with immunolabeling against the CA2-specific marker PCP4, while recording from deep ($n = 5$) and superficial CA1 PCs ($n = 7$; Fig. 5j). Both cell types responded with strong disynaptic inhibition following CA2 stimulation, but deep cells were able to fire during some sweeps, as tested in current clamp (Fig. 5k). Estimation of the evoked ESPC amplitude at -70 mV confirmed stronger glutamatergic activation of deep cells ($P = 0.0474$, $t(10) = -2.259$, unpaired t test; Fig. 5l). Consistent with stronger local perisomatic inhibition of deep CA1 cells, differences were also detected in IPSCs recorded at $+10$ mV ($P = 0.0007$, $t(10) = 4.813$, unpaired t test; Fig. 5l). This trend persisted for EPSCs and IPSCs recorded at -50 mV, but large variability prevented statistical differences (Supplementary Fig. 6e). Finally, given that activation of CA2 PCs by CA3 terminals would affect the operation of the CA3-CA1 microcircuit, we also examined their response to CA3 stimulation *in vitro* (Fig. 5j). Consistent with previous reports²⁷, CA3-CA2 synapses were dominated by strong feedforward inhibition that typically prevented CA2 PC firing ($n = 3$; Fig. 5l,m).

Microcircuit control of CA1 PC responses *in vivo*

We further tested the CA3-CA2 microcircuit *in vivo* by recording PCs intracellularly. All CA3c PCs ($n = 4$) exhibited depolarization well before SPW ripple events recorded with 16-channel arrays in CA1 and often reached the threshold for firing at resting membrane potentials (driving force 0.6 ± 0.3 mV, $V_{rev} = -59.2 \pm 7.9$ mV; Fig. 6a). Their identity was confirmed by their typical response to both ipsi- (data not shown)



and contralateral CA3 stimulation, including antidromic activation, and after visualization of Neurobiotin labeling with DAB-HRP reaction (**Fig. 6a**). In contrast, all CA2 PCs ($n = 3$) exhibited a dominant hyperpolarizing drive during spontaneous SPW ripples recorded in CA1 (driving force -3.2 ± 0.5 mV, $V_{rev} -62.4 \pm 2.1$ mV; **Fig. 6b**). The identity of CA2 PCs was confirmed with PCP4 immunolabeling (**Fig. 6b**). Consistent with *in vitro* data, CA2 PCs were predominantly inhibited by contralateral (data not shown) and ipsilateral CA3 stimulation (driving force -3.9 ± 1.3 mV, $V_{rev} -63.1 \pm 1.4$ mV; **Fig. 6b**).

Next, we evaluated the firing dynamics of different hippocampal PCs along the cornu ammonis during SPW ripples recorded at CA1 by constructing peri-event firing histograms of the different cell types recorded at resting membrane potential for a sufficient number of events (that is, no injected current). Consistent with the well-known CA3 origin of SPWs^{1,4}, firing from CA3c PCs peaked 23.7 ± 9.5 ms before SPWs recorded at the CA1 stratum radiatum (estimated from 5-ms binned histograms, $n = 4$, $P = 0.0074$, $t(3) = -6.4838$, paired t test). CA3c PC firing increased significantly during SPW ripples ($P = 0.0464$, $t(3) = -3.27$; **Fig. 6c**). In contrast, CA2 PCs ($n = 3$) consistently exhibited firing suppression ($P = 0.0441$, $t(2) = 3.13$, paired t test; **Fig. 6c**). Depolarized CA1 PCs were sharply activated above their baseline firing level ($n = 6$, $P = 0.0173$, $t(5) = -3.49$, paired t test; **Fig. 6c**), whereas firing suppression dominated in hyperpolarized CA1 PCs during SPW ripples ($n = 7$, $P = 0.0275$, $t(6) = 2.89$; **Fig. 6c**). These values are consistent with those reported for extracellular recorded populations of CA3 and CA1 PCs in both drug-free conditions⁴ and under urethane^{6,28}. Notably, CA1 PC participation during SPW ripples, defined as the proportion of events a cell fired within 60 ms of the SPW peak was significantly higher in depolarized than hyperpolarized cells ($P = 0.0034$, $t(12) = 3.63$; **Fig. 6d**) and was positively correlated with the SPW-associated driving force (**Fig. 6d**). On average, depolarized cells fired more spikes per SPW ripple (0.71 ± 0.43) than hyperpolarized cells (0.04 ± 0.06 , $P = 0.0002$, rank sum = 63, Mann-Whitney). In the subset of cells with histological confirmation ($n = 6$ depolarized, $n = 4$ hyperpolarized), SPW ripple participation exhibited a robust tendency along the distance to radiatum (**Fig. 6e**). Indeed, superficial/CB+ cells had stronger participation than deep/CB- PCs (**Fig. 6e**). Similarly, the firing rate of CA1 PCs during SPW ripples was correlated with the anatomical differences observed in deep and superficial CA1 sublayers (**Fig. 6f**).

CA1 PC participation during SPW ripples in drug-free conditions

Finally, we aimed to confirm our predictions regarding SPW-ripple participation of CA1 PCs across the deep-superficial axis in the drug-free context. To this purpose, we implemented CA1 single-cell recordings with glass pipettes in freely moving rats ($n = 11$ cells; **Fig. 7a**) using a microdrive that enables mounting and remounting in drug-free conditions²⁹. Recordings in an open field during movement and sleep were followed by juxtacellular labeling and *post hoc* histological validation ($n = 6$ cells; **Supplementary Table 2** and **Supplementary Fig. 7a–c**). The action potential waveform and firing autocorrelogram of each cell (**Fig. 7b**) were used to classify unlabeled cells as PCs on the basis of their similarities to juxtacellularly labeled CA1 PCs. In freely moving rats, CA1 PC participation of SPW ripples is known to be spatially modulated across sleep and wakefulness^{20,30,31}. Thus, we analyzed these effects on sleep and awake SPW ripples defined using behavioral and electrophysiological information (**Supplementary Fig. 7d–g**).

We investigated the effect of behavioral state on SPW ripple participation by identifying events (>10) occurring during sleep and awake conditions in the same rat ($n = 6$ CA1 PCs, 1 histologically confirmed;

Fig. 7a,c and Supplementary Table 2). Although no behavioral effect dominated baseline firing ($P = 0.1887$, $t(5) = -1.52$) or the firing rate during SPW ripples events ($P = 0.8661$, $t(5) = -0.18$), we found significantly higher participation of CA1 PCs in awake versus sleep SPW-ripples ($P = 0.0420$, $t(5) = -2.71$; **Fig. 7d,e**). To account for spatial effects, we evaluated PC firing from rats exhibiting substantial exploratory activity and a sufficient number of SPW ripples recorded during pauses at more than two locations ($n = 6$ cells, 3 histologically confirmed; **Fig. 7f–h** and **Supplementary Table 2**). Consistent with the well-known spatial modulation of hippocampal activity, indices of CA1 PC firing exhibited large variability in the recording arena (**Fig. 7i**). A permutation test for each cell (100 replicates) confirmed substantial spatial bias for the firing rate during SPW ripples in 2 of 6 cells (no bias in the number of SPW events accounted for this effect; **Supplementary Table 2**). Indeed, the variability of the firing rate during SPW ripple events recorded in the entire session was strongly correlated with the number of visited locations for all cells ($r = 0.71$, $P = 0.0134$; **Fig. 7j**), confirming that a large part of the variance could be explained by this factor.

Can behavioral state and spatial variability in freely moving conditions still allow for detection of a deep-superficial effect of CA1 PC participation during SPW ripples? SPW ripple participation and firing rate across different states (awake, sleep) and spatial locations of individual PCs did not reveal deep-superficial differences (participation: $r = -0.68$, $P = 0.312$; firing rate: $r = -0.69$, $P = 0.3$; $n = 6$ identified CA1 PCs). However, when sleep and awake SPW ripples were considered together and used as an estimation of overall cell participation and firing rate, we found a significant correlation with PC soma distance to stratum radiatum (SPW-r participation, $P = 0.0423$, $r(6) = -0.82$, Pearson correlation; firing rate during SPW-r, $P = 0.0306$, $r(6) = -0.85$, Pearson correlation; **Fig. 7k**), similar to the urethane data reported above (**Fig. 6e,f**). CB immunoreactivity was confirmed in only 4 of 6 cells, preventing us from evaluating the effect of deep/superficial and CB+/CB- classification directly (**Fig. 7l,m** and **Supplementary Table 2**). Thus, the variability of CA1 PC firing during SPW ripples recorded in freely moving conditions not only reflects spatial and state-dependent effects²⁰, but also a deep-superficial gradient of PC participation.

DISCUSSION

Our data highlight a different participation of deep and superficial PCs during SPW ripples and question the view of hippocampal pyramidal cells as a functionally uniform population during these events. The cell type-specific firing of a variety of morphologically identified hippocampal GABAergic interneurons was initially recognized using extracellular recordings and juxtacellular labeling in urethane-anesthetized rats⁶ and was further confirmed in unanesthetized conditions for some interneuronal types^{30,32,33}. However, neither single nor multi-electrode recordings have successfully separated PCs during SPW ripples, although differences are evident during theta and gamma oscillations^{17,18} and some indications were recently reported¹⁹. *In vitro*, the variability of PC participation during SPW ripple events has been recognized and associated with different factors^{34–36}. Intracellular studies in un-anesthetized rodents did not attempt to differentiate, probably as a result of poor sampling from deep and superficial neurons in relatively unfavorable conditions for long-lasting recordings and labeling^{8,9,37,38}. Although these reports highlight consistent SPW-associated intracellular depolarization in CA1 PCs⁹, evidence of concurrent somatic inhibition and dendritic excitation suggests that complex intracellular interactions occur^{3,5}. Possibly, variability resulting from synaptic fluctuations, together

with differences in the number and timing of events, as well anatomical factors, could camouflage potential differences in these studies. Our sharp electrode recording approach under urethane is especially suitable for overcoming some of these limitations, as it allows long-lasting intracellular recordings and unbiased labeling of a variety of CA1 PCs along the deep and superficial sublayers under stable network oscillations.

We found that stronger and more appropriately timed PV-mediated perisomatic inhibition of deep versus superficial cells is one leading determinant of CA1 PCs dynamics. GABAergic inhibition was consistently stronger in deep cells no matter whether it was activated di-synaptically from CA3 or CA2 or directly at perisomatic regions in the presence of glutamate receptor antagonists. Under this last condition, suppression of PV+ basket cell-mediated inhibition with DAMGO occluded group differences. This is consistent with recent reports from paired recordings on preferential connectivity between PV+ basket cells and deep CA1 PCs in mice¹⁶ and with our data on a dominant SPW-associated inhibitory drive close to the GABA_A-receptor reversal in deep cells. In contrast, superficial CA1 cells were typically depolarized beyond their resting membrane potential. We found that these cells were preferentially innervated by CCK+ basket cells compared with deep CA1 PCs, but this connection appeared to be less likely to contribute to deep-to-superficial functional differences than what has been reported in neocortex³⁹. In the ventral CA1 region of mice, paired recordings between CCK basket cells and deep/superficial pyramidal cells did not reveal a significant functional difference or a gradient of CB1-immunoreactive boutons¹⁶. Although species and regional differences may be factors, ultrastructural differences in CB1R and PV somatic boutons²⁴ and their unitary IPSC dynamics²⁶ may also contribute⁴⁰. Recent data suggest that CB1 receptor pharmacological modulation of GABA release is not necessarily correlated with CB1 immunolabeling⁴¹, suggesting that unknown signaling mechanisms are in place. PV basket cells and bistratified cells markedly increase their firing during SPW ripples^{6,7}, whereas CCK+ basket cells do not show a clear relationship and, at least under urethane, poorly participate^{6,7}. Instead, GABA release from CCK cells is more likely to contribute during theta oscillations^{7,42}. Alternatively, SPW ripple active bistratified cells targeting dendrites could have additional roles in separating deep and superficial PCs.

SPW ripples are a candidate mechanism underlying memory consolidation^{31,43}. Participation of CA1 cells during SPW ripples is spatially modulated across brain states^{17,20,30,33}, but the underlying mechanisms are unknown. During exploratory pauses, neuronal replay of CA1 PCs during awake SPW ripples is location dependent and exhibits a complex interaction with place fields that contribute to firing reactivation during subsequent sleep SPW^{20,31}. Our single-cell recordings and juxtaglomerular labeling in freely moving rats confirmed that CA1 PC participation of SPW ripples is spatially modulated across behavioral states. Notably, in spite of this variability, we successfully confirmed a deep-superficial gradient of CA1 PC participation in drug-free conditions. We speculate that the gradient of the excitatory/inhibitory ratio underlying different driving forces of deep and superficial PCs will modulate the dynamics of replay and consolidation of memory traces during awake and sleeping periods. It is possible that potential long-range projection specificity of deep and superficial CA1 PCs¹⁶ could further amplify the functional effect of their differential activity.

According to our data, the operation of the CA3-CA1 microcircuit during SPW ripples was controlled by an appropriately timed gear assembly of interactions (**Supplementary Fig. 8**). Firing increases by CA3 PCs quickly propagated to activate their downstream targets

at CA2 and CA1. Firing suppression of CA2 PCs caused by strong di-synaptic inhibition^{27,44,45} releases deep CA1 PCs from a dominant excitatory action¹⁵, which, together with firing from PV+ basket cells^{6,7,32}, results in a major inhibitory drive during SPW ripple events. In contrast, superficial CA1 PCs are preferentially innervated by CCK+ basket cells, which fire less consistently than PV+ basket cells during these events⁷, leaving them under the dominant control of CA3 PC firing, as reflected in driving force and reversal potential values. SPW ripple active interneurons, such as PV+ basket cells and bistratified cells, may enable the phasic firing of active pyramidal cells during ripple cycles (for example, for the correct temporal order of a reactivated ensemble). The spatiotemporal specialization of hippocampal microcircuits is therefore far more complex than originally thought^{6,46}.

Although SPW-ripples are the more synchronous event recorded in the healthy hippocampus, their role in neurological disease is less well understood. In temporal lobe epilepsy, pathological high-frequency ripple-like oscillations are conspicuously related to epileptogenic regions, but their relationship with physiological ripples is questioned^{47,48}. Ambiguity on the intracellular correlates of extracellular ripples, whether physiological- or pathological-like, are already recognized^{36,49} and suggest that more work is required to fully understand the generators of these events. Different vulnerabilities of deep and superficial CA1 PCs to anoxia and seizures are a common feature⁵⁰. Our data regarding a disparate correlation of deep and superficial cells with the SPW and the ripple components opens the door to new interpretations of the major cellular contributors to the SPW-ripple complex in health and disease.

METHODS

Methods and any associated references are available in the [online version of the paper](#).

Note: Any Supplementary Information and Source Data files are available in the online version of the paper.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank P. Somogyi for his valuable guidance and suggestions on histological procedures and analyses. For gephyrin counting, B. Micklem advised on stereological approaches and K. Wagner helped with tissue processing. We thank B. Gal for histological processing for immunofluorescence studies and F. Laurent for suggestions for analysis. R. Miles, A. Gulyás and A. Colino provided useful comments and discussion. We also thank G. Tamás and V. Szemenyei for their generous support. This work was supported by a grant from the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (BFU2012-37156-C03-01). E.C. receives funding from the CSIC JAE Program, co-funded by the European Social Fund. M.V. was supported by the Spanish Ministry of Education, Culture and Sports (FPU12/03776) and by a short-term grant to visit the MRC Anatomical Neuropharmacological Unit in Oxford (FPU-EST13/01046). A.S.-A. is funded by the Universidad Complutense de Madrid. T.J.V. was supported by the UK Medical Research Council. R.G.A. was supported by an ERC Advanced grant (INTERIMPACT) to G. Tamás. D.G.-D. is funded by the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (BES-2013-064171).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

J.A. and L.M.d.I.P. first observed the phenomenon. L.M.d.I.P. designed and coordinated the study. M.V., J.A. and L.M.d.I.P. obtained *in vivo* sharp recordings. A.S.-A. and L.M.d.I.P. performed *in vitro* experiments. M.V. and R.G.A. obtained recordings from freely moving rats. E.C. was responsible for the immunohistological characterization of recorded cells. M.V. and T.J.V. were responsible for identification and quantification of perisomatic GABAergic boutons. M.V., E.C., A.S.-A., T.J.V., E.B., D.G.-D. and L.M.d.I.P. analyzed and interpreted the data. L.M.P. wrote the paper. J.A. and A.S.-A. contributed equally to this work.

COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.



Reprints and permissions information is available online at <http://www.nature.com/reprints/index.html>.

1. Buzsáki, G., Leung, L.W.S. & Vanderwolf, C.H. Cellular bases of hippocampal EEG in the behaving rat. *Brain Res.* **287**, 139–171 (1983).
2. Skaggs, W.E. *et al.* EEG sharp waves and sparse ensemble unit activity in the macaque hippocampus. *J. Neurophysiol.* **98**, 898–910 (2007).
3. Kamondi, A., Acsády, L. & Buzsáki, G. Dendritic spikes are enhanced by cooperative network activity in the intact hippocampus. *J. Neurosci.* **18**, 3919–3928 (1998).
4. Csicsvari, J., Hirase, H., Mamiya, A. & Buzsáki, G. Ensemble patterns of hippocampal CA3-CA1 neurons during sharp wave-associated population events. *Neuron* **28**, 585–594 (2000).
5. Ylinen, A. *et al.* Sharp wave-associated high-frequency oscillation (200 Hz) in the intact hippocampus: network and intracellular mechanisms. *J. Neurosci.* **15**, 30–46 (1995).
6. Klausberger, T. *et al.* Brain state– and cell type–specific firing of hippocampal interneurons *in vivo*. *Nature* **421**, 844–848 (2003).
7. Klausberger, T. *et al.* Complementary roles of cholecystokinin- and parvalbumin-expressing GABAergic neurons in hippocampal network oscillations. *J. Neurosci.* **25**, 9782–9793 (2005).
8. Maier, N. *et al.* Coherent phasic excitation during hippocampal ripples. *Neuron* **72**, 137–152 (2011).
9. English, D.F. *et al.* Excitation and inhibition compete to control spiking during hippocampal ripples: intracellular study in behaving mice. *J. Neurosci.* **34**, 16509–16517 (2014).
10. Slomianka, L., Amrein, I., Knuesel, I., Sørensen, J.C. & Wolfer, D.P. Hippocampal pyramidal cells: the reemergence of cortical lamination. *Brain Struct. Funct.* **216**, 301–317 (2011).
11. Dong, H.-W., Swanson, L.W., Chen, L., Fanselow, M.S. & Toga, A.W. Genomic-anatomic evidence for distinct functional domains in hippocampal field CA1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 11794–11799 (2009).
12. Baimbridge, K.G., Peet, M.J., McLennan, H. & Church, J. Bursting response to current-evoked depolarization in rat CA1 pyramidal neurons is correlated with lucifer yellow dye coupling but not with the presence of calbindin-D28k. *Synapse* **7**, 269–277 (1991).
13. Bannister, N.J. & Larkman, A.U. Dendritic morphology of CA1 pyramidal neurones from the rat hippocampus. I. Branching patterns. *J. Comp. Neurol.* **360**, 150–160 (1995).
14. Nielsen, J.V., Blom, J.B., Noraberg, J. & Jensen, N.A. Zbtb20-Induced CA1 pyramidal neuron development and area enlargement in the cerebral midline cortex of mice. *Cereb. Cortex* **20**, 1904–1914 (2010).
15. Kohara, K. *et al.* Cell type-specific genetic and optogenetic tools reveal hippocampal CA2 circuits. *Nat. Neurosci.* **17**, 269–279 (2014).
16. Lee, S.H. *et al.* Parvalbumin-positive basket cells differentiate among hippocampal pyramidal cells. *Neuron* **82**, 1129–1144 (2014).
17. Mizuseki, K., Diba, K., Pastalkova, E. & Buzsáki, G. Hippocampal CA1 pyramidal cells form functionally distinct sublayers. *Nat. Neurosci.* **14**, 1174–1181 (2011).
18. Senior, T.J., Huxter, J.R., Allen, K., O'Neill, J. & Csicsvari, J. Gamma oscillatory firing reveals distinct populations of pyramidal cells in the CA1 region of the hippocampus. *J. Neurosci.* **28**, 2274–2286 (2008).
19. Stark, E. *et al.* Pyramidal cell–interneuron interactions underlie hippocampal ripple oscillations. *Neuron* **83**, 467–480 (2014).
20. O'Neill, J., Senior, T. & Csicsvari, J. Place-selective firing of CA1 pyramidal cells during sharp wave/ripple network patterns in exploratory behavior. *Neuron* **49**, 143–155 (2006).
21. Fritschy, J.M., Harvey, R.J. & Schwarz, G. Gephyrin: where do we stand, where do we go? *Trends Neurosci.* **31**, 257–264 (2008).
22. Freund, T.F. & Buzsáki, G. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* **6**, 347–470 (1996).
23. Katona, I. *et al.* Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. *J. Neurosci.* **19**, 4544–4558 (1999).
24. Takács, V.T., Szonyi, A., Freund, T.F., Nyiri, G. & Gulyás, A.I. Quantitative ultrastructural analysis of basket and axo-axonic cell terminals in the mouse hippocampus. *Brain Struct. Funct.* **220**, 919–940 (2015).
25. Glickfeld, L.L., Atallah, B.V. & Scanziani, M. Complementary modulation of somatic inhibition by opioids and cannabinoids. *J. Neurosci.* **28**, 1824–1832 (2008).
26. Bartos, M. & Elgueta, C. Functional characteristics of parvalbumin- and cholecystokinin-expressing basket cells. *J. Physiol. (Lond.)* **590**, 669–681 (2012).
27. Chevaleyre, V. & Siegelbaum, S.A. Strong CA2 pyramidal neuron synapses define a powerful disinaptic cortico-hippocampal loop. *Neuron* **66**, 560–572 (2010).
28. Tukker, J.J., Fuentealba, P., Hartwich, K., Somogyi, P. & Klausberger, T. Cell type-specific tuning of hippocampal interneuron firing during gamma oscillations *in vivo*. *J. Neurosci.* **27**, 8184–8189 (2007).
29. Korshunov, V.A. Miniature microdrive for extracellular recording of neuronal activity in freely moving animals. *J. Neurosci. Methods* **57**, 77–80 (1995).
30. Lapray, D. *et al.* Behavior-dependent specialization of identified hippocampal interneurons. *Nat. Neurosci.* **15**, 1265–1271 (2012).
31. Roumis, D.K. & Frank, L.M. Hippocampal sharp-wave ripples in waking and sleeping states. *Curr. Opin. Neurobiol.* **35**, 6–12 (2015).
32. Varga, C., Golshani, P. & Soltesz, I. PNAS Plus: Frequency-invariant temporal ordering of interneuronal discharges during hippocampal oscillations in awake mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, E2726–E2734 (2012).
33. Katona, L. *et al.* Sleep and movement differentiates actions of two types of somatostatin-expressing gabaergic interneuron in rat hippocampus. *Neuron* **82**, 872–886 (2014).
34. Ellender, T.J., Nissen, W., Colgin, L.L., Mann, E.O. & Paulsen, O. Priming of hippocampal population bursts by individual perisomatic-targeting interneurons. *J. Neurosci.* **30**, 5979–5991 (2010).
35. Bähner, F. *et al.* Cellular correlate of assembly formation in oscillating hippocampal networks *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, E607–E616 (2011).
36. Aivar, P., Valero, M., Bellistri, E. & Menéndez de la Prida, L. Extracellular calcium controls the expression of two different forms of ripple-like hippocampal oscillations. *J. Neurosci.* **34**, 2989–3004 (2014).
37. Lee, D., Lin, B.-J. & Lee, A.K. Hippocampal place fields emerge upon single-cell manipulation of excitability during behavior. *Science* **337**, 849–853 (2012).
38. Bland, B.H., Konopacki, J. & Dyck, R. Heterogeneity among hippocampal pyramidal neurons revealed by their relation to theta-band oscillation and synchrony. *Exp. Neurol.* **195**, 458–474 (2005).
39. Bodor, A.L. *et al.* Endocannabinoid signaling in rat somatosensory cortex: laminar differences and involvement of specific interneuron types. *J. Neurosci.* **25**, 6845–6856 (2005).
40. Glickfeld, L.L. & Scanziani, M. Distinct timing in the activity of cannabinoid-sensitive and cannabinoid-insensitive basket cells. *Nat. Neurosci.* **9**, 807–815 (2006).
41. Lenkey, N. *et al.* Tonic endocannabinoid-mediated modulation of GABA release is independent of the CB1 content of axon terminals. *Nat. Commun.* **6**, 6557 (2015).
42. Cea-del Rio, C.A. *et al.* M3 muscarinic acetylcholine receptor expression confers differential cholinergic modulation to neurochemically distinct hippocampal basket cell subtypes. *J. Neurosci.* **30**, 6011–6024 (2010).
43. Dupret, D., O'Neill, J., Pleydell-Bouverie, B. & Csicsvari, J. The reorganization and reactivation of hippocampal maps predict spatial memory performance. *Nat. Neurosci.* **13**, 995–1002 (2010).
44. Mercer, A., Trigg, H.L. & Thomson, A.M. Characterization of neurons in the CA2 subfield of the adult rat hippocampus. *J. Neurosci.* **27**, 7329–7338 (2007).
45. Viney, T.J. *et al.* Network state-dependent inhibition of identified hippocampal CA3 axo-axonic cells *in vivo*. *Nat. Neurosci.* **16**, 1802–1811 (2013).
46. Klausberger, T. & Somogyi, P. Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. *Science* **321**, 53–57 (2008).
47. Worrell, G.A. *et al.* High-frequency oscillations in human temporal lobe: simultaneous microwire and clinical macroelectrode recordings. *Brain* **131**, 928–937 (2008).
48. Jefferys, J.G.R. *et al.* Mechanisms of physiological and epileptic HFO generation. *Prog. Neurobiol.* **98**, 250–264 (2012).
49. Alvarado-Rojas, C. *et al.* Different mechanisms of ripple-like oscillations in the human epileptic subiculum. *Ann. Neurol.* **77**, 281–290 (2015).
50. Morris, M.E., Baimbridge, K.G., El-Beheiry, H., Obrocea, G.V. & Rosen, A.S. Correlation of anoxic neuronal responses and calbindin-D(28k) localization in stratum pyramidale of rat hippocampus. *Hippocampus* **5**, 25–39 (1995).

