FACULTAD DE CIENCIAS

PROGRAMA DE MAGÍSTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

MENCIÓN NEUROCIENCIA

"SINCRONÍA DE LA ACTIVIDAD OSCILATORIA EN EL CIRCUITO DE LA CORTEZA PREFRONTAL-HIPOCAMPO-CORTEZA PARIETAL POSTERIOR DURANTE LA ADQUISICIÓN DE LA MEMORIA ESPACIAL DE REFERENCIA"

MARÍA-JOSÉ TORRES MORENO

Tesis para optar al grado de

Magíster en Ciencias Biológicas Mención Neurociencia

Director(a) de Tesis:

Dr. IGNACIO NEGRÓN OYARZO

Instituto de Fisiología

2023

AGRADECIMIENTOS

A todas las fuentes financieras que apoyaron las investigaciones donde se abstrajeron los datos utilizados en esta tesis: Proyecto de iniciación en investigación FONDECYT 2016 y FONDECYT/ANID Anillos regulares 2021.

A todos/as los investigadores del Laboratorio de Neurofisiología Cognitiva que pusieron sus conocimientos teóricos, prácticos y su tiempo para llevar a cabo los experimentos.

A mis padres.

INDICE

1. RESUMEN 5

2. ABSTRACT 6

3. INTRODUCCIÓN 8

3.1 LA FORMACIÓN DE LA MEMORIA ESPACIAL DE REFERENCIA COMO UNA FUNCIÓN COGNITIVA 8

3.2 ESTRUCTURAS CEREBRALES QUE SOPORTAN LA ADQUISICÓN DE LA MER 9

3.3 PROCESOS NEUROFISIOLÓGICOS QUE PARTICIPAN EN LA ADQUISICIÓN DE LA MER 10

4. HIPÓTESIS Y/O PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN 13

5. OBJETIVOS 13

5.1 OBJETIVO GENERAL 13

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 13

6. DISEÑO EXPERIMENTAL 14

7. MATERIAL Y MÉTODOS 15

7.1 MUESTRA 15

7.2 ARREGLO DE MULTIELECTRODO (MEA) 15

7.3 IMPLANTACIÓN DEL MEA 15

7.4 EVALUACIÓN CONDUCTUAL 15

7.5 REGISTRO 17

7.6 HISTOLOGÍA 17

7.7 ANÁLISIS DE DATOS 17

7.7.1 CONDUCTA DEL ANIMAL 17

7.7.2 ELECTROFISIOLÓGICO 19

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO 21

9. RESULTADOS 22

10. DISCUSION 32

11. CONCLUSIONES 35

12. BIBLIOGRAFÍA 36

1. RESUMEN

La memoria espacial permite a los sujetos el conocimiento a largo plazo de los lugares relevantes para su supervivencia. Esta memoria se adquiere mediante el ajuste gradual de las rutas de navegación en el ambiente. En este procesamiento de alta carga cognitiva participan varias estructuras cerebrales, entre ellas la Corteza Prefrontal, posiblemente asistiendo a la optimización del recorrido, el Hipocampo, representando la localización del sujeto en el espacio y la Corteza Parietal Posterior, representando las rutas disponibles. Es de amplia discusión si las codificaciones por parte de cada estructura ocurren de manera separada o integrada durante la adquisición de este tipo de memoria. Se ha propuesto que la sincronía de la actividad entre áreas cerebrales, conocida como conectividad funcional, soporta la adquisición de la memoria espacial. Se ha reportado que la conectividad funcional entre algunas áreas cerebrales cambia con el aprendizaje. Sin embargo, se desconoce si existe alguna modificación de la sincronización entre estas tres estructuras durante la adquisición de una memoria espacial de referencia y, de haberlas, su posible vinculación con las estrategias utilizadas para alcanzar el objetivo. Es por esto por lo que examinamos la actividad eléctrica cerebral in vivo durante la adquisición de la memoria espacial de referencia en los circuitos mPFC-HPC y mPFC-PPC. Descubrimos que el acoplamiento entre oscilaciones de baja frecuencia con oscilaciones de alta frecuencia presenta una modulación significativa cuando el animal ocupa estrategias de navegación que requieren una alta demanda cognitiva frente a estrategias de baja demanda cognitiva sin diferencias en los circuitos estudiados durante la adquisición de la memoria espacial de referencia.

PALABRAS CLAVES

Corteza Prefrontal – Hipocampo – Corteza Parietal Posterior – Potencial de campo local – Memoria espacial de referencia – Estrategias de navegación.

2. ABSTRACT

Spatial memory allows thelong-term knowledge of places relevant for survival. This memory is acquired through the gradual adjustment of the navigation routes in the environment. In this processing of high cognitive load, several brain structures participate, including the Prefrontal Cortex, possibly supporting the optimization of the path, the Hippocampus, representing the location of the individual in space, and the Posterior Parietal Cortex, representing the available routes. It is broadly discussed whether the encodings by each structure happen separately or joined during the acquisition of this type of memory. It has been suggested that the synchrony of the activity among brain areas, known as functional connectivity, contributes to acquisition of spatial memory. It has been noted that functional connectivity between some brain areas changes with learning. However, it is unknown whether there is any variation of the synchronization between these three structures during the acquisition of spatial reference memory and, if so its possible connection with the strategies used to reach the objective. For this reason, we assessed brain electrical activity in vivo during the acquisition of spatial reference memory in the mPFC-HPC and mPFC-PPC circuits. We discovered that the coupling between low-frequency oscillations with high-frequency ones presents a substantial differentiation when the animal uses navigation strategies that require high cognitive demand as opposed to low cognitive demand strategies, without differences in the circuits studied through the acquisition of spatial reference memory.

KEYWORDS

Prefrontal Cortex – Hippocampus – Posterior Parietal Cortex – Local field potential – Spatial reference memory – Navigation strategies.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 LA FORMACIÓN DE LA MEMORIA ESPACIAL DE REFERENCIA COMO UNA FUNCIÓN COGNITIVA

La necesidad de buscar alimento, refugio, reproducción, entre otras, son necesarias para la supervivencia de los sujetos en el medio ambiente. Navegar con éxito en este entorno depende de la capacidad de comprender e interpretar las señales ambientales (exteroceptivas e interoceptivas), mapas y puntos de referencia, que suelen ser dinámicos (1). Así, la creación de posibles mapas cognitivos (2) que sean idóneos de representar la información espacial es fundamental para la capacidad de orientación espacial de los sujetos. Sin embargo, el navegar y localizar con éxito lugares relevantes no es una conducta simple que solo requiere de los estímulos perceptuales, sino que corresponde a una conducta orientada a metas. Este tipo de conductas generan respuestas probabilísticas, generalizadas, prospectivas, autogeneradas y flexibles (3), por lo que se conocen como procesos u operaciones cognitivas de alto orden. Se ha postulado que este tipo de conductas requieren de la sincronización y coordinación transitoria de varios procesos cognitivos discretos, como por ejemplo la atención, la memoria a largo plazo, el control inhibitorio, la capacidad de establecer contingencias, la planificación, la flexibilidad cognitiva y la memoria de trabajo (4).

Este tipo de memoria que involucra la localización espacial de lugares relevantes en el medio ambiente y las posibles maneras de llegar a ellos, se denomina **memoria espacial de referencia** (MER). Existen algunos criterios relevantes para diferenciar las formas de adquirir la MER: el tipo de información, el marco de referencia, el tipo de memoria y el tiempo para su adquisición, los cuales se suelen agrupar en las estrategias de respuesta y de lugar (5). Cuando la adquisición del aprendizaje se basa en asociaciones sensoriales o motoras, utilizan marcos de referencia egocéntricos (utilización de la propia posición en el espacio y su relación con señales fuera del organismo), donde la navegación se usa de manera secuencial o en encadenamientos de estímulos-respuestas, se habla de estrategias de respuesta o aprendizajes ("*response-learning*") (1,5–8). Por otro lado, cuando la adquisición del aprendizaje se basa en procesos de localización espacial permitiendo recrear un mapa topológico donde se utilizan marcos de referencia alocéntricos (retroalimentación de las señales internas del organismo), se habla de estrategias de lugar ("*place learning*") (1,5–8). Se propone que ambos tipos de estrategias o de marcos de referencia son necesarias para representar los aspectos espaciales y contextuales (6), y así durante las fases de adquisición de la MER, los organismos sean capaces de ajustar sus estrategias de navegación para optimizar la ruta hacia el objetivo (7), generando rutas óptimas y alternativas según las circunstancias, siendo este tipo de memoria un suceso flexible según los recursos y necesidades del sujeto (9).

La adquisición de la MER es una operación cognitiva ampliamente utilizada para evaluar el desempeño cognitivo tanto en humanos (10) como en roedores (11). En este ámbito, las pruebas conductuales más utilizadas en roedores son el laberinto acuático de Morris y el laberinto de Barnes (BM) (12), donde la MER se adquiere de manera progresiva mediante la exploración repetida en condiciones ambientales estables. La evidencia sugiere que, durante las sesiones de aprendizaje, los sujetos sometidos a estos paradigmas conductuales requieren de ambos marcos de referencia para aprender la localización del objetivo, lo que se manifiesta en la transición de estrategias no espaciales (relacionadas con la utilización de marcos egocéntricos) hacia estrategias espaciales de navegación (relacionados con la utilización de marcos alocéntricos) (13). Esta transición a través de estrategias refleja una navegación más eficiente durante el proceso de aprendizaje, lo que podría estar acompañado por la interacción diferencial entre distintas estructuras cerebrales (14).

3.2 ESTRUCTURAS CEREBRALES QUE SOPORTAN LA ADQUISICÓN DE LA MER

Considerando que el cerebro está constituido por redes neurales, donde varias regiones interactúan para llevar a cabo diversas operaciones, se puede asignar que algunas estructuras en particular soportan los diversos procesos cognitivos (3,15,16). La evidencia parece indicar que la adquisición de la MER necesita de la integración de al menos tres áreas particulares: la Corteza Prefrontal (PFC), el Hipocampo (HPC) y la Corteza Parietal Posterior (PPC) (17).

La PFC, corresponde a una corteza de asociación ubicada en el lóbulo frontal de los mamíferos (18) y se le connota un papel fundamental en el control del comportamiento dirigido a objetivos (19). Diversas condiciones, como lesiones traumáticas o enfermedades neurodegenerativas, han sustentado la relación entre la PFC y la disfunción de estas conductas complejas (18). Este último tiempo se ha prestado atención en cómo la PFC pudiese tener acceso a las experiencias pasadas (i.e memoria) para predecir de manera adecuada las acciones futuras (20). Si bien la PFC de los roedores no posee las mismas características anatómicas que los primates (20,21), diversas investigaciones establecen que la Corteza Prefrontal Medial (mPFC) refleja a nivel de red, las funciones anteriormente mencionadas en primates, siendo un homólogo, por lo cual los murinos son un modelo adecuado para el estudio de operaciones cognitivas (20,22). Se ha propuesto, que la mPFC y su acomodación adaptativa de la conducta, sería esencial para la selección de la estrategia más eficiente en la navegación y formación de la MER, por lo que la mPFC participaría en optimizar el recorrido de acuerdo con la situación (14,23).

Una de las estructuras con las cuales la mPFC presenta mayor conectividad directa, corresponde al HPC. En los humanos se ubica en las profundidades del lóbulo temporal medial, mientras que en roedores se encuentra bajo la neocorteza (24). Se cree que una de sus funciones principales es favorecer la memoria episódica, vinculándolos a un tiempo y lugar específicos (25). En estudios en modelos murinos, se ha visto que las lesiones en esta área producen que los animales tengan un déficit en el aprendizaje de tareas espaciales (24), especialmente en aquellas relacionadas con la utilización de la navegación alocéntrica (26). Por consiguiente, la evidencia parece indicar que el HPC se relaciona con la codificación de secuencias en el tiempo y espacio, lo que estaría soportado por la existencia de neuronas que representan la localización del sujeto en el espacio (mediante células de lugar, o *place cells*), lo cual es esencial para la MER (25).

Por otro lado, la PPC es una región asociativa ubicada en el lóbulo parietal (áreas de Brodmann 4,7,39 y 40 en humanos y área 7 en roedores) (27). De manera más detallada se considera una corteza de asociación sensorial, ya que se relaciona con la detección de cambios ambientales, tanto sensoriales como motores, siendo esencial para la adquisición de la memoria espacial basada en pistas egocéntricas (28–30). Se sugiere que la PPC participaría en la presentación de alternativas de rutas disponibles, mediante la capacidad de procesar e integrar aspectos espaciales del entorno del sujeto, tales como la orientación espacial (sistema de coordenadas: ejes del ojo, cabeza y cuerpo), el reconocimiento de objetos y el razonamiento abstracto, siendo de gran relevancia para la navegación (31) y la planificación de rutas (25,32). La PPC mantiene conectividad anatómica directa con la PFC, pero no con el HPC (33). Por lo tanto, se plantea un circuito tripartito en donde la mPFC es capaz de comunicarse de manera directa con el HPC y la PPC. (Fig 1.)

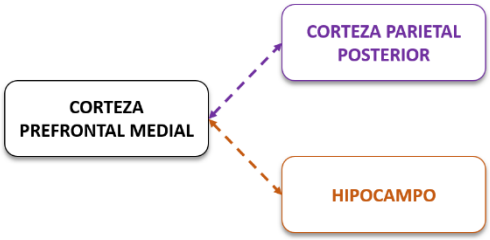

Figura 1. Circuito tripartito. Esquema representativo del circuito tripartito: mPFC-HPC-PPC.

Si bien las investigaciones hasta la fecha le connotan un rol preferente a cada área durante el proceso de adquisición de la MER, existen diversas perspectivas de como ocurriría esto durante el proceso. Por ejemplo, algunos estudios apoyan que el circuito mPFC-PPC estaría asociado a la implementación de la navegación egocéntrica, mientras que el circuito mPFC-HPC estaría asociado a la implementación de la navegación alocéntrica (34–36), y como la navegación egocéntrica emerge en las primeras etapas de la adquisición de la MER y la alocéntrica emerge en las etapas posteriores, es posible que existiese un reclutamiento diferenciado de estas estructuras a lo largo del aprendizaje. Por otro lado, otros investigadores son partidarios de que la codificación que hace cada circuito, aportando información multimodal y la construcción de los mapas espaciales (37) se realiza de manera paralela durante los días de adquisición de la MER (38).

Estas tres estructuras cruciales en la MER presentan conectividad estructural (32,39), lo que permitiría la comunicación entre ellas a través de las sinapsis, y con el tiempo podrían presentar modificaciones, proceso denominado plasticidad neuronal (40). Sin embargo, estos cambios ocurrirían en espacios temporales amplios y por lo tanto no explicarían la flexibilidad con la cual estas estructuras soportarían diversas operaciones cognitivas. Una posible respuesta es que estas tres estructuras no solo estén conectadas anatómicamente, sino que para los procesos que ocurren en escalas temporales mínimas la comunicación entre estas sería soportada por la sincronía de la actividad neuronal entre estas zonas actividad. Pero hasta el momento no se encuentra evidencia de que exista una conexión funcional entre la actividad eléctrica cerebral del circuito mPFC-HPC-PPC (41,42), tal como la evidencia respalda la sincronización entre el mPFC e HPC (14,23).

3.3 PROCESOS NEUROFISIOLÓGICOS QUE PARTICIPAN EN LA ADQUISICIÓN DE LA MER

Por mucho tiempo se ha pensado que las diferentes funciones cerebrales, como estados motores, perceptivos, de memoria o cognitivos, presentan una manifestación física en el cerebro, lo que se traduciría en que determinadas células o regiones cerebrales estarían destinadas a cumplir funciones específicas, lo que se conoce como engramas (43). Actualmente la hipótesis más aceptada manifiesta que estos mismos grupos específicos de neuronas pueden abarcar un amplio repertorio de funciones cerebrales, por medio de asociaciones y reactivaciones, conocidos como ensambles o conjuntos neuronales (44). La evidencia parece indicar que estos funcionan como sistemas distribuidos, donde conjuntos de diversas regiones del cerebro pueden apoyar diferentes aspectos (información) en el cálculo cerebral (45)(46,47)

Considerando la hipótesis anterior, la evidencia ha demostrado que la mPFC tiene la capacidad de representar múltiples conjuntos de información cognitiva, asociados principalmente a integrar diferentes atributos de un resultado u objetivo, como la selección de la opción adecuada, la valoración de recompensas y la proyección de eventos futuros (prospección) (48,49). Por otro lado, las neuronas del HPC exhiben disparos específicos relacionados con a la ubicación espacial del sujeto, conocidas como células de lugar (50) y, a su vez, en conjunto con las "células de grilla" (*grid cells*), ubicadas en la corteza entorrinal, serian la base para formar el mapa cognitivo, representado un entorno determinado, permitiendo la navegación basada en la memoria por medio de un espacio mental y físico (51). Finalmente, la PPC se considera crucial en la MER en la representación de las rutas disponibles (29), posiblemente apoyando y acompañando los roles de la mPFC y el HPC. Sin embargo, por el momento se desconoce la conectividad entre estas tres estructuras para favorecer la adquisición de la MER.

