

DEPARTAMENT D'ANATOMIA I EMBRIOLOGIA
HUMANA

EL NÚCLEO INCERTUS Y SU CONTRIBUCIÓN AL
CONTROL DE LA OSCILACIÓN THETA HIPOCÁMPICA.

ANA CERVERA FERRI

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Servei de Publicacions
2010

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 1 de juliol de 2010 davant un tribunal format per:

- Dr. Francisco Martínez Soriano
- Dr. Ángel Núñez Molina
- Dra. Margarita Rodrigo Angulo
- Dr. Alberto Prats Galino
- Dr. Fernando Martínez García

Va ser dirigida per:

Dr. Vicent Teruel i Martí

Dra. Amparo Ruiz Torner

©Copyright: Servei de Publicacions
Ana Cervera Ferri

Dipòsit legal: V-2061-2011

I.S.B.N.: 978-84-370-7921-9

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Arts Gràfiques, 13 baix

46010 València

Spain

Telèfon:(0034)963864115

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
FACULTAT DE MEDICINA I ODONTOLOGIA
DEPARTAMENT D'ANATOMIA I EMBRIOLOGIA HUMANA

**El Núcleo Incertus
y su contribución al control
de la Oscilación Theta Hipocámpica**

TESIS DOCTORAL

Presentada por

Ana Cervera Ferri

Dirigida por

Dr. Vicent Teruel Martí

Dra. Amparo Ruiz Torner

VALÈNCIA
2010

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
FACULTAT DE MEDICINA I ODONTOLOGIA
DEPARTAMENT D'ANATOMIA I EMBRIOLOGIA HUMANA

Dr. Vicent Teruel Martí, Profesor Contratado Doctor del
Departamento de Anatomía y Embriología Humana. Universitat de València.
Dra. Amparo Ruiz Torner, Catedrática de Universidad del
Departamento de Anatomía y Embriología Humana. Universitat de València.

HACEMOS CONSTAR:

Que Ana Cervera Ferri ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo de su Tesis Doctoral «*El Núcleo Incertus y su contribución al control de la Oscilación Theta Hipocámpica*», y habiendo revisado el trabajo, consideramos que reúne las condiciones necesarias para optar al Grado de Doctor.

Y para que conste, en cumplimiento de la legislación vigente, firmamos el presente certificado

en Valencia, a 1 de junio de 2010

Dr. Vicent Teruel Martí

Dra. Amparo Ruiz Torner

Para mis padres
Y para Antonio

(...) la extensión de los campos desiertos, por donde un viandante marcha deprisa hacia la estación cercana; y el caminito que recorre se va a grabar en su recuerdo por la excitación que le dan los lugares nuevos, los actos desusados, la charla reciente, los adioses de la despedida que le acompañan aún en el silencio de la noche y la dulzura próxima del retorno.

Marcel Proust, *En busca del tiempo perdido*

La mente recibe una miríada de impresiones (...) De todas partes viene una lluvia incesante de innúmeros átomos, que al caer se autoconfiguran en la vida del lunes o del martes (...) Registremos los átomos conforme caen sobre la mente en el orden en el que caen, busquemos el patrón, por desconectado e incoherente que parezca, que cada visión o incidente graban en la conciencia.

Virginia Woolf, *La ficción moderna*

Durante el tiempo que he pasado trabajando en esta Tesis muchas personas me han dado motivos para estar agradecida.

Los primeros, Amparo y Vicent, por vuestra guía y porque habéis sufrido en ocasiones más que yo con este trabajo, que no es, ni de lejos, sólo mío. Ya dije una vez que no siempre se tiene la suerte de encontrar maestros. Me arriesgaré a que me corrijáis por repetirme. Amparo, gracias por el cuidado y por el cariño, por leer y releer. Vicent, por las conversaciones, por compartir obsesiones y almuerzos. Gracias por los desvelos y las discusiones sin fin. Por cierto, el huevo fue primero, sin duda. Espero haber aprendido sobretodo de las formas, y esta vez no hablo del L^AT_EX. Es un placer aprender y compartir inquietudes con vosotros.

Gracias también a los compañeros, amigos, del Departamento que habéis estado cerca en muchos momentos. Se agradece mucho trabajar y aprender con gente con quienes se está a gusto.

Ana, Ali, Espe... Habéis compartido conmigo momentos muy diferentes del proceso. Ana, mi primera compañera de ciencia... fue un placer aprender contigo, ya lo sabes. Ali, Espe... habéis estado en el final, compartiendo el desquicio. Gracias por hacerlo más llevadero. Rocío, por fin llega el momento. Gracias por tu ayuda desde el principio.

Gracias a Juan Guerrero y a Manolo Mompeán. Gran parte de este trabajo es gracias a vosotros.

Muchas gracias, Ángel, por la oportunidad de aprender contigo. Siempre es un placer volver a Madrid con todos vosotros.

Todo esto ha sido más fácil gracias a quienes habéis compartido conmigo un espacio o tiempo que valga la pena recordar. Y sabéis quienes sois. Gracias. Gracias por los cafés, por las conversaciones, por los ánimos, por hacerme creer que mi sitio estaba aquí y por hacer que la vida sea más fácil, aunque algunos sigáis pensando que me dedico casi a controlar plagas de roedores, aunque algunas estéis lejos, o lejos a ratos, pero sólo en kilómetros: he tenido mucha suerte.

A mis padres y a mi original familia. Gracias por darnos todas las oportunidades posibles, una educación y una vida feliz. Sobretodo por estar siempre ahí, cerca. Porque crecer entre el Corfú de Durrell, Macondo y la mafia calabresa te hace fuerte y además es divertido.

A Antonio. Gracias. Por todo. Por entenderme y seguir ahí. Por soportar lo más duro del proceso. Espero compensarlo. Gracias por compartir el camino, equilibrarme y dar sentido a la búsqueda.

Gracias.

