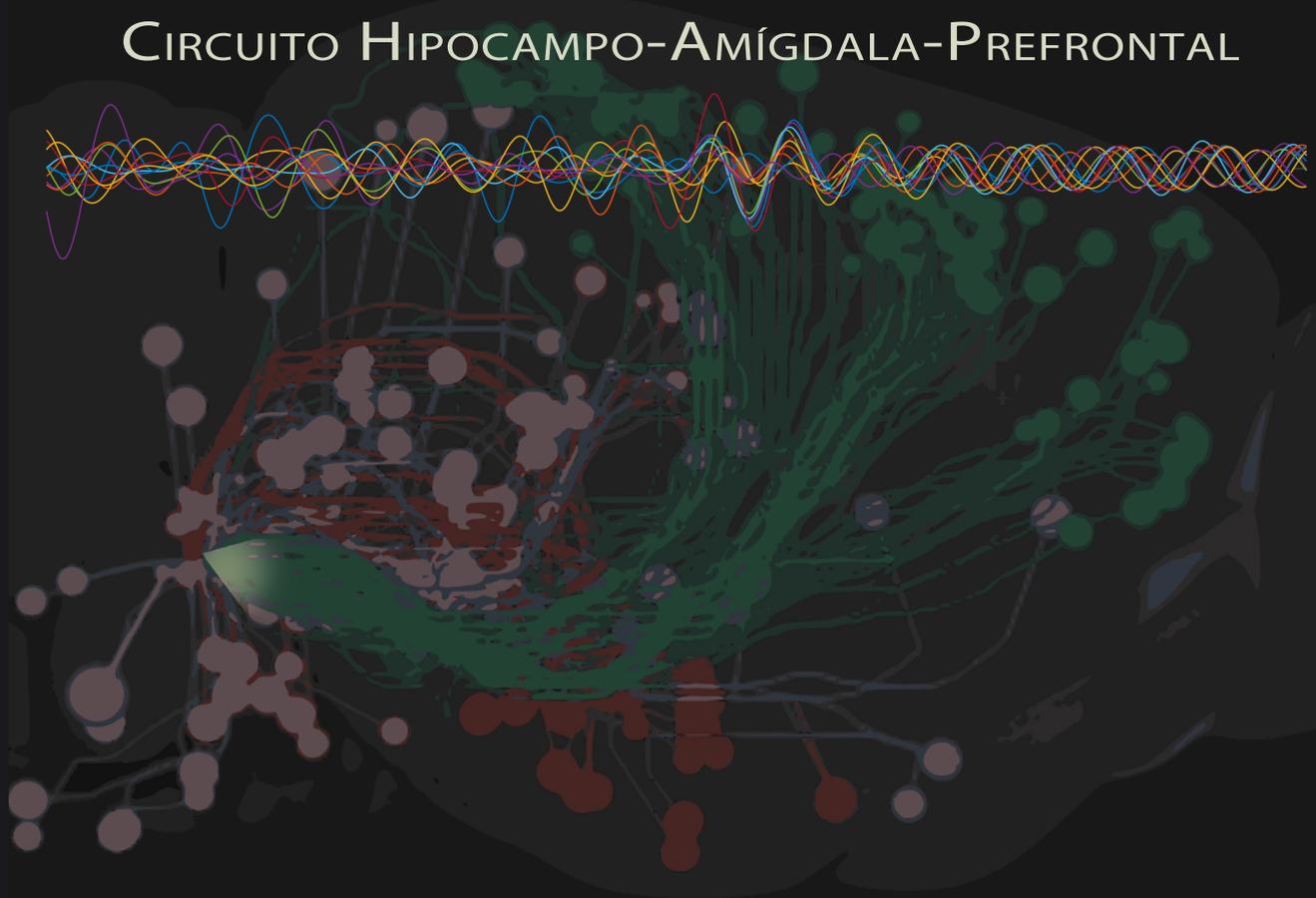




UNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

INFLUENCIA DE LA ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA
DEL NÚCLEO INCERTUS SOBRE LA ACTIVIDAD DEL
CIRCUITO HIPOCAMPO-AMÍGDALA-PREFRONTAL



TESIS DOCTORAL

Presentada por

ALICIA GONZÁLEZ MARTÍNEZ

Dirigida por

ANA CERVERA FERRI

DOCTORADO EN NEUROCIENCIAS

2023

**INFLUENCIA DE LA ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA DEL
NÚCLEO INCERTUS SOBRE LA ACTIVIDAD DEL CIRCUITO
HIPOCAMPO-AMÍGDALA-PREFRONTAL**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:
ALICIA GONZÁLEZ MARTÍNEZ

Dirigida por:
DRA. ANA CERVERA FERRI



**Doctorado en Neurociencias
Dept. de Anatomía y Embriología Humana
Facultad de Medicina y Odontología
Universitat de València
Enero de 2023**

Alicia González Martínez: Influencia de la estimulación eléctrica del núcleo incertus sobre la actividad del circuito hipocampo-amígdala-prefrontal, © 2023.

Dirección de la tesis: Dra. Ana Cervera Ferri.

Valencia.

Ana Cervera Ferri, Profesora Contratada Doctora del Departamento de Anatomía y Embriología Humana de la Facultad de Medicina de la Universitat de València

HACE CONSTAR:

Que D^a **ALICIA GONZÁLEZ MARTÍNEZ** ha realizado bajo mi dirección el trabajo de su Tesis Doctoral "Influencia de la estimulación eléctrica del Núcleo Incertus sobre la actividad del circuito hipocampo-amígdala-prefrontal". Habiendo revisado el trabajo, considero que reúne las condiciones necesarias para optar al Grado de Doctor.

Para que así conste, en cumplimiento de la legislación vigente, firmo el presente certificado

en Valencia, a 23 de enero de 2023



Dra. Ana Cervera Ferri

Para mis padres

"Las cosas nunca son como a primera vista las figuramos, y así ocurre que cuando empezamos a verlas de cerca, cuando empezamos a trabajar sobre ellas, nos presentan tan raros y hasta tan desconocidos aspectos, que de la primera idea no nos dejan a veces ni el recuerdo."

Camilo José Cela, La familia de Pascual Duarte

RESUMEN

El núcleo incertus (NI), sensible al estrés y parte del sistema reticular activador ascendente, proyecta a las principales estructuras implicadas en la generación y modulación del ritmo theta hipocámpico, por lo que ha sido relacionado con la respuesta al estrés y procesos cognitivos.

El hipocampo, implicado en el aprendizaje y la memoria, presenta un gradiente dorsoventral conectivo y funcional. La región dorsal participa en la navegación espacial y las porciones ventral e intermedia se han asociado con respuestas emocionales y con el valor motivacional. Estudios previos han demostrado el papel regulador del NI sobre la actividad theta de hipocampo dorsal, pero se desconoce su papel sobre el intermedio y ventral.

El NI presenta también elevada conectividad con la amígdala y la corteza prefrontal. La amígdala participa en el aprendizaje emocional y el control de comportamientos adaptativos, mientras que la corteza prefrontal está involucrada en el procesamiento de información cognitiva y emocionalmente relevante, la modulación de estados atencionales, la memoria y la toma de decisiones. Tanto el hipocampo como la corteza prefrontal y la amígdala están implicadas en patologías neuropsiquiátricas relacionadas con el estrés, como la ansiedad, en las que se ha propuesto al NI como diana terapéutica.

Dadas las interconexiones entre estas regiones y a su papel en el desarrollo de una respuesta adaptativa frente a un estresor, en esta Tesis Doctoral hemos estudiado la influencia del NI sobre el circuito amígdalo-hipocámpico-prefrontal, mediante su estimulación eléctrica y el registro de la actividad en hipocampo dorsal, intermedio y ventral, amígdala basolateral y corteza prefrontal infralímbica, en ratas de ambos sexos anestesiadas con uretano. Este estudio fue complementado por un análisis de expresión de c-fos en estructuras implicadas en la respuesta al estrés.

Nuestros resultados mostraron que el NI induce un estado oscilatorio propio de la vigilia activa, suprimiendo ondas lentas y generando ritmo theta en las tres regiones del hipocampo, así como un aumento de actividad gamma en todo el circuito. La estimulación reinició e indujo una mayor sincronización en theta y aumentó la comunicación también a frecuencias gamma entre hipocampo y amígdala basolateral, e incrementó el acoplamiento theta-gamma en hipocampo dorsal y corteza infralímbica. Además, pudimos observar, de forma preliminar, un cambio de direccionalidad dentro del circuito, con un aumento del flujo de información hacia IL así como desde HPCd al resto de estructuras. La estimulación eléctrica en machos, además, indujo un incremento de la expresión de c-Fos en numerosas estructuras cor-

tales, troncoencefálicas, diencefálicas y telencefálicas relacionadas con el estrés y con el procesamiento cognitivo. Todo ello apoya la implicación del NI en el procesamiento emocional y cognitivo de estímulos relevantes mediante su modulación de la actividad del circuito amigdalohipocámpico-prefrontal.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a todas las personas que de una forma u otra me han acompañado en este proceso.

Muchas gracias Joana y Vicent por el apoyo, la ayuda y la entrega que habéis demostrado. No era vuestro papel y aun así siempre habéis estado dispuestos a cumplirlo.

Gracias también a mis compañeros, los más cercanos, María, Esteban, Gloria, Danae y los que llegaron al final de la etapa, Rut, Manel, Camila y Anna. Sin duda, habéis hecho mucho más fácil y llevadero el proceso.

No me puedo olvidar de Arantxa, Eva, Sergio y Ceci, que siempre han estado predispuestos a compartir sus conocimientos y a ayudarme cuando lo he necesitado.

Y Ana, igual tendría que escribirte una enciclopedia entera para poder expresar lo agradecida que estoy. Gracias por tu entrega, tu aguante y por no haberme dejado abandonar. Por tu empatía y comprensión, por contagiarme (o al menos intentarlo) de esa tranquilidad y racionalidad con la que abor das los imprevistos. Admiro tu capacidad y resolución, haces que lo difícil parezca fácil.

Y por supuesto Hanna, me has acompañado en las aventuras y en las desventuras, gracias por estar en los días soleados y no huir durante los lluviosos. Gracias por tu ayuda y tu apoyo, seguro que sin ellos no habría terminado.

Y finalmente, gracias a mi familia, por su apoyo incondicional y su infinita paciencia. No hay suficientes palabras que puedan expresar lo afortunada que soy de teneros.

ÍNDICE GENERAL

1	Introducción	1
1.1	Redes neuronales	1
1.1.1	Oscilaciones cerebrales como marcos temporales	1
1.1.2	Implicaciones funcionales de las ondas cerebrales	3
1.1.3	Jerarquía oscilatoria y sintaxis neuronal: acoplamiento entre frecuencias	5
1.1.4	Alteraciones del patrón oscilatorio en patologías neuropsiquiátricas	6
1.2	El núcleo incertus	7
1.2.1	Ubicación del NI en el sistema reticular activador ascendente	7
1.2.2	Neuroquímica del NI	9
1.2.3	Conectividad	11
1.2.4	El núcleo incertus y la respuesta al estrés: nodo en el procesamiento cognitivo y emocional	13
1.2.5	El núcleo incertus como modulador de la actividad theta hipocámpica	14
1.3	El hipocampo	18
1.3.1	Conectividad intrínseca: circuito trisináptico	21
1.3.2	Organización dorsoventral del hipocampo	23
1.3.3	Regionalización funcional del hipocampo	24
1.4	Amígdala	26
1.4.1	Conectividad y funcionalidad de la amígdala	28
1.5	Corteza prefrontal	30
1.5.1	Conectividad y funcionalidad de la corteza prefrontal	31
1.6	Circuito hipocampo-amígdala-prefrontal	33
1.7	Planteamiento del problema	36
2	Hipótesis y objetivos	39
3	Material y métodos	41
3.1	Estudio electrofisiológico	41
3.1.1	Sujetos experimentales	41
3.1.2	Origen y registro de las señales bioeléctricas en el cerebro. Potencial de membrana y registro de potencial de campo	41
3.1.3	Metodología de los registros electrofisiológicos de LFP	43
3.1.4	Análisis de datos	53
3.2	Estudio de la expresión de c-Fos encefálica	65

3.2.1	Sujetos experimentales	65
3.2.2	Expresión de c-Fos: regulación y patrón de expresión	65
3.2.3	Metodología inmunohistoquímica	66
3.2.4	Análisis de resultados	69
4	Resultados	71
4.1	Resultados I	71
4.1.1	Variaciones en el patrón oscilatorio de los componentes del circuito amígdalo-hipocámpico-prefrontal inducidos por la estimulación eléctrica de NI	71
4.1.2	Frecuencia dominante	75
4.1.3	Análisis de las potencias relativas	79
4.1.4	Estudio de la actividad theta	84
4.1.5	Estudio de la comunicación en el circuito: actividad sincrónica entre estructuras	89
4.2	Resultados II	104
4.2.1	Regiones corticales	105
4.2.2	Regiones septales	106
4.2.3	Regiones de la formación hipocámpica	107
4.2.4	Regiones del complejo amigdalino	108
4.2.5	Regiones diencefálicas	109
4.2.6	Regiones troncoencefálicas	111
5	RESUMEN DE LOS RESULTADOS	113
6	Discusión	117
6.1	NI como activador del procesamiento emocional y cognitivo	117
6.2	NI altera el patrón oscilatorio del circuito	120
6.2.1	La potencia de las ondas lentas se vio mermada por la estimulación eléctrica del NI	122
6.2.2	La estimulación eléctrica del NI activa la oscilación theta bajo en el circuito amígdalo-hipocámpico-prefrontal	124
6.2.3	La estimulación eléctrica del NI aumentó la actividad gamma en el circuito	127
6.3	Efectos sobre la comunicación dentro del circuito	129
6.3.1	La estimulación de NI aumenta la sincronización en el circuito a frecuencias theta y gamma	129
6.3.2	La estimulación eléctrica del NI aumenta el intercambio de información a frecuencia gamma en machos	130
6.3.3	Durante la estimulación observamos un incremento del acoplamiento fase-amplitud entre theta bajo y gamma	131
6.3.4	El NI provoca cambios en la direccionalidad del circuito	133

6.4	La estimulación eléctrica de NI indujo la activación celular	134
6.5	Limitaciones del estudio y perspectivas de futuro	136
7	Conclusiones	139
8	Bibliografía	143
9	Anexos	182

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Clasificación de los ritmos cerebrales corticales	2
Figura 2	Ubicación anatómica del núcleo incertus en el cerebro de rata	9
Figura 3	Presentación de las proyecciones de NI en el cerebro de rata	12
Figura 4	Mapeo de la expresión de RLX3	13
Figura 5	Esquema de principales conexiones de NI con otras áreas cerebrales involucradas en la regulación del ritmo theta de hipocampo	16
Figura 6	Patrón de disparo de las células NI	17
Figura 7	Análisis del reinicio de fase de la frecuencia theta en el hipocampo inducido por la estimulación eléctrica de NI	18
Figura 8	Localización y organización longitudinal del hipocampo en rata y humano	20
Figura 9	Conexiones aferentes y eferentes de la formación hipocampal	22
Figura 10	Circuito trisináptico del hipocampo	23
Figura 11	Núcleos del complejo amigdalino en rata	28
Figura 12	Conexiones intrínsecas de la amígdala	30
Figura 13	Conexiones CPF-hipocampo	32
Figura 14	Estudios de lesiones en hipocampo y CFPm	35
Figura 15	Proyecciones de amígdala basolateral sobre hipocampo	36
Figura 16	Visiones lateral y dorsal del cráneo de rata estándar de aproximadamente 290 g	47
Figura 17	Visión sagital y coronal de la posición de los electrodos	48
Figura 18	Transformada de Fourier	54
Figura 19	Fundamentos análisis <i>wavelet</i>	56
Figura 20	Señal promedio de un ejemplar macho representativo	72
Figura 21	Perfil oscilatorio promedio de un ejemplar macho representativo	73
Figura 22	Señal promedio de un ejemplar hembra representativo	74
Figura 23	Perfil oscilatorio promedio de un ejemplar hembra representativo	75
Figura 24	Resultados estadísticos del análisis de la frecuencia pico en machos	77

Figura 25	Resultados estadísticos del análisis de la frecuencia pico en hembras	78
Figura 26	Resultados estadísticos de la comparación de la frecuencia dominante entre machos y hembras	79
Figura 27	Análisis de la potencia relativa en machos (I)	80
Figura 28	Análisis de la potencia relativa en machos (II)	81
Figura 29	Análisis de la potencia relativa en hembras (I)	82
Figura 30	Análisis de la potencia relativa en hembras (II)	83
Figura 31	Comparación por sexos de la potencia relativa de la frecuencia gamma	84
Figura 32	Efecto de la estimulación del NI sobre la distribución de la actividad oscilatoria en el circuito	85
Figura 33	Análisis de la los segmentos de actividad theta bajo en machos	87
Figura 34	Análisis de la los segmentos de actividad theta bajo en hembras	88
Figura 35	Sincronización entre hipocampo dorsal y amígdala basolateral	90
Figura 36	Detalle de la sincronización entre hipocampo dorsal y amígdala basolateral a frecuencias gamma	91
Figura 37	Detalle de la sincronización entre hipocampo dorsal y corteza infralímbica a frecuencias gamma	92
Figura 38	Detalle de la sincronización entre amígdala basolateral y corteza infralímbica a frecuencias gamma	93
Figura 39	wPLI en machos para las ondas theta y gamma	95
Figura 40	wPLI en hembras para las ondas theta y gamma	96
Figura 41	Reinicio de la onda theta 2.5-6Hz	97
Figura 42	Información mutua a frecuencia gamma en machos	99
Figura 43	Información mutua a frecuencia gamma en hembras	100
Figura 44	Estudio preliminar de la causalidad en el circuito amigdaló-hipocámpico-prefrontal	102
Figura 45	Acoplamiento fase-amplitud de theta bajo con gamma bajo y gamma medio	104
Figura 46	Marcaje de c-FOS en las cortezas infralímbica y prelímbica	106

Figura 47	Marcaje de c-FOS en el septum lateral dorsal 107
Figura 48	Marcaje de la expresión de c-Fos en el núcleo paraventricular del tálamo 110
Figura 49	Marcaje de c-Fos en el núcleo paraventricular del hipotálamo 111
Figura 50	Marcaje de c-Fos en el núcleo parabraquial 112
Figura 51	Resumen de los resultados del estudio de actividad 113
Figura 52	Resumen de los resultados del estudio de sincronización 114
Figura 53	Resumen de los resultados del estudio del acoplamiento theta-gamma 115
Figura 54	Resumen de los resultados del estudio preliminar de la causalidad 115
Figura 55	Resumen de los resultados del estudio de expresión de la proteína c-Fos 115

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Coordenadas de las estructuras de interés tomando bregma como referencia	47
Tabla 2	Frecuencia pico en machos	76
Tabla 3	Frecuencia pico en hembras	78
Tabla 4	Recuento de células inmunorreactivas para c-Fos en estructuras corticales	105
Tabla 5	Recuento de células inmunorreactivas para c-Fos en estructuras septales	107
Tabla 6	Recuento de células inmunorreactivas c-Fos en la formación hipocámpica	108
Tabla 7	Recuento de células inmunorreactivas para c-Fos en el complejo amigdalino	109
Tabla 8	Recuento de células inmunorreactivas para c-Fos en regiones diencefálicas	109
Tabla 9	Recuento de células inmunorreactivas para c-Fos en regiones troncoencefálicas	112
Tabla 10	Potencias relativas en machos	182
Tabla 11	Potencias relativas en hembras y diferenciación sexual entre ejemplares	183
Tabla 12	Recuento de regiones con actividad theta en machos	184
Tabla 13	Tiempo medio de los segmentos con actividad theta en machos	185
Tabla 14	Tiempo total con actividad theta en machos	186
Tabla 15	Recuento de regiones con actividad theta en hembras	187
Tabla 16	Tiempo medio de los segmentos con actividad theta en hembras	188
Tabla 17	Tiempo total con actividad theta en hembras	189
Tabla 18	Información mutua de la frecuencia gamma en machos	190
Tabla 19	Información mutua de la frecuencia gamma en hembras y diferencias sexuales	191
Tabla 20	wPLI theta bajo y theta alto en machos	192
Tabla 21	wPLI gamma bajo y gamma medio en machos	193
Tabla 22	wPLI theta bajo y theta alto en hembras y diferencias sexuales	194
Tabla 23	wPLI gamma bajo y gamma medio en hembras y diferencias sexuales	195
Tabla 24	Acoplamiento fase-amplitud en machos	196

Tabla 25	Acoplamiento fase-amplitud en hembras y diferencias sexuales	197
----------	--	-----

ABREVIATURAS

AAA: área de la amígdala anterior	NI: núcleo incertus
AChE: enzima acetilcolinesterasa	NIc: núcleo incertus parte compacta
ACo: núcleos corticales anterior	NId: núcleo indertus parte dissipata
AHA: área amígdalohipocampal	NLOT: núcleo del tracto olfatorio lateral
Apir: zona de transición amígdalopiriforme	NMB: neuromedina B
ARAS: sistema reticular activador ascendente	PAC: corteza periamigdalóide
BAOT: núcleo del lecho del tracto olfatorio accesorio	PAG: sustancia gris periacueductal
BLA: amígdala basolateral	PCo: núcleos corticales anterior
BNST: núcleo del lecho de la estría terminalis	PDTg: núcleo tegmental posterodorsal
BMA: núcleo basomedial de la amígdala	PER: corteza perirrinal
CA1-3: campos del asta de Ammon (1-3)	PFC: corteza prefrontal
CB: calcio calbindina	PL: corteza prefrontal
CCK: colecistoquinina	PLCo: núcleo amigdalóide cortical posterolateral
CE: corteza entorrinal	PMCo: núcleo amigdalóide cortical posteromedial
CeA: núcleo central de la amígdala	RLN3: relaxina 3
Cg: corteza cingulada	POR: corteza postrinal
CM: núcleo centromedial del tálamo	RPO: núcleo reticular pontino oral
CPF: corteza prefrotal	PaAP: núcleo paraventricular del hipotálamo
CRH: factor liberador de corticotropina	PV/PVT: núcleo talámico paraventricular
CRH1: receptor 1 del factor liberador de corticotropina	RXFP3: receptor nativo de la RLX3
DBB: banda diagonal de Broca	SUM: núcleo supramamilar
DTT: tenia tecta dorsal	VGLUT2: transportador vesicular de glutamato
DR: rafe dorsal	VTA: área ventral tegmental
DT: núcleo dorsal tegmental	VTT: tenia tecta ventral
Ect: corteza ectorrinal	5HT1A: receptores para serotonina-1A
FC: giro fasciolar	
GABA: ácido γ -aminobutírico	
GAD: glutamato descarboxilasa	
GC: sustancia gris central	
GD: giro dentado	
HPCd: hipocampo dorsal	
HPCi: hipocampo intermedio	
HPCv: hipocampo ventral	
IC: masas celulares intercaladas	
IL: corteza infralímbica	
LA: amígdala lateral	
LC: locus coeruleus	
LPB: núcleo parabraquial	
LS: núcleos septales laterales	
MeA: núcleo medial de la amígdala	
MD: núcleo talámico mediodorsal	
mGluR3: receptores metabotrópicos tipo 3 para glutamato	
MR: rafe medial	
MS: septum medial	
M1: corteza motora primaria	
NAc: núcleo accumbens	

INTRODUCCIÓN

1.1 REDES NEURONALES PARA EL PROCESAMIENTO COMPLEJO DE LA INFORMACIÓN

El cerebro es un sistema complejo compuesto por numerosas entidades funcionales interconectadas entre sí a distintos niveles. A nivel de microescala, se forman conexiones entre neuronas individuales; a una escala intermedia se conforman circuitos locales y finalmente a macroescala se dan conexiones entre regiones distribuidas (Tognoli y Kelso, 2009). Estas entidades funcionales se conectan entre sí generando comportamientos dinámicos que se deben adaptar a sus propiedades intrínsecas y a la influencia mutua que ejercen entre sí (Kelso y Tognoli, 2007). La mayor parte de las funciones tanto cognitivas como perceptivas y motoras se basan en la interacción coordinada de multitud de neuronas distribuidas en diferentes zonas especializadas del cerebro (Ward, 2003). Es por ello que la comprensión de un órgano tan complejo va más allá del estudio de sus componentes; es preciso describir los vínculos funcionales entre áreas del cerebro y explicar los mecanismos integradores que coordinan las complejas funciones cognitivas y perceptivas llevadas a cabo por el cerebro.

1.1.1 *Oscilaciones cerebrales como marcos temporales*

Desde los inicios de la electrofisiología, se han registrado varios patrones rítmicos de actividad cerebral, que difieren en frecuencia, ubicación y relación con el comportamiento o la actividad cognitiva (Tononi et al., 1992). El término oscilaciones cerebrales se refiere a esta actividad eléctrica rítmica y/o repetitiva generada en el sistema nervioso que se produce de forma espontánea o en respuesta a estímulos (Başar, 2013). Al igual que ocurre en otros sistemas, en el cerebro, la actividad de sus componentes debe codificarse, empaquetarse y coordinarse para convertirse en información (Buzsáki, 2015). Las oscilaciones cerebrales son un reflejo de la actividad sincrónica de grupos neuronales dispersos, las cuales facilitan la asociación de procesos en el tiempo (Buzsáki, 2006), por esta razón, los ritmos oscilatorios son los mejores candidatos para llevar a cabo ese papel de coordinación.

Los ritmos cerebrales han sido descritos tanto en invertebrados como vertebrados, incluidas numerosas especies de mamíferos. Hay al menos diez ritmos cerebrales descritos que abarcan como mínimo cuatro órdenes de magnitud en el rango de frecuencia, aproximadamente de los 0.2 hasta los 600 Hz (Figura 1). Los distintos ritmos se clasifican en virtud de su rango de frecuencia, más que los procesos en los que participan. Las diferentes bandas de frecuencia proporcionan un marco sintáctico que permite empaquetar la información en diferentes ventanas temporales y transmitirla a otras regiones para conseguir una respuesta coordinada. Así, cada oscilación cerebral representa una ventana temporal que marca el inicio y el fin de la codificación de un mensaje, es decir, el cerebro opera empleando paquetes temporales (Buzsáki, 2006).

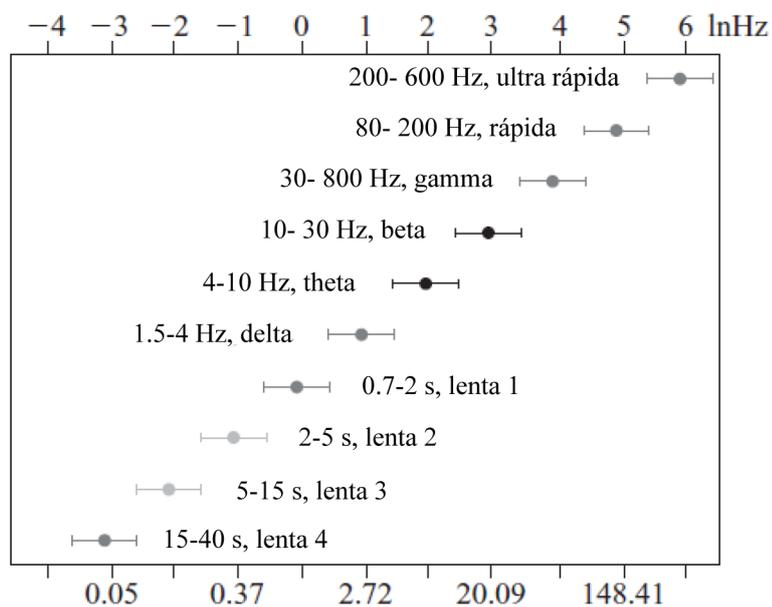


Figura 1: Clasificación de los ritmos cerebrales corticales. Se muestra una progresión lineal de los ritmos en escala logarítmica. Adaptada de Penttonen y Buzsáki (2003).

Los ritmos surgen a partir de la retroalimentación entre las neuronas que dan como resultado la sincronización de sus patrones de activación. Si bien es cierto que estos ritmos están conservados en la escala evolutiva, existen pequeñas variaciones en el rango y nomenclatura entre especies.

En los sistemas más sencillos, las neuronas están provistas de corrientes marcapasos que promueven la actividad rítmica y la resonancia a frecuencias de onda específicas. En el caso de sistemas más complejos, las oscilaciones se originan por la actividad de microcircuitos específicos en los que la inhibición posee un papel destacado (Grillner, 2006; Buzsáki, Logothetis y Singer, 2013). Los potenciales inhibitorios postsinápticos (inhibitory postsynaptic potential, IPSP) generados por parte de redes específicas de interneuronas sobre pobla-

ciones neuronales generan esta actividad sincrónica que es capaz de proporcionar ventanas de excitabilidad alternante de las células principales de una manera coordinada en el tiempo (Buzsáki, 2006). Las oscilaciones más rápidas se generan por las fluctuaciones de potencial de membrana de un número de células reducido que se sincronizan dentro de un volumen neural restringido, mientras que las más lentas son el resultado de la actividad sincrónica de un mayor número de neuronas distribuidas de manera más generalizada en todo el cerebro (He et al., 2008). Cuando el cerebro se involucra en procesos específicos como pueden ser el procesamiento de estímulos sensoriales, la orientación espacial o la atención, las frecuencias propias de la actividad local se vuelven dominantes.

1.1.2 *Implicaciones funcionales de las ondas cerebrales*

El hecho de que la mayoría de las bandas de frecuencia se correlacionen con ciertos patrones conductuales ha derivado en la consideración de que estas contribuyen al procesamiento de la información neural (Ekstrom et al., 2003).

La aparición de las oscilaciones lentas (<1 Hz) ha sido bien documentada en animales tanto en estados de sueño como de vigilia. Este ritmo altamente conservado (Jaggard et al., 2021) consiste en periodos de actividad neuronal sincrónica intercalados con periodos quiescentes (Steriade et al., 1993, Buzsáki et al., 2013). Es un fenómeno de sincronización de red a escala global que involucra regiones corticales y subcorticales (Ros et al., 2009). Durante los periodos de ondas lentas, los periodos de silencio neuronal permiten la homeóstasis, la reparación celular y tisular y el ahorro energético (estados DOWN), mientras que en los periodos UP, corteza y tálamo expresan de forma espontánea actividad sincrónica y contribuyen al aprendizaje y a la consolidación de memoria (Neske, 2016).

La actividad theta (3 a 12 Hz) fue descrita por primera vez por Jung y Kornmüller en 1938, entonces no se conocía su función en el cerebro, pero sí que observaron su amplitud y regularidad casi sinusoidal. En 1972 Landfield y compañeros descubrieron un vínculo existente entre la generación de theta hipocámpico y la memoria y aprendizaje (Landfield et al., 1972; Berry y Thompson, 1978). El ritmo theta está presente durante el movimiento y con mayor amplitud si el movimiento es activo y no pasivo (Terrazas et al., 2005) y que también está presente durante los comportamientos asociados con la entrada de estímulos (Macrides et al., 1982). El ritmo theta tipo II es propio de la inmovilidad y la anestesia con uretano y se caracteriza tener una frecuencia más baja, en cambio, el ritmo theta tipo I, cuya frecuencia es más alta, es propio de los estados activos (Gu et al., 2017). Si bien es cierto que la regulación colinérgica del ritmo theta ha sido asociada tradicionalmente con la generación del ritmo theta I, actualmente se

considera que además esta vía participa en la regulación del ritmo theta propio del aprendizaje y la codificación espacial del hipocampo (Gu y Yakel., 2022). Existe consenso en que el septum medial (medial septum, MS) es el generador del ritmo theta en hipocampo, ya que su lesión deriva en la interrupción de la actividad theta en hipocampo (Green y Arduini 1954). En concreto, las interneuronas GABAérgicas de proyección del MS ejercen la acción de marcapasos (Gaztelu y Buño, 19982; Tóth et al., 1997) con canales iónicos activados por hiperpolarización y modulados por nucleótidos cíclicos. Mediante su disparo rítmico a frecuencia theta son capaces de bloquear la fase a esta misma frecuencia en el hipocampo con un retraso de aproximadamente 80 ms (Hangya et al., 2009). Aunque el propio hipocampo posee la maquinaria necesaria para producir theta intrínsecamente, lo que se ha demostrado *in vitro*, hay muchas evidencias que indican que el MS está involucrado en la generación de la oscilación theta durante el comportamiento de los animales (Colgin, 2013).

El ritmo beta (10-30 Hz) ha sido observado principalmente en cortezas sensorimotoras (Kramer et al., 2008) y en estructuras de los núcleos basales (Holgado et al., 2010; Mirzaei et al., 2017) y se cree que participan en el procesamiento sensorial y en el control motor (Pfurtscheller y Lopes da Silva, 1999). La ratio de esta onda aumenta en las áreas sensorimotoras durante las posturas estables y disminuye durante los estados activos como la planificación y ejecución de los movimientos y aumenta de nuevo al concluirlos (Baron y Rossiter, 2021). El rango beta incluye varios tipos de oscilaciones a diferentes frecuencias, las lentas (10-20 Hz) cuyo papel parece ser anticinético, y las rápidas (>24 Hz) que reflejan atención y anticipación de señales sensoriales (Brown, 2003; Saleh et al., 2010). Pese a que investigaciones anteriores describían el ritmo beta como un ciclo repetido de actividad oscilatoria sostenida en el tiempo, numerosos estudios recientes reconsideran que estas oscilaciones no son sostenidas, sino que su actividad se manifiesta en periodos temporales localizados (Sherman et al., 2016; Shin et al., 2017; Little et al., 2019). En la rata, en condiciones fisiológicas, las oscilaciones de frecuencias más rápidas han sido descritas principalmente en la vigilia activa, incluyendo gamma bajo (30-60 Hz), medio (60-90 Hz) y alto (90-120 Hz). No obstante, también aparecen durante las fases activas del sueño, asociadas a los estados activos (UP states de las ondas lentas). El ritmo gamma es un componente de frecuencia relativamente alta que aumenta con los impulsos sensoriales (Adrian, 1942) y durante procesos cognitivos como la memoria de trabajo y la atención (Fries et al., 2007). Esta oscilación ha sido observada en varias áreas corticales y estructuras subcorticales en diferentes especies animales (Jia y Kohn, 2011) y son ritmos esenciales para la codificación y recuperación de la memoria (Jackson et al., 2011). Por tratarse de frecuencias rápidas, su aparición

local correlaciona con la realización de tareas específicas, como el procesamiento visual o auditivo.

1.1.3 *Jerarquía oscilatoria y sintaxis neuronal: acoplamiento entre frecuencias*

La longitud de onda determina el tamaño de la ventana temporal, favoreciendo distintos tipos de conexiones y niveles computacionales. De este modo, en la generación de las ondas lentas participa un número elevado de neuronas que forman parte de regiones amplias y dispersas del cerebro mientras que las ondas rápidas se originan por el reclutamiento de un número de neuronas más reducido que se activan localmente. La computación requiere la transmisión de la información de un lugar a otro. Así, cuando la distancia a recorrer es menor, las ventanas temporales reducidas son suficientes para procesar la actividad local, por lo que el procesamiento a nivel de microcircuito se caracteriza por la aparición de ritmos oscilatorios cortos. Si, por el contrario, es precisa la integración global de la actividad local de grupos neuronales distanciados, se necesitan ventanas temporales mayores, que se traduce en ritmos lentos (Buzsáki, 2006). La comunicación entre distintas estructuras tiene un papel esencial en el procesamiento neuronal complejo de los mamíferos (O'Keefe y Dostrovsky, 1971; Muller, 1987; Peylo et al., 2022). Sin embargo, estos procesos no se dan aisladamente sino que requieren la integración de la información procesada a diferentes escalas.

El cerebro tiene la capacidad de subsanación y predicción basadas en una serie de propiedades complejas como son habilidad para retener información y la integración de la actividad global y local. La retención de información consiste en la capacidad del cerebro para conservar un rastro duradero una vez finalizado el input inicial. La habilidad integradora se corresponde con la capacidad de integrar una gran cantidad de procesos locales distribuidos en estados ordenados globalmente (Tononi et al., 1998, Dehaene et al., 1998; Spooner y Wilson, 2022). Este proceso se realiza mediante la transmisión simultánea de la actividad local de distintas áreas cerebrales. Esta actividad local está sujeta al control de la actividad cerebral global o control de arriba hacia abajo (Engel et al., 2001, Varela et al., 2001). Un requisito para que la comunicación local-global sea efectiva es que los resultados de los cálculos locales en múltiples áreas se integren dentro de la ventana de tiempo de integración (Buzsáki, 2010; Voloh y Womelsdorf, 2016).

Muchas oscilaciones a menudo ocurren de manera simultánea en el mismo estado cerebral e interactúan entre sí dentro de la misma estructura o a través de diferentes estructuras. Estas oscilaciones suelen mantener una relación jerárquica, de manera que la fase de la oscilación más lenta modula la potencia de las más rápidas (Chrobak y Buzsáki, 1998, Leopold et al., 2003, Canolty et al., 2006, Buzsáki y

Wang, 2012; Dong et al., 2022). Esto permite la integración de ambas simultáneamente. Este fenómeno de acoplamiento entre frecuencias ocurre durante la realización de diferentes procesos cognitivos, constituyendo un código sintáctico general. Son ejemplos concretos de esta organización jerárquica el acoplamiento theta-gamma característico de estados de procesamiento hipocámpico (Lisman y Jensen, 2013), o el acoplamiento entre ondas lentas, spindles y ripples que se produce durante el sueño no-REM (Staresina et al., 2015).

1.1.4 *Alteraciones del patrón oscilatorio en patologías neuropsiquiátricas*

Está demostrado que la disfunción en la generación y/o coordinación de las oscilaciones neurales está implicada en la fisiopatología de los trastornos neuropsiquiátricos (Mathalon y Sohal, 2015; Yakubov et al., 2022). Es por eso que el estudio de la actividad electrofisiológica puede emplearse como herramienta que reflejaría los cambios dinámicos cerebrales funcionales que podrían usarse como biomarcadores de enfermedades neuropsiquiátricas y neurodegenerativas como el trastorno por déficit de atención con hiperactividad, enfermedad de Alzheimer, trastorno bipolar, Parkinson y esquizofrenia, entre otras (Yener y Başar, 2013).

Actualmente, los trastornos neuropsiquiátricos tienen una elevada prevalencia, pero a pesar de ello, su diagnóstico sigue siendo complicado, en parte debido a la variada expresión sintomatológica. Por ello se han buscado otros marcadores diagnósticos que permitan discriminar entre trastornos y proporcionar un diagnóstico y tratamiento adecuados a los pacientes (Ippolito et al., 2022). Los estudios electrofisiológicos han demostrado que existe un incremento de la actividad gamma tanto en modelos animales como en pacientes con esquizofrenia (Ahnaou et al., 2017). Esta alteración del ritmo gamma podría estar ocasionada por déficit en la neurotransmisión mediada por el neurotransmisor γ -aminobutírico (GABA) (Bartos et al., 2007; Lewis et al., 2004) en neuronas inhibitoras, las cuales son esenciales en la generación de los ritmos gamma (Sohal et al., 2009). Por otro lado, aunque las oscilaciones beta (13–30 Hz) son una característica común en la red cortico-ganglio basal- talámica, el incremento aberrante de estas en la sustancia negra y el globo pálido puede contribuir a los síntomas motores propios de la enfermedad de Parkinson (Brown, et al., 2001, Singh, 2018).

Como ya mencionábamos con anterioridad, son numerosas las enfermedades neuropsiquiátricas que se han relacionado con un patrón de actividad neural aberrante lo cual convierte al estudio de la actividad oscilatoria de las redes neuronales en una potente herramienta para la detección de estas patologías. Así mismo, el conocimiento de estas alteraciones y los mecanismos subyacentes pueden contribuir al desarrollo de nuevos tratamientos.

1.2 EL NÚCLEO INCERTUS

El origen del término *núcleo incertus* es complejo, ya que a lo largo de los años su parcelación anatómica ha sido objeto de controversia. Fue inicialmente introducido en 1903 por Streeter para describir una región en el cerebro humano localizada ventral al cuarto ventrículo. No obstante, el NI fue descrito más adelante también por Morest (1961) y Cowan (1964), pero en estos casos esta estructura fue nombrada como parte del *núcleo dorsal tegmental*. Por entonces, ya se hacía referencia a la subdivisión de este núcleo en función del destino de sus proyecciones sobre la región mamilar (Guillery, 1957). Estas subdivisiones fueron denominadas partes *centralis* (DTc), *anterior* (DTa), *posterior* (DTp) y *ventromedialis* (DTvm) (Morest, 1961), siendo precisamente esta última la que posteriormente recibió la denominación de *núcleo incertus*. Fue en 1979 cuando Wyss y compañeros identificaron el NI como un grupo celular distinto, con principalmente neuronas multipolares de tamaño medio que se encuentra en el tegmento pontino situado en el suelo del cuarto ventrículo, medial al núcleo laterodorsal tegmental y al *locus coeruleus* e inmediatamente posterior al núcleo dorsal del rafe. Esta región, formada por células de tamaño medio distribuidas a los dos lados de la línea media, ha sido denominado también como *núcleo O* (Meessen y Olszewski, 1949), *núcleo recessus pontis medialis* (Tanaka et al., 2005) o sustancia gris central (CG), como figura en los atlas de Paxinos y Watson (Paxinos y Watson, 2015). Cabe mencionar que en el caso del núcleo O, debido a sus características histológicas y quimioarquitectónicas se corresponde con la parte compacta de NI (NIc) que más adelante describiremos.

Si bien fue descrito inicialmente por Streeter, este lo describió en el cerebro humano, posteriormente fue descrito en varias especies experimentales y se describió su anatomía y el mapa de sus conexiones. Este núcleo presenta gran conectividad con la red neuronal causante de la generación de la actividad theta (Goto et al., 2001; Olucha-Bordonau et al., 2003; Cervera-Ferri et al., 2012) y en trabajos previos de nuestro grupo ya se ha demostrado su papel sobre la actividad theta de hipocampo (Cervera-Ferri et al., 2011).

1.2.1 Ubicación del NI en el sistema reticular activador ascendente

El sistema reticular activador ascendente (ARAS) está constituido por varios núcleos troncoencefálicos y circuitos neuronales que conectan el tronco encefálico con la corteza cerebral (Yeo et al., 2013). Este sistema contribuye a los procesos que requieren una activación prosencefálica, como la atención, el aprendizaje o la respuesta de estrés (Mourizzi y Magoun, 1949; Maldonado, 2014). La complejidad de las proyecciones ascendentes que surgen de la formación reticular ponto-mesencefálica y la contribución de las estructuras no reticulares

del tronco encefálico llevan a considerar la relevancia del prosencéfalo basal como un relevo clave para estos sistemas ascendentes (Parvizi y Damasio, 2001). El *septum medial* (MS) juega un papel central en el control del ritmo theta de hipocampo, ya que es el relevo final de las proyecciones ascendentes que surgen de los cuerpos mamilares, el rafe medio y del núcleo *reticularis pontis oralis* (RPO) (Bland et al., 1994). NI proyecta a todos los componentes de este sistema ascendente (Goto et al., 2001; Olucha-Bordonau et al., 2003) y es un nexo entre RPO, principal estructura generadora de theta del tronco y el MS (Teruel-Martí et al., 2008), lo que lo convierte en un elemento clave en la conducción del theta hipocámpico, y por lo tanto en un componente del ARAS (Olucha-Bordonau et al., 2003). Así, el NI es un nodo en el control ascendente del sistema hipocámpico y del ritmo theta hipocámpico (Núñez et al., 2006) involucrado en el control de la memoria contextual, la excitación y las respuestas al estrés (Ma et al., 2013; Lu et al., 2020). De acuerdo con la clasificación anatómica, el NI en el cerebro de rata está localizado en el segmento prepontino del rombencéfalo, y se sitúa ventral y medial al núcleo tegmental posterodorsal (PDTg) en la sustancia gris periventricular (Goto et al., 2001, Olucha-Bordonau et al., 2003). En rata adulta, este núcleo se encuentra situado a los 9.12 mm por detrás de Bregma y se extiende unos 0.7 mm a lo largo del eje rostro-caudal y se divide en dos partes, *pars compacta* (NIc) y *pars dissipata* (NIId) (Figura 2), que equivalen a las porciones CGA, CGB y CGg del Atlas de Paxinos y Watson. NIc se localiza en la línea media, dorsal al fascículo longitudinal medial, formando dos columnas densas de neuronas a ambos lados de la línea media. En el caso de NIId, esta recorre lateralmente NIc, ventral a los núcleos dorsal y posterodorsal tegmental y sus neuronas están empaquetadas de forma más dispersa (Goto et al., 2001).

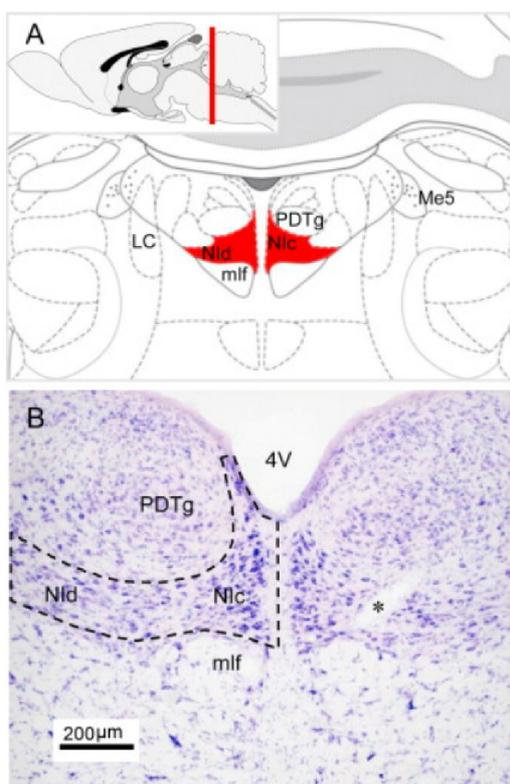


Figura 2: (A) El NI se localiza en la región prepontina del romboencéfalo, medial al locus ceruleus (LC) y caudal al rafe dorsal. (B) Sección teñida con Nissl en la que se describen los límites de la *pars compacta* (NIC) y la *textitpars dissipata* (NID). Obtenida de Ryan (2011).

1.2.2 Neuroquímica del NI

Debido a su ubicación, tradicionalmente este núcleo fue considerado como parte del rafe dorsal. No obstante, los estudios neuroquímicos y conectivos del núcleo han permitido diferenciarlos, ya que, a diferencia del rafe dorsal, que es principalmente serotoninérgico, el NI está formado por una población neuronal que expresa en su mayoría glutamato descarboxilasa (GAD), una enzima que participa en la síntesis del neurotransmisor ácido γ -aminobutírico (GABA) (Ford et al., 1995). Esta población de neuronas GAD positivas ha sido descrita como neuronas GABAérgicas con proyecciones eminentemente largas (Ma et al., 2007). Pese a haberse considerado tradicionalmente como un núcleo mayoritariamente inhibitorio debido a la predominancia de neuronas GABAérgicas, nuestro grupo demostró la existencia, además, de neuronas que contenían el transportador vesicular de glutamato VGLUT2 que proyectan sobre el complejo septal (Cervera-Ferri et al., 2012).

Este núcleo además expresa proteínas fijadoras de calcio calbindina (CB) de manera uniforme en todo el NI y calretinina (CR) en la parte compacta (Cervera-Ferri et al., 2012) y también expresa distintos neuropéptidos, entre ellos la relaxina-3 (RLX₃) (Burazin et al., 2002, Ma et al., 2007) así como colecistoquinina (CCK) (Kubota et

al., 1983), la neuromedina B (NMB) (Chronwall et al., 1985, Wada et al., 1990) y la enzima acetilcolinesterasa (AChE), cuya presencia indica que las células del NI pueden ser activadas por la acetilcolina (Olucha-Bordonau et al., 2003). Así mismo, presenta expresión de receptores de neuropéptidos y neurotransmisores, incluido el receptor 1 del factor liberador de corticotropina (CRH1), así como receptores para serotonina-1A (5HT1A) y receptores metabotrópicos tipo 3 para glutamato (mGluR3) (Ryan et al., 2011).

La RLX3 es un péptido que pertenece a una superfamilia de péptidos estructuralmente muy similares a la insulina, evolutivamente muy conservada (Wilkinson, 2005). Este péptido es liberado de manera muy específica por las neuronas de NI (Burazin, 2001; Ma et al., 2009; Smith et al., 2010) y actúa como ligando del receptor 3 de la familia de las relaxinas (RXFP3) (Bathgate et al., 2006). Adicionalmente, estudios de expresión de ARNm para este péptido revelaron tres grupos neuronales adicionales en los que se expresa, localizados en la parte lateral de la sustancia negra, la parte ventrolateral de la sustancia gris periacueductal (PAG) y el núcleo del rafe pontino (Tanaka et al., 2005; Ma et al., 2007; Smith et al., 2010). Experimentos realizados en rata sugieren que esta proteína modula la excitación, la respuesta al estrés, el hambre, el sueño y la memoria (Smith, 2011) además de jugar un papel esencial en la generación y regulación de la actividad theta de hipocampo (Ma et al., 2009; Kania, 2014). Por otra parte, las neuronas de NI RLX3 positivas coexpresan GABA (Ma et al., 2007).

Esta neuroquímica resulta relevante en el establecimiento de estados de activación elevada y el estrés. La expresión del receptor CRH1 (Van Pett et al., 2000), cuyo ligando es la hormona liberadora de corticotropina (CRH), es especialmente abundante en NI (Potter et al., 1992, 1994; Chalmers et al., 1995). Esta hormona es mediadora en la respuesta de estrés e induce una activación generalizada (Sutton et al., 1982; Fisher, 1993; Koob et al., 1999). La exposición a diferentes factores estresantes incrementa los niveles de CRH y por tanto la activación del receptor CRH1 (Tanaka, 2005). La elevada expresión de estos receptores hace que este núcleo se active por estresores muy diversos, como pueden ser la natación forzada o la administración de drogas angiogénicas (Cullinan et al., 1995; Singewald et al., 2000). La activación de este receptor en las neuronas permite que NI regule la actividad de las regiones sobre las que proyecta mediante la liberación de RLX3 sobre estas regiones (Smith, 2010; Ryan, 2011). Por otro lado, las neuronas RLX3 expresan el receptor (5HT1A) y dado que la supresión de la serotonina en NI ocasiona un aumento de la RLX3, este neurotransmisor juega también un papel regulador de la expresión de RLX3 en NI (Miyamoto et al., 2008).

1.2.3 *Conectividad*

Mediante el uso de trazadores retrógrados y anterógrados, estudios de Goto y compañeros en 2001 y también de nuestro grupo en 2003 evidenciaron las aferencias y eferencias de este núcleo. Basándose en sus conexiones eferentes, pudieron concluir que el NI puede ser una estructura clave en el sistema reticular activador ascendente, ya que puede ser fundamental en la modulación de la actividad de corteza prefrontal e hipocampo, además de influir en las localizaciones del cerebro encargadas del control del comportamiento locomotor, los estados de atención y los procesos de aprendizaje.

Dado que una de las características neuroquímicas más destacable de las neuronas de NI es la coexpresión de RLX3 y GABA, las conexiones de NI también se han estudiado empleando diferentes técnicas histológicas que han permitido mapear la distribución anatómica de la proteína RLX3 y su receptor nativo RXFP3 en el cerebro de ratón adulto. Como cabría esperar, la distribución de las proyecciones de neuronas RLX3 positivas y los lugares de expresión del receptor RXFP3 se superponen en gran medida entre sí (Sutton et al., 2004; Tanaka et al., 2005; Ma et al., 2007; Smith et al., 2010) y además coinciden en su mayoría con las conexiones eferentes de NI descritas mediante el estudio de trazadores. Estas pequeñas diferencias en las proyecciones resultantes del estudio con trazadores y las proyecciones de RLX3 probablemente se deban a que la inervación de relaxina-3 de estas áreas provenga de otras poblaciones que también expresan esta proteína y son externas al NI, como son el núcleo pontino del rafe, la sustancia gris periacueductal anterior y poblaciones adyacentes a la sustancia negra (Burazin et al., 2002; Tanaka et al., 2005; Ma et al., 2007; Gundlach et al., 2009).

De la conectividad de NI (Figura 3), cabe destacar la profusión de sus proyecciones ascendentes y las conexiones recíprocas que presenta con numerosas regiones implicadas en la modulación del ritmo theta, como son la región septal, especialmente el complejo septum medial/banda diagonal de Broca (MS/DBB), el hipocampo, el núcleo RPO, los núcleos del rafe, los núcleos tegmentales y el núcleo supramamilar y otras regiones hipotalámicas (Goto et al., 2001; Olucha-Bordonau et al., 2003; Teruel-Martí et al., 2008). Es también subrayable su extensa y conocida conectividad con regiones involucradas en el procesamiento emocional como son el núcleo paraventricular del tálamo (PVT) y los núcleos amigdalinos basolateral, cortical y medial, así como sobre el área amigdalohipocámpica y sobre regiones encargadas del control de las respuestas defensivas a contextos condicionados por el miedo como es la sustancia gris periacueductal (Goto et al., 2001; Olucha-Bordonau et al., 2003; Tovote, 2016; Barson et al., 2020).

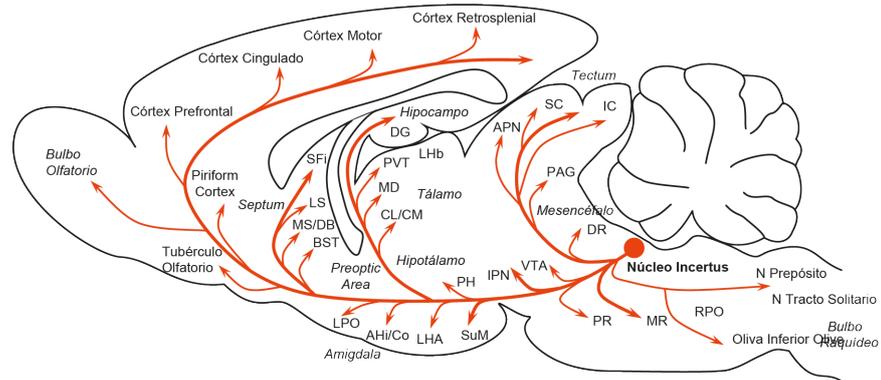


Figura 3: Presentación de las proyecciones de NI en el cerebro de ratona. AHi, área amigdalohipo-cámpica; APN, núcleo preteccal anterior; BST, núcleo del lecho de la stria terminalis; CL/CM, núcleos talámicos centrolateral/centromedial; Co, núcleo de la amígdala cortical; DB, núcleo de la banda diagonal; DG, giro dentado; DR, rafe dorsal; IC, colículo inferior; IPN, núcleos interpedunculares; LHA, área hipotalámica lateral; Lhb, habénula lateral; LPO, área preóptica lateral; LS, núcleos septales laterales; MD, núcleo talámico mediodorsal; MR, rafe medial; PAG, sustancia gris periacueductal; PDTg, núcleo tegmental posterodorsal; PH, hipotálamo posterior; PR, núcleo del rafe pontino; PVT, núcleo talámico paraventricular; RPO, núcleo reticular pontino oral; SC, colículo superior; SFi, núcleo septofimbrial; SUM, núcleo supramamilar; VTA, área ventral tegmental. Adaptada de Ryan (2011).

Anteriormente mencionamos que la RLX3 es liberada de manera muy específica por las neuronas de NI, los estudios inmunohistoquímicos para la detección de este péptido han permitido identificar las regiones diana del núcleo incertus (Ma set al., 2007; Smith et al, 2010). A partir de estos estudios se ha determinado que existe una elevada presencia de fibras terminales RLX3 positivas en todas las divisiones de hipocampo, en amígdala basolateral y corteza prefrontal (Figura 4). En concreto, en el caso de las fibras inmunoreactivas que penetraban en la región hipocámpica, cabe destacar que se observa mayor prominencia sobre la región ventral del hipocampo y el giro dentado frente a la región dorsal del hipocampo (Ma set al., 2007).

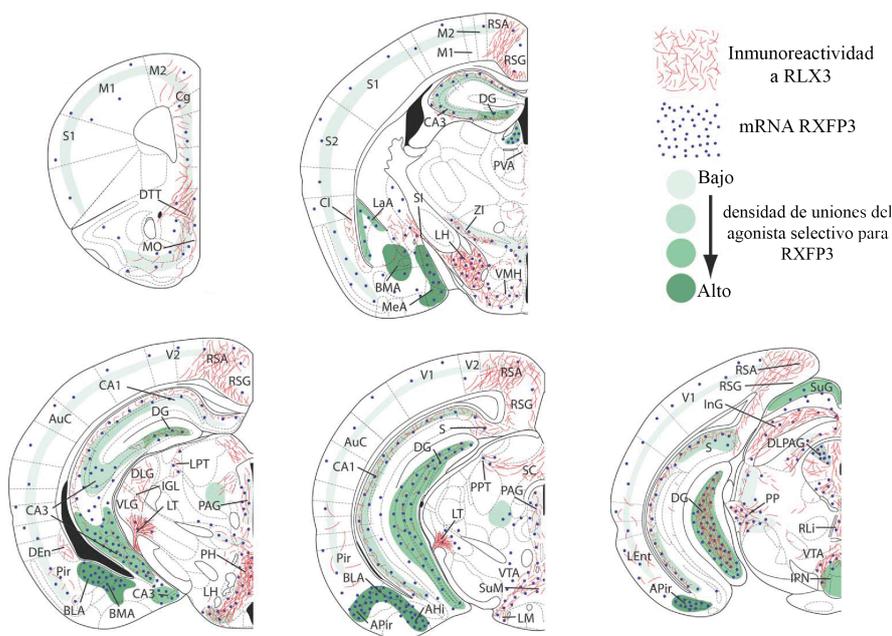


Figura 4: Mapeo de la expresión de RLX3. En la figura se muestra la detección inmunohistoquímica de RLX3, así como de distribución mRNA codificante para RXFP3 (receptor nativo de la RLX3) y la densidad de las uniones del receptor RXFP3 con un agonista selectivo. Adaptada de Smith (2010).

1.2.4 *El núcleo incertus y la respuesta al estrés: nodo en el procesamiento cognitivo y emocional*

Las proyecciones de las neuronas de NI le permiten participar tanto en los circuitos involucrados en el control de distintas funciones fisiológicas como la modulación de la respuesta al estrés y la memoria (Goto et al., 2001; Olucha-Bordonau et al., 2003; Ryan et al., 2011). El hecho de que este núcleo tenga una expresividad elevada del receptor CRH1 (Potter et al., 1994; Van Pett et al., 2000) en rata, hizo sospechar que podría tener un papel importante en la respuesta al estrés. Empleando como marcador la expresión del gen de expresión temprana *c-fos* y su producto proteico *c-Fos*, lo cual indica que las neuronas que lo expresan se han activado (Herrera y Robertson, 1996), se han estudiado diferentes condiciones estresores capaces de activar las neuronas de NI. En condiciones basales, la expresión de ARNm de *c-fos* en NI es mínima, pero estresores como la inyección de CRH (Bittencourt y Sawchenko, 2000; Tanaka et al., 2005), la natación forzada (Goto et al., 2001), la restricción de movimiento (Cullinan et al., 1995; Senba et al., 1993) o los calambres en las patas (Li y Sawchenko, 1998) incrementan la expresión de *c-fos* en NI. Adicionalmente, si nos basamos en las conexiones anatómicas del NI con la amígdala y el núcleo paraventricular del tálamo, dos áreas conocidas por su importancia en la adaptación al estrés crónico, este núcleo puede desempeñar un importante papel en la respuesta al estrés crónico

(Bhatnagar et al., 2000; Olucha-Bordonau et al., 2003; Rowson y Pleil, 2021).

El nucleus incertus envía conexiones recíprocas a la columna dorso-lateral de la sustancia gris periacueductal (dIPAG) y al núcleo del rafe dorsal (DR). El dIPAG se activa generalmente durante el estrés controlable y se encarga de coordinar la respuesta activa a una amenaza, puede ser por confrontación (mediada por dIPAG rostral) o mediante evitación o escape (mediada por dIPAG caudal) (Ryan et al., 2011). Por el contrario, el estrés incontrolable activa las neuronas serotoninérgicas de DR, ocasionando cambios comportamentales característicos de la indefensión aprendida (Maier y Watkins, 2005). La activación de estas regiones puede parecer incoherente con las proyecciones de NI, dado el hecho de que la RLX3 se coexpresa junto a GABA y exista evidencia electrofisiológica respalda el efecto inhibitorio de este péptido, no obstante, la investigación histológica de regiones cerebrales sugieren que las proyecciones del núcleo incertus se dirigen hacia las interneuronas inhibitorias, de esta forma puede lograr una mayor activación conductual mediante desinhibición de interneuronas inhibitorias (Blasiak et al., 2009).

Determinar si un factor es o no estresante precisa un procesamiento neuronal complejo. La corteza prefrontal medial (vmPFC) es capaz de identificar la naturaleza estresante de un factor y enviar la señal a otras regiones como al DR (Amat et al., 2005). Dado que NI presenta proyecciones recíprocas desde corteza prefrontal (CPF) (Goto et al., 2001) esta región podría desempeñar un papel similar en el procesamiento de los factores estresantes y la modulación ejercida por NI. La exposición tanto a ambientes aversivos como a compuestos ansiogénicos producen una activación de las neuronas RLX3 positivas del núcleo incertus (Kumar et al., 2016), aumento de la expresión de c-fos y elevados niveles de mRNA para RLX3 (Tanaka et al., 2005) estos hallazgos junto con las robustas conexiones bidireccionales que presenta con el sistema reticular activador ascendente sugieren que participa en la modulación de la ansiedad fisiológica. Cabe destacar que la respuesta al estrés expresa una diferenciación dismórfica entre machos y hembras tanto a nivel conductual, como endocrino y molecular (Liu et al., 2015). Además, parece existir una activación dependiente del estresor, ya que, este núcleo parece activarse de forma más frecuente durante las situaciones estresantes que requieren una elevada actividad conductual frente a las que inducen una respuesta de congelación (Goto et al., 2001; Ryan et al., 2011; Timofeeva et al., 2003).

1.2.5 *El núcleo incertus como modulador de la actividad theta hipocámpica*

Los primeros estudios sobre la actividad eléctrica de hipocampo demostraron que cuando una rata explora un entorno nuevo, se genera

un mapa cognitivo en el hipocampo mediante la activación selectiva de un grupo de células, las células de lugar, cuando el animal explora un lugar específico del campo (O'Keefe y Dostrovsky, 1971). Estas neuronas que permiten geolocalizar la posición, se activan durante la locomoción cuando el animal se aproxima al campo específico, generando una actividad sincrónica de 4 a 12 Hz, onda theta (Vanderwolf, 1969; Buzsáki et al., 1983; O'Keefe y Recce, 1993). Sin embargo, el ritmo theta de hipocampo no está únicamente vinculado a la posición espacial, ya que también ha sido registrado en condiciones en las que la locomoción no implica variaciones en la posición espacial como puede ser el desplazamiento en una cinta rodante (Pastalkova et al., 2008; Chen et al., 2013). Adicionalmente este ritmo se puede registrar en el hipocampo durante la codificación y recuperación de memoria y también con integración sensoriomotora (Buzsáki, 2002; Buzsáki, 2005; Bland y Oddie, 2001).

La actividad theta puede surgir a partir de conexiones intrínsecas de hipocampo que incluyen entradas rítmicas de la corteza entorrinal dirigidas al giro dentado, CA3 o CA1 (Alonso y García-Austt, 1987a; Alonso y García-Austt, 1987b) y por la activación de células CA1 a partir de entradas CA3 (Kamondi et al., 1998), no obstante, existen evidencias de que las proyecciones provenientes de distintas regiones transmitidas a través del área septal medial juegan un papel esencial en la generación de la actividad theta de hipocampo (Gaztelu y Buño, 1982; Vertes y Kocsis, 1997; Kang et al., 2017). El NI proyecta sobre varios núcleos implicados en la generación y modulación del ritmo theta de hipocampo, con proyecciones recíprocas con el núcleo reticularis pontis oralis (RPO) y unas proyecciones ascendentes muy intensas sobre el núcleo SUM y el complejo MS/DBB, así como proyecciones más leves sobre el propio hipocampo (Figura 5) (Olucha-Bordonau et al., 2003; Teruel-Martí et al., 2008). En concreto, neuronas de NI que reciben proyecciones de RPO proyectan, a su vez hacia el complejo septal, por lo que constituye un nexo fundamental en la ruta ascendente entre el principal activador pontino de la oscilación y su marcapasos (Teruel-Martí et al., 2008). Adicionalmente, este núcleo presenta conexiones bidireccionales con el núcleo del rafe mediano, cuya actividad desincroniza la actividad theta (Kinney et al., 1995; Vertes y Kocsis, 1997).

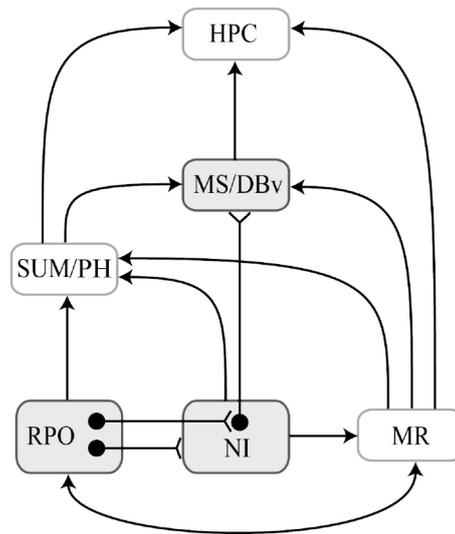


Figura 5: Esquema de principales conexiones de NI con otras áreas cerebrales involucradas en la regulación del ritmo theta de hipocampo. Las flechas indican la dirección de las proyecciones. HPCD: hipocampo; MR: núcleo del rafe medial; MS/DBB: septum medial/núcleo de la banda diagonal; NI: núcleo incertus; RPO: núcleo reticularis pontis oralis; SuM/PH: núcleo supraamigdalino/núcleo posterior hipotalámico. Obtenida de Teruel-Martí (2008).

Son numerosos los trabajos que han estudiado el papel del NI en la generación del ritmo theta en el hipocampo. Estudios previos de nuestro grupo, en ratas anestesiadas con uretano, han demostrado que la estimulación eléctrica de este núcleo induce la aparición de actividad theta en el hipocampo mientras que su lesión suprime esta oscilación evocada por la estimulación de RPO (Núñez et al., 2006). Además, la estimulación eléctrica de RPO evoca actividad theta coherente entre hipocampo y NI (Cervera-Ferri et al., 2011).