Se sugiere que la comunicación dinámica de las distintas poblaciones neuronales se realizaría a través de la sincronización de los patrones de actividad cerebral de las áreas involucradas en el proceso (16,52). Estos patrones de actividad, que se puede registrar por medio de electrodos intracerebrales, se

observan como cambios de voltaje rítmicos de baja frecuencia (menor a ~ 500 Hz), conocida como potencial de campo local (LFP)(53,54). La forma del LFP, en su amplitud y frecuencia, depende de las fuentes que le contribuye, principalmente por la actividad sináptica, -como también pueden contribuir los potenciales de acción rápidos, picos de calcio, corrientes y resonancias intrínsecas, entre otras-, junto con las propiedades de tejido cerebral (53). Si bien el LFP es una manifestación extracelular que ocurre por fenómenos intracelulares, cuando la actividad poblacional de las neuronas se sincroniza, se podría observar cómo variaciones periódicas en el voltaje extracelular, denominados oscilaciones o ritmos cerebrales (55). Los diferentes rangos oscilatorios se han establecido en base a su frecuencia en delta (1-4 Hz), theta (6-10 Hz), beta (20-30 Hz) y gamma (30-100 Hz) (en roedores). Normalmente se considera que las oscilaciones de alta frecuencia representan la actividad de poblaciones neuronales locales, mientras que las de baja frecuencia representan poblaciones neuronales distribuidas y más amplias (16). Además, se han observado diferentes bandas de frecuencia en determinadas estructuras y estados cerebrales, conservadas en diferentes especies (56). Por ejemplo, se ha propuesto que la actividad theta se presenta en tareas de alta demanda, como el control de la atención, creyéndose fundamental para el funcionamiento exitoso de la memoria (57); la actividad gamma rápida hipocampal se observa cuando los sujetos presentan atención a puntos de referencia externos para la navegación; o la actividad gamma lenta hipocampal se manifestaría cuando es necesario recuperar recuerdos almacenados (58). De igual importancia, una característica de las oscilaciones es que se pueden generar en ausencia de señales externas, es decir son autogeneradas, representando operaciones neuronales producidas por el mismo cerebro (16).

El LFP se puede volver relevante cuando se quiere estudiar los mecanismos que utiliza el cerebro para diferentes procesamientos, como la atención y memoria. A través de múltiples electrodos, se puede inferir la integración de la actividad de conjuntos neuronales (o poblaciones) en determinadas frecuencias, tanto en la misma área como áreas lejanas, de manera transitoria para la realización de un proceso cognitivo (15,54). La evidencia ha dejado entrever que estos procesos de integración, en frecuencias particulares, son fundamentales para la propagación de una señal y, por ende, la comunicación neuronal. La interacción entre dos o más áreas, lo que se denomina **conectividad entre redes**, parece facilitar y promover la transmisión de información Según la literatura se describen tres tipos de conectividad: estructural o anatómica, funcional y efectivas o eficaces (59). La conectividad anatómica es una de las primeras en establecerse, ya que se basa en los posibles tractos o vías que vinculan de manera física las diferentes regiones del cerebro. En base a esto, se podría asentar si estas estructuras conectadas se correlacionan en sus patrones neuronales de actividad oscilatoria en alguna frecuencia, fase y/o amplitud similar, denominado conectividad funcional (60,61). Y, por último, cuando se tiene presente la conectividad funcional entre las estructuras de estudio se puede determinar la influencia de un sistema sobre otro, en relación con el flujo de información, conocido como conectividad efectiva (60,62).

Una de las formas de evaluar si la actividad eléctrica cerebral entre dos o más áreas es razonablemente similar, por ejemplo, en alguna frecuencia de interés, es a través de la coherencia espectral. Este método cuantifica la frecuencia y amplitud de la sincronización de estos patrones de actividad oscilatoria (63,64) siendo una de las medidas más comunes utilizadas para tener una estimación global (59). Pero los últimos años la investigación se ha volcado a una integración más compleja de la información, donde al parecer existiría una jerarquía entre las oscilaciones en la integración a multiescala y se sugiere que las oscilaciones de baja frecuencia modulan la actividad en las grandes regiones, mientras que las oscilaciones de alta frecuencia modulan la actividad en pequeñas regiones, siendo la interacción entre estas oscilaciones un mecanismo de comunicación más complejo . El acoplamiento de frecuencia cruzada (CFC) de fase-amplitud posee diversas formas de cuantificar la dependencia estadística de como

la fase de un ritmo de baja frecuencia (como theta) sobre la amplitud de un ritmo de alta frecuencia (como gamma) seria esencial para relacionar eventos sensoriales o motores externos y procesos cognitivos internos como la atención y la memoria (65,66). Por último, una de las formas de estimar el retraso entre un área y otra, para evaluar cual tendería a liderar el flujo de información en una situación determinada, es a través de un método matemático más sencillo (en relación otros) que utiliza el LFP, denominado correlación cruzada de amplitudes, donde se necesita una conectividad funcional en algún rango de frecuencia específico y de interés (62).

Por lo anteriormente mencionado, postulamos que la conectividad entre las estructuras que soporten un proceso cognitivo, posiblemente en frecuencias particulares, sería un mecanismo que sustente la adquisición y ejecución de dichas funciones, y que, por lo tanto, cambios el en desempeño cognitivo se acompañan con cambios en la conectividad funcional entre estas estructuras cerebrales.

Por otro lado, no solo podrían existir bandas de frecuencias preferentes, sino que también algunas investigaciones apoyan que el momento de la utilización de estas, podría ser concordante con el uso de los marcos de referencia y las estructuras que la soportan. Es decir, la utilización de un marco de referencia egocéntrico, donde existe mayor rigidez evidenciado en el uso mayoritario de estrategias no espaciales, estaría apoyado por la PPC (34). Mientras que la utilización de un marco de referencia alocéntrico, donde existe mayor flexibilidad denotado por el mayor uso de estrategias espaciales, estaría apoyada por el HPC (35). A su vez, la PFC seria relevante para integrar ambos marcos de referencia (67). Por lo tanto, postulamos que la adquisición de la MER dependería del uso selectivo de los diferentes marcos de referencia, manifestado en el uso de las estrategias dependiendo de la situación, apoyado por la sincronía de los diferentes circuitos en frecuencias preferentes.

4. HIPÓTESIS Y/O PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

La transición de estrategias no espaciales a espaciales observadas durante la adquisición de la memoria espacial se asocia a un aumento en la conectividad funcional en los ejes mPFC-HPC y mPFC-PPC.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar los cambios de conectividad funcional en los circuitos mPFC-HPC y mPFC-PPC durante la adquisición de la memoria espacial de referencia y establecer su relación con las modificaciones en las estrategias de navegación.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

i. Identificar las modificaciones de las estrategias de navegación espacial durante la adquisición de la MER.
ii. Analizar la conectividad funcional en los circuitos mPFC-HPC y mPFC-PPC durante la adquisición de la MER.
iii. Establecer la asociación entre la conectividad funcional en el circuito PFC-HPC-PPC según las modificaciones de estrategias, durante la adquisición de la MER.

6. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se analizaron los registros de actividad eléctrica cerebral de la mPFC, HPC y PPC durante los días de adquisición del protocolo del Laberinto de Barnes (BM) (*in vivo*), en el modelo murino C57BL/6j machos crónicamente implantados (Fig. 2). La muestra, construcción de arreglos de multielectrodos (MEAs), cirugía estereotáxica de implante de MEA, registro de actividad cerebral, ejecución del test conductual, y análisis histológico fueron realizadas por otros investigadores del laboratorio de neurofisiología cognitiva, tras la unidad de investigación de Lorena Chacana Veliz y la investigación del Dr. Ignacio Negrón-Oyarzo, junto a otros experimentos realizados por la postdoctorante Dra. Francisca García Rojas.

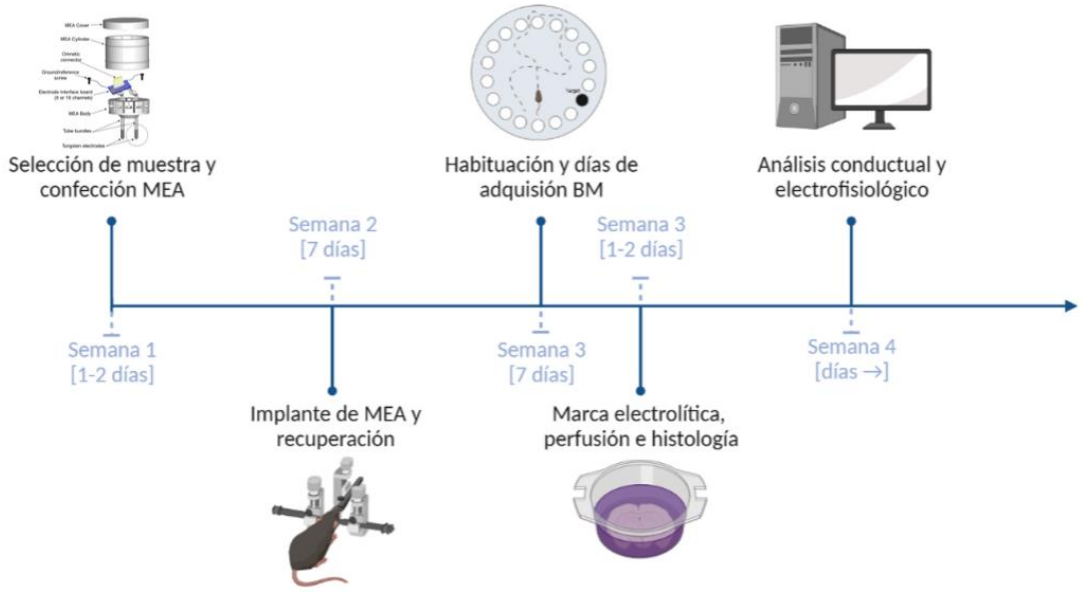

Figura 2. Diseño experimental. Esquema representativo de la cronología de los experimentos, desde la la confección del MEA hasta el análisis de datos conductuales y electrofisiológicos.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 MUESTRA

Se utilizaron 12 ratones macho C57BL/6j entre 60 y 90 días de edad. Solo 10 de ellos fueron incluidos en los análisis electrofisiológicos. Los animales fueron mantenidos en jaulas en el bioterio bajo condiciones estándares a 22°C de temperatura, 40-60% de humedad relativa, agua y alimento *ad libitum*. El procedimiento experimental relacionado con los animales fue aprobado por el Comité Institucional de Bioética para la investigación con Animales de la Universidad de Valparaíso (CIBICA) (código de protocolo: BEA178-22). Durante el desarrollo de los experimentos, se realizaron los esfuerzos para minimizar el número de animales utilizados y disminuir el sufrimiento del animal.

7.2 ARREGLO DE MULTIELECTRODO (MEA)

Los MEAs fueron construidos en el laboratorio, con la finalidad de registrar la actividad cerebral. Por cada MEA se utilizaron 16 electrodos de registro compuestos de alambres de tungsteno (diámetro de 50 µm, 304v; Component Supply Co.); 8 para registro en la mPFC, 4 para el HPC y 4 para la PPC hemisferio derecho, cada uno de los alambres fue anclado a uno de los canales de la placa EIB de 16 canales (EIB-16: 16 Channel Electrode Interface, Neuralynx). Como referencia y tierra se instalaron 2 alambres de acero inoxidable (0,003, Satinl steel, A. M Systems) conectados a tornillos de 1,57 mm de longitud (MX-000120-01S; Miniature Stainles Steel Slotted Flat Head Machine Screws) anclados al cráneo. Se verificó la impedancia de cada electrodo utilizando el amplificador de señal electrofisiológica (INTAN) en suero fisiológico registrando que presenten una medida entre los 0.1-1 MOhm. Cada MEA tiene un peso de aproximadamente 3 gr.

7.3 IMPLANTACIÓN DEL MEA

Cada MEA fue previamente esterilizado (etanol 70%). Los animales fueron anestesiados por inhalación de una mezcla de isoflurano/oxígeno (3% de isoflurano en la caja de inducción y 1-2% de mantención de anestesia; vaporizador modelo R580; RWD Life Sciences). Una vez anestesiados se posicionaron en el marco estereotáxico y su temperatura se mantuvo con una manta térmica; se realizó una craneotomía de 0.5 mm de diámetro por sobre la mPFC y el HPC (coordenadas estereotáxicas Bregma: -1.94 mm AP, +0.5 mm DL para la mPFC; +1.94 mm AP, +1.5 mm DL para el HPC y la PPC (68)). El MEA fue posicionado en la superficie del cráneo para que los electrodos ingresen por las craneotomías. El electrodo se insertó en la mPFC, el HPC y la PPC a una velocidad de aprox. 0.3 mm cada 5 min hasta alcanzar la profundidad deseada en el eje dorsovental. Una vez en posición, el MEA se fijó al cráneo con tornillos y cemento dental. Para finalizar, los animales se retiraron del marco estereotáxico, y se les permitió despertar de la anestesia. Posterior a ello, los animales fueron mantenidos en jaulas individuales en la sala de mantenimiento. Los ratones implantados se almacenaron en jaulas individuales hasta que finalizó el experimento. Los ratones fueron sometidos a un cuidado post-quirúrgico que incluyó suplemento alimenticio (DietGel® Boost; Lab Diet), analgésicos (ketoprofeno) y antibióticos (enrofloxacino) durante al menos una semana.

7.4 EVALUACIÓN CONDUCTUAL

Posterior al implante y su respectiva recuperación, cada animal fue transportado en su jaula hacia la sala de procedimientos conductuales, donde se les permitió la habituación durante 30 minutos; esta sala contempla una temperatura (22 ± 2 °C) y humedad (40-50 %) controlada, y un aislamiento sonoro (intensidad menor a 40dB; medido con sonómetro Prosik, modelo MT4018). Posterior a la habituación, los animales fueron sometidos a la evaluación de la memoria espacial de referencia mediante la prueba de BM (69). El laberinto consistió en una plataforma circular blanca de 70 cm de diámetro elevada a 70 cm del

suelo, iluminada en el centro (600 lux de intensidad lumínica); la plataforma contempló 16 agujeros equidistantes a lo largo del perímetro (9 cm de diámetro cada uno), solo uno de estos agujeros contenía una caja-escape bajo la plataforma (17x8x8 cm), que permite el ingreso del animal con el implante. Además, se ubicaron señales visuales (Fig. 3) en las cuatro paredes de la habitación (circulo, estrella, triangulo y cuadrado). La prueba de evaluación conductual fue orientada a una tarea espacial, aprendizaje por lugar, donde la caja-escape se encontró en una posición fija para cada ratón, pero aleatoria entre los distintos ratones evaluados. La prueba consistió en que el animal, conectado al amplificador de registro de señal cerebral, navegó libremente por la plataforma hasta encontrar la caja-escape, para aquello fueron entrenados con 20 sesiones de adquisición de la MER, distribuidas en cuatro sesiones por día, durante cinco días consecutivos, con intervalos inter-sesión de 15 minutos (esperaron en su jaula) (Fig. 3). En cada sesión, los animales fueron posicionados en el centro del laberinto cubiertos por una caja, con las luces apagadas, durante un minuto (Fig. 3. Etapa inicio); posterior a esto la luz fue encendida y la caja fue retirada, permitiendo la libre navegación (Fig. 3. Etapa navegación) hasta que el animal entró en la caja-escape. En caso de que transcurrieran tres minutos y el animal no hubiese ingresado, el experimentador lo guio hasta el agujero correspondiente; el animal una vez en la caja-escape fue vuelto a tapar con la caja (Fig. 3. Etapa meta), se apagaron las luces, hasta que transcurra un minuto, para luego desconectar al animal y contabilizar el intervalo de 15 minutos de descanso. Posterior a los cinco días de entrenamiento, el sexto día, se realizó una recuperación de memoria, consistente en una única sesión (con las mismas características de la etapa de entrenamiento) donde no se encontró la caja-escape, por lo que, se evaluó la permanencia del animal en la cercanía del agujero, midiendo la memoria de referencia. Al finalizar cada prueba conductual el laberinto fue limpiado con etanol al 70%, con el fin de evitar sesgo basado en señales olfativas. Cada sesión fue rastreada y registrada con una cámara web (adquisición a 30 FPS y 640x480 píxeles, modelo de cámara C920, Logitech Co.) ubicado a 1,5 m por encima del laberinto y controlado con el software Virtual Dub. Los videos fueron almacenados en un disco duro para el análisis fuera de línea.