Este trabajo ha sido realizado con la ayuda del Fondo de Investigaciones Sanitarias del Instituto de Salud Carlos III (PI061816) y con la beca de Formación de Profesorado Universitario AP-2004-4126 del Ministerio de Educación y Ciencia.

RESUMEN

Las oscilaciones cerebrales constituyen un mecanismo para la integración temporal de la actividad de poblaciones neuronales distribuidas. La oscilación theta es característica del estado activado del hipocampo y su contribución resulta fundamental para los procesos cognitivos en que participa esta estructura y que incluyen la integración sensorimotora y los procesos de aprendizaje y memoria. La generación o modulación de esta actividad rítmica están reguladas por un complejo sistema que tiene su origen en el tronco del encéfalo y en el que intervienen de manera crítica estructuras del prosencéfalo basal y del diencefalo.

En el tegmento pontino, el *núcleo incertus* (NI) presenta proyecciones sobre las principales estructuras implicadas en el control de esta oscilación, lo que nos ha llevado a considerar su posible integración en el sistema tegmental de modulación de la activación hipocámpica. En un estudio previo, nuestro grupo verificó además que la estimulación de NI es capaz de generar ritmo theta en el hipocampo en ratas anestesiadas con uretano.

En el trabajo de tesis que se presenta se muestra la existencia de una ruta directa desde el principal generador reticular de la oscilación, el núcleo *reticularis pontis oralis*, hasta el marcapasos de la oscilación, el complejo *septum medial-banda diagonal* mediante un estudio de inyección doble de trazadores neuronales.

Además, se ha profundizado en la implicación de este núcleo en la activación de la oscilación hipocámpica. Para ello, en ratas anestesiadas con uretano, se ha realizado el registro de la actividad neuronal en NI en condiciones espontáneas y en condiciones de generación de ritmo theta en el hipocampo. El estudio de su influencia ha incluido también el análisis del efecto de su lesión o inhibición sobre la oscilación hipocámpica. Por otra parte, se ha estudiado la actividad local de campo en NI y su correlación con la hipocámpica en distintas condiciones de activación, con el objetivo de analizar si NI forma parte del sistema de estructuras que presentan una oscilación sincronizada con la del hipocampo. La actividad de NI ha sido estudiada también en ratas con electrodos implantados crónicamente. En éstas, se ha analizado tanto la actividad neuronal como la actividad eléctrica local de campo y su correlación con la sincronización hipocámpica en distintos estados de activación a lo largo del ciclo de sueño/vigilia.

Los resultados obtenidos permiten afirmar que NI está implicado en la generación de la actividad theta hipocámpica y que, en determinadas condiciones, resulta necesario para que ésta se origine. Tanto en el animal anestesiado como en el ciclo de sueño/vigilia, la actividad neuronal en NI se correlaciona con estados activados del hipocampo. Además, se ha podido observar actividad rítmica a frecuencias theta en NI, que en determinadas condiciones tiene lugar a la misma frecuencia que en el hipocampo, con el que muestra una elevada coherencia. En conjunto, el trabajo presentado apoya la inclusión de NI como estructura clave en el sistema de control de la oscilación hipocámpica.

ÍNDICE GENERAL

1. Introducción	3
1.1. Las oscilaciones y el procesamiento del tiempo	3
1.2. La oscilación theta hipocámpica	6
1.2.1. El hipocampo en la integración sensorimotora y la memoria	6
1.2.2. Contribución del hipocampo a los procesos cognitivos . .	7
1.2.2.1. El hipocampo y la representación espacial: el	
mapa cognitivo	8
1.2.2.2. El hipocampo y la medida del tiempo: el ritmo	
theta hipocámpico	10
1.2.3. Organización estructural básica y conectividad intrínseca	
del hipocampo	12
1.2.4. El sistema septohipocámpico en la generación de ritmo	
theta hipocámpico	18
1.2.5. Influencia del hipotálamo posterior sobre la oscilación theta	21
1.2.6. La formación reticular troncoencefálica y el control de la	
activación del ritmo theta	24
1.3. El núcleo incertus	33
1.3.1. Nomenclatura y delimitación	33
1.3.2. Organización citoarquitectónica y neuroquímica	34
1.3.3. Conectividad del núcleo incertus	36
1.3.4. Implicación de NI en el control del estado de activación y	
de la oscilación theta hipocámpica	38
2. Hipótesis y objetivos	41
2.1. Planteamiento del problema	41
2.2. Hipótesis	41
2.3. Objetivos	42
2.4. Planteamiento del estudio	43
3. Material y Métodos	45
3.1. Análisis de la actividad neuronal y de campo	45
3.1.1. Fundamentos teóricos	45
3.1.2. Procedimientos experimentales generales	60

3.1.3.	Procedimientos experimentales específicos para los registros bajo anestesia con uretano	66
3.1.4.	Descripción de los experimentos bajo anestesia	68
3.1.5.	Registros crónicos en rata no anestesiada	73
3.1.6.	Descripción del experimento 4: registros crónicos	74
3.2.	Trazado de conexiones e Inmonohistoquímica	75
3.2.1.	Fundamentos	75
3.2.2.	Procedimientos experimentales	80
4.	Resultados I: Actividad del NI	87
4.1.	Actividad de NI en anestesia	87
4.1.1.	Registro unitario en NI	87
4.1.2.	Inactivación de NI	94
4.1.3.	Actividad theta en NI	95
4.2.	NI en vigilia y sueño	114
5.	Resultados II: Ruta RPO-NI-SMBD	126
5.1.	Eferencias de RPO	127
5.2.	Aferencias de NI	131
5.3.	Aferencias de SM/BD	132
5.4.	Dobles marcajes	137
6.	Resumen de los resultados	149
7.	Discusión	153
7.1.	NI como núcleo de control	154
7.2.	Actividad neuronal en NI	156
7.2.1.	Organización de las proyecciones reticulares sobre el prosencéfalo basal y la corteza límbica	156
7.2.2.	Contribución de la formación reticular a los distintos estados de vigilancia	160
7.2.3.	Contribución de la formación reticular a la oscilación theta hipocámpica	161
7.2.4.	Contribución de los sistemas reticulares al sueño REM	161
7.2.5.	Actividad neuronal en el núcleo incertus: conclusiones	162
7.3.	Distintas vías de generación de theta	162
8.	Conclusiones	163
	Bibliografía	165