Estudios posteriores permitieron definir mejor la actividad eléctrica de los distintos tipos neuronales presentes en este núcleo. Las neuronas tipo I y II ya fueron descritas por nuestro grupo en 2006 (Figura 6); las tipo I presentan un patrón de disparo irregular a frecuencia theta (unos 9 Hz) y las neuronas tipo II poseen un patrón de actividad oscilatoria no rítmica y más rápida (entre 13 y 25 Hz) (Nuñez et al., 2006). Además, en el NI existe un grupo neuronal adicional, neuronas tipo III, que únicamente son activadas durante la activación sostenida de hipocampo. Estas neuronas, silentes en condiciones basales de anestesia, adquieren un patrón de disparo theta regular durante la activación hipocámpica (Martínez-Bellver et al., 2015).

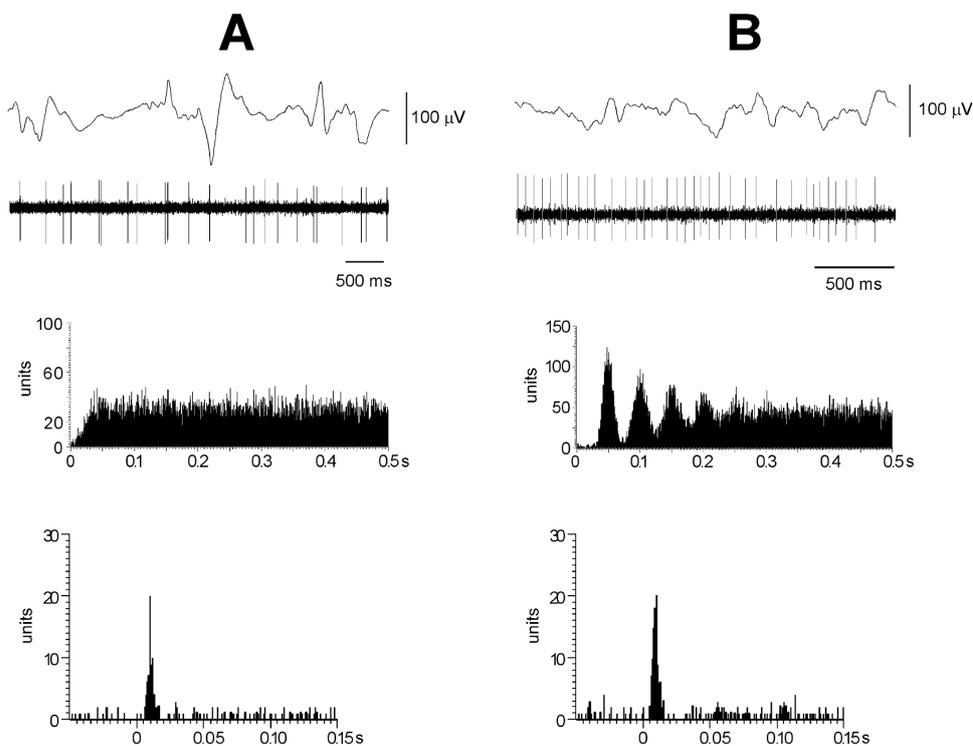


Figura 6: Patrón de disparo de las células NI. (A) La estimulación de RPO indujo una respuesta en la que la mayor parte de las neuronas mostraron un patrón de disparo no rítmico (neurona tipo I). (B) Un ejemplo de las neuronas NI que muestran un patrón de disparo rítmico (neurona tipo II). Obtenida de Nuñez (2006).

Finalmente, un estudio reciente demostró que esta relación entre la activación de las neuronas de NI y la actividad theta del hipocampo es de causalidad. El trabajo permitió concluir que la activación de las neuronas tipo III del NI mantienen una relación causal con la aparición de la oscilación theta en hipocampo, que existe una influencia bidireccional entre NI e hipocampo durante la evocación theta hipocámpica producida por la activación sensorial, siendo predominante la direccionalidad NI a hipocampo. También se observó que la estimulación de NI producía el reinicio de la fase de la oscilación theta evocada en el hipocampo (Figura 7), permitiendo así iniciar un nuevo procesamiento del hipocampo (Martínez-Bellver et al., 2017).

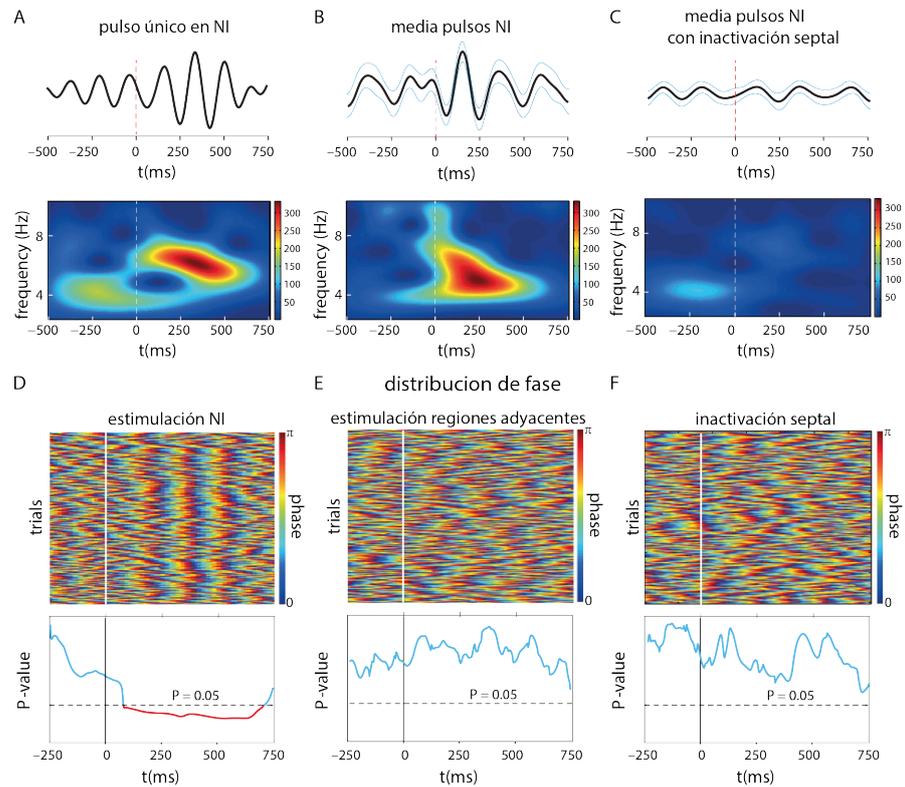


Figura 7: Análisis del reinicio de fase de la frecuencia theta en el hipocampo inducido por la estimulación eléctrica de NI. (A) Espectrograma de ondículas de hipocampo al aplicar un pulso único de NI (abajo) y señal filtrada en el rango theta (arriba). (B) Espectrograma de ondículas de hipocampo al promediar varios estímulos en NI (abajo) y señal filtrada en el rango theta (arriba). (C) Espectrograma de ondículas de hipocampo al promediar varios estímulos en NI (abajo) y señal filtrada en el rango theta (arriba) tras la inactivación de MS/DBB por infusión de muscimol. (D) Reinicio de fase evocado por los pulsos eléctricos aplicados en NI (arriba), cada línea horizontal representa la distribución de la fase filtrada en theta de un estímulo. Abajo se muestra la prueba de Rayleigh de la distribución de fases en el dominio del tiempo para todas las pruebas durante la el mismo registro. La línea discontinua horizontal es indicativa del umbral de significación estadística ($p < 0,05$). (E) representación de la evolución de la fase filtrada en theta (arriba) y valores de significación de la prueba Rayleigh (abajo) con la estimulación eléctrica en áreas vecinas de la NI. (F) representación de la evolución de la fase filtrada en theta (arriba) y valores de significación de la prueba Rayleigh (abajo) con la estimulación eléctrica en áreas vecinas de la MS. Adaptada de Martínez-Bellver (2017).

1.3 EL HIPOCAMPO

En roedores, el hipocampo es una estructura curvada con forma de C que se localiza en el lóbulo temporal y junto con otras estructuras forma parte del sistema límbico. Se extiende ventrocaudalmente desde los núcleos septales del prosencéfalo hasta la corteza temporal, caudal al complejo amigdalino. La formación del hipocampo abarca cuatro subcampos principales, distribuidos de proximal a distal a lo largo del eje transversal del hipocampo. En la posición más medial se encuentra la fascia o el giro dentado (GD), flanqueada lateralmente por los campos CA₁, CA₂ y CA₃ del asta de Ammon (*Cornu Ammonis*, CA) y el complejo subicular; finalmente, el giro fasciolar (*fasciola cinereum*, FC) se extiende medialmente como una continuación longitudinal del GD.

La formación hipocampal tiene la organización característica de la alo corteza, compuesta por tres capas. La más profunda es una capa polimorfa fibrosa interna en la que se localizan las dendritas basales de las neuronas principales, fibras aferentes y eferentes e interneuronas que conforman circuitos locales; a continuación se encuentra la capa celular, que cuenta con células densamente empaquetadas; finalmente, la capa más superficial incluye las dendritas apicales de las de las neuronas y la mayoría de los axones aferentes (Kjonigsen et al., 2015; Witter, 2010). En el caso del GD, estas tres capas reciben el nombre de hilus o capa polimórfica, capa granular o celular y capa molecular respectivamente. Sin embargo, en la región de CA, la región más superficial se subdivide en diferentes subcapas. Además de esta clasificación estructural, la formación hipocampal puede ser estudiada a lo largo de su eje longitudinal, septotemporal, diferenciando tres regiones distintas: la región dorsal del hipocampo (HPCd), la intermedia (HPCi) y la ventral (HPCv) (Amaral y Witter, 1989; Dong et al., 2009) (Figura 8).

El plegamiento ha ocasionado que, en primates, incluidos los humanos, la formación hipocampal se desplace hasta situarla exclusivamente en una posición ventral también situada en la profundidad del lóbulo temporal. En primates, la porción posterior del hipocampo se corresponde con la división dorsal de roedores y la anterior se corresponde con la ventral (Strange et al., 2014).

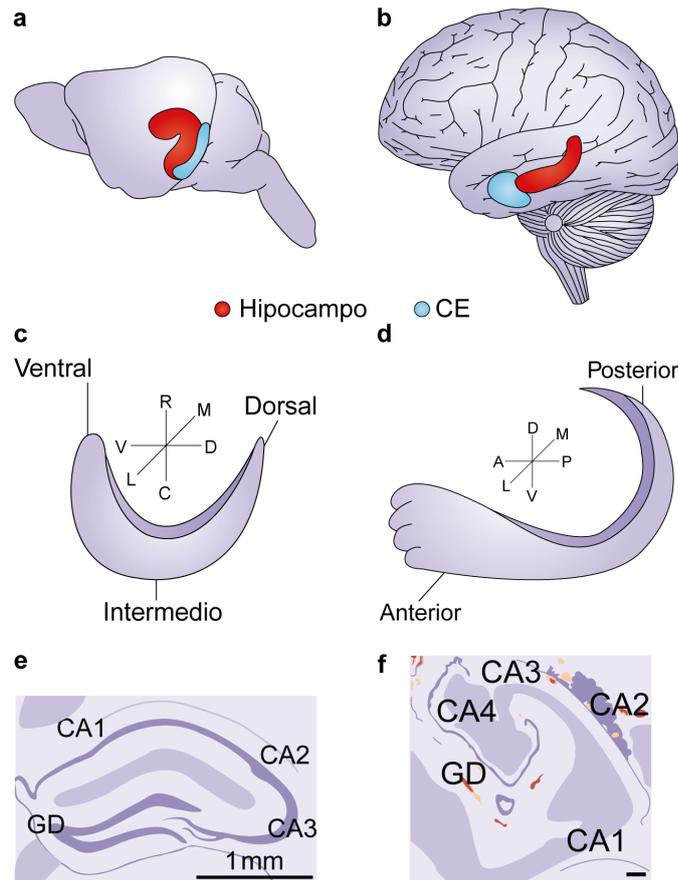


Figura 8: Localización y organización longitudinal del hipocampo en rata y humano. (a) localización del hipocampo (rojo) y la corteza entorrinal (azul) en roedores. (b) localización del hipocampo (rojo) y la corteza entorrinal (azul) en humanos. (c) eje longitudinal dorso-ventral en roedores, para que el hipocampo de roedores tenga la misma posición que el de humanos se requiere una rotación de 90 grados. (d) eje longitudinal antero-posterior en humanos. (e) dibujo de secciones transversales de Nissl del hipocampo de rata. (f) dibujo de secciones transversales de Nissl del hipocampo de humano. A: anterior; C: caudal; CA: asta de Ammon; CE: corteza entorrinal; D: dorsal; GD: giro dentado; L: lateral; M: medial; P: posterior; R: rostral; V: ventral. Adaptado de Strange (2014).

La implicación del hipocampo en la formación, recuperación y consolidación de memoria, así como en la navegación espacial han sido ampliamente estudiados (Eichenbaum, 1999; Kandel y Spencer, 1968; O'Keefe y Dostrovsky, 1971; Fortin et al., 2002). Los circuitos del hipocampo son capaces de procesar y codificar información multisensorial que codifican conjuntamente como recuerdos a largo plazo. Este procesamiento es esencial para el reconocimiento del entorno y sus cambios y así poder ajustar la respuesta comportamental a estos cambios de contexto (Zemla y Basu, 2017). El hipocampo, además, es capaz de incorporar valor emocional al ensamblaje neuronal que conforma un recuerdo, especialmente su región ventral, gracias a su interacción con la amígdala y otras estructuras subcorticales, las cuales atribuyen un valor emocional ponderado (Fastenrath et al., 2014; Strange, 2014).

La corteza entorrinal (CE), localizada en la parte medial del lóbulo temporal es la principal estructura de entrada y salida de la formación del hipocampo. El interés por esta estructura surgió cuando Ramón y Cajal describió una parte de la corteza temporal fuertemente conectada con el hipocampo (Ramón Y Cajal, 1902). A diferencia de lo que ocurre en la formación hipocampal, la CE está dividida en seis capas diferenciadas, de las cuales la capa II y III son las responsables de la transmisión del flujo de información hacia el hipocampo (Insausti et al., 2004; van Strien et al., 2009; Cappaert et al., 2014; Strange et al., 2014). El campo CA₁ del el asta de Ammon y el subículo son las principales salidas de la formación del hipocampo y su proyección recae sobre la capa V de la CE. De esta capa, además, surgen las principales eferencias de CE hacia dominios corticales y subcorticales (Rosene y Van Hoesen, 1977; Kosel et al., 1982; Cappaert et al., 2014). Esta región comprende diferentes subdivisiones en función de la conectividad con conjuntos funcionalmente diferentes de áreas corticales y subcorticales en el cerebro (Witter et al., 2017).

1.3.1 *Conectividad intrínseca: circuito trisináptico*

Las regiones parahipocampales comprenden la corteza perirrinal (PER), la corteza postrinal (POR) y la corteza entorrinal, junto con el presubículo y el parasubículo (Witter et al., 2010). Como se puede observar (Figura 9), las proyecciones neocorticales se dirigen hacia la región parahipocampal y a continuación a la CE, que es la principal entrada a la formación hipocampal. En la región parahipocampal se distinguen dos rutas paralelas: por un lado, las proyecciones del PER sobre la corteza entorrinal lateral y por otro, la ruta que conecta la POR con la corteza entorrinal medial, así mismo, estas regiones parahipocampales reciben conexiones recíprocas desde CE. Esta región proyecta sobre las regiones de la formación hipocampal, en esta vía, la capa II de CE proyecta sobre la capa granular de GD y CA₃, mientras que la capa III de CE proyecta sobre CA₁ y la formación subicular.

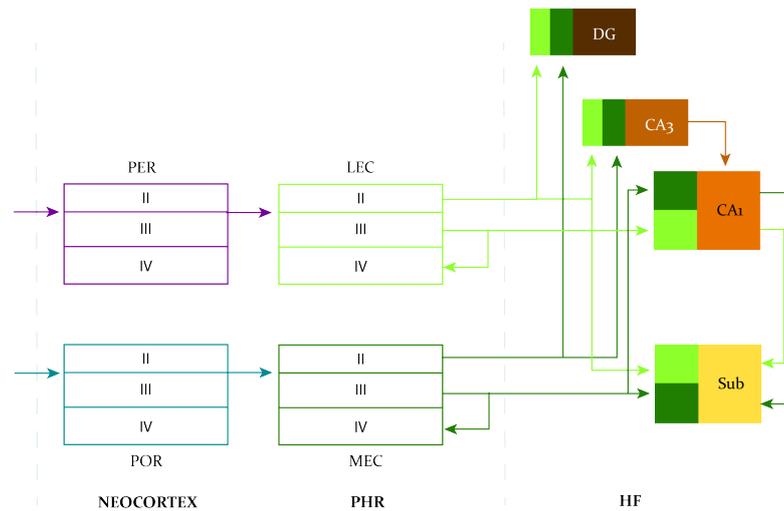


Figura 9: Conexiones aferentes y eferentes de la formación hipocampal. Hay dos entradas paralelas a través de la CE, por una parte, la vía a través de la corteza entorrinal medial y por otra la vía a través de la corteza entorrinal lateral, en ambos casos son las capas II y III las responsables de las aferencias a los subcampos de la formación hipocampal. A su vez, el campo CA3 y el subículo proyectan sobre la capa V de la CE. CA: Asta de Ammon; DG: Giro dentado; LEC: Corteza entorrinal lateral; MEC: Corteza entorrinal medial; PER: Corteza peririnal; POR: Corteza postrinal; Sub: subículo. Tomada de Witter (2010).

Como ya mencionamos anteriormente, fueron los estudios de tinciones de Golgi realizados por Ramón y Cajal y por su discípulo Lorente de Nó los que inicialmente permitieron describir las proyecciones de CE sobre la formación hipocampal. El conectoma interno del hipocampo se caracteriza por seguir un patrón de conectividad unidireccional (Cajal, 1893), siendo la vía perforante la principal de entrada de información cortical hasta el giro dentado, en esta vía perforante, los axones de las neuronas de la capa II de la corteza entorrinal proyectan hacia el giro dentado. A continuación, los axones de las células granulares de la circunvolución dentada envía proyecciones a las células piramidales de CA3 a través de las fibras musgosas, luego los axones colaterales del campo CA3, las colaterales de Schaffer, conectan con las neuronas piramidales del campo CA1 y finalmente, neuronas del campo CA1 inervan tanto al subículo y la CE (Amaral y Lavanex, 2007; Knierim, 2015). Este circuito, denominado vía trisináptica (Figura 10), es unidireccional dado que durante ninguno de los relevos de la vía hay proyecciones de vuelta al relevo anterior.

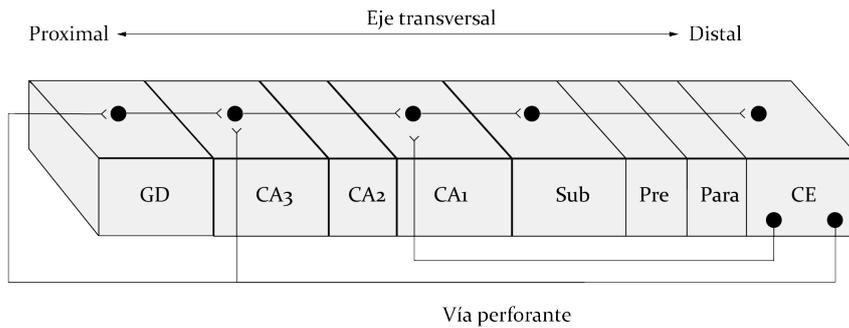


Figura 10: Circuito trisináptico del hipocampo. La corteza entorrinal envía la información hasta la circunvolución dentada a través de la vía perforante. A través de las fibras musgosas, el giro dentado proyecta sobre las neuronas piramidales de CA₃ y estas lo hacen mediante las colaterales de Schaffer sobre CA₁, quien proyecta sobre la corteza entorrinal y al subículo. CA: asta de Ammon; CE: corteza entorrinal; GD: giro dentado; Para: parasubiculum; Pre: presubiculum; Sub: subículo. Adaptado de Amaral y Lavenex, (2007).

1.3.2 Organización dorsoventral del hipocampo

El eje dorsoventral del hipocampo se diferencia en las regiones dorsal (HPCd), intermedia (HPCi) y ventral (HPCv) (Nadel, 1967; Ruth et al., 1982; Dong et al., 2009; Fanselow y Dong, 2010). Inicialmente se propuso la hipótesis de que el hipocampo funcionaba como un modelo unitario en el que toda la estructura era la responsable del procesamiento de la memoria declarativa (Cave y Squire, 1991) y del mapeo espacial (Nadel, 1991). Sin embargo, los estudios anatómicos han demostrado que cada una de estas regiones parece tener distintas aferencias y eferencias extrahipocampales (Swanson y Cowan, 1977) lo cual apoya la idea de que tienen funciones diferenciadas en el procesamiento (Small et al., 2011; Strange et al., 2014).

Las pruebas comportamentales de memoria y navegación espacial han sido fundamentales para el esclarecimiento de las funciones diferenciadas a lo largo del eje dorsoventral, mientras que la lesión restringida a la región dorsal del hipocampo dificulta la navegación en el laberinto de agua y laberinto del brazo radial, la lesión de la región ventral no incrementa la dificultad (Moser et al., 1995; Pothuizen et al., 2004). Por el contrario, las lesiones provocadas en la región ventral y no en la dorsal reducen la expresión de miedo provocando que las ratas prefieran los brazos abiertos del laberinto elevado en cruz, lo cual indica una disminución de la ansiedad (Kjelstrup et al., 2002). En vista de los resultados obtenidos en estudios anteriores, actualmente parece haber un consenso que defiende que mientras que la parte dorsal parece estar especializada en el procesamiento de información espacial la parte ventral parece ser la responsable del procesamiento de las respuestas de estrés y el comportamiento emocional (Moser et al., 1993, 1995; Moser y Moser, 1998; Kjelstrup et al., 2002; Fanselow y Dong, 2010; Henke, 1990; Bannerman et al., 2014; Strange et al., 2014). En el caso del hipocampo intermedio, aunque su papel no está claro,

los estudios de comportamiento sugieren que su funcionalidad es distinta, al menos, del hipocampo dorsal (Bast et al., 2009; Kenney y Manahan-Vaughan, 2013), contribuyendo al valor motivacional del procesamiento espacial (Jin y Lee, 2021).

Sin embargo, pese a que la segregación funcional en el eje dorsoventral del hipocampo puede estar respaldada por la existencia de un patrón de conexiones extrahipocampales diferenciado para los distintos segmentos hipocampales, como exponíamos con anterioridad, se plantea la posibilidad de que esta distribución funcional desigual también puedan estar ocasionada por variaciones en el circuito intrínseco del hipocampo a lo largo del eje dorsoventral. Las diferencias en los patrones de expresión génica (Lee et al., 2017), en las propiedades intrínsecas de las células principales y en la plasticidad sináptica a lo largo del eje longitudinal de la estructura Papatheodoropoulos y Kostopoulos, 2000; Maruki et al., 2001; Dong et al., 2009; Dougherty et al., 2012; Honigsperger et al., 2015; Cembrowski et al., 2016; Malik et al., 2016; Milior et al., 2016; Schreurs et al., 2017; Floriou-Servou et al., 2018; Manahan-Vaughan, 2019) parecen suscribir esta hipótesis, de manera que, la propia diferenciación en el circuito intrínseco de las regiones del hipocampo podría contribuir a la especialización funcional de las mismas.

1.3.3 *Regionalización funcional del hipocampo*

Pese a que el circuito básico del hipocampo es considerablemente similar a lo largo de su eje dorsoventral, las regiones dorsal, intermedia y ventral se comunican con diferentes conjuntos extrahipocampales (Ruth et al., 1982; Roberts et al., 1984; Van Groen y Lopes da Silva, 1985; Witter, 1986; Bannerman et al., 2014). El hipocampo dorsal recibe información sensorial polimodal de las áreas corticales, mientras que el hipocampo ventral está mucho más relacionado con estructuras subcorticales, como la amígdala y el eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal (Risold y Swanson, 1996; Bannerman et al., 2014). Este fenómeno, como ya mencionamos anteriormente, puede ser la causa por la cual el hipocampo dorsal sea responsable del procesamiento cognitivo (Swanson, 2000; Kim y Fanselow, 1992; 2011; Bannerman et al., 2014), mientras que la región ventral esté involucrada en el procesamiento emocional (Bannerman et al., 2003; McHugh et al., 2011).

En el caso de las proyecciones corticales sobre el hipocampo, este recibe una transición de proyecciones aferentes desde la corteza cingulada a lo largo de su eje longitudinal: las áreas cinguladas involucradas en la regulación emocional (cortezas infralímbica y prelímbica) proyectan sobre la región más ventral, y las áreas cinguladas involucradas en el procesamiento espacial (la corteza retrosplenial) se proyectan hacia región más dorsal (Strange et al., 2014). A través de las proyecciones del campo CA1 hacia el área retrosplenial de la corteza

cingulada anterior, el eje dorsal del hipocampo (HPCd), parece ser el responsable proporcionar información contextual en el desarrollo de las tareas de memoria espacial (Cenquizca y Swanson, 2007). De hecho, la lesión de HPCd así como el silenciamiento de CA1 dorsal impiden el aprendizaje en tareas de memoria espacial (Moser et al., 1995; Vann y Aggleton, 2002; Pothuizen et al., 2004). Sin embargo, la función de HPCd parece no estar restringida a la modulación de la memoria espacial, sino que esta región es capaz de proporcionar información contextual (Luo et al., 2011).

Las conexiones del hipocampo con estructuras subcorticales también parecen mostrar un gradiente dorsoventral. Las conexiones con el septum lateral (LS), las regiones hipotalámicas involucradas en respuestas conductuales y endocrinas, el núcleo accumbens (NAc) (Groenewegen et al., 1987) y la amígdala (Kishi et al., 2006) siguen un patrón topográfico, con aferencias hipocámpicas progresivamente más ventrales. En el eje ventral, CA1 y el subículo son las principales eferencias de HPCv, aunque estas vías presentan algunas diferencias anatómicas y en la densidad de los terminales sobre los subnúcleos (Canteras y Swanson, 1992; McDonald, 1998; Kishi et al., 2000; Cenquizca y Swanson, 2007), sus patrones de proyección son prácticamente superpuestos.

Durante años, se ha considerado que el hipocampo es esencial para la formación de recuerdos (Vargha-Khadem et al., 1997; Eichenbaum, 2000), pero un evento episódico también implica la codificación de un significado emocional y motivacional, por lo que es probable que el hipocampo procese la información del lugar en asociación con su valencia (LaBar y Cabeza, 2006; Bayeler et al., 2016). Esto justifica la implicación del hipocampo en el procesamiento de aspectos tan diferenciados como la memoria y la ansiedad. Así, específicamente la región ventral ha sido asociada al procesamiento del comportamiento ansioso, contribuyendo al valor del contexto (Bannerman et al., 2004; Adhikari et al., 2011; Padilla-Coreano et al., 2016; Parfitt et al., 2017). No obstante, aún es preciso estudiar más en profundidad el mecanismo neuronal que sustenta el procesamiento de la información espacial asociada a valores emocionales en el hipocampo.

En este aspecto, el patrón conectivo y la diferenciación funcional de la región intermedia del hipocampo (HPCi) han sido los menos estudiados. Los estudios de trazado de conexiones anterógradas manifestaron que las proyecciones de CA1 intermedio sobre el complejo subicular muestran patrones de conectividad intrínsecos distintivos (Cenquizca y Swanson, 2007). El campo CA1 intermedio, a diferencia del CA1 dorsal no proyecta directamente sobre corteza cingulada, pero sí que envía proyecciones directas a áreas corticales olfativas primarias y a las cortezas IL y PL. En contraste con el campo CA1 ventral, el campo CA1 intermedio no proyecta conexiones eferentes directas sobre el complejo amigdalino, el núcleo del lecho de la estría

terminal (BNST) o el hipotálamo (Cenquizca y Swanson, 2007), pero el complejo subicular intermedio, sí mantiene proyecciones recíprocas a varios núcleos amigdalinos, incluidos amígdala lateral (LA) o amígdala basolateral (BLA) (Pitkänen, 2000). En cuanto a su funcionalidad, se ha propuesto que el rol del HPCi podría estar involucrado tanto en la codificación espacio-temporal precisa (Bast et al., 2009; Kenney y Manahan-Vaughan, 2013), como en el control del comportamiento emocional, por medio de las conexiones comunes con la región ventral (Bannerman et al., 2004; Bast et al., 2009; Jin y Lee, 2021). Un estudio reciente parece sugerir que la funcionalidad de la región intermedia y dorsal de hipocampus es diferente: mientras que HPCi es un elemento clave en la codificación del significado motivacional de un lugar, HPCd está más especializado en la localización precisa de la posición espacial (Jin y Lee, 2021). El gradiente funcional a lo largo del eje dorsoventral sugiere que la región intermedia del hipocampo juega un papel clave en el comportamiento basado en el aprendizaje rápido del lugar del hipocampo, ya que es en esta región donde los sustratos de la codificación precisa del lugar convergen con enlaces directos al control del comportamiento, pudiendo ser importante para traducir el aprendizaje rápido del lugar en un comportamiento apropiado (Bast, 2011). Así, el hipocampo constituye una formación compleja y necesaria para crear y recuperar memoria, con un gradiente tanto en su conectividad como en su funcionalidad, capaz de proporcionar un contexto no sólo espacial para la orientación y navegación, sino de integrar en éste el valor motivacional y emocional.

1.4 AMÍGDALA

La primera referencia a amígdala fue realizada por Burdach en 1819, quien la describió como una masa de materia gris en forma de almendra en la parte anterior del lóbulo temporal humano. No obstante, la región descrita se refería exclusivamente a lo que hoy en día se conoce como la amígdala basolateral (BLA) (Sah et al., 2003). En estudios posteriores realizados en diferentes especies se han identificado varias estructuras que rodean a BLA, demostrando que la amígdala no es homogénea, sino que está compuesta por diferentes núcleos, razón por la cual recibe el nombre de complejo amigdalino (Johnston, 1923). Pero si bien existen muchas similitudes entre especies, también existen diferencias tanto en la organización como en el tamaño de los distintos núcleos.

En rata, el complejo amigdalino comprende unos trece núcleos que se distinguen en base su citoarquitectura, histoquímica y las conexiones que establecen (Krettek y Price, 1978; Pitkanen, 2000). Estos núcleos se clasifican en tres grandes subdivisiones (Figura 11). En primer lugar, se encuentra el complejo profundo o basolateral compuesto por el núcleo lateral (LA), el núcleo basal (BA) a veces

denominado conjuntamente núcleo basolateral (BLA) y el núcleo basomedial de la amígdala (BMA) (Beyeler y Dabrowska, 2020; Sah et al., 2003). La región superficial o de tipo cortical (sCLR), que incluye los núcleos corticales anterior (ACo) y posterior (PCo), el núcleo del tracto olfatorio lateral (NLOT), el núcleo del lecho del tracto olfatorio accesorio (BAOT) y la corteza periamigdalóide (PAC). El tercer y último complejo nuclear es el centromedial, compuesto por los núcleos medial (MeA), central (CeA) y la parte amigdalina del núcleo del lecho de la *stria terminalis* (BNST). Algunos de los núcleos de este complejo no encajan con ninguno de los grupos mencionados por lo que se enumeran por separado y son las masas celulares intercaladas (IC), el área de la amígdala anterior (AAA) y el área amigdalohipocámpal (AHA) (Price et al., 1987; McDonald, 1998; Sah et al., 2003; Benarroch, 2014). Es preciso matizar que en el caso del grupo que incluye los núcleos superficiales o de tipo cortical, pese a que nos referimos a estas estructuras como núcleos, muchas tienen características corticales ya que su estructura es a capas (Price et al., 1987).

Aunque esta clasificación está generalmente aceptada, muchos autores proponen una clasificación alternativa, ya que mediante el estudio de sus conexiones se ha observado que la amígdala central inerva BNST y las regiones caudodorsales de la sustancia inominata (*ventral pallidum*). Por esta razón propusieron una clasificación en la que la amígdala centromedial se extiende de manera rostral y medial y se clasifica como una entidad anatómica formada distinta formada por los núcleos centromediales Ce y Me junto con las masas celulares intercaladas y BNST recibe el nombre de amígdala extendida centromedial (Alheid y Heimer, 1988; Alheid et al., 1995; Lanuza, Martínez-Marcos y Martínez-García, 1999; Benarroch, 2015).

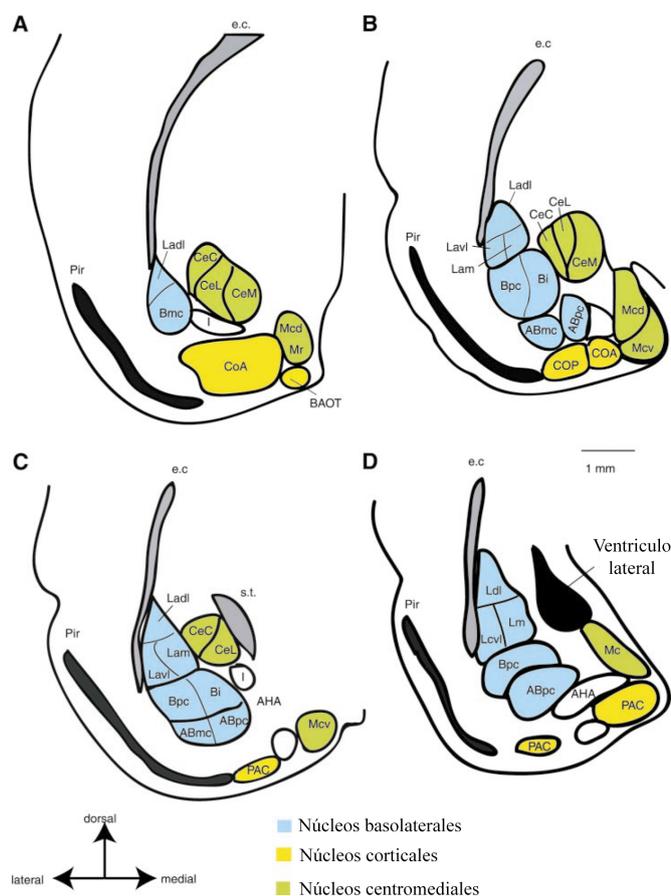


Figura 11: Circuito Núcleos del complejo amigdalino en rata. Se representan secciones coronales que van de rostral (A) a caudal (D). La división de todos los núcleos se hace en tres grandes grupos. En azul se indican las áreas incluidas en el grupo basolateral, en amarillo las del grupo cortical y en verde las del grupo centromedial. Las regiones que no se incluyen dentro de ninguno de estos grupos se encuentran en blanco. Adaptada de Sah (2003).

Tanto en el complejo basolateral como de la región cortical tienen una composición celular similar a la corteza, donde las neuronas predominantes son las neuronas glutamatergicas espinosas piramidales y el resto son interneuronas locales GABAérgicas escasamente espinosas (McDonald, 1982; Millhouse y DeOlmos, 1983; Washburn y Moises, 1992; McDonald y Augustine, 1993). La región CeA está compuesta casi exclusivamente por neuronas inhibitorias y MeA principalmente por neuronas GABAérgicas aunque también contiene glutamatergicas (Li et al., 2017). Por el contrario, el complejo basolateral está principalmente compuesto por neuronas excitatorias de proyección (Erö et al., 2018; Fritsch et al., 2009; Nitecka y Ben-Ari, 1987).

1.4.1 Conectividad y funcionalidad de la amígdala

El conocimiento sobre las aferencias y eferencias de los distintos núcleos que conforman el complejo amigdalino ha permitido observar

que, en primer lugar, cada núcleo recibe y envía información a múltiples y distintas fuentes cerebrales (Price, 1987; Pitkanen, 2000; Price y Amaral, 1987), tras haber estudiado el conectoma de la amígdala en diferentes especies, se ha concluido que este tiene un alto nivel de conservación entre especies. Esta diversidad conectiva convierte a esta estructura en un elemento que participa tanto en procesamientos emocionales como cognitivos.

Atendiendo a las aferencias que recibe la amígdala, estas pueden ser clasificadas en función de su origen. Por un lado, la amígdala recibe información desde regiones corticales y talámicas que transmiten la información de áreas sensoriales y de los sistemas relacionados con la memoria y, por otra parte, desde el hipotálamo y el tronco encefálico, que transmiten la información de regiones relacionadas con la computación comportamental y de los sistemas autónomos (McDonald, 1998). Los inputs sensoriales unimodales que recibe la amígdala se dirigen principalmente hacia LA (Aggleton et al., 1980; McDonald, 1998), siendo su fuente principal la corteza cerebral, y en especial las cortezas asociativas primarias, que envían proyecciones glutamatérgicas principalmente originadas en la capa V (Amaral et al., 1992). LA también recibe proyecciones sensoriales directas de la corteza insular (Shi y Cassell, 1998), y de regiones subcorticales por la vía talámica. Esta convergencia de inputs corticales y subcorticales en LA le proporciona un importante valor en el proceso de aprendizaje asociativo (Benarroch, 2014). Por otra parte, CeM recibe información visceral y nociceptiva procedente del núcleo parabraquial. A su vez, la amígdala envía proyecciones recíprocas a las áreas corticales de sensorial cortical unimodal y heteromodal y a las áreas sensoriales primarias, proporcionando un valor emocional a estímulos sensoriales específicos y participando así en la modulación emocional del procesamiento sensorial (Benarroch, 2015).

El estudio conectivo ha evidenciado también que la corteza prefrontal es una importante fuente de proyecciones corticales dirigidas al complejo amigdalino. Este patrón conectivo denso y organizado ha sido descrito en numerosas especies (McDonald et al., 1996). En las áreas de corteza prefrontal converge información sensorial polimodal (Ray y Price, 1992). Los estudios han permitido demostrar que el principal objetivo de estas proyecciones corticales es BLA, aunque también proyectan sobre LA y los núcleos accesorios.

Además, la amígdala recibe aferencias provenientes de otras fuentes como son las áreas relacionadas la memoria declarativa a largo plazo, que incluyen la corteza perirrinal, la corteza entorrinal, la corteza parahipocampal y el hipocampo (Milner et al., 1998). Con este, BLA presenta fuertes conexiones recíprocas, importantes en los mecanismos de regulación emocional de la memoria episódica. Mientras que las aferencias del hipocampo a la amígdala aportan información contextual sobre el evento emocional, las eferencias de la amígdala

sobre el hipocampo brindan un significado emocional a un evento promoviendo la consolidación de la memoria episódica (Benarroch, 2015).

Al margen de sus conexiones extrínsecas, la amígdala tiene una conectividad intrínseca desarrollada tanto entre sus núcleos como dentro de los mismos (Figura 12) (Pitkanen, 2000), lo que indica un complejo procesamiento local de la información. Los estudios muestran que la información sensorial accede a la amígdala a través de los núcleos basolaterales, a continuación, es procesada de manera local y finalmente son los núcleos centromediales los que actúan como eferencia (Pitkanen et al., 1997).

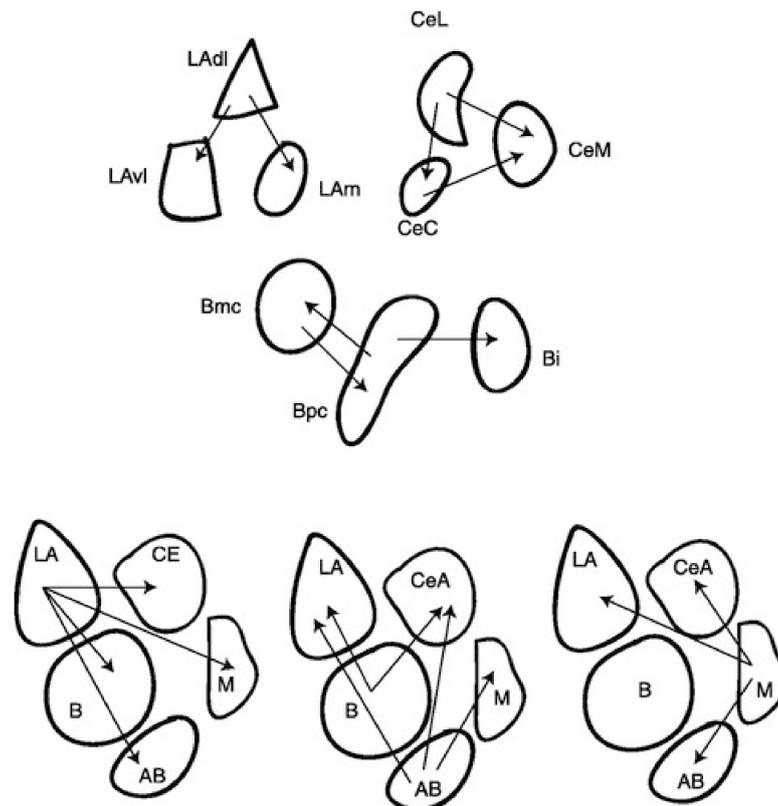


Figura 12: Conexiones intrínsecas de la amígdala. Mapa conectivo obtenido a partir de estudios con trazadores. Tomada de Sah (2003).

En definitiva, si bien la amígdala ha sido tradicionalmente conocida por su participación en la regulación emocional como el condicionamiento del miedo (LeDeux, 2000), la extensa conectividad de esta región con otras estructuras cerebrales le permite participar en el control de gran variedad de comportamientos adaptativos.

1.5 CORTEZA PREFRONTAL

Existe una gran diferencia entre el volumen cortical relativo del cerebro de rata y de humanos, siendo este último unas mil veces mayor

que el de rata. Este incremento de volumen conlleva el desarrollo de funciones más complejas. Esta gran diferencia hizo cuestionar si realmente las áreas corticales del cerebro de rata son comparables a las del cerebro humano, y en especial se ha cuestionado si las ratas poseen una región prefrontal comparable a la corteza de los primates (Preuss, 1995; Preuss et al., 1999; Uylings et al., 2003). Fue en 2003 cuando Uylings describió los criterios esenciales para evaluar la similitud de las regiones corticales entre especies, como son las características citoarquitectónicas, el patrón conectivo, la distribución de neurotransmisores, el desarrollo embriológico y las propiedades funcionales.

La corteza prefrontal de rata por lo general se divide en tres regiones topológicamente diferentes. En primer lugar, la corteza prefrontal medial, en segundo lugar, la corteza prefrontal orbital, ubicada ventralmente, y en tercer lugar, la corteza prefrontal lateral, que también se denomina corteza insular agranular (Krettek y Price, 1977; Heidbreder y Groenewegen, 2003). Basándose en los parámetros determinados por Uylings, se pudo concluir que las áreas 24, 25 y 32 de Brodmann en humanos se corresponden con la corteza prefrontal medial (CPFm) en ratas.

Además, la CPFm de rata se subdivide en varias regiones, por un lado, la región cingulada (Cg) que se corresponde con el área 24, la región prelímbica (PL) con el área 32 y la región más ventral, denominada infralímbica (IL) se corresponde con el área 25 (Vertes, 2004; Seamans, 2008). No obstante, basándonos en criterios anatómicos, parece que la CPFm se subdivide en un componente dorsal que incluye las áreas Cg anteriores dorsales y la parte dorsal del área PL y un componente ventral compuesto por las áreas PL ventral, IL y orbital medial (Berendse et al., 1992); En cuanto a la composición celular, la CPFm de rata es agranular y carece de la capa IV granular propia de las áreas 32, 24 y 25 en humanos. Es por esta razón por la cual durante años se consideró que no existía en el cerebro de rata una región homóloga a las regiones prefrontales del cerebro humano (Carlén, 2017).

1.5.1 *Conectividad y funcionalidad de la corteza prefrontal*

En la especialización cortical tienen gran importancia el desarrollo de conexiones talamocorticales. Es por ello que uno de los criterios empleados para la definición de las áreas corticales son sus conexiones. Aunque inicialmente se observó una densa conectividad entre el núcleo mediodorsal del tálamo (MD) y las regiones prefrontales de la corteza (Rose y Woolsey, 1948), gracias al desarrollo de las técnicas de trazadores sabemos que estas regiones también presentan conexiones recíprocas con otros núcleos talámicos como son los núcleos intralaminares y de la línea media, el núcleo medial anterior y las

partes rostrales del complejo ventral (Berendse y Groenewegen, 1991; Shibata, 1992; Groenewegen y Berendse, 1994; Jones y Leavitt, 1974; Uylings, 2003; Seamans et al., 2008).

Además de las conexiones que presenta con las regiones talámicas, la corteza prefrontal también establece conexiones con otras áreas corticales externas como son corteza premotora, motora temporal y parietal (Akert y Hartmann-von Monakow, 1980; Bedwell et al., 2014). Este patrón conectivo de la corteza prefrontal con otras regiones corticales, así como con regiones talámicas, siendo las conexiones recíprocas con el núcleo MD del tálamo las más fuertes ayudó a definir la corteza prefrontal y a incluir en esta clasificación la corteza cingulada anterior de primates y ratas (Uylings y Van Eden, 1991).

Así mismo, la región prefrontal establece conexiones con las áreas límbicas, que incluyen la amígdala, la corteza entorrinal y perirrinal (Ongur y Price, 2000; Uylings et al., 2003) y recibe información de los núcleos basales y en concreto del globo pálido y de la sustancia negra pars reticulata a través de un subconjunto de núcleos talámicos que actúan como relevo (Middleton y Strick, 2000; Alexander et al., 1991; McFarland y Haber, 2002). Adicionalmente, la CPF está conectada directa e indirectamente con la formación hipocámpica por medio de distintas vías (Figura 13) (Eichenbaum, 2017).

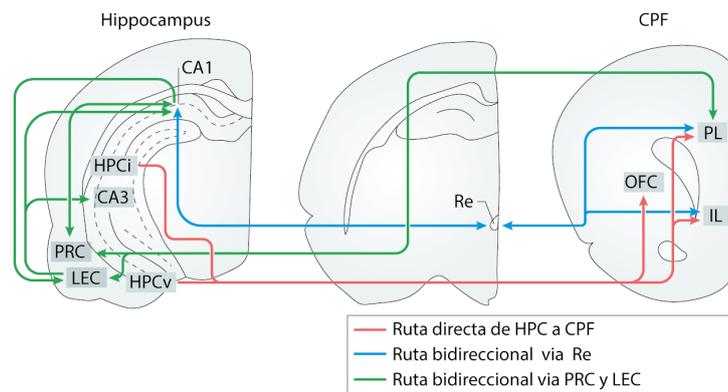


Figura 13: Conexiones CPF-hipocampo. El hipocampo ventral (HPCv), algunas regiones más dorsales (HPCd) e hipocampo intermedio (HPCi) envía conexiones directas a diferentes regiones de la corteza prefrontal (CPF), incluida la CPF orbital (OFC), la prelímbica corteza (PL) y corteza infralímbica (IL). Existen dos conexiones bidireccionales entre el CPF y el hipocampo: una a través del núcleo talámico reuniens (Re) y la otra a través de la corteza perirrinal (PRC) y la corteza entorrinal lateral (LEC). Adaptada de Eichenbaum, 2017.

Los estudios de proyección desde los sistemas colinérgicos y monoaminérgicos muestran una posición activadora de CPFm, ya que esta región cortical recibe invasión colinérgica de los núcleos del prosencéfalo basal y del núcleo laterodorsal tegmental y además es la única región cortical que presenta proyecciones directas hacia estos núcleos basales del prosencéfalo y del tronco encefálico (Groenewegen et al., 1997; Zaborszky et al., 1997). Algo similar ocurre con las proyecciones

noradrenérgicas del locus coeruleus y las fibras serotoninérgicas de los núcleos dorsal y mediano del rafe. Estas regiones troncoencefálicas proyectan a casi toda la neocorteza, pero ciertas áreas prefrontales son las únicas áreas corticales que mantienen conexiones recíprocas descendentes. En el caso de las aferencias dopaminérgicas del mesencéfalo, estas están limitadas principalmente a regiones prefrontales y a la corteza entorrinal, y únicamente CPFm se conecta recíprocamente con el área tegmental ventral (VTA) y la pars compacta de la sustancia negra (Carr y Sesack, 2000; Haber, 2014).

La CPFm está involucrada en el procesamiento de información cognitiva y emocionalmente relevante y en la modulación de estados atencionales, la memoria y la toma de decisiones (Bush et al., 2000; MacDonald et al., 2000; Kerns et al., 2004; Eichenbaum, 2017; Moorman et al., 2015).

No obstante, se ha observado que existe una diferenciación funcional entre las subregiones ventral y dorsal de la CPFm. La parte dorsal, que incluye el área Cg anterior dorsal y PL dorsal está principalmente involucrada en el patrón temporal de las secuencias de comportamiento, mientras que la parte ventral, que incluye el área PL ventral y las cortezas orbital medial e IL, parece tener un papel crucial en el desarrollo de nuevas estrategias frente a los cambios sensibles producidos durante las tareas de discriminación con pistas visuales o espaciales, así como en la integración del estado fisiológico interno con señales ambientales, permitiendo el desarrollo de una respuesta comportamental ajustada en situaciones de amenaza (Heidbreder y Groenewegen, 2003; Peters et al., 2009; Gass y Chandler, 2013; Gourley y Taylor, 2016). También ha sido propuesta una diferenciación funcional entre PL e IL, ya que parece ser que PL media en las respuestas comportamentales voluntarias mientras que IL es la responsable de las respuestas involuntarias que se producen mediante el entrenamiento progresivo de hábitos comportamentales, haciendo que las respuestas se generen de forma autónoma (Killcross y Coutureau, 2003).

1.6 CIRCUITO HIPOCAMPO-AMÍGDALA-PREFRONTAL EN EL PROCESAMIENTO COGNITIVO Y EMOCIONAL

El aprendizaje es un mecanismo necesario que asegura la supervivencia del individuo. Si bien es cierto que en mamíferos las formas sencillas de aprendizaje pueden ser computadas a partir de redes subcorticales, cuanto más complejo es el aprendizaje, precisa de redes más complejas que incluyen a la corteza prefrontal, el hipocampo y la amígdala (Zelikowsky et al., 2014; Yavas et al., 2019). De hecho, la alteración funcional y estructural de estas estructuras se asocia con el desarrollo de neuropatologías relacionadas con el procesamiento cognitivo y emocional, como los trastornos de ansiedad, la esquizofrenia o

la demencia de Alzheimer, entre otras (Yavas et al., 2019; Tellez-Merlo, et al. 2019).

Se ha estudiado durante mucho tiempo el papel del hipocampo y la CPFm en la memoria episódica. Los estudios realizados tanto en humanos como en modelos animales indican que la CPFm y el hipocampo tienen funciones complementarias en el procesamiento de la memoria. Por un lado, el hipocampo es esencial para en la formación de los recuerdos y el contexto en el que se experimentan (Eichenbaum, 2004; Langston y Wood, 2010; Holland y Buton, 1999), mientras que la CPFm tiene un papel esencial en la recuperación de recuerdos apropiados al contexto y en la selección de conductas adaptativas (Preston y Eichenbaum, 2013; Szczepanski y Knight, 2014).

Estas dos estructuras interactúan a través de diferentes mecanismos, incluido el intercambio bidireccional de información específica mediante la sincronización oscilatoria, específicamente en el rango de theta 4-12 Hz (Siapas et al., 2005; Hyman et al., 2005). Los estudios de lesiones cruzadas (Figura 14) en hipocampo y CPFm han permitido investigar cómo interactúan estas regiones en el procesamiento de la memoria. Estos estudios han mostrado que la lesión bilateral de hipocampo o de CPFm deriva en el deterioro de la memoria episódica, así como cuando la lesión es cruzada (se daña CPFm de un hemisferio e hipocampo del contrario).

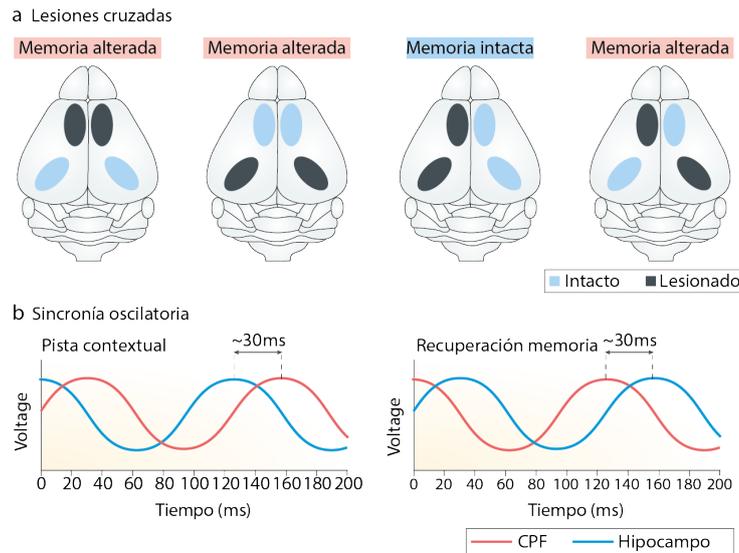


Figura 14: Estudios de lesiones en hipocampo y CFPm. (a) La lesión bilateral de hipocampo o de CFPm deriva en el deterioro en varias tareas de memoria episódica. Lo mismo ocurre cuando la lesión es cruzada (se daña CFPm de un hemisferio e hipocampo del contrario). Sin embargo, cuando la lesión es unilateral, no tiene efecto en la memoria, lo que demuestra que se necesita una vía ipsilateral intacta. (b) Existe un flujo de información bidireccional entre estas estructuras en el que la sincronización oscilatoria en frecuencia theta entre es un elemento clave. Durante la presentación de una pista contextual, la aparición de ritmo theta en hipocampo precede a la aparición de theta en CFPm, mientras que durante el proceso de recuperación de memoria la direccionalidad cambia. El desfase que existe entre el ritmo theta de ambas estructuras es de aproximadamente 30 ms, lo cual se corresponde con la duración de un ciclo de la frecuencia gamma. Adaptada de Eichenbaum (2017).

Por otra parte, el estudio para la caracterización los circuitos neuronales responsables de la expresión y regulación de las emociones han permitido demostrar que la amígdala juega un papel esencial en los procesos emocionales (Baxter y Murray, 2002; Lang y Davis, 2006; Phelps y LeDoux, 2005). Igualmente, se sabe que las conexiones que establece con CFPm y el hipocampo son el posible sustrato que interrelaciona cognición y emoción (Barbas y Zikopoulos, 2007; Price, 2007; Pessoa, 2008). Aunque existen multitud de proyecciones bidireccionales entre la amígdala y la CFP, unas de las más destables y densas son las que se producen con la CFPm (Ghashghaei et al., 2006). Los estudios de lesiones cruzadas en la amígdala y la CFP han permitido deducir que estas estructuras participan en funciones ejecutivas como la atención, la memoria de trabajo, la planificación y la valoración de estímulos, incluido el procesamiento relacionado con la valencia e intensidad emocional (Salzman y Fusi, 2010).

El procesamiento emocional tiene una gran influencia sobre los procesos cognitivos, incluidos la memoria y el aprendizaje. Mientras que la amígdala está especializada en el procesamiento de las emociones, el hipocampo está relacionado con la formación de memoria episódica (Yang y Wang, 2017). La relación existente entre estas estructuras ha sido cada vez más estudiada con el propósito de au-

mentar la comprensión de la memoria asociada a las emociones. Si bien es cierto que ambas estructuras pueden operar independientemente, también lo hacen de manera sinérgica. Los estudios de trazadores muestran la existencia de proyecciones monosinápticas glutamatérgicas desde el núcleo basolateral de la amígdala hacia CA1 de la región ventral de hipocampo (Köbber et al., 2000; Katz et al., 1984), siendo las proyecciones de la división posterior de la amígdala basolateral más prominentes que las de la región anterior (Yang et al., 2016) (Figura 15).

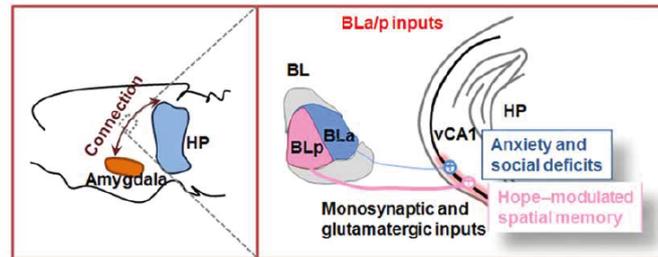


Figura 15: Proyecciones de amígdala basolateral sobre hipocampo. La amígdala basolateral proyecta sobre CA1 del hipocampo estableciendo circuitos monosinápticos glutamatérgicos. La proyección desde la división posterior de BLA (BLp) hacia CA1 del hipocampo ventral (vCA1) es más intensa y controla la memoria espacial modulada por emociones mientras que las proyecciones desde la región anterior de BLA (BLa)-vCA1 participan en la modulación de la ansiedad y los déficits sociales. Adaptada de Yang y Wang (2017).

En el procesamiento de contextos de elevada complejidad, el hipocampo parece ser el encargado de codificar las pistas o detalles que permiten el reconocimiento del entorno, las neuronas del núcleo basolateral de la amígdala están involucradas con el componente emocional de la memoria y finalmente estas dos fuentes de información se unen en la CPFm (Zelikowsky et al., 2014), formando así un circuito complejo capaz de procesar los diferentes componentes del entorno.

1.7 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Es sabido que el NI constituye un punto de control de la oscilación theta en el hipocampo dorsal, estructura clave en proporcionar un contexto espacio-temporal para el procesamiento de la memoria. Igualmente, se sabe que es sensible al estrés y que induce una respuesta de activación elevada, así como que mantiene conexiones con la amígdala, la corteza prefrontal medial y la región ventral del hipocampo, todas ellas con un papel crucial en la respuesta emocional. Incluso, se ha propuesto que pueda ser una diana en enfermedades neuropsiquiátricas en las que este circuito se encuentra alterado, como la ansiedad. No obstante, no se conoce su efecto sobre estas estructuras, ni sobre la interacción que mantienen con la región dorsal del hipocampo, necesaria para el procesamiento de estímulos de elevada saliencia o relevancia emocional. Por otra parte, aunque se sabe que presenta

referencias sobre numerosas estructuras implicadas en la respuesta de estrés, pero no se ha estudiado su efecto sobre ellas.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La presente Tesis Doctoral se basa en la hipótesis de que, en base a su conectividad, a su influencia sobre la actividad eléctrica del hipocampo dorsal y sobre la conducta en roedores, el NI debe modificar la actividad y la comunicación en el circuito hipocampo-amígdala-corteza prefrontal medial, así como en un circuito distribuido implicado en el aprendizaje, el procesamiento del estrés y la adaptación de la conducta.

El objetivo general de este trabajo es profundizar en los efectos de este núcleo troncoencefálico como parte del sistema reticular activador ascendente, para contribuir a la comprensión de su influencia en el procesamiento cognitivo y emocional. Los objetivos concretos que se persiguen son:

- I. Verificar si la estimulación eléctrica de NI es capaz de alterar la actividad oscilatoria en hipocampo dorsal, ventral, amígdala basolateral y corteza infralímbica.
 - a) Estudiar el efecto sobre la potencia de oscilaciones en diferentes bandas de frecuencia: ondas lentas, delta, theta, alpha, beta y gamma
- II. Comprobar si la estimulación de NI cambia los patrones de comunicación, a través de medidas de sincronización, trasiego de información y direccionalidad de la comunicación en el mismo circuito.
 - a) Analizar el efecto de la estimulación de NI sobre la sincronización de fase en determinadas bandas de frecuencia.
 - b) Estudiar su efecto sobre la comunicación local entre las distintas regiones del circuito, medida como información mutua a frecuencias gamma.
 - c) Estudiar su efecto sobre el anidamiento de oscilaciones en el circuito, determinando el acoplamiento fase-amplitud.
 - d) Analizar si tiene efecto sobre la direccionalidad de la información, estudiando la causalidad de Granger.
- III. Analizar qué otras estructuras encefálicas son activadas por la estimulación del NI.

- a) Determinar el grado de activación neuronal mediante la expresión de c-fos en estructuras corticales y subcorticales relacionadas con el aprendizaje, el estrés y la adaptación de la conducta

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 ESTUDIO ELECTROFISIOLÓGICO DE LOS EFECTOS DE LA ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA DEL NÚCLEO INCERTUS EN LA ACTIVIDAD LOCAL DE CAMPO DEL CIRCUITO AMIGDALO-HIPOCÁMPICO-PREFRONTAL

3.1.1 *Sujetos experimentales*

Para llevar a cabo, el estudio de la actividad local de campo se emplearon un total de 22 ratas albinas Wistar (Charles River Company, Barcelona, España) de entre 250 y 350 g de peso. En concreto, se emplearon 16 ejemplares macho y 7 ejemplares hembra.

Experimento	Sexo	Animales
Estudio de la actividad local de campo	Macho	16
	Hembra	7

Los animales fueron estabulados en el animalario de la Unidad Central de Investigación de la Facultad de Medicina (UCIM) hasta la fecha de experimentación, bajo unas condiciones de temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), ciclo de luz-oscuridad regular de 12h, humedad del $55 \pm 10\%$ y acceso a comida y bebida *ad libitum*. Los procedimientos experimentales se llevaron a cabo bajo el cumplimiento de la legislación vigente dictaminada por la directiva de la Unión Europea (2010/63/UE) y el Real Decreto (53/2013) para el uso y protección de animales de uso científico y con la aprobación previa por parte del Comité de Ética de la Universidad de Valencia (con número de procedimiento A20191121151842) y de la Dirección General de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Generalitat Valenciana (2019/VSC/PEA/305).

3.1.2 *Origen y registro de las señales bioeléctricas en el cerebro. Potencial de membrana y registro de potencial de campo*

Las membranas celulares de las neuronas están polarizadas, es decir, en reposo el citosol de las neuronas tiene aproximadamente una diferencia de voltaje de unos -70 mV con respecto al exterior celular. Los cationes más abundantes en el medio intra y extracelular son Na^+

y K^+ y el anión más abundante Cl^- . La distribución desigual de estas iones entre el interior y el exterior celular junto con la permeabilidad relativa a cada ion son los que determinan el potencial de membrana, que en situación basal recibe el nombre de potencial de membrana en reposo.

Las señales neuronales se transmiten mediante el establecimiento de sinapsis, ya sean químicas (mediadas por neurotransmisores) o eléctricas (mediadas por intercambio directo de iones). La señal postsináptica recibida se transmite a lo largo de la neurona gracias a la apertura y cierre de canales iónicos que modifican el flujo iónico de la célula, y por ende su potencial de membrana. Pueden producirse dos tipos de señales: despolarización, el potencial de membrana se vuelve más positivo que el potencial de reposo, o hiperpolarización, el potencial de membrana es más negativo que el potencial de reposo. Para que la señal sea transmitida a otras neuronas el cómputo de las señales postsinápticas ha de provocar que el potencial de membrana alcance un umbral. Es entonces cuando la de produce la rápida despolarización del potencial de membrana, el potencial de acción. Este proceso es causado por la apertura de los canales de Na^+ en primera instancia y posteriormente los de K^+ , permitiendo que estos iones se desplacen a favor de gradiente electroquímico hacia el interior y exterior de la célula, respectivamente. Una vez alcanzado el pico del potencial de acción (+40 mV), los canales de Na^+ se cierran hasta que la membrana recupere el estado de reposo. Por el contrario, los canales K^+ permanecen abiertos durante más tiempo, liberando estos cationes al medio extracelular y provocando la hiperpolarización de la membrana celular. Finalmente, la bomba sodio-potasio elimina los cationes de sodio y el potasio expulsado se difunde en el medio, permitiendo la recuperación del potencial de reposo.

Las señales bioeléctricas son señales eléctricas de baja amplitud y baja frecuencia que se pueden medir en los seres vivos (Singh et al., 2012). Estas señales se miden a través de los cambios en el potencial generados por las distintas reacciones electroquímicas que se producen en el sistema. El potencial extracelular es el cómputo de todos los procesos iónicos que se producen, ya sean rápidos como un potencial de acción hasta lentos como los potenciales sinápticos, y sean excitatorios o inhibitorios o las fluctuaciones de la glía. Así mismo, las membranas neuronales son excitables independientemente de si forman parte de las dendritas, soma o axón; es por ello, que el sumatorio de todas ellas contribuye al potencial extracelular (Buzsáki et al., 2012).

El registro de potencial de campo (LFP) es una técnica que permite detectar el potencial eléctrico extracelular mediante el uso de electrodos que se introducen intracranalmente. El LFP es una señal compuesta en la que contribuyen distintas fuentes neuronales que refleja la actividad eléctrica de un campo esférico alrededor del electrodo de registro (Mitzdorf, 1985; Juergens et al., 1999). Pese a que

todos los procesos iónicos contribuyen la señal de LFP, los potenciales sinápticos tienen mayor peso que los potenciales de acción, ya que la duración de los primeros es mayor permitiendo su sumación lineal. Las características de la forma, amplitud y frecuencia de la onda LFP dependen de la contribución de las distintas fuentes y de las propiedades del tejido cerebral (Buzsáki et al., 2012). La fluctuación de los potenciales de campo funciona como medida de la actividad cerebral que refleja el flujo dinámico de información a través de las redes neuronales. La mayor parte del procesamiento neuronal es llevado a cabo por ensamblajes de neuronas en los que sus unidades se coactivan. Solo cuando la activación se sincronice temporalmente, sus corrientes transmembrana pueden generar LFP medibles en el espacio extracelular (Herrerías, 2016). Por ello, dado que los LFP son un reflejo tanto de la actividad local como del circuito en el que participa, su análisis es de gran interés en el campo de la neurociencia de sistemas.

3.1.3 Metodología de los registros electrofisiológicos de LFP

Anestesia

Para la realización de los procedimientos quirúrgicos que se llevaron a cabo se empleó como anestésico el uretano. Este compuesto es ampliamente empleado como anestésico en experimentos con animales, principalmente porque puede administrarse por varias vías parenterales, porque produce un nivel constante y duradero de anestesia quirúrgica, por su capacidad como relajante musculoesquelético y tiene efectos mínimos en los sistemas autónomo, respiratorio y cardiovascular (Maggi y Meli, 1986a). Una dosis de 1,1 g/Kg administrada con inyección intraperitoneal es suficiente para inducir anestesia de larga duración de al menos 8 horas (Lincoln, 1969). Pese a que tiene efectos mutagénicos, cancerígenos y hepatotóxicos (Maggi y Meli, 1986b), el hecho de que los experimentos sean agudos y los sujetos no lleguen a manifestar estos efectos adversos sumado a que presenta ciertas ventajas frente a otros anestésicos lo convirtieron en la opción más adecuada para nuestros procedimientos.