ONLINE METHODS

All experimental protocols and procedures were performed according to the Spanish legislation (R.D. 1201/2005 and L.32/2007), the European Communities Council Directives of 1986 (86/609/EEC) and 2003 (2003/65/CE) for animal research, and were approved by the Ethics Committee of the Instituto Cajal (CSIC). Single-cell recordings in freely moving rats were obtained in both Madrid and at the University of Szeged, Hungary. Those experiments in Hungary were approved by Animal Care Committee of the University of Szeged.

In vivo electrophysiology under urethane anesthesia. Males and female Wistar rats (250–450 gr) were anesthetized with urethane (1.2 g per kg of body weight, intraperitoneal) and fastened to the stereotaxic frame. Body temperature was kept constant at 37°. Two bilateral craniotomies of ~1 mm diameter were performed above both hippocampi for CA3 stimulation (AP: -1.2 mm, ML: 2.9 mm), and a window of ~2 mm diameter was drilled above the right hippocampus for CA1, CA2 and CA3 recordings (AP: -3.7 mm; ML: 3 mm). The dura was gently removed to allow electrode penetration. To decrease brain pulsations the cisterna magna was opened and drained.

Two concentric bipolar stimulating electrodes were advanced 3.5 mm with 30° in the coronal plane to target CA3. Stimulation consisted of biphasic square pulses of 0.2-ms duration and amplitudes of 0.050–1.2 mA every 5 s. A subcutaneous Ag/AgCl wire was placed in the neck as a reference electrode.

A 16-channel linear silicon probe (NeuroNexus Tech; 100-μm interspaced contact) was advanced perpendicular along the CA1-DG-CA3c axis guided by extracellular stimulation and typical electrophysiological hallmarks including: (i) multi-unit activity from the CA1 and CA3 stratum pyramidale and the granule cell layer of the dentate gyrus, (ii) spontaneous ripple events to identify CA1 cell layer with the associated sharp-wave events to identify the stratum radiatum, and (iii) the spatial distribution of theta oscillations (4–12 Hz) and gamma activity (20–90 Hz). Extracellular signals were pre-amplified (4× gain) and recorded with a 16(32)-channel AC amplifier (Multichannel Systems), further amplified by 100, filtered by analog means at 1 Hz to 5 kHz, and sampled at 20 kHz per channel with 12 bits precision using a Digidata 1440 (only 14 channels were stored to allow for simultaneous recording with intracellular current and voltage signals). Recording and stimulus position was confirmed by post-hoc histological analysis of the tracks (see below).

For intracellular recording and labeling, sharp pipettes were pulled from 1.5 mm/0.86 mm outer/inner diameter borosilicate glass (A-M Systems) on a Flaming-Brown puller (Sutter Instruments) and filled with 1.5 M potassium acetate and 2% Neurobiotin (wt/vol, Vector Labs). *In vivo* pipette impedances varied from 50–100 MΩ. Intracellular recordings were obtained blindly, driven by a hydraulic manipulator (Narishige) and guided by extracellular stimulation (**Supplementary Fig. 1a**). Signals were acquired with an intracellular amplifier (Axoclamp 900A) at 100× gain. Before recordings started, the craniotomy was covered by 3% agar to improve stability. Passive and evoked physiological properties were recorded in current-clamp mode in CA1 ($n = 25$), CA2 ($n = 3$) and CA3c ($n = 4$) cells. The resting potential, input resistance and amplitude of action potentials was monitored all over the course of experiments. After data collection, Neurobiotin was ejected using 500-ms depolarizing pulses at 1–3 nA at 1 Hz for 10–45 min. The electrode was then gently retracted while monitoring cell survival and the final offset (**Supplementary Fig. 1a**). Pyramidal cell identity was first inferred by electrophysiological criteria—spontaneous activity, action potential waveform, firing response to depolarizing current pulses and CA3 antidromic/orthodromic response—and subsequently confirmed by morphological analysis (**Supplementary Fig. 1a**). Pyramidal cells included in this study had stable resting potentials of at least -40 mV and access resistances lower than 20 MΩ.

In vivo pharmacology under urethane anesthesia. For pharmacological manipulations *in vivo*, we used an 8-channel linear probe with a fluidic tube mounted on the tip (D-series, NeuroNexus Tech). Between 1–2 μl of a cocktail containing the glutamate receptor antagonists CNQX/AP5 (3mM/30 mM) and the Texas Red conjugated dextran tracer (0.1 mg ml⁻¹; Molecular Probes) in artificial cerebrospinal fluid (ACSF, in mM: 124 NaCl, 5 KCl, 1.5 MgSO₄, 26 NaHCO₃, 3 CaCl₂, 10 glucose, pH 7.3; bubbled with 95% O₂/5% CO₂) was slowly (~0.1 μl min⁻¹) delivered using a Hamilton syringe coupled to the fluidic cannula by an oxygen-impermeable Tygon tube (R-3603; Cole-Parmer). After completing experiments ($n = 2$ rats), brains were fixed (see below) to analyze the reach of drug infusion (**Supplementary Fig. 1c–e**).

In vitro electrophysiology. Juvenile (P15–25, $n = 38$) and adults (P39–58; $n = 5$) male and female Wistar rats were used to prepare hippocampal slices. Animals were anesthetized with ketamine-xylazine (100 mg/kg, 10 mg/kg) and decapitated using approved procedures. Sagittal slices (400 μm) were prepared from the septal level of the hippocampus at 2–4 mm from midline using a Leica vibratome (Leica VT1200S). The composition of the extracellular solution (ACSF) was (in mM): 125 NaCl, 4.25 KCl, 3 CaCl₂, 1 MgCl₂, 22 NaHCO₃, 1.2 NaH₂PO₄, 10 glucose, pH 7.3 when balanced with 95% O₂/5% CO₂. Slices recovered in an interface chamber for at least 1 h at 22–25 °C in ACSF. For recordings, one slice was transferred each time from the storing to the submerged recording chamber. A peristaltic pump (Gilson) was used to uniformly circulate the ACSF (2.5–3 ml min⁻¹) through the recording chamber using oxygen-impermeable Tygon tubes. Somatic patch-clamp recordings were made from CA1 pyramidal cells under visual control with an upright microscope (BX51W, 60× lens; Olympus) at 32 °C, using patch pipettes (pulled from borosilicate glass capillaries; Harvard Apparatus) and filled with (in mM): 40 cesium gluconate, 90 potassium gluconate, 3 KCl, 1.8 NaCl, 1.7 MgCl₂, 1 EGTA, 10 HEPES, 2 K₂ATP, 0.3 NaGTP, 10 mM phosphocreatine and 0.025% Alexa568, pH 7.3 adjusted with KOH (osmolarity ~300 mOsm). Using cesium gluconate solutions facilitated voltage-clamp recordings but prevented appropriate characterization of firing patterns in current-clamp mode. Electrodes filled with this solution had resistances of ~7 MΩ.

A bipolar stimulating electrode (tungsten wires, 0.5-mm separation, 0.5 MΩ) were positioned under visual control at the stratum pyramidale of either CA3 (**Fig. 5a**), CA2 (**Fig. 5j**) or CA1 (for evaluating perisomatic inhibition; **Fig. 5h**). For extracellular field potential recordings at the CA1 stratum radiatum, we used a patch-clamp pipette filled with ACSF coupled to one-channel AC amplifier (DAM-80; WPI). Patch recordings were performed using the whole-cell configuration in current- and voltage-clamp modes with an Axoclamp 2B amplifier (Molecular Devices) and digitized with a Digidata 1440A (Molecular Devices) at a sampling frequency of 20 kHz. Capacitance compensation and bridge balance were performed for current-clamp recordings. The junction potential (~15 mV) was not corrected.

Drugs used include: 6-cyano-7-nitro-quinoxaline-2,3-dione (CNQX, 10–20 μM, Sigma-Aldrich) and D-2-amino-5-phosphonopentanoate (AP5, 50 μM, Sigma-Aldrich), [S-(R*,R*)]-[3-[1-(3,4-dichlorophenyl)ethyl]amino]-2-hydroxypropyl] cyclohexylmethyl phosphinic acid (CGP54626, 1 μM, Tocris Bioscience), [D-Ala₂,N-MePhe₄,Gly-ol5] enkephalin (DAMGO, 100–200 nM, Tocris Bioscience), R-(+)-(2,3-dihydro-5-methyl-3-[(4-morpholinyl)methyl]pyrrol[1,2,3-de]-1,4-benzoxazin-6-yl)(1-naphthalenyl)meth anone mesylate (WIN55,212, 5 μM, Sigma-Aldrich).

Single-cell recordings and juxtagcellular labeling in drug-free freely moving rats. Single-cell recordings followed by juxtagcellular labeling for *post hoc* immunohistochemical identification were obtained from freely moving rats during awake resting periods or during sleep using a miniature microdrive adapted to house glass electrodes²⁹. Both male and female Wistar rats (300–450 g) were implanted with the microdrive holder consisting of a plastic base with a cylindrical hole (2.5 mm) targeting a small craniotomy (4.3 mm posterior to Bregma and 2.5 mm lateral) under isoflurane anesthesia (1.5–2% mixed in oxygen 400–800 ml min⁻¹). The dura mater was left intact. The craniotomy was cleaned with 0.05–0.07 mg ml⁻¹ Mitomycin C (Sigma) to reduce growth-tissue, filled with agar (2.5–3.5%) and covered to avoid drying. A ground epidural platinum/iridium wire (125 μm) was implanted over the cerebellum and used as reference.

To habituate animals to microdrive mounting/remounting in awake and drug-free conditions, craniotomy cleaning was repeated over 4–5 consecutive days after surgery. Animals were habituated daily to the recording arena (40 × 40 × 23 cm or 25 × 25 × 35 cm) and microdrive-holder manipulations with water and food ad libitum. Only data from the 40 × 40 × 23 cm arena were used for spatial analysis (see below). Recordings were obtained over the light cycle (12-h light/dark cycle). The day of recording, the microdrive housing a glass pipette (1.0 mm × 0.58 mm, ref 601000; A-M Systems) filled with 1.5–2.5% Neurobiotin in 0.5 M NaCl (impedance 8–15 MΩ) was mounted in the holder and gently advanced into the animal's brain (350 μm per revolution at 3–5-μm resolution). In two animals, an ipsilateral cortical EEG screw over the prefrontal cortex and a contralateral intrahippocampal tungsten wire (122 μm) targeting the stratum radiatum were implanted for validating definition of behavioral states. Recordings were

obtained with a miniature pre-amplifier (ELC mini-preamplifier, NPI Electronic, Germany), carrying two LEDs, and customized to connect with an Axoclamp-2B amplifier (Molecular Devices). In some animals a microdrive adapted for housing an independent sharpened tungsten-wire electrode for LFP recording was used (100–400- μ m separation between pipette and wire). A video-camera was used to monitor the animals' behavior (sleep, awake, movement) and to track their position in the recording arena. Images were acquired at 27 frames per s. The depth position of the pipette was inferred from the micrometric scale of the microdrive²⁹ and from the shape of relevant LFP signals, including K-complexes with spindles while going through the cortex and hippocampal SPW-ripples. Single CA1 pyramidal cells were randomly targeted at the dorsal hippocampus following both stereotaxic and extracellular waveform criteria. After recording, cells were modulated using the juxtacellular labeling technique with positive current pulses (500–600-ms on-off pulses; 5–18 nA) while monitoring their response as previously reported⁵¹. After experiments, rats were perfused with 4% paraformaldehyde (wt/vol) and the brain cut in 70- μ m coronal sections. Labeled CA1 pyramidal cells were identified using streptavidin-conjugated fluorophores.

Tissue processing and immunohistochemistry. For *in vivo* experiments, 1–2 h after completing recordings rats were transcardially perfused with 4% paraformaldehyde (PFA) and 15% saturated picric acid (wt/vol) in 0.1 M, pH 7.4 phosphate-buffered saline (PBS). In initial experiments, picric acid was not included. Brains were postfixed overnight at 22–25 °C, washed in PBS and serially cut in 70- μ m coronal sections (Leica VT 1000S vibratome). Rats selected for synaptic bouton counting ($n = 3$) were perfuse-fixed with 4% PFA, 15% saturated picric acid and 0.05% glutaraldehyde (vol/vol) in 0.1 M phosphate buffer, without further post-fixation. Sections containing the stimulus and probe tracks were identified with a stereomicroscope (S8APO, Leica). Sections containing Neurobiotin-labeled cells were localized by incubating them in 1:400 Alexa Fluor488-conjugated streptavidin (Jackson ImmunoResearch 016-540-084) with 0.5% Triton X-100 (vol/vol) in PBS (PBS-Tx) for 2 h at 22–25 °C. After three washes, sections were analyzed in an inverted epifluorescence microscope (Leica, DMI6000B). Those containing the recorded soma were selected for immunofluorescence characterization (Supplementary Fig. 1a), and several adjacent sections were used for synaptic bouton studies in $n = 2$ identified cells (Supplementary Fig. 5). For *in vitro* experiments, recorded sagittal slices (400 μ m) were fixed by immersion in 4% PFA in PBS overnight at 22–25 °C, and washed three times in PBS before immunofluorescence labeling.

Sections with either *in vivo* or *in vitro* recorded cells were equally processed, except for the Tx concentration in solutions and washes: 0.5% for *in vivo*, and 1% for *in vitro*. They were blocked with 10% fetal bovine serum (FBS, vol/vol) in PBS-Tx and incubated overnight at 22–25 °C with the primary antibody solution containing rabbit anti-CB (1:1,000, CB D-28k, Swant CB-38), or mouse anti-CB (1:1,000, CB D-28k, Swant 300) and rabbit anti-PCP4 (1:300, Sigma HPA005792), with 1% FBS in PBS-Tx. After three washes in PBS-Tx, sections were incubated for 2 h at 22–25 °C with appropriate secondary antibodies: goat anti-rabbit Alexa Fluor633 (1:500, Molecular Probes, A21070), and goat anti-mouse Alexa Fluor488 (Jackson ImmunoResearch 115-545-003) or goat anti-mouse Rhodamine Red (1:200, Jackson ImmunoResearch, 115-295-003) in PBS-Tx-1%FBS. Following 10-min incubation with bisbenzimide H33258 (1:10,000 in PBS, Sigma, B2883) for nuclei labeling, sections were washed and mounted on glass slides in Mowiol (17% polyvinyl alcohol 4-88 (wt/vol), 33% glycerin (vol/vol) and 2% thimerosal (vol/vol) in PBS).

To analyze synaptic boutons with immunohistochemistry, sections were blocked with 20% normal horse serum (NHS, vol/vol) in Tris-buffered saline with 0.3% Triton X-100 (TBSTX), followed by primary antibody incubation in 1% NHS in TBSTX for at least 3 days at 4 °C. After washing 3× 10 min in TBSTX, sections were incubated with secondary antibodies in 1% NHS in TBSTX overnight at 4 °C. Sections were washed 3× 10 min in TBSTX and mounted to glass slides in VectaShield (Vector Laboratories). The primary antibodies used in this case were: Mouse anti- gephyrin (1:500, Synaptic Systems, 147 011), goat anti-parvalbumin (1:1,000, Swant, PVG-214), guinea pig anti-CB1R (1:1,000, Frontier Institute, Hokkaido, Japan CB1-GP-Af530), rabbit anti-Wfs-1 (1:500, Proteintech, 11558-1-AP). The following secondary antibodies were used (all raised in donkey): anti-mouse or anti-rabbit DyLight405 (1:250 and 1:400, Jackson ImmunoResearch, 715-475-151 and 711-475-152, respectively), anti-mouse, anti-goat, anti-guinea

pig Alexa Fluor 488 (1:400, Jackson ImmunoResearch Laboratories; 715-546-150, 705-546-147 and 706485148, respectively); anti-goat and donkey anti-guinea pig Cy3 (1:400, Jackson ImmunoResearch; 705-165-147 and 706-165-148, respectively); and anti-rabbit, anti-goat or anti-guinea pig Cy5 (1:400; Jackson ImmunoResearch; 711-175-152, 705-175-147 or 706-175-148, respectively). For processing gephyrin in recorded cells (Supplementary Fig. 5), we implemented antigen retrieval protocols. Negative controls lacking the primary antibodies were always included.

Antibodies. Specificity information for primary antibodies: CB, rabbit polyclonal produced by immunization with recombinant rat CB D-28k, antiserum; characterized in rat⁵²; no signal in mouse knockout⁵³. CB, mouse monoclonal from chicken CB D-28k, hybridoma supernatant; generated and characterized previously⁵⁴; similar immunoreactivity as for the rabbit antibody. PCP4 (Purkinje cell protein 4), rabbit polyclonal from 6–58 aa of recombinant human PCP4, similar immunoreactivity as for another PCP4 antibody used previously⁵⁵. Gephyrin, mouse monoclonal from N-terminal of rat gephyrin, 100 μ g ml⁻¹; purified IgG, generated previously⁵⁶; no Geph7a signal in mouse knockout⁵⁷. Parvalbumin, goat polyclonal from rat parvalbumin, antiserum; similar immunoreactivity as for other parvalbumin antibodies⁵²; no signal in mouse knockout⁵⁸. CB1R (cannabinoid receptor 1), guinea pig polyclonal from C-terminal 31 aa of mouse CB1R, 200 μ g/ml; similar immunoreactivity as for other CB1R antibodies, western blot single band at 52 kDa⁵⁹. Wfs1 (Wolfram syndrome 1), rabbit polyclonal from fusion protein 1–314 aa of recombinant human Wfs1, 280 μ g ml⁻¹; immunoreactivity in rat brain and molecular weight (~100 kDa) similar to rabbit anti-WFS1C antibody⁶⁰.

Confocal imaging. To acquire multichannel fluorescence stacks from recorded cells, a confocal microscope (Leica SP5) with LAS AF software v2.6.0 build 7266 (Leica) was used. For single-cell studies the following channels (fluorophore, laser and excitation wavelength, emission spectral filter) were used: i) bisbenzimide, Diode 405 nm, 415–485 nm; ii) Alexa Fluor488, Argon 488 nm, 499–535 nm; iii) Rhodamine Red/Alexa Fluor568/Texas Red, DPSS 561nm, 571–620 nm; iv) Alexa Fluor633, HeNe 633 nm, 652–738 nm; and objectives HC PL APO CS 10.0×0.40 DRY UV, HCX PL APO lambda blue 20.0×0.70 IMM UV and HCX PL APO CS 40.0×1.25 OIL UV.

For bouton counting experiments, as well as for documenting two CA1 pyramidal cells (see Supplementary Fig. 5), an LSM710 confocal microscope (Axio Imager Z1, Zeiss) with ZEN 2008 software v5.0 (Zeiss) was used, with the following channels (fluorophore, laser excitation wavelength, emission band): i) DyLight405, 405 nm, 409–499 nm; ii) Alexa Fluor 488, 488 nm, 493–542 nm; Cy3, 543 nm, 552–639 nm; iii) Cy5, 633 nm, 637–757 nm; and a DIC M27 Plan-Apochromat 63×/1.4 n.a. oil immersion objective lens. Channels were acquired sequentially with an 8-bit dynamic range, with a pinhole of 1 Airy unit typically for the shortest wavelength; the pinhole sizes of the other channels were adjusted to give the same optical slice thickness. With the 405 nm laser, the optical slice thickness was typically 0.6 μ m; with the 488-nm laser 1 Airy unit gave an optical slice thickness of 0.7 μ m. With the 405-nm laser, sampling resolution was typically 12.7 pixel μ m⁻¹, 0.08 × 0.08 × 0.43 μ m voxels

Assignment of antibody fluorophores was based on minimizing spectral overlap between channels.

DAB processing of *in vivo* recorded cells. After completing confocal studies, sections with Neurobiotin-labeled neurons were demounted from slides and together with all remaining sections were rinsed in PBS-0.5%Tx and treated with 0.3% H₂O₂ (vol/vol) for peroxidase inactivation. After further washes, they were incubated with 1% B solution (biotinylated peroxidase complex, vol/vol) of the ABC kit (Vectastain ABC Elite kit, Vector Laboratories, PK6100) in PBS-Tx-2%FBS for 4 h at 22–25 °C, and afterwards with 1% A/1% B kit solutions in PBS-Tx-FBS for 3 d at 4 °C. Following three washes, slices were processed with diaminobenzidine (DAB, Sigma) using the glucose oxidase method, with or without nickel intensification: 0.05% DAB (wt/vol), 0.2% glucose (wt/vol), 0.004% CLNH₄ (wt/vol), 0.04% Ni(NH₄)₂SO₄ (wt/vol) and 0.002% glucose oxidase (wt/vol) in PBS. Reaction was observed at a stereomicroscope and stopped by several rinses in PBS. Sections were then mounted in slides, dehydrated (in ethanol 70–95%–100% and xilol) and coverslipped with DPX (VWR). Subsequently, labeled cells were examined and photographed in a bright-field microscope (Nikon Eclipse

80i) coupled to a digital camera (Mbf). Two-dimensional reconstructions were made with a drawing camera lucida tube (**Fig. 3a**).

Morphological data analysis. All morphological analyses were performed blindly to electrophysiological data. Assignment of cell location (**Fig. 3b**) and probe track position (**Fig. 1b**) was based on anatomical landmarks⁶¹; the mediolateral coordinate was directly measured from the midline. The orthogonal distance from the recorded cell to the probe track (**Fig. 2f**) was estimated by triangulation using previous measurements. The distance from the cell soma to radiatum (**Fig. 3b**) was measured from camera lucida drawings (1 section of 70 µm at 40×). The lineal distance from the cell soma to CA2 was taken parallel to the stratum pyramidale in the same section. The border between CA1 and CA2 was defined at the end of the stratum lucidum.