ÍNDICE DE FIGURAS

1.1. Sincronización de la actividad oscilatoria	6
1.2. Representación espaciotemporal en el hipocampo y estructuras asociadas	9
1.3. El circuito hipocámpico	13
1.4. Hipocampo como asociador	15
1.5. Circuito de formación, consolidación y recuperación de memoria	17
1.6. Conexiones septohipocámpicas	20
1.7. Circuito actual del control del ritmo theta hipocámpico	22
1.8. Conexiones de SUM con el sistema septohipocámpico	23
1.9. El sistema reticular activador ascendente	25
1.10. Organización de la formación reticular. Representación en cortes horizontales	28
1.11. Organización de la formación reticular. Representación en cortes coronales	30
1.12. Localización y subdivisión del NI	35
1.13. Conexiones de NI en relación con el ritmo theta hipocámpico	37
1.14. NI como mediador de la respuesta a CRH	39
1.15. Estimulación de NI	40
3.1. Contribuciones sinápticas	46
3.2. Potenciales intra y extracelulares	48
3.3. Selección de espigas	49
3.4. Potenciales ortodróxicos y antidróxicos	52
3.5. Histograma de autocorrelación	54
3.6. Histogramas de tiempo periestímulo	55
3.7. Representación de actividad neuronal sincronizada y desincronizada	56
3.8. Superposición de ondas	57
3.9. Espectros de potencia	58
3.10. Análisis de tiempo-frecuencia	59
3.11. Referencias estereotáxicas	62
3.12. Sistema de registro	64
3.13. Marcaje retrógrado	76
3.14. Inmunohistoquímica y avidina-biotina-peroxidasa	79
3.15. Inyección de trazadores	83

4.1. Esquema del experimento de registro unitario en NI	89
4.2. Neuronas de tipo I	90
4.3. Neuronas de tipo II	91
4.4. Activación de las neuronas de NI durante la generación de theta	92
4.5. Esquema del experimento de lesión	93
4.6. Efecto de la lesión o inhibición de NI	94
4.7. Esquema del experimento de registro simultáneo de actividades de campo	97
4.8. La frecuencia alcanzada en hipocampo y NI depende de la intensidad	98
4.9. Efecto de la estimulación eléctrica de RPO sobre los EEGs de hipocampo y NI	99
4.10. Evolución temporal de la densidad de energía espectral con la estimulación eléctrica de RPO	100
4.11. Evolución temporal de la energía espectral para Th1 y Th2 con estimulación eléctrica de RPO	101
4.12. Comparación estadística de la energía espectral en Th1y Th2	102
4.13. Comparación de la coherencia espectral en Th1 y Th2 entre hipocampo y NI	103
4.14. Estadísticos de la energía espectral normalizada en Th1y Th2	104
4.15. Esquema del experimento de estimulación colinérgica y evolución temporal del espectro	106
4.16. Evolución temporal de la potencia relativa tras estimulación colinérgica	107
4.17. Evolución temporal de la densidad de energía espectral tras estimulación colinérgica	108
4.18. Evolución temporal de la frecuencia dominante tras estimulación colinérgica	109
4.19. Ejemplo de estimulación sensorial	111
4.20. Evolución de la densidad de energía espectral tras estimulación sensorial	112
4.21. Comparación estadística del efecto de la estimulación sensorial en hipocampo y NI	113
4.22. Estadísticos en estimulación sensorial	113
4.23. Ejemplo de registro en vigilia con estimulación sensorial	116
4.24. Espectros de potencia en vigilia por estimulación sensorial	117
4.25. Reinicio de la actividad de campo por estimulación sensorial	118
4.26. Histograma periestímulo tras estimulación sensorial	118
4.27. Registro en vigilia con actividad exploratoria sin locomoción	119
4.28. Actividad de hipocampo y NI antes y durante la actividad exploratoria	120
4.29. Autocorrelograma de neuronas pseudo-rítmicas de NI	121
4.30. Diferencias en la actividad de NI en el sueño y la vigilia	121
4.31. Potencia de la banda theta por estados	122
4.32. Comparación de la potencia de la banda theta por estados	122
4.33. Datos en animales no anestesiados	123

4.34. Diferencias en la actividad neuronal en NI por estados	124
4.35. Comparación de la actividad neuronal en NI por estados	124
5.1. Localización de las inyecciones	128
5.2. Marcaje anterógrado desde RPO	130
5.3. Inyección retrógrada en NI	133
5.4. Inyección retrógrada en NI II	134
5.5. Inyección retrógrada en NI III	135
5.6. Inyección retrógrada en SM/BD	136
5.7. Dobles marcajes en NI, panorámica	138
5.8. Dobles marcajes en NI, panorámica II	139
5.9. Marcaje doble en NI	140
5.10. Dobles marcajes en NI III	141
5.11. Dobles marcajes en NI IV	142
5.12. Dobles marcajes en NI V	143
5.13. Dobles marcajes en NI VI	144
5.14. Dobles marcajes en NI VII	145
5.15. Dobles marcajes en NI VIII	145
5.16. Estudio de dobles marcajes en NI en confocal	147
5.17. Dobles marcajes en SUM, PH y PHL	148
7.1. Conexiones del NI en el circuito del ritmo theta	154
7.2. NI como estructura de control de los procesos cognitivos	155
7.3. Vías pontoseptales	156
7.4. Circuito propuesto de control del theta hipocámpico	157
7.5. Actividad neuronal de DR, LC y VTg en distintos estados de activación	158
7.6. Actividad neuronal de NI en respuesta a un estímulo	158
7.7. Proyecciones tegmentales comparadas	159