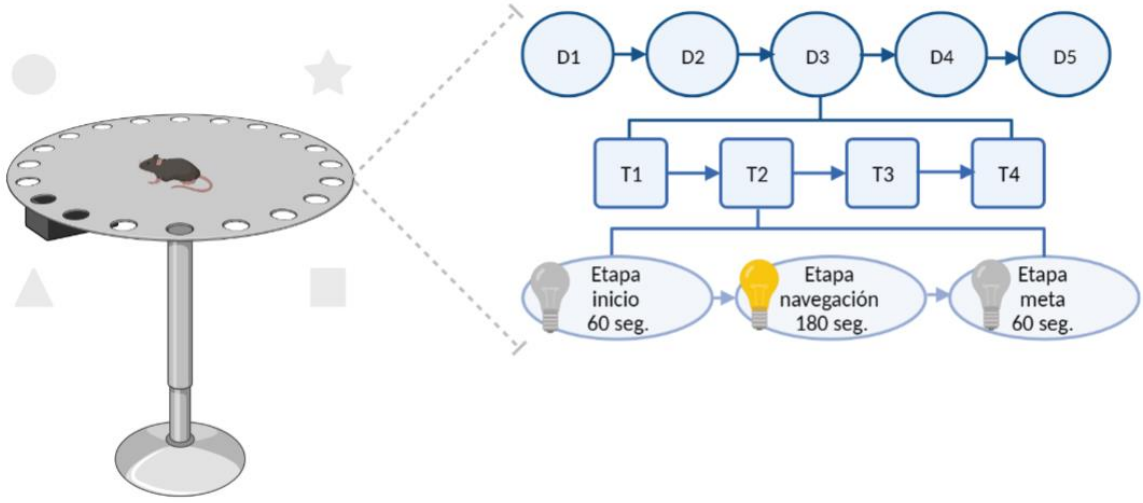

Figura 3. Diseño procedimental del BM. Ilustración de la plataforma y señales visuales, y ejemplificación de la aplicación del protocolo conductual desde la cantidad de días (Ej: D1), intentos (Ej: T1) y las tres etapas (inicio, navegación y meta).

7.5 REGISTRO

Durante todas las sesiones de evaluación conductual, descritas anteriormente, la placa de interfase (EIB) del MEA fue conectada a un headstage (modelo RHD2132 INTAN Tech, CA, EE. UU.) y este, a través de un cable SPI (3 mt de largo; INTAN Tech) se conectó a un amplificador de registro (sistema de evaluación RHD2000, INTAN Tech, CA, EE. UU.). El registro de actividad cerebral se digitalizo, se amplifico a 1000x, y se adquirió a una tasa de muestreo de 20 kHz, y fue filtrada entre 0.1 a 4000 Hz.

7.6 HISTOLOGÍA

Después de completar los experimentos, los ratones fueron anestesiados con isofluorano al 1% y se marcó la ubicación de cada electrodo por medio de corriente eléctrica de 50 µA durante 10 segundos mediante una fuente de aislamiento de estímulo (WPI A365, Stimulus isolates). Al día siguiente, los ratones fueron anestesiados con isofluorano (3%) y se perfundieron transcardiacamente con 45 ml de solución salina seguido de 45 ml de paraformaldehído al 4% en solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH=7,4). Se extrajo el cerebro, se incubó durante la noche en paraformaldehído al 4% en PBS y luego se almacenó en PBS y azidasódica al 0,2%. Se prepararon las rebanadas de cortes coronales de cerebro (40 µm) a partir de cerebros fijados con paraformaldehído en criostato (Cryostat Kedee KD 2950 zhengiang jinhua kedi instrumental equipment Co., Ltada.). Las secciones fueron montadas en Entellan y teñidas con tinción de Nissl. Las imágenes de cortes coronales del cerebro se adquirieron con microscopio confocal.

7.7 ANÁLISIS DE DATOS

7.7.1 CONDUCTA DEL ANIMAL

Las tres etapas del BM para cada animal fueron grabadas en video, para que posteriormente la posición del animal durante la etapa de navegación fuese determinada automáticamente por el software de seguimiento ANY maze (Stelting Co.). Mediante esto cuantificar la eficiencia del aprendizaje de los animales utilizando los parámetros específicos como:

- Latencia (segundos): tiempo que el animal tarde en ingresar al agujero de escape (latencia total). Tiempo que el animal tarda en hacer contacto por primera vez con el agujero que contiene la caja-escape (latencia primaria).
- Errores (conteo): número de puntadas nasales en agujeros sin escape durante la duración completa del intento (errores totales). Número de puntadas nasales en agujeros sin escape antes de hacer por primera vez la puntada nasal en el agujero que contiene la caja-escape (errores primarios).
- Distancia recorrida (metros): espacio que recorre el animal antes de ingresar al agujero que contiene la caja-escape (distancia total). Espacio que recorre el animal antes de que haga contacto por primera vez con el agujero que contiene la caja-escape (distancia primaria).
- Eficiencia de la trayectoria (longitud real/longitud óptima): relación entre la longitud del camino óptimo hacia el agujero que contiene la caja-escape y la longitud del camino real tomado hacia el agujero que contiene la caja-escape, durante toda la duración del intento (eficiencia de la trayectoria total). Relación entre la longitud del camino óptimo hacia el agujero que contiene la caja-escape y la longitud del camino real tomado hacia el agujero que contiene la caja-escape, hasta el primer contacto con el agujero escape (eficiencia de la trayectoria primaria).

Durante la navegación los animales suelen evidenciar diferentes estrategias para encontrar el agujero de escape, lo que podría estar asociado con el uso de las diferentes áreas de estudio. Es por esto por lo que, para complementar la comprensión del comportamiento de los animales se evaluaron las estrategias

utilizadas, mediante la implementación de la herramienta de clasificación de estrategia imparcial del laberinto de Barnes (BUNS), descrita en Illouz et al., 2016. Por medio de la función máquina vectorial de soporte (SVM) en MATLAB, se ingresaron las coordenadas del animal obtenidas en ANY-maze, convirtiéndolas en coordenadas cartesianas, caracterizando diferentes aspectos de la trayectoria del animal hasta el primer contacto con el agujero que contiene la caja-escape. Dichos archivos fueron ingresados y ajustados a los requerimientos del detector BUNS, el cual clasificó las estrategias no espaciales a altamente espaciales, de acuerdo con las siguientes descripciones (Fig. 4):

- Aleatoria: cuando el animal viaja de manera azarosa por el entorno hasta encontrar el agujero que contiene la caja-escape.
- Seriada: el animal viaja de agujero en agujero (adyacentes) hasta encontrar el agujero que contiene la caja-escape.
- Búsqueda enfocada: donde el animal realiza un escaneo localizado de la región (cuadrante) donde se encuentra el agujero que contiene la caja-escape.
- Corrección larga: donde el animal va a un agujero contrario y debe re-angular para ir de manera directa al agujero que contiene la caja-escape.
- Corregida: donde le animal realiza una modificación menor a su trayectoria (ir al agujero próximo, antes del agujero que contiene la caja-escape.).
- Directa: donde se utiliza la trayectoria lo más corta posible para llegar al agujero que contiene la caja-escape.

Todos los resultados entregados por el detector de estrategias fueron comparados con un registro de inspección visual de las estrategias para detectar posibles errores.

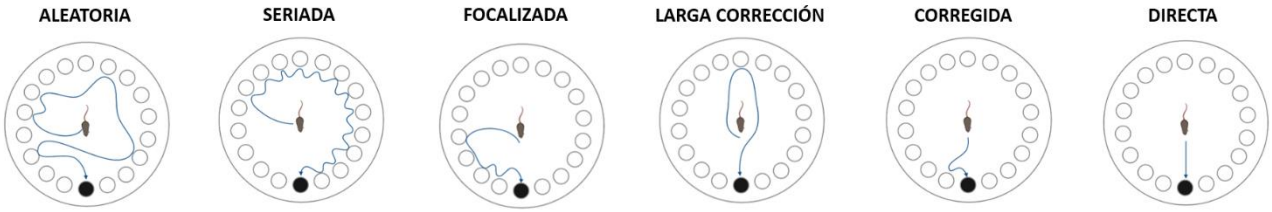

Figura 4. Ilustración de las diferentes trayectorias según la estratagia utilizada en el BM.

Los parámetros primarios para cuantificar la eficiencia del aprendizaje también fueron diferenciados según las estrategias de navegación utilizadas por los animales y en agrupaciones de estrategias no espaciales (NS) (consideradas como: aleatoria y seriada) y espaciales (S) (consideradas como: focalizada, larga corrección, corregida y directa).

Además, se calificó con un valor numérico no arbitrario el rendimiento del animal en el BM, obteniendo una escala de puntuación para las diferentes estrategias de navegación según la necesidad y relevancia para el aprendizaje durante la navegación especial hasta el primer contacto con el agujero que contiene la caja-escape, donde: Directa= 1 punto; Corregida= 0,75 puntos; Corrección larga= 0,5 puntos; Búsqueda enfocada= 0,5 puntos; Seriada 0,25 puntos; Aleatoria= 0 puntos.

7.7.2 ELECTROFISIOLÓGICO

Cada registro de actividad cerebral obtenido desde la mPFC, el HPC y la PPC durante los experimentos conductuales fue sometido a la reducción de su tasa de adquisición (*downsampling*, a 1000 Hz) y eliminación de posibles artefactos. Luego se realizó el análisis, en ventas de tiempo (segmentos de 5000 o 2000 ms), de la densidad espectral de potencia (PSD), análisis de la coherencia espectral (COH), medición de acoplamiento de frecuencia cruzada (CFC) y una predicción de direccionalidad mediante Causalidad de Granger (GC). Estos parámetros se evaluaron por cada día la adquisición de la MER en sus diferentes etapas: inicio (ST), navegación: antes del primer contacto con el agujero que contiene la caja-escape (BN) y después del primer contacto con el agujero que contiene la caja-escape (AN) y meta (GL), para cada circuito mPFC-HPC y mPFC-PPC, utilizando la caja de herramientas Chronux (http://www.chronux.org) (70) en el software MATLAB. Para los análisis de la actividad cerebral se consideraron los siguientes aspectos:

Poder y coherencia espectral del LFP. Para poder relacionar la actividad cerebral, en bandas oscilatorias específicas, y el comportamiento, se realizó una descomposición del LFP para así cuantificar los cambios de potencia de la señal en bandas de frecuencia específicas de interés, que son representadas como perturbaciones elevadas desde la actividad eléctrica de fondo, conocido como PSD (71). Para esto, posterior a la reducción de la tasa de adquisición se utilizó el análisis de Fourier (función *fourierp_lan*), donde se representó la proporción de potencia total de la señal aportada por cada componente de frecuencia de la señal de voltaje, correspondiente a (72):

$$S_{Yy}(f) = \Delta \sum_{\tau=-\infty}^{\infty} rYy(\tau)e^{-i2\pi f\tau\Delta}$$

Para medir la conectividad funcional, es decir, si las regiones cerebrales de interés tenían un dominio en alguna frecuencia, fase y/o amplitud en el contenido de su actividad, aumentando la probabilidad de estar conectadas entre sí, se utilizó para cuantificar de manera global el método matemático de COH (función *lan_coherence*). De esta manera se le otorgo un valor numérico a la frecuencia y amplitud para medir la sincronía en de los patrones de actividad eléctrica neuronal entre los circuitos mPFC-HPC y mPFC-PPC. La magnitud de la COH entre dos señales es una función de frecuencia, donde estadísticamente si los conjuntos de datos entre estas dos áreas en la señal de entrada se correlacionan positivamente, serian coherentes, tienen un valor cercano o como máximo de uno. Mientras que, si los conjuntos de datos entre estas dos áreas no se correlacionan significativamente, no serían coherentes, tienen un valor cercano o como mínimo de cero (60). La COH entre dos señales "*x*" e "*y*" (C_{xy}) es se define como el producto de la densidad espectral de la primera señal por el complejo conjugado de la segunda seña, donde ambas señales normalizadas ($S_{xy}(\omega)$), dividido en la raíz cuadrada del producto de la densidad espectral de cada una de las señales ($S_{xx}(\omega)$, $S_{yy}(\omega)$), como lo representa la siguiente ecuación:

$$C_{xy}(\omega) = \frac{S_{xy}(\omega)}{\sqrt{S_{xx}(\omega) * S_{yy}(\omega)}}$$

Para el cálculo del PSD se dividió el LFP en segmentos de 5000 ms con un solapamiento de 500 ms y un producto de ancho de banda temporal (TW) de 3 y 5 *tapers.* Mientras que para el cálculo de la COH los potenciales de campo se dividieron en segmentos de 2000 ms con un solapamiento de 100 ms y un

producto de TW de 5 y 9 *tapers*. Tanto para el PSD como la COH se consideraron las medias para las bandas theta (6-12 Hz), gamma lento (30-45 Hz) y gamma rápido (60-80 Hz) para todos los días de adquisición y por separado para las etapas ST, BN, AN y GL de la prueba BM.

Acoplamiento de frecuencia cruzada. Como segunda medida de conectividad funcional se utilizó un método más específico, donde se postula que la interacción entre las diferentes bandas de frecuencia puedan dar pie a una regulación más compleja, conocida como CFC. Este método de fase-amplitud se basa en la relación estadística entre los ritmos de baja frecuencia (como theta) y la amplitud de un ritmo de alta frecuencia (como gamma) de la actividad eléctrica cerebral (65), donde la amplitud del ritmo de alta frecuencia es modulada o contenido en la fase del ritmo de baja frecuencia. Es por esto por lo que se aplicó la medición de CFC mediante el *toolbox ModIndex toolbox* (73).

Para el cálculo de CFC se utilizó la medida de índice de modulación (MI), donde se le otorga un valor numérico, para cuantificar la intensidad de esta conexión al acoplamiento de fase-amplitud entre dos rangos de frecuencia diferentes. Como se representa gráficamente en la Fig. 5, mientras menor sea el acoplamiento, menor será su MI; a mayor acoplamiento, mayor su MI. Para esto, como menciona Tort et al. (2010) se utiliza el LFP filtrado en los rangos de frecuencia para la oscilación que actuara como fase y la de amplitud. Las series temporales de la fase y la amplitud ya filtradas se calculan por medio de la transformada de Hilbert. Posterior a esto se construye las series temporales de la amplitud de la fase para obtener su media sobre las series temporales de la fase. Si existe un acoplamiento de fase-amplitud entre las señales se denota una desviación en la distancia ("D_{KL}") de la distribución uniforme ("U") frente a la distribución de una amplitud ("P") por un log, lo que se le otorgó un valor entre 0 y 1, mientras mayor el MI mayor es el acoplamiento fase-amplitud entre las frecuencias y áreas de interés, como lo representa la siguiente ecuación (13):

$$MI = \frac{D_{KL}(P, U)}{.\log(N)}$$

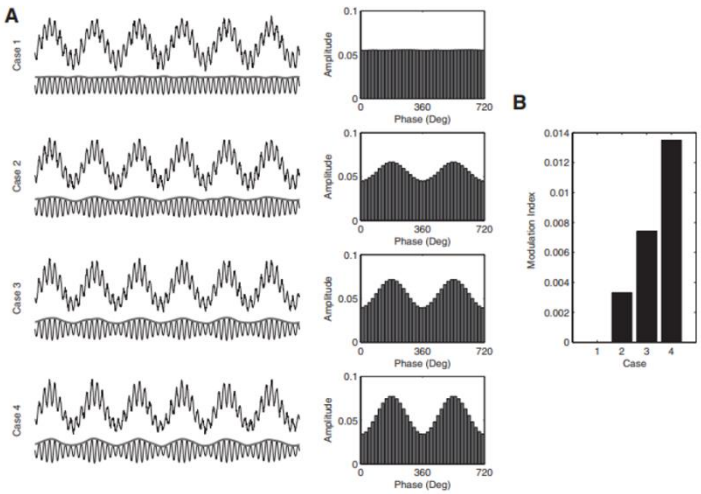

Figura 5. Índice de modulación. Ilustración gráfica recuperada de Tort et al (2010)**.** Parte A: La modulación de los rítmos de ata frecuencia (parte de arriba de cada caso) en relación con los rítmos de baja frecuencia (parte de debajo de cada caso), de superior a inferior muestra menor a mayor acomplamiento. Parte B: El acomplamiento mayor de fase-amplitud muestra un índice de modulación mayor.