For stereological quantification of gephyrin-immunopositive puncta (**Fig. 4**), we selected Wfs1-positive CA1 pyramidal cells ($n = 34$) in 4 sections (4 confocal stacks) obtained from 3 different rats. We counted all gephyrin/PV and gephyrin/CB1R boutons from 11 optical slices around the soma center, using the first image in the stack as a lookup section for the optical disector. The sampling area was calculated from the product of the mean circumference of the soma and the 10 optical slices. The border with radiatum was estimated for each section and the distance from the cell somata were measured using ImageJ.

For evaluation of CB immunoreactivity (**Supplementary Table 1**) in the CA1 stratum pyramidale, we adopted a quantitative approach (details in **Supplementary Fig. 4**). Briefly, for each confocal image containing the soma of a recorded identified neuron, we measured the mean pixel intensity of the CB signal (Alexa Fluor633 immunofluorescence) both from the recorded cell and from neighboring pyramidal cells in the same optical section by drawing conservative ROIs around their somata (avoiding CB+ axons and dendrites) in ImageJ. Some cells were intensely immunopositive (CB+) and others were immunonegative (CB−). We defined CB intensity of the recorded cell as a normalized intensity value (**Supplementary Fig. 4b**). A binary classification of CB+ and CB− pyramidal cells was adopted, with immunonegative cells classified as CB− (normalized intensity threshold <0.2) and neurons with intense (normalized intensity >0.75) or intermediate immunoreactivity to CB classified as CB+ (**Supplementary Figs. 3c–e and 4**). To classify cells as deep and superficial pyramidal cells (**Fig. 5d**), we considered the positions of the soma with respect to the more compact CB sublayer. Cells were defined as “deep” if identified somata were located away from the CB positive sublayer, independent of their immunoreactivity to CB; “superficial” cells were defined as having their soma within the CB positive sublayer. For *in vitro* studies at P15 to P58 cells were classified similarly. Only slices with clear CB expression at the recorded coordinate were included in the database, to circumvent a late developmental onset of CB expression. Calbindin quantification was evaluated independently in a subset of cells by two authors (EC and TJV) who reached to comparable measurements.

All confocal images were processed in ImageJ/Fiji (v1.49b)⁶² and Adobe Photoshop CS5 Extended (v12.0.4x64). Colocalization between markers (channels; for example, **Fig. 4b,c**) was evaluated in the same optical section.

In vivo data analysis. Data analysis was performed using routines written in MATLAB 7.10 (MathWorks). Electrophysiological properties (input resistance, membrane capacitance and membrane time constant) of neurons recorded intracellularly *in vivo* were measured using 500-ms currents step in current-clamp mode (**Supplementary Table 1**). In single-cell recordings with glass pipettes in freely moving rats, we evaluated the stability of the action potential waveform (peak-to-peak duration and amplitude as well as a spike asymmetry index defined as the ratio of the difference between the negative and positive baseline-to-peak amplitudes and their sum) over the entire recording session (minimum 3 min), before juxtacellular electroporation. To evaluate firing features typical of PCs an autocorrelogram of the single-cell firing rate was estimated (0.5-ms bins). CA1 PC usually fire complex-spike bursts with autocorrelogram peaks at 4–5 ms (**Fig. 7b** and **Supplementary Table 2**). Cells with intracellular action potential amplitude smaller than 40 mV were excluded. Single-cell drug-free recordings with action potentials wider than 1 ms and large amplitude variability over the recorded session were excluded from the analysis.

Electrophysiological analyses were performed with the whole database at once. Groups (depolarized/hyperpolarized, deep/superficial, CB+/CB−) were identified using criteria that are specified along the text.

Local field potential (LFP) recordings from sites at the stratum radiatum were low-pass filtered at 100 Hz to study SPWs. LFP signals from sites at the stratum pyramidale were bandpass filtered between 100–600 Hz to study ripples. We used forward-backward-zero-phase finite impulse response (FIR) filters of order 512 to preserve temporal relationships between channels and signals. For SPWs, filtered signals were smoothed by a Gaussian kernel and candidate events were detected by thresholding (>3 s.d.). For ripple detection, the bandpass-filtered signal was subsequently smoothed using a Savitzky-Golay (polynomial) filter and candidate events were detected by thresholding (>2 s.d.). Only SPW events associated to stratum pyramidale ripples were included for analysis. All pairs of detected events were visually confirmed and aligned by the peak of the accompanying individual SPW (or by the local maximum of the smoothed ripple). One-dimensional current-source density (CSD) signals were calculated from the second spatial derivative of LFP and treated similarly for SPW detection. Smoothing was only applied to CSD signals for visualization purposes. Tissue conductivity was considered isotropic, and an arbitrary value of 1 was assigned to express CSD signal as mV/mm². Stripes in the background CSD due impedance and offset differences between sites were clearly separated from the relevant CSD responses. For both LFP and CSD signals, data were represented as averages of 10–112 individual events.

For analysis of SPW-associated intracellular responses (**Fig. 1c,d**), the timing of SPW-ripple events was used to align membrane potentials at different levels. We found similar intracellular trends when the peak of the SPW or the ripple power was used for alignment. Evoked responses were aligned by the stimulation trigger (artifact) and input/output curves (**Fig. 1e**) were obtained for a range of stimulation intensities (50–500 µA). The resting membrane potential (RMP) and input resistance were estimated by linear regression between baseline potential data and the associated holding current. The reversal potential (V_{rev}) of SPW-associated and evoked responses for each cell was estimated by linear regression between the response peak amplitude and membrane potential (**Fig. 1c,d**). The driving force of SPW-associated and evoked responses (**Fig. 1g**) was estimated as V_{rev} -RMP.

Time-frequency analysis of intracellular and extracellular ripples (**Fig. 2**) was performed by applying the multitaper spectral estimation in sliding windows with 97.7% overlap and frequency resolution of 10 Hz in the 90–600-Hz frequency range (only the 90–400-Hz range is shown) to data sweeps aligned by SPW-ripple events (±1 s). The normalized power in the whole time windows was then treated as a statistical distribution, from which we extracted the mode to estimate the oscillatory frequency peak and the mean power spectral value. The ripple power both for intracellular and extracellular signals (**Fig. 2e**) was estimated from the area within the 90–200-Hz band. To quantify the coordination between the intracellular and extracellular ripple (**Fig. 2**), we estimated the cross-correlation function between signals for each sweep and calculated the power spectrum of cross-correlation (**Supplementary Fig. 3b**).

Peri-event time histograms of intracellularly recorded cells (PETHs; **Fig. 6c**) were obtained by binning (30 ms) action potential timing recorded in the absence of holding currents, i.e. at their resting membrane potential. Individual action potentials were identified by thresholding at mean amplitude. Only isolated SPW-ripples events (on a time windows >1 s) were used to compute PETHs and a minimum number of events (>10) per cell was required. This resulted in a subset of cells that satisfied all conditions. A grand-average of the mean PETHs was calculated pooling individual PETHs in a given cell group. We also evaluated whether cell responses during SPW-ripples (±60 ms around the SPW peak) was different from the baseline firing occurring between 500 and 100 ms before the event (**Fig. 6c**). We tested different windows lengths (20, 40, 60, 100 ms) and found ±60 ms to better capture statistical differences, consistent with the typical SPW-ripple duration (~50–70 ms).

To evaluate single PC entrainment by SPW ripples (**Fig. 6d–f**), we defined the following measures: i) cell participation, as the number of events the cell fire over the total number of events (0.1 means the cell fires in 10% of SPW-ripples); ii) the average number of spikes emitted in a 60 ms centered in the SPW-ripple events, defined from the total count for all events examined; iii) the SPW-associated firing rate in Hz, which is calculated from the average number of spikes in the 60-ms window.

For single-cell recordings in freely moving conditions (**Fig. 7**), data from glass pipettes were: i) band pass filtered at 100–600 Hz and smoothed using a Savitzky-Golay (polynomial) filter to detect ripple events by thresholding

(>4 s.d.); ii) high-pass filtered at 300 Hz to detect positive spikes from the juxtacellular recorded cell (>8 s.d.) (see Fig. 7c). For visualization of ripple events signals were filtered signals at 100–200 Hz. We used forward-backward-zero-phase finite impulse response filters (order 512) to preserve temporal relationships between channels and signals. All events/spikes were visually confirmed. Candidate SPW ripple events were all aligned by the local maximum of the smoothed ripple. In those cases where a second electrode was available for LFP recordings, signals were treated similarly and SPW-ripple events were all validated. PETHs and entrainment by SPW ripples of single-cells recorded in freely moving conditions were obtained as previously described for intracellular recordings under urethane. Data in different behavioral brain states (sleep and awake) were analyzed separately.

To define the different brain states in freely moving rat experiments we adopted an integrated behavioral and electrophysiological approach. Sleep and awake states were visualized from the videos by two independent researchers (M.V., D.G.-D.) one blind to electrophysiological data. We used written information recorded along the experiments (by R.G.A. and M.V.) and simultaneous LFP activity at the glass pipette to roughly identify epochs of sleep and wakefulness in the same animal ($n = 6$ out of 11 rats). Definition of brain states in these animals was subsequently refined using specific behavioral and electrophysiological criteria. Under light conditions, rat's sleep is characterized by a curled-up posture typically at a preferred corner of the cage with eyes closed⁶³. Hence, sleep was behaviorally defined by the curled immobile posture of the animal at the corner (Fig. 7a), typically associated with slow-wave activity (<3 Hz high amplitude LFP). On occasions, phasic movements typical of paradoxical REM sleep were observed accompanied by low amplitude rhythmic activity at the theta band in the hippocampal LFP (4–12 Hz). Awake states were defined whenever the animals had their eyes open⁶³ and were attentive either moving or not (Fig. 7b). Animal's position in the arena was tracked using idTracker to account for head movements⁶⁴ and/or manually checked in cases of poor contrast. We validated these approaches in two animals carrying an ipsilateral cortical screw for EEG recordings and a contralateral intrahippocampal wire for LFP recordings at the stratum radiatum in addition to the glass pipette (Supplementary Fig. 7). All these signals were recorded together with signals from an accelerometer integrated in the pre-amplifier headstage. Labeled epochs were subsequently used to classify SPW-ripple events as occurring during slow-wave sleep (sleep SPW ripples) or in awake conditions (awake SPW ripples).

To account for the spatial modulation of single-cell firing, we first identified rats exhibiting exploratory activity along several locations (4×4) in the 40×40 cm arena (>2 locations) and sufficient number of SPW-ripple events detected at each location (>10; $n = 6$ of 11 rats). The baseline firing rate, the number of SPW-ripples, as well as single-cell participation and firing rate during SPW-ripples were evaluated in the 4×4 spatial grid (Fig. 7i). To quantify the spatial modulation of the single-cell firing rate and participation during SPW-ripples for each cell we calculated the s.d. of the spatial index across 4×4 locations. Then we performed a Fisher-Pitman permutation test for each cell and index, consisting in randomly shuffling the event location (100 replicates) and testing for significant difference between the observed value and the random distribution. We also tested similarly whether the number of SPW-ripple events had a spatially biased distribution. For the basal firing rate, we proceeded similarly but randomly permuting the animal's position (that is, xy vector). Finally, to account for the spatial effects on the variance of the single-cell participation and firing rate during SPW-ripples we estimated the coefficient of variation of the mean (s.d./mean) for the whole session as a function of the number of visited locations for all cells examined ($n = 11$).

Code availability. Routines and codes written in MATLAB 7.10 (MathWorks) are available on request

In vitro data analysis. *In vitro* data was analyzed using tools from pClamp 10.2 (Molecular Devices) and Origin 8.5 (OriginLab). Basic membrane properties (input resistance, membrane capacitance and membrane time constant; Supplementary Fig. 6a) were measured at -60 mV in response to a -20 -pA current pulse (300-ms duration).

Evoked EPSC and IPSC amplitudes were measured as the peak current with the cell held at -70 , -50 and $+10$ mV. Amplitude data was correlated with the

cell distance to radiatum as estimated by posterior morphological analysis. The onset was measured as the delay from the beginning of the stimulation artifact to the start of postsynaptic response (Supplementary Fig. 6d).

Statistical analysis and comparisons. Cells from different hippocampal regions were collected randomly and assigned to different groups according to the following criteria: i) CA1, CA2 and CA3 PCs were classified according to anatomical information and neurochemical profiling; ii) depolarized and hyperpolarized CA1 PCs were classified according to their subthreshold membrane response during SPW events recorded intracellularly at the resting membrane potential in urethane; iii) deep and superficial CA1 PCs were classified according to their somatic position regarding to the CB-positive sublayer (the center of the soma within the CB immunoreactive cell band was considered superficial; deep above the CB band); iv) CB-positive or CB-negative was determined by quantitative analysis of CB immunoreactivity (see Supplementary Fig. 4); v) single-cells recorded with glass electrodes in freely moving rats were classified as CA1 PCs based on similarities of their action potential waveform and firing autocorrelogram to those obtained from histologically confirmed CA1 PCs. Given the low sample size (only 4 cells tested for CB out of 6) we did not attempt to classify them as deep/superficial or CB+/CB-.

Group results are given as mean \pm s.d., with individual data plotted in each case. No statistical methods were used to predetermine sample sizes, but our sample sizes are similar to those reported in previous publications^{36,45}. Statistical analysis was performed using MATLAB or SPSS 17.0. Data were analyzed using two-way ANOVA, repeated measures ANOVA, Pearson correlation and Student's *t* test (paired or unpaired) considering $P < 0.05$ as statistically significant. All *post hoc* tests are two-tailed. Histograms distribution of several values (SPW-associated reversal potential, driving force, cell participation and firing rate) measured across the entire population of cells was fitted to a Gaussian distribution for cells classified as superficial/deep or CB+/CB- using the Shapiro-Wilk test. Non-parametric tests (Mann-Whitney) were used whenever required.

A Supplementary Methods Checklist is available.

51. Pinault, D. A novel single-cell staining procedure performed *in vivo* under electrophysiological control: morpho-functional features of juxtacellularly labeled thalamic cells and other central neurons with biocytin or Neurobiotin. *J. Neurosci. Methods* **65**, 113–136 (1996).
52. Sloviter, R.S. Calcium-binding protein (calbindin-D28k) and parvalbumin immunocytochemistry: localization in the rat hippocampus with specific reference to the selective vulnerability of hippocampal neurons to seizure activity. *J. Comp. Neurol.* **280**, 183–196 (1989).
53. Airaksinen, M.S. *et al.* Ataxia and altered dendritic calcium signaling in mice carrying a targeted null mutation of the calbindin D28k gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 1488–1493 (1997).
54. Celio, M.R. *et al.* Monoclonal antibodies directed against the calcium binding protein Calbindin D-28k. *Cell Calcium* **11**, 599–602 (1990).
55. San Antonio, A., Liban, K., Ikrar, T., Tsyanovskiy, E. & Xu, X. Distinct physiological and developmental properties of hippocampal CA2 subfield revealed by using anti-Purkinje cell protein 4 (PCP4) immunostaining. *J. Comp. Neurol.* **522**, 1333–1354 (2014).
56. Pfeiffer, F., Simler, R., Grenningloh, G. & Betz, H. Monoclonal antibodies and peptide mapping reveal structural similarities between the subunits of the glycine receptor of rat spinal cord. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 7224–7227 (1984).
57. Feng, G. *et al.* Dual requirement for gephyrin in glycine receptor clustering and molybdoenzyme activity. *Science* **282**, 1321–1324 (1998).
58. Schwaller, B. *et al.* Prolonged contraction-relaxation cycle of fast-twitch muscles in parvalbumin knockout mice. *Am. J. Physiol.* **276**, C395–C403 (1999).
59. Fukudome, Y. *et al.* Two distinct classes of muscarinic action on hippocampal inhibitory synapses: M2-mediated direct suppression and M1/M3-mediated indirect suppression through endocannabinoid signalling. *Eur. J. Neurosci.* **19**, 2682–2692 (2004).
60. Takeda, K. *et al.* WFS1 (Wolfram syndrome 1) gene product: predominant subcellular localization to endoplasmic reticulum in cultured cells and neuronal expression in rat brain. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 477–484 (2001).
61. Paxinos, G. & Watson, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 5th edn. (Elsevier, London, 2005).
62. Schneider, C.A., Rasband, W.S. & Eliceiri, K.W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* **9**, 671–675 (2012).
63. van Betteray, J.N., Vossen, J.M. & Coenen, A.M. Behavioural characteristics of sleep in rats under different light/dark conditions. *Physiol. Behav.* **50**, 79–82 (1991).
64. Pérez-Escudero, A., Vicente-Page, J., Hinz, R.C., Arganda, S. & de Polavieja, G.G. idTracker: tracking individuals in a group by automatic identification of unmarked animals. *Nat. Methods* **11**, 743–748 (2014).

**A.2. Mechanisms for selective single-cell reactivation
during offline sharp-wave ripples and their distortion
by fast ripples**



Neuron 94 (6), 1234-1247.

Mechanisms for Selective Single-Cell Reactivation during Offline Sharp-Wave Ripples and Their Distortion by Fast Ripples

Highlights

- Unsupervised clustering discloses a mechanism of firing selectivity during ripples
- Firing selectivity collapses in the epileptic hippocampus during fast ripples
- Global and cell-specific synaptic drives are critical factors for selective firing
- Tuning global and cell-specific factors allow improving recall in epileptic rats

Authors

Manuel Valero, Robert G. Averkin,
Ivan Fernandez-Lamo, ..., Elena Cid,
Gabor Tamas,
Liset Menendez de la Prida

Correspondence

lmprida@cajal.csic.es

In Brief

Valero et al. show how unsupervised clustering discloses a synaptic mechanism for CA1 firing selectivity during sharp-wave ripples. This mechanism is impaired in epileptic rats by collapsing cell-specific synaptic drives. This establishes new concepts in understanding selective neuronal firing.

Mechanisms for Selective Single-Cell Reactivation during Offline Sharp-Wave Ripples and Their Distortion by Fast Ripples

Manuel Valero,¹ Robert G. Averkin,² Ivan Fernandez-Lamo,¹ Juan Aguilar,³ Diego Lopez-Pigozzi,¹ Jorge R. Brotons-Mas,¹ Elena Cid,¹ Gabor Tamas,² and Liset Menendez de la Prida^{1,4,*}

¹Instituto Cajal, CSIC, Ave Doctor Arce 37, Madrid 28002, Spain

²MTA-SZTE Research Group for Cortical Microcircuits, University of Szeged, Szeged H-6726, Hungary

³Hospital Nacional de Parapléjicos, Servicio de Salud de Castilla-La Mancha, Toledo 45071, Spain

⁴Lead Contact

*Correspondence: lmprida@cajal.csic.es

<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2017.05.032>

SUMMARY

Memory traces are reactivated selectively during sharp-wave ripples. The mechanisms of selective reactivation, and how degraded reactivation affects memory, are poorly understood. We evaluated hippocampal single-cell activity during physiological and pathological sharp-wave ripples using juxtacellular and intracellular recordings in normal and epileptic rats with different memory abilities. CA1 pyramidal cells participate selectively during physiological events but fired together during epileptic fast ripples. We found that firing selectivity was dominated by an event- and cell-specific synaptic drive, modulated in single cells by changes in the excitatory/inhibitory ratio measured intracellularly. This mechanism collapses during pathological fast ripples to exacerbate and randomize neuronal firing. Acute administration of a use- and cell-type-dependent sodium channel blocker reduced neuronal collapse and randomness and improved recall in epileptic rats. We propose that cell-specific synaptic inputs govern firing selectivity of CA1 pyramidal cells during sharp-wave ripples.

INTRODUCTION

Reactivation of spatial and episodic neuronal sequences occurs offline in the hippocampus during sharp-wave ripples (100–250 Hz; Nádasdy et al., 1999; O'Neill et al., 2006; Foster and Wilson 2006; Diba and Buzsáki 2007; Wang et al., 2016). Such sequences, which may also play prospectively (Gupta et al., 2010; Pfeiffer and Foster, 2013), are precisely organized in proximo-distal and deep-superficial hippocampal sub-regions (Csicsvari et al., 2000; Valero et al., 2015; Oliva et al., 2016). They depend in part on network microstructure (Stark et al., 2015; Wang et al., 2016) and, in turn, firing sequences shape local field potentials (LFPs) associated with ripple events (Reichinnek et al.,

2010; Taxidis et al., 2015). Global interference with sharp-wave ripples impairs memory and destabilizes the spatial code (Ego-Stengel and Wilson, 2009; Girardeau et al., 2009), while acting locally in a cell-type-specific manner results in alterations of some but not all sequences (Stark et al., 2015; Kovács et al., 2016; van de Ven et al., 2016). Selective reactivation of neuronal sequences is thought to stabilize an engram (Wilson and McNaughton, 1994; Nakashiba et al., 2009; Carr et al., 2011; van de Ven et al., 2016).

Deficits of memory consolidation are common to many neurological diseases for which changes of sharp-wave ripples are reported (Suh et al., 2013; Born et al., 2014; Nicole et al., 2016). Ripple activity patterns change with aging (Kanak et al., 2013; Wiegand et al., 2016), in tauopathies (Booth et al., 2016), and in animal models of neuropsychiatric disorders (Suh et al., 2013), presumably due to functional changes in underlying microcircuits. The mechanisms for selective single-cell firing during sharp-wave ripples, and those that govern memory degradation in pathological conditions remain to be clarified.

In temporal lobe epilepsy (TLE), a disease affecting hippocampal and parahippocampal microcircuits, fast ripples (250–600 Hz) have been associated with both interictal discharges and sharp-wave-like events (Bragin et al., 1999, 2002; Worrell et al., 2008; Ibarz et al., 2010; Alvarado-Rojas et al., 2015). Pathological fast ripples are a clinically useful biomarker in epilepsy, but their effects on cognition are not clear (Kucewicz et al., 2014). Given difficulties in identifying ripples associated to hippocampal sharp waves in clinical settings (Staba et al., 2002; Menendez de la Prida et al., 2015), addressing this question in humans is challenging. Here, we took advantage of a rat model of TLE exhibiting distortion of sharp-wave ripples and different memory abilities to pursue the mechanisms for firing selectivity. We found that the spectral properties of sharp-wave ripples were correlated with increased neuronal firing and loss of selectivity typical of the epileptic hippocampus. Using unsupervised clustering of sharp-wave ripples (Reichinnek et al., 2010; Taxidis et al., 2015), we disclosed a synaptic mechanism that can be used to perturb firing selectivity at the single-cell and microcircuit level. Our results demonstrate how global and cell-specific network activity are critical for hippocampal memory function.