ABREVIATURAS

cuarto ventrículo	4V	núcleo mamilar lateral	ML
serotonina, 5-hidroxitriptamina	5-HT	fascículo prosencefálico medial	mif
nervio facial	7n	núcleo mamilar medial	MM
área 7 noradrenérgica	A7	pedúnculo mamilar	mp
acetilcolina	ACh	núcleo del rafe medial	MR
acetilcolinesterasa	AChE	tracto mamilotalámico	mt
acueducto de Silvio	Aq	núcleo vestibular medial	MVe
núcleo de Barrington	Ba	noradrenalina	NA
núcleo lecho de la estria terminal	BNST	núcleo del vago	N10
asta de Ammon	CA	núcleo del hipogloso	N12
colecistoquinina	CCK	núcleo del trigémino	N5
pars alpha de la sustancia gris central	CGA	núcleo incertus	NI
pars beta de la sustancia gris central	CGB	núcleo incertus pars compacta	Nic
pars gamma de la sustancia gris central	CGG	núcleo incertus pars dissipata	Nid
sustancia gris central del puente	CGPn	sustancia gris periacueductal	PAG
hormona liberadora de corticotropina	CRH	núcleo parabraquial	PB
subunidad B de la toxina colérica	CTb	núcleo posterodorsal tegmental	PDT
córtex prefrontal medial	CxPFm	núcleo posterior hipotalámico	PH
córtex entorrinal	CxEn	leucoaglutinina de Phaseolus vulgaris	PHA-L
diaminobencidina	DAB	región posterior del núcleo lateral hipotalámico	PLH
banda diagonal de Broca porción vertical	DBv	núcleo del rafe paramediano	PMR
giro dentado	DG	núcleos pontinos	Pn
núcleo tegmental dorsomedial	DMTg	núcleo tegmental pedunculopontino	PPT
núcleo dorsal del rafe	DR	rafe interpeduncular	RIP
decusación del pedúnculo cerebeloso superior	dscp	núcleo reticular pontino caudal	RPC
núcleo dorsal tegmental	DT	rafe pontis	RPn
núcleo dorsal tegmental parte anterior	DTa	núcleo reticular pontino oral	RPO
núcleo dorsal tegmental parte central	DTC	tracto rubroespinal	rs
núcleo dorsal tegmental parte posterior	DTp	núcleo reticular tegmental	RtTg
núcleo dorsal tegmental parte ventromedial	DTvm	núcleo supragenua	SGe
núcleo esfenoide	Esf	septum lateral	SL
fórnix	f	septum medial	SM
ácido gamma-aminobutírico	GABA	complejo septum medial/ banda diagonal porción vertical	SM/BD
peroxidasa de rábano	HRP	núcleo del tracto solitario	Sol
locus coeruleus	LC	núcleo subpeduncular tegmental	SPTg
núcleo laterodorsal tegmental	LDT	sistema reticular de activación ascendente	SRAA
fascículo longitudinal del puente	lfp	núcleo subcoeruleus	SubC
área lateral hipotalámica	LHA	supramamilar	SUM
núcleo de la habénula lateral	LHb	tracto trigeminotalámico	tt
haz prosencefálico medial	mfb	ventrículo lateral	VL
lemnisco medial	ml	núcleo tegmental ventral	VTg

1 INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso permite al individuo responder a los estímulos del entorno. La correcta integración de la información sensorial, la asignación de un valor y la adecuación de la respuesta son procesos neurales fundamentales en el funcionamiento del cerebro. De esta manera, la cantidad de información procesada y la magnitud de la respuesta se adaptan a las necesidades y a las posibilidades del organismo.

El aprendizaje implica la posibilidad de modificación de los patrones conectivos entre neuronas mediante mecanismos que conllevan el aumento de la probabilidad de dar una respuesta eficiente ante estímulos iguales. Estos procesos de aprendizaje, que suponen la formación, consolidación y recuperación de memoria, están estrechamente ligados a la formación hipocámpica. La actividad conjunta de las poblaciones neuronales que configuran el hipocampo es la base de su participación en los mecanismos de memoria, a través de un patrón oscilatorio específico. La ritmicidad theta está presente en la actividad hipocámpica y supone uno de los patrones de su funcionalidad.

El trabajo que presentamos tiene como objetivo último determinar la contribución del núcleo incertus a la generación o modulación de la oscilación theta hipocámpica y analizar la modificación de su actividad en función del estado de activación.

1.1 LAS OSCILACIONES Y EL PROCESAMIENTO DEL TIEMPO

Una cuarta dimensión para la integración neuronal: el procesamiento del tiempo

En un intento de entender la manera en que el cerebro integra la información sensorial y proporciona una respuesta adecuada, Cristof Koch postula que la clave se encuentra en el concepto de *significado*. Según esta visión, el significado de un estímulo es la cantidad y la naturaleza de la información asociada a un conjunto de conexiones sinápticas. De esta manera, las proyecciones de las células responsables de la representación de un conjunto de estímulos determinan la información que se asocia a éstos (Koch, 2004).

El procesamiento de la información en el cerebro requiere de una actividad neuronal distribuida y coordinada en el tiempo (Ackermann et al., 1997).

La integración de la información entrante y la adecuación de la respuesta requieren de una organización temporal. Esta coordinación tiene lugar mediante la activación sincrónica de poblaciones neuronales (Tononi y Edelman, 1998). Atendiendo a Buzsáki (2006), la capacidad del cerebro para generar y *sentir* información temporal es un prerrequisito tanto para la acción como para la cognición.

Afirma también este autor que para establecer una relación de causalidad entre distintos eventos es preciso que exista una capacidad de percepción del tiempo. Sólo de esta manera, el reconocimiento de la precesión de un estímulo a otro permite establecer una relación entre ambos. Así, la repetición de una secuencia de estímulos conocida da lugar al proceso inductivo por el cual la información del pasado y del presente es integrada y permite prever la situación más probable (Buzsáki, 2006).