Causalidad de Granger. Para la conectividad efectiva se utilizó una predicción de direccionalidad, donde se busca detectar la causalidad entre dos señales registradas simultáneamente mediante el *toolbox MVGC*. La predicción ($F_{y\to x}$) de una serie temporal (x) puede verse reflejada en la medición de una segunda serie temporal (y) en un modelo de regresión (modelo *Verctor AutoRegressive* (VAR)), por lo que si la segunda ($\sum_2$) serie temporal tiene un reflejo de la primera ($\sum_1$) se habla que existe una "causalidad de Granger" de la primera serie sobre la segunda. Si la predicción de la señal "x" se mejora incorporando los valores de la señal "y", tiene una influencia causal en "x", como lo refleja la siguiente ecuación (74,75):

$$F_{y\to x} = En\frac{\sum_2}{\sum_1}$$

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para la comparación entre los parámetros de comportamiento (latencia, errores, distancia y eficiencia de la trayectoria) se realizó un ANOVA de dos vías seguido del análisis *post hoc* de Bonferroni, al igual que el puntaje cognitivo. Por otro lado, los datos no paramétricos de estrategias se realizaron mediante el ANOVA de una vía y una prueba de U de Mann-Whitney para los grupos no espaciales (NS) y espaciales (S).

Para los datos electrofisiológicos de COH, CFC y GC se realizó un ANOVA de dos vías seguido del análisis *post hoc* de Bonferroni, además se realizaron las comparaciones entre la media de los días, etapas y/o grupos del mismo y entre circuito según corresponda. Para los datos de las comparaciones electrofisiológicas entre grupos de estrategias se utilizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

Los análisis estadísticos y gráficos se realizaron con el software Graphpad Prism 8.0.1 y en algunas circunstancias con MATLAB. Se aceptaron diferencias significativas en $P < 0,05$ para todos los análisis estadísticos.

9. RESULTADOS

9.1 RENDIMIENTO CONDUCTUAL Y ESTRATEGIAS DE NAVEGACIÓN DURANTE LA ADQUISICIÓN DE LA MEMORIA ESPACIAL DE REFERENCIA.

Para evaluar la conducta medimos diferentes parámetros que van asociados al desempeño que tiene el animal al momento de recorrer el laberinto de Barnes (BM). De la Fig. 6A a la Fig. 6E podemos ver el tiempo de permanencia (por medio de un mapa de calor) que pasa el animal en diferentes partes del laberinto, y como se reduce el tiempo de permanencia en los lugares alejados del agujero que contiene la caja-escape a medida que pasan los días de adquisición del BM.

Para valorar el rendimiento conductual del animal a medida que los días de adquisición pasaron se consideraron parámetros totales y primarios:

Los parámetros totales, es decir, hasta que el animal ingresó al agujero que contiene la caja-escape o bien se hayan terminado los 180 segundos de navegación, se utilizaron parámetros como: latencia total (Fig. 6A), errores totales (Fig. 6H), distancia total (Fig. 6J) y eficiencia de la ruta total (Fig. 6L). La latencia total (tiempo en que el animal tarda en ingresar al agujero que contiene la caja-escape o hasta que terminen los 180 segundos de navegación) muestran una disminución progresiva significativa del tercer día respecto al quinto día de adquisición ($F_{(4,55)} = 3.466$; $P = 0.0135$, ANOVA de una vía, Fig. 6F). Mientras que los errores totales (cantidad de puntadas nasales que el animal hace en agujeros que no contienen la caja-escape hasta que ingresa a ella o termina el tiempo total de la navegación) presentan una tendencia a la disminución no significativas entre el primer y último día de adquisición de la memoria espacial de referencia (MER) ($F_{(4,55)} = 1.476$; $P = 0.222$, ANOVA de una vía, Fig. 6G). La distancia total recorrida (cantidad de metros recorridos hasta que el animal ingresa al agujero que contiene la caja-escape o se terminan los 180 segundos de navegación) también muestra una tendencia a la disminución del primer hasta el quinto día del protocolo ($F_{(4,55)} = 0.687$; $P = 0.604$, ANOVA de una vía, Fig. 6H). Por el contrario, la eficiencia de la ruta total (relación entre el camino óptimo y el utilizado para ingresar al agujero que contiene la caja-escape o hasta que se termine el tiempo máximo de la navegación) denota una mejora, sin llegar a ser significativa, a medida que pasan los días de adquisición de la MER ($F_{(4,55)} = 0.624$; $P = 0.646$, ANOVA de una vía, Fig. 6L).

Por otro lado, los parámetros primarios, es decir, hasta que el animal hizo contacto por primera vez con el agujero que contiene la caja-escape, denominados como: latencia primaria (Fig. 6G), errores primarios (Fig. 6I), distancia primaria (Fig. 6K) y eficiencia de la ruta primaria (Fig. 6M), muestran una tendencia no significativa a mejorar desde el primer al último día de adquisición del BM. En conjunto, estos datos sugieren que los animales generaron una adquisición de la memoria espacial de referencia por la progresión de parámetros conductuales relevantes durante los días de adquisición del protocolo.

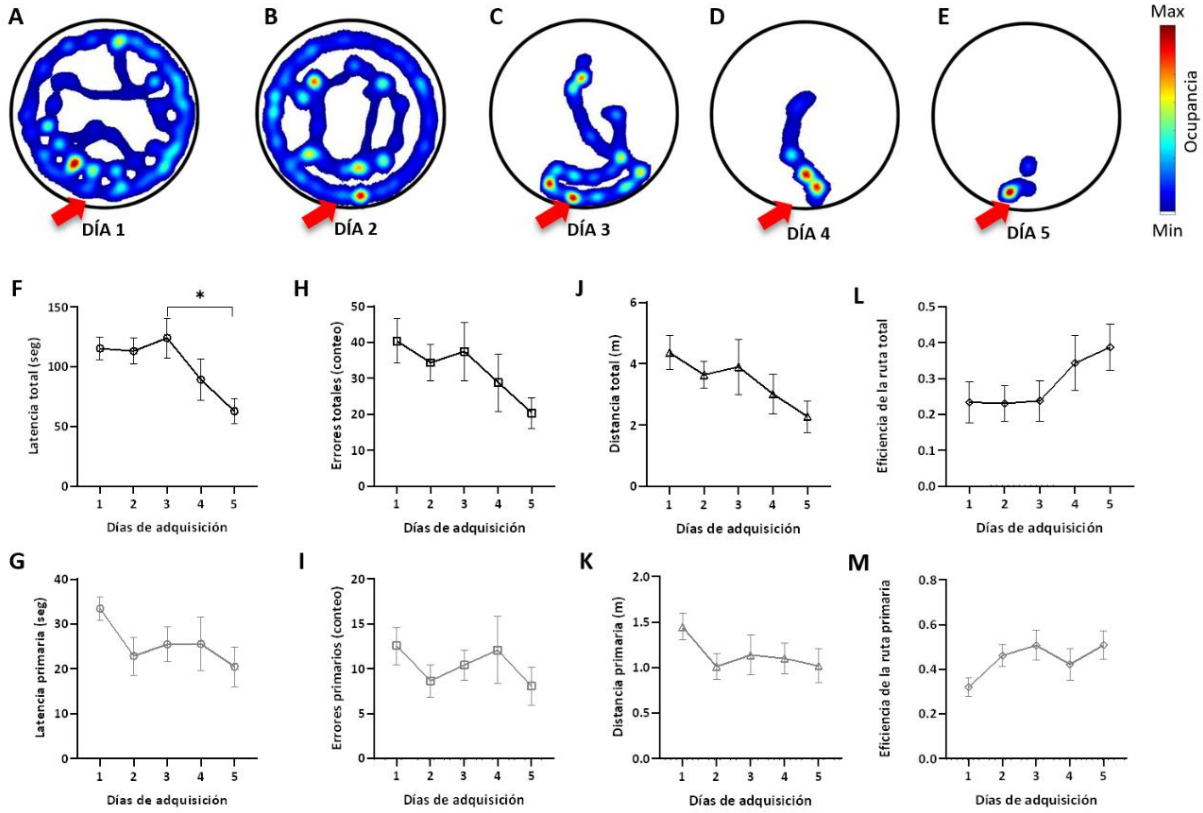

Figura 6. Rendimiento conductual durante la adquisición de la MER. (A-E) Ejemplo representativo de mapas de ocupancia para cada día de adquisición (Codigo de la muestra: FG10), flecha rojo indica el lugar del agujero que contiene la caja-escape. **(F)** Latencia de escape total promedio por día durante la adquisión (*P < 0.05; Prueba de comparación múltiple de Benferroni despues de ANOVA unidireccional; n = 12 animales, 240 ensayos). **(G)** Latencia de escape primaria, **(H)** Conteo de errores totales y **(I)** primarios, **(J)** Distancia total recorrida y **(K)** primaria, **(L)** Eficiencia de la ruta total y **(M)** primeria (Para G a M, P > 0.05; Prueba de comparación múltiple de Benferroni despues de ANOVA unidireccional; n = 12 animales, 238 ensayos). Los datos se presentan con media ± SEM.

Para idenficiar las modificaciones en las estrategias de navegación durante la adquisión de la memoria espacial de referencia (MER), se detectaron 6 estretegias diferentes para alcanzar el objetivo, que van desde estrategias que no utilizan las señales espaciales para locarlizar el agujero que contiene la caja-escape (aleatoria y seriada), hasta estretegias que utilizan las señales distales para localizar el agujero que contiene la caja-escape (focalizada, larga corrección, corregida y directa). Como se muestra en el mapa de ocupancia de la Fig. 7A-F un ejemplo representativo para cada una de las estretegias consideradas en la etapa de navegación hasta el primer contacto del agujero que contiene la caja-escape, etapa denominada como antes del primer contacto (etapa BN). En la Fig. 7G se pueden ver las estretegias utilizadas por día de adquisición durante la etapa BN del laberinto, donde a medida que los días pasaban hubo una progresión hacia el uso de estretagias más eficiencia para resolver la tarea. Esto último se puede ver reflejado en una tendencia al aumento en el puntaje cognitivo por tanto transcurren los días de adquisión ($F_{(4,55)} = 1.535$; P = 0.204, ANOVA de una vía, Fig. 7H).

Por definición, las estretagias que utilizan señales espaciales para localizar el objetivo disminuyen algunos parametros primarios como el tiempo utilizado ($F_{(5,218)} = 35.20$; $P = 0.0001$, ANOVA de una vía, Fig. 7I), la cantidad de errores cometidos ($F_{(5,226)} = 30.71$; $P = 0.0001$, ANOVA de una vía, Fig. 7J) y la distancia recorrida ($F_{(5,223)} = 38.19$; $P = 0.0001$, ANOVA de una vía, Fig. 7K), siendo significativos entre la estretegias con puntajes cognitivos más distantes, alteatoria y directa (****$P < 0.0001$, comparación multiple de Benferroni, Fig. 7I-L). Estos resultados sugieren que los animales muestran tendencia a utilizar estretegias asociadas a una mayor eficiencia para alcanzar el objetivo, a medida que avanzan los días de adquisición.

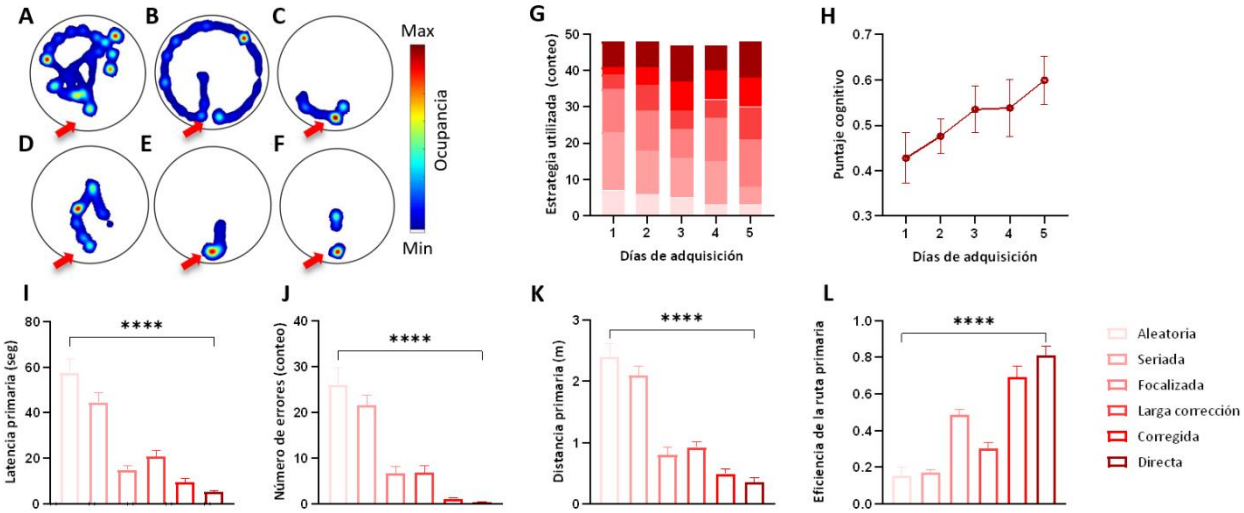

Figura 7. Estrategias de navegación durante la adquisición de la MER. (A-F) Ejemplo representativo de mapas de ocupancia para las estrategias de navegación detectadas (Codigo de la muestra: LC39), flecha rojo indica el lugar del agujero que contiene la caja-escape; los colores cálidos muestran mayor tiempo de ocupancia, mientras que los colores fríos muestra menor tiempo de ocupancia en el laberinto: **(A)** estrategia aleatoria, **(B)** estrategia seriada, **(C)** estrategia focalizada, **(D)** estrategia de corrección larga, **(E)** estretagia corregida y **(F)** estretegia directa. **(G)** Grafico de barras superpuestas por día de adquisición con el conteo de cada estrategia utilizada. **(H)** Puntuaciones cognitivas por día de adquisición. **(I)** Latencia primaria **(J)** Errores primarios **(K)** Distancia primaria y **(L)** Eficiencia de la ruta primaria, por estretgia utilizada (****$P < 0.0001$; Prueba de comparación múltiple de Bonferroni despues de ANOVA unidirecciónal; n = 12 animales, 238 ensayos). Los datos se presentan con media ± SEM.

Como la literatura sugiere, durante las sesiones de aprendizaje se requeriría el uso o no de las señales distales para alcanzar el objetivo y que esto se manifestaría en la transición del uso de las estrategias no espaciales (NS) a estrategias espaciales (S). Para esto nos interesó evaluar las modificaciones en las estrategias durante la adquisición de la MER en agrupaciones más globales. Es por ello que se consideraron las estrategias aleatorias y seriadas como NS, mientras que la focalizada, larga corrección, corregida y directa como S. En la Fig. 8A se puede observar las preferencias de las agrupaciones de estrategias utilizadas por día de adquisición. Esto se acompaña de las diferencias significativas en algunos parámetros primarios como la latencia, los errores, la distancia y la eficiencia de la ruta entre las estrategias S y NS ($P = 0.0001$, prueba de Mann-Whitney, Fig. 8B-E). En conjunto con los resultados anteriores, se sugiere que los animales aprendieron progresivamente la tarea conductual, generando la MER para el agujero que contiene la caja-escape. Esto lo llevaron acabo mostrando 6 estretegias

diferentes de navegación hasta el primer contacto con el agujero que contiene la caja-escape, las cuales se pueden agrupar en NS y S, siendo esta última más eficiente para alcanzar el objetivo.

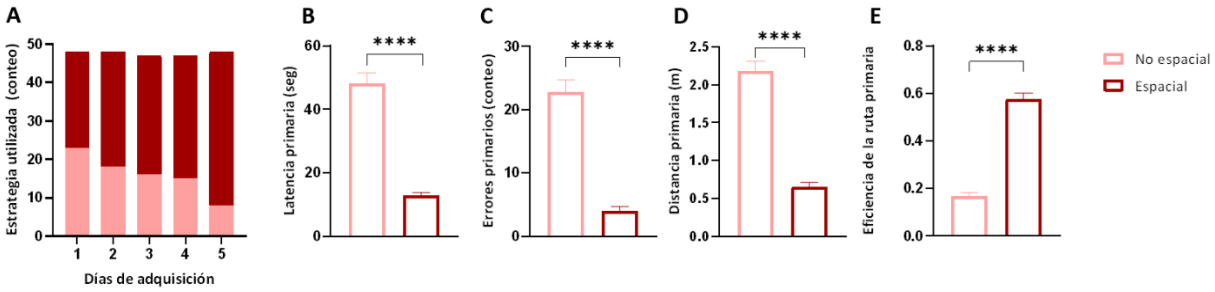

Figura 8. Agrupación de estartegias de navegación: No espaciales y Espaciales. (A) Grafico de barras apiladas de días de adquisición por agrupación de estrategias utilizadas en NS (Conteo por día, día 1: 23, día 2: 18, día 3: 16, día 4: 15, día 5: 8; total = 80.) y S (Conteo por día, día 1: 25, día 2: 30, día 3: 31, día 4: 32, día 5: 40; total = 158.). **(I)** Latencia primaria **(J)** Errores primarios **(K)** Distancia primaria y **(L)** Eficiencia de la ruta primaria, por agrupación de estretagias NS y S (****P < 0.0001; Prueba de comparación Mann-Whitney; n = 12 animales, 238 ensayos). Los datos se presentan con media ± SEM.