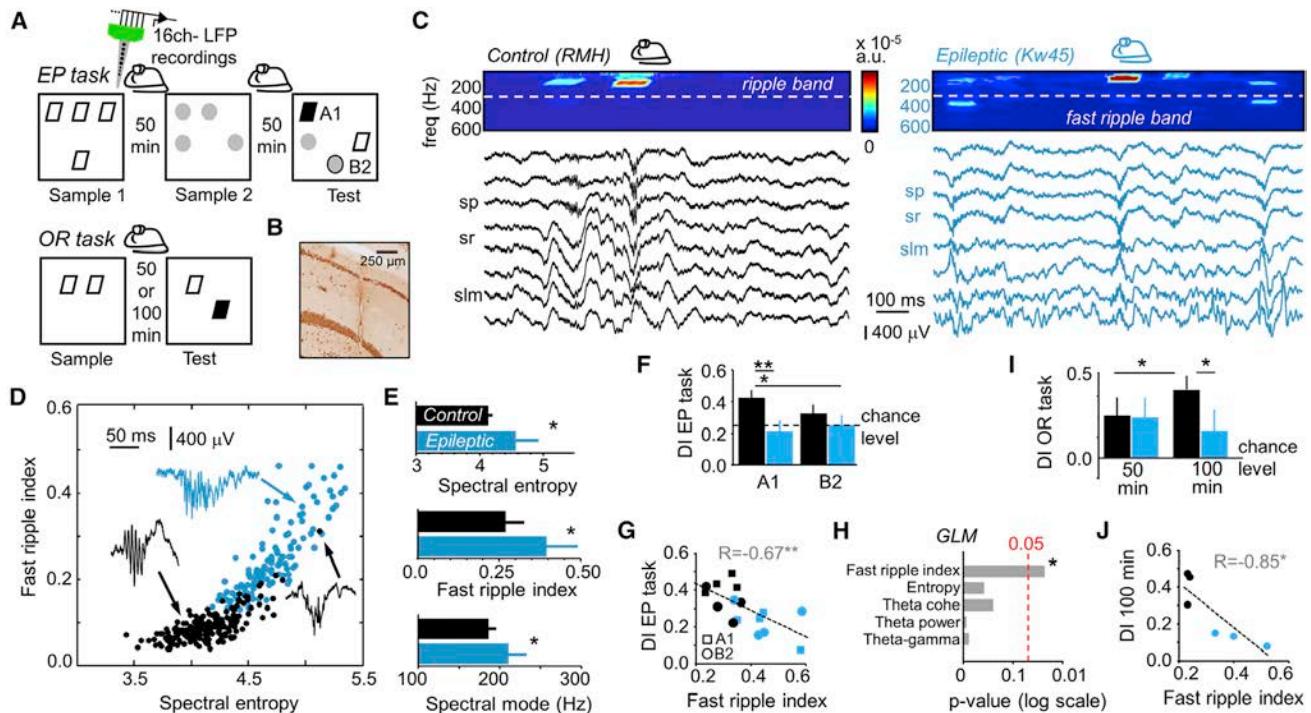


Figure 1. Sharp-Wave Ripples in Normal and Epileptic Rats

- (A) Sharp-wave ripples were recorded with 16-channel probes in the dorsal hippocampus of behaving rats between trials of object recognition tasks, including the episodic-like memory task (EP) and one-trial object recognition (OR).
- (B) NeuN immunostaining confirmed probe track position going through the strata pyramidale (SP), radiatum (SR), and lacunosum moleculare (SLM) of CA1. A coronal section from an epileptic rat is shown.
- (C) Examples of sharp-wave ripples recorded in representative normal and epileptic rats during the inter-trial. Time frequency spectra of the SP layer are shown at the top.
- (D) Spectral indices characterize individual sharp-wave ripples recorded in rats shown in (C).
- (E) Grand average group differences of sharp-wave ripple spectral indices (mean \pm SD data from $n = 7$ control, $n = 7$ epileptic rats). * $p < 0.05$.
- (F) Different performance in the EP memory task of rats recorded electrophysiologically ($n = 4$ control, $n = 4$ epileptic rats). * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$.
- (G) The fast ripple index correlated with animal performance in the EP task. The r value of a significant Pearson correlation is shown; ** $p < 0.001$.
- (H) Results from the generalized linear model (GLM). Significance level at $p = 0.05$ is indicated.
- (I) Performance of normal and epileptic rats in the OR task at 50 min and 100 min inter-trial (data from $n = 7$ control, $n = 9$ epileptic rats). * $p < 0.05$.
- (J) Correlation between the fast ripple index and animal performance for $n = 3$ control and $n = 3$ epileptic rats recorded electrophysiologically during the OR task. * $p < 0.05$.

RESULTS

Sharp-Wave Ripples in Normal and Epileptic Rats

We first asked whether sharp-wave-associated ripples could be separated from interictal epileptiform events in chronically epileptic rats. In normal rats, physiological ripples (100–250 Hz) emerge in the CA1 region during immobility and slow-wave sleep. Thus, we implanted 16-channel silicon probes in the dorsal hippocampus of normal and epileptic behaving animals. Rats performed either the episodic-like “what-where-when” memory task (EP task; $n = 4$ control, $n = 4$ epileptic) or a one-trial object recognition task (OR task; $n = 3$ control, $n = 3$ epileptic; Figure 1A) (Inostroza et al., 2013). LFP signals were acquired along CA1 layers (Figure 1B).

In normal rats ($n = 7$), characteristic sharp-wave ripples occurred during awake immobility and slow-wave sleep in periods between trials at a rate of 0.55 ± 0.18 events/s (Figure 1C, left). Sharp-wave amplitude was maximal in the stratum radia-

tum (1.03 ± 0.24 mV) and associated with ripples at the stratum pyramidale. Time-frequency spectra revealed that ripples contributed consistently to the 100–250 Hz band (Figure 1C). Sharp-wave-associated gamma oscillations were identified in some events (Sullivan et al., 2011), but we focused on the ripple band given its relevance for the epileptic condition (Bragin et al., 1999; Alvarado-Rojas et al., 2015).

Similar events were recorded in epileptic rats between trials but their spectral components were remarkably variable (Figure 1C, right). In the stratum radiatum, sharp-wave amplitude (0.82 ± 0.20 mV, $n = 7$; $p = 0.18$; Student’s t test) and rate (0.37 ± 0.16 events/s, $p = 0.19$) were similar to records from control rats. They clearly differed from interictal discharges with larger, saturating amplitude fluctuations (Figure S1A). We thus excluded sessions with interictal or ictal events for further analysis.

Are ripples recorded in normal and epileptic rats spectrally different? We defined two indices to characterize individual

events. The fast ripple index was the proportion of the 100–600 Hz power spectrum above a frequency cutoff, usually 250 Hz. Ripple entropy was a measure of spectral disorganization in the 100–600 Hz band (see **STAR Methods**). The larger the entropy, the more disorganized the spectra; the larger the fast ripple index, the stronger the ripple contribution to the fast frequency band. Events from normal and epileptic rats could be separated statistically for cutoff thresholds of 180–350 Hz (**Figure 1D** for 250 Hz; **Figures S1B–S1D**). Overall, ripples in epileptic rats exhibited higher entropy ($p = 0.017$), fast ripple index ($p = 0.015$), and frequency ($p = 0.018$; **Figure 1E**).

Sharp-Wave Ripples in Epileptic Rats Are Pathological

How do sharp-wave ripples in epileptic rats relate to their memory performance? Previously, we showed that epileptic rats failed in their ability to discriminate old and recently displaced and non-displaced objects in the “what-where-when” task (objects A1 and B2 in the EP task, **Figure 1A**; **Inostroza et al., 2013**). We confirmed a similar trend in the subset of animals used for this study (**Figure 1F**; effect for group F(1,10) = 15.14, $p = 0.002$, but not for objects nor interaction, two-way ANOVA). Importantly, we found strong correlation between spectral indices of sharp-wave ripples recorded during the inter-trial and the discrimination ratio for object A1 and B2 for both groups together (**Figure 1G** for the fast ripple index; for entropy: $R = -0.73$, $p = 0.0013$; frequency: $R = -0.68$, $p = 0.003$).

Theta and gamma rhythmopathies were recently associated with memory deficits in TLE (**Inostroza et al., 2013; Lopez-Pigozzi et al., 2016**). In the current dataset, we found an association between the fast ripple index of offline events and the mean inter-layer coherence of theta oscillations recorded in the exploratory phases of the task ($R = -0.87$; $p = 0.004$; **Laurent et al., 2015**). To dissect the contribution of different physiological indices, we used a generalized linear model (GLM). This analysis models the discrimination index as a combination of independent effects of (1) ripple spectral indices (**Ibarz et al., 2010**), (2) theta power at the stratum lacunosum-moleculare (**Inostroza et al., 2013**), (3) coherence with molecular layers (**Laurent et al., 2015**), and (4) interaction between theta and gamma (30–60 Hz) at the stratum radiatum (**Lopez-Pigozzi et al., 2016**). We found that the fast ripple index explained most of the variance of discrimination for both objects A1 and B2 at a significance level of $p < 0.05$ (**Figure 1H**). Thus, excluding covariation, ripple spectral dynamics is directly correlated with discrimination ability, suggesting some direct effect on consolidation processes.

To test this point further, we evaluated ripple effects by using one-trial object recognition tasks at 50 min and 100 min intervals (OR task) in an independent cohort of animals ($n = 7$ control, $n = 9$ epileptic, **Figure 1A**). Differences of exploration between objects would suggest interferences between novelty and familiarity that when tested allocentrically and with long delays depend on the hippocampus (**Barker and Warburton, 2011**). We found that epileptic rats performed similar to controls at 50 min but less well at 100 min inter-trial interval (**Figure 1I**; $F(1,12) = 4.32$, $p = 0.047$ for groups; no effect for interval; interaction $p = 0.068$; two-way ANOVA). The temporal trend for control rats was compatible with successful recall after sleep typical

of 100 min interval ($p = 0.021$; **Binder et al., 2012**). Epileptic rats failed to show such a trend (**Figure 1I**) and differences between groups became more pronounced at longer intervals ($p = 0.011$). These data suggest similar abilities between groups for encoding and retrieval for short retention intervals and a failure of epileptic rats in memory consolidation at long intervals of 100 min. Spectral indices of sharp-wave ripples were similar for events recorded in sleep and during immobility (**Figure S1E**). We asked whether sleep pattern could contribute but found no difference between epileptic and control animals of either the sleep stages or the duration of REM episodes (control: 22–164 s; epileptic: 43–147 s). Instead, only the discrimination index in the 100 min interval OR task correlated with the fast ripple index (**Figure 1J**). These data therefore suggest that spectrally disorganized sharp-wave ripples during immobility and sleep may impair memory function. Do differences in ripple spectra reflect some specific cellular process of memory consolidation?

Spectral Signatures of Sharp-Wave Ripples Reflect Local Neuronal Firing

We looked for cellular determinants of ripple spectral features in juxtacellular recordings of CA1 pyramidal cells from freely moving rats (**Figure 2A**). Sharp-wave ripple events recorded with glass pipettes exhibited similar spectral features to those obtained with silicon probes (**Figures S2A** and **S2B**).

Pyramidal cells from normal rats generally fired 1–3 spikes at the trough of spontaneous ripples recorded with the glass pipette and were identified by their characteristic autocorrelogram (**Figure 2B**; $n = 14$ cells; $n = 8$ histologically confirmed). In contrast, cells recorded from epileptic rats were more typically active (3–6 spikes; **Figure 2C**; $n = 7$ cells, 4 histologically confirmed) and their firing was less coherent with LFP than in control cells (**Figure S2C**; **Foffani et al., 2007**). Un-identified putative pyramidal cells exhibited similar action potential features and autocorrelation than histologically validated cells. Previously, we described a bias of CA1 neuronal firing and participation during physiological sharp-wave ripples along the deep-superficial sub-layers (**Valero et al., 2015**). We considered histological information to predict the position of un-identified cells with respect to the border with the stratum radiatum (**Figures S2D–S2G**; **STAR Methods**). Firing from control cells exhibited the bias that we described before, with superficial cells firing more and more consistently during sharp-wave ripples (**Figure 2D**, left). In contrast, in epileptic rats the deep-superficial trend was impaired (**Figure 2D**, right; **Figure S2H**). Overall, the group effect dominated differences of single-cell firing rate ($F(1,17) = 29.99$, $p < 0.0001$) and participation during sharp-wave ripples ($F(1,17) = 10.19$, $p = 0.005$; **Figure S2I**) (no deep-superficial effect nor interaction, two-way ANOVA).

Next, we looked for the cellular correlates of ripple features by comparing single-cell firing and the spectral indices of nearby field events. We found a steep correlation between the fast ripple index and the firing rate of single cells (**Figure 2E**; **Figures S3A** and **S3B**). This single-cell/ripple correlation was also evident in $n = 3$ cells recorded together with an additional tungsten wire at a distance of 150–400 μm (**Figures S3C** and **S3D**; see **STAR Methods**), suggesting that it reflected collective behavior of

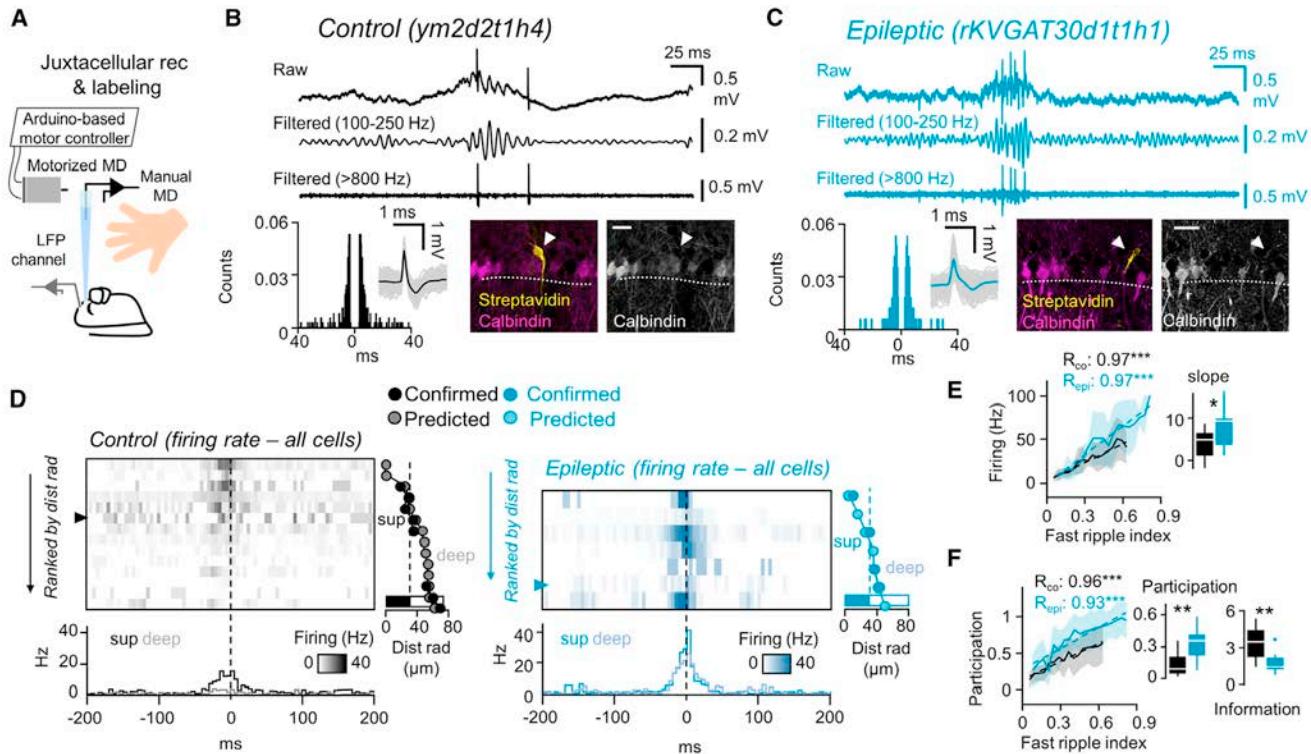


Figure 2. Juxtacellular Single-Cell Recordings during Sharp-Wave Ripples in Normal and Epileptic Rats

- (A) Juxtacellular recordings were obtained in freely moving rats with either manual or motorized microdrives.
- (B) Top: example of a CA1 pyramidal cell recorded from a control rat with the motorized microdrive. Ripples and action potentials can be separated by filtering raw LFP signals. Bottom: firing autocorrelogram, action potential waveform, and histological verification of the cell (filled with Neurobiotin, revealed with streptavidin). The deep-superficial location was evaluated with calbindin immunostaining. Scale bar: 25 μ m, 1 optical section.
- (C) Same for a CA1 pyramidal cell recorded in an epileptic rat with the manual microdrive.
- (D) Left: mean peri-event firing rate histograms (5 ms bin) from all cells recorded juxtacellularly ranked by their distance to radiatum (n = 14; left), as predicted based in the subset of histologically verified cells (n = 8; Figure S2D). Bottom plot shows grand average firing rate data from deep and superficial cells separately. The cell shown in (B) is indicated by an arrowhead. Right: same for all epileptic cells recorded (n = 7 cells; n = 4 histologically confirmed).
- (E) Single-cell firing positively correlated with the fast ripple index of sharp-wave events (n = 14 control cells and n = 7 epileptic cells). The correlation slope was significantly steeper in epileptic rats. *p < 0.05.
- (F) Relationship between the probability of single-cell participation and the fast ripple index in the same dataset. Group differences of participation and information content are shown at right. **p < 0.001.

neighboring neurons. Single-cell participation was higher for sharp-wave ripples with faster spectral components, especially in epileptic rats (Figure 2F). In information theory, the probability of participation P is related to the information content as $-\log(P)$. Thus, higher participation resulted in less information content of single cells during sharp-wave ripples in epileptic rats (Figure 2F, right).

Altogether, these results suggest that extracellular ripple features are good proxy for microcircuit firing dynamics. When sharp-wave ripple frequency spectrum is most disorganized, single-cell firing is least selective. Cells that participate indiscriminately in more events have the least information content. In normal animals, this may occur exceptionally while in epileptic rats is rather the norm (see events indicated in Figure 1D for instance). These data provide further evidence that cognitive behavior and sharp-wave ripple spectral content are linked, possibly through common cellular or synaptic processes involved in memory consolidation.

Selective Single-Cell Reactivation during Sharp-Wave Ripples Is Impaired in Epileptic Rats

How can single cells fire selectively during some events? A major role of sharp-wave ripples is reactivation of single cells with specific neuronal ensembles. Presumably, different ensembles consist of unique groups of neurons, which may generate specific LFP events (Bazérot et al., 2016). In order to capture this specificity, we made an unsupervised classification of different sharp-wave ripple fields to test firing selectivity of pyramidal cells recorded juxtacellularly.

All ripple events recorded in a given session were grouped into self-organizing maps (SOMs) according to their topological similarities in a multi-dimensional parameter space (Kohonen 2001; Reichinnek et al., 2010; Figure S4A). The first ten principal components of each ripple were used for SOM clustering independent of spectral indices (STAR Methods). For this analysis, we chose juxtacellularly recorded cells with at least 50 sharp-wave ripples during a recording session (n = 8 control, n = 5 epileptic).

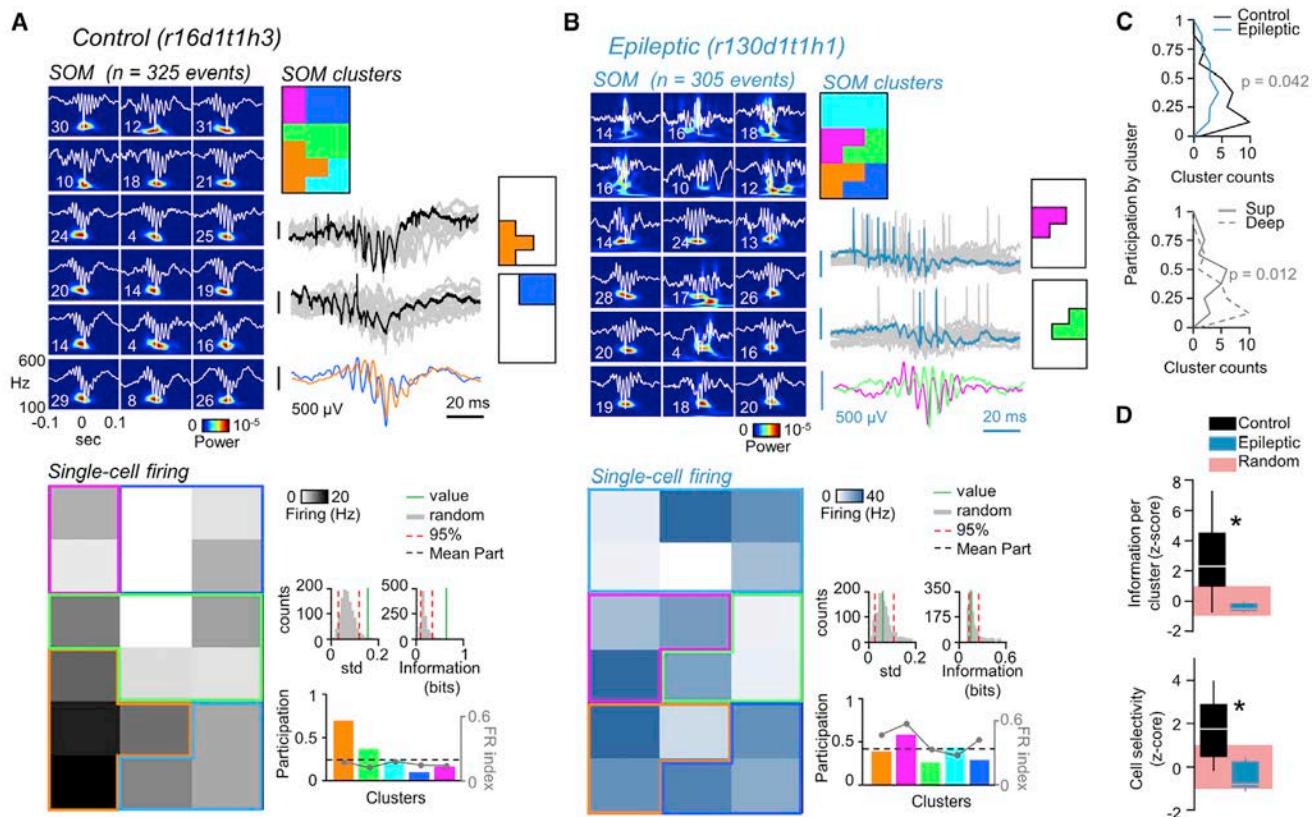


Figure 3. Selective Participation of Single Cells during Sharp-Wave Ripples

(A) Self-organizing maps (SOM) of all sharp-wave ripples in a given recording session. The average SPW-ripple waveform and the number of events contributing to each group are shown in white over the average time-frequency spectrum. Firing rate of the recorded cell is shown below in gray scale. To evaluate single-cell participation, we identified clusters in the SOM matrix (color-coded inset matrix at right) according to the topological similarities between groups (Figure S4D). Raw data of sharp-wave ripple events and single-cell firing are shown for two SOM clusters (see orange and blue clusters). The mean trace ripple waveform per cluster is shown below. Single-cell participation of each SOM cluster was tested against random permutations. Control cells show firing preference for some clusters (see orange cluster in this example). Note the similar mean fast ripple indices per clusters.

(B) Same as in (A) for a representative example in epileptic rats.

(C) Probability distribution histograms of single-cell participation per cluster of sharp-wave ripples as a function of cell location and group. For these plots data from all SOM clusters were pooled according to group (independent on deep-superficial location) or by location (independent on groups). p values represent general effects of repeated-measures ANOVA (26 SOM clusters in control, 19 clusters in epileptic).

(D) Group difference of information content and cell selectivity from all juxtacellularly recorded cells meeting criteria for SOM analysis (n = 8 control, n = 5 epileptic). *p < 0.05.