Esta construcción de *escenas* mentales en las que la organización espacio-temporal permite establecer relaciones de causa y efecto constituye una base también para la asignación de un valor a los eventos procesados. Debido a esta asociación, la *saliencia* o relevancia de un evento estará influida por su historia de aprendizaje, por el valor que le haya sido asignado en el pasado, como indicador directo o indirecto de un peligro o de una recompensa, lo que le confiere valor evolutivo (Edelman, 2001).

Este establecimiento de relaciones implica un sistema de percepción de la temporalidad. En este sentido, la interpretación de objetos o eventos como relacionados se ve favorecida por su continuidad en el espacio o en el tiempo. Así, contornos de características similares pueden permitir la apreciación de la forma de un objeto y partes que se mueven juntas en la misma dirección y a igual velocidad son también percibidas como una unidad. Entender los mecanismos que permiten la integración del tiempo en el procesamiento de la información y de qué manera se produce su regulación es fundamental para el conocimiento de cómo el cerebro integra la información que recibe y con ella la elaboración de una respuesta adecuada.

Las oscilaciones neuronales como mecanismo para la integración del tiempo

Así como la ubicación en el espacio puede ser interpretada gracias a un sistema de representación topográfica, existe un gran número de evidencias de que el problema de la continuidad en el tiempo puede ser solucionado gracias a la sincronización de la actividad neuronal (para revisión, Singer 1999). El agrupamiento de información en el tiempo y las relaciones de causalidad que se establecen puede ser procesado en el cerebro mediante la existencia de osciladores neuronales que reflejan la actividad sincrónica de grupos de neuronas dispersas (Buzsáki, 2006)

La actividad conjunta de diferentes poblaciones neuronales no es independiente de las redes que conforman, sino que existe una sincronización de sus patrones de actividad. Esta sincronización se traduce en la aparición de estados oscilatorios que pueden ser registrados en virtud de los flujos de corriente deri-

vados de la actividad neuronal individual. La sincronización entre oscilaciones es una propiedad emergente de las interacciones entre grupos de neuronas (Fries et al., 2008). El hecho de que ciertos patrones comportamentales se correlacionen de manera específica con actividad oscilatoria a determinadas frecuencias ha hecho pensar que ésta pueda ser un mecanismo para el procesamiento de la información neural (Ekstrom et al., 2003).

Los patrones oscilatorios y la sincronización de la actividad neuronal unitaria con éstos presentan una dinámica compleja y dependen en gran medida de las condiciones en que tengan lugar, tales como el estado de activación del animal, la atención o los estímulos externos (Ekstrom et al., 2003). Inicialmente, la sincronización neuronal fue asociada con el sueño y la anestesia, suponiéndose que desaparecería durante la vigilia. Motivado por el estudio de la telepatía, en 1929, Hans Berger realizó la primera descripción de la actividad eléctrica cerebral en humanos. Caracterizó las ondas alfa, predominantes en el sujeto despierto con los ojos cerrados, que al abrir los ojos eran sustituidas por una actividad beta de alta frecuencia, que denominó *desincronizada*, en contraste con las ondas lentas de alta intensidad presentes en situaciones de descanso, sueño y anestesia, con una elevada coherencia entre regiones distantes del cerebro.

Posteriormente han sido descritas con mayor precisión actividades oscilatorias características de determinados estados. Los distintos patrones electroencefalográficos, entre otras manifestaciones de su fisiología, han permitido caracterizar las diferentes fases del sueño. Durante el sueño de ondas lentas (*slow wave sleep*, SWS), es poco frecuente la aparición de experiencias oníricas. En contraste, la fase REM (*rapid eye movements*) o sueño paradójico, presenta un patrón de EEG similar al de la vigilia y con experimentación de sueños vívidos. Del mismo modo, ha sido descrita también una sincronización a altas frecuencias en situaciones que implican un estado de atención o vigilancia. En esta situación se facilita la selección de la información relevante del entorno y la amplificación de estas señales respecto de las no relevantes (Fries et al., 2001). En definitiva, estos son ejemplos que muestran como la actividad neuronal oscilatoria queda relacionada con diferentes estados de actividad cerebral y con los patrones comportamentales asociados.

Tononi y Edelman (1998) sugieren que la actividad rápida de bajo voltaje característica de la vigilia y del sueño REM refleja la disponibilidad de un amplio repertorio de patrones de actividad neuronal. De acuerdo con esta misma interpretación, se ha propuesto que el cerebro trabaja en diferentes escalas temporales, mediante la sincronización a distintas frecuencias (Buzsáki, 2006). De esta manera, la actividad "desincronizada" descrita por Berger se correspondería en realidad con la actividad simultánea de distintos grupos de neuronas, que están actuando a diferentes frecuencias y, por tanto, a distintas escalas simultáneamente.

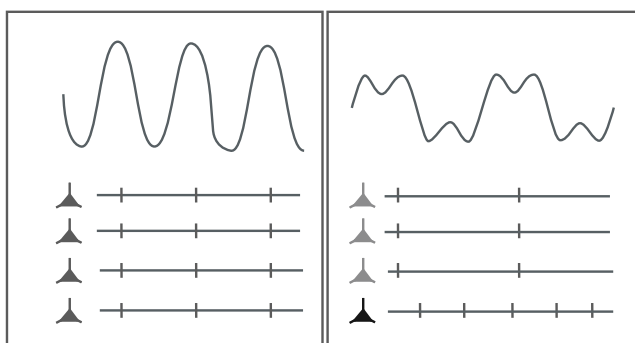


Figura 1.1: Las oscilaciones neuronales son resultado de flujos de corriente rítmicos. Izquierda: población neuronal que dispara simultáneamente a una frecuencia dada, sin tener en cuenta los posibles *inputs* externos a esa población. El potencial de campo reflejaría en esas condiciones una actividad oscilatoria a la frecuencia de disparo de las neuronas y su amplitud sería proporcional al tamaño de la población. Derecha: población de neuronas que disparan de manera más heterogénea, a frecuencias diferentes. El potencial de campo, *desincronizado*, está originado por la combinación de las oscilaciones generadas por cada subpoblación neuronal.