9.2 EVOLUCIÓN DE LA CONECTIVIDAD EN LOS CIRCUITOS mPFC-HPC Y mPFC-PPC DURANTE EL APRENDIZAJE.

Con la finalidad de analizar la actividad eléctrica cerebral de las áreas de interés, se realizó un registro simultaneo (Fig. 9A) por medio de múltiples electrodos dispuestos en la mPFC, el HPC y la PPC (Fig. 9B), donde se puede observar la señal del LFP para dichas áreas (Fig. 9C) y el poder espectral de cada señal en las diferentes bandas de frecuencia (Fig. 9D).

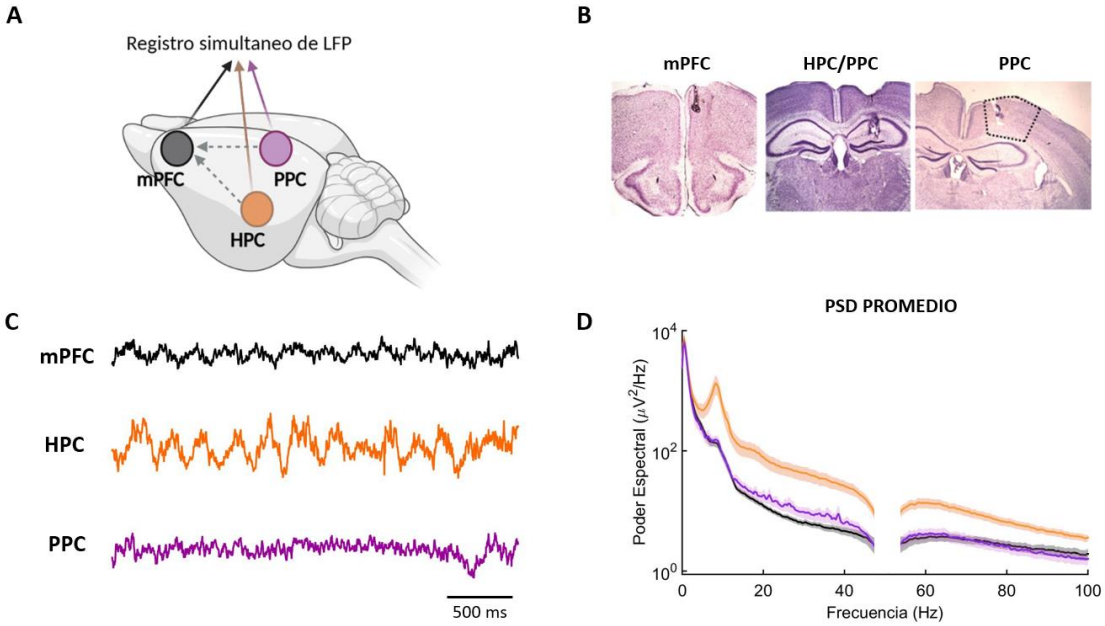

Figura 9. Registro de la actividad eléctrica oscilatoria de las áreas mPFC, HPC y PPC durante la adquisición de la MER. (A) Diagrama esquemático de las tres áreas de registro simultaneo (in vivo) de la actividad eléctrica cerebral, la mPFC (negro), el HPC (naranjo) y la PPC (morado). **(B)** Tinción de Nissl donde muestra la ubicación de los electrodos de

registro en la mPFC, el HPC y la PPC. **(C)** Ejemplo del LFP crudo registrado en la mPFC, el HPC y la PPC (Código de la muestra: LC60). **(D)** Promedio del PSD en función de las frecuencias de las áreas mPFC, HPC y PPC (mPFC: n= 10 animales, 141 registros; HPC: n=9 animales = 121 registros; PPC: n= 10 animales = 141 registros), los datos se presentan con media ± SEM.

Debido a que la sincronización de patrones de actividad electrica oscilatoria ha sido un elemento estudiado para facilitar la comunicación entre áreas cerebrales, hemos analizado la conectividad funcional por medio de coherencial espectral (COH) del LFP para los circuitos mPFC-HPC y mPFC-PPC durante la adquisición de la MER. En la Fig. 10A-B encontramos coherogramas representativos para cada circuito. Nuestros resultados evidencian un aumento prominente en la COH para la banda theta (6-12 Hz) en el circuito mPFC-HPC, mientras que en el circuito mPFC-PPC presenta un pico más bajo para el mismo rango. Por el contrario en las frecuencias más elavadas, culminando la banda gamma rápido (60-80 Hz) presenta un aumento progresivo para el circuito mPFC-PPC (Fig. 10C), no así en el circuito mPFC-HPC donde se mantiene estable.

Para la comparación de los circuitos en los diferentes rangos de frencuencia de interes: theta (6-12 Hz; Fig. 10D), gamma lento (30-45 Hz; Gig.10E) y gamma rápido (60-80 Hz; Fig. 10F). No se evidencian modificaciones en la COH para la interacción de los dos circuitos mPFC-HPC y mPFC-PPC en las bandas de frecuencia theta (P = 0.8225, ANOVA de dos vías, Fig. 10D), gamma lento (P = 0.8724, ANOVA de dos vías, Fig. 10E) ni gamma rápido (P = 0.9022, ANOVA de dos vías,Fig. 10F) a lo largo de los días de adquisición para los circuitos. La única significancia entre la comparación de estos dos circuitos es para la frecuencia theta en el primer día de adquisición (P = 0.0431, comparación multiple de Benferroni, Fig. 10D). Estos datos sugieren que la modulación de la COH no afectaria el aprendizaje durante el paso de los días de adquisición.

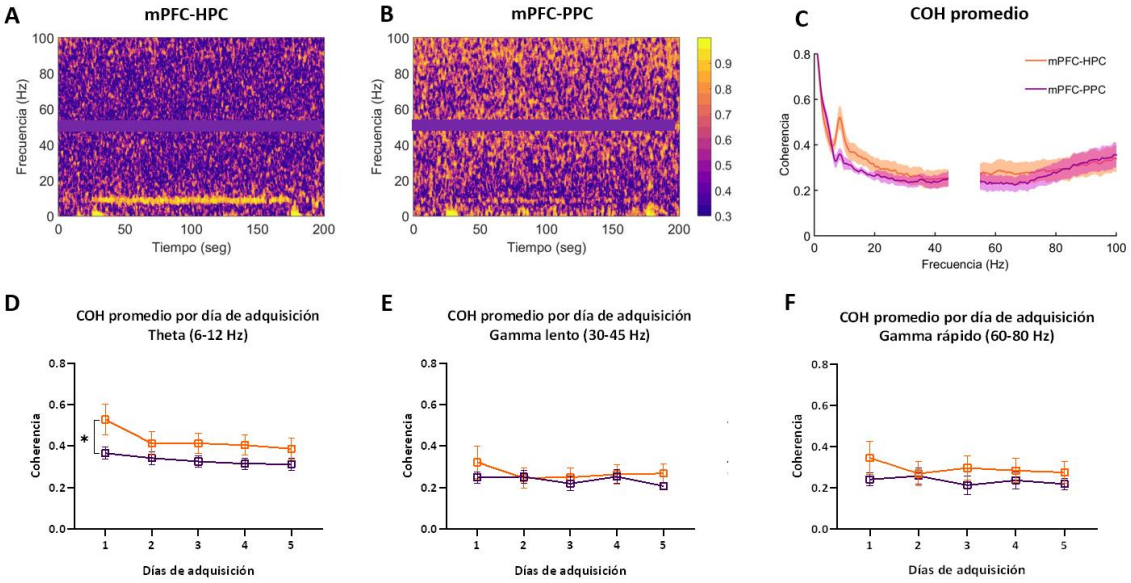

Figura 10. Coherencia en los circuitos mPFC-HPC y mPFC-PPC s durante la adquisición de la MER. (A-B) Coherograma representativo donde se muestra la coherencia espectral en función del tiempo y la frecuencia de los registros de LFP para los circuitos de **(A)** mPFC-HPC y **(B)** mPFC-PPC, donde los colores cálidos muestran una mayor COH mientras que los colores oscuros una menor COH (Codigo de la muestra: IN114). **(C)** Promedio de la coherencia en función de las frecuencias entre las áreas mPF-HPC (naranjo) y mPFC-PPC (morado) (mPFC-HPC: n= 9 animales; mPFC-PPC: n= 10 animales). Gráficos de la coherencia promedio de la banda **(D)** theta (6-12 Hz) (*P < 0.05), **(E)** gamma lento (30-45 Hz)

y **(F)** gamma rápido (60-80 Hz), en el circuito mPFC-HPC y mPFC-PPC durante los días de adquisición del BM. Los datos se presentan con media ± SEM.

Posterior a esto, nos interesó evaluar una segunda medida de conectividad funcional, las variaciones entre los días de adquisición y las etapas del laberinto de Barnes (BM), por medio de la interacción de las bandas de frecuencia, por lo que incluimos medidas del acoplamiento de frecuencia cruzada (CFC). A pesar que no se evidencian cambios en los índices de modulación para el circuito mPFC-HPC y mPFC-PPC durante los días de adquisición para los acoplamientos theta-gamma lento ($F_{(4,83)}$ = 0.2781; P = 0.9985, ANOVA de dos vías, Fig. 11A) ni theta-gamma rápido ($F_{(3,62)}$ = 0.06901; P = 0.9762, ANOVA de dos vías, Fig. 11C), si hay un aumento significativo de la etapa antes del primero contacto con el agujero que contiene la caja-escape (etapa BN) en relación con la etapa de meta (etapa GL) (mPFC-HPC, P = 0.0006, Fig. 11B; mPFC-PPC, P = 0.0001, Fig. 11B). Así tambien para el acomplamiento theta-gamma rápido en su respectiva fase BN en relación con GL (mPFC-HPC, P = 0.0016, Fig. 11D; mPFC-PPC, P = 0.0003, Fig. 11D). Estos resultados indican que la fase BN tienen una mayor interacción entre las bandas de baja frecuencia y alta frecuencia, a diferencia de las otras etapas de la prueba conductual.

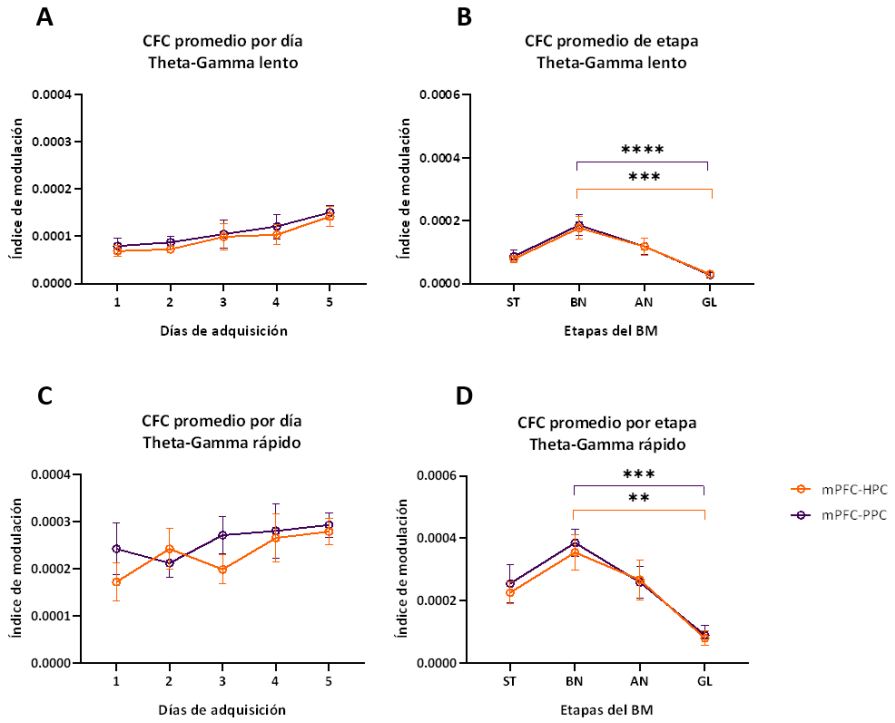

Figura 11. Theta-gamma CFC en los circuitos mPFC-PPC y mPFC-HPC durante la adquisición de la MER. (A) Graífico del promedio CFC por día, frecuencia para la fase en theta (6-12Hz) y frecuencia para la amplitud en gamma lento (30-45 Hz), en los circuitos mPF-HPC (naranjo) y mPFC-PPC (morado) (mPFC-HPC: n= 9 animales; mPFC-PPC: n= 10 animales). **(B)** Gráfico del promedio CFC por etapa del BM (***P < 0.001 y **** P< 0.0001; Prueba de comparación múltiple de Benferroni despues de ANOVA de dos vías) . **(C)** Graífico del promedio CFC por día, frecuencia para la fase en theta (6-12Hz) y frecuencia para la amplitud en gamma ráido (55-100 Hz), en los circuitos mPF-HPC y mPFC-PPC (mPFC-HPC: n= 9 animales; mPFC-PPC: n= 10 animales). **(D)** Graífico del promedio CFC por etapa del BM (**P < 0.01 y ***P < 0.001; Prueba de comparación múltiple de Benferroni despues de ANOVA de dos vías). Los datos se presentan con media ± SEM.

9.3 ASOCIACIÓN DE LA CONECTIVIDAD EN BANDAS DE FRECUENCIA PARTICULARES EN CIRCUITO mPFC-HPC Y mPFC-PPC SEGÚN LAS MODIFICACIONES DE ESTRETEGIAS DURANTE LA ADQUISICIÓN DE LA MER.

Debido a que la conectividad funcional muestra una COH estable a lo largo de los días de adquisición de la tarea para las tres frecuencias analizadas, nos preguntamos si existe alguna relación entre las bandas de interés (theta, gamma lento y rápido) en ambos circuitos y a su vez en su relación con la preferencia de agrupaciones de estrategias utilizadas en la etapa hasta el primer contacto con el agujero que contiene la caja-escape (etapa BN). Los resultados muestran que durante las estrategias más eficientes para la navegación (S) los ejes mPFC-HPC y mPFC-PPC tienden a tener una sincronización mayor que las menos eficientes (NS), pero no de manera significativa ($P > 0.05$), esto ocurre para las bandas de frecuencia theta ($P = 0.555$, prueba de Mann-Whitney, Fig. 11A; $P = 0.3186$, prueba de Mann-Whitney, Fig. 12D), gamma lento ($P = 0.0673$, prueba de Mann-Whitney, Fig. 12A; $P = 0.1470$, prueba de Mann-Whitney, Fig. 12D) y gamma rápido ($P = 0.1860$, prueba de Mann-Whitney, Fig. 12C; $P = 0.1534$, prueba de Mann-Whitney, Fig. 12F).