Los mecanismos de acción de los agentes anestésicos en el sistema nervioso central siguen sin ser completamente conocidos. Actualmente, parece haber un consenso en que los anestésicos ejercen sus efectos mejorando la neurotransmisión sináptica inhibitoria y/o inhibiendo la neurotransmisión excitatoria (Hara y Harris, 2002). Los estudios de mecanismos de acción de estas sustancias muestran que interaccionan de forma más selectiva con los receptores ionotrópicos (Franks y Lieb, 1994) y en concreto parece su principal objetivo son los receptores del ácido γ -aminobutírico tipo A ($GABA_A$), ya que la mayoría de los anestésicos volátiles y no volátiles aumentan la actividad del canal en concentraciones clínicas (Krasowski y Harrison, 1999; Hill-Venning

et al., 1997). Por otro lado, los receptores de glicina, principales receptores inhibitorios de la médula espinal y tronco de encéfalo, ven mejorada su función con la aplicación de anestésicos volátiles (Hara y Harris, 2002). Los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA), que median la neurotransmisión nociceptiva y el almacenamiento de memoria en el sistema nervioso central, ven disminuida su función con el uso de Ketamina a concentraciones clínicas (Yakamura et al., 1993). Otro receptor ionotrópico que podría ser objetivo de los anestésicos es el receptor nicotínico (nACh), ya que es inhibido por anestésicos volátiles y ketamina (Tassonyi et al., 2002). Dado que el uretano ha demostrado bajos efectos en la actividad de los canales iónicos, potencia los receptores de glicina, $GABA_A$ y nicotínico e inhibe los receptores AMPA y NMDA pero en niveles muy bajos, puede ser adecuado para mantener la anestesia durante el registro electrofisiológico, siempre que no supere la concentración requerida para la anestesia quirúrgica (Hara y Harris, 2002).

El hecho de estar registrando actividad cerebral permite además comprobar el estado de anestesia del animal de forma relativamente sencilla, sumando a la comprobación de los reflejos la observación del registro de potencial de campo. El grado de anestesia se puede verificar observando el reflejo pupilar, cuando la pupila se contrae y se localiza en el centro del ojo el animal está totalmente inconsciente. También se comprueban los reflejos plantar y de la cola, para ello se aplica presión con unas pinzas entre los dedos de la pata o en la cola del animal para comprobar que no retira sus extremidades. Complementariamente, los patrones oscilatorios observados en el registro electrofisiológico pueden ser empleados para monitorizar el grado de anestesia, ya que el registro de hipocampo en animales anestesiados con uretano presenta un patrón de alternancia espontánea entre una actividad irregular de baja frecuencia y gran amplitud (0.5 a 3 Hz) y una actividad rítmica de mayor frecuencia y menor amplitud (3 a 12 Hz). Con la anestesia por uretano se mantienen las fluctuaciones cerebrales que se manifiestan durante el sueño natural (Clement et al., 2008). No obstante, el uretano puede producir cierta depleción en la actividad del potencial de campo, por lo que numerosos autores describen las frecuencias de theta en rata anestesiada como una actividad de 2.5 a 8 Hz (Leung, 1985).

Para realizar nuestros experimentos, se empleó una dosis intraperitoneal de uretano de entre 1.3 y 1.5 g/Kg (Sigma-Aldrich/Merk, Barcelona, España), preparado en suero salino fisiológico 0.9%. Con esta dosis anestésica, en el registro electrofisiológico en reposo predominan las ondas lentas con incrementos de actividad theta cuando se estimula sensorialmente la cola (textittail pinch) (Bland et al., 1994). A dosis menores (entre 1 y 1.2 g/kg) predominan las ondas lentas con actividad espontánea a frecuencias más altas además de haber mayor respuesta a estímulos sensoriales y finalmente, a dosis más altas (supe-

riores a 1.5 g/kg) la anestesia puede deprimir las funciones cardíacas y respiratorias, aumentando un 25 % la tasa de mortalidad (Maggi y Meli, 1986b). Complementariamente a esta anestesia general y para asegurar el nivel de anestesia, se administró a los sujetos lidocaína (0.5 % en suero salino, sin superar la dosis máxima de 10 mg/Kg) de forma local. Fue administrada de forma tópica en el oído externo y en la zona de incisión para insensibilizar las zonas de sujeción y cirugía. Mediante inyección subcutánea se administraron 0.2 ml en distintos puntos para bloquear la sensibilidad craneal (nervio oftálmico, zigomático y fibras C2). Dado que el efecto de este anestésico oscila entre los 20 y 40 minutos, se repitió cuando se fue necesario. Tras confirmar el estado de anestesia del sujeto mediante el control de los reflejos a estímulos sensoriales se inició la cirugía y una vez implando el electrodo de registro en hipocampo dorsal se pudo controlar el estado de anestesia mediante la observación del patrón oscilatorio. En los casos en los que se observó que el patrón disminuía notablemente la actividad lenta y aparecían períodos de actividad theta espontánea (3 a 12 Hz) de forma más recurrente, se suplementó la dosis anestésica a razón de 0.3 g/Kg de uretano. Para el desarrollo de los procedimientos se procuró minimizar el número de sujetos experimentales y el sufrimiento animal. Se controlaron las condiciones fisiológicas, el nivel de anestesia y analgesia de los sujetos a lo largo del procedimiento. Como ya se ha mencionado, el uretano tiene efectos tóxicos y nocivos, por lo que los animales fueron sacrificados y perfundidos al finalizar el procedimiento experimental, de acuerdo con la legislación vigente

Procedimiento quirúrgico

Tras la administración de la anestesia general de uretano y habiendo pasado los 35-45 minutos que tarda en hacer efecto, se comprobaron los reflejos corneal, caudal y plantar del animal y tras la verificación del estado de anestesia se aplicó la anestesia local con lidocaína con la dosis y de la forma que se indica en el apartado anterior. A continuación, se introdujo en el interior de los conductos auditivos externos un adaptador que permite fijar las barras que sujetarán el cráneo del animal. El animal fue situado en un marco estereotáxico (SR-6R, Narishige, Japón) al que se incorporó el adaptador y se fijó el cráneo al cuadro estereotáxico. Posteriormente, se fijaron los incisivos superiores permitiendo fijar el cráneo por completo y poder regular su altura.

El siguiente paso fue rasurar la zona y desinfectarla con povidona yodada (Betadine ©) y a continuación, con un bisturí se realizó una incisión medial longitudinal de unos 2 cm en la piel del cráneo, procurando no cortar la musculatura nuchal. Con la ayuda de una espátula quirúrgica se retiró el periostio y para mantener despejada la zona y que fuesen totalmente visibles las suturas craneales se usaron retractores que mantuvieron la piel apartada. La zona se limpió con

un algodón empapado en hipoclorito de sodio diluido en agua (40 g/L) con la que se retiraron los restos de sangre y proteínas, a continuación, se empleó una solución de ácido ortofosfórico para facilitar la adhesión del cemento al hueso. Finalmente, se limpiaron los restos con agua destilada y se empleó acetona para deshidratar la zona.

Se localizaron las coordenadas dorsoventrales de bregma y lambda, así como de puntos laterales equidistantes y se modificó la altura y posición de la pieza de los incisivos hasta que ambos puntos de referencia se encontraran situados a la misma altura, asegurando la posición horizontal del cráneo. Las coordenadas teóricas de las regiones de interés fueron extraídas del atlas estereotáxico de rata de Paxinos y Watson (Paxinos y Watson, 2015). Dado que las coordenadas teóricas del atlas fueron obtenidas empleando ratas de 290 g de peso con una distancia entre bregma y el punto interaural de 9.0 mm (figura 16), se midió la distancia anteroposterior entre los puntos de referencia bregma e interaural y se realizó una corrección de las coordenadas en función del tamaño del cráneo de cada uno de los ejemplares. Para calcular estas nuevas coordenadas se emplea un factor de corrección que se obtiene al dividir la distancia entre bregma e interaural del ejemplar entre la distancia estándar del atlas que hay entre estos dos puntos, 9.0 mm.

$$\text{Factor de corrección} = \frac{AP_{\text{bregma}} - AP_{\text{interaural}}}{9.0}$$

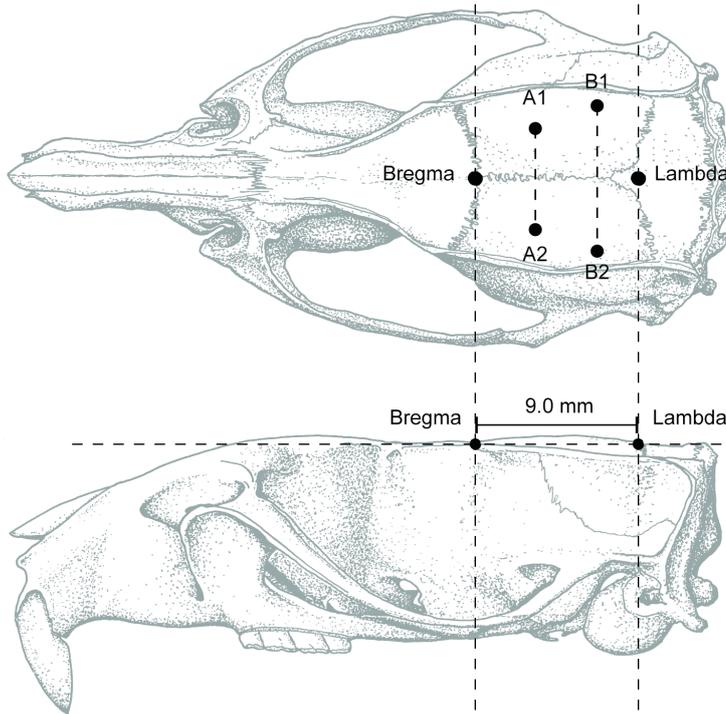


Figura 16: Visiones lateral y dorsal del cráneo de rata estándar de aproximadamente 290 g. Se representa la situación de bregma, lambda y la línea interaural. Las referencias estereotáxicas están dadas considerando 9 mm como distancia entre bregma y la línea interaural. A1, A2, B1 y B2 representan los puntos laterales equidistantes que se emplearon como referencia para nivelar el eje horizontal del cráneo. Adaptada de Paxinos y Watson (2015)

A pesar de que esta corrección no es estrictamente necesaria en regiones grandes o muy superficiales, sí la consideramos muy recomendable para aumentar la precisión cuando el objetivo son núcleos de pequeño tamaño y/o profundos, como es el caso del NI. Las coordenadas de las regiones de interés que se muestran (tabla 1) son sin aplicar el factor de corrección.

Tabla 1: Coordenadas de las estructuras de interés tomando bregma como referencia

Núcleo	Antero-posterior	Lateral	Dorso-ventral
IL	+3.2 mm	0.5 mm	5.2 mm
BLA	-2.3 mm	5 mm	8.5 mm
HPCd	-3.4 mm	5.8 mm	2.4 mm
HPCi	-5.8 mm	5.8 mm	8.6 mm
HPCv	-9.7 mm	0.1 mm	7.9 mm
NI	+3.2 mm	0.5mm	5.4mm

Una vez corregidas las coordenadas, se marcaron en el cráneo y con un taladro dental se realizaron los trépanos (Figura 17). Las meninges fueron retiradas con unas micropinzas para evitar que al insertar los electrodos estos se dañasen o deteriorasen. Una vez insertados se fijaron al hueso mediante el uso de resina acrílica dental (Duralay

©). En algunos casos fue necesario el uso de gelatina hemostática (Espongostan ©) para el control de las hemorragias, especialmente al insertar el electrodo de estimulación en NI, dado que se atraviesa el seno transverso. Durante el desarrollo de la operación se revisó el estado de hidratación del animal y se administraron inyecciones intraperitoneales de suero salino estéril para evitar la deshidratación. Todos los animales fueron mantenidos a una temperatura constante de 37°C mediante el uso de una manta térmica.

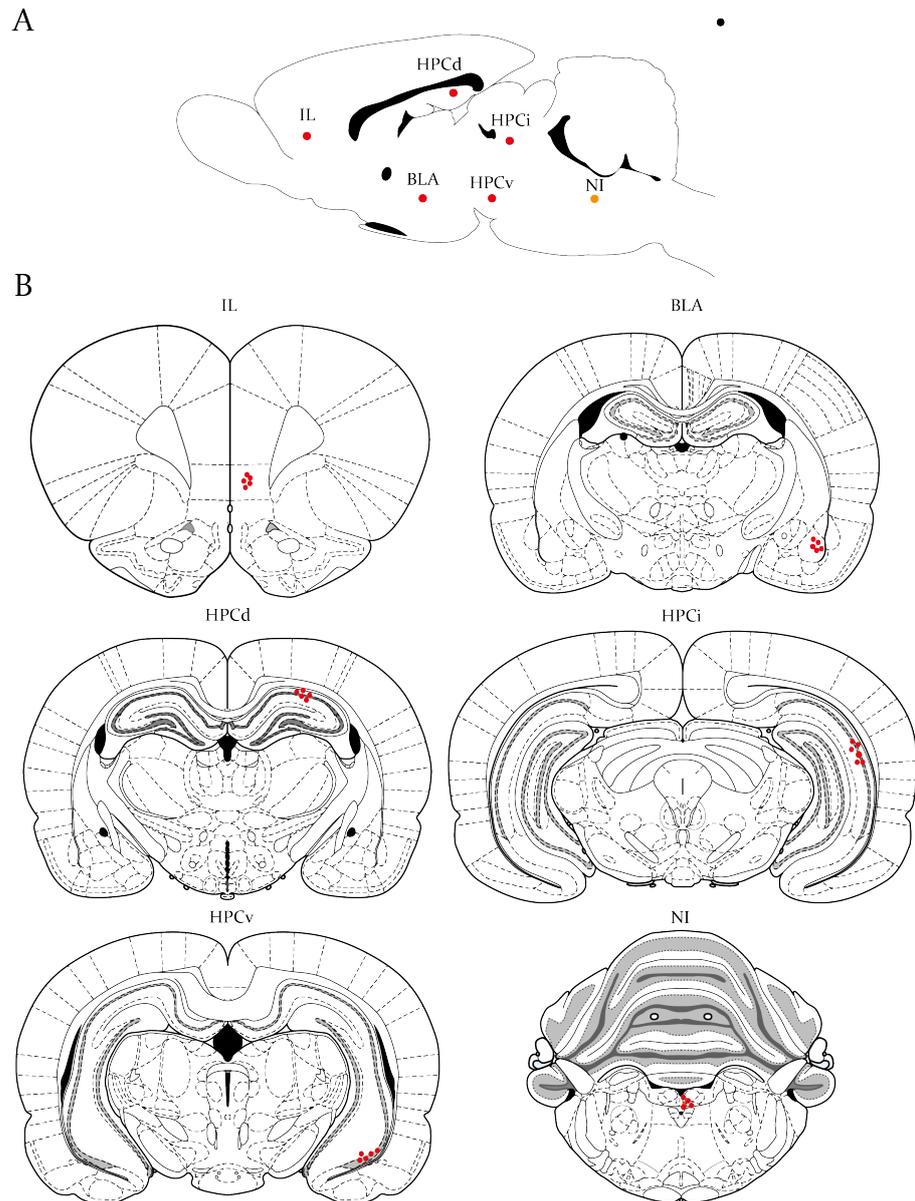


Figura 17: Visión sagital y coronal de la posición de los electrodos. (A) se muestra la posición de los electrodos en un corte sagital de cerebro de rata. La posición de los electrodos de registro se marca con un punto rojo y la del electrodo de estimulación con un punto naranja. (B) muestra la posición de los electrodos en cortes coronales de cerebro de rata. Los puntos rojos identifican los electrodos de registro, mientras que el punto naranja localiza el electrodo de estimulación. Adaptada de Paxinos y Watson (2015).

Sistema de registro y adquisición

Para el registro se emplearon cinco electrodos de registro con sus referencias, todos los electrodos fueron implantados intracranealmente en el hemisferio derecho. Para las referencias se emplearon cables de conducción con pinzas terminales que se fijaron a la piel.

Uno de los grandes problemas que surgen durante el registro es la captación de ruido eléctrico originado por señales ajenas a nuestro registro electrofisiológico. Las señales cerebrales son de baja amplitud (entre 5 y 300 μV), este fenómeno hace que sean propensas a la aparición de artefactos provenientes de otras fuentes. La corriente alterna (50 Hz) es la fuente principal de este ruido artefactual. Para anularlo del registro, se utilizaron varias tomas de tierra derivadas tanto al marco estereotáxico como al animal y en los casos que se consideró necesario, además se hizo uso de una jaula de Faraday que permite el blindaje eléctrico.

La señal obtenida por cada electrodo fue conducida a un preamplificador (P55, Grass Technologies, Alemania) y a un amplificador (MPLI 4G21; CIBERTEC, Madrid, España), en los que se filtró la señal entre 0.3 y 300 Hz y se amplificó 100 veces. Posteriormente, se eliminó in situ el ruido de línea producido por la corriente alterna (50 Hz) mediante el uso de un filtro de línea Hum Bug (Quest Scientific, North Vancouver, Canadá).

Finalmente, las señales se digitalizaron empleando el sistema CED Micro 1401 plus A/D converter (Cambridge Electronic Design, Cambridge, Reino Unido) y pudieron ser visualizadas y almacenadas en un ordenador equipado con el *software* Spike2 (Cambridge Electronic Design, Cambridge, Reino Unido). La frecuencia de muestreo que se empleó en los 5 canales de registro fue de 1000 Hz.

El sistema incluye un electrodo de estimulación, también implantado en el hemisferio derecho. Para la estimulación se empleó un generador de pulsos rectangulares conectado a un sistema de aislamiento de estímulo de voltaje constante y conectado también al sistema de adquisición para registrar los estímulos aplicados. Los detalles de la estimulación se explicarán más adelante.

Electrodos de registro

Para los registros de la actividad extracelular se emplearon macroelectrodos monopolares de acero inoxidable de 120 μm de diámetro y con recubrimiento de teflón (AM Systems, Sequim, EE. UU). Para permitir la conectividad con el sistema, este recubrimiento de teflón fue eliminado con un bisturí en los extremos distales. Con el fin de asegurar la conductividad eléctrica de las referencias fijadas en la piel, éstas se mantuvieron humedecidas con suero salino estéril.

En la actividad oscilatoria de hipocampo dorsal bajo el efecto de la anestesia con uretano predominan oscilaciones de baja frecuencia y

gran amplitud (ondas lentas). Con la aplicación de estímulos externos como el *tail pinch* esta estructura responde con un patrón típico en el que se observa un aumento de la actividad theta, una onda de mayor frecuencia y menor amplitud (Bland et al., 1999). Por esta razón, la implantación del electrodo de hipocampo dorsal fue la que se realizó en primer lugar y con el sistema de adquisición de señales conectado, permitiendo su visualización en tiempo real. Así se pudo corroborar que el electrodo estaba implantado en el lugar adecuado y que el sistema de adquisición funcionaba correctamente.

El orden de inserción de los electrodos fue el mismo en todos los casos. El primero en ser implantado fue siempre el macroelectrodo de hipocampo dorsal y el resto se insertaron en orden del más anterior al más posterior.

Electrodo de estimulación

El electrodo de estimulación, situado en el núcleo incertus, se confeccionó a partir de cable de acero inoxidable de 120 μm de diámetro (AM Systems, Sequim, EE. UU) con aislamiento de teflón. Para trenzar el cable, se emplearon dos pinzas hemostáticas de punta recta con un recubrimiento para evitar dañar el teflón del cable. Con un bisturí se retiró ligeramente la cobertura plástica en los extremos y con unas micropinzas y un pie de rey se separaron las puntas de estimulación con una distancia inferior a 1 mm.

Este electrodo fue siempre el que se implantó en último lugar y tras su fijación, se recubrió con cemento dental el conjunto de todos los electrodos creando una base firme para evitar posibles desprendimientos por la infiltración de posibles sangrados. Estos sangrados son habituales dado que para alcanzar tanto corteza prefrontal como NI, ambos localizados en la línea media, los electrodos han de atravesar senos venosos.

Paradigma de estimulación eléctrica

Para los estímulos se empleó un generador de pulsos cuadrados S48 (GRASS Technologies; Warwick, USA) conectado a una unidad SIU5-RF (GRASS Technologies) para aislamiento de estímulo de voltaje y mantener la intensidad de estimulación constante. El generador de pulsos además se conectó al sistema de adquisición con el fin de tener el registro de los pulsos aplicados.

La estimulación se realizó aplicando trenes de estímulos en el NI. En primer lugar, se realizó un registro basal de 300 segundos, luego se sometió al animal a trenes de 10 s con pulsos de 0.3 ms a 100 Hz y 0.08 mA aplicados a una velocidad de 0.02 trenes/s para permitir la recuperación parcial de las ondas lentas. Se aplicaron periodos de reposo entre trenes de 60 segundos y finalmente se registró un periodo post-estimulación de 300 s. El paradigma fue seleccionado basándose en estudios previos que se habían hecho en el grupo sobre el papel

de NI en la actividad theta hipocámpica (Martínez-Bellver et al., 2017, 2015; Nuñez et al., 2006).

Sacrificio y perfusión

Una vez finalizados los procedimientos se sacrificaron los animales mediante la administración intraperitoneal de una dosis letal al 20 % de 100 mg/Kg de pentobarbital sódico (Doletal, Vetoquinol, Madrid, España). Cuando la frecuencia cardíaca disminuyó, pero antes de que cesara el latido cardíaco, se realizó una incisión longitudinal en la línea media desde la parte anterior del abdomen hasta el esternón. Luego se seccionó el diafragma para tener acceso al corazón. Se introdujo una cánula sin filo de 1 mm de diámetro a través del ventrículo izquierdo y se llevó hasta la aorta ascendente. Seguidamente se aseguró la cánula pinzándola para evitar su salida.

Para bombear los distintos líquidos que se emplearon se empleó una bomba de perfusión (PERCOM N-M; J.P.Selecta). En primer lugar, para purgar la sangre del sistema circulatorio, se emplearon 500 ml de suero salino isotónico (0.9 %) heparinizado al 1 %. Además, se realizó una incisión en la aurícula derecha para permitir la salida de la sangre y el suero del sistema. Cuando el fluido desalojado tuvo un color transparente, se cambió el flujo a los 500 ml de la solución fijadora de paraformaldehído (PFA) al 4 % (Sigma-Aldrich; St. Louis, USA) en tampón fosfato (0.1m, pH = 7.4) con un flujo de 20 ml/min. Tras completar la perfusión se extrajo el encéfalo y se conservó a 4°C durante 24 h en solución fijadora de PFA al 4 % con el objetivo de que la solución continúe fijando el tejido perfundido. Transcurrido el tiempo, se lavó el encéfalo en una disolución crioprotectora de sacarosa al 30 % en tampón fosfato salino (0.2m, pH = 7.4) y se conservó en esta misma disolución en nevera a 4°C durante 36-48 h, hasta que el encéfalo quedase totalmente sumergido indicando que se había infiltrado la solución de sacarosa. Este paso es necesario dado que posteriormente el tejido se cortó usando un microtomo de congelación y la sacarosa actúa como crioprotector evitando que el tejido se dañe durante la congelación.

Para realizar los cortes se empleó un microtomo de congelación SM200 R (Leica Biosystems, Alemania) junto con una unidad de congelación Frigomobil (Leica). En primer lugar, se prepararon las muestras para el corte. Para ello, se eliminaron el bulbo olfatorio y la médula espinal y para facilitar la congelación se seccionó coronalmente en dos partes, procurando garantizar que ninguna de las regiones de interés fuese afectada. Para ajustar el microtomo, en primer lugar, se bajó la temperatura de la pletina hasta alcanzar -30°C. A continuación, se formó una base con sacarosa al 30 % en tampón fosfato salino que fue nivelada para poder situar encima el fragmento de encéfalo y una vez colocada la sección se fue añadiendo poco a poco la misma preparación de sacarosa tamponada hasta que se formó un bloque

de hielo alrededor de la muestra. La temperatura de la pletina fue controlada durante todo el proceso de corte y modulada cuando fue necesario.

Los cortes se realizaron en el plano coronal y con un grosor de 40 μm y se recogieron en tubos Eppendorf de 2.0 ml. Se realizaron 5 series por cada ejemplar y el medio de suspensión utilizado en los Eppendorf dependió del tratamiento que se dio a cada serie. Las series en las que el procesamiento histológico fue realizado en los 3 días posteriores al corte se usó tampón fosfato salino (0.2 M, pH = 7.4) como medio y se conservaron a 4°C, para los casos en los que el procesamiento histológico no se realizó en ese periodo, se empleó como medio solución de sacarosa y las muestras se almacenaron a -40°C hasta su utilización.

Verificación histológica

Para verificar que los electrodos habían sido implantados correctamente en las estructuras diana, se realizó el análisis histológico. Para ello, se empleó al menos una serie por ejemplar. En algunos casos fue necesario procesar más de una serie para localizar el electrodo de estimulación, debido al pequeño tamaño del NI.

En los casos en los que se usaron series almacenadas a -40°C en tampón fosfato salino con sacarosa al 30 %, se sacaron las muestras del congelador y se mantuvieron en la nevera a 4°C hasta que se descongelaron por completo. Para el montaje de las series se emplearon portaobjetos gelatinizados con una solución de gelatina 0.5 % y alumbre de cromo al 0.05 % en agua destilada. Cuando las muestras se montaron, se dejaron secar los portaobjetos a temperatura ambiente hasta que quedaron completamente secos. Fue entonces cuando se aplicó el protocolo de tinción citoarquitectónica Giemsa, adaptado de Iñiguez et al. (1985). En primer lugar, se rehidrataron los cortes y se eliminaron posibles impurezas, para ello se sumergieron los portaobjetos con los cortes en una batería de alcoholes con concentración decreciente: un paso de 2 min en etanol 96°, seguido de otro paso de 2 min en etanol 70°, y finalizando con un paso de 2 min en agua destilada. A continuación, se introdujeron en un baño de KH_2PO a 60°C durante 2 min y luego en una dilución 1:10 de Giemsa a 60°C en agitación durante 10 a 30 min. El tiempo que se mantuvieron las muestras en la dilución de Giemsa dependió de la coloración de la tinción. Posteriormente se pasaron los portaobjetos por dos lavados simples de agua destilada y dos baños de 5 minutos cada uno en KH_2PO a temperatura ambiente y en agitación. Para finalizar, se sometieron a otra batería de alcoholes, en este caso ascendente para deshidratar las muestras, se aclararon con dos baños de xileno (Merck, Barcelona, España) y se cubrieron con el medio de montaje comercial DPX (Merck; Darmstadt, Alemania).

Las muestras se observaron al microscopio (Nikon Eclipse E600; Nikon) y junto con la ayuda del atlas estereotáxico (Paxinos y Watson, 2015) se determinó la posición de los electrodos. Los casos en los que alguno de los electrodos no alcanzó la región objetivo, fueron eliminados del análisis.

3.1.4 *Análisis de datos*

Las señales registradas en el proceso de adquisición de la actividad local de campo se analizaron mediante el uso de los distintos métodos analíticos que se exponen en este apartado. Previamente a la aplicación de estos métodos, los datos fueron importados al entorno MATLAB (The MathWorks, Massachusetts, EE. UU.), donde posteriormente se analizaron *offline* mediante el uso de rutinas propias.

En una aproximación inicial por determinar el efecto de la estimulación eléctrica se segmentó la señal cruda para delimitar las ventanas de interés que incluían los 10 segundos anteriores al inicio de la estimulación, 10 segundos de estimulación y 10 segundos posteriores al fin del estímulo. De este modo, generamos una ventana de 30 segundos por cada estímulo que posteriormente fue promediada para obtener la señal cruda promedio que nos permitió observar los cambios generales sobre el patrón oscilatorio de las regiones estudiadas.

Transformada rápida de Fourier para el análisis del espectro de potencias

La señal representada por la onda del LFP es una señal compleja compuesta por señales de distintas frecuencias y amplitudes. La señal original es captada con un muestreo, a partir de la cual se reconstruye una señal continua. Esta señal, en cada instante del registro contiene una composición de ondas diferente. Esta secuencia de datos continua puede ser descompuesta en un conjunto de ondas sinusoidales de diferentes frecuencias aplicando la transformada rápida de Fourier (*fast Fourier transform*, FFT) (Figura 18). Este algoritmo se basa en el teorema de Joseph Fourier, según el cual una serie temporal continua se puede descomponer en sus diferentes componentes espectrales, transformándola por tanto del dominio del tiempo al dominio de la frecuencia.

El espectro de potencia o densidad espectral de potencia de una onda es una la representación gráfica que se obtiene a partir de los componentes de los coeficientes de Fourier, en la que se representa el voltaje al cuadrado para cada componente. Cabe mencionar que la frecuencia máxima que se puede representar en el espectro de potencias está determinada por la frecuencia de muestreo, ya que coincide con la frecuencia de Nyquist (mitad de la frecuencia de muestreo de un sistema de procesamiento de una señal discreta).

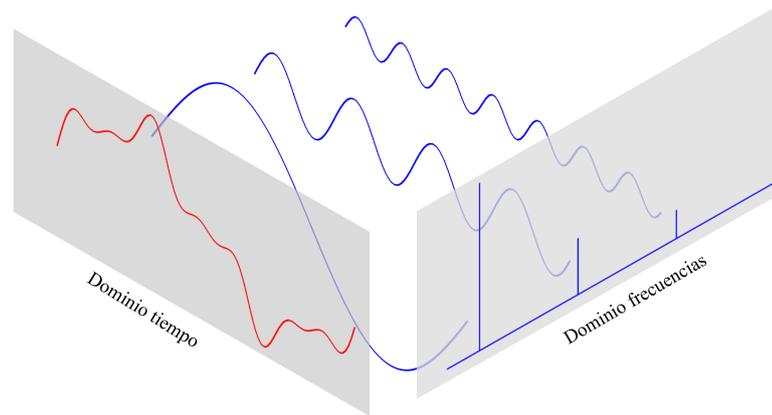


Figura 18: Transformada de Fourier. Descomposición en el dominio de las frecuencias de los componentes sinusoidales de una señal compleja en el dominio temporal.

En nuestro caso, la tasa de muestreo que empleamos durante la adquisición de los datos (1000 Hz) permitía descomponer y representar frecuencias más altas de las que nos interesaba, por ello se aplicó una reducción de muestreo (*offline*). La tasa de muestreo fue reducida a 250 Hz, lo cual permite la representación de una frecuencia máxima de 125 Hz. La finalidad de esta reducción fue disminuir el volumen de operaciones a realizar por el software de análisis facilitando así el procesamiento. Para aplicar la FFT se aislaron ventanas de 5 segundos en los 3 periodos de interés del análisis: basal, estimulación y post-estímulo para cada uno de los estímulos realizados. Se establecieron los siguientes rangos de frecuencia para la caracterización de componentes: ondas lentas (<1.5 Hz), theta bajo (2.5-6 Hz), theta alto (6-12 Hz), beta (16-30 Hz), gamma bajo (30-60 Hz) y gamma medio (60-90 Hz). Se empleó el método Welch con ventanas de 5 segundos, superposición del 50 % y un valor *nfft* 1024.

Para la selección de los estímulos que se incluirían en el análisis, establecimos un umbral de actividad theta en HPCd que debían superar para ser incluidos. Los casos en los que la potencia relativa de la banda theta bajo durante las ventanas de 5s del estímulo superó el umbral establecido (1.5 veces) respecto a la potencia relativa de esta misma frecuencia durante la ventana del periodo basal fueron incluidos en todos los análisis.

Análisis *wavelet* para la evolución temporal de frecuencias

Pese a la gran utilidad de la FFT para el análisis de los componentes frecuenciales de la señal, no permite analizar la evolución dinámica en el tiempo de espectro de potencias, es decir, únicamente aporta una imagen estática de las frecuencias (Cohen, 2019). Esta limitación puede ser solventada mediante la aplicación de la transformada de

Fourier de tiempo reducido (*Short Time Fourier Transform*, STFT) que nos permite descomponer la señal en tiempo y frecuencia. En este caso, la transformación se hace multiplicando la función a transformar por una función ventana que es normalmente de tipo gaussiano. No obstante, se descartó este enfoque ya que emplea ventanas de muestreo con un tamaño fijo lo que deriva en que ventanas amplias aportan una buena resolución de frecuencias con baja resolución temporal mientras que, ventanas estrechas aportan buena resolución temporal pero una deficiente resolución espectral (Allen, 1977).

La naturaleza dinámica de las señales bioeléctricas exige que una alta resolución de tiempo y frecuencia por este motivo se realizó un abordaje diferente a la STFT, el análisis *wavelet*, usando la *wavelet* de Morlet aplicada al análisis de señales biométricas (Torrence y Compo, 1998) que permite obtener una descomposición de la señal en el dominio tiempo-frecuencia. Es así como se introduce el análisis mediante la transformada continua *wavelet* (*Continuous Wavelet Transform*, CWT). En el análisis *wavelet* se emplean ondículas (*wavelets*) con una duración finita y en las que su energía se concentra en el tiempo entorno a un punto, lo que permite el análisis de fenómenos no estacionarios y discontinuos. La capacidad para escalar el ancho de banda del filtro de manera inversa a la frecuencia permite conseguir solventar las limitaciones de la STFT (Wirsing, 2020) y proporciona una adecuada resolución temporal para frecuencias altas y una resolución idónea en frecuencias para ondas más lentas. Por todo ello, la CWT es una potente herramienta para el estudio en el dominio tiempo-frecuencia. Los mecanismos de dilatación y traslación son los que permiten transformar la señal y analizarla en el dominio espacio y temporal. La dilatación de las ondículas consiste en dilatarlas o comprimirlas para que se amolden a la frecuencia de la señal en la ventana seleccionada. La traslación permite el movimiento de las ventanas a lo largo del tiempo, proporcionando la resolución temporal (Figura 19).

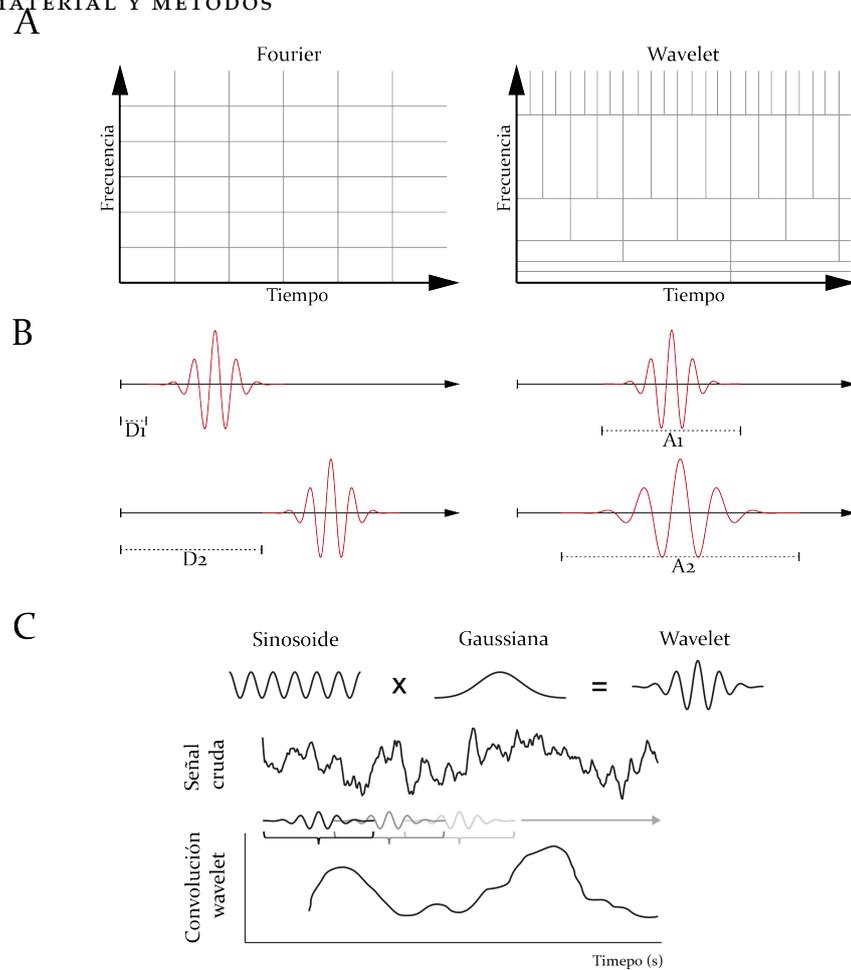


Figura 19: Fundamentos análisis *wavelet*. (A) A la izquierda se muestran las ventanas que proporciona la transformada de Fourier, al ser estáticas son apropiadas para analizar un solo rango de frecuencia. A la derecha se muestran las ventanas que proporciona un análisis *wavelet*, estas se pueden ajustar al rango de frecuencia deseado por lo que tiene mayor resolución tiempo-frecuencia. (B) Las distintas ventanas del análisis *wavelet* se ajustan mediante sus propiedades básicas: traslación (izquierda) y dilatación (derecha). La primera permite desplazar las ventanas a lo largo del tiempo y la segunda ajustar la función *wavelet* según la frecuencia. (C) Se muestra el resultado de la convolución con una *wavelet* compleja. Adaptada de Cohen (2019).

A continuación, se expone una breve contextualización de los principios matemáticos de la CWT. Para calcular la CWT se precisa previamente una función *wavelet* que sea dependiente de un parámetro temporal y no dimensional, η , y que cumpla con la condición de admisibilidad: que tenga media cero y se encuentre localizada en los dominios tiempo y frecuencia (que no tenga componente de frecuencia cero). Un ejemplo de función *wavelet* que cumple estos requisitos es la *wavelet* de Morlet, una onda plana que es modulada por una gaussiana:

$$\Psi_0(\eta) = \pi^{-\frac{1}{4}} e^{i\omega_0\eta} e^{-\frac{\eta^2}{2}}$$

en la que ω_0 es una constante de valor 6, lo que permite cumplir la condición de admisibilidad (Farge, 1992). Para una serie temporal, χ_n , que ha sido muestreada a una frecuencia constante δ_t , la transfor-

mada *wavelet* continua de esta señal discreta en un tiempo y escala determinados (n, s) puede ser definida como su convolución mediante una versión escalada y desfasada de la función *wavelet*:

$$W_n(s) = \sum_{n'=0}^{N-1} \chi_{n'} \Psi^* \left[\frac{(n' - n)\delta t}{s} \right]$$

Es preciso realizar una normalización que permitirá comparar textitwavelets con distintas escalas (distintas textits) o con la misma escala pero distintas sucesiones temporales. La fórmula normalizada se define como:

$$\Psi_0 \left[\frac{(n' - n)\delta t}{s} \right] = \left(\frac{\delta t}{s} \right)^{\frac{1}{2}} \Psi_0 \left[\frac{(n' - n)\delta t}{s} \right]$$

De la cual se obtiene la ecuación que define la normalización a energía unitaria de la función textitwavelet:

$$W_n(s) = \sum_{n'=0}^{N-1} \chi_{n'} \left(\frac{\delta t}{s} \right)^{\frac{1}{2}} \Psi_0 \left[\frac{(n' - n)\delta t}{s} \right]$$

La función wavelet de Morlet, $\psi(\eta)$, es una función compleja que transforma la señal manteniendo su complejidad. Esta señal transformada, $W_n(s)$, puede descomponerse en sus componentes real $\Re\{W_n(s)\}$ e imaginario $\Im\{W_n(s)\}$. La amplitud de la señal se puede obtener a partir del cálculo del módulo de su parte real $|W_n(s)|$ y la fase a partir del cálculo arcotangente de la división entre las partes imaginaria y real de $W_n(s)$:

$$\phi(s) = \tan^{-1} \frac{\Re\{W_n(s)\}}{\Im\{W_n(s)\}}$$

Y finalmente, se puede obtener la potencia de la señal a una escala concreta calculando el módulo al cuadrado de la amplitud: $|W_n(s)|^2$.

En este trabajo, se estudió la evolución temporal de los rangos de frecuencias indicados anteriormente. Para ello, se seleccionaron ventanas de 5 segundos en los periodos basal, estimulación y post-estimulación y se extrajeron los segmentos en los que cada componente constituía al menos un 30 % de la actividad oscilatoria. Posteriormente se calculó la longitud y el número de segmentos aislados para cada componente y cada periodo de interés. Además, pudimos calcular el grado de fraccionamiento de los segmentos de cada banda, así como la frecuencia media por banda periodo analizados. Finalmente, para la representación de los espectrogramas *wavelet*, empleamos escalas colorimétricas estandarizadas que evitan que las potencias de las bandas con mayor frecuencia se enmascaren por la alta potencia de las bandas más lentas.

Aplicación del análisis *wavelet* como medida de sincronización entre estructuras

La sincronización neuronal entre estructuras se puede definir como la aparición de eventos correlacionados en el tiempo entre ellas (Timofeev et al., 2012). Las oscilaciones y su sincronización, en los mamíferos, se han encontrado de manera ubicua en circuitos neuronales locales y redes de todo el cerebro, desde los núcleos más profundos hasta la neocorteza (Buzsáki et al., 2013). La sincronía neuronal ha sido ampliamente documentada en procesamientos cognitivos como la memoria, la percepción y el aprendizaje durante el sueño y la vigilia, siendo fundamental en estos procesos (Kazemi y Jamali, 2022; Lowet et al., 2022). Además, se ha observado una alteración de los patrones de sincronización en numerosas condiciones psiquiátricas (Haig et al., 2000; Lopes Da Silva et al., 2003; Uhlhaas et al., 2006; Little y Brown, 2014). Por estas razones, desentrañar las funciones de sincronización neuronal oscilatoria ha sido uno de los principales objetivos de la neurociencia de sistemas.

Se llevó a cabo un primer abordaje para determinar el nivel de relación entre estructuras registradas sincrónicamente mediante el espectrograma cruzado *wavelet* (*Wavelet Cross-Spectrum*, WCS), para lo cual se empleó la transformada *wavelet* continua. El WCS se puede definir como el producto de la transformada *wavelet* de dos series temporales:

$$W_n^{XY}(s) = W_n^X(s)W_n^{Y*}(s)$$

donde $W_n^{Y*}(s)$ representa el complejo conjugado de $W_n^Y(s)$. El valor absoluto o módulo del producto conjugado, $|W_n^{XY}(s)|$, da como resultado la potencia del espectrograma. Los WCS se representaron con una resolución de 0.01 bin y con una escala colorimétrica en la que los colores más fríos (azules) representan menor potencia y los cálidos (rojos) mayor.

La coherencia *wavelet*, $C(s)$, es una medida que permite determinar correlaciones lineales entre las distintas señales basándose en la similitud o diferencia de la amplitud relativa y la fase entre ambas señales. La medida de coherencia generalmente es distinta de la sincronía (Singer, 1999), que normalmente se describe como la similitud entre señales que oscilan a la misma frecuencia con fases idénticas. La coherencia es una medida de sincronización entre dos señales basada principalmente en la fase, es decir, dos señales pueden tener fases diferentes, pero se presenta alta coherencia cuando esta diferencia de fase tiende a permanecer constante (Srinivasan, 2007). La coherencia se puede definir de la siguiente manera:

$$C(s) = \frac{S(s^{-1}|W^{XY}(s)|^2)}{(s^{-1}|W^{XX}(s)|^2) \cdot (s^{-1}|W^{YY}(s)|^2)}$$

donde W^{XY} es el espectrograma cruzado (WCS), W^{XX} y W^{YY} son los espectrogramas autocruzados de las dos señales y S es un parámetro *wavelet* que para el suavizado espacio-temporal (Torrence y Webster, 1998). Esta definición matemática es similar a la del coeficiente de correlación de Pearson, por lo que podemos definir la coherencia como un coeficiente de correlación en el dominio tiempo-frecuencia (Grinsted et al., 2004). La representación gráfica se realizó mediante el coherograma *wavelet* (*Wavelet Coherogram*, *WCoh*) en el que la escala colorimétrica indica el grado de correlación lineal va determinado por la calidez del color al igual que ocurría en el espectro cruzado. La resolución que empleamos para esta representación fue de 0.01 bin.

Índice de bloqueo de la fase como medida del acoplamiento fase-fase

El valor del bloqueo de fase (*Phase Locking Value*, *PLV*) es una medida estadística que se puede utilizar para investigar los cambios en la sincronización entre poblaciones neuronales, por ello, una vez demostrada la sincronización entre señales se profundizó aislando las diferencias de fases. Este método fue introducido por Lachaux en 1999 y se puede entender el *PLV* como un índice de conectividad entre estructuras. El incremento respecto a un estado referencia del *PLV* entre estructuras se conoce como acoplamiento o sincronización de fase (Vinck et al., 2011). Si bien es cierto que la coherencia espectral ha sido empleada para cuantificar la sincronización entre fases, esta consiste en una correlación de las fases y amplitudes de las señales analizadas mientras que en el caso del *PLV* se emplea la fase relativa entre señales, por lo que el índice evalúa la sincronización entre fases independientemente de las amplitudes de las ondas. Matemáticamente, y siguiendo a Lachaux et al. (1999), el acoplamiento de fase se define como:

$$PLV_{xy} = \frac{1}{N} \sum_{n=1}^N e^{i\varphi_{rel,xy}(t_n)}$$

Donde $\varphi_{rel,xy}(t_n)$ se obtiene tomando dos señales $x(t)$ e $y(t)$ cuyas fases son $\varphi_x(t)$ e $\varphi_y(t)$ respectivamente, y calculando la diferencia de fase. Teniendo en cuenta que se trata de un sistema experimental que puede presentar saltos aleatorios de fase 2π , es recomendable realizar la diferencia de fase relativa en el intervalo $[0, 2\pi]$:

$$\varphi_{rel,x,y}(t) = \varphi_{xy}(t) \bmod 2\pi$$

Es bastante frecuente en los registros de señales extracelulares que se produzca el fenómeno de conducción volumétrica (Stinstra y Peters, 1998) en el que la señal registrada es producto de varias señales que por el volumen de las poblaciones neuronales adyacentes son también registradas. Por ese motivo, en este trabajo se utilizó el índice de retraso ponderado (*Weighted Phase Lag Index*, wPLI) como alternativa al PLV. En el wPLI, la contribución de los adelantos y retrasos de fase observados se pondera por la del componente imaginario del espectro cruzado:

$$wPLI_{xy} = \frac{n^{-1} \sum_{t=1}^n |\Im(S_{xyt})| \text{sgn}(\Im(S_{xyt}))}{(n^{-1} \sum_{t=1}^n |\Im(S_{xyt})|)}$$

donde $\Im(S)$ indica el componente imaginario de la densidad espectral cruzada en el tiempo t y se extrae mediante el uso de rutinas de MATLAB. Y la función sgn indica si el un número o el resultado de una expresión es mayor, menor o igual que cero. Las ventajas del uso del wPLI son que este índice aumenta la especificidad, mediante la reducción del efecto de la conducción volumétrica y además tiene mayor poder estadístico, ya que detecta cambios en la sincronización de las fases ponderadas (Vinck et al., 2011). Para obtener los valores de wPLI, se emplearon los espectrogramas *wavelet* cruzados (Borhegyi et al., 2004; Li et al., 2007), a partir de los cuales se extrajeron los datos. Las diferencias de fase se traducen en ángulos, los cuales se pueden representar para estudiar su distribución mediante estadística circular. Para el estudio de la distribución de los ángulos se emplearon rutinas de MATLAB y para examinar la uniformidad de la distribución se utilizó la prueba de uniformidad de Rayleigh, considerándose significativo cuando p-valor fue inferior a 0.05 (umbral de significación del 95 %). El wPLI estima cómo se distribuyen las fases ponderadas sobre el círculo unidad. Cuando la sincronización es alta, la distribución se concentra en una porción pequeña del círculo, mientras que cuánto más débil es la sincronización, más homogéneamente se distribuyen las fases en el círculo. Para la obtención de los valores de acoplamiento de fases ponderadas se analizaron todos los estímulos seleccionando ventanas de 5 segundos para los tres periodos de análisis (basal, estimulación y post-estimulación) y estableciendo una escala normalizada en la que $y=1$ representaba el acoplamiento máximo, es decir, mantener la misma diferencia de fases para cada tiempo, e $y=0$ ausencia de acoplamiento de fases.

Información mutua como medida del grado de conectividad

Como ya demostraron Freiwald y compañeros en 1999, existen también relaciones no lineales entre poblaciones neuronales. En los métodos analíticos anteriores se han estudiado las relaciones lineales entre señales, pero para los casos en los que además existen relaciones

no lineales, es preciso el uso de medidas basadas en la Teoría de la Información de Shannon, introducida en 1948. La información mutua (*Mutual information*, MI) es una medida que cuantifica la dependencia estadística de dos series de datos y que, aplicada a nuestro campo de estudio, permite cuantificar grado de interacción no lineal entre dos poblaciones neuronales registradas.

El cerebro tiene como funciones principales la codificación, procesamiento y almacenamiento de la información. Por esta razón es lógico analizar su comportamiento empleando la teoría de la información, concebida precisamente para el estudio de la transmisión y procesamiento de la información. Debido a su utilidad, esta teoría ha sido ampliamente utilizada en la neurociencia, siendo de gran interés en el estudio de la conectividad funcional (Timme, 2018). En el campo de la teoría matemática de la información, Shannon define la entropía como una medida de incertidumbre o variabilidad en una variable aleatoria (X). Su definición formal es la siguiente:

$$H(X) = - \sum_{i=1}^{N_x} p_x(i) \cdot \log_2 p_x(i)$$

donde N es el número de bins y $p_x(i)$ representa la probabilidad de observar el valor i en cada uno de los bins. Esta medida en sí ya aporta información sobre la variable estudiada, dado que mide su incertidumbre, o, dicho de otra manera, es un reflejo de la variabilidad o de las posibles configuraciones que puede adoptar el sistema.

La relación entre dos variables, X e Y , puede ser estudiada mediante una extensión de la entropía. La entropía conjunta permite medir la incertidumbre asociada a un conjunto de variables. Se define del siguiente modo:

$$H(X, Y) = - \sum_{i=1}^{N_x} \sum_{j=1}^{N_y} p_{xy}(i, j) \cdot \log_2 p_{xy}(i, j)$$

donde $p(x, y)$ es la probabilidad de que los valores j e i se observen conjuntamente en un bin N .

En teoría de la información, una variable proporciona información sobre otra cuando el conocimiento de la primera, en promedio, reduce la incertidumbre en la segunda (Cover y Thomas, 2006). La MI permite medir la dependencia entre las dos variables, concretamente, la información (en bins) obtenida de una variable mediante la observación de la otra y es por tanto considerada una medida de intercambio de información entre las poblaciones registradas. La MI entre dos variables X e Y se puede calcular de la siguiente manera:

$$MI(X, Y) = H(X) + H(Y) - H(X, Y)$$

donde X e Y representan las distribuciones de potencias de las señales. Para el cálculo de la MI, en primer lugar, mediante el análisis *wavelet*, las señales crudas se filtraron en frecuencia para aislar las bandas gamma bajo y gamma alto y de ahí se extrajo la distribución de potencias. Estos valores de potencia se estandarizaron empleando la medida *z-score*.

Estudio de la integración dinámica mediante el análisis del acoplamiento fase-amplitud

El cerebro constituye una red compleja compuesta por distintos nodos y conexiones en la que la información se procesa de forma paralela y especializada, por lo que precisa de mecanismos integradores de la información. Varias formas de sincronización entre oscilaciones de distinta frecuencia han sido descritas como mecanismos de integración de la información neural (Munia y Aviyente, 2019). Sin embargo, las oscilaciones de diferentes bandas de frecuencia no son independientes, sino que, en determinadas circunstancias, las oscilaciones interactúan. Dicha interacción de las oscilaciones entre bandas de distinta frecuencia se conoce como acoplamiento entre frecuencias (*cross-frequency coupling*, CFC) (Jensen, 2007). Pese a que se emplean distintos mecanismos, el acoplamiento fase-amplitud (*phase-amplitude coupling*, PAC) que consiste en el acoplamiento de la amplitud de las oscilaciones más rápidas a la fase de las oscilaciones electrofisiológicas más lentas es el tipo de acoplamiento de frecuencia cruzada más estudiado y se constituye un mecanismo capaz de permitir la integración o coordinación dinámica entre poblaciones neuronales (Fries, 2005). Cuando se da este acoplamiento, existe una relación de modulación entre distintas bandas de frecuencia (Canolty, 2006; Lisman, 2013).

El PAC se ha detectado en diferentes especies, en distintos tipos de registros electrofisiológicos, entre diferentes regiones y durante numerosos procesos cognitivos (atención, memoria y percepción visual entre otros). Así mismo, patrones alterados de este acoplamiento ha sido relacionado con diferentes patologías neuropsiquiátricas (Khan, 2013; Kirihara, 2012).

Una vez extraídos los valores de amplitud y de fase de las bandas de estudio, se pueden emplear distintos métodos para cuantificar el acoplamiento. Entre estos, la determinación de la longitud media del vector (*mean vector length*, MVL) es el método más sensible. El método MVL mide la longitud del vector promedio y calcula el PAC de la siguiente manera:

$$PAC(X, Y) = |n^{-1} \sum_{t=1}^n A_X(t) e^{i\varphi(t)}|$$

donde X representa la señal filtrada a la frecuencia más rápida e Y la señal filtrada a la frecuencia más lenta, t es vector tiempo unitario,

A la potencia de X para ese tiempo t y φ el ángulo en radianes de Y en el tiempo t .

En este estudio, en primer lugar, se filtraron las señales crudas en los rangos de frecuencia de interés, y a continuación, se extrajeron los valores de fase y amplitud empleando la transformada de Hilbert. Las fases fueron normalizadas en un rango de -2π a 2π radianes estableciendo el valor 0 como el valle de la oscilación. Finalmente se calculó el valor de la PAC normalizada, donde los valores oscilaron entre 0 (ausencia de acoplamiento fase-amplitud) a 1 (máximo nivel de acoplamiento).

El Interacción dinámica entre señales neurales: estudio de la causalidad

La dinámica de las señales es el reflejo de la conectividad específica entre los nodos que conforman las redes neuronales. Los métodos explicados con anterioridad no permiten conocer la direccionalidad del flujo de información existente entre dos series temporales registradas. Por esta razón, es preciso introducir una metodología que permita identificar el sentido del flujo de información y las dinámicas de retroalimentación entre las estructuras que conforman la red en los diferentes estados del registro.

Wiener en 1956, inició el estudio de las relaciones causales entre señales. En su trabajo, planteó la hipótesis de que una señal influye causalmente en otra cuando el conocimiento de valores anteriores de la primera mejora la predicción de la segunda. Posteriormente, Granger implementó esta idea y mediante el uso de modelos autorregresivos desarrolló el estudio de la causalidad, definida como habilidad de predecir valores en una serie temporal empleando valores pasados de otra serie temporal (Granger, 1969).

El análisis de causalidad de Granger se llevó a cabo empleando el modelado mediante múltiples vectores de autoregresión (*Multiple Vector Autoregressive*, MVAR). El acoplamiento temporal entre señales y el nivel de interacción se estudiaron empleando modelos autorregresivos (Granger, 1969; Seth, 2010).

Según este modelo, dadas dos señales, X_1 y X_2 , existe una relación de causalidad cuando, en un modelo de regresión lineal que incluye ambas series temporales, la inclusión de observaciones pasadas de X_2 reduce el error en la predicción de los valores de la serie temporal X_1 respecto a un modelo que solo incluya observaciones previas de X_1 . Para nuestro análisis, las dinámicas temporales de las dos series (con la misma longitud temporal, t) se pueden describir como un modelo de autorregresión bivariado:

$$X_1(t) = \sum_{j=1}^p A_{11,j} X_1(t-j) + \sum_{j=1}^p A_{12,j} X_2(t-j) + \xi_1(t)$$

$$X_2(t) = \sum_{j=1}^p A_{21,j} X_1(t-j) + \sum_{j=1}^p A_{22,j} X_2(t-j) + \zeta_2(t)$$

donde p es el máximo de observaciones retrasadas incluidas en el modelo, A es la matriz de coeficientes y ζ_1 y ζ_2 son los errores de predicción de cada serie temporal. Si el error ζ_1 disminuye con la inclusión de valores de X_2 en la primera ecuación diremos que X_2 es causa de X_1 . Si, por el contrario, ζ_2 disminuye al incluir los valores de X_1 en la segunda ecuación, podremos afirmar, en términos de causalidad de Granger, que X_1 es causa de X_2 .

El uso de la causalidad de Granger requiere que las señales formen parte de un proceso estacionario en covarianza, es decir, que la media y la varianza de las señales sean constantes en el tiempo. Dado que las señales bioeléctricas registradas se consideran no estacionarias, estas se fraccionaron permitiendo ser consideradas como señales estacionarias. Para determinar si los segmentos realmente cumplían el requisito de estacionalidad, se aplicaron las pruebas de Dickey-Fuller aumentada (ADF) y la de Kwiatkowski-Phillips-Schmidt-Shin (KPSS) (Seth 2010). La magnitud de la causalidad fue determinada de la siguiente manera:

$$C_{2 \rightarrow 1} = \ln \frac{\text{var}(\zeta_{1R(12)})}{\text{var}(\zeta_{1U})}$$

donde $2 \rightarrow 1$ indica la dirección del estudio de causalidad, $\zeta_{1R(12)}$ es el residuo o error obtenido al omitir A_{12} y ζ_{1U} deriva del modelo completo (Seth, 2010).

Para este trabajo, se estudiaron un total 10 segundos de los periodos basal y estimulación de cada estímulo. Estas ventanas totales fueron subdivididas en fragmentos de 2 segundos que se solaparon y posteriormente se estudió la causalidad en todas las combinaciones posibles entre las estructuras registradas.

Análisis estadístico

Los distintos análisis estadísticos, así como la representación gráfica de los resultados se realizó empleando el *software* R v.4.0.5 (PBC, Boston, EE.UU.) y el entorno de desarrollo R Studio v.1.4 (PBC, Boston, EE.UU.).

Los resultados de todos los métodos analíticos obtenidos en este bloque experimental se analizaron aplicando el mismo test estadístico. Dado que el tamaño muestral no cumplía las pautas relativas al tamaño de la muestra para las pruebas paramétricas, se aplicaron pruebas de análisis no paramétricos.

Para el análisis de cada sexo, dado que se compararon tres grupos dependientes (basal, estimulación y post-estimulación) se aplicó la prueba de Friedman con el test de Conover como post-hoc para comparaciones múltiples.

Para el estudio de las diferencias sexuales se realizó la prueba de U de Mann-Whitney para comparar dos grupos independientes con distribución no gaussiana junto con el post-hoc de Bonferroni. En todos los casos se estableció el umbral de significación al 95 % ($p < 0.05$).

3.2 ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA DEL NÚCLEO INCERTUS EN LA EXPRESIÓN DE C-FOS ENCEFÁLICA

3.2.1 *Sujetos experimentales*

Para el experimento de expresión de la proteína c-Fos se emplearon un total de 14 ratas macho albinas Wistar (Charles River Company, Barcelona, España) de entre 250 y 350 g de peso, de las cuales 5 formaron parte del grupo control y 9 del grupo estimulación. Los procedimientos experimentales se llevaron a cabo bajo el cumplimiento de la legislación vigente dictaminada por la directiva de la Unión Europea (2010/63/UE) y el Real Decreto (53/2013) para el uso y protección de animales de uso científico y con la aprobación previa por parte del Comité de Ética de la Universidad de Valencia (con número de procedimiento A20191121151842) y de la Dirección General de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Generalitat Valenciana (2019/VSC/PEA/305).

Al igual que en el estudio anterior, los animales fueron estabulados en el animalario de la Unidad Central de Investigación de la Facultad de Medicina (UCIM) hasta la fecha de experimentación, bajo unas condiciones de temperatura controlada (22 ± 2 °C), ciclo de luz-oscuridad regular de 12h, humedad del 55 ± 10 % y acceso a comida y bebida ad libitum.

Experimento	Condición	Animales
Estudio de la expresión de c-Fos encefálica	Sham	5
	Estimulación	9

3.2.2 *Expresión de c-Fos: regulación y patrón de expresión*

La activación intensa de las neuronas provoca la expresión inmediata de algunos genes, entre ellos *c-fos*. Este proto-oncogen se expresa en el interior celular de algunas neuronas cuando estas se despolarizan (Bullitt, 1990). Como todas las proteínas, es sintetizada en el citoplasma, pero luego regresa al núcleo donde se une a otra proteína, c-Jun, para formar la proteína activadora 1 (AP-1) que regulará la transcripción de otros genes relacionados con procesos cognitivos, motores y de aprendizaje y cuya expresión es tardía (Morgan et al., 1987; Da Silveira et al., 2007; Cruz et al., 2013). Estudios con roedores han mostrado que la exposición a distintos estímulos (miedo, olores

o estimulación eléctrica entre otros) provoca la expresión de c-Fos en distintas regiones del sistema nervioso central (Dragunow y Robertson, 1987; Luyck et al., 2020). En condiciones basales, y especialmente en condiciones de anestesia, los niveles detectables tanto de la proteína c-Fos como el ARNm que la codifica son muy bajos (Hughes et al., 1992). Este fenómeno sumado al amplio rango de estímulos que inducen su transcripción hacen de este gen una poderosa herramienta para el mapeo de la actividad neuronal (Kovacs, 1998).

La región reguladora de la expresión del gen contiene varios elementos regulados por vías de transducción de señales independientes. Estas vías de señalización pueden ser inducidas por factores neurotróficos, neurotransmisores, despolarización o aumento de la entrada de Ca^{2+} (Kovacs, 1998). El patrón de expresión de c-Fos ha sido ampliamente descrito, en el caso del ARNm el nivel máximo de expresión se alcanza entre los 30 y 60 minutos, por el contrario, si se miden los niveles de proteína c-Fos celular, aunque a los 30 minutos ya hay un incremento notable de los niveles de la proteína, no es hasta los 60-180 minutos cuando se alcanzan los niveles máximos de expresión (Chan et al., 1993; Ikeda et al., 1994; Barros, 2015). Los niveles de proteína van disminuyendo progresivamente entre las 4 y 6 horas posteriores al tratamiento.

Mediante el uso de técnicas inmunohistoquímicas se consigue marcar proteínas presentes en un tejido mediante el uso de anticuerpos. El uso de métodos indirectos permite la amplificación de la señal frente a los métodos directos, en estos casos el anticuerpo primario para el antígeno diana se une a este en un primer paso. Posteriormente, en un segundo paso, el uso de un anticuerpo secundario conjugado con moléculas de biotina permite amplificar la detección ya que este liga con el primario. A su vez, la señal es amplificada nuevamente gracias al uso del conjugado avidina-biotina (ABC), ya que incrementa los sitios de unión entre la enzima peroxidasa y el anticuerpo secundario amplificando la señal.

3.2.3 Metodología inmunohistoquímica

Anestesia

Para el desarrollo de este experimento, los métodos anestésicos empleados fueron los mismos descritos en el apartado de anestesia del punto 3.1.3. Para realizar los experimentos, se empleó una dosis intraperitoneal de uretano de entre 1.3 y 1.5 g/Kg (Sigma-Aldrich/Merk, Barcelona, España), preparado en suero salino fisiológico al 0.9 %. De manera complementaria para asegurar el nivel de anestesia, se administró lidocaína (0.5 % en suero salino, sin superar la dosis máxima de 10 mg/Kg) de forma tópica en el oído externo y en la zona de incisión para insensibilizar las zonas de sujeción y cirugía y mediante

inyección subcutánea se administraron 0.2 ml en distintos puntos para bloquear la sensibilidad craneal.

Procedimiento quirúrgico

Nuevamente, el procedimiento quirúrgico fue muy similar al realizado en el estudio de los efectos de la estimulación eléctrica del núcleo incertus en la actividad local de campo del circuito amigdalohipocámpico-prefrontal. En el caso de la cirugía, únicamente difiere en el número de electrodos implantados, en este estudio tan solo se insertó el electrodo de estimulación dado que el objetivo del estudio era cuantificar el nivel de expresión de c-Fos tras la estimulación de núcleo incertus y para ello era preciso mantener intactas las regiones que se registraron en el estudio anterior. Con el fin de evitar que la manipulación de los animales provocase expresión de c-Fos, esta fue realizada con sumo cuidado y sin superar los 15 minutos de duración.

Electrodo de estimulación

El electrodo de estimulación, situado en el núcleo incertus, se confeccionó de la misma forma que en el estudio anterior, a partir de cable de acero inoxidable de 120 μm de diámetro (AM Systems, Sequim, EE. UU) con aislamiento de teflón. El cable fue trenzado mediante el uso de dos pinzas hemostáticas de punta recta recubierta. La cobertura de teflón se eliminó de los extremos con un bisturí y con unas micropinzas y un pie de rey se separaron las puntas de estimulación con una distancia inferior a 1 mm.

Sacrificio y perfusión

Tras finalizar la cirugía de implantación, los animales recibieron el tratamiento determinado por el grupo experimental al que pertenecían. Los dos grupos que se establecieron fueron: machos con implantación sin estimulación eléctrica (control) y machos con implantación y estimulación eléctrica (estimulación). La implantación en el caso de los controles (*sham*) permitió restringir las diferencias observadas al efecto exclusivamente de la estimulación eléctrica. En el caso control, tras la implantación del electrodo se esperó 90 minutos para sacrificar al animal. Para el grupo estimulación, se empleó el mismo paradigma de estimulación que en el estudio electrofisiológico y con la misma duración que en los experimentos anteriores (60 minutos) y se esperó 30 minutos sin estimulación para realizar el sacrificio, para alcanzar la máxima expresión del gen c-Fos.

La perfusión y la preparación del encéfalo para posteriormente cortarlo y realizar la inmunohistoquímica se realizó siguiendo los mismos pasos que se detallan en el apartado de sacrificio y perfusión del estudio electrofisiológico. También se obtuvieron cinco series por cada ejemplar, de las que al menos en una de ellas se realizó el proceso de tinción con Giemsa para comprobar la localización del electrodo

de estimulación de manera que los ejemplares en los que el electrodo no alcanzó el núcleo fueron descartados del estudio. Nuevamente, las series que no se trataron en un periodo breve de tiempo posterior al corte, se almacenaron suspendidas en tampón fosfato salino con sacarosa al 30

Inmunohistoquímica para la detección de c-fos

El protocolo empleado para la detección inmunohistoquímica de la proteína c-Fos se realizó por el método ABC-DAB (Hsu et al., 1982), adaptando el protocolo de Valverde-Navarro (Valverde-Navarro et al., 1996).