1.2 LA OSCILACIÓN THETA HIPOCÁMPICA

El estudio que presentamos se ha centrado en el control de la ritmicidad theta hipocámpica ejercido por el *núcleo incertus* (NI), situado en el tegmento dorsal pontino. Esta oscilación ha sido descrita en numerosas especies, incluyendo la humana (Buzsáki, 2002). Se trata de un patrón oscilatorio presente en diferentes áreas corticales, fundamentalmente en el hipocampo, como manifestación de una actividad neuronal sincrónica de sus células principales (Green y Arduini, 1954; Vanderwolf, 1969).

A lo largo de esta segunda parte del capítulo introductorio, en primer lugar se describe la implicación del hipocampo y de la aparición de la oscilación theta en su funcionalidad. Posteriormente, se analizan las estructuras y procesos neuronales implicados en su generación y control. En este punto se describe la circuitería y funcionalidad septohipocámpica, su relación con núcleos diencefálicos del hipotálamo posterior y el control de su activación desde el tronco del encéfalo, haciendo especial hincapié en la contribución de NI a dicho control.

1.2.1 El hipocampo como substrato para la integración sensorimotora y la gestión de la memoria

Desde la descripción del caso clásico del paciente H.M, el hipocampo ha sido considerado una estructura clave en la formación de la memoria. Tras la resección del lóbulo temporal como solución para su epilepsia intratable, este paciente presentó un síndrome de amnesia anterógrada severa, siendo incapaz de construir nuevos recuerdos (Scoville y Milner, 2000). Posteriormente, Helen

Mahut demostró, hace ya más de dos décadas, que la lesión hipocámpica tenía como resultado un déficit en el aprendizaje asociativo (Mahut et al., 1982). Este descubrimiento en primates no humanos se correspondía con los datos clínicos descritos en pacientes con ablación hipocámpica. La función mnemónica del hipocampo en otros animales y en humanos son comparables, tal y como se ha demostrado en circunstancias experimentales similares (Olton et al., 1986).

El hipocampo presenta una organización neuronal y funcional que lo sitúa en un lugar privilegiado dentro de la conectividad cortical. Esto permite que, aunque la memoria probablemente quede almacenada en regiones cerebrales distribuidas, los procesos de aprendizaje y consolidación de memoria explícita parecen depender del hipocampo y de las regiones parahipocámpicas adyacentes (Morris et al., 2003; Squire, 2004). Sin embargo, mientras que el substrato anatómico de tales procesos está en la actualidad bien definido, los estudios siguen sin clarificar de forma concluyente de qué manera las células actúan colectivamente en forma de redes neuronales complejas con el fin de extraer y almacenar la información nerviosa distribuida.

Donald Hebb, hace ya más de 50 años, postuló un modelo simple de aprendizaje neuronal según el cual, la fuerza de las conexiones sinápticas entre dos neuronas se incrementaría si la actividad en la neurona presináptica contribuye persistentemente a la descarga de la postsináptica (Hebb, 1949). Esta idea implica que los apareamientos repetidos entre los eventos sinápticos y los potenciales de acción postsinápticos, dentro de una ventana de unas decenas de milisegundos, pueden producir cambios a largo plazo de la eficacia sináptica (Paulsen y Sejnowski, 2000). Estos eventos no sólo determinan la intensidad de los cambios plásticos sino también si la transmisión sináptica resulta facilitada o deprimida (Markram et al., 1997). Esta plasticidad sináptica dependiente del tiempo supone un mecanismo suficiente para explicar los procesos de asociación entre eventos, la facilitación de secuencias de aprendizaje y los mecanismos de consolidación y recuperación de memoria.

Sin embargo, la plasticidad dependiente del tiempo requiere que la actividad neuronal ocurra en órdenes precisos dentro de ventanas temporales definidas. Por tanto, no resulta obvio cómo estos mecanismos pueden operar exitosamente dentro de poblaciones neuronales complejas, cuyos patrones conectivos suponen rutas polisinápticas que forman redes neuronales distribuidas. La existencia de oscilaciones cerebrales podría representar un mecanismo para organizar la actividad individual de poblaciones neuronales dentro de las redes conectivas que conforman. De este modo, proporcionarían las condiciones para que se dieran las reglas que facilitarían la plasticidad sináptica dependiente del tiempo (Paulsen y Sejnowski, 2000).

1.2.2 Contribución del hipocampo a los procesos cognitivos

De acuerdo con Olton (1986), las descripciones acerca de la función hipocámpica deben integrar los fenómenos mnemónicos y de procesamiento de la información espacial y temporal en los que participa. Según este autor, dado que

el hipocampo está implicado en estos tres procesos, cualquier descripción del hipocampo debe ser capaz de explicar todos ellos. El establecimiento de vínculos entre eventos, creando asociaciones también espaciales y temporales, permite la elaboración de recuerdos contextualizados en un marco espaciotemporal y establecer relaciones causales y comparaciones entre ellos.

1.2.2.1 El hipocampo y la representación espacial: el mapa cognitivo

Vanderwolf (1969) fue el primero en describir la aparición de un EEG particular -ritmo theta o RSA (*rhythmic slow activity*)- en el hipocampo de ratas durante la realización de movimientos exploratorios (para revisión O'Keefe y Nadel 1978). Según su interpretación, esta actividad rítmica estaba relacionada con la iniciación o la organización de los movimientos voluntarios y tanto su frecuencia como su amplitud dependían de las características del movimiento realizado. Sin embargo, este autor no encontró datos que apoyasen que el ritmo theta estuviese relacionado con procesos de activación generalizada (*arousal*), orientación o aprendizaje (Bland y Oddie, 2001).