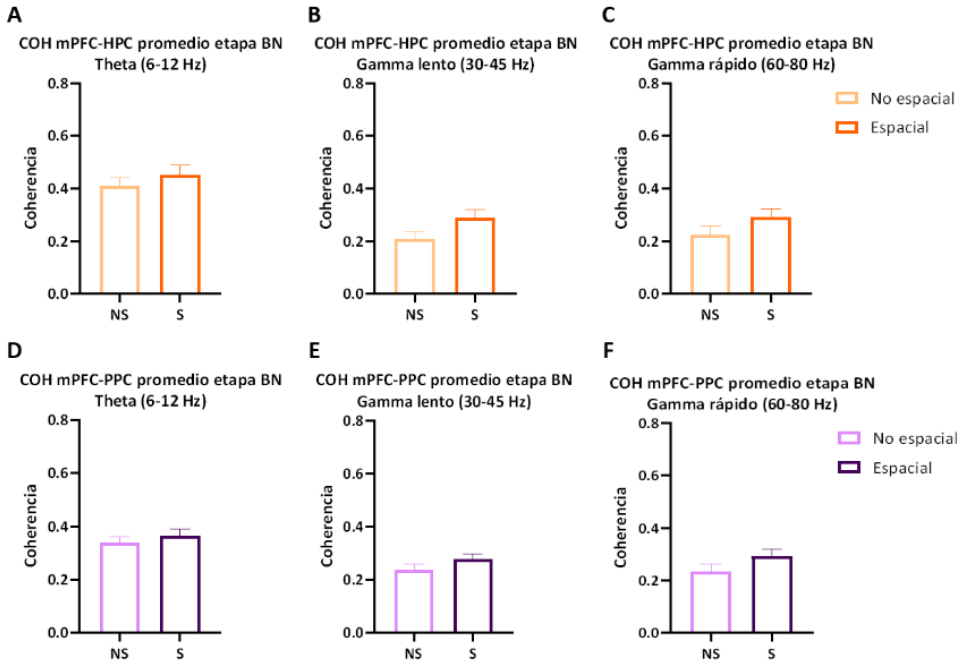

Figura 12. Asociación de la conectividad funcional por COH de la actividad eléctrica oscilatoria en los diferentes circuitos según las modificaciones de estrategias durante la adquisición de la MER. (A-C) Gráfico de barra sobre la COH promedio en las agrupaciones de estrategias (naranjo claro: no espacial; naranjo oscuro: espacial) por frecuencias **(A)** theta, **(B)** gamma lento y **(C)** gamma rápido en el circuito mPFC-HPC durante la etapa BN. **(D-F)** Gráfico de barra sobre la COH promedio en las agrupaciones de estrategias (morado claro: no espacial; morado oscuro: espacial) por frecuencias **(A)** theta, **(B)** gamma lento y **(C)** gamma rápido en el circuito mPFC-PPC durante la etapa BN.

Por otro lado, ya que el acoplamiento entre los diferentes circuitos mostraba un aumento significativo del Índice de modulación (MI) en la etapa BN de la prueba conductual, quisimos evaluar si dentro de esta misma etapa había diferencias según las estrategias utilizadas. En el caso del circuito mPFC-HPC para la modulación de la fase theta del HPC respecto a la amplitud de gamma lento de la mPFC, encontramos que existe un MI mayor de las estrategias espaciales (S) frente a las no espaciales (NS) ($F_{(4,96)} = 0.04421$; $P = 0.9962$, ANOVA de dos vías, Fig. 13C), que se vuelve significativo cuando se comparan las estretegias con puntajes cognitivos extremos ($F_{(5,157)} = 0.9126$; $P = 0.0001$, ANOVA de una vía, Fig. 13D).

Es decir, existiria una posible explicación por la modulación que tienen ciertas bandas de frecuencia para realizar estrategias más eficientes durante la navegación, reflejado además en las agrupaciones de las estrategias de navegación donde existe un MI significativamente mayor en los grupos espaciales (S) frente a los no espaciales (NS) (P = 0.00001, prueba de Mann-Whitney, Fig. 13E). De igual manera, en la modulación de la fase theta del HPC respecto a la amplitud de gamma rápido de la mPFC el MI no muestra significancia en ambos grupos a lo largo de los días de adquisición ($F_{(4,109)} = 0.4762$; P = 0.7531, ANOVA de dos vías, Fig. 13H), pero si al momento de comparar las estretegias directas con aletorias ($F_{(5,158)} = 0.9126$; P = 0.0001, ANOVA de una vía, Fig. 13I) y las agrupaciones NS y S (P = 0.00001, prueba de Mann-Whitney, Fig. 13J).

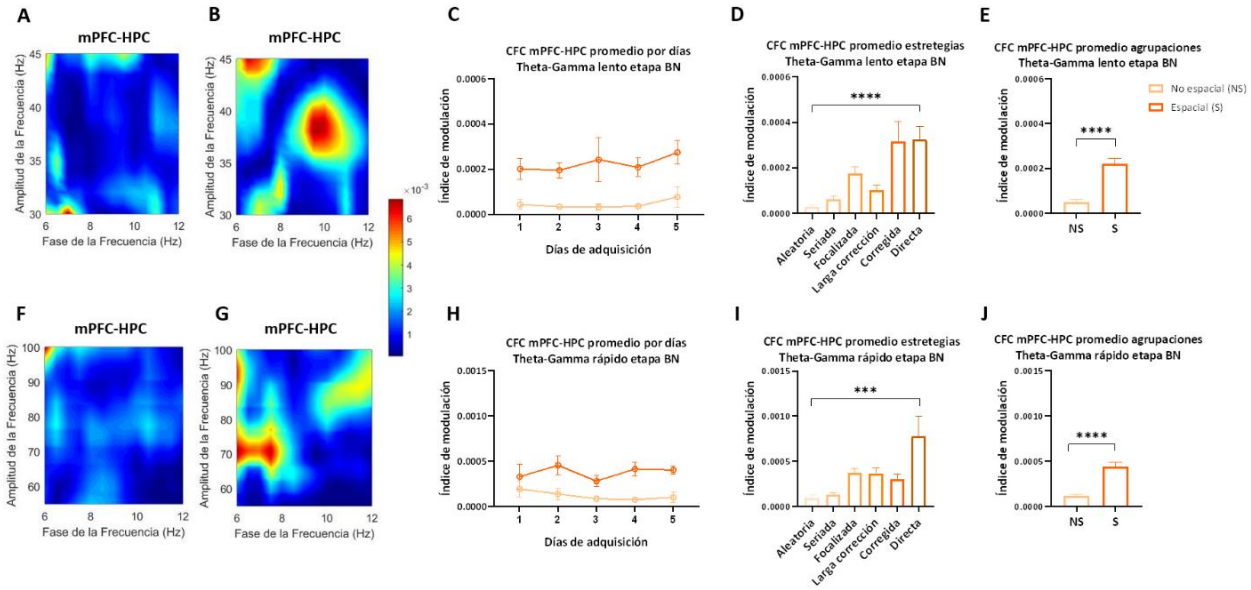

Figura 13. Asociación entre el CFC en el circuito mPFC-HPC y las estrategias durante la adquisición de la MER. (A-B) Comodulograma representativo de una estrategia **(A)** aleatoria y **(B)** directa de la etapa BN donde muestra la modulación de una fase (theta) sobre una amplitud (gamma lento) de los registros para el circuito, donde los colores cálidos representan un mayor MI mientras que los colores fríos un menor MI (Codigo de la muestra: LC59). **(C)** Graífico del promedio CFC por día, frecuencia para la fase en theta (6-12 Hz) y frecuencia para la amplitud en gamma lento (30-45 Hz), para las agrupaciones de estrategias NS y S para la fase BN. **(D)** Gráfico de barras del CFC promedio para las estrategias de navegación utilizadas para la fase BN (****p < 0.0001; Prueba de comparación múltiple de Benferroni despues de ANOVA de una vía). **(E)** Grafíco de barras del CFC promedio para las agrupaciones de estartegias NS y S para la fase BN (****p < 0.0001; Prueba de Mann-Whitney). **(F-G)** Comodulograma representativo de una estrategia **(F)** aleatoria y **(G)** directa de la etapa BN donde muestra la modulación de una fase (theta) sobre una amplitud (gamma rápido) de los registros para el circuito (Codigo de la muestra: FG11). **(H)** Graífico del promedio CFC por día, frecuencia para la fase en theta (6-12 Hz) y frecuencia para la amplitud en gamma rápido (55-100 Hz), para las agrupaciones de estrategias NS y S para la fase BN. **(I)** Gráfico de barras del CFC promedio para las estrategias de navegación utilizadas para la fase BN (***p < 0.001; Prueba de comparación múltiple de Benferroni despues de ANOVA de una vía). **(J)** Grafíco de barras del CFC promedio para las agrupaciones de estartegias NS y S para la fase BN (****p < 0.0001; Prueba de Mann-Whitney).

A su vez en el circuito mPFC-PPC, la modulación de la fase theta del PPC respecto a la amplitud de gamma lento de la mPFC el índice de modulación (MI) no muestra diferencias entre las agrupaciones de estrategias NS y S a lo largo de los días de adquisición en el laberinto de Barnes (BM) ($F_{(4,110)} = 0.07890$; P = 0.9886, ANOVA de dos vías, Fig. 14C), pero si en las estretegias altamente S frente a las NS ($F_{(5,173)} = 0.8562$; P = 0.0001, ANOVA de una vía, Fig. 14D), y sus agrupaciones (P = 0.00001, prueba de Mann-Whitney,

Fig. 14E). Por último, el acoplamiento de la fase theta del PPC con la amplitud de gamma rápido de la mPFC muestra la misma dinámica para la progresión de los días de adquisición ($F_{(4,124)} = 0.2142$; P = 0.9301, ANOVA de dos vías, Fig. 14H), el desgloce de las estretegias conductuales ($F_{(5,174)} = 0.7637$; P = 0.0001, ANOVA de una vía, Fig. 14I) y las agrupaciónes NS y S (P = 0.00001, prueba de Mann-Whitney, Fig. 14J). En su conjunto estos resultados sugieren que ambos circuitos mPFC-HPC y mPFC-PPC mostrarían modulaciones significativamente mayores para las estrategias espaciales frente a las no espaciales en el momento de la prueba conductual donde son ocupadas (etapa BN).

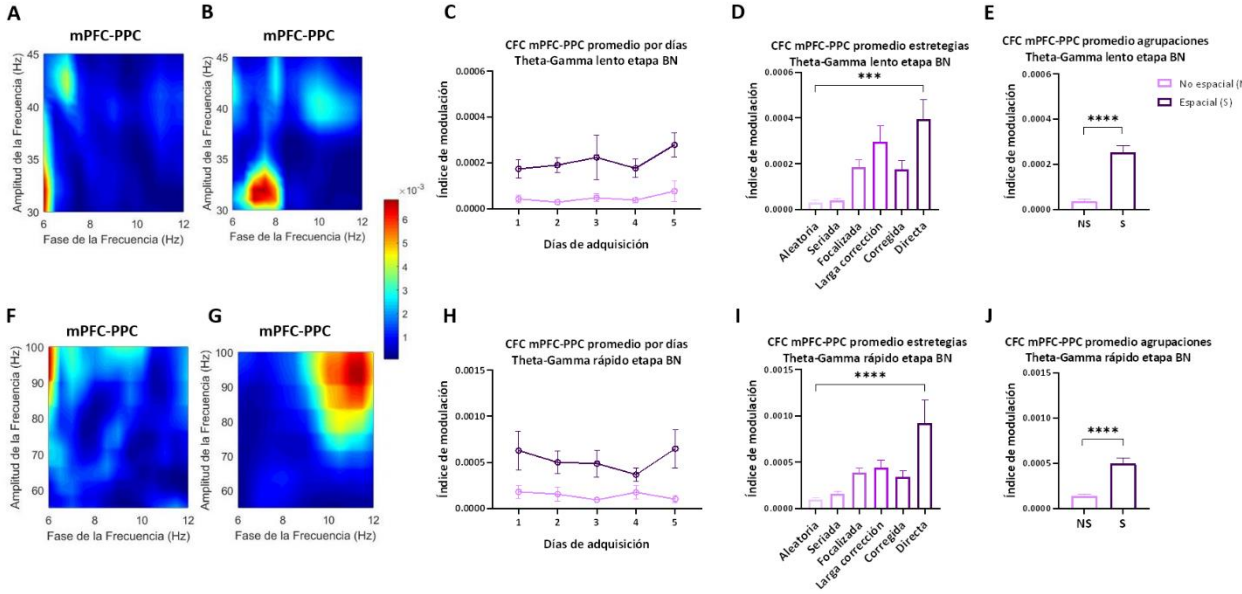

Figura 14. Asociación entre CFC en el circuito mPFC-PPC según las modificaciones de estrategias durante la adquisición de la MER. (A-B) Comodulograma representativo de una estrategia **(A)** aleatoria y **(B)** directa de la etapa BN donde muestra la modulación de una fase (theta) sobre una amplitud (gamma lento) de los registros para el circuito, donde los colores cálidos representan un mayor MI mientras que los colores fríos un menor MI (Codigo de la muestra: IN114). **(C)** Graífico del promedio CFC por día, frecuencia para la fase en theta (6-12 Hz) y frecuencia para la amplitud en gamma lento (30-45 Hz), para las agrupaciones de estrategias NS y S para la fase BN. **(D)** Gráfico de barras del CFC promedio para las estrategias de navegación utilizadas (***p< 0.0001; Prueba de comparación múltiple de Benferroni despues de ANOVA de una vía) para la fase BN. **(E)** Grafíco de barras del CFC promedio para las agrupaciones de estartegias NS y S para la fase BN. (****p < 0.0001; Prueba de Mann Whitney). **(F-G)** Comodulograma representativo de una estrategia **(F)** aleatoria y **(G)** directa de la etapa BN donde muestra la modulación de una fase (theta) sobre una amplitud (gamma rápido) de los registros para el circuito (Codigo de la muestra: LC39). **(H)** Graífico del promedio CFC por día, frecuencia para la fase en theta (6-12 Hz) y frecuencia para la amplitud en gamma rápido (55-100 Hz), para las agrupaciones de estrategias NS y S para la fase BN. **(I)** Gráfico de barras del CFC promedio para las estrategias de navegación utilizadas para la fase BN. (****p < 0.0001; Prueba de comparación múltiple de Benferroni despues de ANOVA de una vía). **(J)** Grafíco de barras del CFC promedio para las agrupaciones de estartegias NS y S para la fase BN (****p< 0.0001; Prueba de Mann-Whitney).

Para culminar los analisis, quizimos establecer si estas agrupaciones de estrategias no espaciales (NS) y espaciales (S) eran el reflejo de alguna direccionalidad entre los circuitos mPFC-HPC y mPFC-PPC durante la fase BN. Para esto realizamos un prueba de predicción de direccionalidad, *Granger Causality*, donde buscamos detectar la causalidad entre las señales registradas simultaneamente.

La direccionalidad HPC→mPFC las estrategias NS solo es significativa frente a las estretegias S para la banda de frecuencia theta (6-12 Hz) (P = 0.0011, prueba de Mann-Whitney, Fig. 15A), mientras que para la banda de frecuencia gamma lento (30-45 Hz) y gamma rápido (60-80 Hz) existe una diferencia

significativa para las estrategias S frente a las NS (P< 0.0001 gamma lento; P= 0,0036 gamma rápido, prueba de Mann-Whitney, Fig. 15A). La dirección mPFC→HPC presenta una diferencia significativa en las tres bandas de frecuencia analizadas de las estretagias S frente a las NS (P< 0.0001 theta; P< 0.0001 gamma lento; P< 0.0001 gamma rápido, prueba de Mann-Whitney, Fig. 15B). Estos resultados sugieren que las las estrategias NS solo presentarian una direccionalidad HPC→mPFC para la banda de frecuencia theta, mientras que las estrategias S tienen una direccionalidad mPFC→HPC para todas las bandas analizadas en la etapa antes del primer contacto con el adujero que contiene la caja-escape (etapa BN) de la prueba conductual.

Por último, para el segundo circuito mPFC-PPC, en la dirección PPC→mPFC entre las estrategias NS y S no hay diferencias significadas para la banda de frecuencia theta (6-12 Hz) (P = 0.4055 theta, prueba de Mann-Whitney, Fig. 15C) pero si existe un predominio estadístico de las estrategias S frente a las NS en las bandas gamma lento (30-45 Hz) y rápido (60-80 Hz) (P = 0.0001 gamma lento; P= 0.0001 gamma rápido, prueba de Mann-Whitney, Fig. 15C). Mientras que para la direccionalidad mPFC→PPC existe una tendencia significativa de las estrategias S frente a las NS para las bandas de frecuencia theta (6-12 Hz), gamma lento (30-45 Hz) y gamma rápido (60-80 Hz) (P = 0.0008 theta; P= 0.0078 gamma lento; P< 0.0001 gamma rápido, prueba de Mann-Whitney, Fig. 15D). En suma, estos datos indicarían un predominio de las estrategias S en ambas direccionalidades del circuito.