En los casos en los que las muestras empleadas se encontraban almacenadas en el congelador a -40°C antes de comenzar el procedimiento se dejaron descongelar por completo en nevera, a una temperatura controlada de 4°C . El primer paso fue eliminar los restos del líquido de suspensión empleando un tampón TRIS salino (TBS pH 7.4), para ello se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno. A continuación, el tejido fue sometido a un proceso de reducción de la actividad de las peroxidasas endógenas con una solución de peróxido de oxígeno como sustrato enzimático. Para ello es necesario aumentar la permeabilidad de la membrana lipídica mediante el uso de un tensoactivo, por lo que los tejidos se sometieron a un baño de 30 minutos en TBS con 1 % de tritón X-100 (TBS-T) y 30 % H_2O_2 . Se eliminaron los restos de la reducción mediante lavados con TBS y posteriormente se realizó una preincubación de 120 minutos con una solución de TBS-T con albúmina de suero bobino (BSA) al 2 % y suero normal de cabra (NGS, Thermo Fisher, Massachusetts, EE.UU) al 3 % para bloquear las reacciones inespecíficas.

Transcurrido el tiempo, se realizó la hibridación con el anticuerpo primario, para ello, los cortes se sumergieron en una solución de TBS-T, NGS al 1.5 % y anticuerpo monoclonal recombinante Rabbit anti c-Fos (Synaptic Systems, Gotinga, Alemania) a 1:1000 de concentración. Las muestras se mantuvieron refrigeradas a 4°C en agitación durante 24 horas. Finalizada la primera incubación, se eliminaron los restos de anticuerpo realizando tres lavados con TBS y se preparó el medio para la segunda incubación. En este caso, se empleó TBS-T con anti-IgG de conejo biotilado (Thermo Fisher, Massachusetts, EE.UU) a una concentración de 1:200 y se mantuvieron los cortes suspendidos en agitación a temperatura ambiente durante 120 minutos.

Tras eliminar los restos del anticuerpo secundario, los cortes se incubaron durante 90 minutos con el complejo avidina-biotina (ABC, PK4000 Vectastain ABC Kit ©, Abcam) siguiendo las indicaciones comerciales. Finalmente, para el revelado, se preparó una disolución de 25 ml TRIS con una alícuota de diaminobencidina (DAB) y 5 μL de H_2O_2 al 30 %. Las secciones se sumergieron en esa dilución durante 10 a 30 minutos hasta que la saturación del color fue la deseada.

Para parar la reacción de revelado se lavaron los cortes con TRIS y posteriormente con TBS.

Para facilitar que el medio de suspensión alcanzase todas las secciones de tejido, todos los lavados y baños se realizaron en agitación. Los distintos pasos se realizaron a temperatura ambiente, salvo en los casos en los que se especifica la temperatura concreta.

El montaje de los cortes se realizó sobre portaobjetos gelatinizados al igual que en la verificación histológica, luego se realizó una batería de deshidratación similar a la realizada en el proceso de verificación y finalmente se cubrieron los portaobjetos.

Adquisición de imágenes

Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio óptico (Axioscope A1, Zeiss Microscopy) y una cámara refrigerada de alta resolución acoplada al mismo (Axiocam MRC, Carl Zeiss). Se empleó el software Zen (Zeiss Microscopy) para la visualización digital y posterior captura.

Una vez determinadas las regiones de interés para el estudio, estas fueron localizadas en los cortes con la ayuda del atlas de rata (Paxinos y Watson, 2015). El siguiente paso fue realizar la captura de las imágenes. Las fotografías fueron realizadas con los objetivos de 5 y 10 aumentos en función del tamaño de la estructura y almacenadas en formato TIFF. Posteriormente, las imágenes se procesaron empleando el *software* Fiji (versión: 2.1.0 153i, ImageJ) para el recuento celular y el *software* de edición de imágenes Adobe Photoshop (Adobe Photoshop CS, 2020, Berkeley, EE.UU) para realizar el montaje y superposición de las imágenes seleccionadas como representativas que se muestran en el apartado de resultados.

3.2.4 *Análisis de resultados*

Recuento celular

Previamente a la realización del recuento, las imágenes fueron tratadas mediante el uso del *software* Fiji (versión: 2.1.0 153i, ImageJ) para, en cierta medida estandarizar todas las imágenes que se iban a analizar. Para ello, se equilibró el contraste al 1 % y se estableció un valor de iluminancia gamma que osciló entre 0.5 y 0.6. A continuación, dado que todas las imágenes tienen cierto nivel de ruido de fondo, se aplicaron métodos de suavizado de la imagen que permitieron la eliminación del ruido para evitar que durante el recuento fuese identificado como células inmunorreactivas que se incluyesen erróneamente en el recuento total. Para ello, se aplicó un filtro gaussiano de 120 grados y el resultado, que es una imagen desenfocada en la que no se distinguen las células, se restó a la imagen original para eliminar el ruido de fondo, pero no distorsionar las células marcadas.

Una vez estandarizadas las imágenes, se transformaron a escala colorimétrica binaria, ya que así lo requiere la herramienta de recuento del *software* Fiji/ImageJ. Posteriormente, y para diferenciar las células que estaban en contacto, se aplicó un filtro para detectar los bordes celulares y separa las células para que en el recuento se detectasen como unidades diferenciadas.

Debido a que el tamaño de las regiones cerebrales varía entre individuos, para estandarizar el área de recuento se emplearon marcos de recuento de 100, 200 y 500 μm^2 , la elección del marco fue determinada por el tamaño del núcleo de análisis. El recuento en todos los casos fue realizado en el hemisferio derecho, puesto que en el estudio anterior los registros habían sido realizados en este hemisferio. Finalmente se realizó el recuento de las células inmunorreactivas estableciendo una medida de circularidad que varió entre el 0.7 y 1.0 (Vila-Merkle, 2022).

El marcaje mostró niveles variables de inmunoreactividad entre ejemplares e incluso en el mismo ejemplar, observándose diferentes niveles de opacidad y saturación del color. Por este motivo se estableció la opacidad del marcaje como criterio de inclusión para el análisis, considerando la reacción inmunohistoquímica como positiva en aquellos casos en los que las células marcadas tuviesen un alto grado de opacidad.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico del recuento inmunoreactivo y para la representación gráfica de los resultados se realizó empleando el *software* R v.4.0.5 (PBC, Boston, EE.UU) y el entorno de desarrollo R Studio v.1.4 (PBC, Boston, EE.UU).

Dado que el tamaño muestral no cumplía las pautas relativas al tamaño de la muestra para las pruebas paramétricas, se aplicaron pruebas de análisis no paramétricos. Para este estudio se compararon dos grupos independientes de muestras, el grupo machos-control con el grupo machos-estimulación por lo que se realizó la prueba de U de Mann-Whitney (también conocida como Mann-Whitney-Wilcoxon), que es empleada prueba alternativa a la t de Student para comparar dos grupos independientes con distribución no gaussiana. Se estableció el umbral de significación al 95 % ($p < 0.05$).

RESULTADOS

En este apartado se exponen los resultados obtenidos a partir del estudio de la actividad electrofisiológica del circuito amígdalo-hipocámpico-prefrontal en condiciones basales y durante la estimulación eléctrica del NI así como los resultados obtenidos a partir del estudio de la expresión protooncogén *c-fos* en varias estructuras corticales y subcorticales relacionadas con el circuito anteriormente mencionado. A continuación, se detallan los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral.

4.1 RESULTADOS I: ESTUDIO ELECTROFISIOLÓGICO DE LA ACTIVIDAD INDUCIDA POR LA ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA DEL NÚCLEO INCERTUS

4.1.1 *Variaciones en el patrón oscilatorio de los componentes del circuito amígdalo-hipocámpico-prefrontal inducidos por la estimulación eléctrica de NI*

En una aproximación inicial por determinar el efecto de la estimulación eléctrica se segmentó la señal cruda para delimitar las ventanas de interés que incluían los 10 segundos anteriores al inicio de la estimulación, 10 segundos de estimulación y 10 segundos posteriores al fin del estímulo. De este modo, generamos una ventana de 30 segundos por cada estímulo que posteriormente fue promediada para obtener la señal cruda promedio que nos permitió observar los cambios generales sobre el patrón oscilatorio de las regiones estudiadas.

La representación promedio de la onda cruda mostró una disminución de las ondas lentas y aumento de las rápidas durante la estimulación, tanto en machos como en hembras, siendo este cambio más notable en los machos y además siendo este cambio generalizado en todos los canales registrados. Así mismo, las señales promedio evidenciaban que tras el periodo de estimulación las regiones registradas no recuperan inmediatamente su actividad basal, lo que permitió determinar que era necesario al menos dejar 2 minutos de reposo entre estímulos para recuperar niveles similares a la actividad basal.

Para una caracterización más objetiva, se emplearon espectrogramas a partir de las señales promedio. De una forma más intuitiva, el

espectrograma *wavelet* nos permite observar la evolución temporal y de la potencia para las distintas frecuencias representadas. A continuación, se muestran las señales crudas promediadas para un ejemplar representativo de cada sexo (Figuras 20 y 22) y sus espectrogramas *wavelet* (Figuras 21 y 23).

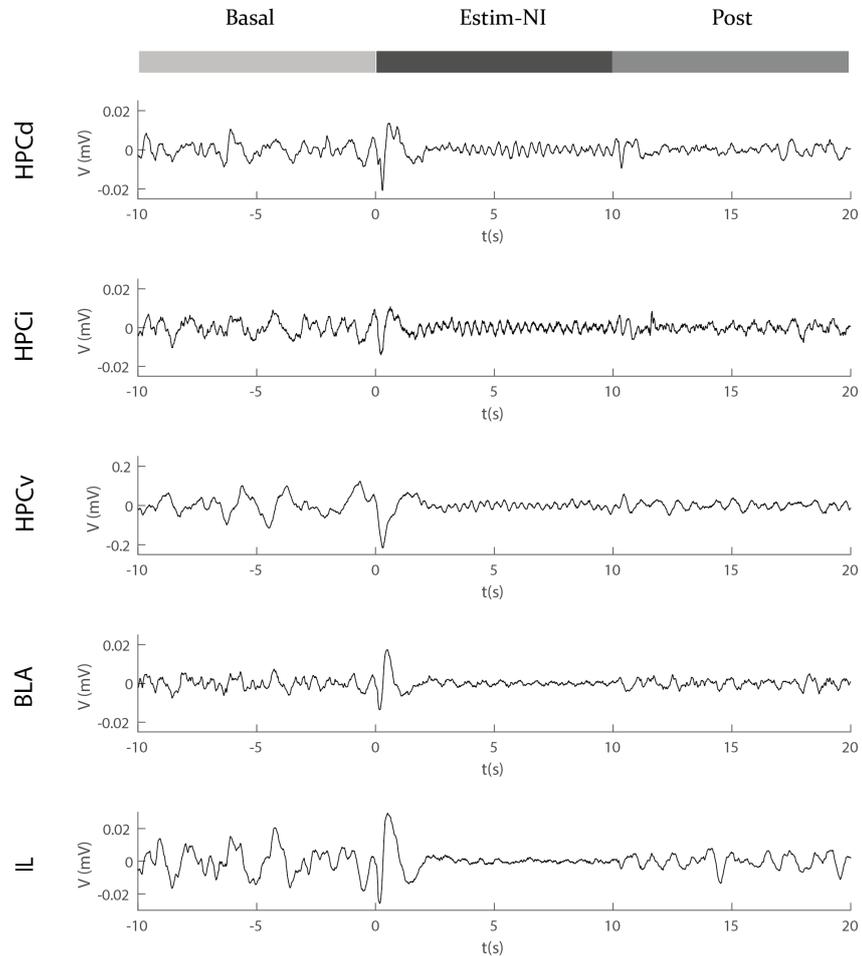


Figura 20: Señal promedio de un ejemplar macho representativo. La señal se corresponde con la actividad media obtenida a partir de todos los estímulos realizados sobre un mismo ejemplar. La media se ha calculado en un periodo que abarca desde 10 s previos al estímulo hasta los 10 s posteriores al final del estímulo. Durante el periodo de la estimulación se puede observar cómo cambia el patrón oscilatorio pasando de ser un perfil lento y de mayor amplitud a otro más rápido y de menor amplitud. En el periodo post-estímulo, el perfil de la onda media comienza a ralentizarse, pero sin recuperar la actividad previa al estímulo. BLA: amígdala basolateral; HPCd: hipocampo dorsal; HPCi: hipocampo intermedio; HPCv: hipocampo ventral; IL: corteza infralímbica.

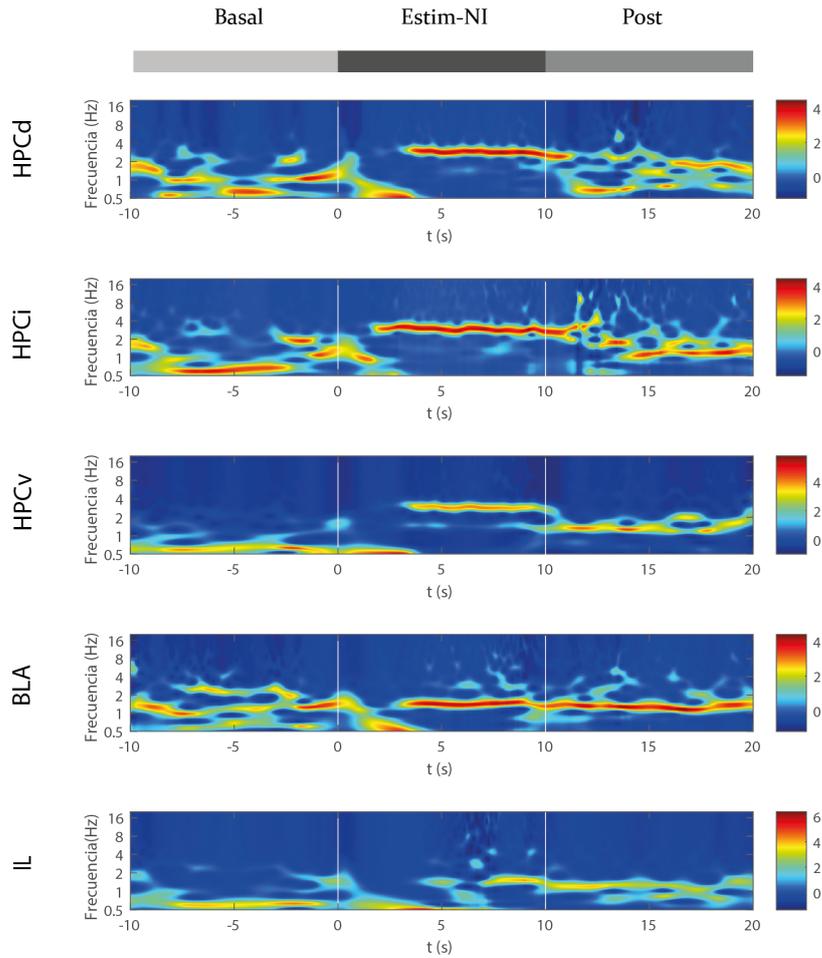


Figura 21: Perfil oscilatorio promedio de un ejemplar macho representativo. Los espectrogramas corresponden a la actividad media obtenida a partir de todos los estímulos realizados sobre un mismo ejemplar mostrados en la Figura 20. Las líneas verticales blancas delimitan el inicio y el fin de la estimulación eléctrica. En todos los canales, la actividad basal se sitúa por debajo de 4 Hz, con breves periodos más rápidos en hipocampo y amígdala. La estimulación hace desaparecer la actividad lenta especialmente en esos canales e induce la aparición de actividad en el rango theta en hipocampo y delta en amígdala y corteza infralímbica. BLA: amígdala basolateral; HPCd: hipocampo dorsal; HPCi: hipocampo intermedio; HPCv: hipocampo ventral; IL: corteza infralímbica.

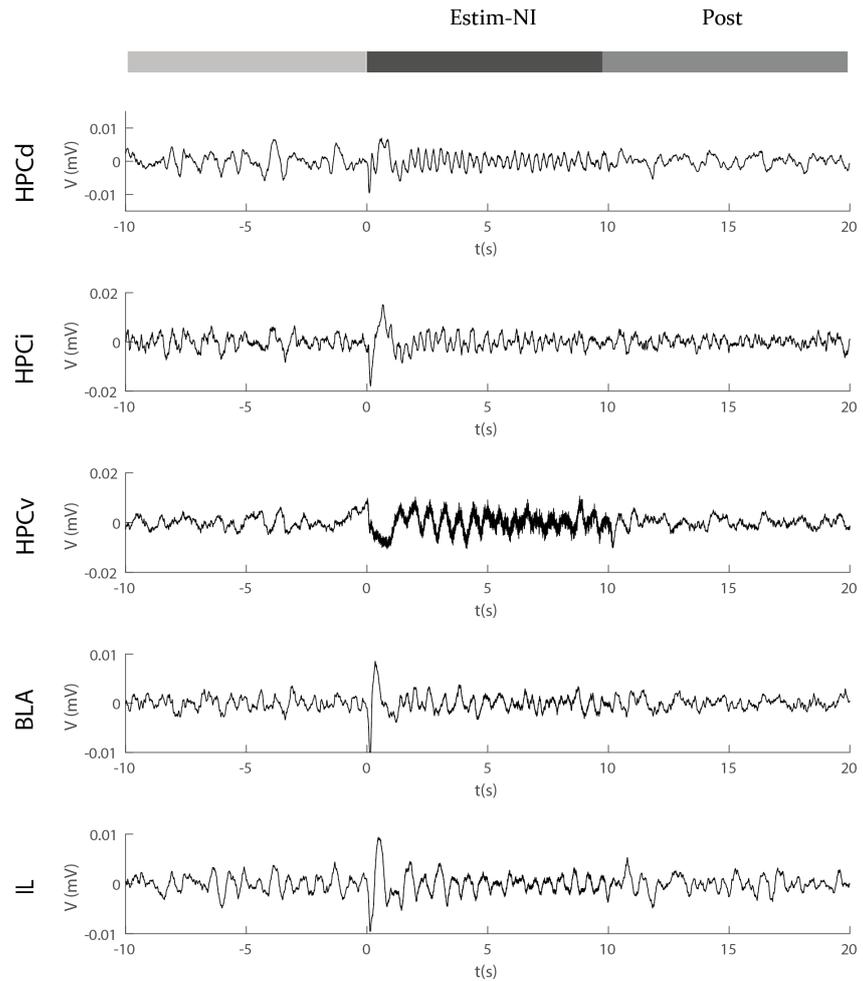


Figura 22: Señal promedio de un ejemplar hembra representativo. Para la obtención de la señal promedio nuevamente se han extraído las señales crudas de los diferentes estímulos aplicados a un mismo ejemplar y se han promediado. En todos los canales se observa como el perfil oscilatorio incrementa su velocidad con respecto al periodo basal. Sin embargo, en este caso, durante el periodo basal no se observa un perfil tan lento como en el ejemplar macho. BLA: amígdala basolateral; HPCd: hipocampo dorsal; HPCi: hipocampo intermedio; HPCv: hipocampo ventral; IL: corteza infralímbica.

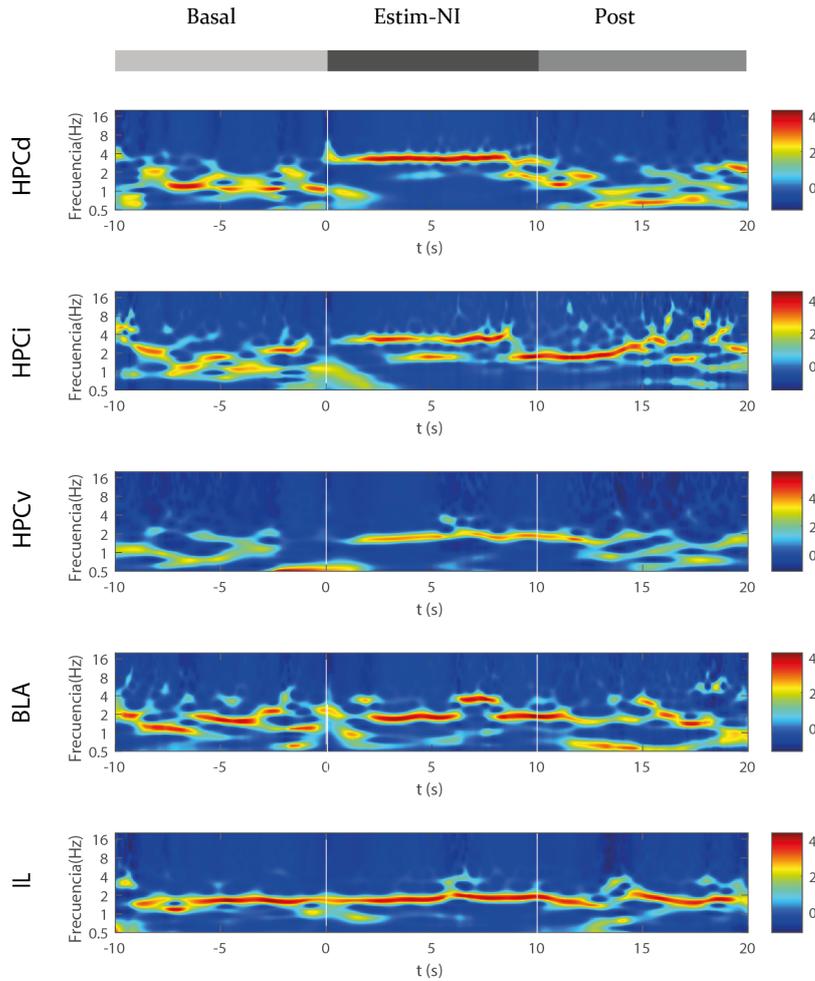


Figura 23: Perfil oscilatorio promedio de un ejemplar hembra representativo. La señal se corresponde con la actividad media obtenida a partir de todos los estímulos realizados sobre un mismo ejemplar. La estimulación induce un aumento de frecuencias. En el periodo post-estímulo, la actividad basal se recupera parcialmente. BLA: amígdala basolateral; HPCd: hipocampo dorsal; HPCi: hipocampo intermedio; HPCv: hipocampo ventral; IL: corteza infralímbica.

4.1.2 Frecuencia dominante

Una primera aproximación para objetivar los cambios oscilatorios que se producen en las regiones de registro es la extracción de la frecuencia dominante, para lo que empleamos la FFT, que permite descomponer la señal cruda en sus componentes y así poder estudiar independientemente las bandas de frecuencia de interés. El análisis se realizó en las tres ventanas de interés para cada estímulo: una perteneciente al periodo basal, otra representativa del periodo estimulación y finalmente otra extraída del periodo posterior a la estimulación. Los resultados mostraron un incremento de la frecuencia pico tanto en machos como en hembras, aunque con ciertas diferencias.

En el caso de los machos, en todos los canales, la frecuencia pico basal se situó alrededor de 1 Hz, y el aumento fue generalizado en

todos los canales registrados al comparar el periodo de estimulación con el periodo basal, con una diferencia estadística muy significativa. En el caso de las regiones del hipocampo, en los tres canales registrados, la frecuencia pico pasó de estar en el rango de oscilaciones lentas durante el basal a aumentar a frecuencia de rango theta durante el estímulo, más rápida cuanto más dorsal, desde 2.551 ± 0.234 Hz en HPCv hasta 3.694 ± 0.156 en HPCd. El incremento de la frecuencia pico resultó también muy significativo en el caso de BLA e IL, no obstante, en estas dos regiones el pico no traspasó el rango de oscilación delta, alrededor de 1.5 Hz, por lo que no llegó a alcanzar ritmo theta. En prácticamente todos los canales registrados, a excepción de HPCv, el incremento de la frecuencia pico se redujo tras el cese de la estimulación, pero sin volver completamente a los niveles basales durante los primeros segundos tras finalizar la estimulación, ya que mostró diferencias significativas o tendencia estadística entre el periodo posterior y el basal. Únicamente en el caso de HPCd se observaron diferencias significativas entre el periodo de estimulación y el posterior ($p < 0.001$). En la Tabla 2 y en la Figura 24 se muestran los resultados estadísticos de la frecuencia dominante en machos.

Tabla 2: Frecuencia pico en machos

Periodo	HPCd	HPCi	HPCv	BLA	IL
Basal	1.071 ± 0.039	1.001 ± 0.048	0.898 ± 0.063	1.072 ± 0.042	0.913 ± 0.040
Estimulación	<u>$3.694 \pm 0.156^{***}$</u>	<u>$3.052 \pm 0.243^{***}$</u>	<u>$2.551 \pm 0.234^{**}$</u>	<u>$1.623 \pm 0.057^{***}$</u>	<u>$1.531 \pm 0.133^{**}$</u>
Post	<u>$1.792 \pm 0.162 \dagger$</u>	<u>$2.097 \pm 0.154 \dagger$</u>	<u>1.261 ± 0.107</u>	<u>$1.525 \pm 0.119^{***}$</u>	<u>$1.342 \pm 0.090^*$</u>

*Nota: Media \pm error estándar. Significación estadística en la comparación por pares del periodo basal con los periodos estimulación y post: *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, † $p < 0.08$. Se subrayan los casos en los que existen diferencias significativas entre el periodo estimulación y el post.

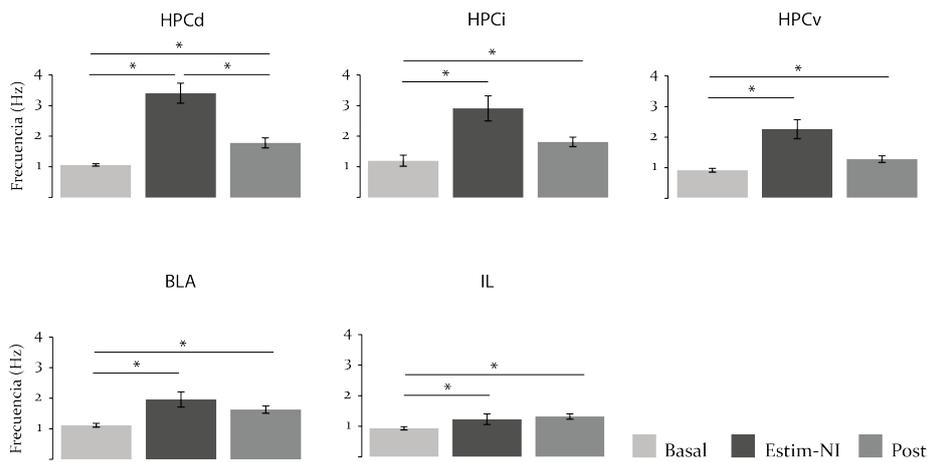


Figura 24: Resultados estadísticos del análisis de la frecuencia pico en machos. La estimulación eléctrica de NI induce un incremento significativo de la frecuencia dominante en todos los canales registrados. En todos los canales, durante el periodo basal la frecuencia pico estaba en el rango de onda lenta, alrededor de 1 Hz, mientras que durante la estimulación, en HPCd, HPCi e HPv alcanza valores propios de la actividad theta, más alta cuanto más dorsal es la región. Sin embargo, IL y BLA si bien muestran un aumento significativo de la frecuencia dominante con respecto al basal, no alcanzan el rango de theta, sino de delta. Adicionalmente, en HPCd existen diferencias significativas entre el periodo estimulación y el posterior, lo que sugiere que la recuperación de la actividad basal podría darse en primer lugar en HPCd mientras que el resto de regiones recuperan su actividad basal de forma más paulatina. * significación estadística en la comparación por pares del basal-estimulación. Los datos de significación pueden observarse en la Tabla 2. BLA: amígdala basolateral; HPCd: hipocampo dorsal; HPCi: hipocampo intermedio; HPCv: hipocampo ventral; IL: corteza infralímbica.

En los resultados obtenidos del análisis realizado en hembras, durante el periodo basal la frecuencia pico se localizó igualmente en rango de ondas lentas. En este caso, observamos que la estimulación de NI también indujo un aumento en la frecuencia dominante en las tres regiones de hipocampo registradas. Sin embargo, estas frecuencias son más bajas que en caso de los machos, no llegando a alcanzar el rango de frecuencia theta sino delta, siendo esta diferencia significativa en el caso de HPCd. También, a diferencia del grupo de machos, en el caso de las regiones BLA e IL, no se observaron diferencias significativas. En el caso de BLA, la variabilidad encontrada fue superior al grupo de machos. Al igual que ocurría con los machos, no hay diferencias significativas entre el estímulo y el periodo posterior, pero sí entre el periodo basal y el posterior. En este caso, en hipocampo, el efecto de la estimulación perdura tras el cese del estímulo, y en BLA e IL parece alcanzarse algo más tarde. Los resultados detallados con la significación estadística respecto al basal se muestran en la tabla 3 y se representan en la Figura 25.

Tabla 3: Frecuencia pico en hembras

Periodo	HPCd	HPCi	HPCv	BLA	IL
Basal	0.991±0.108	1.092±0.100	0.777±0.048	1.086±0.104	1.013±0.108
Estimulación	2.328± 0.203*	2.040±0.183*	1.942±0.230*	1.522±0.083	1.418±0.094
Post	1.819±0.241*	1.973±1.973±0.225 †	1.321±0.149	1.618±0.052 †	1.516±0.086*

*Nota: Media±error estándar. Significación estadística en la comparación por pares del periodo estimulación respecto al periodo basal: *p<0.05, † p<0.08. En negrita se muestran los casos en los que hay diferencias significativas entre machos y hembras.

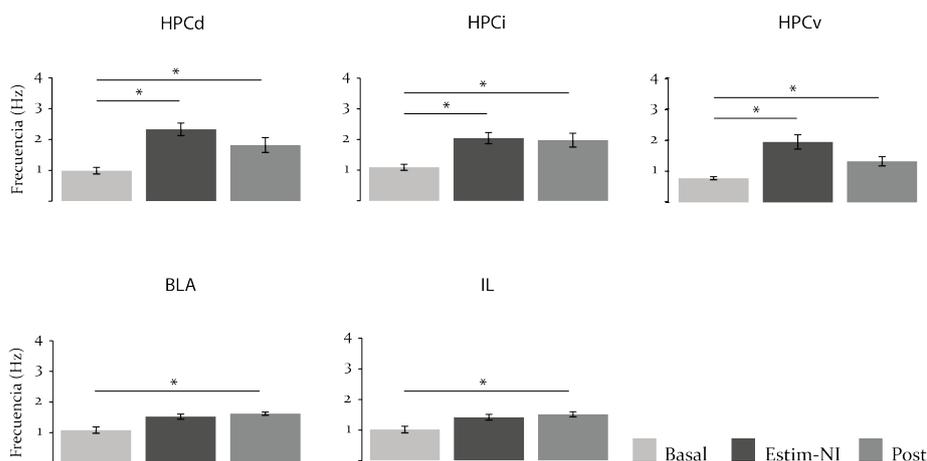


Figura 25: Resultados estadísticos del análisis de la frecuencia pico en hembras. En este caso, la estimulación eléctrica de NI incrementa la frecuencia dominante de las tres regiones de hipocampo registradas, en rango delta. En las regiones BLA e IL, pese a observarse un incremento de la frecuencia, no alcanza frecuencias theta, sin alcanzar significación estadística. El * indica significación estadística en la comparación por pares. BLA: amígdala basolateral; HPCd: hipocampo dorsal; HPCi: hipocampo intermedio; HPCv: hipocampo ventral; IL: corteza infralímbica.

El análisis estadístico de comparación por pares entre las frecuencias dominantes de machos y hembras para cada canal y cada periodo sólo mostró diferencias significativas en la respuesta de HPCd a la estimulación ($p < 0.05$). En la Figura 26 se representan las medias junto con el error estándar para cada canal y periodo, así como la significación estadística.

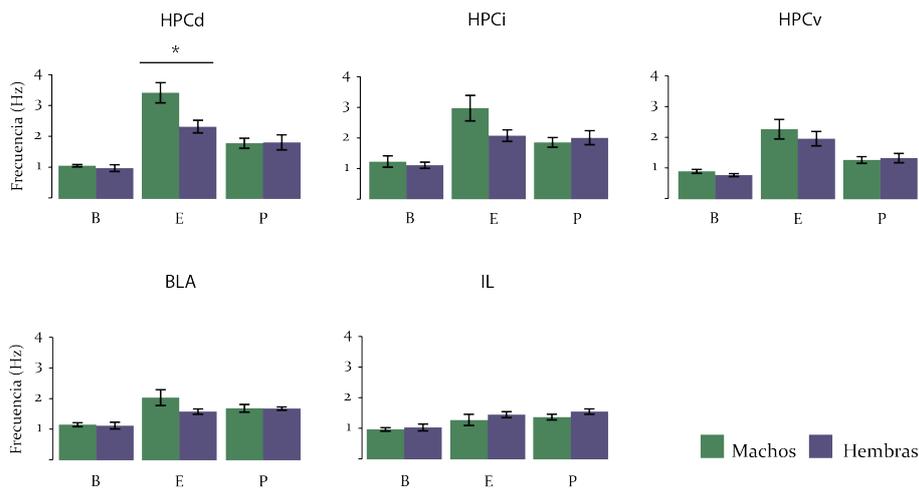


Figura 26: Resultados estadísticos de la comparación de la frecuencia dominante entre machos y hembras. En las regiones hipocámpicas así como en BLA, pese a que las hembras parecen alcanzar una frecuencia pico menor que los machos con la estimulación de NI, tan solo se observan diferencias significativas en HPCd durante el periodo estimulación (E). Los asteriscos denotan el grado de significación estadística en las comparaciones por pares entre sexos ($*p < 0.05$). BLA: amígdala basolateral; HPCd: hipocampo dorsal; HPCi: hipocampo intermedio; HPCv: hipocampo ventral; IL: corteza infralímbica; B: periodo basal; E: periodo estimulación; P: periodo post estimulación.

4.1.3 Análisis de las potencias relativas

El uso de la FFT nos permitió además estudiar la potencia relativa de cada una de las distintas bandas de frecuencia. El estado basal se caracterizó por un predominio claro de las ondas lentas, características del estado de anestesia. En el estudio realizado sobre los machos pudimos observar que durante la aplicación del estímulo en todos los canales se produjo una disminución significativa de la potencia relativa de la banda de ondas lentas y un incremento de las potencias tanto de theta bajo como theta alto. En caso de (este último a excepción de HPCi cuyo incremento no llegó a ser significativo). Este cambio también se observó en frecuencias más rápidas, con aumentos significativos de la actividad a frecuencia alpha, delta, gamma medio y gamma bajo. En la mayoría de los casos, el periodo post-estimulación mostró una recuperación parcial, sin regresar completamente al estado basal. Los resultados se pueden observar en las Figuras 27 y 28, y los resultados estadísticos detallados en la Tabla 10 localizada en el apartado de Anexos.

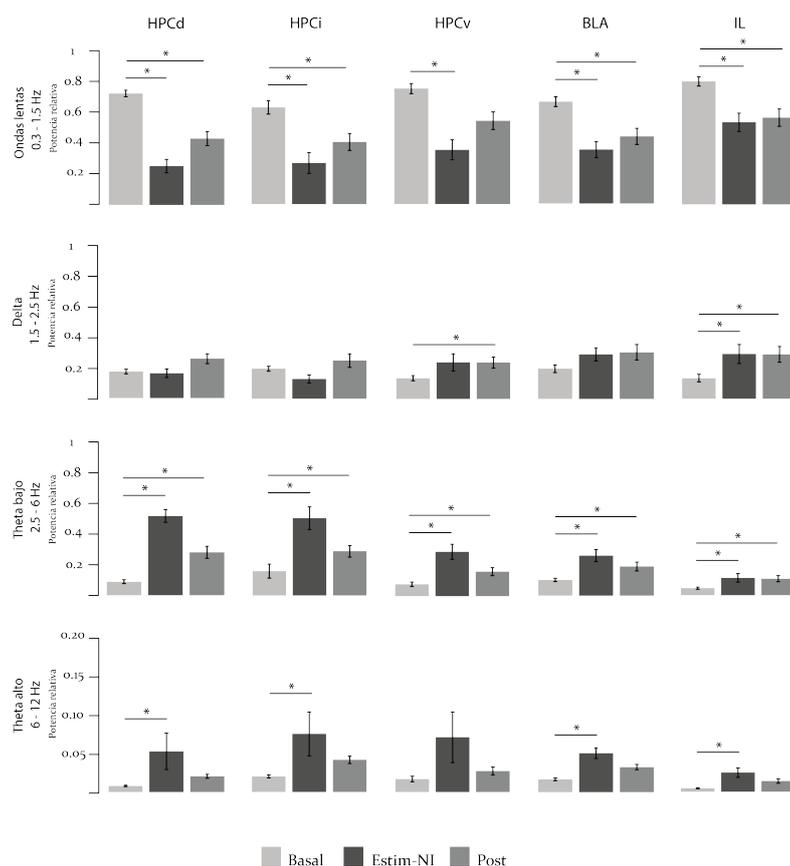


Figura 27: Análisis de la potencia relativa en machos (I). Se muestran los resultados estadísticos para las bandas de frecuencias de ondas lentas, delta, theta bajo y theta alto en las cinco estructuras registradas y para los tres periodos de análisis. En el caso de las ondas lentas, la potencia relativa de la banda disminuye significativamente en los cinco canales registrados, y en ninguno de los casos se recupera la actividad basal completamente al finalizar el estímulo. En los resultados de la banda theta bajo, se observa un efecto de la estimulación contrario al que ejerce sobre las ondas lentas, ya que, en este caso, la potencia relativa de la banda aumenta significativamente con respecto al periodo basal en todas las regiones registradas, más marcado en HPCd e HPCi. También se observa un aumento significativo en el caso de la banda theta alto en todos los canales, a excepción de HPCi que muestra mayor variabilidad. En el caso de la potencia de la onda delta no observan diferencias significativas. * indica significación estadística en la comparación por pares. BLA: amígdala basolateral; HPCd: hipocampo dorsal; HPCi: hipocampo intermedio; HPCv: hipocampo ventral; IL: corteza infralímbica.

Los resultados de las bandas más rápidas muestran un aumento generalizado en todos los canales de la potencia relativa de gamma bajo y medio (Figura 27). En el caso de la actividad entre 12-30 Hz, experimenta un aumento de la potencia significativo en todas las regiones menos en HPCi, y más marcado en HPCv y BLA respecto de su actividad basal. La comparación por pares entre el periodo basal y el posterior, nuevamente muestra una prolongación del efecto de la estimulación sobre los distintos ritmos cerebrales estudiados. En la Tabla 10, localizada en el apartado de Anexos se encuentran los resultados estadísticos y los valores de significación específicos para cada comparativa.

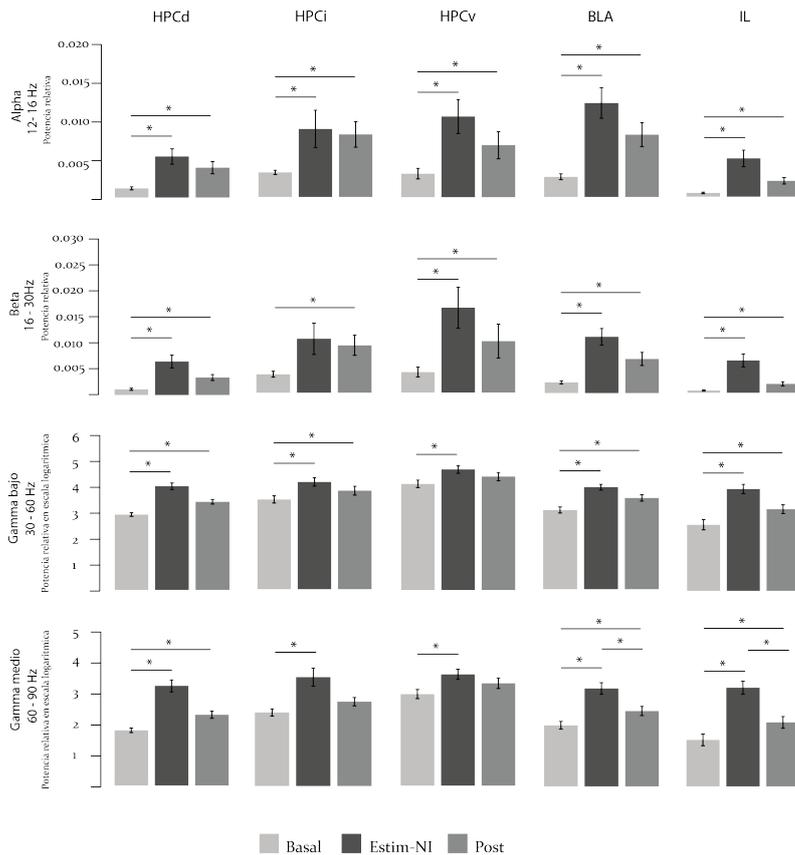


Figura 28: Análisis de la potencia relativa en machos (II). En este caso se muestran los resultados estadísticos para frecuencias más rápidas, entre 12-90 Hz. La actividad entre 12-30 Hz muestra un incremento significativo durante la estimulación con respecto al periodo basal en todos los canales a excepción de HPCi, el cual nuevamente muestra bastante variabilidad. Tanto el gamma bajo como medio presenta un aumento significativo de la potencia relativa durante el periodo estimulación. Nótese que, pese a que en el periodo posterior a la estimulación se observa una disminución de la potencia relativa de todas las frecuencias y en todos los canales, este no es en ningún caso significativo en la comparación por pares con el periodo de estimulación, a excepción de gamma medio en BLA e IL. Cabe mencionar, que las potencias relativas de las frecuencias gamma bajo y gamma medio están representadas en escala logarítmica. * indica significación estadística en la comparación por pares. BLA: amígdala basolateral; HPCd: hipocampo dorsal; HPCi: hipocampo intermedio; HPCv: hipocampo ventral; IL: corteza infralímbica.

En el estudio de la potencia relativa de las hembras, pudimos observar una disminución de la potencia de ondas lentas en todos los canales registrados. La actividad delta no experimenta cambios estadísticamente significativos. En el caso de la frecuencia theta, se produjo un aumento durante el periodo estimulación en las tres regiones de hipocampo estudiadas, tanto en el caso de theta bajo como alto, pero no resultó significativo en BLA ni en IL. El efecto sobre la frecuencia theta bajo fue mayor en las regiones más dorsales que en HPCv. Los efectos comenzaron a revertirse en la mayoría de los casos al final de la estimulación, sin recuperar los valores basales. En cuanto las frecuencias más rápidas, el resultado del análisis estadístico mostró un incremento significativo de la potencia relativa en todas las bandas entre 12-90 Hz durante la estimulación eléctrica, pese a que se encontró una mayor variabilidad. Estos efectos se revirtieron parcialmente

tras el fin del estímulo eléctrico, manteniendo diferencias significativas entre el basal y el periodo post-estimulación. Como excepción, la actividad Alpha mostró valores aún más elevados en el periodo posterior, aunque con gran variabilidad. Los resultados estadísticos se muestran en las Figuras 29 y 30 y se encuentran detallados con el grado de significación de cada comparativa en la Tabla 11 incluida en el apartado Anexos.

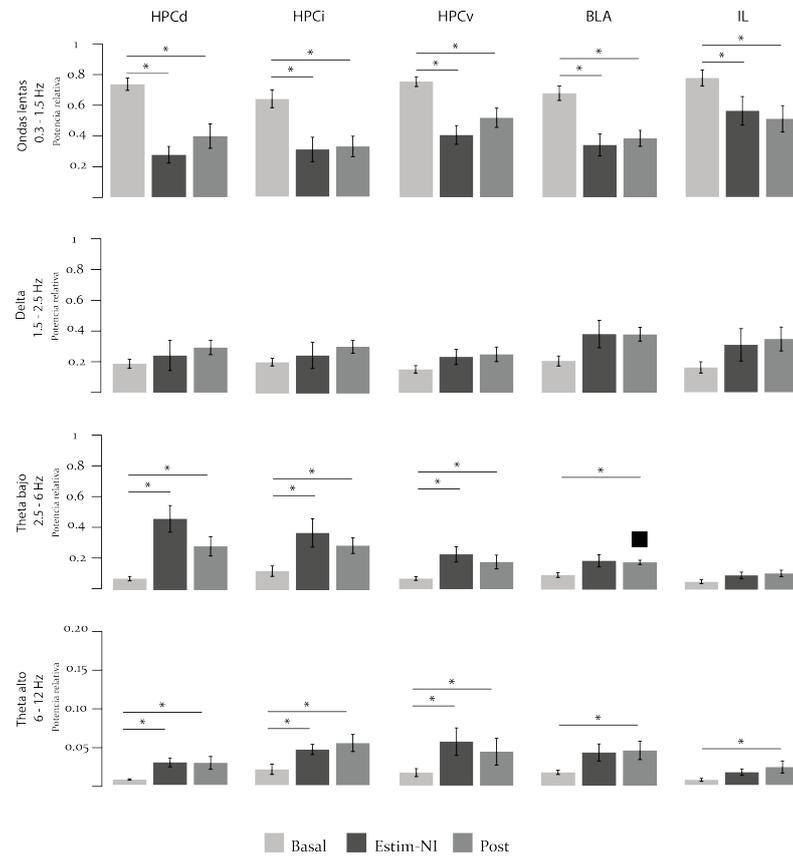


Figura 29: Análisis de la potencia relativa en hembras (I). Los resultados del análisis de la potencia relativa muestran que una disminución significativa de la potencia de las ondas lentas en todos los canales registrados. En cambio, en el análisis de la frecuencia theta, el incremento durante la estimulación es significativo en todas las regiones del hipocampo estudiadas, sin alcanzar valores significativos en BLA ni IL. El * indica significación estadística en la comparación por pares. BLA: amígdala basolateral; HPCd: hipocampo dorsal; HPCi: hipocampo intermedio; HPCv: hipocampo ventral; IL: corteza infralímbica.

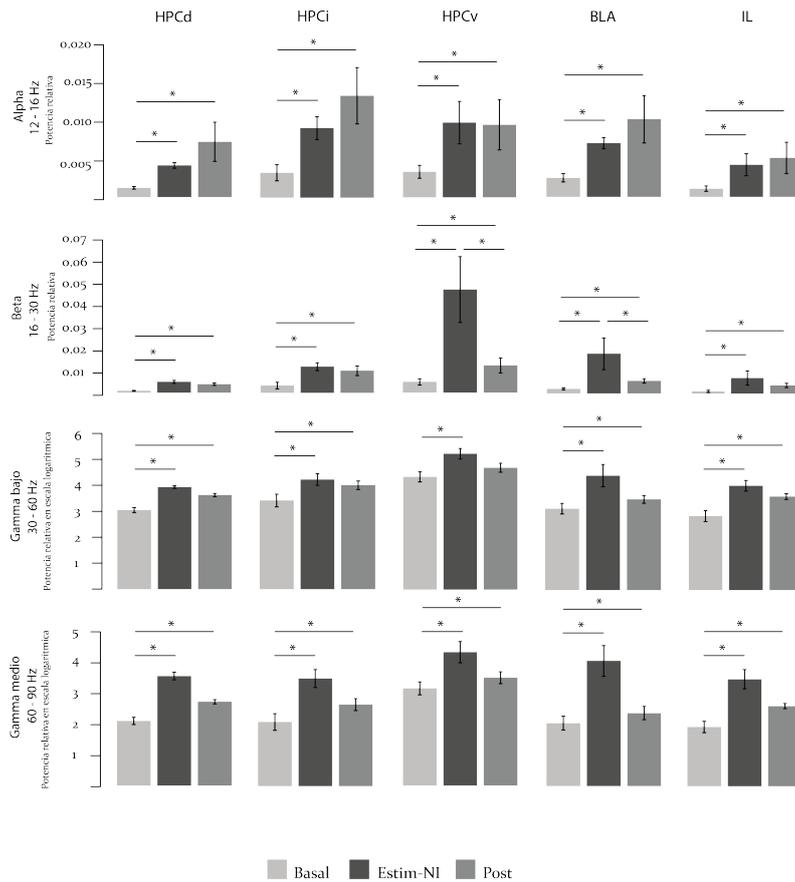


Figura 30: Análisis de la potencia relativa en hembras (II). En este caso se muestra el análisis de las variaciones de la potencia relativa de las bandas alpha, delta, gamma bajo y gamma medio. El análisis de la actividad entre 12-16 Hz, la estimulación induce el incremento de la su potencia relativa y este efecto se mantiene posteriormente, aunque con gran variabilidad. Se observa que en el caso de las ondas beta hay un incremento significativo durante el estímulo en todas las regiones registradas y durante el periodo posterior la potencia va decreciendo, pero sin alcanzar los niveles basales. También hay un aumento de las potencias relativas de las ondas más rápidas, gamma bajo y medio, durante la estimulación. Debido a la baja potencia que caracteriza a las ondas más rápidas, los dos rangos de la onda gamma están representados en escala logarítmica. El * indica significación estadística en la comparación por pares. BLA: amígdala basolateral; HPCd: hipocampo dorsal; HPCi: hipocampo intermedio; HPCv: hipocampo ventral; IL: corteza infralímbica.

En la comparación por pares entre sexos únicamente observamos diferencias estadísticamente significativas en la potencia relativa de gamma bajo de HPCv durante el periodo de estimulación ($p < 0.05$). Estas comparaciones se muestran en la Figura 31 y se han incluido en la Tabla 11 de los Anexos.

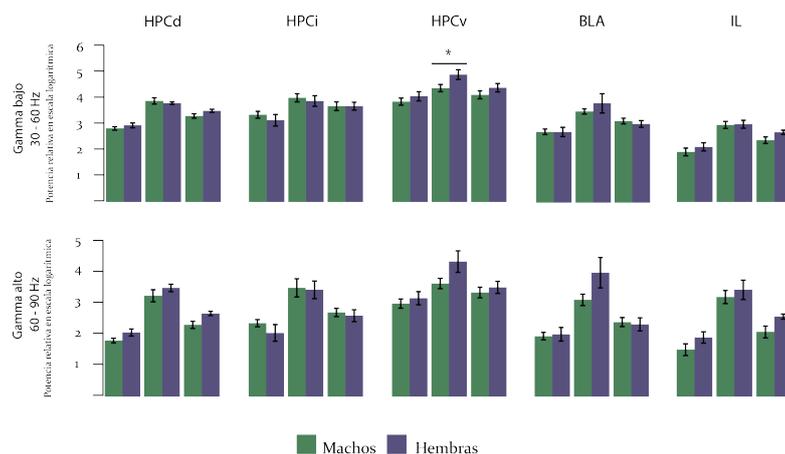


Figura 31: Comparación por sexos de la potencia relativa de la frecuencia gamma. Los resultados de la comparación por pares entre machos y hembras para las frecuencias gamma bajo y gamma medio muestran que no hay diferencias entre los sexos a excepción de HPCv durante el periodo estimulación, siendo en este caso, el valor de la potencia relativa de gamma bajo significativamente superior en hembras. Los asteriscos denotan el grado de significación estadística en las comparaciones por pares entre sexos ($*p < 0.05$). BLA: amígdala basolateral; HPCd: hipocampo dorsal; HPCi: hipocampo intermedio; HPCv: hipocampo ventral; IL: corteza infralimbica; B: periodo basal; E: periodo estimulación; P: periodo post.

4.1.4 Estudio de la actividad theta

El empleo de espectrogramas *wavelet* permitió observar la evolución tiempo-frecuencia. Así, se pudo visualizar el efecto de la estimulación de NI sobre cada uno de los canales.

Como muestra la Figura 32, y tal como se sabía, la inducción de actividad a frecuencias theta en HPCd fue evidente, con periodos de actividad a una frecuencia alrededor de 4 Hz sostenida, que mostraba un ligero descenso progresivo de la frecuencia. La supresión de ondas lentas durante la estimulación resultó clara también, con un incremento general de la frecuencia en todos los canales. La actividad en HPCi, HPCv, BLA e IL no quedó tan concentrada en el rango theta, sino que presentó una mayor dispersión y actividad a frecuencias más elevadas. La recuperación de la actividad basal fue progresiva tras finalizar la estimulación.

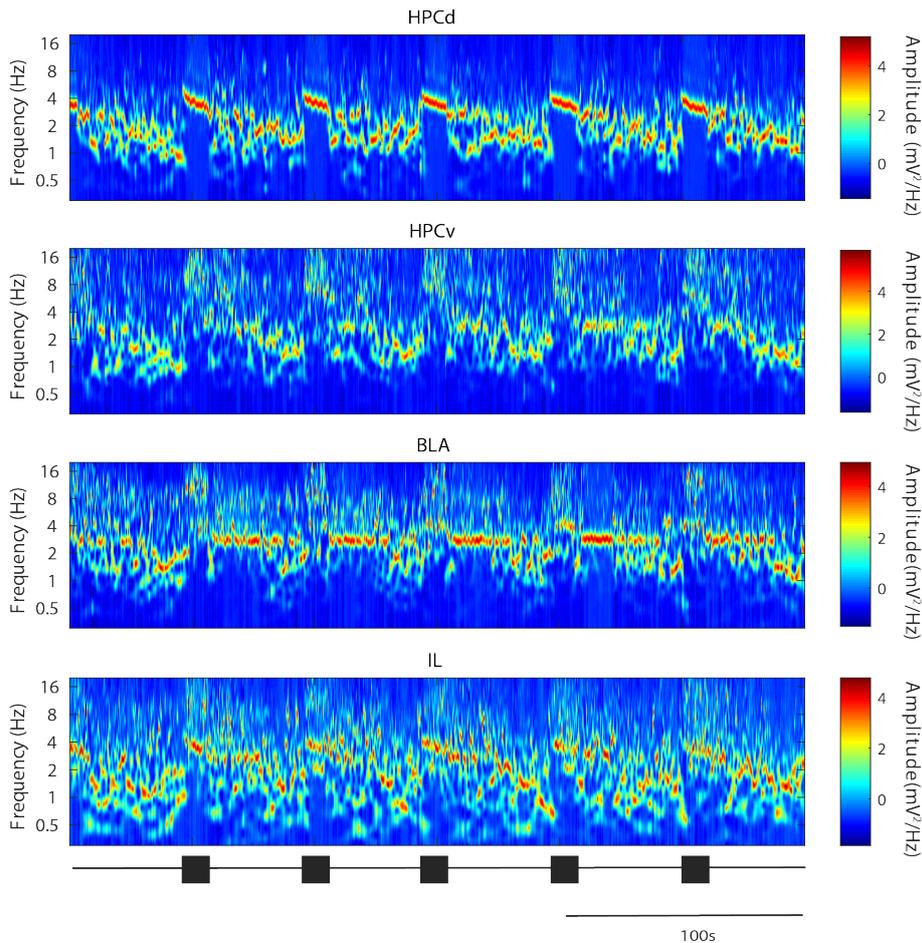


Figura 32: Efecto de la estimulación del NI sobre la distribución de la actividad oscilatoria en el circuito. El espectrograma muestra la evolución en el tiempo a cada frecuencia, en este caso entre 0,3-20 Hz. Las marcas de la línea inferior muestran los trenes de estímulos en NI. BLA: amígdala basolateral; HPCd: hipocampo dorsal; HPCi: hipocampo intermedio; HPCv: hipocampo ventral; IL: corteza infralímbica.

Estudios previos realizados por este grupo de investigación demostraron la participación del NI en la generación del ritmo theta de hipocampo dorsal (Núñez et al., 2006; Cervera-Ferri et al., 2011; Martínez-Bellver et al., 2015, 2017). Dado que los resultados obtenidos del análisis de potencias relativas mostraron un incremento significativo de la actividad para la banda theta bajo (2.5 a 6 Hz) en todas las regiones registradas durante el periodo de estimulación eléctrica en ambos sexos, se decidió profundizar en el análisis de esta banda. Para ello, realizamos un análisis de la evolución de la onda en el dominio tiempo-frecuencia, empleando espectrogramas *wavelet*. Mediante este análisis conseguimos aislar los segmentos de actividad theta que se producen a lo largo de las ventanas de interés para caracterizar aquellos segmentos en los que predominaba esta actividad, tanto en número como en duración media, así como la duración total de todos los segmentos. Estos datos nos permiten conocer no sólo el tiempo total que cada estructura registrada manifiesta actividad theta, sino

también averiguar si la actividad es mantenida en el tiempo o, por el contrario, se muestra fraccionada. El análisis se realizó sobre todos los estímulos seleccionados de cada ejemplar, seleccionando ventanas de 5 segundos para los periodos de interés.

En el análisis de la frecuencia theta bajo en el grupo de machos, observamos que la estimulación eléctrica del NI aumentó de forma significativa el número de segmentos con actividad theta no sólo en todo el hipocampo, sino también en BLA y en IL. Además, en todas las estructuras registradas, excepto en HPCi que presentó una mayor variabilidad, estos segmentos aumentaron su duración media, lo que, en conjunto implicó un incremento significativo del tiempo total de la banda en todo el circuito, lo que indica un aumento de la actividad theta de 2.5 a 6 Hz que además es sostenida en el tiempo. En general, se pudo observar que la duración de los segmentos y el tiempo total ocupado siendo esta actividad la predominante fue mayor en HPCd, siguiendo un orden decreciente en el circuito en sentido rostral: HPCd>HPCi>HPCv>BLA>IL.

El cese de la estimulación eléctrica no induce un cambio repentino hacia valores basales, ya que como podemos observar en la Figura 33, el número de segmentos theta se mantuvo elevado en todas las estructuras aún tras finalizar la estimulación, pero se hicieron más breves en las tres regiones hipocámpicas. En BLA e IL, los cambios se mantuvieron al finalizar la estimulación. Los resultados estadísticos concretos y los valores de significación se pueden consultar en la Tablas 12-14 del apartado Anexos.

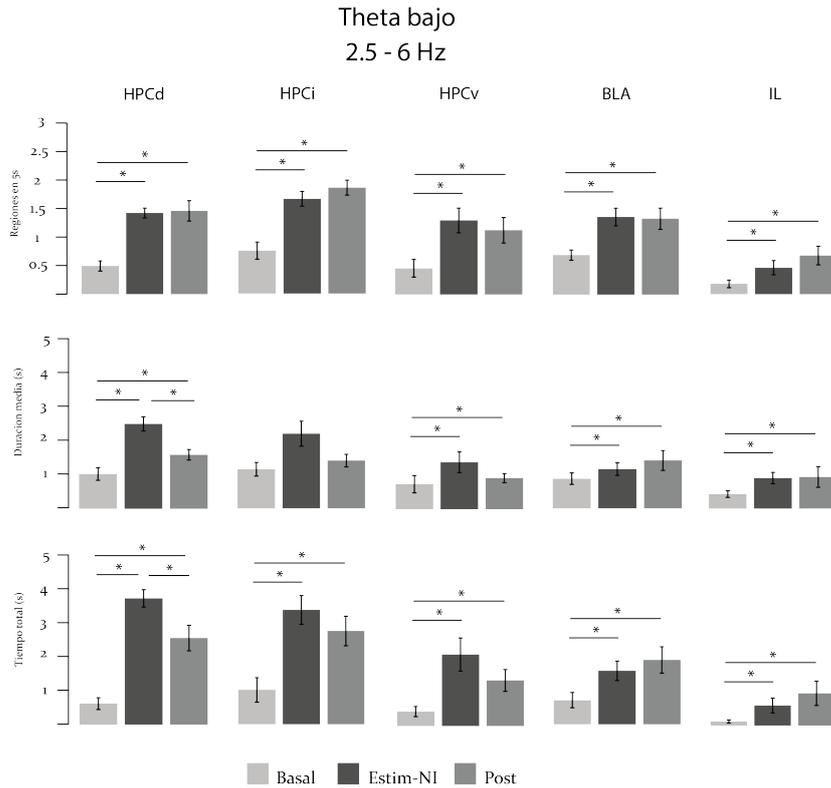


Figura 33: Análisis de los segmentos de actividad theta bajo en machos. Los resultados obtenidos a partir del análisis muestran un incremento significativo de tanto el número de regiones como el tiempo total con actividad theta bajo en todos los canales registrados. En todos, a excepción de HPCi, la duración media de las regiones con actividad de 2.5 a 6 Hz también experimenta un incremento sustancial. Esta variación en la continuidad de la onda es persistente en el tiempo, pues el periodo posterior sigue siendo significativamente diferente al basal. Tan solo en el caso de HPCd se observan diferencias entre el periodo estimulación y el periodo posterior, y más concretamente en la duración media de los segmentos y en el tiempo total que hay actividad theta en las ventanas de análisis. El * indica significación estadística en la comparación por pares. BLA: amígdala basolateral; HPCd: hipocampo dorsal; HPCi: hipocampo intermedio; HPCv: hipocampo ventral; IL: corteza infralímbica.

Los resultados obtenidos a partir del análisis del grupo de hembras mostraron cambios similares a los que se observan en el grupo de machos, ya que la estimulación de NI indujo un incremento significativo tanto del número de regiones como en su duración media en todos los canales, aunque en este caso a excepción de IL, que no alcanza la significación estadística. El conjunto de tiempo ocupado por la banda theta bajo muestra también el mismo perfil: HPCd>HPCi>HPCv>BLA>IL. La recuperación de la actividad basal tras la estimulación es también paulatina, ya que en el transcurso del periodo posterior al cese del estímulo siguen existiendo diferencias con el periodo basal. Estos resultados se pueden observar en la Figura 34, donde se muestran las medias del número de regiones con actividad theta de 2.5 a 6 Hz aisladas, su duración media y el tiempo total que cada canal muestra actividad en esta banda. Al realizar la comparación por pares entre los resultados obtenidos en hembras y machos no se encontraron diferencias entre sexos para esta frecuencia de theta. En ambos grupos

ocurre una dinámica similar, la estimulación induce un incremento de las regiones con actividad del rango theta lento y prolonga duración media, manteniendo una actividad sostenida que se mantiene durante al menos el periodo inmediatamente posterior al fin de la estimulación.

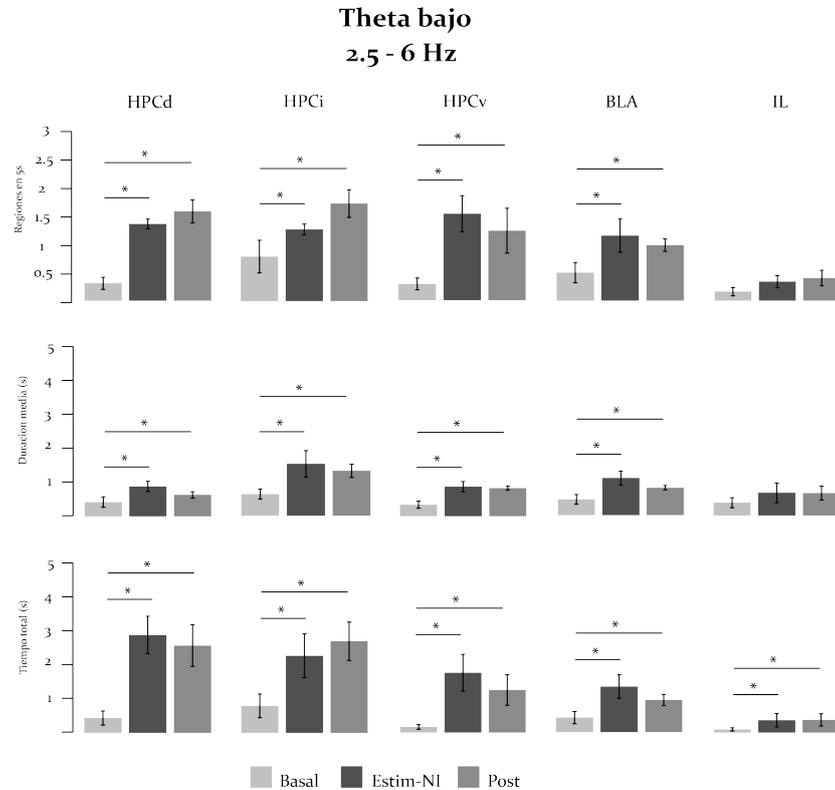


Figura 34: Análisis de los segmentos de actividad theta bajo en hembras. La estimulación eléctrica del núcleo incertus induce la aparición de un mayor número de regiones con actividad de 2.5 a 6 Hz y además con una duración media superior que las regiones aisladas durante el periodo basal, este cambio no se revierte inmediatamente después del fin de la estimulación. El * indica significación estadística en la comparación por pares. BLA: amígdala basolateral; HPCd: hipocampo dorsal; HPCi: hipocampo intermedio; HPCv: hipocampo ventral; IL: corteza infralimbica.

También evaluamos los cambios producidos por la estimulación de NI sobre la actividad del rango de theta que oscila entre 6 y 12 Hz, al que denominamos theta alto. En el grupo de machos los cambios principalmente se dan en HPCd, el cual experimentó un descenso muy significativo ($p < 0.001$) del número de segmentos con actividad dentro de este rango pero con una mayor duración media de los mismos, lo que resulta en un incremento neto en el tiempo total de actividad en esta banda, con periodos de theta más duraderos. Un patrón similar, con menos periodos pero más duraderos se observó también en las otras regiones hipocámpicas, aunque algunos de estos cambios no fueron significativos. En el caso de BLA e IL, el número de regiones theta alto o su duración no varió significativamente, pero en IL sí que se observó una disminución significativa del tiempo

total en la banda, probablemente debida a un ligero acortamiento de los periodos. En cuanto a la duración total del tiempo en theta alto durante la estimulación de NI, de nuevo se observó el patrón HPCd >HPCi >HPCv >BLA >IL.

Estos cambios, nuevamente, los efectos se mantuvieron parcialmente tras la finalización de la estimulación, aunque sólo con diferencias significativas respecto del basal en el caso de HPCd. Los resultados detallados se pueden observar en la Tablas 12-14 del apartado Anexos.

En las hembras, se observó también una reducción significativa del número de segmentos theta alto en HPCd pero con mayor duración, aunque en este caso los segmentos no fueron significativamente más largos que en el periodo basal, ni tampoco lo fue el tiempo total en theta alto. Los demás canales no mostraron cambios significativos ni en el número de segmentos ni en su duración media, pero al igual que los machos, mostraron una reducción significativa del tiempo total de la banda.