Los primeros registros unitarios de células hipocámpicas realizados en ratas a las que se permitía el movimiento libre (Ranck, 1973), aportaron nuevos datos para la comprensión del papel del hipocampo en la representación espacial. Experimentos similares de O'Keefe y Nadel (O'Keefe y Dostrovsky, 1971; O'Keefe, 1976; O'Keefe y Nadel, 1978) permitieron observar las primeras evidencias de que ciertas células hipocámpicas son células de lugar (*place cells*, Figura 1.2), es decir, disparan preferentemente en determinadas ubicaciones del animal en el espacio. Este hallazgo proporciona la base para la consideración del hipocampo como mapa cognitivo, capaz de generar una representación del espacio necesaria para la navegación. Según esta interpretación, el hipocampo permite el establecimiento de un marco espacial para la ubicación y la interrelación de los elementos que constituyen la experiencia de un organismo (O'Keefe y Nadel, 1978; Moita et al., 2003).

Investigaciones recientes han puesto de manifiesto que este sistema de representación espacial es bastante más complejo. No sólo el hipocampo, sino distintas estructuras del sistema límbico en conjunto, incluyen un sistema coordinado de representación del espacio (O'Keefe y Nadel, 1978), como se representa en la Figura 1.2. Además de las neuronas hipocámpicas que se activan preferentemente en respuesta a la ubicación del animal en una determinada zona del espacio, han sido descritas células del postsubiculum que responden a la orientación de la cabeza del animal (*head direction cells*) (Taube et al., 1990) y células del córtex entorrinal medial que integran la información de posición, orientación y velocidad de forma independiente del entorno y de las guías sensoriales (células de rejilla o cuadrícula o *grid cells*) (Hafting et al., 2005; Sargolini et al., 2006).

Según las interpretaciones más actuales (O'Keefe y Recce, 1993; Burgess et al., 2005; O'Keefe y Burgess, 2005), la representación de los recorridos para la navegación requiere de la combinación de este sistema de representación espacial con su integración temporal a través de la actividad oscilatoria. De esta manera, la integración no tiene lugar únicamente en el hipocampo o el cortex

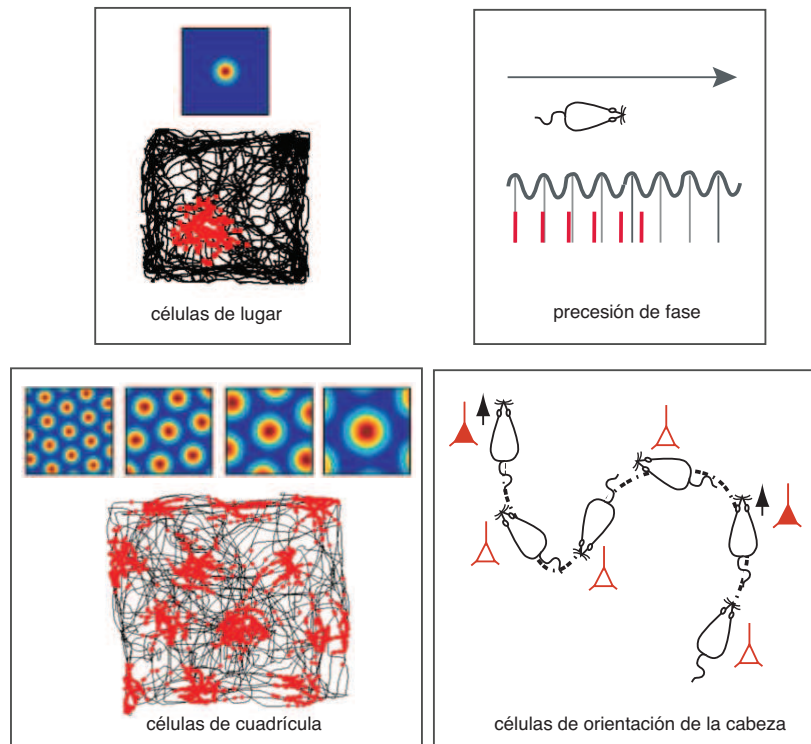


Figura 1.2: Representación espaciotemporal en el hipocampo y estructuras asociadas. La combinación de la actividad de las células implicadas en la representación espacial con la interferencia de fase de sus disparos con las oscilaciones de potencial de campo permite contextualizar la información sensorimotora. En la representación espacial intervienen las *place cells* hipocámpicas, *grid cells* del córtex entorrinal y *head direction cells* del postsubiculum y de otras localizaciones límbicas, como los cuerpos mamilares y el tegmento dorsal pontino.

entorrinal sino también en los generadores subcorticales del ritmo theta (Blair et al., 2008). Según este modelo, la combinación de las tasas de disparo de las células implicadas en la ubicación con las fases de la oscilación theta en que disparan permite establecer un sistema de representación tanto de la ubicación del animal en el espacio como de su velocidad por el mismo.

1.2.2.2 El hipocampo y la medida del tiempo: el ritmo theta hipocámpico

De forma paralela a la integración espacial por parte del hipocampo, otros estudios le otorgan una función clave en el muestreo del tiempo (*timing*), participando en su percepción (Pedemonte et al., 1999; Tesche y Karhu, 2000). La contribución de esta estructura al establecimiento de relaciones temporales ha sido considerada fundamental para la creación de asociaciones entre eventos que subyace a la formación de memoria (Hasselmo, 2008). De hecho, el paciente H.M., además de déficits de memoria operativa, experimentaba una distorsión en la percepción del tiempo (Olton et al., 1986).

La implicación del hipocampo en el muestreo del tiempo ha sido explicada en virtud de la integración del disparo individual de las neuronas en fases concretas de las oscilaciones del potencial de campo local (Hasselmo, 2005; Dragoi y Buzsáki, 2006; Hasselmo, 2008). Tal como se ha referido previamente, las oscilaciones proporcionarían una ventana temporal para la integración, estableciendo así asociaciones entre eventos en una escala temporal determinada por la frecuencia de la oscilación (Buzsáki, 2006).