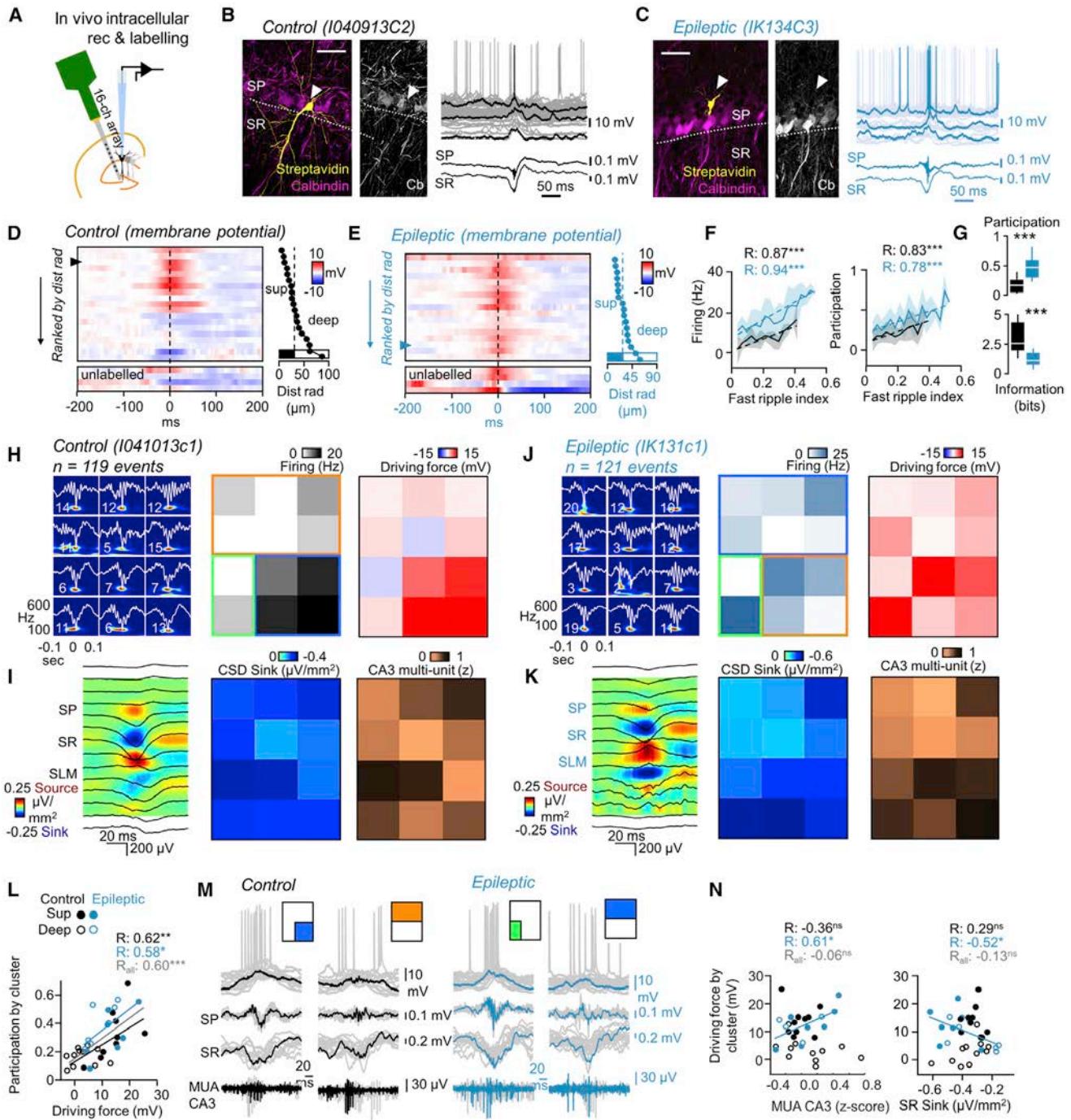
Similar numbers of events from control and epileptic rats (Figure S4B) yielded SOMs with similar features (Figure S4C).

Consistent with a high information content, CA1 pyramidal cells from normal rats fired selectively during some sharp-wave ripples grouped by SOM (Figure 3A), as previously reported *in vitro* (Reichinnek et al., 2010) and *in vivo* (Taxidis et al., 2015). In the SOM matrix, each element represents events clustered together from the 10-dimensional parameter space. We evaluated single-cell participation by identifying clusters in the SOM matrix sharing topological similarities (Figure S4D) and found firing preferences above expected coincidences (color blocks in Figure 3A, 1,000 permutations and binomial tests). This firing selectivity within SOM clusters validates that the method is able to capture some essential aspects of the neurophysiological system dynamics (Reichinnek et al., 2010; Taxidis et al., 2015).

Strikingly, cells from epileptic rats fired within different SOM clusters (Figure 3B). Both the experimental group and deep-superficial location strongly determined single-cell participation per SOM cluster (Figure 3C; group: $F(1,41) = 4.27$, $p = 0.042$; location: $F(1,41) = 6.8$, $p = 0.012$; no interaction; 26 SOM clusters in control, 19 clusters in epileptic). When tested against chance distribution across clusters, information content of epileptic cells was random and lower than for control cells ($p = 0.025$; Figure 3D). A measure of selectivity, defined from the standard deviation of cell participation by clusters, was lower in epileptic rats ($p = 0.014$; Figure 3D).

Discriminatory Synaptic Mechanisms for Selective Single-Cell Firing

What are the mechanisms for firing selectivity? We targeted the synaptic mechanisms intracellularly using simultaneous sharp

**Figure 4. Intracellular Synaptic Driving Forces Associated to Sharp-Wave Ripples**

- (A) CA1 pyramidal cells were intracellularly impaled simultaneously to 16-channel recording in rats anesthetized with urethane.
- (B) CA1 pyramidal cell recorded intracellularly at different membrane potentials during sharp-wave ripples in a control rat. Scale bar: 50 μ m, 32 μ m optical sections, 67 μ m.
- (C) Same for a CA1 pyramidal cell recorded in an epileptic rat. Scale bar: 50 μ m, 1 optical section.
- (D) Average membrane potential responses during all sharp-wave ripples recorded in control cells, as ranked according to their distance to radiatum ($n = 19$ histologically confirmed, right). Unlabeled cells are shown at bottom ($n = 4$).
- (E) Same for all cells recorded in epileptic rats ($n = 17$ histologically confirmed, $n = 4$ unlabeled).
- (F) Relationship between the firing rate (and cell participation) and the ripple spectral index in cells with more than 10 events at resting membrane potential (12 control, 12 epileptic). The r value of a significant Pearson correlation is indicated. *** $p < 0.0001$.
- (G) Mean \pm SD group data of single-cell participation and information content. *** $p < 0.0001$.

(legend continued on next page)

and 16-channel silicon probe recordings in urethane-anesthetized rats (Figure 4A). Sharp-wave ripples recorded under this condition showed similar spectral differences between groups as described in freely moving animals (Figure S5A). CA1 pyramidal cells were impaled and labeled in normal ($n = 23$ cells; 19 histologically confirmed as 8 deep and 11 superficial; 4 unlabeled cells; Figure 4B) and epileptic rats ($n = 21$; 8 deep, 9 superficial; 4 unlabeled cells; Figure 4C).

Single-cell firing during sharp-wave ripples was measured from the resting membrane potential, which was similar between groups ($p = 0.927$) and in deep-superficial locations ($p = 0.214$; no interaction). Subthreshold responses were evaluated also at this potential (Figures 4D and 4E). As for juxtacellular data, the ripple spectral index was significantly correlated with single-cell firing and participation in population events (Figure 4F), with group differences for participation and information content (Figure 4G; Figure S5B). Passive membrane properties, such as the input resistance, membrane decay, and capacitance, did not account for differences between groups (Figure S5C; left). Furthermore, differences in intrinsic neuronal firing did not explain this effect (Figure S5C, right). These data suggest that synaptic mechanisms may contribute to the higher participation of CA1 pyramidal cells during sharp waves in epileptic rats.

To evaluate synaptic mechanisms, we estimated the dominant synaptic drive for different SOM clusters of sharp-wave ripples under urethane. SOM clustering in this condition showed similar differences of firing selectivity as from juxtacellular recordings in freely moving animals ($n = 7$ control, $n = 5$ epileptic with more than 50 events; Figures 4H and 4J; Figures S5D and S5E). For each SOM cluster, subthreshold responses at the sharp-wave peak were measured at different membrane potentials to define the dominant synaptic drive (21 clusters control, 15 clusters epileptic). We noted that the SOM-related driving force matrix showed a remarkable correspondence with the firing rate matrix in both groups (2D correlation, control: $r = 0.71 \pm 0.06$; epileptic: $r = 0.81 \pm 0.16$; Figures 4H and 4J). Thus, single-cell participation by SOM clusters correlated with the driving force both in control and epileptic rats (Figure 4L). The more depolarized the drive, the more likely the cell fired for events in a given cluster (Figure 4M).

To check whether participation was determined by cell-specific or population factors, we estimated current-source density signals and built SOM-related matrices for the sharp-wave-associated sink at the stratum radiatum (Figures 4I and 4K, blue matrices). We also included mean firing rate data from multi-unit activity (MUA) at CA3 whenever available (Figures 4I and 4K, brown matrices; 7 control, 5 epileptic), which was skewed to high-frequency firing in epileptic versus control rats ($p = 0.004$). In control rats, the driving force estimated by SOM cluster was poorly correlated with the stratum radiatum sink and with MUA in CA3 (Figure 4N, black; see Figure S5G for the

extracellular source). Correlation was not found for deep and superficial cells separately, in spite of some covariation between depolarizing responses and current sinks in superficial cells across individual events (Valero et al., 2015). In stark contrast, the intracellular driving force in epileptic cells correlated with the sharp-wave-associated sink and CA3 MUA (Figure 4N, blue) by cluster, suggesting that global factors act to collapse neuronal firing in the epileptic context.

Global and Cell-Specific Mechanisms of Firing Selectivity during Sharp-Wave Ripples

The data above suggest that generalized network activity compete with cell-specific influences to adjust selection of single CA1 pyramidal cells during sharp-wave ripples. We pursue this question using the Borg-Graham method (Borg-Graham, 2001) to estimate conductance changes and the time course of the composite reversal potential associated to sharp-wave ripples classified by SOM. Excitatory and inhibitory influences were inferred from the sign of the summed synaptic current (STAR Methods; Menéndez de la Prida and Gal, 2004).

In agreement with driving force data above, SOM clusters with the higher participation exhibited more depolarization (Figure 5A). The depolarizing peak was followed by hyperpolarization in the composite reversal potential, consistent with the dynamics of excitatory and inhibitory currents (arrowheads; Hulse et al., 2016; Gan et al., 2017). In epileptic rats, the hyperpolarizing component was variable in terms of amplitude and delay (Figure 5B). We estimated the net charge, the 20%–80% rise time of the excitatory component, the 63% decay time, and the E-I peak delay to search for links with single-cell participation in SOM clusters (Figure 5C; STAR Methods). We also analyzed whether the timing of pyramidal cell firing was modulated across the ripple phase or over the course of the sharp-wave phase (early versus late firing; Figure 5D).

Global and cell-specific correlations of these parameters are shown in Figure 5E, which represents r and p values from a Pearson correlation between all combinations. In control rats, single-cell participation was related to the driving force and not to the sharp-wave sink or CA3 firing (Figure 5E). The 63% decay of membrane response correlated with the E-I delay, consistent with inhibition controlling the amount of depolarization (English et al., 2014). In epileptic rats this regulation was absent, and the driving force at the sharp-wave peak was under the CA3 influence (Figure 5E, arrowheads). The timing of CA1 pyramidal cell firing during sharp-waves was dependent on cluster participation in epileptic but not in control cells (Figure 5D, right), reinforcing our conclusion that generalized network activity in these rats impairs selectivity.

Different covariations between global (sharp-wave sink) and cell-specific variables (driving force) extrapolated along sharp-wave ripples from all cells in the entire dataset, independent on

(H) SOM and firing rate per SOM cluster (color coded) as well as the SOM-related driving force matrices from a representative control cell.

(I) SOM-related matrices of the average current-source density (CSD) SR sink and CA3 multi-unit activity (MUA).

(J and K) Same as in (H) and (I) for an epileptic example.

(L) Single-cell participation correlated with the average driving force for both control and epileptic rats. Open circles identify deep pyramidal cells. Data from all clusters in cells meeting criteria for SOM analysis (21 clusters, $n = 7$ control; 15 clusters, $n = 5$ epileptic).

(M) Examples of sharp-wave ripples and intracellular responses of SOM clusters shown above, as identified by their color code.

(N) Correlation between the intracellular driving force and CA3 pre-synaptic (MUA) and post-synaptic (SR sink) activity in epileptic but not in control rats.

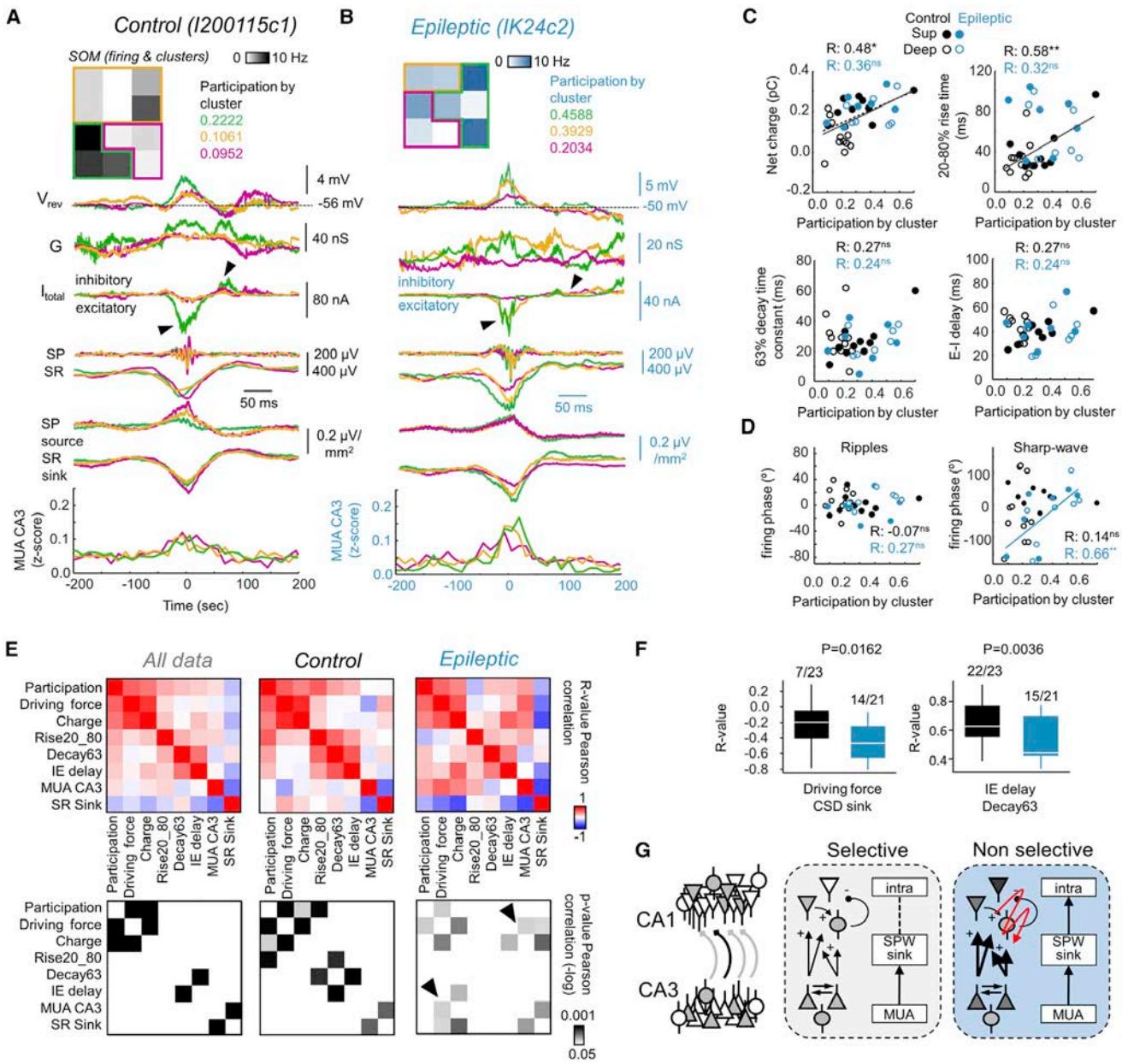


Figure 5. Global and Cell-Specific Determinants of Firing Selectivity

- (A) Data from a representative control cell showing the firing rate per SOM cluster (color-coded) and the mean traces of the sharp-wave-associated composite reversal potential (V_{rev}), conductance (G) and total synaptic current, together with LFP, CSD, and MUA (30 ms bin size) signals.
- (B) Same as in (A) for a representative example of an epileptic cell.
- (C) Determinants of sharp-wave-associated membrane potential responses. Data from all clusters in cells meeting criteria for SOM analysis (21 clusters, n = 7 control; 15 clusters, n = 5 epileptic). The r value of a Pearson correlation is shown for control and epileptic data separately. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; n.s., not significant.
- (D) Phase firing preference during ripples and sharp-wave as a function of SOM clusters. In epileptic rats, firing preference along the sharp-wave phase correlates with participation.
- (E) Statistical covariations (r and p values of Pearson correlation) between variables along SOM clusters. In control rats, the rise time of depolarization correlates with both the charge and driving force. Note the absence of interaction between the presynaptic CA3 MUA and CA1 CSD sink at SR with intracellular variables in control but not in epileptic rats (arrowheads).
- (F) Covariations between global (CSD sink) and cell-specific variables (driving force) along all sharp-wave ripples in a given cell independently of their SOM classification. Covariation between the I-E delay and 63% decay time dynamics is shown at right. Data from all cells in the dataset, n = 23 control and n = 21 epileptic cells. Values indicate the number of cells with significant correlation over the total number of cells tested.
- (G) Schematic representation of the mechanisms governing single-cell selection during sharp-wave ripples.

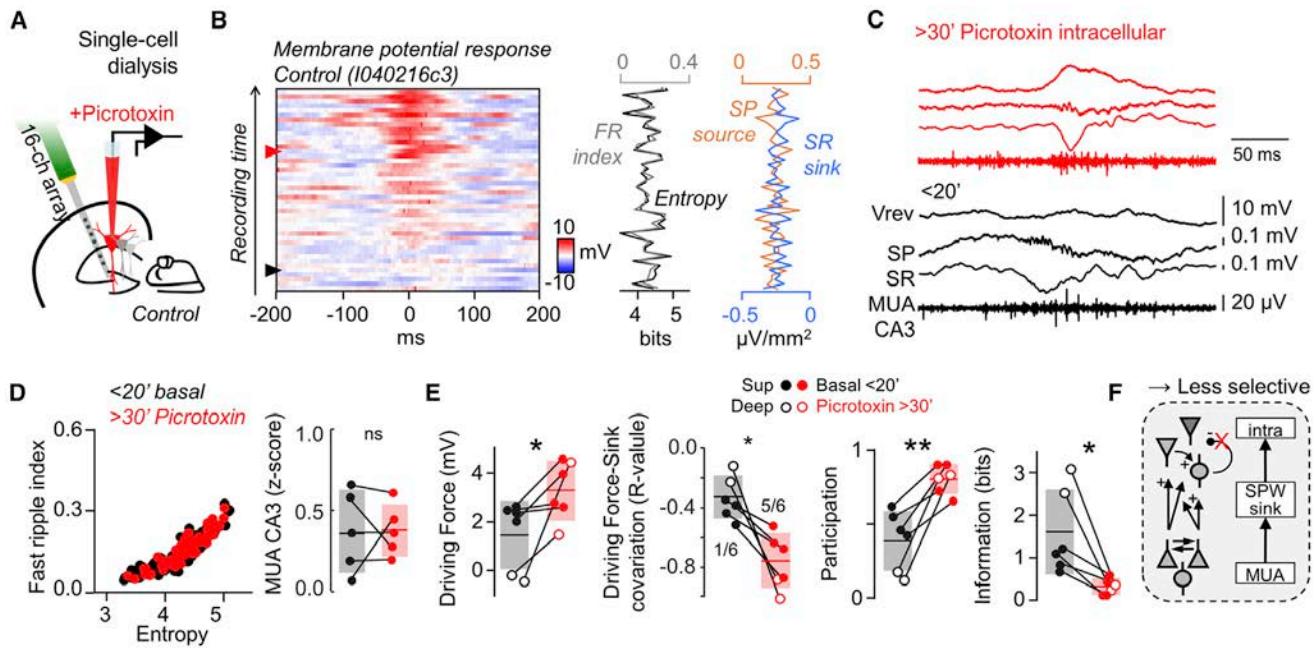


Figure 6. Pharmacological Modulation of Single-Cell Firing during Sharp-Wave Ripples

- (A) Single pyramidal cells from control rats were intracellularly dialyzed with picrotoxin (1 mM) to interfere with the excitatory/inhibitory balance.
- (B) Representative example of the evolution of sharp-wave-associated membrane potential responses during dialysis of picrotoxin through the recording pipette. Note the stability of ripple spectral indices and sharp-wave sink sources (right).
- (C) Sharp-wave ripples and intracellular responses of the cell shown in (B) at two time points along recording (arrowheads in B).
- (D) Relationship between the entropy and fast ripple index before and after dialysis with picrotoxin (data from all events in $n = 6$ rats). Note the similar CA3 MUA during CA1 sharp-wave ripples before and after picrotoxin (data from $n = 5$ rats with CA3 recordings).
- (E) Changes caused by intracellular picrotoxin ($n = 6$ control cells; 2 deep, 4 superficial). * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$.
- (F) Schematic representation of the mechanistic effect of picrotoxin that makes CA1 pyramidal cells less selective during sharp-wave ripples.

their SOM classification (Figure 5F). Only a minority of cells from control rats (7/23) showed some correlation between the driving force and population sink. Interestingly, 4 out of the 7 control cells were superficial, consistent with our previous reports (Valero et al., 2015). In contrast, most cells (14/21) from epileptic animals were correlated ($p = 0.0162$; Figure 5F, left). Almost all control cells (22/23) exhibited stronger correlation between the response decay and E-I delay, consistent with inhibitory currents curtailing membrane depolarization (Figure 5F, right). Fewer cells in epileptic rats showed correlation (15/21), which was lower than control ($p = 0.0363$), suggesting inhibitory function may be compromised in TLE (Cossart et al., 2001; Peng et al., 2013; Lopez-Pigozzi et al., 2016).

Altogether, our data suggest that global and cell-specific mechanisms compete to determine firing selectivity during sharp-wave ripples. During sharp waves initiated by CA3 pyramidal cell firing, inhibition decouples global influences from CA3 MUA and the sharp-wave sink so that CA1 pyramidal cell firing is more selective (Figure 5G; gray box). This mechanism collapses in epileptic rats to exacerbate and randomize neuronal firing making single-cell participation less selective (Figure 5G; blue box). Since global influences dominate CA1 collective output, the extracellular features of ripples, such as the entropy and fast ripple index, reflect these alterations in epileptic animals (Figure S5H).

Manipulation of Cell-Specific Synaptic Drives Influences Firing Selectivity

Our data suggest that selective firing of single CA1 pyramidal cells during sharp-wave ripples depends on a cell-specific dominant synaptic drive, which may reflect differences between SOM ensembles. We thus reasoned that altering the excitatory/inhibitory ratio in single neurons of control animals might then couple a cell more strongly to global influences, thus changing its firing selectivity and participation during events. We tested this idea with intracellular dialysis of picrotoxin (1 mM) in control cells, which affects the excitatory/inhibitory balance (Inomata et al., 1988; but see Atherton et al., 2016; Figure 6A).

Consistent with the role of inhibition in shaping single-cell selectivity, we found that participation of single cells during sharp-wave ripples changed over the course of dialysis with picrotoxin (Figure 6B, $n = 6$ cells: 2 deep, 4 superficial; similar resting membrane potential). Intracellular responses after 30 min differed significantly from those over the first 20 min (Figure 6C), with no changes in the ripple spectral features nor the associated sink and CA3 MUA (Figures 6B and 6D). The cell-driving force depolarized at the sharp-wave peak and coupling to the sharp-wave sink was enhanced (Figure 6E). Single-cell participation of sharp-wave ripples became nonspecific with a loss of information content, as in epileptic cells (Figure 6E). This effect occluded differences between deep and superficial

cells. Intrinsic properties were not affected, except for the maximal firing rate to current pulses (Figure S6A).

This experiment further supports our conclusion that a balance between excitatory and inhibitory synaptic inputs controls the selective firing of CA1 pyramidal cells during sharp-wave ripples (Figure 6F).

Acute Administration of Use-Dependent Sodium Blockers Improves Firing Selectivity and Memory Function in Epileptic Rats

Can selective pyramidal cell firing be restored in the epileptic hippocampus? We asked whether we could allow some selectivity to emerge by reducing the excitatory drive in epileptic rats. We chose the use-dependent sodium blocker carbamazepine (CBZ) to reduce excessive pyramidal cell firing while sparing inhibitory circuits (Pothmann et al., 2014; Figure 7A). Since CBZ would decrease high-frequency firing only (McLean and Macdonald, 1986; Pothmann et al., 2014), we reasoned that it should act by controlling excessive firing in presynaptic CA3 pyramidal cells contributing to nonspecific depolarizing drives and possibly in the CA1 output as well.