Finalmente, tras comparar los resultados de machos y hembras no encontramos diferencias significativas entre los sexos en estos parámetros. Los resultados detallados con la significación estadística se pueden consultar en la Tablas 15-17 del apartado Anexos.

En conjunto, los resultados obtenidos indican, en ambos sexos, un incremento de la actividad a frecuencias theta bajo, con periodos más duraderos y predominantes en todas las regiones del hipocampo, así como de theta alto en el HPCd. En general, se observó un patrón de duración de la actividad theta que disminuye en sentido rostral desde la región dorsal del hipocampo HPCd >HPCi >HPCv >BLA >IL.

4.1.5 *Estudio de la comunicación en el circuito: actividad sincrónica entre estructuras*

Como ya mencionamos en apartados anteriores, la actividad coordinada de los diferentes componentes de un circuito cerebral permite la integración y gestión de la información. Las ondas rápidas son propias de la actividad local cuya capacidad de propagación es más limitada, mientras que las ondas más lentas son capaces de propagarse a distancias mayores. La coordinación oscilaciones a altas y bajas frecuencias permite la integración de la actividad local de los distintos nodos de una red en la actividad global de la misma.

Estudio de la coherencia entre estructuras

A partir del análisis *wavelet*, pudimos observar el efecto de la estimulación del NI sobre la sincronización entre los distintos canales. La Figura 35 muestra una primera aproximación para analizar el acoplamiento entre estructuras, en ese caso entre HPCd y BLA. Los coherogramas y el espectro cruzado evidenciaron una elevada sincronización entre canales a bajas frecuencias en condiciones basales,

como era esperable bajo el efecto de la anestesia. La estimulación de NI indujo cambios en la sincronización del circuito, haciendo desaparecer el acoplamiento en el rango de ondas lentas y aumentándolo a frecuencias theta y gamma. Las Figuras 36, 37 y 38 muestran el detalle de la coherencia y espectro cruzado en el rango gamma para las parejas HPCd-BLA, HPCd-IL y BLA-IL, respectivamente.

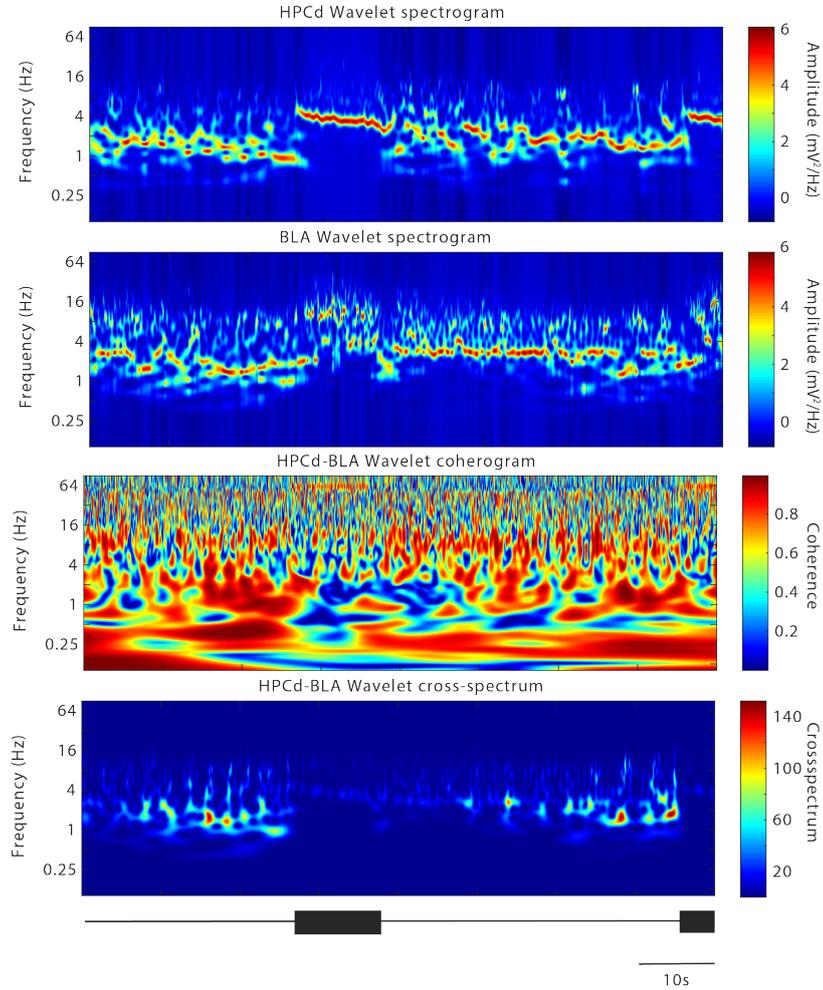


Figura 35: Sincronización entre hipocampo dorsal y amígdala basolateral. Las imágenes superiores muestran los espectrogramas de cada canal. Se muestra la coherencia en escala 0-1 y el espectro cruzado en unidades arbitrarias. Nótese que la estimulación de NI desincroniza la actividad en ondas lentas y delta y aumenta el acoplamiento a frecuencias theta. El coherograma muestra también un aumento de la coherencia en el rango gamma. BLA: amígdala basolateral; HPCd: hipocampo dorsal.

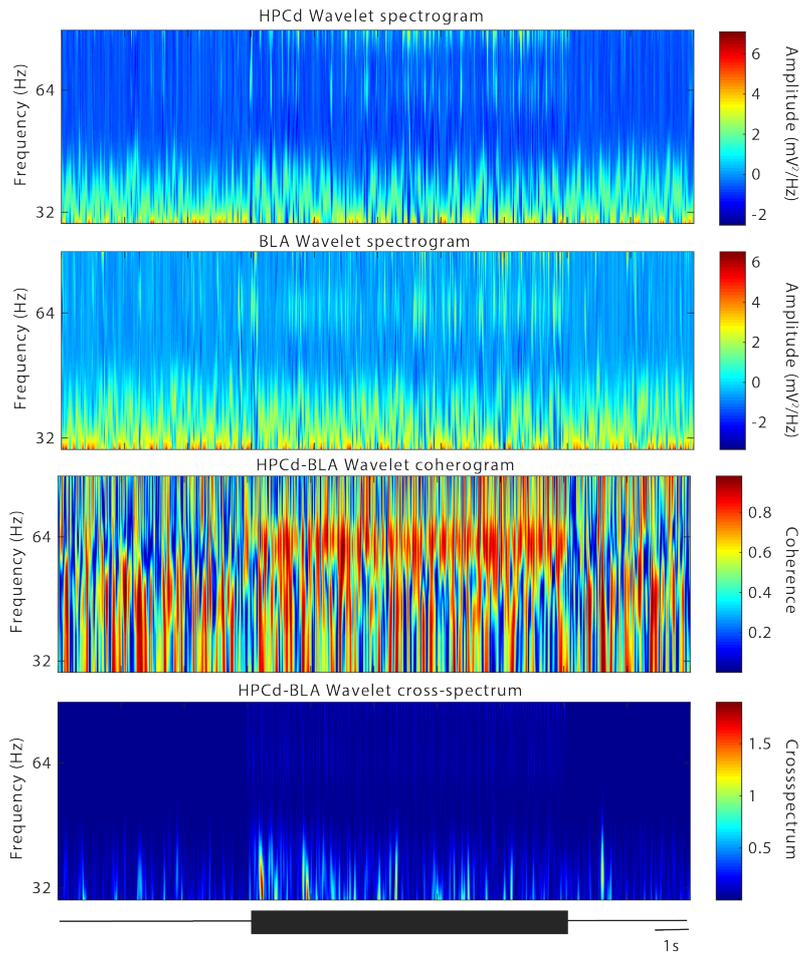


Figura 36: Detalle de la sincronización entre hipocampo dorsal y amígdala basolateral a frecuencias gamma. Durante la estimulación de NI, aumenta la actividad gamma tanto en HPCd como en BLA, así como su acoplamiento. BLA: amígdala basolateral; HPCd: hipocampo dorsal.

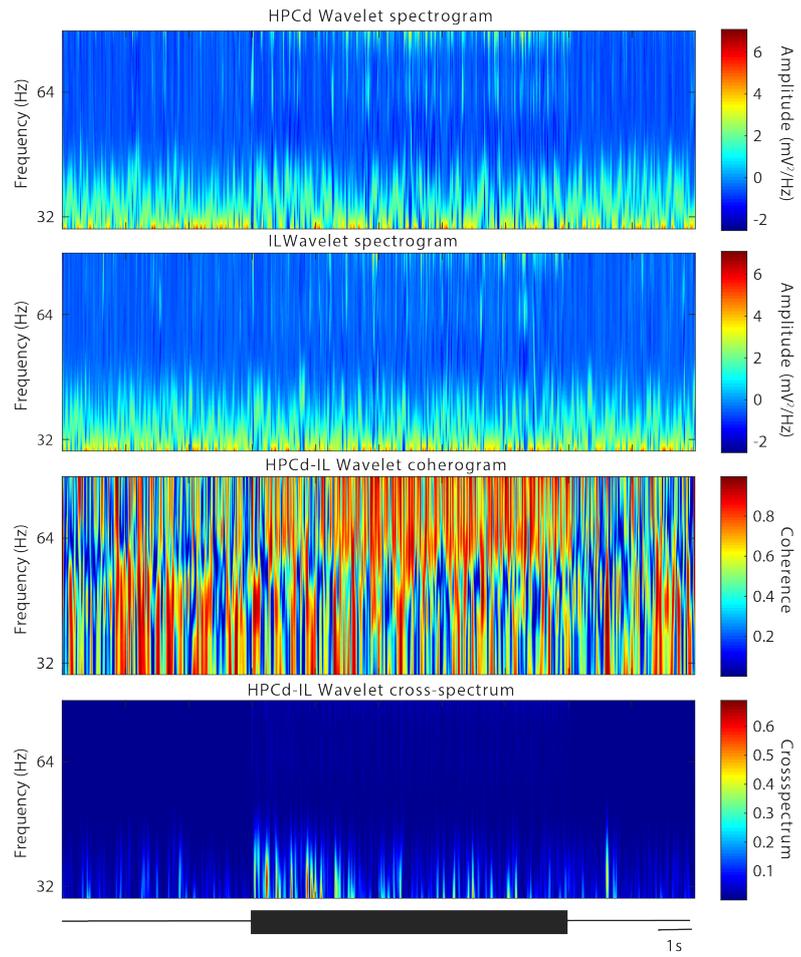


Figura 37: Detalle de la sincronización entre hipocampo dorsal y corteza infralímbica a frecuencias gamma. Durante la estimulación de NI, aumenta la actividad gamma tanto en HPCd como en IL, así como su acoplamiento. HPCd: hipocampo dorsal; IL: corteza infralímbica.

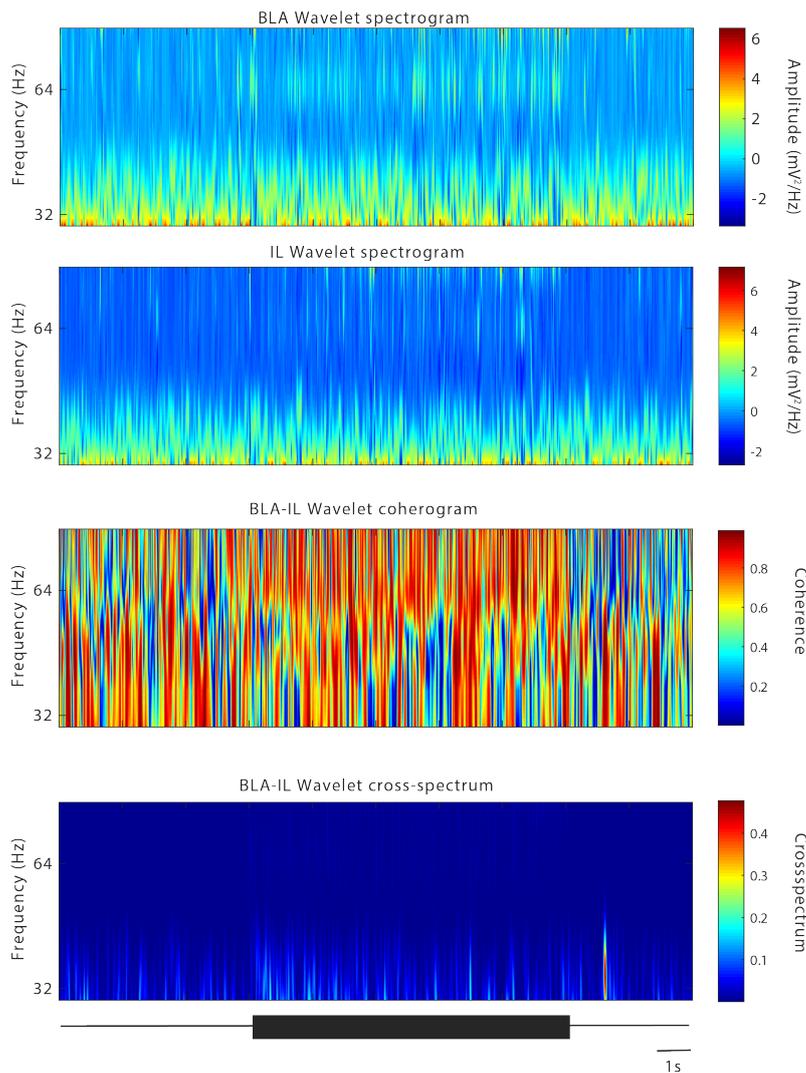


Figura 38: Detalle de la sincronización entre amígdala basolateral y corteza infralímbica a frecuencias gamma. Durante la estimulación de NI, aumenta la actividad gamma tanto en BLA como en IL, así como su acoplamiento. BLA: amígdala basolateral; IL: corteza infralímbica.

Estudio del bloqueo de fase o acoplamiento fase-fase

La sincronización de fase manifiesta la interacción entre grupos neuronales. Esta puede ser medida a partir de las señales bioeléctricas registradas en nuestros registros. No obstante, la conducción volumétrica puede inducir un falso incremento del valor de bloqueo de fase (PLV). Para evitarlo, en nuestro caso empleamos el índice de retraso de fase ponderado (wPLI) donde la contribución de los adelantos y atrasos de fase observados se pondera por la magnitud del componente imaginario del espectro cruzado, y que presenta dos ventajas: presenta una sensibilidad reducida a fuentes de ruido externas y mayor potencia estadística para detectar cambios en la sincronización de fase.

En nuestro estudio nos centramos en la comparación del wPLI durante el periodo basal y el periodo estimulación para determinar el efecto de la misma sobre la sincronización de las estructuras del circuito de estudio. En el estudio realizado sobre el grupo de machos, observamos un incremento significativo del wPLI en rango theta entre HPCd y el resto de las estructuras a excepción de IL, así como entre HPCi e HPCv y entre BLA e IL. En cuanto a la frecuencia gamma, encontramos que los cambios significativos se concentraron en la frecuencia media de la misma, 60-90 Hz, ocurriendo un aumento significativo del índice de retraso de fase ponderado entre todas las estructuras a excepción de HPCi y BLA. La Figura 39 muestra los resultados estadísticos del wPLI.

En el caso de las hembras observamos nuevamente cambios generalizados en el wPLI de theta, tanto alto como bajo, así como un incremento de la sincronización de la actividad gamma medio. En el caso de theta bajo encontramos que, frente a los machos, estas mostraron un incremento también del wPLI entre HPCi e IL y en el caso de theta alto observamos que también se incrementa sustancialmente entre HPCd y BLA. En lo que al estudio de la frecuencia gamma se refiere, la respuesta a la estimulación en el rango 30-60 Hz, la sincronización fue igual a la observada en los machos, sin cambios significativos, mientras que en el caso de la frecuencia media pudimos observar ciertas diferencias respecto a los machos. En las hembras no se observó un incremento sustancial del wPLI entre HPCd e IL ni entre HPCv y BLA, sin embargo, la estimulación eléctrica de NI sí indujo un incremento del wPLI entre HPCi e IL. La Figura 40 muestra los resultados estadísticos del wPLI en las hembras. Todos los resultados de significación estadística se pueden consultar en las Tablas 20-23 del apartado Anexos.

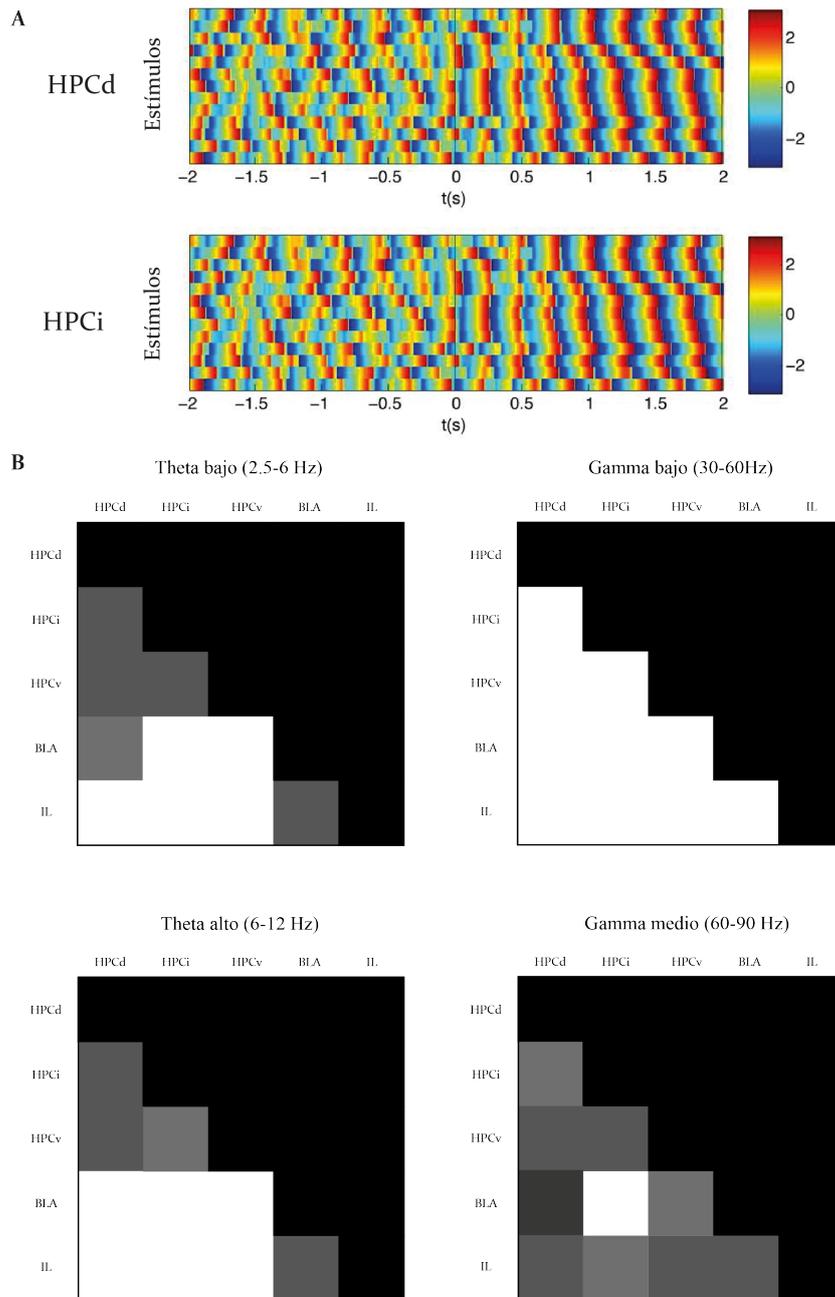


Figura 39: wPLI en machos para las ondas theta y gamma. (A) Distribución de fases para la frecuencia theta en HPCd e HPCv de todos los estímulos aplicados sobre un ejemplar representativo. Cada fila representa un estímulo. El inicio del estímulo está representado a tiempo 0. La escala colorimétrica representa las fases en π radianes. Obsérvese que en el periodo previo a la estimulación, la distribución de fases es aleatoria, mientras que tras los estímulos, se ordenan. (B) Se representa en escala de grises los casos en los que hay la estimulación eléctrica de NI induce un aumento con significación estadística del wPLI entre las estructuras analizadas, de modo que cuanto más oscuro es el tono mayor significación representa. En el caso de la frecuencia theta, observamos incremento entre HPCd y todas las otras estructuras menos IL, mientras que, en gamma, los resultados se centran en la frecuencia gamma más alta estudiada (60-90 Hz). BLA: amígdala basolateral; HPCd: hipocampo dorsal; HPCi: hipocampo intermedio; HPCv: hipocampo ventral; IL: corteza infralimbica.

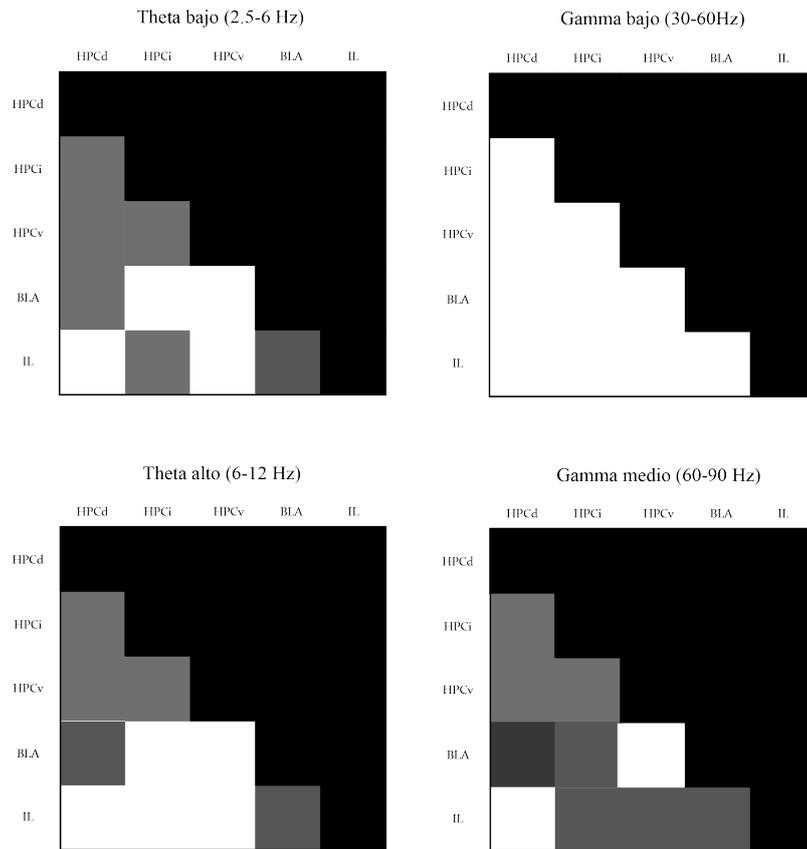


Figura 40: wPLI en hembras para las ondas theta y gamma. En el estudio realizado sobre las hembras encontramos resultados similares al estudio realizado en machos, con la particular diferencia de que en este caso se observó un incremento de la actividad theta bajo entre HPCi e IL y en el caso de la actividad gamma medio, no se observó un incremento sustancial entre HPCd-IL e HPCv-BLA al contrario de lo que ocurría con el grupo de machos y en cambio, este incremento sí se observó entre HPGi y BLA. Se representa en escala de grises los casos en los que hay la estimulación eléctrica de NI induce un aumento con significación estadística del wPLI entre las estructuras analizadas, de modo que cuanto más oscuro es el tono mayor significación representa. BLA: amígdala basolateral; HPCd: hipocampo dorsal; HPGi: hipocampo intermedio; HPCv: hipocampo ventral; IL: corteza infralímbica

La distribución de las fases (Figura 39 A) muestra que la estimulación de NI induce un reseteo de las fases de la onda theta bajo con un retraso de aproximadamente 0.2 s en todas las estructuras del circuito. El reinicio de fases puede observarse también en la Figura 41, que muestra la superposición de ondas filtradas a esta frecuencia en una ventana alrededor del inicio del estímulo. Independientemente de las fases de la onda previas al estímulo, el NI reinicia la actividad, favoreciendo así la sincronización entre hipocampo, amígdala y corteza IL.

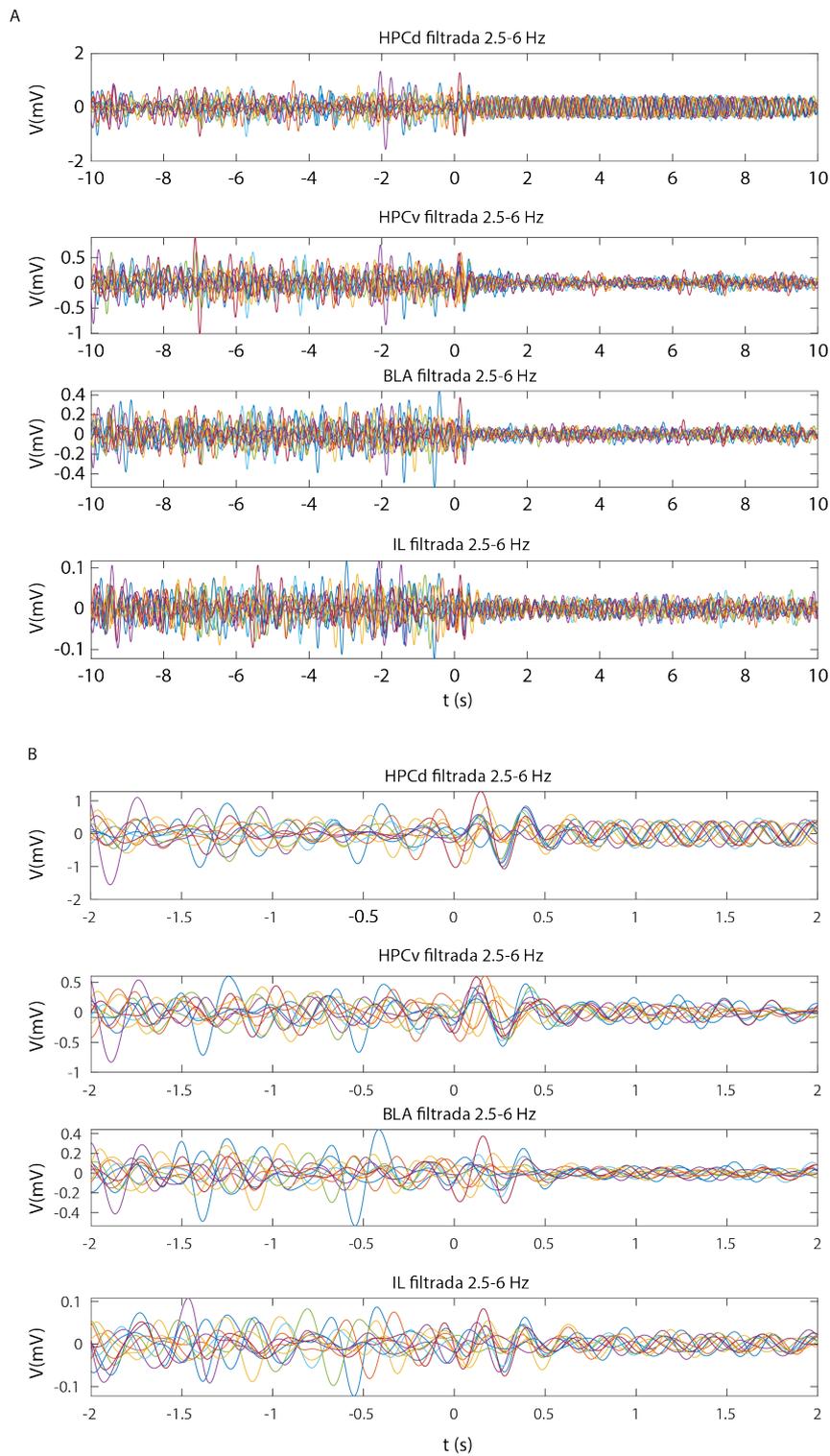


Figura 41: Reinicio de la onda theta 2.5-6Hz. La imagen muestra la superposición de diferentes trials en torno a los estímulos de NI (tiempo 0). A. Detalle de 10 s basales y 10 s de estimulación. B. Detalle de 2 s periestimulo. Obsérvese que las ondas muestran fases aleatorias en el periodo previo a la estimulación y que, a partir de la estimulación, se sincronizan. BLA: amígdala basolateral; HPCd: hipocampo dorsal; HPCv: hipocampo ventral; HPCi: hipocampo intermedio; IL: corteza infralímbica.

Estudio la información mutua a frecuencia gamma bajo y medio

El análisis de la actividad mutua para la frecuencia gamma nos permitió evaluar el grado de sincronización en la actividad local de las distintas regiones estudiadas, ya que mediante el estudio del bloqueo de fases se puede cuantificar la información compartida entre dos variables desde un punto de vista probabilístico, lo cual nos permite identificar relaciones de carácter no lineal en la dinámica espaciotemporal propia de las señales bioeléctricas. Para el cálculo, se extrajo la distribución de la potencia de la frecuencia gamma de los espectrogramas *wavelet*, delimitando ventanas de 5 segundos antes y durante el estímulo.

En el grupo de los machos, comparando la información mutua durante el periodo basal y el periodo estimulación, observamos que en el caso de la frecuencia gamma bajo hay un descenso generalizado de la información mutua entre los canales durante la estimulación de NI, alcanzando significación estadística en la comunicación entre la región intermedia del hipocampo BLA y con IL. En cambio, se observó un incremento significativo de la información mutua a esta frecuencia entre HPCd y BLA.

En el caso de la frecuencia gamma medio (60 a 90 Hz), por el contrario, observamos un aumento de la comunicación entre la región dorsal y el resto del circuito, que alcanzó significación estadística entre HPCd e HPCi ($p < 0.01$), así como entre HPCi y BLA. En la Figura 42 se ilustran los cambios observados en machos. Los resultados detallados de significación se pueden consultar en la Tabla 18 del apartado de anexos.

En conjunto, estos resultados indican un cambio en el intercambio de información entre las estructuras del circuito durante la estimulación de NI. En concreto, la estimulación del NI produciría un aumento de la comunicación entre la región dorsal del hipocampo y amígdala a frecuencias gamma bajo y entre HPCd e HPCi y este último y la amígdala en gamma medio, y una reducción de la comunicación a frecuencias gamma bajo entre la región intermedia, la amígdala y corteza IL.

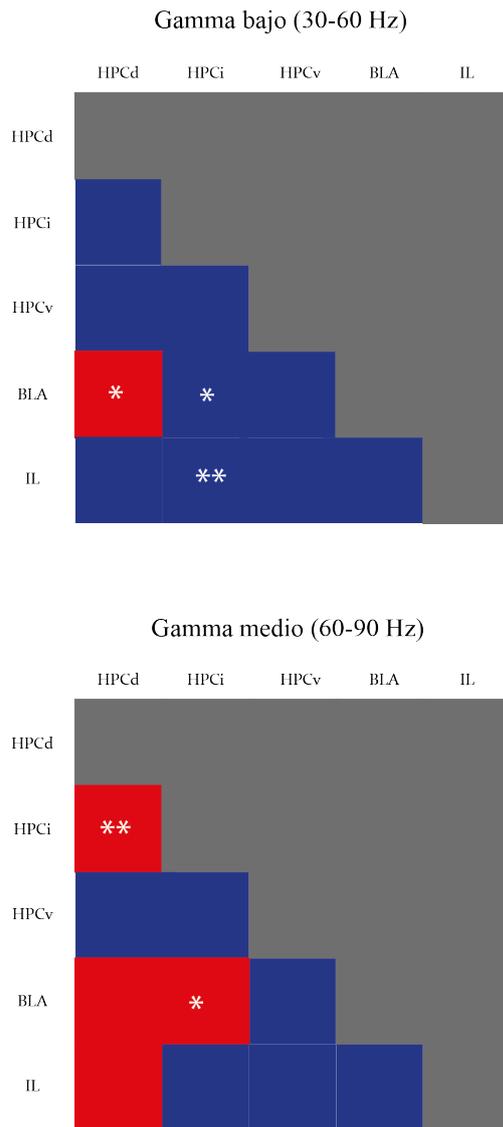


Figura 42: Información mutua a frecuencia gamma en machos. En la figura se representa la significación de la información mutua entre el periodo basal y el de estimulación para la oscilación gamma bajo (arriba) y para la oscilación gamma medio (abajo). Observamos que, en el caso de la información mutua para gamma bajo, se produce un incremento de la información mutua entre HPCd-BLA y un descenso de esta entre HPCi-BLA e HPCi-IL. La estimulación eléctrica de NI induce un incremento de la actividad mutua en gamma medio entre HPCd-HPCi y entre HPCi-BLA. En la figura se muestran de color rojo los casos en los que aumenta la información mutua y en azul los casos en los que disminuye. En los casos en los que la comparación por pares ha resultado ser significativa, el nivel de significación ha sido representado con asteriscos donde ** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$. BLA: amígdala basolateral; HPCd: hipocampo dorsal; HPCi: hipocampo intermedio; HPCv: hipocampo ventral; IL: corteza infralímbica.

En el grupo de estudio de hembras, al comparar la información mutua durante el periodo basal con el periodo de estimulación eléctrica, lo que observamos fue una tendencia a la disminución de la información mutua de gamma bajo entre HPCi y BLA. Mientras que en el caso de la información mutua en el rango de gamma medio no se observaron diferencias significativas en la comunicación entre ninguna pareja de estructuras. En la Figura 43 se ilustran los cam-

bios observados en hembras. Los resultados del análisis estadístico se pueden consultar en la Tabla 19 del apartado Anexos.

Finalmente, la comparación por pares entre los ejemplares de ambos grupos, machos y hembras, no mostraron grandes diferencias entre los sexos (casos significativos indicados en la Tabla 19 del apartado Anexos).

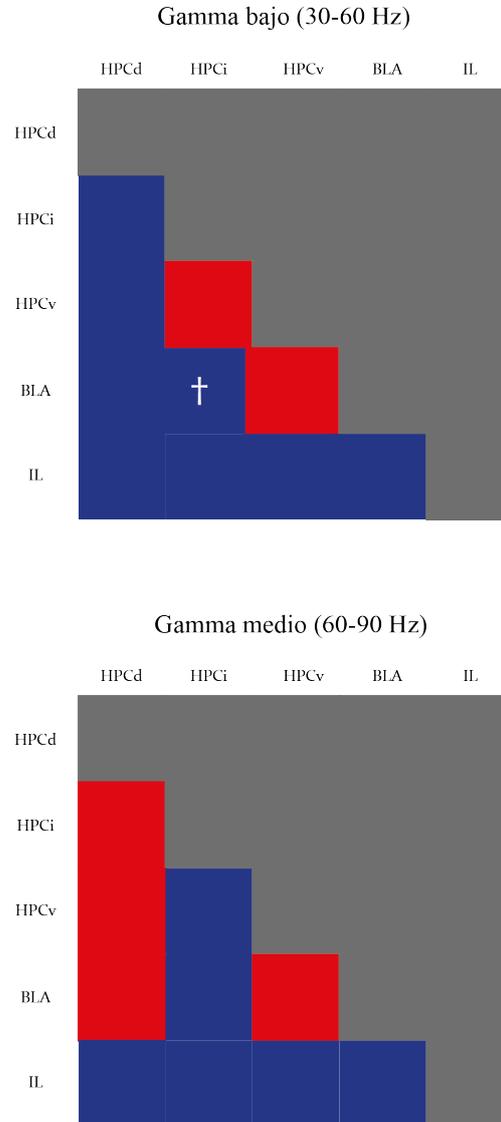


Figura 43: Información mutua a frecuencia gamma en hembras. En la imagen superior se muestran los resultados del efecto de la estimulación eléctrica sobre la información mutua en gamma bajo entre todos los canales registrados. Tan solo se observa tendencia a la disminución de información mutua entre HPCi y BLA. En el estudio realizado sobre la actividad gamma medio no se observaron diferencias significativas. En la figura se muestran de color rojo los casos en los que aumenta la información mutua y en azul los casos en los que disminuye. La cruz indica tendencia a la significación ($p < 0.08$). BLA: amígdala basolateral; HPCd: hipocampo dorsal; HPCi: hipocampo intermedio; HPCv: hipocampo ventral; IL: corteza infralímbica.

Estudio preliminar sobre la direccionalidad del flujo de información en el circuito

En nuestro trabajo, realizamos un estudio preliminar de la direccionalidad en el circuito, empleando el análisis de causalidad de Granger en 7 ejemplares (4 machos y 3 hembras). En todos los casos se observó un cambio en la direccionalidad de la comunicación entre algunas de las estructuras del circuito durante la estimulación de NI (Figura 44). No obstante, los ejemplares mostraron diferencias en los pares, por lo que este análisis debe considerarse sólo como una primera aproximación.

En todos los ejemplares analizados se observó un incremento en la causalidad en el dominio del tiempo en sentido $HPCd \rightarrow HPCv$, y en 6 de los 7 aumentó también en las direcciones $HPCd \rightarrow IL$, $HPCv \rightarrow IL$, $BLA \rightarrow IL$, $IL \rightarrow HPCv$. En general, se observó un aumento del flujo de información en dirección hacia IL desde el resto del circuito, en algunos casos con cambios claros de direccionalidad. Así mismo, en general se observó un aumento del flujo de información desde $HPCd$ hacia el resto del circuito.

En el estudio de la causalidad en el dominio de la frecuencia, pese a la variabilidad observada entre ejemplares, se detectó un incremento generalizado en la causalidad en el rango gamma, alrededor de 60 Hz con la estimulación del NI.

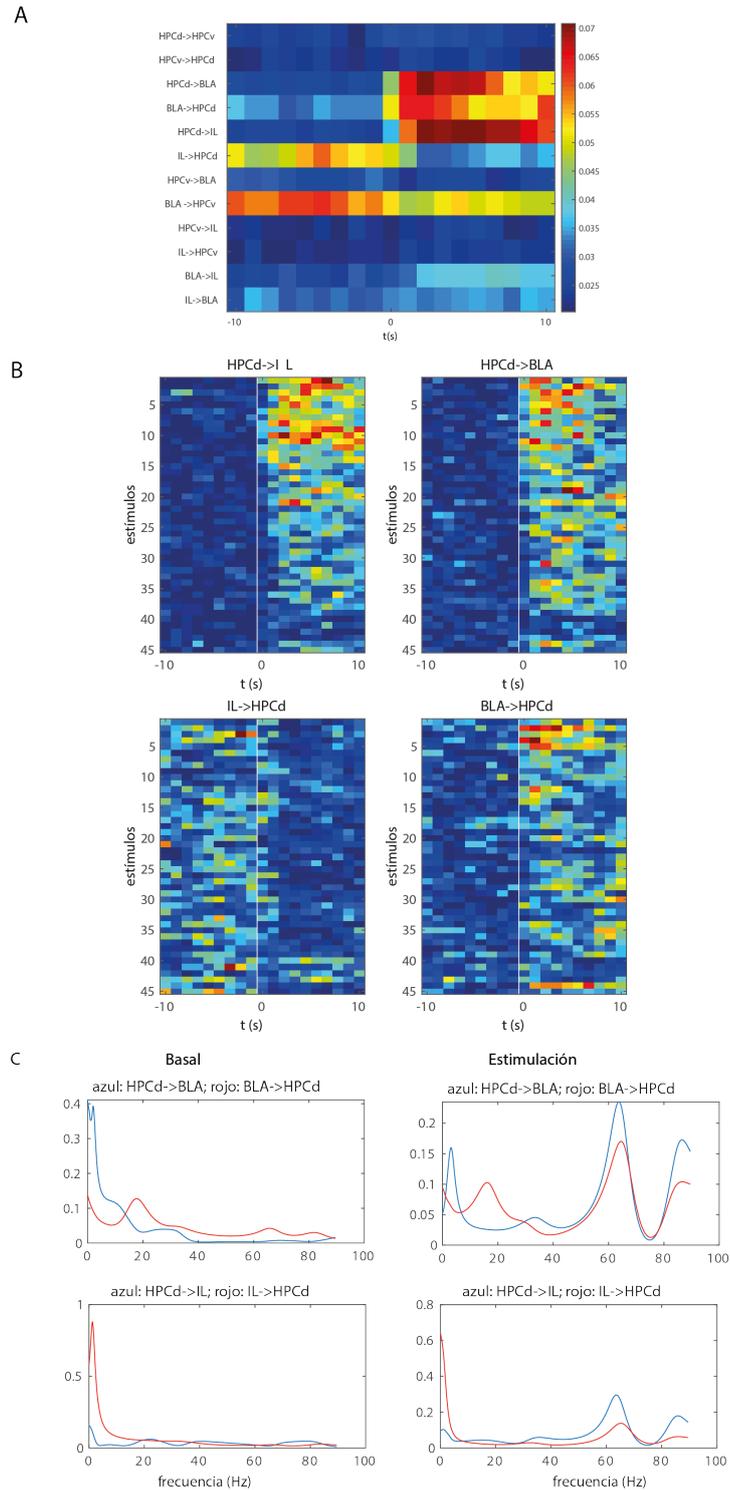


Figura 44: Estudio preliminar de la causalidad en el circuito amígdalo-hipocámpico-prefrontal. El tiempo 0 indica el inicio de la estimulación. A. Promedio de la causalidad en el dominio del tiempo en aquellos casos en los que se encontró significación. Se observa un aumento en el flujo desde HPCd hacia BLA e IL. En el caso de HPCd-IL, hay un cambio de direccionalidad con la estimulación. B. Detalle de la causalidad en dominio del tiempo en todos los estímulos dados en un ejemplar. Obsérvese que parece producirse una habituación, con más efecto en los primeros estímulos. C. Causalidad en el dominio de la frecuencia entre HPCd-BLA y HPCd-IL. La estimulación produce un incremento en la causalidad a frecuencias gamma, preferentemente desde HPCd. BLA: amígdala basolateral; HPCd: hipocampo dorsal; HPCi: hipocampo intermedio; HPCv: hipocampo ventral; IL: corteza infralímbica.

Acoplamiento theta-gamma

Uno de los métodos para el estudio de la actividad sincrónica dentro de una red neuronal es el acoplamiento fase-amplitud, una forma de acoplamiento de frecuencia cruzada donde la amplitud de una señal de alta frecuencia es modulada por la fase de las oscilaciones de baja frecuencia. Esta sincronización permite integrar la actividad local de las regiones dentro de un circuito global, permitiendo integración de información en regiones cerebrales especializadas. Para este análisis, comparamos el acoplamiento de la amplitud de las ondas rápidas gamma bajo y gamma medio con la amplitud de la oscilación theta bajo (2.5-6 Hz), ya que la estimulación de NI había mostrado inducir actividad en esta banda en todo el circuito estudiado.

La estimulación eléctrica de NI, en ambos sexos, provocó un incremento sustancial del acoplamiento de theta con gamma medio en HPCd, así como en IL. El aumento de acoplamiento theta-gamma medio en HPCd también se observó en el grupo de las hembras, pero con significación inferior. En machos, la estimulación también incrementó el acoplamiento de theta con los dos rangos de gamma estudiados en HPCi, un cambio que no se observó en hembras. En cambio, en BLA, sólo observamos un incremento en el acoplamiento de la amplitud de gamma medio (30-60 Hz) con la fase de theta bajo (2.5-6 Hz) en hembras. La Figura 45 muestra un caso representativo y los resultados estadísticos obtenidos, que se recogen en detalle en las Tablas 24 y 25 del apartado Anexos.

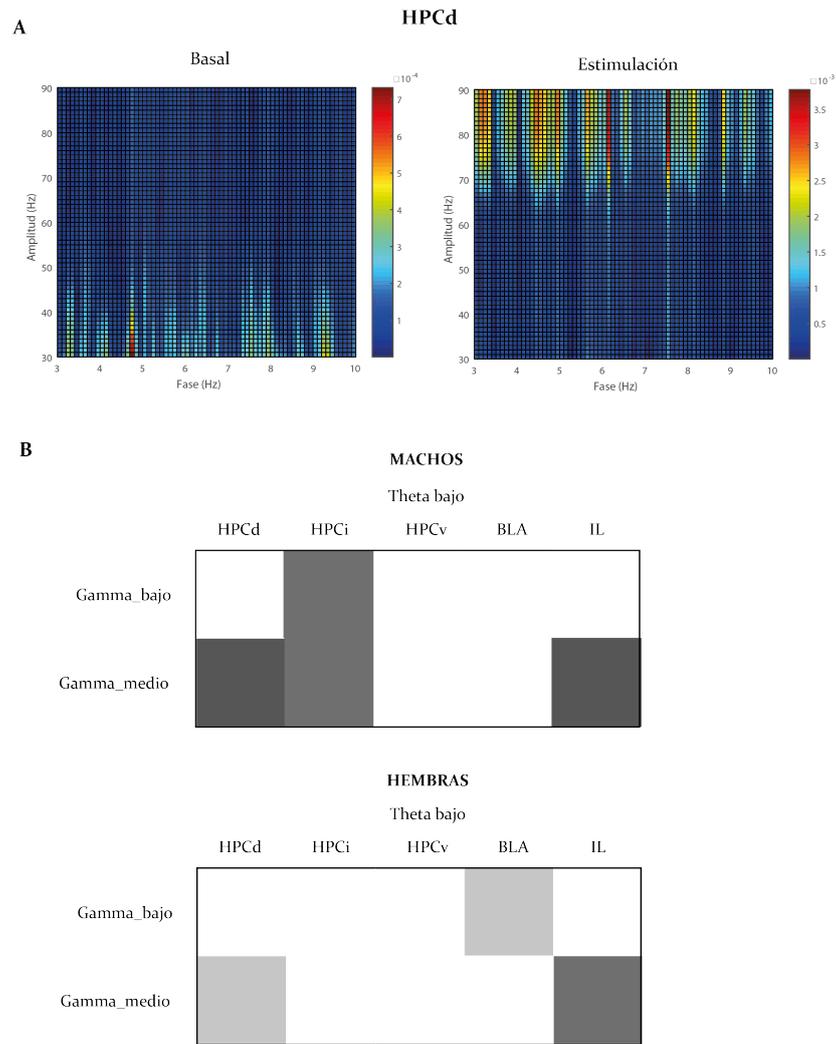


Figura 45: Acoplamiento fase-amplitud de theta bajo con gamma bajo y gamma medio. (A) Comodulogramas entre las fases de 3-10 la amplitud de 30-90 Hz en HPCd en un caso representativo, que muestran un aumento del acoplamiento entre dichas oscilaciones tras la estimulación eléctrica de NI. (B) Representación en escala de grises de las diferencias significativas del acoplamiento fase-amplitud entre el periodo basal y estimulación para todos los canales analizados. Los tonos más oscuros de gris determinan mayor grado de significación. BLA: amígdala basolateral; HPCd: hipocampo dorsal; HPCi: hipocampo intermedio; HPCv: hipocampo ventral; IL: corteza infralímbica.

4.2 RESULTADOS II: ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA C-FOS INDUCIDO POR LA ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA DEL NÚCLEO INCERTUS

Teniendo en cuenta el mapa de conexiones del NI y el circuito sobre el que centramos nuestro estudio, decidimos complementar el estudio de la actividad eléctrica del circuito prefrontal-amígdalo-hipocámpico bajo el efecto de la estimulación eléctrica en NI con el análisis inmunohistoquímico de la presencia de la proteína c-Fos en las estructuras de estudio, así como en otras estructuras corticales y subcorticales inervadas por NI y participantes en la respuesta al estrés.

En este caso empleamos un total de 14 ejemplares macho. En el primer grupo de estudio se incluyeron 5 ejemplares a los que únicamente se les practicó la cirugía para la implantación del electrodo en el NI (grupo control o sham) mientras que 9 ejemplares fueron destinados al grupo estimulación, a quienes se les practicó la cirugía para la implantación, así como el protocolo de estimulación empleado en el estudio anterior. Posteriormente se realizó un recuento de células inmunorreactivas en un total de 37 estructuras. En el presente apartado se muestran los resultados de este estudio, clasificando las estructuras analizadas en corticales, septales, hipocámpicas, amigdalinas, diencefálicas y troncoencefálicas.

4.2.1 Regiones corticales

El recuento de células con expresión de c-Fos a nivel cortical se practicó sobre las siguientes estructuras: cortezas infralímbica (IL), prelímbica (Pl), cingulada (Cg), ectorrinal (Ect), entorrinal (CE), motora primaria (M1), piriforme (Pir) y la tenia tecta dorsal (DTT) y ventral (VTT). Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 4, donde se muestran las medias con la desviación estándar, así como los resultados de la prueba estadística de Mann-Whitney que empleamos para comparar las dos condiciones experimentales estudiadas y en la figura 46 se muestran las microfotografías de cortezas infralímbica y prelímbica.

Los resultados que obtuvimos del recuento de estas regiones fue que la estimulación eléctrica del NI induce un incremento significativo ($p < 0.01$) o muy significativo ($p < 0.001$) en casi todas las regiones corticales estudiadas.

Tabla 4: Recuento de células inmunorreactivas para c-Fos en estructuras corticales

Estructura	Área μm^2	Sham	Estimulación
CE	500	12.8 \pm 2.39	37.11 \pm 6.508***
Cg	500	33.6 \pm 13.72	91.18 \pm 7.33**
Ect	500	17.4 \pm 4.88	48.67 \pm 11.29**
M1	500	25.4 \pm 10.85	85.67 \pm 9.46**
IL	500	21.6 \pm 8.82	80.33 \pm 9.11**
PL	500	26.4 \pm 8.32	87.67 \pm 8.75**
DTT	500	26 \pm 7.81	65.78 \pm 8.83**
VTT	500	15.6 \pm 3.61	34.22 \pm 7.99**

*Nota: Media \pm error estándar. Significación estadística en la comparación por pares del grupo sham con el grupo estimulación: *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$.

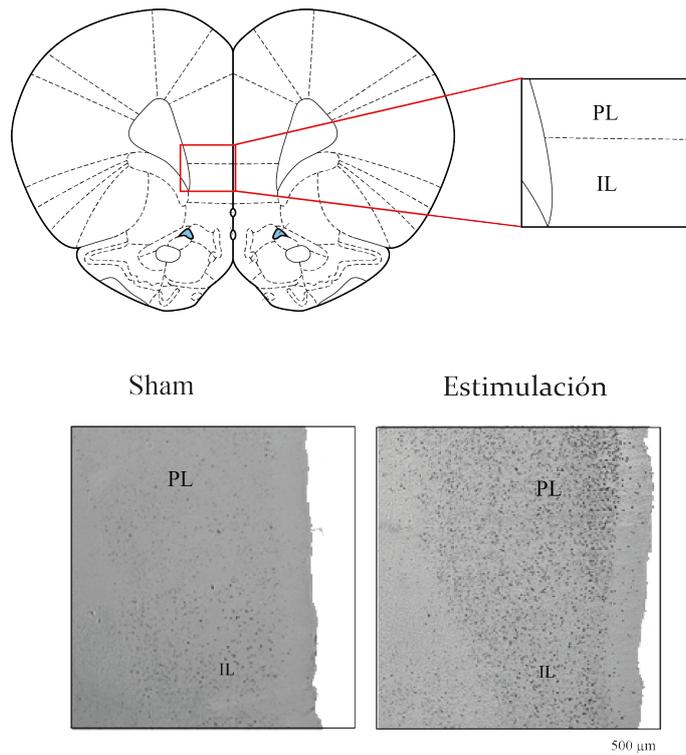


Figura 46: Marcaje de c-FOS en las cortezas infralímbica y prelímbica. Fotografía representativa del marcaje en el grupo sham y el grupo estimulación. La estimulación eléctrica del NI induce un incremento significativo de la expresión de la proteína. IL: corteza infralímbica. PL: corteza prelímbica.

4.2.2 Regiones septales

El recuento de células a nivel septal se llevó a cabo en las siguientes estructuras: septum lateral dorsal (LSD), intermedio (LSI) y ventral (LSV), septum medial (MS) así como en la banda diagonal de Broca (DBB). Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 5, donde se muestran las medias con la desviación estándar, así como los resultados de la prueba estadística de Mann-Whitney que empleamos para comparar las dos condiciones experimentales estudiadas y en la Figura 47 se muestran las microfotografías correspondientes a LSD.

Tras realizar el recuento del número de células que expresaron la proteína c-Fos tras la implantación del electrodo en NI en el grupo sham y tras la implantación y la estimulación en el grupo estimulación, lo que observamos en el caso de las regiones septales analizadas, fue un incremento de neuronas activas en el grupo estimulación respecto al sham. La única región analizada que no mostró una variación significativa fue LSI, en el resto de los casos la significación varió ente de $p < 0.05$ y $p < 0.01$.

Tabla 5: Recuento de células inmunorreactivas para c-Fos en estructuras septales

Estructura	Área μm^2	Sham	Estimulación
LSD	500	2.2 ± 0.83	$7.11 \pm 1.05^{**}$
LSI	500	6 ± 2.45	8 ± 2.39
LSV	500	6.2 ± 3.03	$15.56 \pm 2.74^{**}$
MS	500	4.4 ± 2.70	$8.33 \pm 1.94^{**}$
DBB	500	16.4 ± 1.14	$11.56 \pm 1.95^{**}$

*Nota: Media \pm error estándar. Significación estadística en la comparación por pares del grupo sham con el grupo estimulación: $**p < 0.01$.

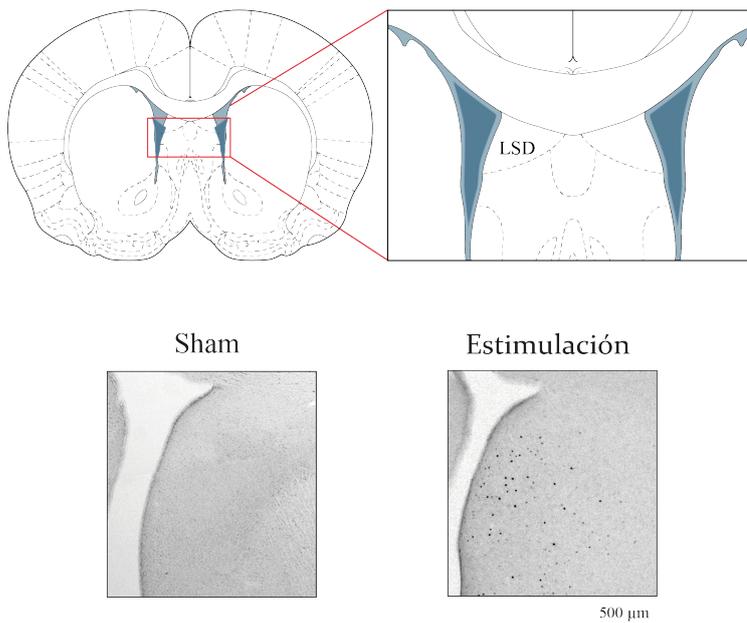


Figura 47: Marcaje de c-FOS en el septum lateral dorsal. Fotografía representativa del marcaje en el grupo sham y el grupo estimulación. Los resultados muestran un incremento significativo en la expresión de la proteína c-Fos inducido por la estimulación eléctrica del NI. LSD: septum lateral dorsal.

4.2.3 Regiones de la formación hipocámpica

En el caso de la formación del hipocampo el recuento se realizó sobre los campos CA₁, CA₂ y CA₃ y la región del GD de HPCd e HPCv, además de sobre el campo CA₁ y la región del GD de HPCi. En la tabla 6 se pueden observar los resultados obtenidos, en ella se muestran las medias con la desviación estándar, así como los resultados de la prueba estadística de Mann-Whitney que empleamos para comparar las dos condiciones experimentales estudiadas.

El recuento de las células con expresión de la proteína c-Fos en la formación hipocámpica mostró una tendencia al aumento del recuento celular en los campos CA₁ de HPCd e HPCv así como en el campo

CA2 de HPCv. Pese a lo esperado, en el resto de las zonas analizadas no se encontraron diferencias significativas.

Tabla 6: Recuento de células inmunorreactivas c-Fos en la formación hipocámpica

Estructura	Área μm^2	Sham	Estimulación
HPCd-CA1	200	2 ± 0.71	$3 \pm 0.87^\dagger$
HPCd-CA2	200	3.4 ± 1.14	$8 \pm 4 \pm 1.41$
HPCd-CA3	200	2 ± 0.71	2.89 ± 1.05
HPCd-GD	100	2.2 ± 0.84	2.44 ± 1.33
HPCi-CA1	200	2 ± 0.78	2.79 ± 1.39
HPCi-GD	100	1.8 ± 0.83	2.55 ± 1.13
HPCv-CA1	200	0.8 ± 0.48	$1.56 \pm 0.52^\dagger$
HPCv-CA2	200	2.4 ± 0.89	$3.33 \pm 0.71^\dagger$
HPCv-CA3	200	2.6 ± 1.14	3.22 ± 0.67
HPCv-GD	100	0.8 ± 0.48	10.44 ± 0.52

*Nota: Media \pm error estándar. Significación estadística en la comparación por pares del grupo sham con el grupo estimulación: $\dagger < 0.08$.

4.2.4 Regiones del complejo amigdalino

Para evaluar el efecto sobre el complejo amigdalino medimos la expresión de c-Fos en las siguientes regiones: núcleo basolateral de la amígdala (BLA), amígdala basomedial núcleo basomedial de la amígdala (BMA), núcleo central de la amígdala (CeA), núcleo medial de la amígdala (MeA), núcleo lateral de la amígdala (LA), la zona de transición amígdalopiriforme (Apir), el núcleo amígdaloide cortical a nivel posterolateral (PLCo) y posteromedial (PMCo).

Los resultados obtenidos a partir del recuento de la expresividad de la proteína c-Fos en el complejo amigdalino mostraron una tendencia al incremento ($p < 0.08$) en el núcleo central de la amígdala y en el núcleo lateral de la amígdala. En el resto de las estructuras analizadas no encontramos cambios significativos ni tendencia a la significación. En la Tabla 7 se muestran los resultados obtenidos a partir de la prueba estadística de Mann-Whitney que empleamos para comparar las dos condiciones experimentales estudiadas, así como las medias con la desviación estándar.

Tabla 7: Recuento de células inmunorreactivas para c-Fos en el complejo amigdalino

Estructura	Área μm^2	Sham	Estimulación
BLA	200	2 ± 0.71	3 ± 1.22
BMA	200	2 ± 0.70	2.55 ± 0.53
CeA	200	3 ± 1	$4.22 \pm 0.97^\dagger$
MeA	200	2.2 ± 0.83	2.89 ± 0.60
LA	200	2 ± 0.70	$3.33 \pm 1.32^\dagger$
Apir	200	1.6 ± 0.55	2 ± 0.86
PLCo	200	1.4 ± 0.55	1.78 ± 0.67
PMCo	100	1.4 ± 0.89	2.22 ± 0.83

*Nota: Media \pm error estándar. Significación estadística en la comparación por pares del grupo sham con el grupo estimulación: $\dagger < 0.08$.

4.2.5 Regiones diencefálicas

Las regiones diencefálicas sobre las que realizamos el recuento fueron los núcleos centromedial del tálamo (CM) y paraventricular del tálamo (PV) y núcleo paraventricular del hipotálamo (PaAP). En estas regiones de estudio pudimos observar un incremento significativo del recuento de células c-Fos positivas del grupo estimulación frente al sham en PV y PaAP. En la tabla 8 se muestran las medias y desviaciones estándar de los dos grupos experimentales, así como los resultados obtenidos a partir de la prueba estadística de Mann-Whitney que empleamos para compararlos. Las Figuras 48 y 49 muestran las microfotografías realizadas de PV y PaAP respectivamente.

Tabla 8: Recuento de células inmunorreactivas para c-Fos en regiones diencefálicas

Estructura	Área μm^2	Sham	Estimulación
CM	200	9.2 ± 1.30	8.67 ± 1.58
PV	200	7.2 ± 0.84	$12.88 \pm 2.07^{**}$
PaAP	100	11.4 ± 2.30	$39.67 \pm 5.29^{**}$

*Nota: Media \pm error estándar. Significación estadística en la comparación por pares del grupo sham con el grupo estimulación: $^{**} < 0.01$.

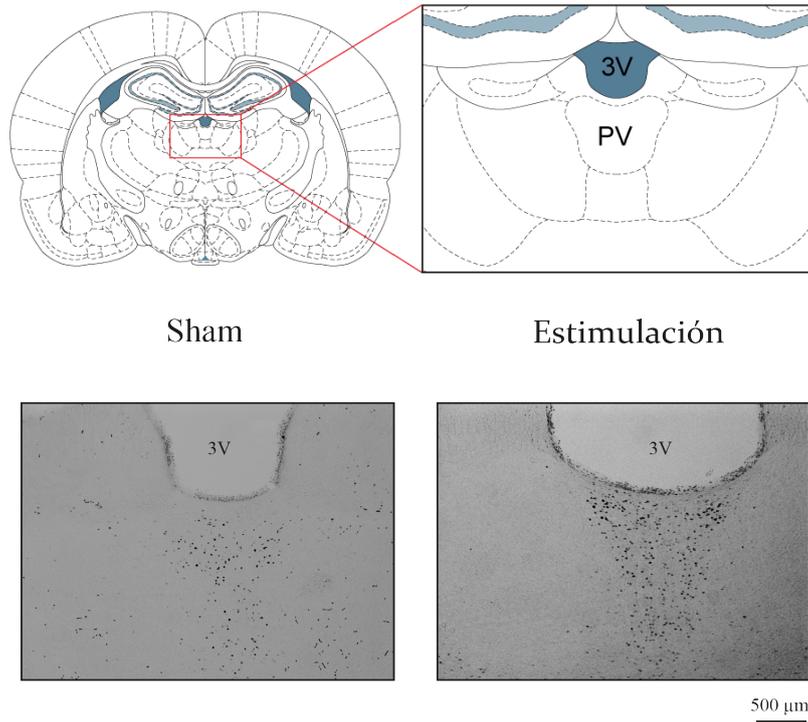


Figura 48: Marcaje de la expresión de c-Fos en el núcleo paraventricular del tálamo. Se muestra una fotografía de un caso representativo de ambos grupos experimentales. El recuento celular muestra un incremento significativo en el grupo estimulación frente al sham. núcleo paraventricular del tálamo; 3V: tercer ventrículo.

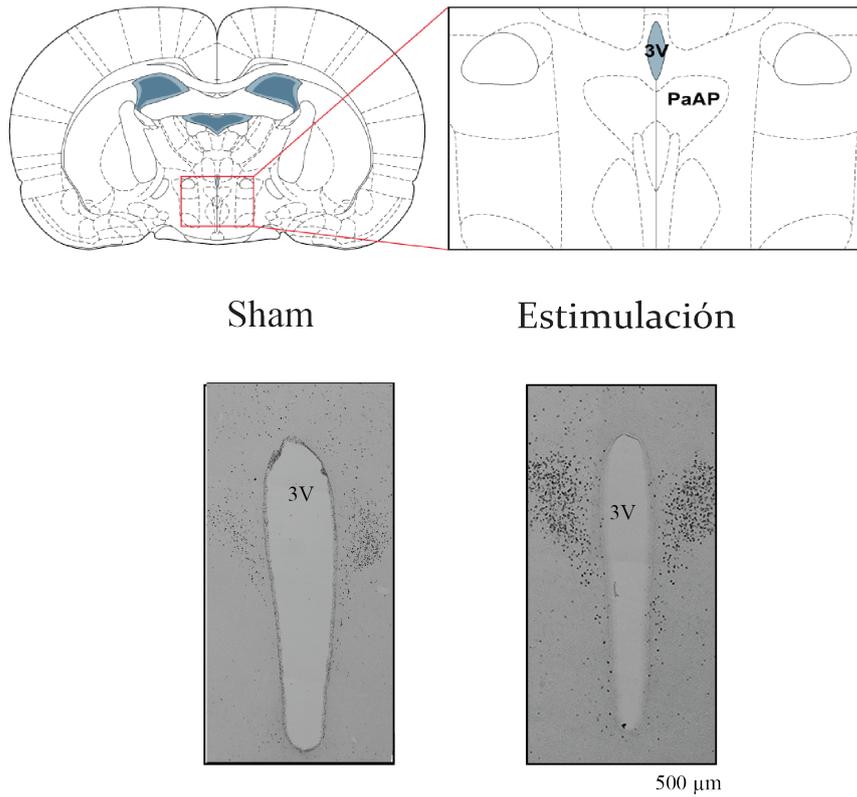


Figura 49: Marcaje de c-Fos en el núcleo paraventricular del hipotálamo. Fotografía representativa del marcaje en el grupo sham y el grupo estimulación. La estimulación eléctrica del NI induce un incremento significativo de la expresión de la proteína. PAaP: núcleo paraventricular del hipotálamo; 3V: tercer ventrículo.

4.2.6 Regiones troncoencefálicas

En este caso, el recuento fue realizado sobre el rafe dorsal (DR), el locus coeruleus (LC), el núcleo parabraquial (LPB) y la sustancia gris periacueductal (PAG). Dado que el electrodo fue implantado en el NI y este tiene unas dimensiones muy reducidas, no se realizó el recuento sobre esta estructura.

Como resultado del recuento y la comparación de los dos grupos experimentales estudiados, observamos que en el grupo estimulación se produjo incremento del número de células reactivas en todas las regiones troncoencefálicas analizadas. En la Tabla 9 se muestran las medias y desviaciones estándar de los dos grupos de estudio, así como los resultados obtenidos a partir de la prueba estadística de Mann-Whitney que empleamos para comparar las dos condiciones experimentales y en la Figura 50 se muestran las microfotografías de LPB.

Tabla 9: Recuento de células inmunorreactivas para c-Fos en regiones troncoencefálicas

Estructura	Área μm^2	Sham	Estimulación
DR	200	3.8 ± 1.92	$12.33 \pm 1.58^{**}$
LC	200	3.4 ± 0.894	$8.89 \pm 1.67^{***}$
LPB	200	5.2 ± 1.30	$7.78 \pm 1.56^*$
PAG	100	2.8 ± 0.84	$4.22 \pm 1.86^\dagger$

*Nota: Media \pm error estándar. Significación estadística en la comparación por pares del grupo sham con el grupo estimulación: ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, $\dagger < 0.08$.