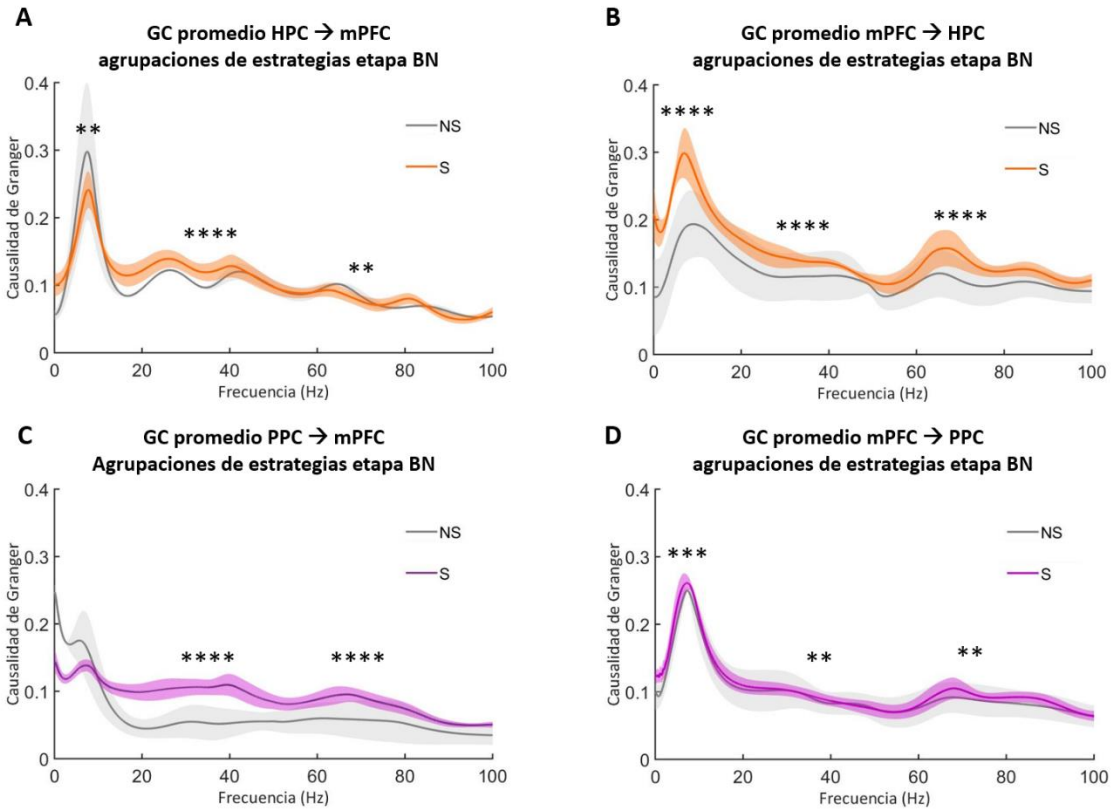

Figura 15. Direccionalidad por GC en el circuito mPFC-HPC y mPFC-PPC según las modificaciones de estrategias durante la adquisición de la MER. (A) Causalidad de Granger en función de la frecuencia para la direccionalidad HPC→mPFC en la fase BN para estrategias NS (gris) y S (naranjo). **(B)** y para la direccionalidad mPFC→HPC en la fase BN para las estrategias NS y S. **(C)** Causalidad de Granger en función de la frecuencia para la direccionalidad PPC→mPFC en la fase BN para estrategias NS (gris) y S (morado). **(D)** y para la direccionalidad mPFC→PPC en la fase BN para las estrategias NS y S (**P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001; Prueba de comparación Mann-Whitney). Los datos se presentan con media ± SEM (n= 10 animales).

10. DISCUSIÓN

Los resultados presentes muestran que las estrategias utilizadas durante el proceso de adquisición de la MER se asociaron con diferencias en conectividad funcional y efectiva en los circuitos mPFC-HPC y mPFC-PPC, observándose que la conectividad aumentó para las estrategias que requieren una mayor demanda cognitiva durante el aprendizaje.

En concordancia con hallazgos anteriores, la disminución de algunos parámetros de comportamiento como las latencias de escape, distancia recorrida y cantidad de errores, confirman el aprendizaje de la MER (76). De igual manera se debe prestar atención a que los animales no siempre al hacer por primera vez contacto con el agujero escape ingresan a este, sino que pueden seguir explorando el laberinto, por lo que solo considerar los datos totales (hasta el ingreso o término del tiempo de la tarea conductual) podría llevar a integrar información no solo de aprendizaje sino que a la vez motivacional, es por esto que considerar parámetros primarios (etapa BN) y totales (etapa BN más AN) podría ser relevante para entender el proceso de adquisición de memoria (77). Por otro lado, estos parámetros no entregan un detalle de los requerimientos cognitivos que necesita el animal para resolver la tarea de navegación (76), por ejemplo: los animales que buscan de manera azarosa o seriada pueden encontrar el agujero escape en un tiempo reducido, por consiguiente, muestran una buena navegación según algunos parámetros de desempeño, pero esto no generaría necesariamente un indicador de la MER (8). Sin embargo, por medio del reconocimiento de las estrategias utilizadas por los animales podría contribuir al entendimiento del comportamiento. Los resultados del presente estudio reflejan que existe un uso paralelo de las estrategias para alcanzar el objetivo, donde se muestra que las estrategias no espaciales y espaciales tienen una preferencia de uso similar en el primer día de la tarea, pero a medida que los días de entrenamiento pasan las estrategias espaciales encabezan el uso para resolver la tarea, lo que concuerda con un estudio reciente de Curdt et al. 2022 donde el primer día de búsqueda se utilizó en un 52% la estrategia aleatoria y estas fueron disminuyendo a un 12% el último día de la tarea.

Dado a que se le puede otorgar una puntuación cognitiva a cada estrategia (78), esto nos deja entrever que existe una mayor relevancia en el aprendizaje espacial cuando se utilizan estrategias espaciales, lo que a su vez podría contribuir con la información sobre las demandas cognitivas que requiere la implementación de dichas estrategias al momento de encontrar por primera vez el agujero que contiene la caja escape. Esto se puede asociar a el uso de las estrategias de navegación por sobre parámetros de desempeño convencionales, a medida que el esfuerzo físico es menor, mayor es el esfuerzo cognitivo (8).

Es por lo anterior que planteamos la hipótesis que durante la adquisición de la MER se puede observar una transición en el paso de la utilización de estrategias no espaciales a espaciales, las cuales se asocian a aumentos en la conectividad funcional de los diferentes circuitos mPFC-HPC-PPC. Observamos que la coherencia entre los circuitos mPFC-HPC y mPFC-PPC se mantiene estable durante los días de adquisición y en las diferentes etapas de la conducta, lo que sugiere que, en este procedimiento conductual, no estaría relacionado con el aprendizaje; tampoco estaría asociado de manera significativa en las diferentes bandas de frecuencia estudiadas: theta, gamma lento y gamma rápido ya que muestran la misma estabilidad, con un ligero incremento no significativo de las estrategias S sobre las NS. Si bien la COH es un método ampliamente utilizado, en los últimos años se ha presentado como una estimación poco fiable para cuantificar el acoplamiento entre dos o más áreas del cerebro o inclusive solo informaría sobre un área que intenta enviar información, pero no necesariamente si otra recibe dicha información (79), por lo que si bien se puede aplicar para ver la sincronización oscilatoria neuronal existirían otros métodos que proporcionarían una información más certera en datos experimentales (80).

Por consiguiente diferentes estudios han propuesto que la conectividad funcional entre áreas podría estar mediado por un mecanismo de acoplamiento más complejo como la interacción entre las diferentes frecuencias (66). En concordancia con estos postulados encontramos que durante la adquisición de la tarea el acoplamiento entre las bandas theta-gamma lento y theta gamma-rápido va aumentando de manera progresiva a medida que pasan los días de adquisición, sin diferencias entre los circuitos mPFC-HPC y mPFC-PPC. Sin embargo, algunos estudios si han mostrado diferencias en el CFC de las frecuencias bajas como theta en relación con frecuencias rápidas como gamma lento y gamma rápido en animales que realizan una libre navegación (81), donde se le ha dado a gamma lento una connotación de facilitador para la transferencia de las representaciones en la recuperación de la memoria desde el HPC (82), mientras que el gamma rápido se ha asociado a la coordinación de múltiples elementos también al interior del HPC (83). Se ha de tener presente que los rangos oscilatorios utilizados en la frecuencia theta considera el promedio entre los 4-10 Hz (81) a diferencia de nuestro rango de 6-12 Hz.

Por otro lado, encontramos diferencias significativas en el índice de modulación entre las diferentes etapas de la tarea, donde la etapa BN muestra una mayor modulación en este acoplamiento, pero nuevamente sin diferenciarse entre ambos circuitos. Si bien la literatura ha postulado que diferentes áreas cerebrales cumplirían un rol específico para la navegación, y considerando que el sustrato neuronal para otorgarle una función en particular a cada región sigue siendo poco esclarecedor (84). Se menciona que la PPC sería capaz de representar la propia percepción del entorno vinculándose con los marcos de referencia egocéntricos, y por otro lado, el HPC tendría el sesgo de representar la relación espacial entre los objetos y el entorno siendo relevante para la creación de los marcos de referencia alocéntricos. Hay estudios que apuntan a que ambas estructuras serian de relevancia para procesar la información alocéntrica, pero solo la PPC seria fundamental para la información egocéntrica (85); sin embargo todo apuntaría a que ambos marcos de referencia serian esenciales para la forma en cómo se percibe el entorno (38). La discrepancia suele crearse en torno a si esto procesos ocurriría en cierta secuencia entre las estructuras a lo largo de la adquisición de esta memoria o si este procesamiento de información ocurrir de manera paralela (38,86). Nuestros resultados parecen ir en concordancia con un sistema paralelo de integración de la información, donde ambos circuitos analizados, mPFC-HPC y mPFC-PPC, presentan un promedio de modulación significativamente mayor de las estrategias S frente a las NS en la etapa BN, lo que sugiere que el aumento del rendimiento no solo depende de parámetros conductuales sino que también requeriría de un mecanismo neuronal específico para favorecer las estrategias de navegación que requieren de una mayor demanda cognitiva, optimizando el alcance del objetivo durante la formación de la MER.

A pesar de que los estudios sobre conectividad funcional se han incrementado, la direccionalidad en que ocurren estos procesos sigue siendo poco esclarecedor, pero se establece que muchos de estos procesos ocurren por vías bidireccionales (87). Nuestros resultados apoyan que en el circuito mPFC-HPC la dirección del flujo de información en procesos de memoria espacial sería HPC→mPFC, lo que se ha establecido en varios estudios (88,89), pero en bandas de frecuencia lentas y solo para estrategias que no requieren un amplio requerimiento cognitivo, como lo son las estrategias NS, mientras que, para las estrategias de una mayor demanda cognitiva, esta direccionalidad pasaría a ser mPFC→HPC. Se debe considerar que los contextos espaciales de los experimentos para evaluar este tipo de memoria predominantemente son el protocolo del laberinto de Barnes, pero también espacio de exploración abiertos con paradigmas de asociación objeto-recompensa, y en esta investigación nos centramos en las estrategias utilizadas para llevar a cabo el objetivo. En un estudio llevado a cabo el 2016 (90) se muestra que el HPC predomina sobre la mPFC cuando el animal se enfrenta a periodos de inmovilidad o se acercaba a un objeto novedoso, pero cuando comienza a interactuar con el objeto esta direccionalidad cambia a un

mPFC→HPC, es por esto por lo que llegan a la deducción que los cambios en la conectividad funcional efectiva son un reflejo de los procesos cognitivos.

En contraste con el circuito mPFC-PPC donde ambos grupos de estrategias se evidencia un predominio de la direccionalidad mPFC→PPC para esta tarea conductual. Si bien algunas investigaciones relacionadas a funciones ejecutivas, en particular a la atención selectiva indicaría que ambas estructuras codifican respuestas específicas a los estímulos relevantes para la tarea atencional (91), se menciona que la conectividad efectiva sería PPC→PFC (92) para ese tipo de tareas conductuales. Otro estudio llega a la conclusión de que dependería de la cantidad de elementos en el entorno cobraría mayor o menor relevancia la PFC y la PPC durante la memoria de trabajo (93), sin hacer referencia a su direccionalidad. Si bien la información es diversa, se debe tener presente que la prueba conductual utilizada o el enfoque que este pueda llegar a tener podría diferir en el resultado por el contexto.

Es necesario considerar que la mayoría de los estudios se centran en la comparación de lesiones en la mPFC, el HPC y la PPC para atribuirle diferentes funciones en la adquisición de la MER, pero hasta la fecha ninguno entrega información en modelos animales con un registro *in vivo* simultaneo de la actividad eléctrica cerebral de estas tres áreas asociado a esta conducta. Nuestros resultados apuntan a que el acoplamiento entre bandas de frecuencia lentas y rápidas serían necesarias de manera paralela en las etapas conductuales con una mayor demanda cognitiva, como localizar un objetivo, independiente del circuito.

11. CONCLUSIONES

Nuestros resultados muestran que durante la adquisición de la MER los circuitos mPFC-HPC y mPFC-PPC aumentan la sincronización en relación con la modulación de las frecuencias bajas sobre las frecuencias altas en la etapa de la conducta donde se requiere un mayor esfuerzo cognitivo, en este caso, cuando el animal localiza por primera vez el agujero que contiene la caja escape frente a la etapa cuando navega libremente posterior a hacer el primer contacto. Además, este aumento en la sincronización en la primera etapa que posee una mayor demanda cognitiva se puede diferenciar según la estrategia que utilizo el animal para navegar por primera vez hacia la meta, el promedio de las estrategias más eficientes consideradas como estrategias espaciales de navegación tiene una modulación significativamente mayor en comparación con las estrategias no espaciales. Sin embargo, no hay diferencias entre los dos circuitos, posiblemente, esto ocurre ya que se realizaría un trabajo de manera paralela entre el circuito mPFC-HPC y mPFC-PPC para favorecer la eficiencia de la ruta durante la formación de la MER en una tarea de navegación espacial.

El estudio de la sincronía en el circuito mPFC-HPC-PPC y los hallazgos entre la interacción de las frecuencias preferentes de comunicación en modelos animales podría ser la base frente a la búsqueda de métodos terapéuticos para personas que tienen dificultades para recordar eventos, presentan problemas de orientación, planificación, toma de decisión, entre otras, como las personas con deterioro cognitivo leve (DCL) (94), en las cuales se ha observado que la MER declina con el envejecimiento, manifestándose en perdida de la orientación espacial (95). Se ha visto en el último tiempo que, por medio de estimulación cerebral no invasiva en humanos, se han logrado avances en diferentes enfermedades, como la depresión (96), la impulsividad en pacientes con trastorno por déficit de atención con hiperactividad (97), la disminución de los síntomas en el síndrome de Tourette (98), entre otras. Por lo tanto, nuestra investigación colabora en abordar las posibles bases, en modelos animales, para la modulación de la actividad cerebral en humanos por medio de estimuladores no invasivos, intentando recuperar el patrón de actividad neural normal en el proceso de adquisición de la MER.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Ladyka-Wojcik N, Barense MD. Reframing spatial frames of reference: What can aging tell us about egocentric and allocentric navigation? Wiley Interdiscip Rev Cogn Sci. 2020;12(3):1–12.

2. Tolman EC. Cognitive maps in rats and men. Psychol Rev. 1948;55(4):189–208.

3. Engel AK, Fries P, Singer W. DYNAMIC PREDICTIONS: OSCILLATIONS AND SYNCHRONY IN TOP-DOWN PROCESSING [Internet]. 2001. Available from: www.nature.com/reviews/neuro

4. Diamond A. Executive Functions. 2012 [cited 2021 Dec 19]; Available from: www.annualreviews.org

5. Khamassi M, Humphries MD. Integrating cortico-limbic-basal ganglia architectures for learning model-based and model-free navigation strategies. Frontiers in Behavioral Neuroscience. 2012.

6. Bott JB, Muller MA, Jackson J, Aubert J, Cassel JC, Mathis C, et al. Spatial reference memory is associated with modulation of theta-gamma coupling in the dentate Gyrus. Cerebral Cortex. 2015;26(9):3744–53.

7. O´Okeef, J. & Nadel L. The Hippocampus as a Cognitive Map. Vol. 27, Philosophical Studies. 1978. 263–267 p.

8. Hegarty M, He C, Boone AP, Yu S, Jacobs EG, Chrastil ER. Understanding Differences in Wayfinding Strategies. Top Cogn Sci. 2023 Jan 1;15(1):102–19.

9. Vorhees C v, Williams MT. Assessing Spatial Learning and Memory in Rodents. ILAR J [Internet]. 2014;55(2). Available from: https://academic.oup.com/ilarjournal/article/55/2/310/643871

10. Fernandez-Baizan C, Arias JL, Mendez M. Spatial memory assessment reveals age-related differences in egocentric and allocentric memory performance. Behavioural Brain Research [Internet]. 2020;388(April):112646. Available from: https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112646

11. Pitts MW. Barnes Maze Procedure for Spatial Learning and Memory in Mice. 2018; Available from: www.bio-protocol.org/e2744

12. Gawel K, Gibula E, Marszalek-Grabska M, Filarowska J, Kotlinska JH. Assessment of spatial learning and memory in the Barnes maze task in rodents-methodological consideration. 2019; Available from: https://doi.org/10.1007/s00210-018-1589-y

13. Illouz T, Madar R, Clague C, Griffioen KJ, Louzoun Y, Okun E. Unbiased classification of spatial strategies in the Barnes maze. Bioinformatics. 2016;32(21):3314–20.