CBZ (10–20 mg/kg) changed both the spectral features of sharp-wave ripples and their intracellular correlates in epileptic rats (Figure 7B; n = 4 cells: 1 deep, 3 superficial). Cells became slightly less depolarized during events (Figure 7C) and ripples more organized 20 min after i.p. injection (Figure 7D, left). CA3 MUA during sharp-wave ripples decreased (Figure 7D, right). Intracellularly, the mean depolarized driving force tended to decrease and reduced correlation with the sharp-wave sink (Figure 7E). Single-cell firing became more selective during events (Figure 7E). Intrinsic properties were not affected by CBZ, with the exception of the maximal firing rate in response to a large current pulse (Figure S6B; Pothmann et al., 2014). Thus, by reducing excessive pyramidal cell firing during sharp-wave ripples, we have allowed hippocampal microcircuits to regain some selectivity during sharp-wave ripples in epileptic rats (Figure 7F). Does it have a functional impact?

We searched for cognitive effects of CBZ (10 mg/kg) in the OR task with 100 min interval (n = 9 epileptic rats; Figure 7G). We found improved discrimination of the displaced object in animals treated with CBZ after the sample phase of the task versus the same animals treated with vehicle in a separate session (Figure 7G; p = 0.0243 paired t test). There was no change in the total exploratory time to objects or any other behavior, excluding nonspecific factors (Figure S6C). Four of these epileptic rats were implanted with silicon probes to permit evaluation of electrophysiological indices including the spectral indices of offline ripples, power, and coherence of exploratory theta and theta-gamma modulation. Only the ripple spectral features were affected by CBZ (Figure S6D) and memory performance was exclusively correlated with the fast ripple index (Figures 7H and 7I). GLM analysis showed a dominant effect of the fast ripple index on the discrimination ability of CBZ-treated epileptic rats (p = 0.0145).

DISCUSSION

We have shown that firing selectivity of CA1 pyramidal cells during sharp-wave ripples can be explained by event- and

cell-specific synaptic drives. While a dominant drive for all events prevailed in each control cell examined, individual differences were unmasked after unsupervised clustering of sharp-wave ripples in self-organizing maps. Remarkably, in control rats the intracellular synaptic signal correlates neither with pre-synaptic CA3 firing nor with an associated extracellular sink at the stratum radiatum, consistent with the cell being predominantly activated by specific ensembles. Quite in contrast, sharp-wave ripples in epileptic rats collapse CA1 pyramidal cell firing by a non-specific population drive. Differences are reflected in ripple spectral features such as the fast ripple index, which correlates with the animal's ability to recall displaced objects seen in a recognition task 100 min before. Thus, our data suggest that selective offline reactivation of single cells during sharp-wave ripples is determined by dedicated microcircuits exerting cell-specific excitatory/inhibitory influences.

The cognitive role of sharp-wave ripples was hypothesized to rely on their ability to reactivate neuronal ensembles offline (Buzsáki, 1989). More recent work shows that this reactivation is highly specific (Nádasdy et al., 1999; Foster and Wilson, 2006; Karlsson and Frank, 2008; Gupta et al., 2010), mostly engaging cognitively relevant ensembles (Wilson and McNaughton, 1994; Harris et al., 2003; Pfeiffer and Foster, 2013). Artificial triggering of sharp-wave ripples activates similar ensembles to those emerging naturally during exploratory theta and offline ripples (Stark et al., 2015). Some of these neuronal sequences may depend on external cues (e.g., spatial fields; Wilson and McNaughton, 1994; Foster and Wilson, 2006), while others presumably reflect the internal dynamics (e.g., time cells; Pastalkova et al., 2008). These two entities react differentially to external manipulations (Wang et al., 2016). Possibly, several cell-type-specific ensembles coexist and code for different aspects of experience (Wu and Foster, 2014; van de Ven et al., 2016; Wang et al., 2016). Such a degree of selectivity should be determined by dedicated synaptic drives recruiting CA1 pyramidal cells to fire. This idea is consistent with recent reports of sparse structured connectivity motifs between and within hippocampal regions underlying the formation of small neuronal groups (Druckmann et al., 2014; Bazelet et al., 2016; Guzman et al., 2016). Our data confirm this view and show that single-cell selection is controlled synaptically in a cell-specific manner across different sharp-wave ripple events.

Neuronal ensembles activated specifically should generate a unique LFP signature, dependent in part on local interneurons (Aivar et al., 2014; Bazelet et al., 2016). We searched for such signatures with unsupervised clustering strategies (Reichinnek et al., 2010; Taxidis et al., 2015). Strikingly, SOM classification of ripples with no a priori model identified clusters of events to which single cells preferentially engage, consistent with orthogonal assembly reactivation (Malvache et al., 2016). While the number and nature of separable ripple patterns may be discussed (Ramirez-Villegas et al., 2015), storage capacity in hippocampal networks is presumably limited by activity level, sparseness, network structure, and plasticity rules (Treves and Rolls, 1994). As previous in vitro work (Reichinnek et al., 2010), our data suggest that a single CA1 pyramidal cell may fire with ensembles/events that are topologically close in Kohonen

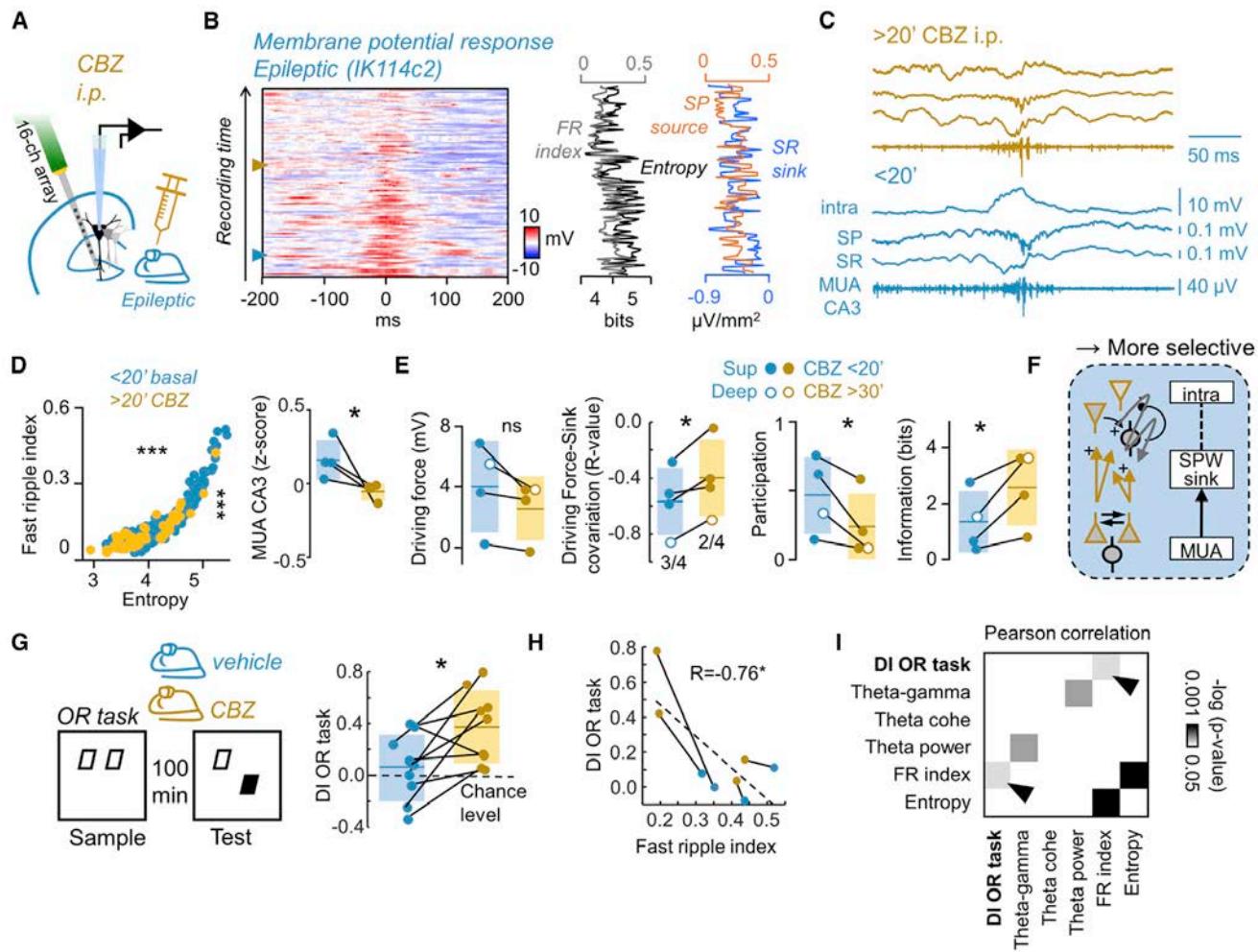


Figure 7. Effect of Carbamazepine on Firing Selectivity, Sharp-Wave Ripples and Memory Function in Epileptic Rats

(A) The use-dependent sodium blocker carbamazepine (CBZ, 10–20 mg/kg) was i.p. injected in anesthetized epileptic rats while recording single cells and LFP.

(B) Representative example showing changes of the pathological sharp-wave-associated intracellular response and spectral indices along time after CBZ.

(C) Sharp-wave ripples and intracellular responses of the cell shown in (B) at two different time points (arrowheads in B).

(D) Relationship between the fast ripple index and the entropy before and after acute administration of CBZ. CBZ reduced CA3 MUA significantly. *p < 0.05; **p < 0.0001 (data from all events from n = 4 rats).

(E) Changes caused by a systemic injection of CBZ. *p < 0.05. ns, not significant in CA1 pyramidal cells (1 deep, 3 superficial).

(F) Schematic representation of the mechanistic effect of CBZ.

(G) The cognitive effect of an acute administration of 10 mg/kg CBZ in behaving epileptic rats was evaluated with the OR task at 100 min inter-trial (n = 9 rats). Group and individual data of discrimination indices (DI) in vehicle versus CBZ are shown at right. *p < 0.05, paired two-tailed.

(H) Correlation between the fast ripple index and animal performance in vehicle versus CBZ. Individual data points from the same rat in two conditions are paired. The r value of a Pearson correlation is shown, *p < 0.05. Data from n = 4 rats implanted with 16-channel silicon probes.

(I) p value (-log) of the correlation between animal's performance and different electrophysiological indices.

maps (Kohonen, 2001). SOM analysis relies on the ability to cluster data in low-dimensional space according to high-dimensional features. For instance, SOM applied to visual cortical networks could capture the neuronal organization of orientation and selectivity maps (Obermayer and Blasdel, 1993; Shouno and Kurata, 2001). Applied to our intracellular recordings during hippocampal ripples, it suggests that ensemble-specific imbalance between excitation and inhibition might limit single-cell participation in some clusters. This is consistent with a mixed

excitatory and inhibitory synaptic control of neuronal output during ripple events (Ylinen et al., 1995; English et al., 2014; Valero et al., 2015). In normal rats, CA1 pyramidal cells do not obey to global inputs reliably (e.g., Schaffer collaterals) due to differences in the dominant drive during sharp-wave ripples grouped by SOM. Previously, we noted that membrane responses across individual events tend to better correlate with the stratum radium sink in superficial than in deep cells (Valero et al., 2015). When sharp-wave ripples were grouped by SOM, such a deep-

superficial distinction was not supported. Possibly, additional mechanisms can refine firing selectivity further, given the different flexibility of deep and superficial CA1 pyramidal cells to cope with processing demands (Danielson et al., 2016; Geiller et al., 2017).

Our data reveal a different situation in epileptic rats: CA1 pyramidal cells fire randomly even in topologically distant sharp-wave ripple events. Yet, some firing bias could be detected, suggesting other possible topological associations between fast ripple events. This is consistent with a reorganized synaptic connectivity in the sclerotic hippocampus, which acts to merge multiple ensembles (Tyler et al., 2012; Feldt Muldoon et al., 2013). Underlying causes may include changes in excitability (Su et al., 2002; Bernard et al., 2004), synaptic efficacy (Artinian et al., 2015) and the functional operation of GABAergic circuits (Cossart et al., 2001; Peng et al., 2013; Karlócai et al., 2014; Takács et al., 2015; Lopez-Pigozzi et al., 2016). In the disinhibited hippocampus, for instance, single CA3 pyramidal cells can initiate population activities accompanied by pathological fast ripples (de la Prida et al., 2006). Instead, when fast inhibition is operative, single CA3 pyramidal cells trigger sequences of interneuron firing that shape sharp-wave ripples and restrain population activity (Hájós et al. 2013; Schlingloff et al., 2014; Bazelot et al., 2016). Thus, epileptic cells not only participate less selectively, but also fire more during pathological sharp-wave ripples as they receive depolarizing drives indiscriminately from different ensembles. This randomization of CA1 pyramidal cell participation due to indistinct synaptic drives presumably reduces the information capacity of the network.

Fast ripple index and entropy characterize the spectral features of ripple events (Ibarz et al., 2010; Alvarado-Rojas et al., 2015). These indices are good mesoscopic proxies of population activity (Ibarz et al., 2010). They consistently signal nonspecific out-of-phase pyramidal cell firing during pathological sharp-wave ripples (Foffani et al., 2007; Fink et al., 2015; Menéndez de la Prida et al., 2015). We show here that these indices correlate well with the animal's ability to discriminate a displaced object seen 100 min before. While this sole correlation may not prove causation, altogether our data suggest that spectrally disorganized fast ripples reflect a massive, nonspecific reactivation of CA1 pyramidal cell firing. This idea was tested using carbamazepine to reduce excessive high-frequency pyramidal cell firing while sparing inhibitory networks (Pothmann et al., 2014). This manipulation sufficed to reestablish some level of selectivity and to improve memory recall in epileptic animals. This is consistent with the hypothesis that ensemble firing gain and selectivity during ripples exert a critical control over cognitive function.

Deficits of memory consolidation have been associated with altered sharp-wave ripples and reactivation patterns in animal models, from normal and abnormal aging to neuropsychiatric disorders (Kanak et al., 2013; Suh et al., 2013; Wiegand et al., 2016). Selective reactivation of oscillations in neuronal ensembles, either hardwired or emergent after experience, is a major feature of the nervous system (Stark et al., 2015). We propose that an appropriate regulation of global and cell-specific network activity is critical for hippocampal memory function.

STAR METHODS

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- KEY RESOURCES TABLE
- CONTACT FOR REAGENT AND RESOURCE SHARING
- EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS
 - TLE model
- METHODS DETAILS
 - Silicon probe recordings in freely moving rats
 - Object recognition tasks and behavioral analysis
 - Single-cell juxtacellular recording and labeling
 - In vivo electrophysiology under urethane anesthesia
 - Tissue processing and immunohistochemistry
 - Spectral analysis of LFP signals
 - Analysis of juxtacellular recordings
 - Self-organizing maps (SOMs) of sharp-wave ripples
 - Analysis of intracellular recordings
- QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS
- DATA AND SOFTWARE AVAILABILITY

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes six figures and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2017.05.032>.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

L.M.P. and M.V. designed the study. R.G.A. and G.T. designed and optimized the manual microdrive for juxtacellular recordings and performed part of juxtacellular recordings. M.V., R.G.A., I.F.-L., J.A., D.L.-P., J.R.B.-M., and E.C. obtained data. M.V. and L.M.P. analyzed and interpreted the data. L.M.P. wrote the paper.

ACKNOWLEDGMENTS

Supported by grants from the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) to L.M.P. (BFU2012-37156-C03-01 and BFU2015-66887-R). M.V. was supported by a PhD fellowship from the Spanish Ministry of Education, Culture and Sports (FPU12/03776). R.G.A. and G.T. were supported by the ERC Interimpact project, the Hungarian Academy of Sciences, the Hungarian National Office for Research and Technology GINOP-2.3.2-15-2016-00018, and by the National Brain Research Program, Hungary. We thank György Buzsáki and Michael Long for sharing the motorized microdrive design for juxtacellular recordings with us, Daniel English for training, and Jose M. Ibarz for building the Arduino-based controller. We also thank Viktor Szeményei for help with anatomical recovery and Richard Miles and Attila Gulyás for feedback and comments on the manuscript.

Received: December 8, 2016

Revised: March 15, 2017

Accepted: May 23, 2017

Published: June 21, 2017

REFERENCES

- Aivar, P., Valero, M., Bellistri, E., and Menéndez de la Prida, L. (2014). Extracellular calcium controls the expression of two different forms of ripple-like hippocampal oscillations. *J. Neurosci.* 34, 2989–3004.
- Alvarado-Rojas, C., Huberfeld, G., Baulac, M., Clemenceau, S., Charpier, S., Miles, R., de la Prida, L.M., and Le Van Quyen, M. (2015). Different

- mechanisms of ripple-like oscillations in the human epileptic subiculum. *Ann. Neurol.* 77, 281–290.
- Artinian, J., Peret, A., Mircheva, Y., Martí, G., and Crépel, V. (2015). Impaired neuronal operation through aberrant intrinsic plasticity in epilepsy. *Ann. Neurol.* 77, 592–606.
- Atherton, L.A., Burnell, E.S., and Mellor, J.R. (2016). Assessment of methods for the intracellular blockade of GABA_A receptors. *PLoS ONE* 11, e0160900.
- Averkin, R.G., Szemenyei, V., Bordé, S., and Tamás, G. (2016). Identified cellular correlates of neocortical ripple and high-gamma oscillations during spindles of natural sleep. *Neuron* 92, 916–928.
- Barker, G.R.I., and Warburton, E.C. (2011). When is the hippocampus involved in recognition memory? *J. Neurosci.* 31, 10721–10731.
- Bazélot, M., Teleríczuk, M.T., and Miles, R. (2016). Single CA3 pyramidal cells trigger sharp waves in vitro by exciting interneurons. *J. Physiol.* 594, 2565–2577.
- Bernard, C., Anderson, A., Becker, A., Poolos, N.P., Beck, H., and Johnston, D. (2004). Acquired dendritic channelopathy in temporal lobe epilepsy. *Science* 305, 532–535.
- Binder, S., Baier, P.C., Mölle, M., Inostroza, M., Born, J., and Marshall, L. (2012). Sleep enhances memory consolidation in the hippocampus-dependent object-place recognition task in rats. *Neurobiol. Learn. Mem.* 97, 213–219.
- Booth, C.A., Witton, J., Nowacki, J., Tsaneva-Atanasova, K., Jones, M.W., Randall, A.D., and Brown, J.T. (2016). Altered intrinsic pyramidal neuron properties and pathway-specific synaptic dysfunction underlie aberrant hippocampal network function in a mouse model of tauopathy. *J. Neurosci.* 36, 350–363.
- Borg-Graham, L.J. (2001). The computation of directional selectivity in the retina occurs presynaptic to the ganglion cell. *Nat. Neurosci.* 4, 176–183.
- Born, H.A., Kim, J.-Y., Savjani, R.R., Das, P., Dabaghian, Y.A., Guo, Q., Yoo, J.W., Schuler, D.R., Cirrito, J.R., Zheng, H., et al. (2014). Genetic suppression of transgenic APP rescues Hypersynchronous network activity in a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 34, 3826–3840.
- Bragin, A., Engel, J., Jr., Wilson, C.L., Fried, I., and Mather, G.W. (1999). Hippocampal and entorhinal cortex high-frequency oscillations (100–500 Hz) in human epileptic brain and in kainic acid-treated rats with chronic seizures. *Epilepsia* 40, 127–137.
- Bragin, A., Wilson, C.L., Staba, R.J., Reddick, M., Fried, I., and Engel, J., Jr. (2002). Interictal high-frequency oscillations (80–500 Hz) in the human epileptic brain: entorhinal cortex. *Ann. Neurol.* 52, 407–415.
- Buzsáki, G. (1989). Two-stage model of memory trace formation: a role for "noisy" brain states. *Neuroscience* 31, 551–570.
- Carr, M.F., Jadhav, S.P., and Frank, L.M. (2011). Hippocampal replay in the awake state: a potential substrate for memory consolidation and retrieval. *Nat. Neurosci.* 14, 147–153.
- Cossart, R., Dinocourt, C., Hirsch, J.C., Merchan-Perez, A., De Felipe, J., Ben-Ari, Y., Escalante, M., and Bernard, C. (2001). Dendritic but not somatic GABAergic inhibition is decreased in experimental epilepsy. *Nat. Neurosci.* 4, 52–62.
- Csicsvari, J., Hirase, H., Mamiya, A., and Buzsáki, G. (2000). Ensemble patterns of hippocampal CA3-CA1 neurons during sharp wave-associated population events. *Neuron* 28, 585–594.
- Danielson, N.B., Zaremba, J.D., Kaifosh, P., Bowler, J., Ladow, M., and Losonczy, A. (2016). Sublayer-Specific Coding Dynamics during Spatial Navigation and Learning in Hippocampal Area CA1. *Neuron* 91, 652–665.
- de la Prida, L.M., Huberfeld, G., Cohen, I., and Miles, R. (2006). Threshold behavior in the initiation of hippocampal population bursts. *Neuron* 49, 131–142.
- Diba, K., and Buzsáki, G. (2007). Forward and reverse hippocampal place-cell sequences during ripples. *Nat. Neurosci.* 10, 1241–1242.
- Druckmann, S., Feng, L., Lee, B., Yook, C., Zhao, T., Magee, J.C., and Kim, J. (2014). Structured synaptic connectivity between hippocampal regions. *Neuron* 81, 629–640.
- Ego-Stengel, V., and Wilson, M.A. (2009). Disruption of ripple-associated hippocampal activity during rest impairs spatial learning in the rat. *Hippocampus* 20, 1–10.
- English, D.F., Peyrache, A., Stark, E., Roux, L., Vallentin, D., Long, M.A., and Buzsáki, G. (2014). Excitation and inhibition compete to control spiking during hippocampal ripples: intracellular study in behaving mice. *J. Neurosci.* 34, 16509–16517.
- Feldt Muldoon, S., Soltesz, I., and Cossart, R. (2013). Spatially clustered neuronal assemblies comprise the microstructure of synchrony in chronically epileptic networks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 3567–3572.
- Fink, C.G., Gliske, S., Catoni, N., and Stacey, W.C. (2015). Network mechanisms generating abnormal and normal hippocampal high-frequency oscillations: a computational analysis. *eNeuro* 2, 2.
- Foffani, G., Uzcategui, Y.G., Gal, B., and Menendez de la Prida, L. (2007). Reduced spike-timing reliability correlates with the emergence of fast ripples in the rat epileptic hippocampus. *Neuron* 55, 930–941.
- Foster, D.J., and Wilson, M.A. (2006). Reverse replay of behavioural sequences in hippocampal place cells during the awake state. *Nature* 440, 680–683.
- Gan, J., Weng, S.-M., Pernía-Andrade, A.J., Csicsvari, J., and Jonas, P. (2017). Phase-locked inhibition, but not excitation, underlies hippocampal ripple oscillations in awake mice in vivo. *Neuron* 93, 308–314.
- Geiller, T., Fattah, M., Choi, J.-S., and Royer, S. (2017). Place cells are more strongly tied to landmarks in deep than in superficial CA1. *Nat. Commun.* 8, 14531.
- Girardeau, G., Benchenane, K., Wiener, S.I., Buzsáki, G., and Zugardo, M.B. (2009). Selective suppression of hippocampal ripples impairs spatial memory. *Nat. Neurosci.* 12, 1222–1223.
- Gupta, A.S., van der Meer, M.A.A., Touretzky, D.S., and Redish, A.D. (2010). Hippocampal replay is not a simple function of experience. *Neuron* 65, 695–705.
- Guzman, S.J., Schlögl, A., Frotscher, M., and Jonas, P. (2016). Synaptic mechanisms of pattern completion in the hippocampal CA3 network. *Science* 353, 1117–1123.
- Hájos, N., Karlócai, M.R., Németh, B., Ulbert, I., Monyer, H., Szabó, G., Erdélyi, F., Freund, T.F., and Gulyás, A.I. (2013). Input-output features of anatomically identified CA3 neurons during hippocampal sharp wave/ripple oscillation in vitro. *J. Neurosci.* 33, 11677–11691.
- Harris, K.D., Csicsvari, J., Hirase, H., Dragoi, G., and Buzsáki, G. (2003). Organization of cell assemblies in the hippocampus. *Nature* 424, 552–556.
- Hulse, B.K., Moreaux, L.C., Lubenov, E.V., and Siapas, A.G. (2016). Membrane potential dynamics of CA1 pyramidal neurons during hippocampal ripples in awake mice. *Neuron* 89, 800–813.
- Ibarz, J.M., Foffani, G., Cid, E., Inostroza, M., and Menendez de la Prida, L. (2010). Emergent dynamics of fast ripples in the epileptic hippocampus. *J. Neurosci.* 30, 16249–16261.
- Inomata, N., Tokutomi, N., Oyama, Y., and Akaike, N. (1988). Intracellular picrotoxin blocks pentobarbital-gated Cl⁻ conductance. *Neurosci. Res.* 6, 72–75.
- Inostroza, M., Brotons-Mas, J.R., Laurent, F., Cid, E., and de la Prida, L.M. (2013). Specific impairment of "what-where-when" episodic-like memory in experimental models of temporal lobe epilepsy. *J. Neurosci.* 33, 17749–17762.
- Kanak, D.J., Rose, G.M., Zaveri, H.P., and Patrylo, P.R. (2013). Altered network timing in the CA3-CA1 circuit of hippocampal slices from aged mice. *PLoS ONE* 8, e61364.
- Karlócai, M.R., Kohus, Z., Káli, S., Ulbert, I., Szabó, G., Máté, Z., Freund, T.F., and Gulyás, A.I. (2014). Physiological sharp wave-ripples and interictal events in vitro: what's the difference? *Brain* 137, 463–485.
- Karlsson, M.P., and Frank, L.M. (2008). Network dynamics underlying the formation of sparse, informative representations in the hippocampus. *J. Neurosci.* 28, 14271–14281.
- Kohonen, T. (2001). Self-Organizing Maps (Springer Berlin Heidelberg).
- Korshunov, V.A. (1995). Miniature microdrive for extracellular recording of neuronal activity in freely moving animals. *J. Neurosci. Methods* 57, 77–80.
- Kovács, K.A., O'Neill, J., Schoenenberger, P., Penttonen, M., Rangel Guerrero, D.K., and Csicsvari, J. (2016). Optogenetically blocking sharp wave ripple events in sleep does not interfere with the formation of stable spatial representation in the CA1 area of the hippocampus. *PLoS ONE* 11, e0164675.