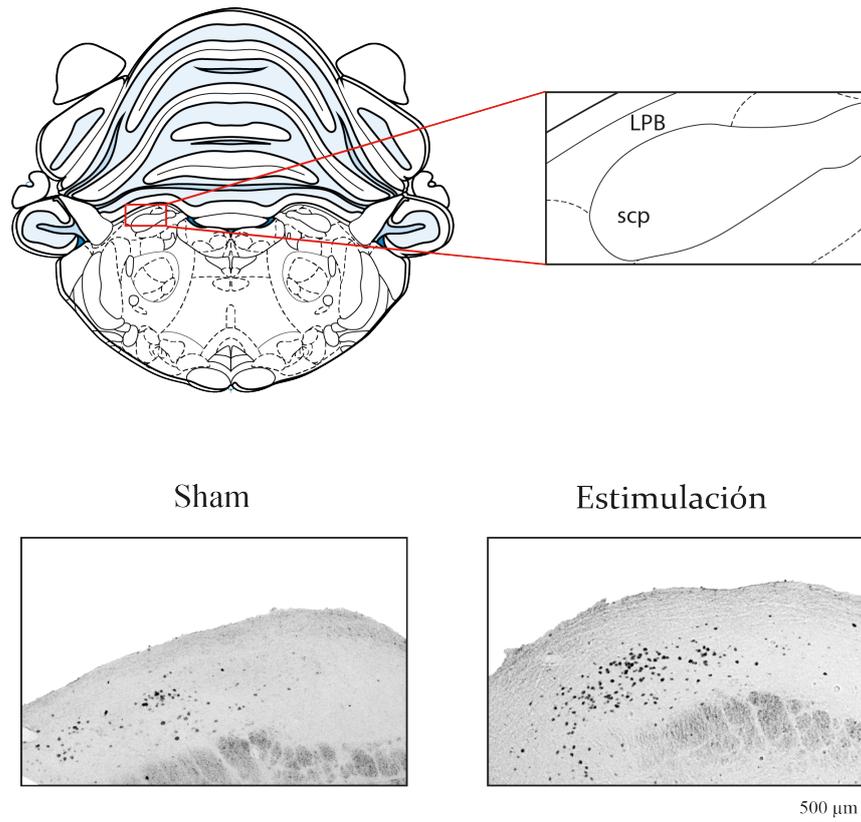


Figura 50: Marcaje de c-Fos en el núcleo parabraquial. Fotografía representativa del marcaje en el grupo sham y el grupo estimulación. El grupo estimulación muestra un incremento significativo de la expresión de la proteína frente al grupo sham. LPB: núcleo parabraquial.

5

RESUMEN DE LOS RESULTADOS

Distribución espectral (potencia relativa)						Frecuencia dominante (Hz)																																																							
	HPCd	HCdi	HPCv	BLA	IL	HPCd	HCdi	HPCv	BLA	IL																																																			
0,3-1,5 Hz	Machos	↓	↓	↓	↓	Machos	3,7	3	2,6	1,6	1,5																																																		
	Hembras	↓	↓	↓	↓	Hembras	2,3	2	1,9	1,6	1,4																																																		
1,5-2,5 Hz	Machos	-	-	-	-	<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="5">Regiones theta 2,5-6 Hz</th> </tr> <tr> <th></th> <th>HPCd</th> <th>HCdi</th> <th>HPCv</th> <th>BLA</th> <th>IL</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>nº</td> <td>Machos</td> <td>↑</td> <td>↑</td> <td>↑</td> <td>↑</td> <td>↑</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Hembras</td> <td>↑</td> <td>↑</td> <td>↑</td> <td>↑</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">duración</td> <td>Machos</td> <td>↑</td> <td>-</td> <td>↑</td> <td>↑</td> <td>↑</td> </tr> <tr> <td>Hembras</td> <td>↑</td> <td>↑</td> <td>↑</td> <td>↑</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">t total</td> <td>Machos</td> <td>↑</td> <td>↑</td> <td>↑</td> <td>↑</td> <td>↑</td> </tr> <tr> <td>Hembras</td> <td>↑</td> <td>↑</td> <td>↑</td> <td>↑</td> <td>↑</td> </tr> </tbody> </table>					Regiones theta 2,5-6 Hz						HPCd	HCdi	HPCv	BLA	IL	nº	Machos	↑	↑	↑	↑	↑		Hembras	↑	↑	↑	↑	-	duración	Machos	↑	-	↑	↑	↑	Hembras	↑	↑	↑	↑	-	t total	Machos	↑	↑	↑	↑	↑	Hembras	↑	↑	↑	↑	↑
	Regiones theta 2,5-6 Hz																																																												
	HPCd	HCdi	HPCv	BLA	IL																																																								
nº	Machos	↑	↑	↑	↑						↑																																																		
	Hembras	↑	↑	↑	↑						-																																																		
duración	Machos	↑	-	↑	↑						↑																																																		
	Hembras	↑	↑	↑	↑						-																																																		
t total	Machos	↑	↑	↑	↑						↑																																																		
	Hembras	↑	↑	↑	↑						↑																																																		
	Hembras	-	-	-	-																																																								
2,5-6 Hz	Machos	↑	↑	↑	↑	<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="5">Regiones theta 6-12 Hz</th> </tr> <tr> <th></th> <th>HPCd</th> <th>HCdi</th> <th>HPCv</th> <th>BLA</th> <th>IL</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>nº</td> <td>Machos</td> <td>↑</td> <td>-</td> <td>↑</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Hembras</td> <td>↑</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">duración</td> <td>Machos</td> <td>↑</td> <td>↑</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>Hembras</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">t total</td> <td>Machos</td> <td>↑</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>↑</td> </tr> <tr> <td>Hembras</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>↑</td> </tr> </tbody> </table>					Regiones theta 6-12 Hz						HPCd	HCdi	HPCv	BLA	IL	nº	Machos	↑	-	↑	-	-		Hembras	↑	-	-	-	-	duración	Machos	↑	↑	-	-	-	Hembras	-	-	-	-	-	t total	Machos	↑	-	-	-	↑	Hembras	-	-	-	-	↑
	Regiones theta 6-12 Hz																																																												
	HPCd	HCdi	HPCv	BLA	IL																																																								
nº	Machos	↑	-	↑	-						-																																																		
	Hembras	↑	-	-	-						-																																																		
duración	Machos	↑	↑	-	-						-																																																		
	Hembras	-	-	-	-						-																																																		
t total	Machos	↑	-	-	-						↑																																																		
	Hembras	-	-	-	-						↑																																																		
	Hembras	↑	↑	↑	-																																																								
6-12 Hz	Machos	↑	↑	↑	↑																																																								
	Hembras	↑	↑	-	-																																																								
12-16 Hz	Machos	↑	↑	↑	↑																																																								
	Hembras	↑	↑	↑	↑																																																								
16-30 Hz	Machos	↑	↑	↑	↑																																																								
	Hembras	↑	↑	↑	↑																																																								
30-60 Hz	Machos	↑	↑	↑	↑																																																								
	Hembras	↑	↑	↑↑	↑																																																								
60-90 Hz	Machos	↑	↑	↑	↑																																																								
	Hembras	↑	↑	↑	↑																																																								

Figura 51: Resumen de los resultados del estudio de actividad.

		Acoplamiento de fase (wPLI)				Información mútua			
		2.5-6 Hz	6-12 Hz	30-60 Hz	60-90 Hz	30-60 Hz	60-90 Hz		
HPCd-HPCi	Machos	↑	↑	-	↑	HPCd-HPCi	Machos	-	↑
	Hembras	↑	↑	-	↑		Hembras	-	-
HPCd-HPCv	Machos	↑	↑	-	↑	HPCd-HPCv	Machos	-	-
	Hembras	↑	↑	-	↑		Hembras	-	-
HPCd-BLA	Machos	↑	-	-	↑	HPCd-BLA	Machos	↑	-
	Hembras	↑	↑	-	↑		Hembras	-	-
HPCd-IL	Machos	-	-	-	↑	HPCd-IL	Machos	-	-
	Hembras	-	-	-	-		Hembras	-	-
HPCi-HPCv	Machos	↑	↑	-	↑	HPCi-HPCv	Machos	↓	-
	Hembras	-	-	↓	↑		Hembras	↓	-
HPCi-BLA	Machos	-	-	-	-	HPCi-BLA	Machos	↓	↑
	Hembras	-	-	↓	↑		Hembras	↓	-
HPCi-IL	Machos	-	-	-	↑	HPCi-IL	Machos	↓	-
	Hembras	↑	-	-	↑		Hembras	-	-
HPCv-BLA	Machos	-	-	-	↑	HPCv-BLA	Machos	-	-
	Hembras	-	-	-	-		Hembras	-	-
HPCv-IL	Machos	-	-	-	↑	HPCv-IL	Machos	-	-
	Hembras	-	-	-	↑		Hembras	-	-
BLA-IL	Machos	↑	↑	-	↑	BLA-IL	Machos	-	-
	Hembras	↑	↑	-	↑		Hembras	-	-

Figura 52: Resumen resultados del estudio de sincronización.

Acoplamiento Theta 2.5-6 Hz - Gamma						
		HPCd	HCdi	HPCv	BLA	IL
2.5-6 Hz 30-60 Hz	Machos	↑	↑	-	-	-
	Hembras	-	-	-	-	-
2.5-6 Hz 60-90 Hz	Machos	↑	↑	-	-	↑
	Hembras	-	-	-	-	↑

Figura 53: Resumen de los resultados del estudio del acoplamiento theta-gamma.

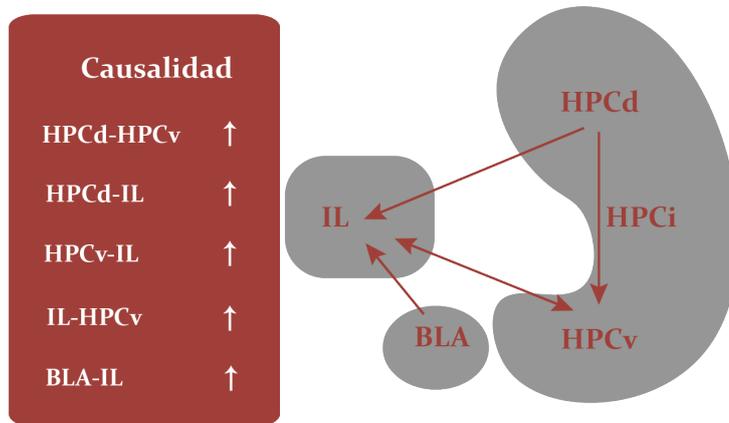


Figura 54: Resumen de los resultados del estudio preliminar de la causalidad.

Expresión de c-Fos					
Corteza	Áreas	Hipocampo	Amígdala	Diencefalo	
CE ↑	Septales	HPCd-CA1 †	BLA -	CM	-
Cg ↑	LSD ↑	HPCd-CA2 -	BMA -	PV	↑
Ect ↑	LSI ↑	HPCd-CA3 -	CeA †	PaAP	↑
M1 ↑	LSV ↑	HPCd-GD -	MeA -	Troncoencéfalo	
IL ↑	MS ↑	HPCi-CA1 -	LA †		
PL ↑	VDB ↑	HPCi-GD -	Apir -	DR	↑
DTT ↑		HPCv-CA1 †	PLCo -	LC	↑
VTT ↑		HPCv-CA2 †	PMCo -	LPB	↑
		HPCv-CA3 -		PAG	-
		HPCv-GD -			

Figura 55: Resumen de los resultados del estudio de expresión de la proteína c-Fos.

DISCUSIÓN

6.1 EL NI COMO ACTIVADOR DEL PROCESAMIENTO EMOCIONAL Y COGNITIVO

La respuesta de estrés constituye un conjunto de adaptaciones del organismo para reaccionar ante una situación que saca al organismo de sus condiciones óptimas. Esa respuesta posee un valor adaptativo para adecuar la respuesta ante un entorno cambiante y que, en ocasiones, puede amenazar la supervivencia. En condiciones normales, una respuesta de estrés adecuada es necesaria y útil. Es por ello, que está también relacionada con el aprendizaje y la memoria, ya que el sistema nervioso debe aprender sobre los estresores y cómo afrontar exitosamente situaciones estresantes.

En esta Tesis Doctoral hemos querido profundizar en el estudio de un núcleo neuronal implicado en el control de esta respuesta, con el objetivo de analizar su implicación en la coordinación de un circuito integrador de la respuesta emocional y el procesamiento cognitivo. De manera resumida, en nuestro trabajo hemos puesto en evidencia la capacidad del NI de inducir cambios en la comunicación del circuito amigdaló-hipocámpico-prefrontal, así como activar una red más amplia de estructuras relacionadas con el estrés y la ansiedad. En conjunto, estos mecanismos pueden favorecer la integración de información emocionalmente relevante, proporcionarle un contexto y regular el comportamiento.

El estrés ha sido recurrentemente relacionado con trastornos psiquiátricos, como la ansiedad y la depresión, lo que ha motivado que el estudio de los sistemas y mecanismos asociados a la respuesta al estrés hayan sido ampliamente estudiados. La respuesta a los estímulos estresantes es elaborada y es llevada a cabo por una amplia y diversa serie de estructuras cerebrales, que, en conjunto, son capaces de detectar los eventos estresantes y desarrollar una respuesta adecuada (Dedovic et al., 2009; McEwen et al., 2015). El complejo sistema responsable de la respuesta al estrés está altamente conservado evolutivamente y está modulado en varios niveles del sistema nervioso central, como son los encargados del aprendizaje, la memoria y la toma de decisiones (Sapolsky y Pulsinelli, 1985; Sapolsky et al., 1985; Pavlides et al., 1993; Sapolsky, 2000; McEwen, 2007; Bains et al., 2015).

En numerosas ocasiones, los estudios sobre el circuito modulador de la respuesta al estrés se han centrado en el papel que juegan de los núcleos del tronco encefálico, los cuales modulan los niveles de excitación a través de sus proyecciones monoaminérgicas ascendentes (Ryan et al., 2011). El NI, localizado en el tegmento dorsal y compuesto principalmente por neuronas de naturaleza GABAérgica, se ha descrito como la fuente de un amplio abanico de proyecciones que alcanzan varias partes del cerebro, incluyendo la corteza prefrontal, el septum medial, el hipocampo, la amígdala, el hipotálamo y los núcleos del rafe (Goto et al., 2001; Olucha-Bordonau et al., 2003). Dado que proyecta ampliamente a implicadas en el estrés, ansiedad, depresión, excitación y cognición, desde las primeras descripciones de su conectividad, se ha postulado su papel como integrador cognitivo-emocional (Goto et al., 2001; Olucha-Bordonau et al., 2003) y, más recientemente se ha propuesto que este núcleo podría estar involucrado en afecciones neuropsiquiátricas como la ansiedad (Watanabe et al., 2011; Ryan et al., 2011; Kumar et al., 2017; Lawther et al., 2015; 2018; Rytova et al., 2019; de Ávila et al., 2020) o la adicción (Nova-Marques et al., 2018).

La adaptación frente a las amenazas es un aspecto esencial para la supervivencia, los factores estresantes inician una respuesta fisiológica diversa en la que participan múltiples ejes. Uno de ellos es el eje hipotálamo-pituitario-suprarrenal (HPA). Este es el responsable de la respuesta mediada por hormonas esteroideas, reguladas por la corticotropina hipofisaria. Estas hormonas parecen tener efectos tanto a largo plazo, regulando la transcripción genómica (De Kloet et al. 1998) como a corto plazo, regulando la química del cerebro mediante mecanismos no genómicos (De Kloet et al. 2008). Así mismo, el factor liberador de corticotropina (CRF) ha sido identificado como un neuropéptido clave responsable de iniciar muchas de las respuestas endocrinas, autonómicas y conductuales al estrés (Deak et al., 1999; Wellman et al., 2015) y de regular la respuesta fisiológica a los factores estresantes externos (Daniels et al., 2004; Dunn y Swiergiel, 2008; Rajkumar et al., 2016). La expresión de CRF es notablemente superior en el hipotálamo, amígdala, áreas corticales y regiones septales (Boorse y Denver, 2006; Potter et al., 1994). Precisamente, como se ha evidenciado en roedores, el NI presenta una expresión destacable del receptor tipo I para el factor liberador de corticotropina (CRF₁) (Potter et al., 1994; Bittencourt y Sawchenko, 2000; Van Pett et al., 2000). Además, son numerosos los estudios que evidencian la sensibilidad de NI al estrés y la ansiedad (Chalmers et al, 1995; Cullinan et al, 1995; Passerin, 2000; Bittencourt y Sawchenko, 2000; Van Pett et al, 2000; Singewald, 2000; Tanaka et al, 2005; Banerjee et al., 2009; Lawther et al, 2015; Rajkumar et al., 2016).

El NI, además, contiene neuropéptidos relacionados con el estrés y la ansiedad, así como con el procesamiento cognitivo. Las neuronas del NI expresan colecistoquinina (CCK) (Olucha-Bordonau et al., 2003; Szlaga et al., 2022), un neuromodulador implicado en la respuesta

de estrés, la recompensa la ansiedad y el pánico, y que interviene también en el procesamiento cognitivo (Daugé y Lena, 1998) a través de distintos receptores (Rotzinger y Vaccarino, 2022). Además, el NI presenta la mayor población liberadora de relaxina (RLX₃). Este neuropéptido juega un papel fundamental en la modulación la respuesta hipotalámica al estrés (Watanabe et al, 2011; McGowan et al, 2014). Estudios han evidenciado que la exposición a factores estresantes induce una mayor expresión de RLX₃, así como de su receptor nativo, mientras que el tratamiento con un antagonista del receptor reduce la respuesta comportamental al estrés relacionada con la ingesta (Calvez et al., 2016). Así mismo, las neuronas de NI que liberan RLX₃ han demostrado coexpresar el CRF₁ y la abolición de este receptor ha demostrado inducir una reducción de la liberación de RLX₃ así como un déficit conductual en la respuesta al miedo (Lee et al., 2014). Por tanto, en condiciones estresantes se ha observado un incremento de los niveles de este neuropéptido, cuyo principal origen es el NI.

De igual manera, numerosos estudios respaldan la activación de las neuronas de NI en respuesta al estrés. La expresión de la proteína c-Fos es una medida aceptada de activación neuronal (Hoffman et al., 1993; Kovacs, 1998; Kovacs, 2008). Estresores tanto agudos como crónicos provocan un aumento específico en la expresión de c-Fos en diferentes estructuras que median la respuesta al estrés (Bozas et al., 1997; Kelly et al., 2011; Keshavarzy et al., 2014; Noh et al., 2012). Además, se ha demostrado que tanto la exposición a distintos estresores como la inyección intraventricular de CRF incrementan la expresión de la proteína c-Fos en el NI (Tanaka et al., 2005; Rajkumar et al., 2016).

Además de participar en la respuesta de estrés, el NI es capaz de modular el procesamiento cognitivo. Estudios previos llevados a cabo por nuestro grupo de investigación y otros han mostrado la importancia de este núcleo en la regulación de la actividad theta del hipocampo (Nuñez et al., 2006; Teruel-Martí et al., 2008; Cervera-Ferri et al., 2011; Ma et al., 2009, 2013; Martínez-Bellver et al., 2015, 2017; Lu et al., 2020). Esta oscilación resulta de importante relevancia para los procesos cognitivos dependientes del hipocampo, como la navegación espacial y el procesamiento de la memoria (O'Keefe y Burgess, 1999, Leutgeb et al., 2005; Moser y Moser, 1998; Buzsáki y Moser, 2013; Nuñez y Buño, 2021), pero también, dada la regionalización dorsoventral del hipocampo, en la respuesta de estrés y ansiedad (Cornwell et al., 2012; Wells et al., 2013; Strange et al., 2014; Korotkova et al., 2017). En concreto, nuestro grupo pudo comprobar que el NI es incluso capaz de reiniciar la fase de esta frecuencia en la región dorsal del hipocampo, proceso que proporciona las condiciones óptimas para la codificación de la memoria (Martínez-Bellver et al., 2017; Martínez-Bellver et al., 2015), lo que sugiere que, ante un estímulo relevante o un estresor, puede proporcionar un marco temporal adecuado para la integración

de la respuesta cognitiva (McCartney et al., 2004; Williams y Givens, 2003).

En base a todo lo expuesto anteriormente, se ha llegado a proponer al NI un núcleo clave en la respuesta de *arousal*, estrés y memoria (Goto et al, 2001; Ryan et al, 2011, Lu et al., 2020), como un nodo en la integración de la respuesta de estrés (Walker y Lawrence, 2016) e incluso como posible diana terapéutica en alteraciones neuropsiquiátricas (Kumar et al., 2017). Este trabajo tiene como objetivo indagar en cuál puede ser la contribución del NI en el circuito de estrés y a su integración con procesos cognitivos, partiendo de su sensibilidad a éste y su capacidad para generar y reiniciar la oscilación theta en el HPCd.

Estudios realizados en roedores han demostrado que el estado de los ejes gonadal (hipotalámico-pituitario-gonadal, HPG) y suprarrenal (hipotálamo-pituitario-suprarrenal, HPA) puede influir en el aprendizaje y la función de la memoria. Se han demostrado también que existen diferencias sexuales entre machos y hembras sobre el impacto que el estrés crónico tiene sobre el desempeño de tareas de memoria (Luine, 2006, 2017). Además, estudios previos de nuestro grupo han puesto de evidencia que la administración de una droga ansiógena produce la activación de neuronas del NI en machos pero no en hembras (Vila-Merkle, 2022). Por esta razón, realizamos un estudio en ambos sexos con el fin de analizar si la respuesta a la activación de este núcleo presentaba diferencias existentes en los mecanismos subyacentes a la gestión del estrés.

6.2 EL NI ALTERA EL PATRÓN OSCILATORIO DE LAS ESTRUCTURAS DEL CIRCUITO AMÍGDALO-HIPOCÁMPICO-PREFRONTAL

Los resultados obtenidos en el presente trabajo han evidenciado los cambios producidos por la estimulación eléctrica del NI sobre la actividad de las señales bioeléctricas registradas en las regiones estudiadas. En resumen, hemos podido observar que el NI, suprime las ondas lentas predominantes en ratas anestesiadas con uretano, induciendo una activación generalizada, que implica un aumento de la potencia relativa de toda la actividad oscilatoria entre 2.5 y 90 Hz, en los rangos theta, alpha, beta y gamma.

Específicamente, la actividad theta aparece de manera más consistente en el HPCd, con periodos prolongados y persistentes, que descienden progresivamente de frecuencia. En general, tanto en la frecuencia dominante como en el tiempo ocupado por la oscilación theta, se da un patrón HPCd >HPCi >HPCv >BLA >IL, con una actividad theta mucho más dispersa en esta última región. Sin embargo, en hembras hemos observado una frecuencia dominante más baja de manera generalizada.

Además, la estimulación de NI incrementa la actividad gamma en todo el circuito, así como el trasiego de información a estas frecuencias entre estructuras. Los resultados de la información mutua demuestran que NI induce un aumento de la comunicación entre BLA y las regiones intermedia y dorsal del hipocampo, así como entre HPCd e HPCi.

Tanto la actividad theta como gamma muestran una mayor sincronización entre estructuras del circuito durante la estimulación. La actividad theta se sincroniza entre todas las regiones hipocámpicas, así como con BLA, y entre BLA e IL, y la sincronización en la banda 60-90 Hz es generalizada en la red. También, en respuesta a la estimulación, se produce un aumento en el acoplamiento theta-gamma en HPCd y en corteza IL.

Por último, aunque los resultados del estudio de causalidad son preliminares, hemos observado que la actividad del NI es capaz de alterar la direccionalidad de la comunicación en el circuito. Bajo su influencia, aumenta el flujo de información procedente de HPCd hacia las restantes estructuras, y se produce también un aumento de la información dirigida hacia IL.

Los ritmos cerebrales, ampliamente conservados evolutivamente, son la expresión de la actividad eléctrica rítmica y/o repetitiva generada en el sistema nervioso. Si bien sabemos que algunos de estos ritmos están altamente relacionados con la cognición (Cannon et al., 2014) y pese a que son numerosos los trabajos que tratan la relación entre los ritmos cerebrales y el comportamiento, aún no se ha alcanzado un consenso sobre el papel de las oscilaciones en diferentes tareas, así como sobre los mecanismos subyacentes que los evocan. No obstante, hay evidencias que sustentan el papel de las oscilaciones en la representación, en el flujo o en el almacenamiento y recuperación de la información (Sejnowski y Paulsen, 2006), estando estas correlacionadas con la percepción, memoria y movimiento (Jones et al., 2010; Sacchet et al., 2015; Buzsáki, 2006; Wang, 2010; Pritchett et al., 2015). Además, la disrupción del estado natural de los ritmos cerebrales ha sido interpretada como biomarcador de numerosas patologías, como son la enfermedad de Parkinson (Little y Brown, 2014; Sanmarino et al., 2022), el autismo (Khan et al., 2015; Xiang et al., 2016) o la esquizofrenia (Gonzalez-Burgo, et al. 2015).

Estudios anteriores realizados en ratas anestesiadas con uretano demostraron el papel del NI en la generación del ritmo theta de hipocampo, pues constituye el nexo entre el principal activador tronco-encefálico de la oscilación, el núcleo reticular pontino oral (RPO), y el complejo septum medial/banda diagonal de Broca (Teruel-Martí et al., 2008), el cual está ampliamente documentado como el marcapasos de la actividad theta de hipocampo (Stumpf et al., 1962; Gaztelu y Buño, 1982; Alonso et al., 1987; Hangya et al., 2009; Kocsis et al., 2022). Además, es necesaria su integridad para originar esta oscilación mediante

estimulación pontina (Nuñez et al., 2006) y su estimulación eléctrica o por optogenética es capaz de generar actividad theta en HPCd (Nuñez et al., 2006; Lu et al., 2020), así como la administración del neuropéptido RLX3 (Ma et al., 2009). También se ha descrito la presencia de una oscilación theta en NI altamente acoplada a la del HPCd mediante el uso de un modelo de generación de ritmo theta en hipocampo como es la estimulación eléctrica y colinérgica de RPO (Cervera-Ferri et al., 2011). En esta Tesis Doctoral ampliamos los efectos conocidos del NI sobre el HPCd a toda la extensión dorsoventral del hipocampo, así como a la amígdala y la corteza prefrontal. Además, hemos podido observar que no sólo influye sobre la oscilación theta sino sobre otras bandas de frecuencia, generando una actividad gamma local en todo el circuito.

6.2.1 *La potencia de las ondas lentas se vio mermada por la estimulación eléctrica del NI*

Tal como se había observado en estudios previos del grupo (Nuñez et al., 2006), la estimulación de NI redujo significativamente la actividad de ondas lentas característica de la anestesia, no sólo en HPCd sino en todo el circuito. Esta respuesta era esperable al tratarse de un núcleo cuya estimulación induce un estado de arousal o excitación (Lu et al., 2020).

Las ondas lentas son propias de los estados tanto del sueño como de la anestesia (Steriade et al., 1993; Vyazovskiy et al., 2009a; Zucca et al., 2017), y en ambos casos, estas ondas muestran un patrón que alterna periodos transitorios de elevada activación neuronal (estados UP) con estados casi silentes, con una inhibición generalizada (estados DOWN). Estos patrones alternos son más irregulares durante los periodos de sueño mientras que bajo la acción de ciertos anestésicos estos patrones alcanzan mayor regularidad (Akeju y Brown. 1999). En este último caso, el diferente patrón observado bajo anestésicos depende más del nivel de anestesia que del propio anestésico (Torao-Angosto et al., 2021). En animales anestesiados con uretano el patrón oscilatorio que se observa es similar al observado durante el sueño no REM (REM: por ^atextitrapid eyes movement), durante el cual predominan las oscilaciones de gran amplitud y frecuencia lenta (Steriade et al., 1993). Los estados DOWN o fase de hiperpolarización son estados inactivos, durante los cuales prácticamente todas las neuronas corticales se hiperpolarizan profundamente y permanecen en silencio. Estos estados, como decíamos, se alternan con estados UP o fase de despolarización, en este estado, el potencial de membrana de las neuronas corticales vuelve al umbral de activación, propagándose hacia otras regiones (Steriade et al., 2001).

El sueño sabemos que es importante tanto para la consolidación de la memoria selectiva como para el olvido, así como para procesos

de recuperación, crecimiento y homeostasis (Born et al., 2006; Buzsáki, 1989; Marshall y Born, 2007; Poe, 2017; Tononi y Cirelli, 2014) y en estos procesos, la actividad de ondas lentas juega un importante papel. Pese a que las oscilaciones lentas son un patrón emergente de la red cortical, estos ciclos no se originan en todas las regiones de forma homogénea, ya que están más concentrados en ciertas regiones y ausentes en otras (Massimini et al., 2004). Estas ondas se generan principalmente en regiones prefrontales y viajan hacia poblaciones neuronales distribuidas en una red de gran tamaño, localizadas en la corteza cerebral y en algunas estructuras subcorticales entre las que se incluyen el hipocampo, el tálamo o el tronco del encéfalo, facilitando la activación local de dichas poblaciones neuronales durante los estados UP (van Someren et al., 2011).

Nuestros resultados mostraron un descenso de la potencia de ondas lentas tanto en las regiones hipocampales como en amígdala y corteza IL inducido por la estimulación eléctrica del NI, lo que implicaría un efecto inhibitorio de este núcleo sobre las regiones generadoras de estas oscilaciones. Adicionalmente, en el estudio comparativo de los efectos dependientes del sexo no observamos diferencias entre machos y hembras. Estos resultados sugieren una desconexión por parte de la corteza, sustrato principal de las ondas de baja frecuencia, iniciando un estado de hiperpolarización que dificultaría la consolidación de memoria, que es uno de los déficits asociados con el estrés (Kloet et al., 1998; Kim y Diamond, 2002; Sandi, 2004).

Diferentes estudios han mostrado la aparición de ondas lenta prominentes en relación con el estrés y la ansiedad. La aplicación de la estimulación cerebral profunda en IL, tratamiento con efectos ansiolíticos, origina el incremento de la potencia de las ondas lentas de manera marcada en toda la extensión dorsoantral del hipocampo y en BLA (Vila-Merkle et al., 2021). Una actividad similar aparece en la corteza IL un tiempo después de la estimulación de la amígdala central como paradigma de estrés agudo, lo que ha sido interpretado como mecanismo favorecedor de la consolidación de la memoria tras un evento estresante (Luque-García et al., 2018). Recientemente, además, se ha observado muy recientemente que la irrupción durante la vigilia de periodos de ondas lentas similares a los del sueño contribuye a lapsus atencionales (Pinggal et al., 2022). Por tanto, la supresión de ondas lentas puede contribuir a un estado atencional.

Los resultados del estudio de c-fos han mostrado un efecto relevante del NI sobre la activación neuronal en PL e IL. Estudios complementarios para caracterizar si las poblaciones neuronales implicadas en cada caso son interneuronas GABAérgicas o piramidales serían necesarios para comprender los mecanismos por los que suprime las ondas lentas.

En conjunto, los efectos observados en la actividad de ondas lentas muestran que el NI induce en el circuito estudiado una desincronización típica de estados de atención elevada y arousal.

6.2.2 *La estimulación eléctrica del NI activa la oscilación theta bajo en el circuito amigdalohipocámpico-prefrontal*

El análisis espectral permitió observar que, en las tres regiones registradas del hipocampo, ventral, intermedia y dorsal, el NI indujo un incremento de la potencia relativa de la onda theta bajo (2.5-6 Hz) tanto en machos como en hembras. El análisis tiempo-frecuencia, además, mostró que esta actividad theta era más persistente en la región dorsal y más fragmentada en las regiones intermedia y ventral.

La oscilación theta es uno de los ritmos más estables que se pueden registrar en el cerebro de mamíferos y es precisamente el hipocampo la estructura principalmente involucrada en la generación de esta onda (Nuñez y Buño, 2021). Si bien no hay un consenso claro sobre su correlación con distintos comportamientos, esta frecuencia además de estar presente durante las fases del sueño REM (Jouvet, 1969; Cowdin et al., 2014), se cree que contribuye a una serie de procesos conductuales, cognitivos y afectivos que incluyen la excitación o *arousal*, la integración sensoriomotora, la actividad locomotora voluntaria (Oddie y Bland, 1998;) y constituye un mecanismo clave para la integración de la información en los procesos mnemónicos (Vanderwolf, 1969; Kragel et al., 2020). Concretamente, la actividad theta de alta frecuencia correlaciona mejor con comportamientos exploratorios y con la locomoción, siendo independiente de acetilcolina, por lo que a este tipo de actividad también se le denomina tradicionalmente theta no colinérgico, aunque recientemente se ha demostrado que sí está modulado por este sistema; en cambio, el ritmo theta de baja frecuencia aparece en estados de alerta, inmovilidad y de atención, así como durante el sueño REM, y este sí es dependiente de las aferencias colinérgicas (Wu y Yakel, 2022).

Son varias las investigaciones que demuestran la aparición de actividad theta en el hipocampo correlacionada con situaciones de *arousal* y ansiedad (Adhikari et al., 2011) como son la exposición a lugares inseguros, la presencia de depredadores o el condicionamiento del miedo (Seidenbecher et al., 2003). Además, los fármacos ansiolíticos como las benzodiazepinas e inhibidores de la recaptación de serotonina han demostrado ser efectivos para la reducción de la frecuencia de la actividad theta hipocámpica tanto en ratas con libertad de movimiento como en anestesiadas con uretano (McNaughton y Coop, 1991; Yeung et al., 2012), lo que apoya la relación existente entre la ansiedad y la actividad theta del hipocampo, habiendo sido incluso descrito como un biomarcador de ansiedad (McNaughton, 2017). Cabe señalar que, en ratones con movimiento libre se ha demostrado que la

activación optogenética de neuronas de NI correlaciona no sólo con la presencia de ritmo theta en el HPCd sino también con el nivel de *arousal*, mientras que su inhibición suprime estos procesos (Lu et al., 2020).

No obstante, el hipocampo es un área funcionalmente compleja que participa en la ejecución de comportamientos tan diversos como la navegación espacial y las emociones. Mientras que la región dorsal se ha relacionado con la navegación espacial (Maurer et al., 2005; Moser y Moser, 1998), mientras que la porción ventral (temporal) se ha asociado con respuestas emocionales a estímulos excitantes (Bannerman et al., 2005). Y pese a que se conoce que es una estructura sensible al estrés (Duman, 2022), ambas regiones parecen desempeñar un papel dual en la respuesta al estrés donde la región dorsal experimenta plasticidad adaptativa, facilitando el escape o la evitación del factor estresante, y la región ventral esté más involucrada en las facetas emocionales de la experiencia estresante (Hawley y Leasure, 2012). En el caso del hipocampo intermedio, aunque su papel no está claro, los estudios de comportamiento sugieren que su funcionalidad es distinta, al menos, del hipocampo dorsal (Bast et al., 2009; Kenney y Manahan-Vaughan, 2013), contribuyendo al valor motivacional del procesamiento espacial (Jin y Lee, 2021).

Estos correlatos comportamentales tan dispares pueden comprenderse mejor al interpretar el papel del hipocampo como un asociador, capaz de integrar, durante la codificación y la recuperación de la memoria, estímulos de distinta naturaleza, y por tanto dispersos en áreas corticales (Wallenstein et al., 1998). La oscilación theta proporciona al hipocampo la capacidad de enmarcar temporalmente los eventos neuronales que constituyen un engrama (Josselyn y Tonegawa, 2020), lo que hace posible la identificación de eventos relacionados entre sí, como es el caso de los distintos componentes de un recuerdo (Goode et al., 2020). Por su parte, la existencia de un mapa cognitivo en el hipocampo proporciona un contexto espacial, constituido por las denominadas *place cells* presentes en la región dorsal y complementado por células que responden a la significación motivacional y a la ansiedad en las regiones intermedia y ventral (*anxiety cells*) (O'Keefe y Nadel, 1978 ; Jin y Lee, 2021; Turner et al., 2022).

En casi todos los niveles de estudio realizados sobre el hipocampo, desde trazado de conexiones, expresión génica y función conductual han demostrado la existencia de un gradiente dorso-ventral en el hipocampo, en el cual la porción más dorsal participa en el aprendizaje espacial y la más ventral está involucrada en aspectos emocionales y motivacionales, desarrollando un papel crucial en el la asignación de valor y la recompensa (Fanselow y Dong, 2010; Strange et al., 2014). Se cree que las prominentes aferencias que recibe la región ventral del hipocampo provenientes del complejo amigdalino, incluyendo BLA, son cruciales en el aprendizaje de las señales asociadas con la

recompensa y la amenaza, en la generación de un comportamiento apropiado dirigido a un objetivo (McDonald y Mott, 2017; Petrovich et al., 2001; Strange et al., 2014; Beyeler et al., 2018; Beyeler et al., 2016; Felix-Ortiz et al., 2013; Selden et al., 1991; Sheth et al., 2008; Yang y Wang, 2017). La sincronización theta amígdalo-hipocámpica sugiere que estas dos estructuras participan conjuntamente en el sistema de consolidación de la memoria del miedo (Pape, 2005).

Dado que la implicación del NI en la respuesta al estrés y en el arousal ya ha sido demostrada (Ma y Gundlach, 2015; Ryan et al., 2011; Lu et al., 2020), nuestros resultados sugieren la respuesta oscilatoria del circuito amígdalo-hipocámpico-prefrontal en respuesta a un estímulo relevante o a un estresor que generen dicha respuesta. En concreto, nuestros resultados muestran su influencia sobre las tres regiones de hipocampo, dorsal, intermedio y ventral, en el procesamiento de la respuesta al estrés, pues la estimulación eléctrica del NI indujo un incremento significativo de la potencia relativa de la onda theta en todos los casos. No obstante, como mencionábamos anteriormente, el hipocampo es un área con diversidad funcional, lo cual parece indicar que, si bien las tres regiones podrían estar participando en la respuesta a un estresor, su implicación podría ser funcionalmente diferente, aportando cada una de las regiones su contribución para contextualizar el estresor desde un punto de vista espacial y emocional. En nuestro trabajo, también pudimos observar un incremento de la potencia relativa de la actividad theta en IL y BLA en machos, sin embargo, este incremento no alcanzó valores significativos en las hembras. En estas regiones, sin embargo, los segmentos de la oscilación que mostraban una predominancia a frecuencia theta durante la estimulación fueron menos y más breves que en las regiones hipocámpicas.

Ambas estructuras, la amígdala y la corteza prefrontal, interactúan entre ellas y con el hipocampo a través de diferentes mecanismos, incluido el intercambio bidireccional de información específica mediante la sincronización oscilatoria, específicamente en el rango de theta 4-12 Hz (Siapas et al., 2005; Hyman et al., 2005). La CPFm está involucrada en el procesamiento de información cognitiva y emocionalmente relevante, así como en la modulación de estados atencionales, la memoria y la toma de decisiones (Bush et al., 2000; MacDonald et al., 2000; Kerns et al., 2004; Eichenbaum, 2017; Moorman et al., 2015), no obstante, las distintas regiones que la componen han demostrado tener funciones diferenciadas, siendo la región IL la responsable del desarrollo de nuevas estrategias frente a los cambios, así como de la integración del estado fisiológico interno con señales ambientales (Heidbreder y Groenewegen, 2003; Peters et al., 2009; Gass y Chandler, 2013; Gourley y Taylor, 2016). Esta flexibilidad comportamental es necesaria para la adaptación a entornos cambiantes, y para superar la exposición a estresores. Por su parte, la amígdala, tradicionalmente ha sido relacionada por su papel en la regulación emocional, pero

sus extensas conexiones podrían ser indicativo de su participación en numerosos procesos. El estudio del efecto de la lesión de BLA con muscimol en machos y hembras sobre la respuesta al estrés demostró la importancia de esta región para la codificación de memoria emocional, dado que la inactivación del BLA en el momento de la exposición al estrés comprometió el aprendizaje emocional asociado a esa experiencia tanto en machos como en hembras (Wddell et al., 2008).

El incremento de la potencia relativa de theta en BLA e IL en machos durante la estimulación podría respaldar el papel de ambas estructuras en el procesamiento cognitivo y emocional frente a un estresor, permitiendo la integración de la información y la elaboración de una respuesta adaptativa. No obstante, los estudios realizados en hembras son aún escasos por lo que no está claro si existe una posible sensibilidad a los estrógenos en el BLA o de las estructuras aferentes y eferentes que puedan influir en su actividad oscilatoria.

Otro aspecto que observamos en la influencia de la estimulación eléctrica sobre la actividad theta del circuito fue el incremento de los segmentos con actividad theta registrados en el periodo de estimulación, siendo estos más numerosos y con una duración media mayor, lo cual refleja la aparición de una actividad más sostenida que durante el periodo basal. Además, la actividad más sostenida se mantuvo en el periodo posterior al fin de la aplicación de los pulsos eléctricos. Con todo ello, nuestros datos parecen demostrar la influencia de la estimulación eléctrica de NI sobre la actividad theta de las regiones registradas, tanto su influencia en la potencia de la banda como en la continuidad de la misma. No obstante, observamos el patrón previamente mencionado, $HPCd > HPCi > HPCv > BLA > IL$, con una mayor persistencia de las oscilaciones en la región dorsal del hipocampo, fraccionándose más al descender en el eje dorsoventral del hipocampo. Lubenov y Siapas (2009) demostraron, tanto en ratas anestesiadas como durante la exploración, que la oscilación theta viaja a través de este eje. Aunque sólo lo evidenciaron en las regiones dorsal e intermedia, partir de sus resultados, propusieron que este mecanismo permite la integración de los diferentes componentes proporcionados por las distintas regiones hipocámpicas. Nuestros resultados podrían ampliar este planteamiento, incorporando, además, la información procedente de BLA y de IL.

6.2.3 *La estimulación eléctrica del NI aumentó la actividad gamma en el circuito*

Las ondas gamma son oscilaciones de frecuencia rápida, presentes tanto durante los estados de vigilia como durante el sueño, que reflejan la actividad de las poblaciones neuronales a nivel local (Ray et al., 2008; Sirota et al., 2008; Buzsáki y Wang, 2012). Es por su naturaleza

local por la que han sido relacionadas con multitud de funciones. Dependiendo de la región donde se han registrado, se le atribuyen funciones tan variadas como el procesamiento perceptivo (Başar et al., 2000), la atención, el *arousal* (Strüber, et al. 2000), el reconocimiento de objetos o la percepción del lenguaje (Eulitz et al., 1996).

Los ritmos gamma del hipocampo, entre otros procesos, aumentan durante las operaciones mnemónicas (Johnson y Redish, 2007; Montgomery y Buzsáki, 2007; Sederberg et al., 2007; Jutras et al., 2009; Trimper et al., 2014) y exhiben su mayor amplitud cuando están anidadas dentro de las oscilaciones theta más lentas (Bragin et al., 1995). Si bien estos ritmos coexisten, su generación parece ser independiente y, además, las ondas gamma ocurren en ráfagas en momentos particulares dentro del ciclo theta (Bragin et al., 1995; Colgin et al., 2009) al contrario de lo que ocurre con los ritmos theta que son mucho más estables. La rápida actividad de las ondas gamma puede ser necesaria durante muchas operaciones fundamentales del hipocampo como la codificación y la recuperación de recuerdos necesarios para desarrollar una respuesta adaptativa (Colgin y Moser, 2010).

Las ondas gamma en la CPFvm han sido descritas tanto en roedores como humanos en los procesos de memoria y la inhibición del miedo condicionado (Lesting et al., 2011, 2013; Stujenske et al., 2014; Harris y Gordon, 2015). Mientras que el incremento de la actividad gamma de esta región parece estar relacionado con una correcta extinción del miedo, la disminución parece estar asociada con la incorrecta extinción (Fitzgerald et al., 2014; Mueller et al., 2014). De hecho, la lesión del NI ha demostrado ser determinante en la extinción del condicionamiento del miedo, pues es preciso que este núcleo permanezca íntegro para favorecer dicho proceso (Pererira et al., 2013).

En el caso del complejo amigdalino, las oscilaciones gamma parecen ser especialmente prominentes en BLA. Se ha observado que este ritmo aumenta en roedores durante la exploración en campo abierto (Stujenske et al., 2014) o durante la exposición a estímulos con un componente emocional (Bauer et al., 2007). Además, se ha demostrado que la relación de las oscilaciones gamma con el procesamiento del miedo en el BLA (Courtin et al., 2013). Mientras que, en el hipocampo, las oscilaciones de frecuencia gamma pueden ser esenciales para la transferencia de información hacia y desde los núcleos de la amígdala. A pesar de la prevalencia de las oscilaciones gamma en la amígdala, su función y base celular siguen sin estar claras.

Nuestros datos muestran un incremento de la actividad gamma en todas las estructuras registradas del circuito hipocampo-amígdalo-prefrontal tanto en machos como en hembras, lo que parece sugerir que la estimulación eléctrica aplicada en el NI induce un incremento de la actividad local en estas regiones. Este mecanismo puede contribuir a la atribución de un componente emocional y el desarrollo de una respuesta coordinada y adaptativa frente a un estresor.

6.3 ESTUDIO DEL DE LA ESTIMULACIÓN SOBRE LA COMUNICACIÓN DENTRO DEL CIRCUITO

6.3.1 *La estimulación de NI aumenta la sincronización en el circuito a frecuencias theta y gamma*

Un fenómeno ampliamente observado en las redes neuronales es la aparición de actividad sincrónica generada a partir de la correlación temporal entre señales. La sincronización se considera habitualmente como el mantenimiento de una diferencia de fase estable entre dos osciladores (Pikovsky et al., 2002). En general, el aumento de la sincronización entre estructuras indica un aumento en su comunicación (Fries, 2005) y se relaciona de forma directa con la transmisión y el procesamiento de la información (Bullmore y Sporns, 2009). Así, estos procesos participan en una amplia gama de funciones cognitivas y la alteración de estos patrones está relacionada con numerosos trastornos mentales.

Una medida del nivel de sincronización entre dos poblaciones neuronales es el índice de retraso de fase ponderado (wPLI). Nuestros resultados muestran un incremento significativo en el wPLI, y por tanto en la sincronización de fase a la frecuencia theta entre HPCd y las otras regiones hipocámpicas registradas, así como con BLA, tanto en machos como en hembras. La sincronización theta amigdalohipocámpica ha sido descrita como consolidación de la memoria del miedo (Pape, 2005) y durante su recuperación (Seindenbecher et al., 2003).

Nuestros resultados fueron observados parecen sugerir que frente al estímulo eléctrico aplicado en el NI estas estructuras reinician la fase de la fase del ciclo en onda theta, sincronizando su respuesta frente al estímulo y que en particular la sincronización entre hipocampo y BLA podría ser clave en la consolidación de memoria frente a un estresor.

Las oscilaciones proporcionan ventanas temporales que permiten la integración de los distintos estímulos (Keil y Senkowski, 2018). El reinicio de la fase permite crear una ventana nueva ante un estímulo relevante y favorece su procesamiento, es por ello, que el ordenamiento o la alineación de la fase a los estímulos con elevada saliencia favorece su codificación y la transmisión de la información comportamentalmente relevante (Volloh y Womelsdorf, 2016).

Otro resultado destacable que encontramos analizando la diferencia de fase de la frecuencia theta, fue un incremento significativo del valor de acoplamiento entre BLA e IL tanto en theta bajo (2.5-6 Hz) como en theta alto (6-12 Hz), nuevamente entre ambos sexos. Un estudio reciente demostró la importancia de la sincronización theta entre BLA e IL, como mecanismo general de aprendizaje del miedo en diferentes especies (Chen et al., 2021). Teniendo en cuenta estos resultados, podemos suponer la existencia de un papel regulador del NI sobre la sincronización de la frecuencia theta en el circuito amigdalohipocámpico.

hipocámpico-prefrontal, pudiendo ser clave en el proceso atencional y de asociación emocional a los estímulos, así como en la recuperación de memoria en el desarrollo de una respuesta adaptativa. De hecho, las conexiones que presenta NI con las regiones registradas (Goto et al., 2001; Ryan et al., 2011) así como sobre las regiones encargadas del control del ritmo theta (Olucha-Bordonau et al., 2003; Teruel-Martí et al., 2008) capacitan a este núcleo para funcionar como regulador de la sincronización en frecuencia theta.

En el análisis de bloqueo de fase realizado sobre la frecuencia gamma, observamos que las diferencias se localizaron en el rango de actividad que oscila entre 30-60 Hz, gamma medio. Nuevamente encontramos en ambos sexos una mayor sincronización durante el periodo estimulación entre HPCd y el resto de las regiones hipocámpicas así como entre HPCd y BLA. En este caso, encontramos que el grado de sincronización de la actividad gamma tanto entre HPCd con IL y HPCv con BLA sí aumentó en el caso de los machos, pero no en el caso de las hembras. En cambio, en hembras encontramos que la estimulación indujo una mejora en la sincronización en gamma medio entre BLA e IL, fenómeno que no observamos en el caso de los machos. Estas diferencias deberían ser estudiadas en mayor profundidad para comprender sus correlatos comportamentales.

El hecho de que el NI reinicie las fases en todas las estructuras estudiadas y sincronice así su actividad parece indicar que NI es capaz de inducir en el circuito un estado óptimo para el procesamiento de la información, mejorando los procesos cognitivos como la memoria y el aprendizaje espacial mediados por HPCd e así como los procesos más emocionales mediados por HPCv y BLA y en la flexibilidad comportamental mediada por IL.

6.3.2 *La estimulación eléctrica del NI aumenta el intercambio de información a frecuencia gamma en machos*

El cerebro tiene la capacidad de integrar información de distintas fuentes, lo cual implica que de alguna manera estas fuentes estén relacionadas. La información mutua permite aproximar el grado de dependencia estadística existente entre dos poblaciones neuronales y así cuantificar el nivel de relación entre estructuras y su comunicación (Cassidy et al., 2015).

Nuestros resultados del análisis realizado sobre el grupo experimental de machos mostraron un incremento de la información mutua a frecuencia gamma bajo entre HPCd y BLA mientras que a frecuencia gamma medio el incremento se observó entre HPCd-HPCi e HPCi-BLA. Estos resultados sugieren que durante la estimulación del NI hay una reducción de la entropía entre el hipocampo y amígdala, lo cual indica que existe un incremento de la actividad compartida entre estas dos estructuras.

Ambas estructuras presentan aferencias directas o indirectas provenientes del NI y nuestros resultados, al mostrar un índice mejorado de modulación parecen sugerir que existe una actividad neuronal local acoplada a una red compuesta por diferentes estructuras cerebrales conectadas funcionalmente.

De nuevo, en este caso, la activación del NI produciría, por tanto, un mayor intercambio de información amigdaló-hipocámpica que permitiría procesar estímulos relevantes. Estudios previos de nuestro grupo han mostrado también un incremento de información mutua entre BLA e IL a frecuencias de theta bajo durante la administración de CRF, paradigma de estrés agudo (Merino et al., 2021), así como entre BLA e HPCd a frecuencias de ondas lentas y theta durante la estimulación cerebral profunda de IL, con efectos ansiolíticos (Vila-Merkle et al., 2021). En el presente trabajo hemos encontrado efectos significativos a frecuencias gamma. Esta actividad está finamente regulada en frecuencia, muy localizada y refleja la actividad local y rápida de procesamiento neuronal (Lowet et al., 2022). La relevancia de que el intercambio de información se produzca en distintas bandas de frecuencia debe afectar a la velocidad a la que se produce la computación neuronal en el circuito, por lo que en este trabajo, tratándose de estímulos breves, a diferencia de la administración farmacológica y la estimulación cerebral profunda de 1h de duración, cuyos efectos son más paulatinos, podría estar implicando un procesamiento rápido, atencional, aunque serían necesarios estudios comportamentales para verificarlo.

En este caso, el análisis realizado sobre el grupo de las hembras no mostró diferencias significativas, de forma que, si bien la aplicación de estímulos eléctricos sobre NI indujo cambios en las potencias relativas de theta, gamma y ondas lentas en hembras, puede ser que la sincronización de estas estructuras frente al procesamiento del estímulo sea diferente en machos y hembras y sería preciso verificarlo en estudios posteriores.

6.3.3 *Durante la estimulación observamos un incremento del acoplamiento fase-amplitud entre theta bajo y gamma*

En el procesamiento de la información son necesarias tanto la codificación como la ordenación de la información. Esta última es clave en el desarrollo de las funciones cognitivas y ejecutivas como por ejemplo la memoria de trabajo, la memoria episódica, la navegación espacial, la toma de decisiones o la planificación (Axmacher et al., 2010). A nivel cerebral, la codificación secuencial de los eventos se computa gracias al acoplamiento de frecuencias cruzadas, que consiste en que una frecuencia de mayor amplitud modula a una de menor amplitud y mayor frecuencia. De hecho, el acoplamiento de frecuencia

cruzada apoya la organización de los ritmos cerebrales y está presente durante una variedad de funciones cognitivas.

El acoplamiento theta-gamma consiste en que la fase de la frecuencia más lenta, theta, modula la potencia de la más rápida, gamma. Se ha demostrado que durante la expresión de miedo se produce sincronización de la actividad theta en HPC, BLA y CPFm además de un aumento en el acoplamiento theta-gamma medio (Stujenske, 2015). La consolidación de la memoria episódica requiere la participación de hipocampo y se ha demostrado que la consolidación de esta memoria tiene mayor rendimiento durante periodos de elevado acoplamiento theta-gamma (Shirvalkar et al., 2010).

Nuestros resultados mostraron un incremento del acoplamiento theta bajo (2.5-6 Hz) con frecuencias gamma en HPCd, HPCi e IL durante el periodo de estimulación. El acoplamiento theta-gamma es un fenómeno frecuentemente observado en el hipocampo y parece estar relacionado directamente con el aumento un mejor rendimiento en tareas que exigen recuperación de recuerdos previamente codificados (Tort et al., 2009). Colgin y Moser (2010) propusieron que el gamma de frecuencias 20-60 Hz proporcionaría un marco mejor para la recuperación de memoria que para su codificación. De ser así, nuestros resultados parecen sugerir que el incremento del acoplamiento theta-gamma podría estar relacionado con la recuperación de recuerdos, un proceso que es necesario en la toma de decisiones frente a un estresor. La percepción y el control frente a una situación estresante determinan el impacto de la misma y la respuesta futura que se pueda dar ante una situación similar.

Por otra parte, tanto en machos como en hembras observamos un incremento del acoplamiento theta-gamma en IL. El papel de la CPF y el hipocampo en esta capacidad para controlar el estrés parece estar clara, no obstante, el mecanismo que subyace a esta capacidad es aún desconocido. Un estudio reciente demostró una relación existente entre los niveles de acoplamiento theta-gamma en corteza prefrontal y la resistencia al estrés, ya que el incremento de este acoplamiento es mayor en los individuos resistentes (Benette Marques et al., 2021). La resistencia al estrés no consiste en la ausencia de respuesta frente a un estresor, sino que un individuo resistente es aquel que es capaz de desarrollar la respuesta más adaptativa y recuperar más rápidamente su estado basal. Es por ello, que unos niveles bajos de acoplamiento theta-gamma durante un periodo estresante podrían ser indicativo de un funcionamiento aberrante en la respuesta al estrés.

Con respecto al grupo de hembras, las principales diferencias que observamos fue que la estimulación eléctrica de NI no indujo cambios en HPCi pero sí un incremento del acoplamiento fase-amplitud entre theta y gamma en BLA. La memoria de eventos aversivos es fundamental para la supervivencia, pero en los trastornos psiquiátricos esta puede llegar a niveles desadaptativos. Se cree que la mejora

de la memoria para eventos emocionales depende de la modulación de la actividad del hipocampo por parte de la amígdala. Sin embargo, la dinámica neuronal de la comunicación entre la amígdala y el hipocampo durante la codificación de la memoria emocional sigue siendo desconocida (Costa et al., 2022). En los estudios realizados sobre modelos animales y humanos se ha demostrado que las lesiones en amígdala reducen la consolidación de elementos emocionales en los recuerdos episódicos (Adolphs et al., 1997; LaBar y Cabeza, 2006; Strange et al., 2003). Además, durante la codificación de memoria, la amígdala muestra mayor respuesta a estímulos con connotaciones emocionales. No obstante la amígdala no es un sitio de almacenamiento de memoria episódica a largo plazo, su papel está más bien relacionado con la influencia en los procesos de almacenamiento de memoria realizados en el hipocampo. Nuestros resultados muestran un incremento de la relación existente entre estas estructuras durante la estimulación en hembras, lo que podría significar que en el caso de este grupo hay mayor participación de la amígdala en la respuesta debido a una mayor percepción emocional asociada al estímulo.

Además, en el grupo de hembras otro resultado observado fue la ausencia de diferencias significativas en el acoplamiento theta-gamma en HPCi. Las diferencias funcionales de esta región del hipocampo aún no han sido estudiadas en profundidad, no obstante, esta región del hipocampo parece estar más bien implicada en la codificación del significado motivacional de un lugar (Jin y Lee, 2021). Estos resultados podrían ser la evidencia de que, en el caso de las hembras, esta estructura participa de manera menos integrada en el circuito, produciendo un déficit en la asignación de significado emocional al entorno.

6.3.4 *El NI provoca cambios en la direccionalidad del circuito*

El estudio de la causalidad permite identificar el sentido del flujo de información y las dinámicas de retroalimentación entre las estructuras que conforman la red en los diferentes estados del registro (Seth et al., 2015).

En nuestro trabajo, realizamos una primera aproximación en el estudio de la direccionalidad de la información en el circuito y observamos que la estimulación eléctrica indujo un cambio en la dinámica del circuito estudiado. En todos los animales empleados para el análisis encontramos que se produjo un incremento en la causalidad en el dominio del tiempo en sentido HPCd \rightarrow HPCv, mientras que en la mayoría de ellos también se produjo un aumento del flujo en las direcciones HPCd \rightarrow IL, HPCv \rightarrow IL, BLA \rightarrow IL, IL \rightarrow HPCv. Estos resultados muestran un aumento general del flujo de información de las estructuras registradas hacia IL así como un aumento de la direccionalidad de HPCd al resto de estructuras.

La corteza prefrontal es la región cerebral más evolucionada cuya función consiste en regular los procesos cognitivos de orden superior. Sin embargo, también es la región del cerebro más sensible a los efectos perjudiciales de la exposición al estrés, pues tanto el estrés agudo como la exposición prolongada al estrés son capaces de provocar cambios citoarquitectónicos en esta región (Holmes y Wellman, 2009; Radley et al., 2006). Barker y colaboradores propusieron que IL sea responsable de proporcionar una flexibilidad comportamental, necesaria para lograr una respuesta adaptativa (Barker et al., 2014).

El incremento del flujo de las estructuras del circuito hacia IL, por tanto, podría indicar que durante la presentación de un estímulo relevante BLA e hipocampo envían la información necesaria a IL para desarrollar una respuesta adaptativa.

6.4 LA ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA DE NI INDUJO LA ACTIVACIÓN CELULAR DE NUMEROSAS ESTRUCTURAS IMPLICADAS EN LA RESPUESTA AL ESTRÉS

Generar respuestas conductuales y afectivas apropiadas a los estímulos que inducen estrés o que señalan un peligro potencial, es fundamental para la supervivencia de los animales, en este apartado hemos centrado el estudio de expresividad de *c-Fos* en estructuras relacionadas con la modulación de la respuesta al estrés que además reciben proyecciones provenientes del NI. La activación intensa de las neuronas provoca la expresión inmediata de algunos genes, entre ellos *c-fos*, el estudio de la expresión de la proteína *c-Fos* sintetizada como resultado de la transcripción de este gen es usualmente empleada como marcador de activación neuronal.

En las regiones corticales estudiadas, entre ellas IL, se produjo en todas ellas un incremento significativo o muy significativo en los niveles de expresión de *c-Fos* durante la estimulación. Las estructuras corticales son críticas en las conductas relacionadas con el estrés, por lo nuestros resultados parecen apoyar la idea de que están participando activamente en el desarrollo de la respuesta frente al estresor. Estos resultados han mostrado su influencia no sólo en IL, cuya relevancia ya ha sido discutida, sino también en PL y en CG. En el caso de PL, se ha demostrado que diferencias estructurales o funcionales de esta región modulan la respuesta neuroendocrina (Jones et al., 2011) y la vulnerabilidad al estrés (Grossman et al., 2022)

En el caso de las regiones del hipocampo y del complejo amigdalino estudiadas, en contra de nuestras expectativas, no encontramos diferencias significativas de la expresión de esta proteína. Son numerosos los estudios que describen el importante papel de la amígdala y en concreto del núcleo basolateral en el condicionamiento del miedo, habiéndose observado un incremento de la respuesta de miedo ante entornos conocidos correlacionada con un aumento de la expresión

de c-Fos (Rajbhandari et al., 2016). Así mismo, encontramos trabajos que también relacionan el incremento de la expresión de esta proteína en BLA con una hiperactivación relacionada con situaciones de estrés agudo (Razavi et al., 2020). Si bien es cierto, encontramos una tendencia a la significación en el caso de CeA, que actúa como la fuente principal de salidas de la amígdala. En el caso del hipocampo, diferentes paradigmas de estrés agudo han demostrado inducir un aumento de la expresión de esta proteína (Figueiredo et al., 2002; Maras et al., 2014; Melia et al., 1994), no obstante, nuestros resultados únicamente muestran una tendencia al incremento en los campos CA₁ de HPCd e HPCv así como en CA₂ de HPCv. Estas variaciones podrían deberse al hecho de que los estudios de la expresión de la proteína en estas regiones suelen centrarse en paradigmas de estrés diferentes al que empleamos nosotros en el trabajo y por tanto difieren tanto en los tiempos de exposición al estímulo, como la naturaleza del mismo y la duración del experimento, pudiendo ser esta la causa de una activación diferenciada. Además, los mecanismos de degradación de la proteína pueden variar según las condiciones de expresión, lo cual podría explicar la escasa presencia de la proteína en estas regiones (Ferrara et al., 2003). Por otro lado, no hemos realizado un estudio inmunohistoquímico de las neuronas activadas, por lo que variaciones entre interneuronas GABAérgicas y glutamatérgicas podrían estar enmascarando los resultados obtenidos, dado que el aumento de actividad gamma local contrasta con la ausencia de resultados de la expresión proteica. Esta actividad requiere una alternancia rápida de activación de ambos tipos celulares, por lo que los tiempos pueden no ser óptimos para ese estudio. Igualmente, en estudios de nuestro grupo, la estimulación cerebral profunda de Il, que provoca una clara actividad gamma, no correlacionaba con un incremento de expresión de c-Fos (Vila-Merkle, 2022).

El análisis de las regiones septales concuerda con esta última hipótesis, pues en este caso, sí mostró un incremento significativo de la expresión en casi todas áreas analizadas, a excepción de LSI. Nuestros resultados concuerdan con otros estudios de expresión de c-Fos que demuestran que el estrés agudo induce un incremento de la expresión de la proteína y por tanto de la actividad neuronal en regiones del septum lateral, entre otras regiones encargadas de la modulación del estrés (Lin et al., 2018). Además, está ampliamente demostrado que la región medial constituye el marcapasos de la actividad theta hipocámpica (Gaztelu y Buño, 1982; Bland, 2000; Kocsis et al., 2021), por lo que un incremento en la actividad neuronal septal concuerda con la generación de ritmo theta observada. Además, la estimulación de NI sí provocó un aumento significativo de la activación en la corteza entorrinal, vía de entrada al hipocampo y esencial para el aprendizaje (Grienberger y Magee, 2021), así como a la corteza piriforme y la tenia tecta, estrechamente relacionadas con la actividad de la amígdala y

el sistema olfativo, muy relevante en el procesamiento sensorial en roedores (Martínez-García et al., 2012).

En nuestro estudio no solo se han registrado aumentos de la expresión relacionados con la respuesta al estrés en regiones septales, también han sido relacionadas con esta respuesta regiones diencefálicas como los núcleos PV y PaAP (Maras et al., 2014; Melia et al., 1994) o troncoencefálicas como DR y LC (Hale et al., 2008; Fidelina y Krasnov, 2004; Medeiros et al., 2005). Nuestros resultados mostraron que la estimulación eléctrica del NI favorece un incremento generalizado en la actividad neuronal también en las regiones troncoencefálicas y diencefálicas analizadas. En el caso del núcleo PB, ahí converge información visceral, nociceptiva y termorreceptora, que envía hacia el tálamo y a la amígdala (Saper, 2002), por lo que constituye una importante vía de entrada de estímulos relevantes y ha sido considerado un nexo para el dolor y la aversión (Chiang et al., 2019).

Teniendo en cuenta los resultados de las diferentes áreas analizadas, podemos suponer que la estimulación eléctrica del NI induce una respuesta en regiones corticales, septales, troncoencefálicas y diencefálicas, ya que observamos que ha inducido un incremento en la expresión de la proteína y por tanto se ha producido activación celular en estas regiones.

6.5 LIMITACIONES DEL ESTUDIO Y PERSPECTIVAS DE FUTURO

Finalmente, es preciso señalar que el presente trabajo cuenta con ciertas limitaciones a tener en cuenta. El uso del uretano nos proporciona una gran ventaja, y es que al realizar los experimentos sobre animales anestesiados evitamos la actividad theta derivada de los comportamientos exploratorios o locomotores que realizan los animales en estado despierto. Como hemos visto en nuestro trabajo, la estimulación del NI tiene gran influencia en la actividad theta registrada en el circuito, por lo que realizar los experimentos sobre animales anestesiados ha sido esencial para el estudio. Además, el uretano es un anestésico ampliamente empleado la realización de experimentos electrofisiológicos agudos en los que se estudia la actividad oscilatoria y las descargas neuronales. No obstante, es también una limitación en el estudio, dado que hay que ser cauteloso con el rango de las frecuencias observadas, ya que el uretano puede producir cierta depleción en la actividad del potencial de campo, por lo que numerosos autores describen las frecuencias de theta en rata anestesiada como una actividad de 2.5 a 8 Hz (Leung, 1985).

Por otro lado, otra limitación que presenta el trabajo realizado es la ausencia de un correlato comportamental relacionado con los cambios electrofisiológicos observados. Teniendo en cuenta el abanico de cambios producidos en la actividad local de las regiones estudiadas, así como en la comunicación entre las distintas áreas del circuito, sería

conveniente realizar el mismo protocolo de registro con los animales despiertos, para evaluar los efectos de la exposición del animal a ciertos estímulos estresores y a la inyección de CRF y comparar la respuesta con la producida por los estímulos eléctricos.

Otro aspecto a desarrollar es el estudio preliminar realizado sobre la direccionalidad de la información, puesto que en este trabajo se presenta una aproximación de los resultados, puesto que no se ha comparado estadísticamente las diferencias en la direccionalidad inducidas por la estimulación eléctrica del NI.