14. Negrón-Oyarzo I, Espinosa N, Aguilar-Rivera M, Fuenzalida M, Aboitiz F, Fuentealba P. Correction: Coordinated prefrontal–hippocampal activity and navigation strategy-related prefrontal firing during spatial memory formation (Proc Natl Acad Sci USA (2018) 115 (7123–7128) DOI: 10.1073/pnas.1720117115). Proc Natl Acad Sci U S A. 2018;115(36):E8577.

15. Francisco Varela JPLERJM. BRAINWEB: PHASESYNCHRONIZATION AND LARGE-SCALE INTEGRATION [Internet]. 2001. Available from: www.nature.com/reviews/neuro

16. Buzsaki G, Draguhn A. Neuronal Oscillations in Cortical Networks. Science (1979) [Internet]. 2004;304(June):1926–9. Available from: http://science.sciencemag.org/

17. Vorhees C v, Williams MT. Assessing Spatial Learning and Memory in Rodents. ILAR J [Internet]. 2014;55(2). Available from: https://academic.oup.com/ilarjournal/article/55/2/310/643871

18. Teffer K, Semendeferi K. Human prefrontal cortex. Evolution, development, and pathology. [Internet]. 1st ed. Vol. 195, Progress in Brain Research. Elsevier B.V.; 2012. 191–218 p. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-53860-4.00009-X

19. Jones DT, Graff-Radford J. Executive Dysfunction and the Prefrontal Cortex. CONTINUUM Lifelong Learning in Neurology. 2021;27(6):1586–601.

20. le Merre P, Ährlund-Richter S, Carlén M. The mouse prefrontal cortex: Unity in diversity. Neuron. 2021;109(12):1925–44.

21. Uylings HBM, Groenewegen HJ, Kolb B. Do rats have a prefrontal cortex? Behavioural Brain Research. 2003 Nov 30;146(1–2):3–17.

22. Harris JA, Mihalas S, Hirokawa KE, Whitesell JD, Choi H, Bernard A, et al. Hierarchical organization of cortical and thalamic connectivity. Nature [Internet]. 2019;575(7781):195–202. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/s41586-019-1716-z

23. Spiers HJ, Gilbert SJ. Solving the detour problem in navigation: a model of prefrontal and hippocampal interactions. 2015; Available from: www.frontiersin.org

24. Knierim JJ. The hippocampus. Current Biology. 2015;25(23):R1116–21.

25. Moser MB, Moser EI. Functional differentiation in the hippocampus. Hippocampus. 1998;8(6):608–19.

26. Morris RGM, Garrud P, Rawlins JNP, O'Keefe J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. Vol. 297, Nature. 1982. p. 681–3.

27. Whitlock JR. Posterior parietal cortex. Current Biology [Internet]. 2017;27(14):R691–5. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2017.06.007

28. Save E, Poucet B, Foreman N, Buhot MC. Object Exploration and Reactions to Spatial and Nonspatial Changes in Hooded Rats Following Damage to Parietal Cortex or Hippocampal Formation. Behavioral Neuroscience. 1992;106(3):447–56.

29. Nitz DA. Tracking route progression in the posterior parietal cortex. Neuron. 2006;49(5):747–56.

30. Lyamzin D, Benucci A. The mouse posterior parietal cortex: Anatomy and functions. Neurosci Res [Internet]. 2019;140:14–22. Available from: https://doi.org/10.1016/j.neures.2018.10.008

31. Sack AT. Parietal cortex and spatial cognition. Behavioural Brain Research. 2009 Sep 14;202(2):153–61.

32. Whitlock JR, Sutherland RJ, Witter MP, Moser MB, Moser EI. Navigating from hippocampus to parietal cortex [Internet]. 2008. Available from: www.pnas.orgcgidoi10.1073pnas.0804216105

33. Save E, Poucet B. Hippocampal-Parietal Cortical Interactions in Spatial Cognition. Vol. 10, Hippocampus. 2000.

34. Spiers HJ, Maguire EA. A navigational guidance system in the human brain. 2007;

35. Save E, Cressant A, Thinus-Blanc C, Poucet B. Spatial firing of hippocampal place cells in blind rats. Journal of Neuroscience. 1998;18(5):1818–26.

36. Poucet B, Hok V. Remembering goal locations. Curr Opin Behav Sci [Internet]. 2017;17:51–6. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.cobeha.2017.06.003

37. Whitlock JR, Sutherland RJ, Witter MP, Moser MB, Moser EI. Navigating from hippocampus to parietal cortex [Internet]. 2008. Available from: www.pnas.orgcgidoi10.1073pnas.0804216105

38. Rogers JL, Kesner RP. Lesions of the dorsal hippocampus or parietal cortex differentially affect spatial information processing. Behavioral Neuroscience. 2006 Aug;120(4):852–60.

39. Jay TM, Witter MP. Distribution of hippocampal CA1 and subicular efferents in the prefrontal cortex of the rat studied by means of anterograde transport of Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin. Journal of Comparative Neurology. 1991;313(4):574–86.

40. di Cristo G, Chattopadhyaya B. Development of neuronal circuits: From synaptogenesis to synapse plasticity. Handb Clin Neurol. 2020 Jan 1;173:43–53.

41. Preston AR, Eichenbaum H. Interplay of hippocampus and prefrontal cortex in memory. Current Biology. 2013;23(17):1–21.

42. Navawongse R, Eichenbaum H. Behavioral/Cognitive Distinct Pathways for Rule-Based Retrieval and Spatial Mapping of Memory Representations in Hippocampal Neurons. 2013;

43. Josselyn SA, Tonegawa S. Memory engrams: Recalling the past and imagining the future. 2020;

44. Carrillo-Reid L. Neuronal ensembles in memory processes. Semin Cell Dev Biol. 2021 May 1;125:136–43.

45. McClelland JL. The organization of memory a parallel distributed processing perspective. Rev Neurol (Paris). 1994;150(8–9):570–9.

46. Buzsáki G. Large-scale recording of neuronal ensembles. Nat Neurosci. 2004;7(5):446–51.

47. Lopes-dos-Santos V, Ribeiro S, Tort ABL. Detecting cell assemblies in large neuronal populations. J Neurosci Methods [Internet]. 2013;220(2):149–66. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.jneumeth.2013.04.010

48. Miller EK, Cohen JD. An integrate theory of PFC function. Annu Rev Neurosci [Internet]. 2001;24:167–202. Available from: www.annualreviews.org

49. Ciaramelli E, de Luca F, Kwan D, Mok J, Bianconi F, Knyagnytska V, et al. The role of ventromedial prefrontal cortex in reward valuation and future thinking during intertemporal choice. Elife. 2021;10.

50. O'Keefe J, Dostrovsky J. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. Brain Res. 1971 Nov 12;34(1):171–5.

51. Robinson NTM, Descamps LAL, Russell LE, Buchholz MO, Bicknell BA, Antonov GK, et al. Targeted Activation of Hippocampal Place Cells Drives Memory-Guided Spatial Behavior. Cell. 2020;183(6):1586-1599.e10.

52. Fell J, Axmacher N. The role of phase synchronization in memory processes. Nat Rev Neurosci. 2011;12(2):105–18.

53. Buzsáki G, Anastassiou CA, Koch C. The origin of extracellular fields and currents — EEG, ECoG, LFP and spikes. 2012; Available from: www.nature.com/reviews/neuro

54. Einevoll GT, Kayser C, Logothetis NK, Panzeri S. Modelling and analysis of local field potentials for studying the function of cortical circuits. 2013; Available from: www.nature.com/reviews/neuro

55. Ahn Sungwoo, Rubchinsky Leonid. Potential Mechanisms and Functions of Intermittent Neural Synchronization. Front Comput Neurosci [Internet]. 2017;11:44. Available from: www.frontiersin.org

56. Singer W. Neuronal oscillations: unavoidable and useful? European Journal of Neuroscience. 2018;48(7):2389–98.

57. Xie Y, Li Y, Duan H, Xu X, Zhang W, Fang P. Theta Oscillations and Source Connectivity During Complex Audiovisual Object Encoding in Working Memory. Front Hum Neurosci [Internet]. 2021;15:614950. Available from: www.frontiersin.org

58. Mably AJ, Colgin LL. Gamma oscillations in cognitive disorders. Curr Opin Neurobiol [Internet]. 2018;52:182–7. Available from: https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.07.009

59. Bowyer SM. Coherence a measure of the brain networks: past and present. Neuropsychiatr Electrophysiol [Internet]. 2016;2(1):1–12. Available from: http://dx.doi.org/10.1186/s40810-015-0015-7

60. Bowyer SM. Coherence a measure of the brain networks: past and present. Neuropsychiatr Electrophysiol. 2016 Dec;2(1).

61. Reid AT, Headley DB, Mill RD, Sanchez-Romero R, Uddin LQ, Marinazzo D, et al. Advancing functional connectivity research from association to causation. Vol. 22, Nature Neuroscience. Nature Publishing Group; 2019. p. 1751–60.

62. Adhikari A, Sigurdsson T, Topiwala MA, Gordon JA. Cross-correlation of instantaneous amplitudes of field potential oscillations: A straightforward method to estimate the

directionality and lag between brain areas. J Neurosci Methods. 2010 Aug 30;191(2):191–200.

63. Fell J, Axmacher N. Local field potential The role of phase synchronization in memory processes. Nat Rev Neurosci [Internet]. 2011;12:105. Available from: www.nature.com/reviews/neuro

64. Fries P. Communication Through Coherence (CTC 2.0). Neuron. 2015;88(1):220–35.

65. Canolty RT, Knight RT. The functional role of cross-frequency coupling. Vol. 14, Trends in Cognitive Sciences. 2010. p. 506–15.

66. Hyafil A, Giraud AL, Fontolan L, Gutkin B. Neural Cross-Frequency Coupling: Connecting Architectures, Mechanisms, and Functions. Trends Neurosci. 2015 Nov 1;38(11):725–40.

67. Poucet B, Hok V. Remembering goal locations. Curr Opin Behav Sci. 2017 Oct 1;17:51–6.

68. Paxinos George WC. The rat brain in stereotaxic coordinates.

69. Barnes CA. Memory Deficits Associated With Senescence: A Neurophysiological and Behavioral Study in the Rat. Vol. 93, Journal of Comparative and Physiological Psychology. 1979.

70. Mitra PP, Pesaran B. Analysis of dynamic brain imaging data. Biophys J. 1999;76(2):691–708.

71. Gao R. Interpreting the electrophysiological power spectrum. J Neurophysiol [Internet]. 2016;115:628–30. Available from: www.jn.org

72. Aoi MC, Lepage KQ, Kramer MA, Eden UT. Rate-adjusted spike-LFP coherence comparisons from spike-train statistics. J Neurosci Methods. 2015 Jan 1;240:141–53.

73. Tort ABL, Komorowski R, Eichenbaum H, Kopell N. Measuring phase-amplitude coupling between neuronal oscillations of different frequencies. J Neurophysiol. 2010;104(2):1195–210.

74. Barnett L, Seth AK. The MVGC multivariate Granger causality toolbox: A new approach to Granger-causal inference. J Neurosci Methods. 2014 Feb 15;223:50–68.

75. Granger CWJ. Investigating Causal Relations by Econometric Models and Cross-spectral Methods. Vol. 37, Econometrica. 1969.

76. Curdt N, Schmitt FW, Bouter C, Iseni T, Weile HC, Altunok B, et al. Search strategy analysis of Tg4-42 Alzheimer Mice in the Morris Water Maze reveals early spatial navigation deficits. Sci Rep. 2022 Dec 1;12(1).

77. Harrison FE, Reiserer RS, Tomarken AJ, McDonald MP. Spatial and nonspatial escape strategies in the Barnes maze. Learning and Memory. 2006 Nov;13(6):809–19.

78. Illouz T, Madar R, Clague C, Griffioen KJ, Louzoun Y, Okun E. Unbiased classification of spatial strategies in the Barnes maze. Bioinformatics. 2016 Nov 1;32(21):3314–20.

79. Schneider M, Broggini AC, Dann B, Tzanou A, Uran C, Sheshadri S, et al. A mechanism for inter-areal coherence through communication based on connectivity and oscillatory power. Neuron. 2021 Dec 15;109(24):4050-4067.e12.

80. Lowet E, Roberts MJ, Bonizzi P, Karel J, De Weerd P. Quantifying neural oscillatory synchronization: A comparison between spectral coherence and phase-locking value approaches. PLoS One. 2016 Jan 8;11(1).

81. Jiang H, Bahramisharif A, van Gerven MAJ, Jensen O. Distinct directional couplings between slow and fast gamma power to the phase of theta oscillations in the rat hippocampus. European Journal of Neuroscience. 2020 May 1;51(10):2070–81.

82. Colgin LL. Do slow and fast gamma rhythms correspond to distinct functional states in the hippocampal network? Brain Res. 2015 Sep 24;1621:309–15.

83. Colgin LL. Theta-gamma coupling in the entorhinal-hippocampal system. Vol. 31, Current Opinion in Neurobiology. Elsevier Ltd; 2015. p. 45–50.

84. Spiers HJ. Keeping the goal in mind: Prefrontal contributions to spatial navigation. Neuropsychologia. 2008 Jun;46(7):2106–8.

85. Dimattia BD, Kesner RP. Spatial Cognitive Maps: Differential Role of Parietal Cortex and Hippocampal Formation. Vol. 102, Behavioral Neuroscience. 1988.

86. Kesner RP. Behavioral Analysis of the Contribution of the Hippocampus and Parietal Cortex to the Processing of Information: Interactions and Dissociations. 2000.

87. Duggento A, Passamonti L, Valenza G, Barbieri R, Guerrisi M, Toschi N. Multivariate Granger causality unveils directed parietal to prefrontal cortex connectivity during task-free MRI. Sci Rep. 2018 Dec 1;8(1).

88. Zhang W, Guo L, Liu D. Concurrent interactions between prefrontal cortex and hippocampus during a spatial working memory task. Brain Struct Funct. 2022 Jun 1;227(5):1735–55.

89. Barker GRI, Banks PJ, Scott H, Ralph GS, Mitrophanous KA, Wong LF, et al. Separate elements of episodic memory subserved by distinct hippocampal-prefrontal connections. Nat Neurosci. 2017 Feb 1;20(2):242–50.

90. Place R, Farovik A, Brockmann M, Eichenbaum H. Bidirectional prefrontal-hippocampal interactions support context-guided memory. Nat Neurosci. 2016 Aug 1;19(8):992–4.

91. Kim YJ, Tsai JJ, Ojemann J, Verghese P. Attention to multiple objects facilitates their integration in prefrontal and parietal cortex. Journal of Neuroscience. 2017 May 10;37(19):4942–53.

92. Greenman DLB, La MAN, Shah S, Chen Q, Berman KF, Weinberger DR, et al. Parietal-prefrontal feedforward connectivity in association with schizophrenia genetic risk and delusions. American Journal of Psychiatry. 2020 Dec 1;177(12):1151–8.

93. Yi Y, Leung HC. Linear and nonlinear prefrontal and parietal activity during multiple-item working memory. Neuroimage. 2011 Aug 1;57(3):1281–91.

94. Zhuang L, Yang Y, Gao J. Cognitive assessment tools for mild cognitive impairment screening. J Neurol [Internet]. 2021;268:1615–22. Available from: https://doi.org/10.1007/s00415-019-09506-7

95. Tascón L, Castillo J, Cimadevilla JM. Age-related differences in the elderly in a spatial recognition task. Memory [Internet]. 2019;27(10):1415–22. Available from: https://doi.org/10.1080/09658211.2019.1663216

96. Zhu Z, Hubbard E, Guo X, Barbosa DAN, Popal AM, Cai C, et al. A connectomic analysis of deep brain stimulation for treatment-resistant depression. Brain Stimul [Internet]. 2021;14(5):1226–33. Available from: https://doi.org/10.1016/j.brs.2021.08.010

97. Allenby C, Falcone M, Bernardo L, Wileyto EP, Rostain A, Ramsay JR, et al. Transcranial direct current brain stimulation decreases impulsivity in ADHD. Brain Stimul. 2018;11(5):974–81.

98. Baldermann JC, Schüller T, Huys D, Becker I, Timmermann L, Jessen F, et al. Deep Brain Stimulation for Tourette-Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis. Brain Stimul [Internet]. 2016;9(2):296–304. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.brs.2015.11.005