- Kucewicz, M.T., Cimbalnik, J., Matsumoto, J.Y., Brinkmann, B.H., Bower, M.R., Vasoli, V., Sulc, V., Meyer, F., Marsh, W.R., Stead, S.M., and Worrell, G.A. (2014). High frequency oscillations are associated with cognitive processing in human recognition memory. *Brain* 137, 2231–2244.
- Laurent, F., Brotons-Mas, J.R., Cid, E., Lopez-Pigozzi, D., Valero, M., Gal, B., and de la Prida, L.M. (2015). Proximodistal structure of theta coordination in the dorsal hippocampus of epileptic rats. *J. Neurosci.* 35, 4760–4775.
- Lopez-Pigozzi, D., Laurent, F., Brotons-Mas, J.R., Valderrama, M., Valero, M., Fernandez-Lamo, I., Cid, E., Gomez-Dominguez, D., Gal, B., and Menendez de la Prida, L. (2016). Altered oscillatory dynamics of CA1 parvalbumin basket cells during theta-gamma rhythopathies of temporal lobe epilepsy. *eNeuro* 3, 3.
- Malvache, A., Reichinnek, S., Villette, V., Haimerl, C., and Cossart, R. (2016). Awake hippocampal reactivations project onto orthogonal neuronal assemblies. *Science* 353, 1280–1283.
- McLean, M.J., and Macdonald, R.L. (1986). Carbamazepine and 10,11-epoxy-carbamazepine produce use- and voltage-dependent limitation of rapidly firing action potentials of mouse central neurons in cell culture. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 238, 727–738.
- Menendez de la Prida, L., and Gal, B. (2004). Synaptic contributions to focal and widespread spatiotemporal dynamics in the isolated rat subiculum *in vitro*. *J. Neurosci.* 24, 5525–5536.
- Menendez de la Prida, L., Staba, R.J., and Dian, J.A. (2015). Conundrums of high-frequency oscillations (80–800 Hz) in the epileptic brain. *J. Clin. Neurophysiol.* 32, 207–219.
- Mizuseki, K., Diba, K., Pastalkova, E., and Buzsáki, G. (2011). Hippocampal CA1 pyramidal cells form functionally distinct sublayers. *Nat. Neurosci.* 14, 1174–1181.
- Nádasdy, Z., Hirase, H., Czurkó, A., Csicsvari, J., and Buzsáki, G. (1999). Replay and time compression of recurring spike sequences in the hippocampus. *J. Neurosci.* 19, 9497–9507.
- Nakashiba, T., Buhl, D.L., McHugh, T.J., and Tonegawa, S. (2009). Hippocampal CA3 output is crucial for ripple-associated reactivation and consolidation of memory. *Neuron* 62, 781–787.
- Nicole, O., Hadzibegovic, S., Gajda, J., Bontempi, B., Bem, T., and Meyrand, P. (2016). Soluble amyloid beta oligomers block the learning-induced increase in hippocampal sharp wave-ripple rate and impair spatial memory formation. *Sci. Rep.* 6, 22728.
- O'Neill, J., Senior, T., and Csicsvari, J. (2006). Place-selective firing of CA1 pyramidal cells during sharp wave/ripple network patterns in exploratory behavior. *Neuron* 49, 143–155.
- Obermayer, K., and Blasdel, G.G. (1993). Geometry of orientation and ocular dominance columns in monkey striate cortex. *J. Neurosci.* 13, 4114–4129.
- Oliva, A., Fernández-Ruiz, A., Buzsáki, G., and Berényi, A. (2016). Spatial coding and physiological properties of hippocampal neurons in the Cornu Ammonis subregions. *Hippocampus* 26, 1593–1607.
- Pastalkova, E., Itskov, V., Amarasingham, A., and Buzsáki, G. (2008). Internally generated cell assembly sequences in the rat hippocampus. *Science* 321, 1322–1327.
- Peng, Z., Zhang, N., Wei, W., Huang, C.S., Cetina, Y., Otis, T.S., and Houser, C.R. (2013). A reorganized GABAergic circuit in a model of epilepsy: evidence from optogenetic labeling and stimulation of somatostatin interneurons. *J. Neurosci.* 33, 14392–14405.
- Pfeiffer, B.E., and Foster, D.J. (2013). Hippocampal place-cell sequences depict future paths to remembered goals. *Nature* 497, 74–79.
- Pothmann, L., Müller, C., Averkin, R.G., Bellistri, E., Miklitz, C., Uebachs, M., Remy, S., Menendez de la Prida, L., and Beck, H. (2014). Function of inhibitory micronetworks is spared by Na⁺ channel-acting anticonvulsant drugs. *J. Neurosci.* 34, 9720–9735.
- Ramirez-Villegas, J.F., Logothetis, N.K., and Besserve, M. (2015). Diversity of sharp-wave-ripple LFP signatures reveals differentiated brain-wide dynamical events. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112, E6379–E6387.
- Reichinnek, S., Künsting, T., Draguhn, A., and Both, M. (2010). Field potential signature of distinct multicellular activity patterns in the mouse hippocampus. *J. Neurosci.* 30, 15441–15449.
- Schlingloff, D., Káli, S., Freund, T.F., Hájos, N., and Gulyás, A.I. (2014). Mechanisms of sharp wave initiation and ripple generation. *J. Neurosci.* 34, 11385–11398.
- Shouno, H., and Kurata, K. (2001). Formation of a direction map by projection learning using Kohonen's self-organization map. *Biol. Cybern.* 85, 241–246.
- Staba, R.J., Wilson, C.L., Bragin, A., Fried, I., and Engel, J., Jr. (2002). Quantitative analysis of high-frequency oscillations (80–500 Hz) recorded in human epileptic hippocampus and entorhinal cortex. *J. Neurophysiol.* 88, 1743–1752.
- Stark, E., Roux, L., Eichler, R., and Buzsáki, G. (2015). Local generation of multineuronal spike sequences in the hippocampal CA1 region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112, 10521–10526.
- Suh, H., Sochivko, D., Becker, A., Chen, J., Jiang, Y., Yaari, Y., and Beck, H. (2002). Upregulation of a T-type Ca²⁺ channel causes a long-lasting modification of neuronal firing mode after status epilepticus. *J. Neurosci.* 22, 3645–3655.
- Suh, J., Foster, D.J., Davoudi, H., Wilson, M.A., and Tonegawa, S. (2013). Impaired hippocampal ripple-associated replay in a mouse model of schizophrenia. *Neuron* 80, 484–493.
- Sullivan, D., Csicsvari, J., Mizuseki, K., Montgomery, S., Diba, K., and Buzsáki, G. (2011). Relationships between hippocampal sharp waves, ripples, and fast gamma oscillation: influence of dentate and entorhinal cortical activity. *J. Neurosci.* 31, 8605–8616.
- Takács, V.T., Szonyi, A., Freund, T.F., Nyiri, G., and Gulyás, A.I. (2015). Quantitative ultrastructural analysis of basket and axo-axonic cell terminals in the mouse hippocampus. *Brain Struct. Funct.* 220, 919–940.
- Taxidis, J., Anastassiou, C.A., Diba, K., and Koch, C. (2015). Local field potentials encode place cell ensemble activation during hippocampal sharp wave ripples. *Neuron* 87, 590–604.
- Treves, A., and Rolls, E.T. (1994). Computational analysis of the role of the hippocampus in memory. *Hippocampus* 4, 374–391.
- Tyler, A.L., Mahoney, J.M., Richard, G.R., Holmes, G.L., Lenck-Santini, P.-P., and Scott, R.C. (2012). Functional network changes in hippocampal CA1 after status epilepticus predict spatial memory deficits in rats. *J. Neurosci.* 32, 11365–11376.
- Valero, M., Cid, E., Averkin, R.G., Aguilar, J., Sanchez-Aguilera, A., Viney, T.J., Gomez-Dominguez, D., Bellistri, E., and de la Prida, L.M. (2015). Determinants of different deep and superficial CA1 pyramidal cell dynamics during sharp-wave ripples. *Nat. Neurosci.* 18, 1281–1290.
- van de Ven, G.M., Trouche, S., McNamara, C.G., Allen, K., and Dupret, D. (2016). Hippocampal offline reactivation consolidates recently formed cell assembly patterns during sharp wave-ripples. *Neuron* 92, 968–974.
- Wang, Y., Roth, Z., and Pastalkova, E. (2016). Synchronized excitability in a network enables generation of internal neuronal sequences. *eLife* 5, 5.
- Wiegand, J.-P.L., Gray, D.T., Schimanski, L.A., Lipa, P., Barnes, C.A., and Cowen, S.L. (2016). Age is associated with reduced sharp-wave ripple frequency and altered patterns of neuronal variability. *J. Neurosci.* 36, 5650–5660.
- Wilson, M.A., and McNaughton, B.L. (1994). Reactivation of hippocampal ensemble memories during sleep. *Science* 265, 676–679.
- Worrell, G.A., Gardner, A.B., Stead, S.M., Hu, S., Goerss, S., Cascino, G.J., Meyer, F.B., Marsh, R., and Litt, B. (2008). High-frequency oscillations in human temporal lobe: simultaneous microwire and clinical macroelectrode recordings. *Brain* 131, 928–937.
- Wu, X., and Foster, D.J. (2014). Hippocampal replay captures the unique topological structure of a novel environment. *J. Neurosci.* 34, 6459–6469.
- Ylinen, A., Bragin, A., Nádasdy, Z., Jandó, G., Szabó, I., Sik, A., and Buzsáki, G. (1995). Sharp wave-associated high-frequency oscillation (200 Hz) in the intact hippocampus: network and intracellular mechanisms. *J. Neurosci.* 15, 30–46.

STAR★METHODS**KEY RESOURCES TABLE**

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
Rabbit anti-calbindin D-28k antiserum	Swant	Swant CB-38; RRID: AB_10000340
Mouse anti-calbindin D-28k IgG1	Swant	Swant 300; RRID: AB_10000347
Mouse anti-NeuN	Millipore	Cat# MAB377; RRID: AB_2298772
Goat anti-rabbit Alexa Fluor 633 IgG	Invitrogen	Cat# A21070; RRID: AB_2535731
Goat anti-mouse Rhodamine Red IgG	Jackson Immunoresearch	Cat# 115-295-003; RRID: AB_2338756
Alexa Fluor 488-conjugated streptavidin	Jackson Immunoresearch	Cat# 016-540-084, RRID: AB_2337249
Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins		
Bisbenzimide H33258	Sigma-Aldrich	Cat# B2883; CAS: 23491-45-4
Neurobiotin tracer	Vector Labs	Cat# SP-1120
Picrotoxin	Sigma-Aldrich	P1675; CAS: 124-87-8
Carbamazepine	Tocris	Cat# 4098; CAS: 298-46-4
Experimental Models: Organisms/Strains		
Rat: Wistar	This paper	N/A
Software and Algorithms		
MATLAB	MathWorks	https://www.mathworks.com
Ethovision v1.90	Noldus	http://www.noldus.com/animal-behavior-research/
ImageJ	NIH Image	https://imagej.net/ImageJ
SOM toolbox 2.0	Esa Alhoniemi, Johan Himberg, Juha Parhankangas and Juha Vesanto	http://www.cis.hut.fi/projects/somtoolbox
SPSS Statistics	IBM Software	http://www-03.ibm.com/software/products/en/spss-statistics
Other		
Silicon probes: 16-channel linear; 100 µm inter-spacing; 413 µm ² electrode area	Neuronexus	A1x16-5mm-100-413

i-

CONTACT FOR REAGENT AND RESOURCE SHARING

Further information and requests for reagents and resources may be directed to the lead contact, Dr. Liset M. de la Prida (lmprida@cajal.csic.es).

EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS

All experimental protocols and procedures were performed according to the Spanish legislation (R.D. 1201/2005 and L.32/2007), the European Communities Council Directives of 1986 (86/609/EEC) and 2003 (2003/65/CE) for animal research, and were approved by the Ethics Committee of the Instituto Cajal (CSIC). Single-cell recordings in freely moving rats were obtained both in Madrid and at the University of Szeged, Hungary. Those experiments in Hungary were approved by Animal Care Committee of the University of Szeged. Health and immune status of all animals was validated by the corresponding veterinary authorities. Animals included in this study were not involved in any previous procedure.

TLE model

Adult male Wistar rats (180–200 g) were treated with multiple intraperitoneal injections of kainate (5 mg/kg) at hourly intervals until they reached status epilepticus. Diazepam (4 mg/kg) was injected 1 hr later to stop convulsions. Animals received intraperitoneal injections of 2.5 mL 5% dextrose in saline and their diet was supplemented with fruit and powder milk during the following 2–3 days. After 4–5 days post-status, rats behaved normally and were housed individually. Some rats were injected with saline

nstead of kainate and received treatments similar to epileptic animals. Untreated normal rats completed the control group. No differences in electrophysiological indices were found in the subset of 3 saline-injected versus 4 untreated controls tested with EP memory tasks.

All quantitative experiments started 8 weeks after status when chronic epileptic rats already exhibited recurrent seizures. Seizures were either observed during animal handling or recorded electrophysiologically during behavioral tasks. In epileptic rats, periods of normal-like electrophysiological activity were intermixed with periods dominated by epileptiform events defined as convulsive or subclinical seizures and interictal discharges (Inostroza et al., 2013). Only data from sessions free from any sign of epileptiform activity within 2 hr were considered for analysis.

METHODS DETAILS

For all experimental designs, the following criteria were applied: a minimum of 3 replicas per group were considered; animals were randomly assigned to the different groups; behavioral and histological analysis were blind to experimental groups.

Silicon probe recordings in freely moving rats

To implant multisite silicon probes, rats were anesthetized with isoflurane (1.5%–2%) in oxygen (30%) and continuously monitored with an oximeter (MouseOx; Starr Life Sciences). Epileptic and saline-treated rats were implanted 6–7 weeks after treatment. Implantation coordinates ranged from 3.9 to 6 mm posterior to Bregma and between 2 and 5 mm from midline. Sixteen channels silicon probes (NeuroNexus; 0.3–1.2 Mohm site impedance; 100 μm resolution; 413 μm^2 electrode area), were implanted either fixed or mounted on an adjustable microdrive (either custom-made or the nDrive from NeuroNexus). Two screws served as reference and ground at the occipital region. After surgery, rats received acute treatment of enrofloxacin 10 mg/kg, methylprednisolone 10 mg/kg and buprenorphine 0.05 mg/kg. At least one week was given for recovery and stabilization before quantitative experiments started (typically 8 weeks after status).

Electrophysiological recordings were obtained using a multichannel amplifier (Dacq system; Axona). LFP signals from multisite silicon probes were acquired with a 16-channel headstage, amplified by 400 and stored at 4800 Hz (during exploratory phases of the task) or 20 kHz (during the inter-trial) with 24-bits precision. Rat's position in the arena was estimated from the infrared headstage LED as recorded from a ceiling camera (100 Hz, 300 pixels/meter). Recordings were obtained daily from Monday to Friday between 2 and 7 pm over 1–3 weeks while the animals performed different cognitive tasks.

Object recognition tasks and behavioral analysis

We used the “what-where-when” object recognition task to test for episodic-like memory in TLE rats (Inostroza et al., 2013). The apparatus consisted of a square open field (80x80x50 cm) situated in an evenly illuminated room with several cues visible on the surrounding walls. Ambient noise was masked. Odor cues were removed after each trial (0.1% acetic acid). Before the task, animals were habituated over 3–4 days to open field exploration and LFP recordings. Animal behavior was monitored with a video camera and analyzed offline either with Ethovision (v1.90, Noldus IT), manually or by routines written in MATLAB. Notes on animal behavior, including sleeping periods and animal's posture were taken to inform electrophysiological analysis.

During the EP task, animals found four copies of an object during a first sample phase (old familiar objects A, 3 min duration; Figure 1A). A second sample phase (3 min duration) followed 50 min after, in which rats found four copies of another object (recent familiar objects B). The test phase (3 min duration, 50 min after) consisted in exposing rats to 2 old and 2 recently familiar objects seen in the previous sampling phases. Rats entered the arena from a fixed position, randomized between animals. During the inter-trial period (50 min) animals were left in a home cage to which they were previously habituated. Electroencephalographic recordings were obtained continuously during the different phases of the task.

To quantify performance in the EP task, a discrimination index was estimated for every object by dividing the time spent at each object by the total exploratory time and tested against chance level (0.25; one-sample t test).

We also used a one-trial object recognition task (Inostroza et al., 2013; Figure 1A). In OR task, two identical objects were used in the sample phase (3 min). The rat exploratory preference for a displaced object was tested in a test phase (3 min duration) 50 or 100 min after. Animals entered the arena allocentrically between phases. A discrimination index was calculated as the ratio between the time difference between objects and the total exploratory time. All memory tasks were performed at equivalent time of the day (afternoons).

To test for the behavioral and cognitive effects of CBZ, we injected rats just after the sample phase with either vehicle (polyethylene-glycol PEG400 300 μL in 1 mL saline) or CBZ (10–20 mg/kg) in separate OR sessions. These two tasks were conducted with different objects and open field orientation in the room in alternate days. The order of the vehicle and CBZ task was randomized between animals. In preliminary experiments, we noted that 20 mg/kg CBZ resulted in reduced exploration and thus a concentration of 10 mg/kg was used for behavioral tests. To analyze behavioral influences, we evaluated the total object exploration time, maximal speed, and number of rearing as an index of hyperactivity, time at the center of the arena and the center/periphery ratio as a measure of anxiety and natural behaviors like thigmotaxis (time along the walls of the behavioral apparatus). All these measures were obtained from videos recorded during the test phase of the OR task in the very same animal tested with vehicle and CBZ.

Single-cell juxtacellular recording and labeling

Single-cell recordings followed by juxtacellular labeling for post hoc immuno-histochemical identification were obtained from freely moving rats during awake resting periods or during sleep using either a manual microdrive (Korshunov, 1995; Averkin et al., 2016) or a motorized version (English et al., 2014).

For the manual microdrive, animals were implanted with a holder consisting of a plastic base with a cylindrical hole (2.5 mm) targeting a small craniotomy (4.3 mm posterior to Bregma and 2.5 mm lateral) under isoflurane anesthesia (1.5%–2% mixed in oxygen 400–800 mL/min). The dura mater was left intact. The craniotomy was cleaned with 0.05–0.07 mg/mL Mitomycin C (Sigma) to reduce growth-tissue, filled with agar (2.5%–3.5%) and covered to avoid drying. A ground epidural platinum/iridium wire (125 μ m) was implanted over the cerebellum and used as reference. To habituate animals to microdrive mounting/remounting in awake and drug-free conditions, cleaning of craniotomy was repeated over 4–5 consecutive days after surgery. We also used a new version with an independent drive to bring a sharpened tungsten wire close to the recorded cell for simultaneous LFP recordings (150–400 μ m; Averkin et al., 2016). Animals were habituated daily to the recording arena (40 x 40 x 23 cm or 25 x 25 x 35 cm) and microdrive-holder manipulations with water and food ad libitum. The day of recording, the microdrive housing a glass pipette (1.0 mm x 0.58 mm, ref 601000; A-M Systems) filled with 1.5%–2.5% Neurobiotin in 0.5 M NaCl (impedance 8–15 M Ω) was mounted in the holder and gently advanced into the animal's brain (350 μ m per revolution at 3–5 μ m resolution). In some animals, an ipsilateral cortical EEG screw over the prefrontal cortex and a contralateral intrahippocampal tungsten wire (122 μ m) targeting the strata pyramidale and radiatum were implanted for validating behavioral states. For these recordings a reference screw was implanted at the occipital region.

For the motorized microdrive, we used a miniature brushless DC motor with 125:1 planetary gear reduction (Microcommo, Faulhaber Group, Germany) attached to a screw (0.2 mm pitch, 1.6 mm diameter) and connected to the glass pipette holder with two separate hex nuts to transform rotation into vertical movements. The device was mounted on a 3D printed plastic rack that was cemented to the skull. An Arduino-based controller was developed to control the motor movement at steps of 1, 10, 100 and 1,000 μ m in both directions. We implanted rats with the motorized microdrive carrying a mock glass pipette using similar coordinates, material, and procedures as described above. A contralateral cortical screw over the prefrontal cortex and a contralateral intra-hippocampal tungsten were added. A ground epidural platinum/iridium wire and/or chlorinated silver wires (125 μ m) were implanted over the cerebellum and used as reference for the glass pipette. An occipital screw was implanted for independent ground and/or reference. Over the next 2–3 days, rats were habituated to the recording arena (25 x 25 x 35 cm) and manipulation of the implant. The day of recording, the animal was briefly sedated with isoflurane (1.5% mixed in oxygen 400–800 mL/min) to mount a new glass pipette and returned to the home cage while monitoring the scalp EEG and pipette impedance continuously. Recordings started after 3–4 hr, when rats behaved normally and the EEG was similar than before sedation.