Por otro lado, los resultados en hembras han mostrado un menor efecto del NI en algunos de los parámetros estudiados. Esto puede deberse a una diferenciación sexual real o al tamaño de la muestra analizado. Sería conveniente ampliar el estudio para verificar si existen tales diferencias o no. En estudios previos del grupo se observó que la administración de una droga ansiógena activaba al NI, así como al complejo septohipocámpico sólo en machos (Vila-Merkle, 2022), por lo que esta diferencia podría no ser espúrea. De ser así, la relevancia del hallazgo debería verificarse mediante estudios de activación, bien por expresión de c-Fos o mediante registros unitarios del NI en condiciones estresantes en ambos sexos, ya que los estudios que Lawther y colaboradores evidenciaron la expresión de c-Fos en el NI en la respuesta de estrés, pero su estudio se realizó exclusivamente en machos (Lawther et al., 2018)

Finalmente, sería interesante complementar los resultados de c-Fos los con un estudio inmunohistoquímico que permitiera comprobar qué poblaciones neuronales se han activado en cada región en respuesta a la estimulación del NI.

CONCLUSIONES

En vista de los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral, podemos concluir que:

- I. La estimulación eléctrica de NI mediante trenes de pulsos induce un cambio oscilatorio tanto en machos como en hembras en el circuito amígdalo-hipocámpico-prefrontal, el cual no se revierte inmediatamente después de finalizar la estimulación.
- II. La estimulación del NI disminuye la actividad de ondas lentas en ambos sexos. Estas ondas son predominantes en ratas con anestesia de uretano, por lo que la estimulación parece estar induciendo en el circuito estudiado una desincronización típica de estados de atención elevada y *arousal*.
- III. La estimulación del núcleo incrementa la actividad theta en el circuito, siendo además más sostenida durante el periodo de estimulación. En el hipocampo, los efectos son observables en todo el eje dorsoventral. En el caso de los machos este incremento se observó en todas las estructuras del circuito estudiadas, mientras que en hembras sólo fue significativo en la formación hipocámpica.
- IV. En ambos sexos, la estimulación del NI aumenta la actividad gamma en el circuito, induciendo por tanto un incremento de la actividad local de las regiones del circuito.
- V. La estimulación de NI sincroniza el circuito amígdalo-hipocámpico-prefrontal a frecuencias theta en, lo que implica un incremento en la comunicación entre las regiones registradas.
- VI. La estimulación eléctrica de NI también favorece la sincronización en frecuencia gamma de frecuencias 60-90 Hz entre la región dorsal del hipocampo y el resto de regiones hipocámpicas y con la amígdala basolateral, apoyando la idea de que el NI es capaz de inducir en el circuito un estado óptimo para el procesamiento de la información.
- VII. En machos, la estimulación incrementa la información mutua a frecuencias gamma entre hipocampo y amígdala, lo que indica

un aumento de la actividad compartida entre estas estructuras y sugiere la existencia de una actividad neuronal local acoplada a una red compuesta por diferentes estructuras cerebrales conectadas funcionalmente. En el caso del grupo de estudio de hembras no se encontraron resultados relevantes al respecto.

- VIII. Hay un mayor acoplamiento fase-amplitud entre theta y gamma en las regin dorsal de hipocampo y en corteza infralímbica como resultado de la estimulación, proceso esencial en el procesamiento de la memoria y en la toma de decisiones frente a un estresor.
- IX. En hembras, durante la estimulación hay un incremento en el acoplamiento entre theta y gamma en amígdala basolateral que no observamos en machos, lo que puede implicar que en el caso de este grupo exista una mayor participación de la amígdala en la respuesta debido a una mayor percepción emocional asociada al estímulo.
- X. A partir del estudio preliminar de la causalidad, sugerimos que la estimulación eléctrica del NI podría inducir un cambio en la direccionalidad del flujo de información dentro del circuito, favoreciendo un aumento general del flujo de información de las estructuras registradas hacia IL así como un aumento de la direccionalidad desde HPCd al resto de estructuras.
- XI. La estimulación eléctrica en machos induce una activación neuronal en un circuito amplio que abarca estructuras corticales, troncoencefálicas, diencefálicas y telencefálicas. Su efecto es marcado en regiones de la corteza prefrontal medial, no sólo infralímbica, sino también prelímbica, cingulada, entorrinal y piriforme, así como en regiones septales. A niveles troncoencefálicos y diencefálicos, la estimulación de NI activa estructuras relacionadas con el procesamiento de la respuesta de estrés y aversiva, como el locus coeruleus, el rafe dorsal, el núcleo parabraquial y los núcleos paraventriculares de tálamo e hipotálamo. La falta de activación neuronal en hipocampo y amígdala contrasta con los resultados electrofisiológicos.
- XII. En el caso de las hembras, la principal diferencia se localiza en la actividad theta de corteza infralímbica y amígdala basolateral, que mostraron cambios no significativos en la potencia relativa así como en la ausencia de resultados significativos en la información compartida entre estructuras.
- XIII. En su conjunto, los resultados muestran un papel regulador del NI en la actividad local del circuito amigdalo-hipocámpico-prefrontal tanto en machos como en hembras, así como de la comunicación en el circuito. Teniendo en cuenta su sensibilidad

al estrés, estos mecanismos pueden contribuir al procesamiento emocional y cognitivo frente a estímulos relevantes.

BIBLIOGRAFÍA

Adolphs, R., Cahill, L., Schul, R., y Babinsky, R. (1997). Impaired declarative memory for emotional material following bilateral amygdala damage in humans. *Learning y Memory*, 4(3), 291-300.

Adrian ED (1942) Olfactory reactions in the brain of the hedgehog. *J Physiol* 100:459-473

Aggleton, J. P., Burton, M. J., y Passingham, R. E. (1980). Cortical and subcortical afferents to the amygdala of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Brain research*, 190(2), 347-368.

Aggleton, J. P., O'Mara, S. M., Vann, S. D., Wright, N. F., Tsanov, M., y Erichsen, J. T. (2010). Hippocampal–anterior thalamic pathways for memory: uncovering a network of direct and indirect actions. *European Journal of Neuroscience*, 31(12), 2292-2307.

Ahnaou, A., Huysmans, H., van de Castele, T., y Drinkenburg, W. H. I. M. (2017). Cortical high gamma network oscillations and connectivity: A translational index for antipsychotics to normalize aberrant neurophysiological activity. *Translational Psychiatry*, 7(12).

Akert y Monakow, H. V. (1980). Relationships of precentral, premotor and prefrontal cortex to the mediodorsal and intralaminar nuclei of the monkey thalamus. *Acta neurobiologiae experimentalis*.

Alexander, G. E., Crutcher, M. D., y DeLong, M. R. (1991). Basal ganglia-thalamocortical circuits: parallel substrates for motor, oculomotor, "prefrontal" and "limbic" functions. *Progress in brain research*, 85, 119-146.

Alheid GF, DeOlmos CA, Beltramino CA. (1995) Amygdala and extended amygdala. In: Paxinos G, editor. The rat nervous system. 2. Academic Press; San Diego 495-578.

Alheid, G. F., y Heimer, L. (1988). New perspectives in basal forebrain organization of special relevance for neuropsychiatric disorders: the striatopallidal, amygdaloid, and corticopetal components of substantia innominata. *Neuroscience*, 27(1), 1-39.

Allen, J. B. (1977). Short Term Spectral Analysis, Synthesis, and Modification by Discrete Fourier Transform. In *IEEE Transactions on Acoustics, Speech, and Signal Processing*, 25(3), 235–238)

Alonso, A., y Garcia-Austt, E. (1987a). Neuronal sources of theta rhythm in the entorhinal cortex of the rat. *Experimental brain research*, 67(3), 493-501.

Alonso, A. y García-Austt, E. (1987b) Neuronal sources of theta rhythm in the entorhinal cortex of the rat. II. Phase relations between unit discharges and theta field potentials. *Experimental brain research*, 67(3), 502–509.

Amaral, D. y Lavenex, P. (2007) "Hippocampal neuroanatomy." The hippocampus book

Amaral DG, Price JL, Pitkänen A, Carmichael T. (1992) *Anatomical organization of the primate amygdaloid complex*. In: Aggleton J, editor. *The Amygdala: Neurobiological Aspects of Emotion, Memory, and Mental Dysfunction*. New York: Wiley-Liss; 1–66.

Amaral, D. G., y Witter, M. P. (1989). The three dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data, 31(3).

Amat, J., Baratta, M. V., Paul, E., Bland, S. T., Watkins, L. R., y Maier, S. F. (2005). Medial prefrontal cortex determines how stressor controllability affects behavior and dorsal raphe nucleus. *Nature neuroscience*, 8(3), 365-371.

Axmacher, N., Henseler, M. M., Jensen, O., Weinreich, I., Elger, C. E., y Fell, J. (2010). Cross-frequency coupling supports multi-item working memory in the human hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(7), 3228-3233.

S., Cusulin, J. I. W., y Inoue, W. (2015). Stress-related synaptic plasticity in the hypothalamus. *Nature Reviews Neuroscience*, 16(7), 377-388.

Barbas, H., y Zikopoulos, B. (2007). The prefrontal cortex and flexible behavior. *The Neuroscientist*, 13(5), 532-545.

Bannerman, D. M., Grubb, M., Deacon, R. M. J., Yee, B. K., Feldon, J., y Rawlins, J. N. P. (2003). Ventral hippocampal lesions affect anxiety but not spatial learning. *Behav Brain Res*, 139(1-2), 197-213.

Bannerman, D. M., Rawlins, J. N. P., McHugh, S. B., Deacon, R. M. J., Yee, B. K., Bast, T., Zhang, W. N., Pothuizen, H. H. J., y Feldon, J. (2004). Regional dissociations within the hippocampus - Memory and anxiety. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 28(3), 273–283.

- Bannerman, D. M., Sprengel, R., Sanderson, D. J., McHugh, S. B., Rawlins, J. N. P., Monyer, H., y Seeburg, P. H. (2014). Hippocampal synaptic plasticity, spatial memory and anxiety. *Nature reviews neuroscience*, 15(3), 181-192.
- Barros, V. N., Mundim, M., Galindo, L. T., Bittencourt, S., Porcionatto, M., y Mello, L. E. (2015). The pattern of c-Fos expression and its refractory period in the brain of rats and monkeys. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9.
- Barson, J. R., Mack, N. R., y Gao, W. J. (2020). The Paraventricular Nucleus of the Thalamus Is an Important Node in the Emotional Processing Network. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 14.
- Bartos, M., Vida, I., y Jonas, P. (2007). Synaptic mechanisms of synchronized gamma oscillations in inhibitory interneuron networks. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(1), 45-56
- Başar, E., Başar-Eroğlu, C., Karakaş, S., y Schürmann, M. (2000). Brain oscillations in perception and memory. *International journal of psychophysiology*, 35(2-3), 95-124.
- Bast, T. (2011). The hippocampal learning-behavior translation and the functional significance of hippocampal dysfunction in schizophrenia. *Current opinion in neurobiology*, 21(3), 492-501.
- Bast, T., Wilson, I. A., Witter, M. P., y Morris, R. G. M. (2009). From rapid place learning to behavioral performance: a key role for the intermediate hippocampus. *PLoS biology*, 7(4)
- Bathgate, R. A., Ivell, R., Sanborn, B. M., Sherwood, O. D., y Summers, R. J. (2006). International Union of Pharmacology LVII: recommendations for the nomenclature of receptors for relaxin family peptides. *Pharmacological reviews*, 58(1), 7-31.
- Bauer, E. P., Paz, R., y Paré, D. (2007). Gamma oscillations coordinate amygdalo-rhinal interactions during learning. *Journal of Neuroscience*, 27(35), 9369-9379.
- G., y Murray, E. A. (2002). The amygdala and reward. *Nature reviews neuroscience*, 3(7), 563-573.
- Bedwell, S. A., Billett, E. E., Crofts, J. J., y Tinsley, C. J. (2014). The topology of connections between rat prefrontal, motor and sensory cortices. *Frontiers in systems neuroscience*, 8, 177.
- Benarroch, E. E. (2015). The amygdala: functional organization and involvement in neurologic disorders. *Neurology*, 84(3), 313-324.

Benarroch, E. E. (2014). *Clinical implications of neuroscience research Section Editor The amygdala Functional organization and involvement in neurologic disorders.*

Banerjee, A., Shen, P. J., Ma, S., Bathgate, R. A., y Gundlach, A. L. (2010). Swim stress excitation of nucleus incertus and rapid induction of relaxin-3 expression via CRF₁ activation. *Neuropharmacology*, 58(1), 145-155.

Berendse, H. W., Graaf, Y. G. D., y Groenewegen, H. J. (1992). Topographical organization and relationship with ventral striatal compartments of prefrontal corticostriatal projections in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 316(3), 314-347.

Beyeler, A., Chang, C. J., Silvestre, M., Lévêque, C., Namburi, P., Wildes, C. P., y Tye, K. M. (2018). Organization of valence-encoding and projection-defined neurons in the basolateral amygdala. *Cell reports*, 22(4), 905-918.

Beyeler, A., y Dabrowska, J. (2020). Neuronal diversity of the amygdala and the bed nucleus of the stria terminalis. *In Handbook of behavioral neuroscience* 26,63-100)

Beyeler, A., Namburi, P., Glover, G. F., Simonnet, C., Calhoun, G. G., Conyers, G. F., y Tye, K. M. (2016). Divergent routing of positive and negative information from the amygdala during memory retrieval. *Neuron*, 90(2), 348-361.

Bhatnagar, S., Viau, V., Chu, A., Soriano, L., Meijer, O. C., y Dallman, M. F. (2000). A cholecystokinin-mediated pathway to the paraventricular thalamus is recruited in chronically stressed rats and regulates hypothalamic-pituitary-adrenal function. *Journal of Neuroscience*, 20(14), 5564-5573.

Bland, B. H. (2000). The medial septum: node of the ascending brainstem hippocampal synchronizing pathways. In *The behavioral neuroscience of the septal region* Springer, New York, NY, 115-145).

Bittencourt, J. C., y Sawchenko, P. E. (2000). *Do Centrally Administered Neuropeptides Access Cognate Receptors?: An Analysis in the Central Corticotropin-Releasing Factor System.*

Bland, B. y Oddie, S. (2001) Theta band oscillation and synchrony in the hippocampal formation and associated structures: the case for its role in sensorimotor integration. *Behavioural brain research*, 127(1-2):119-136.

Bland, B. H., Oddie, S. D., y Colom, L. v. (1999). *Mechanisms of Neural Synchrony in the Septohippocampal Pathways Underlying Hippocampal Theta Generation.*

- Bland, B. H., Oddie, S. D., Colom, L. v, y Vertess, R. P. (1994). Extrinsic Modulation of Medial Septal Cell Discharges by the Ascending Brainstem Hippocampal Synchronizing Pathway. *Hippocampus* 4(6).
- Blasiak, A., Siwiec, M., Grabowiecka, A., Blasiak, T., Czerw, A., Blasiak, E., y Gundlach, A. L. (2015). Excitatory orexinergic innervation of rat nucleus incertus—Implications for ascending arousal, motivation and feeding control. *Neuropharmacology*, 99, 432-447.
- Boorse, C., y Denver, R. J. (2006). Widespread tissue distribution and diverse functions of corticotropin-releasing factor and related peptides. *General and comparative endocrinology*, 146(1), 9-18.
- Borhegyi, Z., Varga, V., Szilágyi, N., Fabo, D., y Freund, T. F. (2004). Phase segregation of medial septal GABAergic neurons during hippocampal theta activity. *Journal of Neuroscience*, 24(39), 8470–8479.
- Bozas, E., Tritos, N., Phillipidis, H., y Stylianopoulou, F. (1997). At least three neurotransmitter systems mediate a stress-induced increase in c-fos mRNA in different rat brain areas. *Cellular and molecular neurobiology*, 17(2), 157-169.
- Bragin, A., Jand61vb, G., Nddasdy, Z., Hetke, J., Wise, K., y Buzsirkil, G. (1995). Gamma Rat ,100 Hz) Oscillation Hippocampus Behaving. *The Journal of Neuroscience*, 15.
- Bains, J., Cusulin, J. y Inoue, W. (2015) Stress-related synaptic plasticity in the hypothalamus. *Nat Rev Neurosci*, 16, 377–388.
- Born J, Rasch B, Gais S. 2006. Sleep to remember. *Neuroscientist* 12(5), 410–424
- Brown, P., Mazzone, P., Oliviero, A., Altibrandi, M. G., Pilato, F., Tonali, P. A., y Di Lazzaro, V. (2004). Effects of stimulation of the subthalamic area on oscillatory pallidal activity in Parkinson's disease. *Experimental neurology*, 188(2), 480-490.
- Bullitt, E. (1990). Expression of C-fos-Like Protein as a Marker for Neuronal Activity Following Noxious Stimulation in the Rat. *The hournal of comparative neurology*, 29651.
- Bullmore, E., y Sporns, O. (2009). Complex brain networks: graph theoretical analysis of structural and functional systems. *Nature reviews neuroscience*, 10(3), 186-198.
- Bush, G., Luu, P., y Posner, M. I. (2000). Cognitive and emotional influences in anterior cingulate cortex. *Trends in cognitive sciences*, 4(6), 215-222.

Buzsáki, G. (1989). Two-stage model of memory trace formation: a role for “noisy” brain states. *Neuroscience*, 31(3), 551-570.

Buzsáki, G. Theta Oscillations in the Hippocampus (2002). *Neuron*, 33(3),325-340

Buzsáki, G. (2005) Theta rhythm of navigation: link between path integration and landmark navigation, episodic and semantic memory. *Hippocampus*,15(7),827-40

Buzsaki, G. (2006) *Rhythms of the Brain*. Oxford university press.

Buzsáki, G. (2010). Neural Syntax: Cell Assemblies, Synapsembles, and Readers. *Neuron*, 68(3),362-385).

Buzsáki, G., Lai-Wo S., L., y Vanderwolf, C. (1983) *Cellular bases of hippocampal EEG in the behaving rat*.

Buzsáki, G., Logothetis, N., y Singer, W. (2013). Scaling brain size, keeping timing: Evolutionary preservation of brain rhythms. *Neuron*, 80(3), 751-764.

Buzsáki, G., y Moser, E. I. (2013). Memory, navigation and theta rhythm in the hippocampal-entorhinal system. *Nature neuroscience*,16(2), 130-138.

Buzsáki, G., y Wang, X. J. (2012). Mechanisms of gamma oscillations. *Annual review of neuroscience*, 35, 203-225.

Burazin, T., Bathgate, R., Macris, M., Layfield, S., Gundlach, A., y Tregear, G. (2002) Restricted, but abundant, expression of the novel rat gene-3 (R3) relaxin in the dorsal tegmental region of brain. *Journal of Neurochemistry*, 82(6),1553-1557.

Cannon, J., Mccarthy, M. M., Lee, S., Lee, J., Börgers, C., Whittington, M. A., y Kopell, N. (2014). Neurosystems: Brain rhythms and cognitive processing. *European Journal of Neuroscience*, 39(5)705-719.

Canteras, N. S., y Swanson, L. W. (1992). Projections of the ventral subiculum to the amygdala, septum, and hypothalamus: a PHAL anterograde tract-tracing study in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 324(2), 180-194.

Canolty RT, Edwards E, Dalal SS, Soltani M, Nagarajan SS, Kirsch HE, Berger MS, Barbaro NM, Knight RT.(2006). High gamma power is phase-locked to theta oscillations in human neocortex. *Science*,313(5793),1626-8.

- Cappaert, N. L. M., Van Strien, N., y Witter, M. P. (2014). "Hippocampal formation," in *The Rat Nervous System*, ed. G. Paxinos (Amsterdam: Elsevier), 511-573.
- Carlén, M. (2017). What constitutes the prefrontal cortex?. *ciencia*, 358(6362), 478-482.
- Carr, D. B., y Sesack, S. R. (2000). Projections from the rat prefrontal cortex to the ventral tegmental area: target specificity in the synaptic associations with mesoaccumbens and mesocortical neurons. *Journal of neuroscience*, 20(10), 3864-3873.
- Cassidy, B., Rae, C., y Solo, V. (2014). Brain activity: Connectivity, sparsity, and mutual information. *IEEE transactions on medical imaging*, 34(4), 846-860.
- Chalmers, D. T., Lovenberg, T. W., y De Souza, E. B. (1995). Localization of novel corticotropin-releasing factor receptor (CRF2) mRNA expression to specific subcortical nuclei in rat brain: comparison with CRF1 receptor mRNA expression. *Journal of Neuroscience*, 15(10), 6340-6350.
- Cervera-Ferri, A., Guerrero-Martínez, J., Bataller-Mompeán, M., Taberner-Cortes, A., Martínez-Ricós, J., Ruiz-Torner, A., y Teruel-Martí, V. (2011). Theta synchronization between the hippocampus and the nucleus incertus in urethane-anesthetized rats. *Experimental brain research*, 211(2), 177-192.
- Cervera-Ferri, A., Rahmani, Y., Martínez-Bellver, S., Teruel-Martí, V., y Martínez-Ricós, J. (2012). Glutamatergic projection from the nucleus incertus to the septohippocampal system. *Neuroscience Letters*, 517(2), 71-76.
- Chalmers, D., López, J., Vázquez, D., Akil, H., y Watson, S. (1994). Regulation of hippocampal 5-HT_{1A} receptor gene expression by dexamethasone. *Neuropsychopharmacology*, 10(3), 215-222.
- Chan, F. K. W., Brown, E. R., Ericsson, A., Kovacs, K. J., y Sawchenko, P. E. (1993). A Comparison of Two Immediate-Early Genes, c-fos and NGFI-B, as Markers for Functional Activation in Stress-related Neuroendocrine Circuitry. In *The Journal of Neuroscience*, 3(12).
- Chen, A. C., y Etkin, A. (2013). Hippocampal network connectivity and activation differentiates post-traumatic stress disorder from generalized anxiety disorder. *Neuropsychopharmacology*, 38(10), 1889-1898.
- Chen, S., Tan, Z., Xia, W., Gomes, C. A., Zhang, X., Zhou, W., y Wang, L. (2021). Theta oscillations synchronize human medial prefrontal cortex and amygdala during fear learning. *Science Advances*, 7(34)

- Chiang, M. C., Bowen, A., Schier, L. A., Tupone, D., Uddin, O., y Heinricher, M. M. (2019). Parabrachial complex: a hub for pain and aversion. *Journal of Neuroscience*, 39(42), 8225-8230.
- Chrobak JJ, Buzsáki G.(1998). Gamma oscillations in the entorhinal cortex of the freely behaving rat. *J Neurosci*,18(1),388-98.
- Chronwall, B., Skirboll, L., y O'Donohue, T. (1985). Demonstration of a pontine-hippocampal projection containing a ranatensin-like peptide. *Neuroscience Letters*, 53(1),109-114.
- Clement, E. A., Richard, A., Thwaites, M., Ailon, J., Peters, S., y Dickson, C. T. (2008). Cyclic and sleep-like spontaneous alternations of brain state under urethane anaesthesia. *PLoS ONE*, 3(4).
- Cohen, M. X. (2019). A better way to define and describe Morlet wavelets for time-frequency analysis. *NeuroImage*, 199, 81-86.
- Colgin, L. L., Denninger, T., Fyhn, M., Hafting, T., Bonnevie, T., Jensen, O., Moser, M. B., y Moser, E. I. (2009). Frequency of gamma oscillations routes flow of information in the hippocampus. *Nature*,462(7271), 353-357.
- Colgin, L. L., y Moser, E. I. (2010). Gamma oscillations in the hippocampus. *Physiology*,25(5),319-329.
- Courtin, J., Bienvenu, T. C. M., Einarsson, E. Ö., y Herry, C. (2013). Medial prefrontal cortex neuronal circuits in fear behavior. *Neuroscience*, 240, 219-242.
- Cornwell, B. R., Arkin, N., Overstreet, C., Carver, F. W., y Grillon, C. (2012). Distinct contributions of human hippocampal theta to spatial cognition and anxiety. *Hippocampus*, 22(9), 1848-1859.
- Cowan, W. M., Guillery, R. W., y Powell, T. P. S. (1964). The origin of the mamillary peduncle and other hypothalamic connexions from the midbrain. *Journal of Anatomy*, 98(Pt 3), 345
- Cowdin, N., Kobayashi, I., y Mellman, T. A. (2014). Theta frequency activity during rapid eye movement (REM) sleep is greater in people with resilience versus PTSD. *Experimental brain research*, 232(5), 1479-1485.
- Cenquizca, L. A., y Swanson, L. W. (2007). Spatial organization of direct hippocampal field CA1 axonal projections to the rest of the cerebral cortex. *Brain research reviews*, 56(1), 1-26.
- Cullinan, W. E., Herman, J. P., Battaglia, D. F., Akil, H., y Watson, S. J. (1995). Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. *Neuroscience*, 64(2), 477-505.

- Cruz, F. C., Koya, E., Guez-Barber, D. H., Bossert, J. M., Lupica, C. R., Shaham, Y., y Hope, B. T. (2013). New technologies for examining the role of neuronal ensembles in drug addiction and fear. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(11), 743-754.
- Daniels, W. M. U., Richter, L., y Stein, D. J. (2004). The effects of repeated intra-amygdala CRF injections on rat behavior and HPA axis function after stress. *Metabolic brain disease*, 19(1), 15-23.
- da Silveira, L. T. G., Junta, C. M., Monesi, N., de Oliveira-Pelegrin, G. R., Passos, G. A., y Rocha, M. J. A. (2007). Time course of c-fos, vasopressin and oxytocin mRNA expression in the hypothalamus following long-term dehydration. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 27(5), 575-584.
- de Ávila, C., Chometton, S., Ma, S., Pedersen, L. T., Timofeeva, E., Cifani, C., y Gundlach, A. L. (2020). Effects of chronic silencing of relaxin-3 production in nucleus incertus neurons on food intake, body weight, anxiety-like behaviour and limbic brain activity in female rats. *Psychopharmacology*, 237(4), 1091-1106.
- Dedovic, K., Duchesne, A., Andrews, J., Engert, V., y Pruessner, J. C. (2009). The brain and the stress axis: The neural correlates of cortisol regulation in response to stress. *NeuroImage*, 47(3), 864-871.
- Dedovic, K., Rexroth, M., Wolff, E., Duchesne, A., Scherling, C., Beaudry, T., y Pruessner, J. C. (2009). Neural correlates of processing stressful information: an event-related fMRI study. *Brain research*, 1293, 49-60.
- Daugé, V., y Léna, I. (1998). CCK in anxiety and cognitive processes. *Neuroscience y Biobehavioral Reviews*, 22(6), 815-825.
- Deak, T., Nguyen, K. T., Ehrlich, A. L., Watkins, L. R., Spencer, R. L., Maier, S. F., y Gold, P. W. (1999). The impact of the nonpeptide corticotropin-releasing hormone antagonist antalarmin on behavioral and endocrine responses to stress. *Endocrinology*, 140(1), 79-86.
- de Kloet, E. R., Karst, H., y Joëls, M. (2008). Corticosteroid hormones in the central stress response: quick-and-slow. *Frontiers in neuroendocrinology*, 29(2), 268-272.
- de Kloet, E. R., Vreugdenhil, E., Oitzl, M. S., y Joels, M. (1998). Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocrine reviews*, 19(3), 269-301.
- de Medeiros, M. A., Carlos Reis, L., y Eugênio Mello, L. (2005). Stress-induced c-Fos expression is differentially modulated by dexamethasone, diazepam and imipramine. *Neuropsychopharmacology*, 30(7), 1246-1256.

Dong, H.-W., Swanson, L. W., Chen, L., Fanselow, M. S., y Toga, A. W. (2009). *Genomic-anatomic evidence for distinct functional domains in hippocampal field CA1*.

Dragunow, M., y Robertson, H. A. (1987). Generalized seizures induce c-fos protein(s) in mammalian neurons. *Neuroscience Letters* (Vol. 82).

Duman, R. S. (2022). Neural plasticity: consequences of stress and actions of antidepressant treatment. *Dialogues in clinical neuroscience*.

Eichenbaum, H. (2000). A cortical–hippocampal system for declarative memory. *Nature reviews neuroscience*, 1(1), 41-50.

Eichenbaum, H. (2017). Prefrontal–hippocampal interactions in episodic memory. *Nature Reviews Neuroscience*, 18(9), 547-558.

Eichenbaum, H., Dudchenko, P., Wood, E., Shapiro, M., y Tanila, H. (1999). The hippocampus, memory, and place cells: is it spatial memory or a memory space?. *Neuron*, 23(2), 209-226.

Ekstrom, A.D. *et al.* (2003). Cellular networks underlying human spatial navigation. *Nature*, 425(6954), 184–188.

Engel, Andreas K.; Fries, Pascal; Singer, Wolf (2001). *Dynamic predictions: Oscillations and synchrony in top–down processing*. 2(10), 704–716.

Erö C, Gewaltig M-O, Keller D, y Markram H (2018). A cell atlas for the mouse brain. *Frontiers in Neuroinformatics*, 12, 84.

Eulitz, C., Maess, B., Pantev, C., Friederici, A. D., Feige, B., y Elbert, T. (1996). Oscillatory neuromagnetic activity induced by language and non-language stimuli. *Cognitive brain research*, 4(2), 121-132.

Fanselow, M. S., y Dong, H. W. (2010). Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures?. *Neuron*, 65(1), 7-19.

Farge, M. (1992) Wavelet transforms and their applications to turbulence. *Annual Review of Fluid Mechanics*, 24(1991), 395–457.

Fastenrath, M., Coynel, D., Spalek, K., Milnik, A., Gschwind, L., Roozendaal, B. y de Quervain, D. J. (2014). Dynamic modulation of amygdala–hippocampal connectivity by emotional arousal. *Journal of neuroscience*, 34(42), 13935-13947.

Felix-Ortiz, A. C., Beyeler, A., Seo, C., Leppla, C. A., Wildes, C. P., y Tye, K. M. (2013). BLA to vHPC inputs modulate anxiety-related behaviors. *Neuron*, 79(4), 658-664.

Ferrara, P., Andermarcher, E., Bossis, G., Acquaviva, C., Brockly, F., Jariel-Encontre, I., y Piechaczyk, M. (2003). The structural determinants responsible for c-Fos protein proteasomal degradation differ according to the conditions of expression. *Oncogene*, 22(10), 1461-1474.

Fidelina, O. V., y Krasnov, I. B. (2004). Expression of the immediate-early gene cFos in brain of the rats exposed to repeated 2 G influence. *Journal of Gravitational Physiology: a Journal of the International Society for Gravitational Physiology*, 11(2), P35-6.

Figueiredo, H. F., Bruestle, A., Bodie, B., Dolgas, C. M., y Herman, J. P. (2003). The medial prefrontal cortex differentially regulates stress-induced c-fos expression in the forebrain depending on type of stressor. *European Journal of Neuroscience*, 18(8), 2357-2364.

Fisher, N. (1993) *Analysis of data with temporal or spatial structure. In Statistical Analysis of Circular Data. Cambridge University Press, Cambridge.*

Fries, P. (2005). A mechanism for cognitive dynamics: neuronal communication through neuronal coherence. *Trends in cognitive sciences*, 9(10), 474-480.

Fritsch B, Qashu F, Figueiredo TH, Aroniadou-Anderjaska V, Rogawski MA, y Braga MFM (2009). Pathological alterations in GABAergic interneurons and reduced tonic inhibition in the basolateral amygdala during epileptogenesis. *Neuroscience*, 163, 415-429.

Fitzgerald, P. J., Seemann, J. R., y Maren, S. (2014). Can fear extinction be enhanced? A review of pharmacological and behavioral findings. *Brain research bulletin*, 105, 46-60.

Ford, B., Holmes, C. J., Mainville, L., y Jones, B. E. (1995). GABAergic neurons in the rat pontomesencephalic tegmentum: codistribution with cholinergic and other tegmental neurons projecting to the posterior lateral hypothalamus. *Journal of Comparative Neurology*, 363(2), 177-196.

Fortin, N. J., Agster, K. L., y Eichenbaum, H. B. (2002). Critical role of the hippocampus in memory for sequences of events. *Nature Neuroscience*, 5(5), 458-462.

Franks NP, Lieb WR. (1994) Molecular and cellular mechanisms of general anaesthesia. *Nature*.367(6464),607-14.

Freiwald, W., Valdes, P., Bosch, J., Biscay, R., Jimenez, J., Rodriguez, L., Rodriguez, V., Kreiter, A., y Singer, W. (1999) Testing non-linearity and directedness of interactions between neural groups in the macaque inferotemporal cortex. *Journal of Neuroscience Methods*, 94(1),105-119.

- Fries, P. (2005). A mechanism for cognitive dynamics: Neuronal communication through neuronal coherence. *Trends in Cognitive Sciences*, 9(10), 474-480.
- Gass, J. T., y Chandler, L. (2013). The plasticity of extinction: contribution of the prefrontal cortex in treating addiction through inhibitory learning. *Frontiers in psychiatry*, 4, 46.
- Gaztelu, J. M., y Buno Jr, W. (1982). Septo-hippocampal relationship during EEG theta rhythm. *Electroencephalography and clinical neurophysiology*, 54(4), 375-387.
- Ghashghaei, H. T., Hilgetag, C. C., y Barbas, H. (2007). Sequence of information processing for emotions based on the anatomic dialogue between prefrontal cortex and amygdala. *Neuroimage*, 34(3), 905-923.
- Goode, T. D., Tanaka, K. Z., Sahay, A., y McHugh, T. J. (2020). An integrated index: engrams, place cells, and hippocampal memory. *Neuron*, 107(5), 805-820.
- Goto, M., Swanson, L. W., y Canteras, N. S. (2001). Connections of the nucleus incertus. *Journal of Comparative Neurology*, 438(1), 86-122.
- Gourley, S. L., y Taylor, J. R. (2016). Going and stopping: dichotomies in behavioral control by the prefrontal cortex. *Nature neuroscience*, 19(5), 656-664.
- Granger, C. W. J. (1969). *Investigating Causal Relations by Econometric Models and Cross-spectral Methods*, 37(3).
- Grienberger, C., y Magee, J. C. (2022). Entorhinal cortex directs learning-related changes in CA1 representations. *Nature*, 1-9.
- Grillner, S. (2006). Biological Pattern Generation: The Cellular and Computational Logic of Networks in Motion. *Neuron* 52(5), 751-766.
- Groenewegen, H. J., y Berendse, H. W. (1994). Anatomical relationships between the prefrontal cortex and the basal ganglia in the rat. In *Motor and cognitive functions of the prefrontal cortex*, Springer, Berlin, Heidelberg, 51-77.
- Groenewegen, H. J., Berendse, H. W., Wolters, J. G., y Lohman, A. H. (1991). The anatomical relationship of the prefrontal cortex with the striatopallidal system, the thalamus and the amygdala: evidence for a parallel organization. *Progress in brain research*, 85, 95-118.
- Groenewegen, H. J., y Uylings, H. B. (2000). The prefrontal cortex and the integration of sensory, limbic and autonomic information. *Progress in brain research*, 126, 3-28.

- Groenewegen, H. J., Wright, C. I., y Beijer, A. V. (1996). The nucleus accumbens: gateway for limbic structures to reach the motor system?. *Progress in brain research*, 107, 485-511.
- Grossman, Y. S., Fillinger, C., Manganaro, A., Voren, G., Waldman, R., Zou, T. y Dumitriu, D. (2022). Structure and function differences in the prelimbic cortex to basolateral amygdala circuit mediate trait vulnerability in a novel model of acute social defeat stress in male mice. *Neuropsychopharmacology*, 47(3), 788-799.
- Gu, Z., Alexander, G. M., Dudek, S. M., y Yakel, J. L. (2017). Hippocampus and Entorhinal Cortex Recruit Cholinergic and NMDA Receptors Separately to Generate Hippocampal Theta Oscillations. *Cell Reports*, 21(12), 3585-3595.
- Gu, Z., y Yakel, J. L. (2022). Cholinergic Regulation of Hippocampal Theta Rhythm. *Biomedicines*, 10(4), 745.
- Guillery, R. W (1957) *Degeneration in the hypothalamic connexions of the albino rat*. *J Anat* 91(1),91-115.
- Haber, S. N. (2014). The place of dopamine in the cortico-basal ganglia circuit. *Neuroscience*, 282, 248-257.
- Haig, A. R., Gordon, E., de Pascalis, V., Meares, R. A., Bahramali, H., y Harris, A. (2000). *Gamma activity in schizophrenia: evidence of impaired network binding?*
- Hangya, B., Borhegyi, Z., Szilágyi, N., Freund, T. F., y Varga, V. (2009). GABAergic neurons of the medial septum lead the hippocampal network during theta activity. *Journal of Neuroscience*, 29(25), 8094-8102.
- Hara, K. y Harris, R.A. (2002)The anesthetic mechanism of urethane: the effects on neurotransmitter-gated ion channels. *Anesthesia and Analgesia*, 94(2),313-318.
- Harris, A. Z., y Gordon, J. A. (2015). Long-range neural synchrony in behavior. *Annual review of neuroscience*, 38, 171.
- Hawley, D. F., Morch, K., Christie, B. R., y Leasure, J. L. (2012). Differential response of hippocampal subregions to stress and learning. *PloS one*, 7(12)
- Herrera, D. G.,y Robertson, H. A. (1996). Activation of c-fos in the brain. *Progress in neurobiology*, 50(2-3), 83-107.
- Herreras, O. (2016). Local field potentials: Myths and misunderstandings. *Frontiers in Neural Circuits*, 10(DEC).

- Heidbreder, C. A., y Groenewegen, H. J. (2003). The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. *Neuroscience y Biobehavioral Reviews*, 27(6), 555-579.
- Hill-Venning, C., Belelli, D., Peters, J. A., y Lambert, J. J. (1997). *Subunit-dependent interaction of the general anaesthetic etomidate with the g-aminobutyric acid type A receptor.*
- Hoffman, G. E., Smith, M. S., y Verbalis, J. G. (1993). c-Fos and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems. *Frontiers in neuroendocrinology*, 14(3), 173-213.
- Holland, P. C., y Bouton, M. E. (1999). Hippocampus and context in classical conditioning. *Current opinion in neurobiology*, 9(2), 195-202.
- Holmes, A., y Wellman, C. L. (2009). Stress-induced prefrontal reorganization and executive dysfunction in rodents. *Neuroscience y Biobehavioral Reviews*, 33(6), 773-783.
- Hyman, J. M., Zilli, E. A., Paley, A. M., y Hasselmo, M. E. (2005). Medial prefrontal cortex cells show dynamic modulation with the hippocampal theta rhythm dependent on behavior. *Hippocampus*, 15(6), 739-749.
- Hughes, P., Lawlor, P., y Dragunow, M. (1992). Basal expression of Fos, Fos-related, Jun, and Krox 24 proteins in rat hippocampus. *Molecular Brain Research*, 13.
- Ihiguez, C., Gayoso, M. J., y Carreres, J. (1985). A versatile and simple method for staining nervous tissue using Giemsa dye. *Journal of Neuroscience Methods*, 13.
- Insausti, R., y Amaral, D. G. (2004). Hippocampal formation. *The human nervous system*, 2, 871-914.
- Ippolito, G., Bertaccini, R., Tarasi, L., Di Gregorio, F., Trajkovic, J., Battaglia, S., y Romei, V. (2022). The Role of Alpha Oscillations among the Main Neuropsychiatric Disorders in the Adult and Developing Human Brain: Evidence from the Last 10 Years of Research. *Biomedicines*, 10(12), 3189.
- Jackson, J., Goutagny, R., y Williams, S. (2011). Fast and slow gamma rhythms are intrinsically and independently generated in the subiculum. *Journal of Neuroscience*, 31(34), 12104-12117.
- Jaggard, J. B., Wang, G. X., y Mourrain, P. (2021). Non-REM and REM/paradoxical sleep dynamics across phylogeny. *Current Opinion in Neurobiology*, 71, 44-51.

- Jensen, O., y Colgin, L. L. (2007). Cross-frequency coupling between neuronal oscillations. In *Trends in Cognitive Sciences*, 11 (7), 267–269.
- Jin, S. W., y Lee, I. (2021). Differential encoding of place value between the dorsal and intermediate hippocampus. *Current Biology*, 31(14), 3053-3072.
- Johnston, J. B (1923) Further contributions to the study of the evolution of the forebrain. *J. comp. Neurol.* 35, 337–481
- Jones, E. T., y Leavitt, R. Y. (1974). Retrograde axonal transport and the demonstration of non-specific projections to the cerebral cortex and striatum from thalamic intralaminar nuclei in the rat, cat and monkey. *Journal of Comparative Neurology*, 154(4), 349-377.
- Jones, K. R., Myers, B., y Herman, J. P. (2011). Stimulation of the prelimbic cortex differentially modulates neuroendocrine responses to psychogenic and systemic stressors. *Physiology y behavior*, 104(2), 266-271.
- Jones, S. R., Kerr, C. E., Wan, Q., Pritchett, D. L., Hämäläinen, M., y Moore, C. I. (2010). Cued spatial attention drives functionally relevant modulation of the mu rhythm in primary somatosensory cortex. *Journal of Neuroscience*, 30(41), 13760-13765.
- Johnson, A., y Redish, A. D. (2007). Neural ensembles in CA3 transiently encode paths forward of the animal at a decision point. *Journal of Neuroscience*, 27(45), 12176-12189.
- Josselyn, S. A., y Tonegawa, S. (2020). Memory engrams: Recalling the past and imagining the future. *Science*, 367(6473).
- Juergens E., Guettler A., Eckhorn R. (1999). Visual stimulation elicits locked and induced gamma oscillations in monkey intracortical- and EEG-potentials, but not in human EEG. *Exp. Brain Res.* 129, 247–259.
- Jutras, M. J., Fries, P., y Buffalo, E. A. (2009). Gamma-band synchronization in the macaque hippocampus and memory formation. *Journal of Neuroscience*, 29(40), 12521-12531.
- Kamondi, A., Acsády, L., Wang, X., y Buzsáki, G. (1998) Theta oscillations in somata and dendrites of hippocampal pyramidal cells in vivo: activity-dependent phase-precession of action potentials. *Hippocampus*, 261, 244–261.
- Kang, D., Ding, M., Topchiy, I., y Kocsis, B. (2017). Reciprocal interactions between medial septum and hippocampus in theta generation: Granger causality decomposition of mixed spike-field recordings. *Frontiers in Neuroanatomy*, 11.

- Kandel, E. R., y Spencer, W. A. (1968). Cellular neurophysiological approaches in the study of learning. *Physiological reviews*, 48(1), 65-134.
- Kania, A., Lewandowski, M. H., y Błasiak, A. (2014). Relaxin-3 and relaxin family peptide receptors—from structure to functions of a newly discovered mammalian brain system. *Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej*, 68, 851-864.
- Katz L. C., Burkhalter A., Dreyer W. J. (1984). Fluorescent latex microspheres as a retrograde neuronal marker for in vivo and in vitro studies of visual cortex. *Nature* 310, 498–500
- Kazemi, S., y Jamali, Y. (2022). Phase synchronization and measure of criticality in a network of neural mass models. *Scientific Reports*, 12(1).
- Keil, J., y Senkowski, D. (2018). Neural oscillations orchestrate multi-sensory processing. *The Neuroscientist*, 24(6), 609-626.
- Kelly, K. J., Donner, N. C., Hale, M. W., y Lowry, C. A. (2011). Swim stress activates serotonergic and nonserotonergic neurons in specific subdivisions of the rat dorsal raphe nucleus in a temperature-dependent manner. *Neuroscience*, 197, 251-268.
- Kenney, J., y Manahan-Vaughan, D. (2013). Learning-facilitated synaptic plasticity occurs in the intermediate hippocampus in association with spatial learning. *Frontiers in synaptic neuroscience*, 5, 10.
- Kerns, J. G., Cohen, J. D., Stenger, V. A., y Carter, C. S. (2004). Prefrontal cortex guides context-appropriate responding during language production. *Neuron*, 43(2), 283-291.
- Keshavarzi, S., Sullivan, R. K., Ianno, D. J., y Sah, P. (2014). Functional properties and projections of neurons in the medial amygdala. *Journal of Neuroscience*, 34(26), 8699-8715.
- Khan, S., et al.(2013). Local and long-range functional connectivity is reduced in concert in autism spectrum disorders. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(8), 3107–3112.
- Kim, J. J., y Diamond, D. M. (2002). The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. *Nature Reviews Neuroscience*, 3(6), 453-462.
- Kishi, T., Tsumori, T., Yokota, S., y Yasui, Y. (2006). Topographical projection from the hippocampal formation to the amygdala: a combined anterograde and retrograde tracing study in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 496(3), 349-368.

- Killcross, S., y Coutureau, E. (2003). Coordination of actions and habits in the medial prefrontal cortex of rats. *Cerebral cortex*, 13(4), 400-408.
- Kirihara, K., Rissling, A. J., Swerdlow, N. R., Braff, D. L., y Light, G. A. (2012). Hierarchical organization of gamma and theta oscillatory dynamics in schizophrenia. *Biological Psychiatry*, 71(10), 873-880.
- Kjonigsen, L. J., Lillehaug, S., Bjaalie, J. G., Witter, M. P., y Leergaard, T. B. (2015). Waxholm Space atlas of the rat brain hippocampal region: Three-dimensional delineations based on magnetic resonance and diffusion tensor imaging. *NeuroImage*, 108, 441-449.
- Knierim, J. J. (2015). The hippocampus. *Current Biology*, 25(23), 1116-1121.
- Köbber C., Apps R., Bechmann I., Lanciego J. L., Mey J., Thanos S. (2000). Current concepts in neuroanatomical tracing. *Prog. Neurobiol.* 62, 327-351
- Kocsis, B., Martínez-Bellver, S., Fiáth, R., Domonkos, A., Sviatkó, K., Schlingloff, D. y Hangya, B. (2022). Huygens synchronization of medial septal pacemaker neurons generates hippocampal theta oscillation. *Cell Reports*, 40(5)
- Koob, G. y Heinrichs, S. (1999) A role for corticotropin releasing factor and urocortin in behavioral responses to stressors. *Brain research*, 848 (1-2), 141-152.
- Korotkova, T., Ponomarenko, A., Monaghan, C. K., Poulter, S. L., Cacucci, F., Wills, T., y Lever, C. (2018). Reconciling the different faces of hippocampal theta: The role of theta oscillations in cognitive, emotional and innate behaviors. *Neuroscience y Biobehavioral Reviews*, 85, 65-80.
- Kosel, K. C., Van Hoesen, G. W., y Rosene, D. L. (1982). Non hippocampal cortical projections from the entorhinal cortex in the rat and rhesus monkey. *Brain Research*, 244(2), 201-213.
- Kovács, K. J. (1998). Invited review c-Fos as a transcription factor: a stressful (re) view from a functional map. *Neurochemistry international*, 33(4), 287-297.
- Kovács, K. J. (2008). Measurement of immediate-early gene activation-c-fos and beyond. *Journal of neuroendocrinology*, 20(6), 665-672.
- Kragel, J. E., y Voss, J. L. (2022). Looking for the neural basis of memory. *Trends in cognitive sciences*, 26(1), 53-65.
- Krasowski, M. D., y Harrison, N. L. (1999). *General anaesthetic actions on ligand-gated ion channels*.

- Krettek, J. E., y Price, J. L. (1977). Projections from the amygdaloid complex to the cerebral cortex and thalamus in the rat and cat. *Journal of Comparative Neurology*, 172(4), 687-722.
- Krettek, J. E., y Price, J. L. (1978). Amygdaloid projections to subcortical structures within the basal forebrain and brainstem in the rat and cat. *Journal of Comparative Neurology*, 178(2), 225-253.
- Kubota, Y., Inagaki, S., Shiosaka, S., Cho, H., Tateishi, K., Hashimura, E., Hamaoka, T., y Tohyama, M. (1983) The distribution of cholecystokinin octapeptide-like structures in the lower brain stem of the rat: an immunohistochemical analysis. *Neuroscience*, 9(3), 587-604.
- Kumar, J. R., Rajkumar, R., Lee, L. C., y Dawe, G. S. (2016). Nucleus incertus contributes to an anxiogenic effect of buspirone in rats: Involvement of 5-HT_{1A} receptors. *Neuropharmacology*, 110, 1-14.
- Kumar, J. R., Rajkumar, R., Jayakody, T., Marwari, S., Hong, J. M., Ma, S. y Dawe, G. S. (2017). Relaxin' the brain: a case for targeting the nucleus incertus network and relaxin-3/RXFP₃ system in neuropsychiatric disorders. *British journal of pharmacology*, 174(10), 1061-1076.
- Kinney, G., Kocsis, B., y Vertes, R. (1995) Injections of muscimol into the median raphe nucleus produce hippocampal theta rhythm in the urethane anesthetized rat. *Psychopharmacology*, 120(3), 244-248.
- LaBar, K. S., y Cabeza, R. (2006). Cognitive neuroscience of emotional memory. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(1), 54-64.
- Lachaux, J. P., Rodriguez, E., Martinerie, J., y Varela, F. J. (1999). Measuring phase synchrony in brain signals. *Human Brain Mapping*, 8(4), 194-208.
- Lang, P. J., y Davis, M. (2006). Emotion, motivation, and the brain: reflex foundations in animal and human research. *Progress in brain research*, 156, 3-29.
- Langston, R. F., Stevenson, C. H., Wilson, C. L., Saunders, I., y Wood, E. R. (2010). The role of hippocampal subregions in memory for stimulus associations. *Behavioural brain research*, 215(2), 275-291.
- Lawther, A. J., Clissold, M. L., Ma, S., Kent, S., Lowry, C. A., Gundlach, A. L., y Hale, M. W. (2015). Anxiogenic drug administration and elevated plus-maze exposure in rats activate populations of relaxin-3 neurons in the nucleus incertus and serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus. *Neuroscience*, 303, 270-284.

Lawther, A. J., Flavell, A., Ma, S., Kent, S., Lowry, C. A., Gundlach, A. L., y Hale, M. W. (2018). Involvement of serotonergic and relaxin-3 neuropeptide systems in the expression of anxiety-like behavior. *Neuroscience*, 390, 88-103.

LeDoux JE.(2000) Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci.* 23:155-84

Leopold DA, Murayama Y, Logothetis NK. (2003) Very slow activity fluctuations in monkey visual cortex: implications for functional brain imaging. *Cereb Cortex*, 13(4),422-33.

Leung, L. W. S. (1985). Spectral analysis of hippocampal EEG in the freely moving rat: effects of centrally active drugs and relations to evoked potentials. *Electroencephalography and clinical neurophysiology*, 60(1), 65-77.

Lesting, J., Daldrup, T., Narayanan, V., Himpe, C., Seidenbecher, T., y Pape, H. C. (2013). Directional theta coherence in prefrontal cortical to amygdalo-hippocampal pathways signals fear extinction. *PloS one*, 8(10) .

Lesting, J., Narayanan, R. T., Kluge, C., Sangha, S., Seidenbecher, T., y Pape, H. C. (2011). Patterns of coupled theta activity in amygdala-hippocampal-prefrontal cortical circuits during fear extinction. *PloS one*, 6(6) .

Leutgeb, S., Leutgeb, J. K., Moser, M. B., y Moser, E. I. (2005). Place cells, spatial maps and the population code for memory. *Current opinion in neurobiology*, 15(6), 738-746.

Lewis, D. A., Volk, D. W., y Hashimoto, T. (2004). Selective alterations in prefrontal cortical GABA neurotransmission in schizophrenia: A novel target for the treatment of working memory dysfunction. *Psychopharmacology*, 174(1),143-150.

Li, X., Yao, X., Fox, J., y Jefferys, J. G. (2007). Interaction dynamics of neuronal oscillations analysed using wavelet transforms. *Journal of Neuroscience Methods*, 160(1), 178-185.

Li, H. Y., y Sawchenko, P. E. (1998). Hypothalamic effector neurons and extended circuitries activated in "neurogenic" stress: a comparison of footshock effects exerted acutely, chronically, and in animals with controlled glucocorticoid levels. *Journal of Comparative Neurology*, 393(2), 244-266.

Lincoln, D. W. (1969). Correlation of Unit Activity in the Hypothalamus with EEG Patterns Associated with the Sleep Cycle. *Experimental neurology*, 24.

- Lisman, J. E., y Jensen, O. (2013). The Theta-Gamma Neural Code. *Neuron*, 77(6), 1002–1016.
- Little, S., y Brown, P. (2013). *Parkinsonism and Related Disorders 20S1 (2014) S44-S48 The functional role of beta oscillations in Parkinson's disease.*
- Liu, W. Z., Zhang, W. H., Zheng, Z. H., Zou, J. X., Liu, X. X., Huang, S. H. y Pan, B. X. (2020). Identification of a prefrontal cortex-to-amygdala pathway for chronic stress-induced anxiety. *Nature communications*, 11(1), 1-15.
- Luine, V., Attalla, S., Mohan, G., Costa, A., y Frankfurt, M. (2006). Dietary phytoestrogens enhance spatial memory and spine density in the hippocampus and prefrontal cortex of ovariectomized rats. *Brain research*, 1126(1), 183-187.
- Luine, V. N., Bowman, R. E., y Serrano, P. A. (2017). Sex differences in acute stress effects on spatial memory and hippocampal synaptic neurochemicals. *Understanding Stress at Work*, 52.
- Lopes Da Silva, F., Blanes, W., Kalitzin, S. N., Parra, J., Suffczynski, P., y Velis, D. N. (2003). Epilepsies as Dynamical Diseases of Brain Systems: Basic Models of the Transition between Normal and Epileptic Activity. *Epilepsia*, 44(12), 72–83.
- Lowet, E., De Weerd, P., Roberts, M. J., y Hadjipapas, A. (2022). Tuning Neural Synchronization: The Role of Variable Oscillation Frequencies in Neural Circuits. *Frontiers in systems neuroscience*, 16.
- Lu, L., Ren, Y., Yu, T., Liu, Z., Wang, S., Tan, L. y Luo, M. (2020). Control of locomotor speed, arousal, and hippocampal theta rhythms by the nucleus incertus. *Nature communications*, 11(1), 1-16.
- Li, Y., Mathis, A., Grewe, B. F., Osterhout, J. A., Ahanonu, B., Schnitzer, M. J. y Dulac, C. (2017). Neuronal representation of social information in the medial amygdala of awake behaving mice. *Cell*, 171(5), 1176-1190.
- Lu, L., Ren, Y., Yu, T., Liu, Z., Wang, S., Tan, L. y Luo, M. (2020). Control of locomotor speed, arousal, and hippocampal theta rhythms by the nucleus incertus. *Nature communications*, 11(1), 1-16.
- Luyck, K., Scheyltjens, I., Nuttin, B., Arckens, L., y Luyten, L. (2020). c-Fos expression following context conditioning and deep brain stimulation in the bed nucleus of the stria terminalis in rats. *Scientific Reports*, 10(1).
- Lubenov, E. V., y Siapas, A. G. (2009). Hippocampal theta oscillations are travelling waves. *Nature*, 459(7246), 534-539.

- Luque-García, A., Teruel-Martí, V., Martínez-Bellver, S., Adell, A., Cervera-Ferri, A., y Martínez-Ricós, J. (2018). Neural oscillations in the infralimbic cortex after electrical stimulation of the amygdala. Relevance to acute stress processing. *Journal of Comparative Neurology*, 526(8), 1403-1416.
- Luo, A. H., Tahsili-Fahadan, P., Wise, R. A., Lupica, C. R., y Aston-Jones, G. (2011). Linking context with reward: a functional circuit from hippocampal CA3 to ventral tegmental area. *Science*, 333(6040), 353-357.
- Ma, S., Blasiak, A., Olucha-Bordonau, F. E., Verberne, A. J., y Gundlach, A. L. (2013). Heterogeneous responses of nucleus incertus neurons to corticotrophin-releasing factor and coherent activity with hippocampal theta rhythm in the rat. *The Journal of physiology*, 591(16), 3981-4001.
- Ma, S., Bonaventure, P., Ferraro, T., Shen, P. J., Burazin, T. C. D., Bathgate, R. A. D., Liu, C., Tregear, G. W., Sutton, S. W., y Gundlach, A. L. (2007). Relaxin-3 in GABA projection neurons of nucleus incertus suggests widespread influence on forebrain circuits via G-protein-coupled receptor-135 in the rat. *Neuroscience*, 144(1), 165-190.
- Ma, S., Sang, Q., Lanciego, J. L., y Gundlach, A. L. (2009). Localization of relaxin-3 in brain of *Macaca fascicularis*: Identification of a nucleus incertus in primate. *Journal of Comparative Neurology*, 517(6), 856-872.
- Ma, S., y Gundlach, A. L. (2015). Ascending control of arousal and motivation: role of nucleus incertus and its peptide neuromodulators in behavioural responses to stress. *Journal of neuroendocrinology*, 27(6), 457-467.
- Maggi, C.A. y Meli, A. (1986a) Suitability of urethane anesthesia for physiopharmacological investigations in various systems Part 1: general considerations. *Experientia*, 42(2), 109-114.
- Maggi, C.A. y Meli, A. (1986b) Suitability of urethane anesthesia for physiopharmacological investigations. Part 3: Other systems and conclusions. *Experientia*, 42(5), 531-537.
- Maier, S. F., y Watkins, L. R. (2005). Stressor controllability and learned helplessness: the roles of the dorsal raphe nucleus, serotonin, and corticotropin-releasing factor. *Neuroscience y Biobehavioral Reviews*, 29(4-5), 829-841.
- Maldonado, M. (2014). The ascending reticular activating system. *Recent Advances of Neural Network Models and Applications*, 333-344.

- Maras, P. M., Molet, J., Chen, Y., Rice, C., Ji, S. G., Solodkin, A., y Baram, T. (2014). Preferential loss of dorsal-hippocampus synapses underlies memory impairments provoked by short, multimodal stress. *Molecular psychiatry*, 19(7), 811-822.
- Martínez-Bellver, S., Cervera-Ferri, A., Luque-García, A., Martínez-Ricós, J., Valverde-Navarro, A., Bataller, M., Guerrero, J., y Teruel-Martí, V. (2017). Causal relationships between neurons of the nucleus incertus and the hippocampal theta activity in the rat. *Journal of Physiology*, 595(5), 1775-1792.
- Martínez-Bellver, S., Cervera-Ferri, A., Martínez-Ricós, J., Ruiz-Torner, A., Luque-García, A., Blasco-Serra, A., Guerrero-Martínez, J., Bataller-Mompeán, M., y Teruel-Martí, V. (2015). Regular theta-firing neurons in the nucleus incertus during sustained hippocampal activation. *European Journal of Neuroscience*, 41(8), 1049-1067.
- Martínez-García, F., Novejarque, A., Gutiérrez-Castellanos, N., y Lanuza, E. (2012). Piriform cortex and amygdala. *The mouse nervous system*, 140-172.
- Marshall, L., y Born, J. (2007). The contribution of sleep to hippocampus-dependent memory consolidation. *Trends in cognitive sciences*, 11(10), 442-450.
- Massimini, M., Huber, R., Ferrarelli, F., Hill, S., y Tononi, G. (2004). The sleep slow oscillation as a traveling wave. *Journal of Neuroscience*, 24(31), 6862-6870.
- Maurer, A. P., VanRhoads, S. R., Sutherland, G. R., Lipa, P., y McNaughton, B. L. (2005). Self-motion and the origin of differential spatial scaling along the septo-temporal axis of the hippocampus. *Hippocampus*, 15(7), 841-852.
- McCartney, H., Johnson, A. D., Weil, Z. M., y Givens, B. (2004). Theta reset produces optimal conditions for long-term potentiation. *Hippocampus*, 14(6), 684-687.
- McDonald, A. J. (1998). Cortical pathways to the mammalian amygdala. *Progress in neurobiology*, 55(3), 257-332.
- McDonald, A. J. (1982). Neurons of the lateral and basolateral amygdaloid nuclei: a Golgi study in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 212(3), 293-312.
- McDonald, A. J., y Augustine, J. R. (1993). Localization of GABA-like immunoreactivity in the monkey amygdala. *Neuroscience*, 52(2), 281-294.

- McDonald, A. J., Mascagni, F., y Guo, L. (1996). Projections of the medial and lateral prefrontal cortices to the amygdala: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin study in the rat. *Neuroscience*, 71(1), 55-75.
- McDonald, A. J., y Mott, D. D. (2017). Functional neuroanatomy of amygdalohippocampal interconnections and their role in learning and memory. *Journal of neuroscience research*, 95(3), 797-820.
- MacDonald, A. W., Cohen, J. D., Stenger, V. A., y Carter, C. S. (2000). Dissociating the role of the dorsolateral prefrontal and anterior cingulate cortex in cognitive control. *Science*, 288(5472), 1835-1838.
- McEwen, B. S. (2007). Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiological reviews*, 87(3), 873-904.
- McEwen, B. S., Nasca, C., y Gray, J. D. (2016). Stress Effects on Neuronal Structure: Hippocampus, Amygdala, and Prefrontal Cortex. *Neuropsychopharmacology*, 41(1), 3-23.
- McEwen, B. S., Gray, J. D., y Nasca, C. (2015). 60 years of neuroendocrinology: redefining neuroendocrinology: stress, sex and cognitive and emotional regulation. *Journal of endocrinology*, 226(2), T67-T83.
- McFarland, N. R., y Haber, S. N. (2002). Thalamic relay nuclei of the basal ganglia form both reciprocal and nonreciprocal cortical connections, linking multiple frontal cortical areas. *Journal of Neuroscience*, 22(18), 8117-8132.
- McGowan, B. M., Minnion, J. S., Murphy, K. G., Roy, D., Stanley, S. A., Dhillon, W. S. y Bloom, S. R. (2014). Relaxin-3 stimulates the neuro-endocrine stress axis via corticotrophin-releasing hormone. *J Endocrinol*, 221(2), 337-346.
- McHugh, S. B., Fillenz, M., Lowry, J. P., Rawlins, J. N. P., y Bannerman, D. M. (2011). Brain tissue oxygen amperometry in behaving rats demonstrates functional dissociation of dorsal and ventral hippocampus during spatial processing and anxiety. *European Journal of Neuroscience*, 33(2), 322-337.
- McNaughton, N. (2018). What do you mean 'anxiety'? Developing the first anxiety syndrome biomarker. *Journal of the Royal Society of New Zealand*, 48(2-3), 177-190.
- Melia, K. R., Ryabinin, A. E., Schroeder, R., Bloom, F. E., y Wilson, M. C. (1994). Induction and habituation of immediate early gene expression in rat brain by acute and repeated restraint stress. *Journal of Neuroscience*, 14(10).

- Merino, E., Raya-Salom, D., Teruel-Martí, V., Adell, A., Cervera-Ferri, A., y Martínez-Ricós, J. (2021). Effects of acute stress on the oscillatory activity of the hippocampus–amygdala–prefrontal cortex network. *Neuroscience*, 476, 72-89.
- Meessen, H. y Olszewski, J. (1949). *A Cytoarchitectonic Atlas of the Rhombencephalon of the Rabbit*. Basel: S. Karger.
- Middleton, F. A., y Strick, P. L. (2000). Basal ganglia and cerebellar loops: motor and cognitive circuits. *Brain research reviews*, 31(2-3), 236-250.
- Millhouse, O. E., y DeOlmos, J. (1983). Neuronal configurations in lateral and basolateral amygdala. *Neuroscience*, 10(4), 1269-1300.
- Milner, B., Squire, L.R., Kandel, E.R., 1998. Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron* 20, 445-468.
- Mitzdorf, U. (1985). Current Source-Density Method and Application in Cat Cerebral Cortex: Investigation of Evoked Potentials and EEG Phenomena. *Physiological reviews*, 65 (1).
- Miyamoto, Y., Watanabe, Y., y Tanaka, M. (2008) Developmental expression and serotonergic regulation of relaxin 3/INSL7 in the nucleus incertus of rat brain. *Regulatory peptides*, 145(1-3), 54-59.
- Montgomery, S. M., y Buzsáki, G. (2007). Gamma oscillations dynamically couple hippocampal CA3 and CA1 regions during memory task performance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(36), 14495-14500.
- Morgan JI, Cohen DR, Hempstead JL, Curran T. (1987) Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure. *Science*, 237(4811), 192-7
- Moorman, D. E., James, M. H., McGlinchey, E. M., y Aston-Jones, G. (2015). Differential roles of medial prefrontal subregions in the regulation of drug seeking. *Brain research*, 1628, 130-146.
- Morest DK. 1961. Connections of the dorsal tegmental nucleus in the rat and rabbit. *J Anat*, 95, 229-246.
- Moser, M. B., y Moser, E. I. (1998). Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus*, 8(6), 608-619.
- Moser, M. B., Moser, E. I., Forrest, E., Andersen, P., y Morris, R. (1995). Spatial learning with a minilab in the dorsal hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(21), 9697-9701.

- Moruzzi, G., y Magoun, H. W. (1949). Brain stem reticular formation and activation of the EEG. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 1, 455-473
- Muller, RU; Kubie, JL (1987). The effects of changes in the environment on the spatial firing of hippocampal complex-spike cells. *The Journal of Neuroscience*, 7(7), 1951-1968.
- Mueller, E. M., Panitz, C., Hermann, C., y Pizzagalli, D. A. (2014). Prefrontal oscillations during recall of conditioned and extinguished fear in humans. *Journal of Neuroscience*, 34(21), 7059-7066.
- Munia, T. T. K., y Aviyente, S. (2019). Time-Frequency Based Phase-Amplitude Coupling Measure For Neuronal Oscillations. *Scientific Reports*, 9(1)
- Nitecka L, y Ben-Ari Y (1987). Distribution of GABA-like immunoreactivity in the rat amygdaloid complex. *Journal of Comparative Neurology*, 266, 45-55.
- Noh, K. M., Hwang, J. Y., Follenzi, A., Athanasiadou, R., Miyawaki, T., Grealley, J. M. y Zukin, R. S. (2012). Repressor element-1 silencing transcription factor (REST)-dependent epigenetic remodeling is critical to ischemia-induced neuronal death. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16).
- Nova-Marques, J. A., Garcia-Diaz, C., y Olucha-Bordonau, F. E. (2018). A new agent in the mechanisms underlying addiction and ingestion of alcohol: the nucleus incertus and the neuropeptide relaxin-3. *Revista de Neurologia*, 67(5), 175-186.
- Nuñez, A., y Buño, W. (2021). The theta rhythm of the hippocampus: From neuronal and circuit mechanisms to behavior. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 15, 649262.
- Nuñez, A., Cervera-Ferri, A., Olucha-Bordonau, F., Ruiz-Torner, A., y Teruel, V. (2006). Nucleus incertus contribution to hippocampal theta rhythm generation. *European Journal of Neuroscience*, 23(10), 2731-2738
- Oddie, S. D., y Bland, B. H. (1998). Hippocampal formation theta activity and movement selection. *Neuroscience y Biobehavioral Reviews*, 22(2), 221-231.
- O'Keefe, J., y Burgess, N. (1999). Theta activity, virtual navigation and the human hippocampus. *Trends in cognitive sciences*, 3(11), 403-406.
- O'Keefe, J., y Conway, D. H. (1978). Hippocampal place units in the freely moving rat: why they fire where they fire. *Experimental brain research*, 31(4), 573-590.