Recordings were obtained with a miniature pre-amplifier (ELC mini-preamplifier, NPI Electronic, Germany), carrying two LEDs, and customized to connect with an Axoclamp-2B amplifier (Molecular Devices). A video-camera (27 frames/s) was used to monitor the animals' behavior (sleep, awake, movement) and position. The depth position of the pipette was inferred from the micrometric scale of the manual microdrive or directed calculated by the Arduino-based controller in the case of the motorized microdrive. We also rely on the shape of relevant LFP signals, including K-complexes with spindles while going through the cortex and hippocampal sharp-wave ripples. Single CA1 pyramidal cells were targeted at the dorsal hippocampus following both stereotaxic and extracellular waveform criteria. After recording, cells were modulated using the juxtacellular labeling technique with positive current pulses (500–600 ms on-off pulses; 5–18 nA) while monitoring their response, as described before (Valero et al., 2015). After experiments, rats were perfused with 4% paraformaldehyde and the brain cut in 70 μ m coronal sections. Labeled CA1 pyramidal cells were identified using streptavidin-conjugated fluorophores.

In vivo electrophysiology under urethane anesthesia

Rats were anesthetized with urethane (1.2 g/kg, i.p.), fastened to the stereotaxic frame and warmed to keep their body temperature at 37°. Two bilateral craniotomies of ~1 mm diameter were performed for CA3 stimulation (AP: –1.2 mm, ML: 2.9 mm), and a window of ~2 mm diameter was drilled above the right hippocampus for recordings (AP: –3.7 mm; ML: 3 mm). The dura was gently removed. To decrease brain pulsations the *cisterna magna* was opened and drained.

A 16-channel silicon probes (NeuroNexus Tech; 100 μ m interspaced, 413 μ m² contact) was advanced perpendicular along the CA1-DG-CA3c axis guided by extracellular stimulation and electrophysiological hallmarks. Extracellular signals were pre-amplified (4x gain) and recorded with a 16(32)-channel AC amplifier (Multichannel Systems), further amplified by 100, analogically filtered at 1Hz to 5 kHz, and sampled at 20 kHz/channel with 12 bits precision with a Digidata 1440. Concentric bipolar electrodes were advanced 3.5 mm with 30° in the coronal plane to stimulate CA3. Stimulation consisted of biphasic square pulses (0.2 ms duration, 0.05–1.2 mA every 5 s). A subcutaneous Ag/AgCl wire in the neck served as reference. Recording and stimulus position was confirmed by post hoc histological analysis.

For intracellular recording and labeling in current-clamp mode, sharp pipettes (1.5 mm/0.86 mm outer/inner diameter borosilicate glass; A-M Systems) were filled with 1.5 M potassium acetate and 2% Neurobiotin (Vector Labs). In vivo pipette impedances varied from 50 to 100 M Ω . Intracellular recordings were guided by monitoring field responses to extracellular stimulation. Signals were acquired with an intracellular amplifier (Axoclamp 900A) at 100x gain. Before recordings started, the craniotomy was covered

by 3% agar to improve stability. The resting potential, input resistance, and amplitude of action potentials was monitored all over the course of experiments. After data collection, Neurobiotin was ejected using 500 ms depolarizing pulses at 1-3 nA at 1 Hz for 10-45 min.

In some experiments we used the non-competitive channel blocker for the GABA_A receptor chloride channels picrotoxin (1 mM in potassium acetate and 2% Neurobiotin) in the glass pipette to interfere with synaptic potentials intracellularly. For systemic injection of the use-dependent sodium channel blocker carbamazepine (10-20 mg/kg), we implanted rats with an intraperitoneal cannula to avoid mechanical interferences during recording.

Tissue processing and immunohistochemistry

After completing recordings, rats were perfused with 4% paraformaldehyde (PFA) and 15% saturated picric acid in 0.1 M, pH 7.4 phosphate buffered saline (PBS). In some initial experiments, picric acid was omitted. Brains were postfixed overnight at room temperature (RT), washed in PBS and serially cut in 70 µm coronal sections (Leica VT 1000S vibratome). Sections containing the stimulus and probe tracks were identified with a stereomicroscope (S8APO, Leica). Sections containing Neurobiotin-labeled cells were localized by incubating them in 1:400 Alexa Fluor488-conjugated streptavidin (Jackson ImmunoResearch 016-540-084) with 0.5% Triton X-100 in PBS (PBS-Tx) for 2 hr at room temperature (RT). After three washes, sections they analyzed in an inverted epifluorescence microscope (Leica, DMI6000B).

Sections containing the somata of recorded cells were processed with Triton 0.5% in PBS, blocked with 10% fetal bovine serum (FBS) in PBS-Tx and incubated overnight at RT with the primary antibody solution containing rabbit anti-calbindin (1:1,000, CB D-28k, Swant CB-38), or mouse anti-calbindin (1:1000, CB D-28k, Swant 300) with 1% FBS in PBS-Tx, or mouse NeuN (1:1000, Millipore). After three washes in PBS-Tx, sections were incubated for 2 hr at RT with appropriate secondary antibodies: goat anti-rabbit Alexa Fluor633 (1:500, Invitrogen, A21070), and goat anti-mouse Alexa Fluor488 (Jackson ImmunoResearch 115-545-003) or goat anti-mouse Rhodamine Red (1:200, Jackson ImmunoResearch, 115-295-003) in PBS-Tx-1%FBS. Following 10 min incubation with bisbenzimide H33258 (1:10000 in PBS, Sigma, B2883) for nuclei labeling, sections were washed and mounted on glass slides in Mowiol (17% polyvinyl alcohol 4-88, 33% glycerin and 2% thimerosal in PBS).

To acquire multichannel fluorescence stacks from recorded cells, a confocal microscope (Leica SP5) with LAS AF software v2.6.0 build 7266 (Leica) was used. For single-cell studies the following channels (fluorophore, laser and excitation wavelength, emission spectral filter) were used: (1) bisbenzimide, Diode 405 nm, 415–485 nm; (2) Alexa Fluor 488, Argon 488 nm, 499–535 nm; (3) Rhodamine Red / Alexa Fluor 568 / Texas Red, DPSS 561 nm, 571–620 nm; (4) Alexa Fluor 633, HeNe 633 nm, 652–738 nm; and objectives HC PL APO CS 10.0 x 0.40 DRY UV, HCX PL APO lambda blue 20.0 x 0.70 IMM UV and HCX PL APO CS 40.0 x 1.25 OIL UV were used.

All morphological analyses were performed blindly to electrophysiological data. The distance from the cell soma to radiatum was measured from confocal images using information from calbindin and bisbenzimide staining. All cells included in this study were localized within the CA1 region. Calbindin immunostaining was used to estimate the width of the superficial sub-layer from the border to the stratum radiatum ([Figures S2E](#) and [S2F](#)). Superficial cells were defined based on the location of the soma within the calbindin sublayer, independently on their immunoreactivity ([Valero et al., 2015](#)). The border with radiatum was estimated for each section and the distance from the recorded cell somata was measured using ImageJ (NIH Image).

Spectral analysis of LFP signals

Analysis of electrophysiological data was performed using routines written in MATLAB 7.10 (MathWorks). For the analysis of ripples, all signals obtained from different recording methods were re-sampled at 20 kHz whenever required. LFP recordings from sites at the stratum radiatum were low-pass filtered at 100 Hz to study sharp-waves. LFP signals from sites at the stratum pyramidale were band-pass filtered between 100-600 Hz to study ripples. We used forward-backward-zero-phase finite impulse response (FIR) filters of order 512 to preserve temporal relationships between channels and signals. For sharp-waves, filtered signals were smoothed by a Gaussian kernel and candidate events were detected by thresholding (>3 SDs). For ripple detection, the bandpass-filtered signal was subsequently smoothed using a Savitzky-Golay (polynomial) filter and candidate events were detected by thresholding (>2 SDs). All pairs of detected events were visually confirmed and aligned by the peak of the accompanying individual sharp-wave (or by the local maximum of the smoothed ripple). One-dimensional current-source density (CSD) signals were calculated from the second spatial derivative of LFP. Smoothing was applied to CSD signals for visualization purposes only. Tissue conductivity was considered isotropic, and an arbitrary value of 1 was assigned to express CSD signal as mV/mm².

Time-frequency analysis of sharp-wave ripples was performed by applying the multitaper spectral estimation in sliding windows with 97.7% overlap and frequency resolution of 10 Hz in the 90-600 Hz frequency range (only the 100-600 Hz range is shown) to data sweeps aligned by sharp-wave ripple events (± 1 s). The normalized power was then treated as a statistical distribution $p(f)$, from which we extracted the mode to estimate the oscillatory frequency peak and the entropy (in bits) as the $-\sum_f p(f) \times \log_2 p(f)$, ([Foffani et al., 2007](#)). By definition, the entropy does not depend on the frequency and is maximal for a flat spectrum (noise) at $\log_2 N = 5.12$, with $N = 35$ bins. We also estimated the fast ripple index (with values from 0 to 1) as the integral of the normalized power above a cutoff frequency (F_{th} ; [Figure S1B](#)), to characterize the proportion of the spectrum at the fast ripple band ([Ibarz et al., 2010](#)). A cutoff of 250 Hz was typically used to estimate the fast ripple index, unless otherwise indicated. These spectral indices (entropy, fast ripple index and frequency) were estimated for every sharp-wave ripple event ([Figure 1D](#)).

Sleep and awake states were identified by evaluating continuous LFP recordings during the inter-trial periods, together with tracking information, videos, and notes taken during the experiments. Animal's behavior was considered to inform electro-encephalographic signatures of sleep: (1) a curled immobile posture of the animal at the corner typically associated with slow-wave activity (<3 Hz high amplitude LFP) indicated slow-wave sleep (SWS); (2) phasic movements accompanied by low amplitude rhythmic activity at the theta band identified REM sleep (Valero et al., 2015). Awake states were defined whenever the animals had their eyes open and were attentive either moving or not. SWS and REM episodes were identified and their duration quantified in a subset of rats ($n = 3$ control, $n = 3$ epileptic) during the 100 min interval of the OR task. In these rats we compared spectral indices of awake immobile and sleep ripples (Figure S1E).

To quantify exploratory theta activity, non-overlapping segments (1 s) with continuous oscillations in the 4-12 Hz band were identified in LFP signals from the stratum lacunosum moleculare using data from the test phases of behavioral tasks. The theta power (in decibels) and coherence between signals from the stratum lacunosum moleculare and the molecular layer of the dentate gyrus were estimated using the Thomson multitaper method (Inostroza et al., 2013; Laurent et al., 2015). An index of theta-gamma modulation was obtained from the stratum radiatum current-source density signals in the 30-60 Hz band as previously described (Lopez-Pigozzi et al., 2016).

Analysis of juxtacellular recordings

For juxtacellular recordings in freely moving conditions, data from glass pipettes were: (1) band pass filtered at 100-600 Hz and smoothed using a Savitzky-Golay (polynomial) filter to detect ripple events by thresholding (>4 SD); (2) high-pass filtered at 300 Hz to detect positive spikes from the juxtacellular recorded cell (>8 SD). For visualization of ripple events signals were filtered at 100-250 Hz. We used forward-backward-zero-phase finite impulse response filters (order 512) to preserve temporal relationships between channels and signals. All events/spikes were visually confirmed.

Interspike interval autocorrelograms (0.5 ms bins) were constructed using all detected spikes (Figures S2B and S2C). CA1 pyramidal cells usually fire complex-spike bursts with autocorrelogram peaks at 4-5 ms. The stability of the action potential waveform (peak-to-peak duration and amplitude as well as a spike asymmetry index defined as the ratio of the difference between the negative and positive baseline-to-peak amplitudes and their sum) was evaluated over the entire recording session (>3 min), before juxtacellular electroporation. Baseline firing rate was stable for small movements of the pipette toward the cell, excluding mechanical interferences (Figure S2J). Peri-event time histograms (PETH) were triggered by sharp-wave ripple events at 5 ms bin size (Figure 2D). The spike-field cross-spectra were evaluated by: concatenating sharp-wave events; calculating the cross-correlation function between the discriminated spikes and the nearby field recording; and estimating the spectrum of the spike-field cross-correlation function (Figure S2C). To keep spike-field cross-spectra independent of signal amplitude, the autocorrelation function of the spikes and the fields were normalized (Foffani et al., 2007). The spectrum of the spike-triggered average was calculated with a FFT by applying one 2,048 points Hanning window centered on lag zero, with mean detrending. The decimal logarithm of the integral of the spike-field cross-spectrum was used as a measure of the overall spike-field synchronization.

To evaluate single-cell entrainment by sharp-wave ripples we defined the following measures: (1) the average number of spikes emitted in a 60 ms window centered around the events, defined from the total count for all events examined; (2) the sharp-wave-associated firing rate in Hz, which was calculated from the average number of spikes in the 60 ms window; (3) the probability of cell participation (P), as the number of events the cell fire over the total number of events (0.1 means the cell fires in 10% of sharp-wave ripples); (4) cell information content defined as $-\log P$ in bits.

To evaluate sharp-wave ripples recorded with glass pipettes, candidate events were all aligned by the local maximum of the smoothed ripple, and analyzed in windows of ± 1 s similar to events recorded with silicon probes (Figures S2A and S2B). To avoid spectral leak from action potentials of the recorded cell in to the fast ripple band, only non-participating events were considered. Similar spectral behavior was confirmed in $n = 3$ cells recorded with a proximal tungsten wire (Figures S3C and S3D). In those cases where a second electrode was available for LFP recordings (either ipsi- or contralateral to the recorded cell), signals were treated similarly and sharp-wave ripples were all validated.

To evaluate relationships between single-cell firing and spectral indices (Figures 2E and 2F; Figures S3A and S3B), only events with cell firing were considered. For each event, we estimated the total number of spikes fired and the spectral indices of the associated ripple (entropy and fast ripple index). Mean spike number data was then binned in 0.1 bits for entropy and 0.05 for fast ripple index. Relationships were evaluated using the Pearson correlation per each cell and the r value was taken as the slope (Figures S3A and S3B). A mean group curve was evaluated by averaging single-cell data (Figure 2E).

To predict the deep-superficial location of unlabeled cells we exploited the dependency of extracellular sharp-wave ripple power across the cell body layer, as introduced by Mizuseki et al. (2011) for high-density extracellular recordings. To this purpose, we low-pass filtered signals at 5, 10, 50, 100, 250, and 600 Hz (Figure S2D; $n = 8$ control, $n = 4$ epileptic). Then we estimated the relationship between the integral of filtered event along different windows (± 25 ms; ± 50 ms) and the distance of the juxtacellularly recorded cell to the border with the stratum radiatum, as validated histologically. This relationship was fitted to the best linear model and the best fitting parameters were evaluated. We then applied the model to predict the position of unlabeled cells based in the information from the juxtacellularly recorded sharp-wave events (Figure 2D). We confirmed the linear relationship between the event integral and the distance from the border with stratum radiatum (Figure S2G).

Self-organizing maps (SOMs) of sharp-wave ripples

To evaluate single-cell firing selectivity during sharp-wave ripples we used an unsupervised machine learning algorithm that cluster events from a multi-dimensional input space into a low dimensional map by optimizing the topological relationships of the original data ([Figure S4A](#)), known as self-organizing maps or SOM (Kohonen, 2001). SOM has been applied before in neuroscience research to the study of visual orientation columns (Obermayer and Blasdel, 1993; Shouko and Kurata, 2001) and to the analysis of sharp-wave ripples in vitro (Reichinnek et al., 2010) and in vivo (Taxidis et al., 2015). We used the open source MATLAB SOM toolbox 2.0 by Esa Alhoniemi, Johan Himberg, Juha Parhankangas and Juha Vesanto in the Helsinki University of Technology: <http://www.cis.hut.fi/projects/somtoolbox/>.

It is worth noting that while SOM implicitly look for groups they may not exist as such in the original input data. SOM represents a predictive model of the data that need to be validated. For instance, the number of sharp-wave events detected by SOM does not necessarily reflect discrete entities, nor the exact number of identifiable waveforms in the LFP signals (Reichinnek et al., 2010). It is thus the consistency of LFP waveform and cell behavior during clusters what contribute to their neurophysiological validation, as we show in this paper.

In SOM, the number of samples, dimension of the original input space and that of the output map as well as its shape is defined a priori. For each cell, a total of N individual events were grouped into a \sqrt{N} dimensional space represented visually as a 2D SOM rectangular matrix. For each event we estimated the first 10 principal components of LFP signals from the stratum pyramidale after 10–600 Hz band pass filtering and 5 kHz down-sampling, which accounted for about 75% variance ([Figures S4B](#) and [S5D](#)) and used them as the 10 dimensional input space (each event is represented by a weighted vector). Grouping events in the SOM matrix follows a competitive process in which topological Euclidean distances in the original 10 dimensional space are translated into the reduced map. For initialization we chose random sample weight vectors from the input dataset. After running the algorithm all sharp-wave ripples from a single experiment, are organized in the SOM matrix according to their topological similarities in the 10 principal components space ([Figures 3A](#) and [3B](#); [Figure S4C](#)). We confirmed that events grouped in a given element of the matrix share common waveforms ([Figures 3A](#) and [3B](#); traces), and neighboring elements were likely to be similar. We then calculated the single-cell firing rate matrix by estimating the frequency rate of single-cells during all events of a given group ([Figures 3A](#) and [3B](#); gray and blue shadowed matrix). To maximize the number of cells analyzed by SOM, we established a minimum number of 50 sharp-wave ripples given comparable results in random blocks taken from cells with more than 200 events.

To get further insights into sharp-wave ripple distribution and the associated single-cell firing rate grouped by SOM we used the unified distance matrix (U-matrix) to quantify clusters of events separated by gaps in the 10-dimensional input space. These would correspond to dissimilar sharp-wave ripples. The U-matrix quantifies the distances between neighboring SOM elements by doubling the dimension of SOM matrix at their borders ([Figure S4D](#)). A large gap in the U-matrix identified different clusters of sharp-wave ripples sharing similar principal components (see color blocks in [Figures 3A](#) and [3B](#)). Importantly, by evaluating the U-matrix, inconsistencies of the unsupervised method can be outlined. We found roughly reliable grouping of sharp-wave ripple events and relied on the automatically identified clusters ([Figure S4D](#)). All events in a given cluster (color blocks) were averaged for quantification purposes. The number of clusters per SOM and the mean cluster distance was estimated by k-means ([Figures S4C](#) and [S5E](#)). Cell participation within each cluster (P_c) was evaluated as the ratio between the number of events a cell fired over the total number of events in given cluster. Cell participation by SOM cluster (P_{SOM}) was evaluated similarly, by considering the number of clusters and tested against random permutations. Cell selectivity was defined as the standard deviation of the probability distribution of the cell participation by clusters normalized by the mean and the standard deviation obtained by the 1000 permutations. Information was defined as $-\sum P_{SOM} \times \log_2 P_c$ normalized by the mean and the standard deviation after the 1000 permutations.

Analysis of intracellular recordings

Passive electrophysiological properties (input resistance, membrane decay and capacitance) of neurons recorded intracellularly *in vivo* were measured using 500 ms currents step in current-clamp mode. Cells with intracellular action potential amplitude smaller than 40 mV were excluded. Intrinsic firing properties, including action potential threshold and duration were estimated from the first spike in response to depolarizing current pulses of 0.5 nA amplitude and 500 ms duration. The maximal firing rate was calculated by dividing the number of spikes by the duration of a current pulse of 0.3 nA ([Figure S5C](#)).

LFP and CSD signals were analyzed as previously described. For analysis of sharp-wave-associated intracellular responses the timing of events was used to align membrane potentials at different levels (Valero et al., 2015). The resting membrane potential (RMP) and input resistance were estimated by linear regression between baseline potential data and the associated holding current. The reversal potential (V_{rev}) of sharp-wave-associated responses for each cell was estimated by linear regression between the response peak amplitude and membrane potential. The maximal driving force at the sharp-wave peak was estimated at the resting membrane potential (RMP).

SOM-related matrices of the intracellular driving force ([Figures 4H](#) and [4J](#); blue-red matrices) and the extracellular sink and CA3 MUA activity at the sharp-wave peak ([Figures 4I](#) and [4K](#); blue and brown matrices) were calculated as described before, by averaging values from sharp-wave events grouped together.

For temporal analysis of synaptic changes associated to sharp-wave ripples classified by SOM we adopted the general method of Borg-Graham (Borg-Graham, 2001). Given difficulties in establishing the GABAergic reversal potential in epileptic conditions, we chose to infer excitatory and inhibitory influences from the sign of the composite synaptic current around the resting membrane

potential ([Menendez de la Prida and Gal, 2004](#)). While the method can be applied to current-clamp data, quantitative estimations of conductances are less reliable than in voltage-clamp configuration. For this reason we chose to examine the dynamic evolution of the composite response. For each SOM cluster, we collected all sharp-wave ripple events recorded at different membrane potentials by injecting a holding current to the cell. Membrane potential deflections at each time point around the sharp-wave peak (± 500 ms) were plotted against the holding current and fit linearly to extract the reversal potential, $V_{rev}(t)$, and conductance, $G(t)$. The conductance increase was given relative to the resting conductance (i.e., as estimated from baseline). We estimated the temporal evolution of the total current as $I_{total}(t) = -G(t) \cdot (V - V_{rev}(t))$, where V is the resting membrane potential. Note that $(V - V_{rev}(t))$ is the temporal evolution of the driving force, which value at the sharp-wave peak was used for building SOM-related matrices. Inward excitatory currents will generate a membrane depolarization while outward inhibitory currents will result in membrane hyperpolarization. To characterize the temporal evolution of the perisomatic driving force we estimated the 20%–80% rise time of the excitatory component at the depolarized peak, the 63% decay, and the delay between excitation and inhibition (E-I delay) at the current peaks (equivalent to the depolarizing and hyperpolarizing peaks of the reversal potential). The sharp-wave-associated net charge was estimated from the temporal integral of the voltage response at resting membrane potential.

To evaluate the preferred firing phase of single-cells during ripple cycles we first filtered LFP signals between 100–250 Hz and aligned spikes relative to the ripple peak. The timing of cell firing over the course of sharp-waves (early versus late spikes) was estimated similarly by aligning spikes relative to the sharp-wave peak. Timing was transformed to phase by considering the duration of individual sharp-waves as defined from the first derivative from the 1–10 Hz filtered radiatum signal. The mean firing phase was estimated by circular statistics.

QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

Statistical analysis was performed either with the SPSS software (IBM) or with MATLAB. No statistical method was used to predetermine sample sizes, which were similar to those reported previously ([Inostroza et al., 2013; Valero et al., 2015](#)). Normality and homoscedasticity were confirmed with the Kolmogorov-Smirnov and Levene's tests, respectively. The exact number of replications for each experiment is detailed in the text and figures.

Two-way ANOVAs were applied for groups and object or interval for behavioral data. Groups and location (deep-superficial) were considered factors to analyze single-cell data. Post hoc comparisons were evaluated with the Tukey-Kramer test. Pharmacological effects at single cells (picrotoxin; CBZ) were evaluated by considering a basal state (20 min) versus the last 20 min (CBZ) or 30 min (picrotoxin) after application in a paired design. Behavioral effects of CBZ were tested against vehicle in a paired design. Between-groups comparisons were performed with unpaired two-tail Student's test, unless otherwise specified. Correlation between variables was evaluated with the Pearson product-moment correlation coefficient, which was tested against 0 (i.e., no correlation was the null hypothesis) at $p < 0.05$ (two sided). Both the Pearson coefficient and p value are reported to facilitate interpretation.

For GLM analysis discrimination indices (DI) in behavioral tasks were modeled as a linear combination of the following variables: fast ripples index, entropy, theta coherence, theta power and theta-gamma modulation using the function *fitglm* from MATLAB (assuming a normal distribution). The impact of each variable in the GLM model was then tested with a multivariate analysis and the p value reported after Tukey-Kramer posthoc correction. Variables having a significant impact in explaining the discrimination index show p values < 0.05 .

DATA AND SOFTWARE AVAILABILITY

Freely available software and algorithms used for analysis are listed in the resource table. Some unavailable analyses were specifically designed for the purpose of this paper using routines written in MATLAB 7.10 (MathWorks). All custom scripts and data contained in this manuscript are available upon request from the Lead Contact.