J. O'Keefe; J. Dostrovsky (1971). *The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat.* , 34(1), 171-175.

O'Keefe, J. y Recce, M. Phase relationship between hippocampal place units and the EEG theta rhythm. *Hippocampus*, 3(3):317-330, 1993.
Parvizi, J., y Damasio, A. (2001). Consciousness and the brainstem. *Cognition*, 79(1-2), 135-160.

Olucha-Bordonau, F. E., Otero-García, M., Sánchez-Pérez, A. M., Núñez, Á., Ma, S., y Gundlach, A. L. (2012). Distribution and targets of the relaxin-3 innervation of the septal area in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 520(9), 1903-1939.

Olucha-Bordonau, F. E., Teruel, V., Barcia-González, J., Ruiz-Torner, A., Valverde-Navarro, A. A., y Martínez-Soriano, F. (2003). Cytoarchitecture and efferent projections of the nucleus incertus of the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 464(1), 62-97.

Öngür, D., y Price, J. L. (2000). The organization of networks within the orbital and medial prefrontal cortex of rats, monkeys and humans. *Cerebral cortex*, 10(3), 206-219.

Padilla-Coreano, N., Bolkan, S. S., Pierce, G. M., Blackman, D. R., Hardin, W. D., Garcia-Garcia, A. L. y Gordon, J. A. (2016). Direct ventral hippocampal-prefrontal input is required for anxiety-related neural activity and behavior. *Neuron*, 89(4), 857-866.

Pape, H. C., Narayanan, R. T., Smid, J., Stork, O., y Seidenbecher, T. (2005). Theta activity in neurons and networks of the amygdala related to long-term fear memory. *Hippocampus*, 15(7), 874-880.

Parfitt, G. M., Nguyen, R., Bang, J. Y., Aqrabawi, A. J., Tran, M. M., Seo, D. K. y Kim, J. C. (2017). Bidirectional control of anxiety-related behaviors in mice: role of inputs arising from the ventral hippocampus to the lateral septum and medial prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology*, 42(8), 1715-1728.

Passerin, A. M., Cano, G., Rabin, B. S., Delano, B. A., Napier, J. L., y Sved, A. F. (2000). Role of locus coeruleus in foot shock-evoked Fos expression in rat brain. *Neuroscience*, 101(4), 1071-1082.

Pastalkova, E., Itskov, V., Amarasingham, A., y Buzsaki, G. (2008). Internally generated cell assembly sequences in the rat hippocampus. *Science*, 321(5894), 1322-1327.

Pavlidis C, Miyashita E, Asanuma H. Projection from the sensory to the motor cortex is important in learning motor skills in the monkey. *J Neurophysiol.* 1993 Aug;70(2):733-41

- Pavlidis, C. Watanabe, Y. McEwen, B.S. (1993) Effects of glucocorticoids on hippocampal long-term potentiation *Hippocampus*, 3,183-192
- Paxinos G. y Watson C. (2015) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Sixth edition 2007. Amsterdam: Academic Press.
- Penttonen, M., y Buzsáki, G. (2003). Natural logarithmic relationship between brain oscillators. *Thalamus and Related Systems*, 2(2), 145-152.
- Pereira, C. W., Santos, F. N., Sánchez-Pérez, A. M., Otero-García, M., Marchioro, M., Ma, S. y Olucha-Bordonau, F. E. (2013). Electrolytic lesion of the nucleus incertus retards extinction of auditory conditioned fear. *Behavioural brain research*, 247, 201-210.
- Pessoa, L. (2008). On the relationship between emotion and cognition. *Nature reviews neuroscience*, 9(2), 148-158.
- Peters, J., Kalivas, P. W., y Quirk, G. J. (2009). Extinction circuits for fear and addiction overlap in prefrontal cortex. *Learning y memory*, 16(5), 279-288.
- Petrovich, G. D., Canteras, N. S., y Swanson, L. W. (2001). Combinatorial amygdalar inputs to hippocampal domains and hypothalamic behavior systems. *Brain research reviews*, 38(1-2), 247-289.
- Phelps, E. A., y LeDoux, J. E. (2005). Contributions of the amygdala to emotion processing: from animal models to human behavior. *Neuron*, 48(2), 175-187.
- Pikovsky, A., Rosenblum, M., Kurths, J., and Hilborn, R. C. (2002). Synchronization: a Universal Concept in Nonlinear Science. *Am. J. Phys.* 70:655.
- Pinggal, E., Dockree, P. M., O'Connell, R. G., Bellgrove, M. A., y Andriillon, T. (2022). Pharmacological manipulations of physiological arousal and sleep-like slow waves modulate sustained attention. *Journal of Neuroscience*, 42(43), 8113-8124.
- Pitkänen, A., Pikkarainen, M., Nurminen, N., y Ylinen, A. (2000). Reciprocal connections between the amygdala and the hippocampal formation, perirhinal cortex, and postrhinal cortex in rat: a review. *Annals of the new York Academy of Sciences*, 911(1), 369-391.
- Pitkänen, A., Savander, V., y LeDoux, J. E. (1997). Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala. *Trends in neurosciences*, 20(11), 517-523.
- Poe GR (2017) Sleep is for forgetting. *J Neurosci* 37:464-473.

Pothuizen, H. H., Zhang, W. N., Jongen-Rêlo, A. L., Feldon, J., y Yee, B. K. (2004). Dissociation of function between the dorsal and the ventral hippocampus in spatial learning abilities of the rat: a within-subject, within-task comparison of reference and working spatial memory. *European Journal of Neuroscience*, 19(3), 705-712.

Potter, E., Behan, D., Linton, E., Lowry, P., Sawchenko, P., y Vale, W. (1992). The central distribution of a corticotropin-releasing factor (CRF)-binding protein predicts multiple sites and modes of interaction with CRF. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(9), 4192-4196.

Potter, E., Sutton, S., Donaldson, C., Chen, R., Perrin, M., Lewis, K. y Vale, W. (1994). Distribution of corticotropin-releasing factor receptor mRNA expression in the rat brain and pituitary. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(19), 8777-8781.

Preston, A. R., y Eichenbaum, H. (2013). Interplay of hippocampus and prefrontal cortex in memory. *Current biology*, 23(17), 764-773.

Preuss, T. M. (1995). Do rats have prefrontal cortex? The Rose-Woolsey-Akert program reconsidered. *Journal of cognitive neuroscience*, 7(1), 1-24.

Price J, Russchen F, y Amaral D (1987). *The limbic region. II: The amygdaloid complex* In Bjorklund A, Hokfelt T, y Swanson LW (Eds.), Vol. 5 Integrated systems of the CNS, Part I: Handbook of chemical neuroanatomy (279-388). Elsevier: Amsterdam, NY.

Radley, J. J., Arias, C. M., y Sawchenko, P. E. (2006). Regional differentiation of the medial prefrontal cortex in regulating adaptive responses to acute emotional stress. *Journal of Neuroscience*, 26(50), 12967-12976.

Rajbhandari, A. K., Zhu, R., Adling, C., Fanselow, M. S., y Waschek, J. A. (2016). Graded fear generalization enhances the level of c-fos-positive neurons specifically in the basolateral amygdala. *Journal of neuroscience research*, 94(12), 1393-1399.

Rajkumar, R., Wu, Y., Farooq, U., Tan, W. H., y Dawe, G. S. (2016). Stress activates the nucleus incertus and modulates plasticity in the hippocampo-medial prefrontal cortical pathway. *Brain research bulletin*, 120, 83-89.

Ray, S., Crone, N. E., Niebur, E., Franaszczuk, P. J., y Hsiao, S. S. (2008). Neural correlates of high-gamma oscillations (60-200 Hz) in macaque local field potentials and their potential implications in electrocorticography. *Journal of Neuroscience*, 28(45), 11526-11536.

- Ray, J. P., y Price, J. L. (1992). The organization of the thalamocortical connections of the mediodorsal thalamic nucleus in the rat, related to the ventral forebrain–prefrontal cortex topography. *Journal of Comparative Neurology*, 323(2), 167-197.
- Razavi, Y., Karimi, S., Karimi-Haghighi, S., Hesam, S., y Haghparast, A. (2020). Changes in c-fos and p-CREB signaling following exposure to forced swim stress or exogenous corticosterone during morphine-induced place preference are dependent on glucocorticoid receptor in the basolateral amygdala. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 98(11), 741-752.
- Report, R., Ikeda, J., Nakajima, T., Osborne, O. C., Mies, G., y Nowak, T. S. (1994). Coexpression of c-fos and hsp70 mRNAs in gerbil brain after ischemia: Induction threshold, distribution and time course evaluated by in situ hybridization. *Molecular Brain Research*, 26.
- Risold, P. Y., y Swanson, L. W. (1996). Structural evidence for functional domains in the rat hippocampus. *Science*, 272(5267), 1484-1486.
- Room, P., Groenewegen, H. J., y Lohman, A. H. (1986). Connections of the parahippocampal cortex in the cat. V. Intrinsic connections; comments on input/output connections with the hippocampus. *Journal of Comparative Neurology*, 252(1), 78-94.
- Rose JE, Woolsey CN. Structure and relations of limbic cortex and anterior thalamic nuclei in rabbit and cat. *Comp Neural* 1948; 89: 279-347.
- Rosene, D. L., y Van Hoesen, G. W. (1977). Hippocampal efferents reach widespread areas of cerebral cortex and amygdala in the rhesus monkey. *Science*, 198(4314), 315-317.
- Rotzinger, S., y Vaccarino, F. J. (2003). Cholecystokinin receptor subtypes: role in the modulation of anxiety-related and reward-related behaviours in animal models: 2001 CCNP Heinz Lehmann Award Paper. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, 28(3), 171-181.
- Rowson, S. A., y Pleil, K. E. (2021). Influences of Stress and Sex on the Paraventricular Thalamus: Implications for Motivated Behavior. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 15.
- Ruggiero, R. N., Rossignoli, M. T., Marques, D. B., de Sousa, B. M., Romcy-Pereira, R. N., Lopes-Aguiar, C., y Leite, J. P. (2021). Neuromodulation of hippocampal-prefrontal cortical synaptic plasticity and functional connectivity: implications for neuropsychiatric disorders. *Frontiers in cellular neuroscience*, 15.

Ruth, R. E., Collier, T. J., y Routtenberg, A. (1982). Topography between the entorhinal cortex and the dentate septotemporal axis in rats: I. Medial and intermediate entorhinal projecting cells. *Journal of Comparative Neurology*, 209(1), 69-78.

Ryan, P. J., Ma, S., Olucha-Bordonau, F. E., y Gundlach, A. L. (2011). Nucleus incertus-An emerging modulatory role in arousal, stress and memory. *In Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 35 (6) 1326-1341.

Rytova, V., Ganella, D. E., Hawkes, D., Bathgate, R. A., Ma, S., y Gundlach, A. L. (2019). Chronic activation of the relaxin-3 receptor on GABA neurons in rat ventral hippocampus promotes anxiety and social avoidance. *Hippocampus*, 29(10), 905-920.

Sacchet, M. D., LaPlante, R. A., Wan, Q., Pritchett, D. L., Lee, A. K., Hämäläinen, M., y Jones, S. R. (2015). Attention drives synchronization of alpha and beta rhythms between right inferior frontal and primary sensory neocortex. *Journal of neuroscience*, 35(5), 2074-2082.

Sah, P. (2017). Fear, anxiety, and the amygdala. *Neuron*, 96(1), 1-2.

Sah, P., Faber, E. L., Lopez de Armentia, M., y Power, J. (2003). The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiological reviews*, 83(3), 803-834.

Salzman, C. D., y Fusi, S. (2010). Emotion, cognition, and mental state representation in amygdala and prefrontal cortex. *Annual review of neuroscience*, 33, 173.

Sandi, C. (2004). Stress, cognitive impairment and cell adhesion molecules. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(12), 917-930.

Saper, C. B. (2002). The central autonomic nervous system: conscious visceral perception and autonomic pattern generation. *Annual review of neuroscience*, 25, 433.

Sapolsky, R. M., y Pulsinelli, W. A. (1985). Glucocorticoids potentiate ischemic injury to neurons: therapeutic implications. *Science*, 229(4720), 1397-1400.

Sapolsky, R. M. (1985). A mechanism for glucocorticoid toxicity in the hippocampus: increased neuronal vulnerability to metabolic insults. *Journal of Neuroscience*, 5(5), 1228-1232.

Sapolsky, R.M. (2000).The possibility of neurotoxicity in the hippocampus in major depression: a primer on neuron death. *Biological psychiatry*, 48(8),755-765.

- Sapolsky, R.M., Krey, L.C. y McEwen, B.S. (1984) Glucocorticoid sensitive hippocampal neurons are involved in terminating the adrenocortical stress response *Proceedings*
- Senba, E., Matsunaga, K., Tohyama, M., y Noguchi, K.(1993) Stress-induced c-fos expression in the rat brain: activation mechanism of sympathetic pathway. *Brain research bulletin*, 31(3-4),329-344.
- Seamans, J. K., Laphis, C. C., y Durstewitz, D. (2008). Comparing the prefrontal cortex of rats and primates: insights from electrophysiology. *Neurotoxicity research*, 14(2), 249-262.
- Sederberg, P. B., Schulze-Bonhage, A., Madsen, J. R., Bromfield, E. B., Litt, B., Brandt, A., y Kahana, M. J. (2007). Gamma oscillations distinguish true from false memories. *Psychological science*, 18(11), 927-932.
- Sejnowski, T. J., y Paulsen, O. (2006). Network oscillations: emerging computational principles. *Journal of Neuroscience*, 26(6), 1673-1676.
- Seidenbecher, T., Laxmi, T. R., Stork, O., y Pape, H. C. (2003). Amygdalar and hippocampal theta rhythm synchronization during fear memory retrieval. *Science*, 301(5634), 846-850.
- Selden, N. R. W., Everitt, B. J., Jarrard, L. E., y Robbins, T. W. (1991). Complementary roles for the amygdala and hippocampus in aversive conditioning to explicit and contextual cues. *Neuroscience*, 42(2), 335-350.
- Seidenbecher, T., Laxmi, T. R., Stork, O., y Pape, H. C. (2003). Amygdalar and hippocampal theta rhythm synchronization during fear memory retrieval. *Science*, 301(5634), 846
- Seth, A. K. (2010). A MATLAB toolbox for Granger causal connectivity analysis. *Journal of Neuroscience Methods*, 186(2), 262-273.
- Seth, A. K., Barrett, A. B., y Barnett, L. (2015). Granger causality analysis in neuroscience and neuroimaging. *Journal of Neuroscience*, 35(8), 3293-3297.
- Sheth, A., Berretta, S., Lange, N., y Eichenbaum, H. (2008). The amygdala modulates neuronal activation in the hippocampus in response to spatial novelty. *Hippocampus*, 18(2), 169-181.
- Shi And, C.-J., y Cassell, M. D. (1998). Cascade Projections From Somatosensory Cortex to the Rat Basolateral Amygdala Via the Parietal Insular Cortex. *J. Comp. Neurol*, 399, 469-491

- Shibata, H. (1992). Topographic organization of subcortical projections to the anterior thalamic nuclei in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 323(1), 117-127.
- Shirvalkar, P. R., Rapp, P. R., y Shapiro, M. L. (2010). Bidirectional changes to hippocampal theta-gamma comodulation predict memory for recent spatial episodes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(15), 7054-7059.
- Siapas, A. G., Lubenov, E. V., y Wilson, M. A. (2005). Prefrontal phase locking to hippocampal theta oscillations. *Neuron*, 46(1), 141-151.
- Singer, W. (1999). Neuronal Synchrony: A Versatile Code Review for the Definition of Relations? temporal relations requires the joint evaluation of re-sponses from more than one neuron, only experiments that permit simultaneous measurements of responses. *Neuron*, 24.
- Singewald, N., Kouvelas, D., Kaehler, S., Sinner, C., y Philippu, A. (2000) Peripheral chemoreceptor activation enhances 5 hydroxytryptamine release in the locus coeruleus of conscious rats. *Neuroscience Letters*, 289(1):17-20.
- Singh, A. (2018). Oscillatory activity in the cortico-basal ganglia-thalamic neural circuits in Parkinson's disease. *European Journal of Neuroscience*, 48(8), 2869-2878.
- Singh, Y. N., Singh, S. K., y Ray, A. K. (2012). Bioelectrical Signals as Emerging Biometrics: Issues and Challenges. *ISRN Signal Processing*, 2012, 1-13.
- Smith, C. M., Ryan, P. J., Hosken, I. T., Ma, S., y Gundlach, A. L. (2011). Relaxin-3 systems in the brain-The first 10 years. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 42(4), 262-275.
- Smith, C. M., Shen, P. J., Banerjee, A., Bonaventure, P., Ma, S., Bathgate, R. A. D., Sutton, S. W., y Gundlach, A. L. (2010). Distribution of relaxin-3 and RXFP₃ within arousal, stress, affective, and cognitive circuits of mouse brain. *Journal of Comparative Neurology*, 518(19).
- Srinivasan, R., Winter, W. R., Ding, J., y Nunez, P. L. (2007). *EEG and MEG coherence: measures of functional connectivity at distinct spatial scales of neocortical dynamics*.
- Sirota, A., Montgomery, S., Fujisawa, S., Isomura, Y., Zugaro, M., y Buzsáki, G. (2008). Entrainment of neocortical neurons and gamma oscillations by the hippocampal theta rhythm. *Neuron*, 60(4), 683-697.
- Sohal, V. S., Zhang, F., Yizhar, O., y Deisseroth, K. (2009). Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. *Nature*, 459(7247), 698-702.

- Spooner, R. K., y Wilson, T. W. (2022). Cortical theta–gamma coupling governs the adaptive control of motor commands. *Brain Communications*, 4(6).
- Staresina, B. P., Bergmann, T. O., Bonnefond, M., van der Meij, R., Jensen, O., Deuker, L., Elger, C. E., Axmacher, N., y Fell, J. (2015). Hierarchical nesting of slow oscillations, spindles and ripples in the human hippocampus during sleep. *Nature Neuroscience*, 18(11), 1679–1686
- Steriade, M., McCormick, D. A., y Sejnowski, T. J. (1993). Thalamocortical oscillations in the sleeping and aroused brain. *Science*, 262(5134), 679-685.
- Steriade, M., Timofeev, I., y Grenier, F. (2001). Natural waking and sleep states: a view from inside neocortical neurons. *Journal of neurophysiology*, 85(5), 1969-1985.
- Stinstra, J. G., y Peters, M. J. (1998). *The volume conductor may act as a temporal filter on the ECG and EEG.*
- Strange, B. A., Hurlmann, R., y Dolan, R. J. (2003). *An emotion-induced retrograde amnesia in humans is amygdala-and-adrenergic-dependent.*
- Strange, B. A., Witter, M. P., Lein, E. S., y Moser, E. I. (2014). Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(10), 655–669.
- Strüber, D., Basar-Eroglu, C., Hoff, E., y Stadler, M. (2000). Reversal-rate dependent differences in the EEG gamma-band during multistable visual perception. *International journal of psychophysiology*, 38(3), 243-252.
- Stujenske, J. M., Likhtik, E., Topiwala, M. A., y Gordon, J. A. (2014). Fear and safety engage competing patterns of theta-gamma coupling in the basolateral amygdala. *Neuron*, 83(4), 919-933.
- Stujenske, J. M., Spellman, T., y Gordon, J. A. (2015). Modeling the spatiotemporal dynamics of light and heat propagation for in vivo optogenetics. *Cell reports*, 12(3), 525-534.
- Stumpf, C., Petsche, H., y Gogolak, G. (1962). The significance of the rabbit's septum as a relay station between the midbrain and the hippocampus. II. The differential influence of drugs upon both the septal cell firing pattern and the hippocampus theta activity. *Electroencephalography and clinical neurophysiology*, 14, 212-219.
- Sutton, R., Koob, G., Le Moal, M., Rivier, J., y Vale, W. (1982) Corticotropin releasing factor produces behavioural activation in rats. *Nature*, 297(5864), 331–333.

Sutton, S., Bonaventure, P., Kuei, C., Roland, B., Chen, J., Nepomuceno, D., Lovenberg, T., y Liu, C. (2004) Distribution of G-Protein-Coupled Receptor (GPCR)₁₃₅ Binding Sites and Receptor mRNA in the Rat Brain Suggests a Role for Relaxin-3 in Neuroendocrine and Sensory Processing. *Neuroendocrinology*, 80(5):298–307.

Swanson, L. What is the brain? *Trends in neurosciences*, 23(11):519–527, 2000.

Swiergiel, A. H., Leskov, I. L., y Dunn, A. J. (2008). Effects of chronic and acute stressors and CRF on depression-like behavior in mice. *Behavioural brain research*, 186(1), 32-40.

Szlag, A., Sambak, P., Gugula, A., Trenk, A., Gundlach, A. L., y Blasziak, A. (2022). Catecholaminergic innervation and D2-like dopamine receptor-mediated modulation of brainstem nucleus incertus neurons in the rat. *Neuropharmacology*, 218, 109-216

Szczepanski, S. M., y Knight, R. T. (2014). Insights into human behavior from lesions to the prefrontal cortex. *Neuron*, 83(5), 1002-1018

Stujenske, J. M., Likhtik, E., Topiwala, M. A., y Gordon, J. A. (2014). Fear and safety engage competing patterns of theta-gamma coupling in the basolateral amygdala. *Neuron*, 83(4), 919-933.

Tanaka, M., Iijima, N., Miyamoto, Y., Fukusumi, S., Itoh, Y., Ozawa, H., y Ibata, Y. (2005). Neurons expressing relaxin 3/INSL 7 in the nucleus incertus respond to stress. *European Journal of Neuroscience*, 21(6), 1659–1670.

Tassonyi, E., Charpentier, E., Muller, D., Dumont, L., y Bertrand, D. (2002). *The role of nicotinic acetylcholine receptors in the mechanisms of anesthesia*.

Tellez-Merlo, G., Morales-Medina, J. C., Camacho-Ábrego, I., Juárez-Díaz, I., Aguilar-Alonso, P., de la Cruz, F. y Flores, G. (2019). Prenatal immune challenge induces behavioral deficits, neuronal remodeling, and increases brain nitric oxide and zinc levels in the male rat offspring. *Neuroscience*, 406, 594-605.

Teruel-Martí, V., Cervera-Ferri, A., Nuñez, A., Valverde-Navarro, A. A., Olucha-Bordonau, F. E., y Ruiz-Torner, A. (2008). Anatomical evidence for a ponto-septal pathway via the nucleus incertus in the rat. *Brain research*, 1218, 87-96.

Timofeeva, E., Huang, Q., y Richard, D. (2003). Effects of treadmill running on brain activation and the corticotropin-releasing hormone system. *Neuroendocrinology*, 77(6), 388-405.

- Timme, N. M., y Lapish, C. (2018). A tutorial for information theory in neuroscience. *eNeuro*, 5(3).
- Timofeev, I., Bazhenov, M., Seigneur, J., y Sejnowski, T. (2012). *Neuronal Synchronization and Thalamocortical Rhythms in Sleep, Wake and Epilepsy*.
- Tononi, G., y Cirelli, C. (2014). Sleep and the price of plasticity: from synaptic and cellular homeostasis to memory consolidation and integration. *Neuron*, 81(1), 12-34.
- Tononi, G., Edelman, G. M., Sporns, O., Tononi, G., y Edelman, G. M. (1998). *Complexity and coherency: integrating information in the brain*.
- Tononi, G., Sporns, O., y Edelman, G. M. (1992). Reentry and the Problem of Integrating Multiple Cortical Areas: *Simulation of Dynamic Integration in the Visual System Downloaded from (Vol. 2)*.
- Torao-Angosto, M., Manasanch, A., Mattia, M., y Sanchez-Vives, M. V. (2021). Up and Down States During Slow Oscillations in Slow-Wave Sleep and Different Levels of Anesthesia. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 15, 609-645.
- Torrence, C. y Compo, G.P. (1998) .^A practical guide to wavelet analysis", *Bulletin of the American Meteorological society*, 79(1),61-78.
- Tort, A. B., Komorowski, R. W., Manns, J. R., Kopell, N. J., y Eichenbaum, H. (2009). Theta-gamma coupling increases during the learning of item-context associations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(49), 20942-20947.
- Tovote, P., Esposito, M. S., Botta, P., Chaudun, F., Fadok, J. P., Markovic, M., Wolff, S. B. E., Ramakrishnan, C., Fenno, L., Deisseroth, K., Herry, C., Arber, S., y Lüthi, A. (2016). Midbrain circuits for defensive behaviour. *Nature*, 534(7606), 206-212.
- Trimper, J. B., Stefanescu, R. A., y Manns, J. R. (2014). Recognition memory and theta-gamma interactions in the hippocampus. *Hippocampus*, 24(3), 341-353.
- Turner, V. S., O'Sullivan, R. O., y Kheirbek, M. A. (2022). Linking external stimuli with internal drives: A role for the ventral hippocampus. *Current opinion in neurobiology*, 76, 102590.
- Uhlhaas, P. J., y Singer, W. (2006). Neural Synchrony in Brain Disorders: Relevance for Cognitive Dysfunctions and Pathophysiology. *In Neuron*, 52(1)155-168.
- Uylings, H. B., y van Eden, C. G. (1991). Qualitative and quantitative comparison of the prefrontal cortex in rat and in primates, including humans. *Progress in brain research*, 85, 31-62.

Uylings, H. B., Groenewegen, H. J., y Kolb, B. (2003). Do rats have a prefrontal cortex?. *Behavioural brain research*, 146(1-2), 3-17.

Vanderwolf, C. H. (1969). Hippocampal electrical activity and voluntary movement in the rat. *Electroencephalography and clinical neurophysiology*, 26(4), 407-418.

Van Groen, T., y Da Silva, F. L. (1985). Septotemporal distribution of entorhinal projections to the hippocampus in the cat: electrophysiological evidence. *Journal of Comparative Neurology*, 238(1), 1-9.

Van Someren, E. J., Van Der Werf, Y. D., Roelfsema, P. R., Mansvelder, H. D., y da Silva, F. L. (2011). Slow brain oscillations of sleep, resting state, and vigilance. *Progress in brain research*, 193, 3-15.

Van Strien, N. M., Cappaert, N. L. M., y Witter, M. P. (2009). The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. *Nature reviews neuroscience*, 10(4), 272-282.

Van Pett, K., Viau, V., Bittencourt, J., Chan, R., Li, H., Arias, C., Prins, G., Perrin, M., Vale, W., y Sawchenko, P. (2000) Distribution of mRNAs encoding CRF receptors in brain and pituitary of rat and mouse. *The Journal of comparative neurology*, 428(2),191-212.

Varela, F., Lachaux, JP., Rodriguez, E. *et al.* (2001). The brainweb: Phase synchronization and large-scale integration. *Nat Rev Neurosci* 2, 229-239.

Vargha-Khadem, F., Gadian, D. G., Watkins, K. E., Connelly, A., Van Paesschen, W., y Mishkin, M. (1997). Differential effects of early hippocampal pathology on episodic and semantic memory. *Science*, 277(5324), 376-380.

Vertes, R. P. (2004). Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse*, 51(1), 32-58.

Vertes, R. y Kocsis, B. (1997) Brainstem-diencephalo septohippocampal systems controlling the theta rhythm of the hippocampus. *Neuroscience*,81(4), 893-926.

Vila Merkle, H. (2022). *Influencia de la estimulación cerebral profunda de la corteza infralímbica sobre un modelo farmacológico de ansiedad en rata. Estudio anatomofuncional de las diferencias debidas al sexo*

Vila-Merkle, H., González-Martínez, A., Campos-Jiménez, R., Martínez-Ricós, J., Teruel-Martí, V., Blasco-Serra, A. y Cervera-Ferri, A. (2021). The Oscillatory Profile Induced by the Anxiogenic Drug FG-7142 in the Amygdala-Hippocampal Network Is Reversed by Infralimbic Deep Brain Stimulation: Relevance for Mood Disorders. *Biomedicines*, 9(7), 783.

- Vinck, M., Oostenveld, R., van Wingerden, M., Battaglia, F., y Pennartz, C. M. A. (2011). An improved index of phase-synchronization for electrophysiological data in the presence of volume-conduction, noise and sample-size bias. *NeuroImage*, 55(4), 1548–1565.
- Voloh, B., y Womelsdorf, T. (2016). A role of phase-resetting in coordinating large scale neural networks during attention and goal-directed behavior. *Frontiers in systems neuroscience*, 10, 18.
- Vyazovskiy, V. V., Faraguna, U., Cirelli, C., y Tononi, G. (2009). Triggering slow waves during NREM sleep in the rat by intracortical electrical stimulation: effects of sleep/wake history and background activity. *Journal of neurophysiology*, 101(4), 1921-1931.
- Wada, E., Way, J., Lebacqz-Verheyden, A. M., y Battey, J. F. (1990). Neuromedin B and gastrin-releasing peptide mRNAs are differentially distributed in the rat nervous system. *Journal of Neuroscience*, 10(9), 2917-2930.
- Waddell, J., Bangasser, D. A., y Shors, T. J. (2008). The basolateral nucleus of the amygdala is necessary to induce the opposing effects of stressful experience on learning in males and females. *Journal of Neuroscience*, 28(20), 5290-5294.
- Walker, L. C., y Lawrence, A. J. (2017). The role of orexins/hypocretins in alcohol use and abuse. *Behavioral Neuroscience of Orexin/Hypocretin*, 221-246.
- Wallenstein, G. V., Hasselmo, M. E., y Eichenbaum, H. (1998). The hippocampus as an associator of discontinuous events. *Trends in neurosciences*, 21(8), 317-323.
- Washburn, M. S., y Moises, H. C. (1992). *Electrophysiological and Morphological Properties of Rat Basolateral Amygdaloid Neurons in vitro*.
- Watanabe, Y., Tsujimura, A., Takao, K., Nishi, K., Ito, Y., Yasuhara, Y. y Tanaka, M. (2011). Relaxin-3-deficient mice showed slight alteration in anxiety-related behavior. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 5, 50.
- Wellman, L. L., Yang, L., y Sanford, L. D. (2015). Effects of corticotropin releasing factor (CRF) on sleep and temperature following predictable controllable and uncontrollable stress in mice. *Frontiers in Neuroscience*, 9, 258.
- Wells, C. E., Amos, D. P., Jeewajee, A., Douchamps, V., Rodgers, J., O'Keefe, J., y Lever, C. (2013). Novelty and anxiolytic drugs dissociate two components of hippocampal theta in behaving rats. *Journal of Neuroscience*, 33(20), 8650-8667.

- Wiener, N. (1956). *The theory of prediction. Modern mathematics for engineers.*
- Williams, J. M., y Givens, B. (2003). Stimulation induced reset of hippocampal theta in the freely performing rat. *Hippocampus*, 13(1), 109-116.
- Wirsing, K. (2020) "Time Frequency Analysis of Wavelet and Fourier Transform," in Wavelet Theory. IntechOpen.
- Witter, M. P. (2010). Connectivity of the hippocampus. *In Hippocampal microcircuits*, 5-26.
- Witter, M. P., Doan, T. P., Jacobsen, B., Nilssen, E. S., y Ohara, S. (2017). Architecture of the entorhinal cortex a review of entorhinal anatomy in rodents with some comparative notes. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 11.
- Yang, Y., y Wang, J. Z. (2017). From structure to behavior in basolateral amygdala-hippocampus circuits. *Frontiers in neural circuits*, 11, 86.
- Wyss, J. M., Swanson, L. W., y Cowan, W. M. (1979). A study of sub-cortical afferents to the hippocampal formation in the rat. *Neuroscience*, 4(4), 463-476.
- Yang, Y., y Wang, J. Z. (2017). From structure to behavior in basolateral amygdala-hippocampus circuits. *Frontiers in Neural Circuits*, 11.
- Yener, G. G., y Başar, E. (2013). Brain oscillations as biomarkers in neuropsychiatric disorders: Following an interactive panel discussion and synopsis. *Supplements to Clinical Neurophysiology*, 62, 343-363.
- Yavas, E., Gonzalez, S., y Fanselow, M. S. (2019). Interactions between the hippocampus, prefrontal cortex, and amygdala support complex learning and memory. *F1000Research*, 8.
- Yeo, S. S., Chang, P. H., y Jang, S. H. (2013). The ascending reticular activating system from pontine reticular formation to the thalamus in the human brain. *Frontiers in Human Neuroscience*.
- Zaborszky, L., Gaykema, R. P., Swanson, D. J., y Cullinan, W. E. (1997). Cortical input to the basal forebrain. *Neuroscience*, 79(4), 1051-1078.
- Zelikowsky, M., Hersman, S., Chawla, M. K., Barnes, C. A., y Fanselow, M. S. (2014). Neuronal ensembles in amygdala, hippocampus, and prefrontal cortex track differential components of contextual fear. *Journal of neuroscience*, 34(25), 8462-8466.
- Zemla, R., y Basu, J. (2017). Hippocampal function in rodents. *Current Opinion in Neurobiology*, 43, 187-197.
- Zucca, S., D'Urso, G., Pasquale, V., Vecchia, D., Pica, G., Bovetti, S., y Fellin, T. (2017). An inhibitory gate for state transition in cortex. *Elife*, 6.

Tabla 10: Potencias relativas en machos

Banda	Periodo	HPCd	HPCi	HPCv	BLA	IL
Lentas	Basal	0.725±0.021	0.643±0.024	0.757±0.033	0.690±0.023	0.816±0.019
	Estimulación	0.224±0.031***	0.261±0.066***	0.314±0.048***	0.355±0.053***	0.539±0.060***
	Post	0.431±0.046***	0.393±0.054**	0.546±0.058 †	0.441±0.053**	0.570±0.057***
Delta	Basal	0.176±0.015	0.202±0.016	0.137±0.017	0.175±0.011	0.117±0.012
	Estimulación	0.148±0.022	0.133±0.028	0.241±0.056	0.301±0.04	0.300±0.064*
	Post	0.240±0.023	0.222±0.024	0.239±0.225 0.036*	0.282±0.039	0.261±0.035**
Theta bajo	Basal	0.079±0.007	0.119±0.016	0.07±0.014	0.095±0.006	0.040±0.004
	Estimulación	0.547±0.015***	0.502±0.073***	0.290±0.050***	0.235±0.025***	0.080±0.008***
	Post	0.277±0.039***	0.287±0.37*	0.160±0.026*	0.175±0.022*	0.114±0.021**
Theta alto	Basal	0.008±0.001	0.021±0.002	0.015±0.002	0.016±0.001	0.005±0.001
	Estimulación	0.031±0.004***	0.083±0.07	0.043±0.007***	0.053±0.007***	0.019±0.003***
	Post	0.021±0.003***	0.043±0.005	0.024±0.003	0.034±0.004*	0.013±0.002
Spindles	Basal	1.05E-03± 1.16E-04	3.59E-03± 2.26E-04	2.70E-03± 4.01E-04	2.65E-03± 3.42E-04	5.56E-04± 1.03E-04
	Estimulación	4.88E-03± 2.85E-04***	7.32E-03± 1.14E-03***	9.73E-03± 1.78E-03***	1.18E-02± 1.47E-03***	4.20E-03± 6.03E-04***
	Post	4.11E-03± 8.33E-04***	7.34E-03±9.96E-04**	4.99E-03± 5.86E-04*	7.80E-03± 1.30E-03*	2.29E-03± 4.52E-04**
Beta	Basal	8.92E-04± 9.51E-05	3.29E-03±4.00E-04	3.94E-03± 8.17E-04	2.14E-03± 3.17E-04	3.88E-04± 6.87E-05
	Estimulación	5.12E-03± 5.13E-04***	8.12E-03± 1.33E-03*	1.38E-02± 1.97E-03***	1.02E-02± 1.28E-03***	6.89E-03± 1.37E-03***
	Post	3.36E-03± 5.60E-04**	9.38E-03± 1.98E-03*	7.41E-03± 1.14E-03 †	5.52E-03± 8.42E-04*	1.45E-03± 2.40E-04**
Gamma bajo	Basal	9.48E-05± 1.17E-05	4.65E-04± 1.09E-04	1.82E-03± 5.37E-04	1.35E-04± 2.28E-05	6.23E-05± 1.23E-05
	Estimulación	1.27E-03± 2.09E-04***	2.62E-03± 7.77E-04***	5.69E-03± 1.36E-03***	1.06E-03± 1.52E-04***	1.79E-03± 4.38E-04***
	Post	3.83E-04± 6.27E-05**	1.78E-03± 6.19E-04 †	3.25E-03± 9.97E-04	4.09E-04± 7.50E-05*	2.57E-04± 6.15E-05**
Gamma medio	Basal	6.91E-06± 6.94E-07	3.77E-05± 9.50E-06	1.32E-04± 3.48E-05	1.19E-05± 1.81E-06	6.74E-06± 1.50E-06
	Estimulación	4.32E-04± 31.37E-04***	8.83E-04± 2.88E-04***	8.32E-04± 2.69E-04***	2.58E-04± 6.61E-05***	3.73E-04± 9.53E-05***
	Post	3.48E-05± 6.51E-06**	8.66E-05± 1.84E-05	4.03E-04± 1.34E-04	3.87E-05± 7.50E-06*	2.72E-05± 6.33E-06 †

Nota: Media±error estándar. Significación estadística en la comparación por pares del periodo basal con los periodos estimulación y post: ***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05, †<0.08. Se subrayan los casos en los que existen diferencias significativas entre el periodo estimulación y el post.

Tabla 11: Potencias relativas en hembras y diferenciación sexual entre ejemplares

Tabla 11: Potencias relativas en hembras y diferenciación sexual entre ejemplares						
Banda	Periodo	HPCd	HPCi	HPCv	BLA	IL
Lentas	Basal	0.766± 0.021	0.650± 0.059	0.762± 0.010	0.679± 0.047	0.775± 0.052
	Estimulación	0.276± 0.054**	0.314± 0.081**	0.406± 0.023*	0.342± 0.071*	0.561± 0.093**
	Post	0.398± 0.079*	0.285± 0.037*	0.482± 0.482*	0.385± 0.052*	0.509± 0.086*
Delta	Basal	0.162± 0.016	0.199± 0.024	0.139± 0.022	0.206± 0.033	0.164± 0.037
	Estimulación	0.234± 0.094	0.241± 0.083	0.214± 0.046	0.380± 0.089	0.312± 0.107
	Post	0.284± 0.045	0.296± 0.041	0.229± 0.043	0.378± 0.045	0.351± 0.079
Theta bajo	Basal	0.072± 0.014	0.123± 0.033	0.066± 0.011	0.094± 0.015	0.052± 0.012
	Estimulación	0.447± 0.084**	0.371± 0.092*	0.216± 0.047*	0.185± 0.039†	0.093± 0.021
	Post	0.274± 0.060 †	0.288± 0.051 †	0.170± 0.042*	0.175± 0.014 †	0.106± 0.021
Theta alto	Basal	0.008± 0.001	0.021± 0.007	0.013± 0.003	0.019± 0.002	0.007± 0.002
	Estimulación	0.032± 0.006*	0.047± 0.007*	0.058± 0.018 †	0.042± 0.011 †	0.017± 0.004
	Post	0.025± 0.006 †	0.055± 0.011*	0.045± 0.018 †	0.035± 0.005 †	0.024± 0.008
Spindles	Basal	1.18E-03± 1.17E-04	3.47E-03± 1.12E-03	3.56E-03± 8.98E-04	2.68E-03± 5.81E-04	1.19E-03± 3.90E-04
	Estimulación	4.42E-03± 3.90E-04**	9.68E-03± 1.59E-03*	1.04E-02± 2.94E-03*	7.56E-03± 7.89E-04*	3.29E-03± 3.31E-04*
	Post	7.73E-03± 2.73E-03 †	1.42E-02± 3.92E-03*	1.01E-02± 3.49E-03*	8.47E-03± 1.75E-03*	5.62E-03± 2.26E-03*
Beta	Basal	8.75E-04± 7.43E-05	2.22E-03± 5.80E-04	5.12E-03± 1.54E-03	2.05E-03± 4.71E-04	6.13E-04± 1.51E-04
	Estimulación	5.77E-03± 7.82E-04**	1.13E-02± 1.04E-03**	<u>4.95E-02± 1.58E-02**</u>	<u>1.84E-02± 7.38E-03**</u>	4.56E-03± 8.16E-04**
	Post	4.56E-03± 6.43E-04*	8.98E-03± 1.26E-03*	1.30E-02± 3.64E-03 †	1.51E-02± 6.07E-03*	3.87E-03± 1.01E-03*
Gamma bajo	Basal	1.12E-04± 1.31E-05	2.53E-04± 6.57E-05	3.03E-03± 7.26E-04	2.10E-04± 6.55E-05	7.12E-05± 2.06E-05
	Estimulación	1.07E-03± 4.99E-05***	1.59E-03± 4.76E-04**	2.78E-02± 9.58E-03**	1.49E-02± 8.65E-03**	1.08E-03± 3.14E-04**
	Post	4.34E-04± 3.25E-05 †	8.58E-04± 1.64E-04*	6.53E-03± 1.64E-03	4.16E-04± 4.08E-05*	3.90E-04± 5.48E-05*
Gamma medio	Basal	1.57E-05± 3.63E-06	1.86E-05± 5.70E-06	2.73E-04± 7.57E-05	1.58E-05± 3.93E-06	9.20E-06± 2.10E-06
	Estimulación	4.79E-04± 1.22E-04**	4.96E-04± 2.52E-04**	1.14E-02± 5.55E-03**	6.54E-03± 4.02E-03*	5.81E-04± 2.80E-04**
	Post	4.95E-05± 4.95E-05*	7.31E-05± 2.33E-05 †	6.49E-04± 2.11E-03*	1.37E-02± 8.11E-03*	4.13E-05± 5.15E-06*

Nota: Media±error estándar. Significación estadística en la comparación por pares del periodo basal con los periodos estimulación y post: ***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05, †<0.08. En negrita se muestran los casos en los que hay diferencias estadísticas con el sexo contrario. Se subrayan los casos en los que existen diferencias significativas entre el periodo estimulación y el post.

Tabla 12: Recuento de regiones con actividad theta en machos

Tabla 12: Recuento de regiones con actividad theta en machos

Banda	Periodo	HPCd	HPCi	HPCv	BLA	IL
Theta bajo	Basal	0.478± 0.077	0.770±0.153	0.290±0.065	0.625±0.069	0.107±0.024
	Estimulación	1.434± 0.051***	1.618±0.099***	1.126±0.145***	1.331±0.152**	0.345±0.073***
	Post	1.571± 0.192***	2.069±0.187***	1.161±0.231*	1.302±0.183*	0.692±0.167**
Theta alto	Basal	8.386± 0.227	8.930± 0.424	8.471±0.194	9.006±0.287	7.635±0.190
	Estimulación	5.978± 0.478***	7.652± 0.356	6.626±0.390***	9.320±0.320	7.997±0.314
	Post	7.337± 0.219*	8.049± 0.292	7.609±0.336	9.099±0.196	7.933±0.232

Nota: Media±error estándar. Significación estadística en la comparación por pares del periodo basal con los periodos estimulación y post: ***p<0.001, **<0.01, *p<0.05.

Tabla 13: Tiempo medio de los segmentos con actividad theta en machos

Banda	Periodo	HPCd	HPCi	HPCv	BLA	IL
Theta bajo	Basal	0.870±0.093	1.158±0.202	0.543±0.092	0.662±0.041	0.394±0.089
	Estimulación	<u>2.481±0.207***</u>	2.210±0.370	1.231±0.215*	0.930±0.077*	0.717±0.096*
	Post	1.579±0.154*	1.413±0.187	1.659±0.243*	1.070±0.125†	0.616±0.103*
Theta alto	Basal	0.470±0.032	0.373±0.045	0.354±0.023	0.384±0.024	0.566±0.031
	Estimulación	0.807±0.081***	0.568±0.068*	0.554±0.069	0.346±0.032	0.320±0.017
	Post	0.552±0.044 †	0.458±0.058	0.386±0.028	0.353±0.026	0.451±0.037

Nota: Media=error estándar. Significación estadística en la comparación por pares del periodo basal con los periodos estimulación y post: ***p<0.001, *p<0.05, †p<0.08. Se subrayan los casos en los que existen diferencias significativas entre el periodo estimulación y el post.

Tabla 13: Tiempo medio de los segmentos con actividad theta en machos

Tabla 14: Tiempo total con actividad theta en machos

Tabla 14: Tiempo total con actividad theta en machos

Banda	Periodo	HPCd	HPCi	HPCv	BLA	IL
Theta bajo	Basal	0.492±0.114	0.637±0.110	0.423±0.148	0.429±0.056	0.059±0.015
	Estimulación	<u>4.047±0.082***</u>	3.433±0.432***	2.089±0.483**	1.167±0.128***	0.328±0.095***
	Post	2.534±0.374**	2.799±0.443**	1.332±0.318*	1.860±0.382**	0.655±0.209**
Theta alto	Basal	3.858±0.194	3.242±0.329	2.898±0.191	3.534±0.204	4.381±0.157
	Estimulación	4.892±0.050***	4.105±0.397	3.597±0.323	2.939±0.138	2.566±0.109***
	Post	4.074±0.199**	3.538±0.335	3.063±0.245	3.137±0.210	3.567±0.233

Nota: Media±error estándar. Significación estadística en la comparación por pares del periodo basal con los periodos estimulación y post: ***p<0.001, **p<0.01. Se subrayan los casos en los que existen diferencias significativas entre el periodo estimulación y el post.

Tabla 15: Recuento de regiones con actividad theta en hembras

Banda	Periodo	HPCd	HPCi	HPCv	BLA	IL
Theta bajo	Basal	0.243± 0.058	0.882± 0.324	0.317± 0.114	0.560± 0.202	0.168± 0.076
	Estimulación	1.451± 0.091*	1.419± 0.106*	1.691± 0.354*	1.296± 0.331*	0.281± 0.074
	Post	1.688± 0.216*	1.932± 0.275*	1.358± 0.439†	1.106± 0.124*	0.420± 0.142
Theta alto	Basal	8.631± 0.273	8.674± 0.147	7.608± 0.406	9.245± 0.458	7.994± 0.149
	Estimulación	5.713± 0.698*	7.140± 0.728	7.248± 0.379	8.673± 0.405	8.637± 0.315
	Post	8.190± 0.839	8.882± 0.664	7.655± 0.501	9.751± 0.093	8.593± 0.738

Nota: Media±error estándar. Significación estadística en la comparación por pares del periodo basal con los periodos estimulación y post: *p<0.05.

Tabla 15: Recuento de regiones con actividad theta en hembras

Tabla 16: Tiempo medio de los segmentos con actividad theta en hembras

Tabla 16: Tiempo medio de los segmentos con actividad theta en hembras

Banda	Período	HPCd	HPCi	HPCv	BLA	IL
Theta bajo	Basal	0.922 ± 0.334	0.642 ± 0.149	0.347 ± 0.105	0.473 ± 0.144	0.361 ± 0.142
	Estimulación	1.925 ± 0.328*	1.535 ± 0.393*	0.896 ± 0.156**	1.106 ± 0.208*	0.638 ± 0.276
	Post	1.381 ± 0.207†	1.329 ± 0.195*	0.898 ± 0.031**	0.816 ± 0.064*	0.467 ± 0.145
Theta alto	Basal	0.447 ± 0.046	0.397 ± 0.050	0.405 ± 0.039	0.384 ± 0.038	0.520 ± 0.052
	Estimulación	0.733 ± 0.117	0.513 ± 0.059	0.457 ± 0.090	0.371 ± 0.017	0.334 ± 0.317
	Post	0.370 ± 0.037	0.308 ± 0.018	0.303 ± 0.014	0.314 ± 0.018	0.038 ± 0.025

Nota: Media=error estándar. Significación estadística en la comparación por pares del periodo basal con los periodos estimulación y post: **p<0.01, *p<0.05, †<0.08.

Tabla 17: Tiempo total con actividad theta en hembras

Banda	Periodo	HPCd	HPCi	HPCv	BLA	IL
Theta bajo	Basal	0.429± 0.203	0.813± 0.355	0.166± 0.069	0.423± 0.176	0.095± 0.045
	Estimulación	2.838± 0.545*	2.319± 0.656*	1.776± 0.549*	1.322± 0.341*	0.209± 0.086*
	Post	2.532± 0.606*	2.756± 0.578*	1.263± 0.454†	0.935± 0.162†	0.242± 0.094*
Theta alto	Basal	3.799± 0.301	3.337± 0.345	3.040± 0.285	3.462± 0.212	4.37± 0.10
	Estimulación	4.192± 0.464	3.861± 0.360	3.238± 0.502	3.243± 0.287	2.68± 0.24**
	Post	3.041± 0.146	2.752± 0.075	2.412± 0.127	3.039± 0.115	2.93± 0.31

Nota: Media±error estándar. Significación estadística en la comparación por pares del periodo basal con los periodos estimulación y post: *p<0.05, †p<0.08.

Tabla 17: Tiempo total con actividad theta en hembras

Tabla 18: Información mutua de la frecuencia gamma en machos

Tabla 18: Información mutua de la frecuencia gamma en machos

Banda	Periodo	Gamma bajo	Gamma medio	Banda	Periodo	Gamma bajo	Gamma medio
HPCd_HPCi	Basal	0.511± 0.043	0.476± 0.0151	HPCi_BLA	Basal	0.481± 0.016	0.447± 0.012
	Estimulación	0.494± 0.051	0.8251± 0.0315**		Estimulación	0.414± 0.015*	0.767± 0.028*
	Post	0.510± 0.048	0.486± 0.021		Post	0.475± 0.017	0.433± 0.006
HPCd_HPCv	Basal	0.444± 0.018	0.514± 0.023	HPCi_IL	Basal	0.571± 0.023	0.565± 0.030
	Estimulación	0.394± 0.013	0.438± 0.018		Estimulación	0.420± 0.012**	0.583± 0.030
	Post	0.383± 0.009	0.430± 0.015		Post	0.475± 0.015†	0.476± 0.023
HPCd_BLA	Basal	0.458± 0.009	0.458± 0.009	HPCv_BLA	Basal	0.438± 0.025	0.489± 0.018
	Estimulación	0.564± 0.0276*	0.564± 0.027		Estimulación	0.397± 0.024	0.439± 0.032
	Post	0.413± 0.007	0.413± 0.007†		Post	0.395± 0.018	0.408± 0.017*
HPCd_IL	Basal	0.616± 0.053	0.550± 0.020	HPCv_IL	Basal	0.561± 0.063	0.638± 0.059
	Estimulación	0.515± 0.040	0.675± 0.060		Estimulación	0.426± 0.046	0.4101± 0.022
	Post	0.447± 0.026**	0.451± 0.017**		Post	0.406± 0.033	0.339± 0.017
HPCi_HPCv	Basal	0.440± 0.012	0.469± 0.041	BLA_IL	Basal	0.595± 0.039	0.561± 0.025
	Estimulación	0.324± 0.005*	0.407± 0.039		Estimulación	0.508± 0.042	0.607± 0.064
	Post	0.417± 0.009	0.406± 0.029		Post	0.484± 0.039*	0.456± 0.020**

Nota: Media±error estándar. Significación estadística en la comparación por pares del periodo basal con los periodos estimulación y post: **p<0.01,*p<0.05.

Tabla 19: Información mutua de la frecuencia gamma en hembras y diferencias sexuales

Tabla 19: Información mutua de la frecuencia gamma en hembras y diferencias sexuales

Banda	Periodo	Gamma bajo	Gamma medio	Banda	Periodo	Gamma bajo	Gamma medio
HPCd_HPCi	Basal	0.511±0.041	0.529±0.031	HPCi_BLA	Basal	0.619±0.056	0.596±0.082
	Estimulación	0.445±0.022	0.646±0.075		Estimulación	0.427±0.045†	0.521±0.072
	Post	0.462±0.032	0.474±0.034		Post	0.575±0.072	0.567±0.078
HPCd_HPCv	Basal	0.420±0.012	0.477±0.023	HPCi_IL	Basal	0.530±0.030	0.523±0.023
	Estimulación	0.417±0.066	0.508±0.090		Estimulación	0.403±0.029	0.503±0.063
	Post	0.371±0.019	0.409±0.010		Post	0.420±0.016	0.442±0.025
HPCd_BLA	Basal	0.512±0.038	0.561±0.070	HPCv_BLA	Basal	0.450±0.027	0.522±0.053
	Estimulación	0.415±0.037	0.641±0.078		Estimulación	0.501±0.075	0.582±0.124
	Post	0.427±0.034	0.514±0.066		Post	0.399±0.025	0.488±0.076
HPCd_IL	Basal	0.579±0.046	0.419±0.014	HPCv_IL	Basal	0.462±0.017	0.528±0.030
	Estimulación	0.475±0.032	0.414±0.067		Estimulación	0.434±0.060	0.485±0.069
	Post	0.418±0.019	0.408±0.027		Post	0.384±0.017	0.410±0.008
HPCi_HPCv	Basal	0.583±0.040	0.541±0.046	BLA_IL	Basal	0.529±0.024	0.535±0.043
	Estimulación	0.615±0.082	0.505±0.067		Estimulación	0.375±0.027	0.473±0.038
	Post	0.472±0.022	0.495±0.050		Post	0.433±0.027	0.463±0.035

Nota: Media±error estándar. Significación estadística en la comparación por pares del periodo basal con los periodos estimulación y post: †p<0.08. En negrita se muestran los casos en los que hay diferencias estadísticas con el sexo contrario.

Tabla 20: wPLI theta bajo y theta alto en machos

Tabla 20: wPLI theta bajo y theta alto en machos

Banda	Periodo	Theta bajo	Theta alto	Banda	Periodo	Theta bajo	Theta alto
HPCd_HPCi	Basal	0.587 ±0.047	0.255±0.013	HPCi_BLA	Basal	0.646±0.040	0.259±0.016
	Estimulación	0.763±0.062**	<u>0.554±0.048**</u>		Estimulación	0.596±0.038	0.301±0.016
	Post	0.616±0.616	0.303±0.034		Post	0.513±0.059	0.229±0.011
HPCd_HPCv	Basal	0.486±0.040	0.293±0.017	HPCi_IL	Basal	0.512±0.050	0.244±0.012
	Estimulación	<u>0.734±0.049**</u>	<u>0.614±0.058**</u>		Estimulación	0.474±0.040	0.282±0.018
	Post	0.533±0.051*	0.254±0.017		Post	0.389±0.020	0.253±0.025
HPCd_BLA	Basal	0.471±0.030	0.253±0.015	HPCv_BLA	Basal	0.438±0.022	0.291±0.019
	Estimulación	0.550±0.037*	0.302±0.018		Estimulación	0.549±0.016	0.295±0.015
	Post	0.454±0.017	0.281±0.010		Post	0.478±0.027	0.252±0.009
HPCd_IL	Basal	0.397±0.012	0.314±0.015	HPCv_IL	Basal	0.387±0.013	0.283±0.025
	Estimulación	0.448±0.021	0.282±0.018		Estimulación	0.393±0.029	0.294±0.025
	Post	0.415±0.015	0.289±0.014		Post	0.427±0.022	0.296±0.027
HPCi_HPCv	Basal	0.532±0.046	0.278±0.031	BLA_IL	Basal	0.444±0.017	0.266±0.012
	Estimulación	<u>0.799±0.050**</u>	<u>0.579±0.040*</u>		Estimulación	0.664±0.033**	0.390±0.026**
	Post	0.584±0.073	0.364±0.037		Post	0.632±0.046*	0.330±0.032*

Nota: Media±error estándar. Significación estadística en la comparación por pares del periodo basal con los periodos estimulación y post: **p<0.01,*p<0.05. Se subrayan los casos en los que existen diferencias significativas entre el periodo estimulación y el post.

Tabla 21: wPLI gamma bajo y gamma medio en machos

Banda	Periodo	Gamma bajo	Gamma medio	Banda	Periodo	Gamma bajo	Gamma medio
HPCd_HPCi	Basal	0.182±0.025	0.100±0.005	HPCi_BLA	Basal	0.211±0.029	0.131±0.019
	Estimulación	0.150±0.012	<u>0.209±0.021*</u>		Estimulación	0.195±0.030	0.204±0.016
	Post	0.182±0.025	0.113±0.011		Post	0.173±0.022†	0.155±0.022
HPCd_HPCv	Basal	0.154±0.012	0.104±0.009	HPCi_IL	Basal	0.131±0.007	0.087±0.006
	Estimulación	0.148±0.017	<u>0.442±0.060**</u>		Estimulación	0.108±0.007	<u>0.201±0.019*</u>
	Post	0.150±0.016	0.092±0.007		Post	0.165±0.023	0.099±0.011
HPCd_BLA	Basal	0.157±0.013	0.121±0.011	HPCv_BLA	Basal	0.180±0.022	0.116±0.013
	Estimulación	0.137±0.006	<u>0.386±0.029***</u>		Estimulación	0.149±0.013	<u>0.241±0.041*</u>
	Post	0.158±0.010	0.122±0.011		Post	0.143±0.015	0.103±0.004
HPCd_IL	Basal	0.198±0.011	0.143±0.014	HPCv_IL	Basal	0.121±0.006	0.107±0.007
	Estimulación	0.143±0.010†	0.381±0.043**		Estimulación	0.174±0.013	<u>0.358±0.094**</u>
	Post	0.188±0.019	0.128±0.008		Post	0.122±0.008	0.089±0.007
HPCi_HPCv	Basal	0.182±0.035	0.085±0.004	BLA_IL	Basal	0.186±0.019	0.162±0.018
	Estimulación	<u>0.155±0.025</u>	0.196±0.032**		Estimulación	0.167±0.014	<u>0.388±0.055**</u>
	Post	0.237±0.072*	0.105±0.005		Post	0.145±0.006	0.150±0.017

Nota: Media±error estándar. Significación estadística en la comparación por pares del periodo basal con los periodos estimulación y post: **p<0.01,*p<0.05. Se subrayan los casos en los que existen diferencias significativas entre el periodo estimulación y el post.

Tabla 22: wPLI theta bajo y theta alto en hembras y diferencias sexuales

Tabla 22: wPLI theta bajo y theta alto en hembras y diferencias sexuales

Banda	Periodo	Theta bajo	Theta alto	Banda	Periodo	Theta bajo	Theta alto
HPCd_HPCi	Basal	0.371±0.024	0.270±0.020	HPCi_BLA	Basal	0.459±0.029	0.346±0.055
	Estimulación	<u>0.765±0.085*</u>	0.591±0.130*		Estimulación	0.598±0.053	0.431±0.080
	Post	0.566±0.099*	0.317±0.057		Post	0.504±0.050	0.369±0.051
HPCd_HPCv	Basal	0.492±0.040	0.257±0.018	HPCi_IL	Basal	0.398±0.016	0.252±0.023
	Estimulación	0.643±0.063*	0.432±0.083*		Estimulación	0.572±0.059*	0.319±0.025
	Post	0.449±0.028	0.247±0.018		Post	0.367±0.036	0.235±0.028
HPCd_BLA	Basal	0.432±0.012	0.268±0.016	HPCv_BLA	Basal	0.471±0.055	0.291±0.026
	Estimulación	0.587±0.034*	0.425±0.071**		Estimulación	0.488±0.039	0.294±0.038
	Post	0.438±0.011	0.298±0.017		Post	0.559±0.068	0.269±0.017
HPCd_IL	Basal	0.401±0.032	0.250±0.018	HPCv_IL	Basal	0.456±0.024	0.237±0.013
	Estimulación	0.405±0.019	0.246±0.020		Estimulación	0.471±0.061	0.329±0.053
	Post	0.371±0.017	0.250±0.010		Post	0.451±0.039	0.223±0.019
HPCi_HPCv	Basal	0.552±0.069	0.274±0.031	BLA_IL	Basal	0.440±0.013	0.332±0.036
	Estimulación	0.621±0.096*	0.447±0.112*		Estimulación	0.695±0.072**	0.497±0.050**
	Post	0.655±0.064	0.318±0.031		Post	0.562±0.065*	0.411±0.021*

Nota: Media±error estándar. Significación estadística en la comparación por pares del periodo basal con los periodos estimulación y post: **p<0.01,*p<0.05. En negrita se muestran los casos en los que hay diferencias estadísticas con el sexo contrario.

Tabla 23: wPLI gamma bajo y gamma medio en hembras y diferencias sexuales

Tabla 23: wPLI gamma bajo y gamma medio en hembras y diferencias sexuales

Banda	Periodo	Gamma bajo	Gamma medio	Banda	Periodo	Gamma bajo	Gamma medio
HPCd_HPCi	Basal	0.154±0.040	0.128±0.017	HPCi_BLA	Basal	0.267±0.060	0.236±0.050
	Estimulación	0.146±0.007	<u>0.253±0.043*</u>		Estimulación	<u>0.188±0.030*</u>	<u>0.544±0.124**</u>
	Post	0.130±0.013	0.105±0.010		Post	0.254±0.039	0.156±0.023*
HPCd_HPCv	Basal	0.198±0.027	0.118±0.017	HPCi_IL	Basal	0.136±0.006	0.185±0.040
	Estimulación	0.173±0.027	<u>0.370±0.132*</u>		Estimulación	0.141±0.024	<u>0.431±0.134**</u>
	Post	0.206±0.037	0.130±0.015		Post	0.128±0.017	0.115±0.010
HPCd_BLA	Basal	0.167±0.031	0.179±0.021	HPCv_BLA	Basal	0.221±0.029	0.286±0.077
	Estimulación	0.143±0.012	<u>0.667±0.048***</u>		Estimulación	0.204±0.023	0.310±0.063
	Post	0.136±0.006	0.104±0.011		Post	0.262±0.015	0.217±0.037
HPCd_IL	Basal	0.207±0.021	0.193±0.029	HPCv_IL	Basal	0.134±0.017	0.105±0.017
	Estimulación	0.178±0.037	0.210±0.043		Estimulación	0.131±0.009	0.399±0.154**
	Post	0.161±0.021	0.098±0.009*		Post	0.154±0.014	0.103±0.010
HPCi_HPCv	Basal	0.345±0.066	0.160±0.032	BLA_IL	Basal	0.278±0.065	0.280±0.051
	Estimulación	<u>0.133±0.013*</u>	0.403±0.154*		Estimulación	0.269±0.066	<u>0.648±0.136**</u>
	Post	0.339±0.074	0.122±0.023		Post	0.226±0.058	0.188±0.049*

Nota: Media±error estándar. Significación estadística en la comparación por pares del periodo basal con los periodos estimulación y post: *p<0.05, †p<0.08. En negrita se muestran los casos en los que hay diferencias estadísticas con el sexo contrario. Se subrayan los casos en los que existen diferencias significativas entre el periodo estimulación y el post.

Tabla 24: Acoplamiento fase-amplitud en machos

Tabla 24: Acoplamiento fase-amplitud en machos

Banda	Período	HPCd	HPCi	HPCv	BLA	IL
Theta	Basal	8.86E-06±6.27E-07	1.56E-05±2.57E-06	1.08E-04±1.99E-05	8.90E-06±5.30E-07	1.27E-05±7.44E-07
bajo_gamma	Estimulación	1.37E-05±1.19E-06*	2.87E-05±3.79E-06*	1.03E-04±1.65E-05	<u>8.15E-06±3.45E-07</u>	1.60E-05±1.18E-06
bajo	Post	9.12E-06±6.50E-07†	2.06E-05±1.95E-06	1.03E-04±1.69E-05	1.06E-05±7.18E-07	1.52E-05±8.48E-07
Theta	Basal	2.25E-06±1.24E-07	4.33E-06±5.24E-07	1.12E-04±2.60E-05	3.42E-06±3.56E-07	3.75E-06±2.20E-07
bajo_gamma	Estimulación	3.65E-06±1.63E-07**	1.03E-05±1.30E-06*	7.55E-05±7.19E-06	4.64E-06±4.45E-07	<u>7.63E-06±6.31E-07**</u>
medio	Post	2.75E-06±1.54E-07	4.57E-06±3.76E-07	1.39E-04±3.69E-05	3.92E-06±4.32E-07	6.49E-06±4.56E-07

Nota: Media±error estándar. Significación estadística en la comparación por pares del periodo basal con los periodos estimulación y post: **p<0.01, *p<0.05, †<0.08. Se subrayan los casos en los que existen diferencias significativas entre el periodo estimulación y el post.

Tabla 25: Acoplamiento fase-amplitud en hembras y diferencias sexuales

Banda	Periodo	HPCd	HPCi	HPCv	BLA	IL
Theta	Basal	9.39E-06±6.83E-07	1.22E-05±1.90E-06	4.81E-05±1.72E-05	6.64E-06±1.11E-06	1.07E-05±1.03E-06
bajo_gamma	Estimulación	1.22E-05±1.86E-06	1.23E-05±2.29E-06	6.61E-05±2.03E-05	2.75E-05±1.05E-05†	1.38E-05±1.33E-06
bajo	Post	7.98E-06±3.89E-07	1.32E-05±7.37E-07	6.54E-05±2.74E-05	6.82E-06±1.04E-06	1.16E-05±1.69E-06
Theta	Basal	3.05E-06±2.70E-07	3.32E-06±5.88E-07	1.46E-05±4.71E-06	2.00E-06±3.19E-07	3.61E-06±3.67E-07
bajo_gamma	Estimulación	5.89E-06±2.21E-07†	3.91E-06±8.12E-07	3.13E-05±1.22E-05	1.66E-05±6.39E-06	5.91E-06±5.82E-07*
medio	Post	3.09E-06±3.20E-07	2.75E-06±4.51E-07	1.48E-05±5.14E-06	1.85E-06±3.36E-07	3.43E-06±2.73E-07

Nota: Media+error estándar. Significación estadística en la comparación por pares del periodo basal con los periodos estimulación y post: *p<0.05, †<0.08. En negrita se muestran los casos en los que hay diferencias estadísticas con el sexo contrario.

Tabla 25: Acoplamiento fase-amplitud en hembras y diferencias sexuales