A partir de experimentos de lesión de fimbria-fórnix, Olton (1986) postula que la discriminación temporal debe ser un componente integral de la memoria o al menos implicar a los mismos procesos neurales y verifica la implicación del hipocampo en estos procesos. De acuerdo a su planteamiento, la función hipocámpica participa en la constitución de un mapa cognitivo espacial y uno temporal, lo que permite interrelacionar los eventos procesados y gestionar con ellos la memoria.

Los patrones oscilatorios mejor caracterizados en la formación hipocámpica son las oscilaciones theta y gamma (Vertes y Kocsis, 1997; Traub et al., 1989; Buzsáki, 2002), que funcionalmente se encuentran muy relacionadas (Bragin et al., 1995; Penttonen et al., 1998). A pesar de que la mayor parte de estudios han sido realizados en roedores, existen evidencias de la presencia de estas oscilaciones también en humanos (Bódizs et al., 2001; Kahana et al., 2001; Jensen y Tesche, 2002; Cantero et al., 2003).

Los parámetros principales de cualquier oscilación son su frecuencia y su amplitud. En el caso concreto de oscilaciones del potencial de campo de poblaciones neuronales, ambas magnitudes se relacionan, respectivamente, con las fluctuaciones de potencial eléctrico extracelular resultado de los potenciales de acción de las neuronas y de las influencias recibidas y con el tamaño de la población de neuronas registradas. El rango de frecuencias *theta* se halla entre 3-12 Hz, con variaciones según la especie estudiada (Stewart y Fox, 1990) y el estado

del animal, presentándose las frecuencias más bajas, en ratas anestesiadas con uretano (Kramis et al., 1975) y las más altas en animales despiertos y activos.

Múltiples evidencias establecen una relación de esta actividad oscilatoria con los procesos mnemónicos en el hipocampo (Rose y Dunwiddie, 1986; Staubli y Lynch, 1987; Hasselmo, 2005), así como con la integración sensorimotora (Bland y Oddie 2001 para revisión) y los fenómenos atencionales (Ekstrom et al., 2005; Missonnier et al., 2006). Pese a que la relación entre la oscilación *theta* y los procesos cognitivos del hipocampo no está completamente esclarecida, se ha propuesto que los mecanismos subyacentes al ritmo *theta* pueden ser considerados como base para la integración de estímulos relevantes en los procesos de memoria y aprendizaje (O'Keefe y Recce, 1993; Hasselmo, 2005).

En base a la sensibilidad farmacológica y a las circunstancias a las que está asociado, se han diferenciado dos tipos de ritmo *theta* (Winson, 1974). La contribución de la acetilcolina a la generación de la ritmicidad está ampliamente aceptada y determina la existencia de dos tipos de oscilación. El ritmo *theta* tipo 1 se asocia a la locomoción, dado que aparecen el transcurso de la realización de movimientos voluntarios y durante la conducta exploratoria del animal (Vanderwolf, 1969; Arnolds et al., 1979; Fox et al., 1986; Bland y Oddie, 2001). Esta oscilación es resistente al bloqueo farmacológico de la acción de la acetilcolina y por tanto no requiere esencialmente del sistema colinérgico.

El ritmo *theta* tipo 2 aparece en ratas inmóviles con un alto nivel de alerta o *arousal* (Sainsbury et al., 1987). El bloqueo colinérgico sí afecta en este caso a la aparición de ritmo *theta* inducido por la presentación de estímulos relevantes. Este segundo tipo es el único presente en animales anestesiados con uretano. En este estado, se puede reproducir el mismo patrón de oscilación mediante la estimulación eléctrica o química de determinadas estructuras de la formación reticular troncoencefálica (Green y Arduini, 1954) o por estimulación sensorial del animal (Sainsbury et al., 1987) y la ritmicidad se puede anular mediante la administración de atropina (Kramis et al., 1975). El ritmo *theta* sensible a la atropina ha sido vinculado a la iniciación de los movimientos que se producen como respuesta a un estímulo sensorial. Se ha postulado también que subyace a fenómenos atencionales (Ekstrom et al., 2005; Missonnier et al., 2006). Podría tratarse de un mecanismo de retroalimentación que favoreciera la adaptación de la conducta mediante el procesamiento de los estímulos significativos del entorno (Oddie y Bland, 1998) y, en cualquier caso, parece evidente que está relacionado con la interacción sensorimotora y el aprendizaje espacial (Bland y Oddie, 2001; Caplan et al., 2003).

Algunos autores consideran que la oscilación *theta*, más que relacionada con la intencionalidad de los movimientos, está implicada en los procesos de integración sensorial y del movimiento realizados en la exploración del entorno y en la gestión de la memoria, lo que en la actualidad recibe en conjunto el nombre de *navegación* e incluye la *navegación mnemónica por el espacio neuronal*, implicada en la planificación o reconstrucción de una exploración sin la necesidad de materializarse en un entorno físico (Buzsáki, 2005).

En cuanto a la manera en que se produce la interacción de los distintos mapas representados en el hipocampo, O'Keefe y Recce (1993) describieron que

las *place cells* hipocámpicas disparaban en distintas fases de la oscilación theta a medida que el animal se desplazaba (*theta phase precession*), lo que podría suponer un mecanismo para la integración temporal de la información espacial (Sakata, 2006; Wagatsuma y Yamaguchi, 2007; Buzsáki, 2006).

El ritmo theta durante la vigilia y el sueño REM

El mismo año que Vanderwolf asoció la aparición de ritmo theta a la realización de movimientos voluntarios, Jouvet describió la fase REM (*rapid eyes movement*) del sueño, a la que denominó sueño paradójico puesto que el animal presentaba en ese estado una actividad eléctrica similar a la de la vigilia aunque con atonía y ausencia de actividad electromiográfica. Jouvet caracterizó esta fase del sueño por la presencia de una actividad eléctrica cortical rápida, de bajo voltaje, asociada a ritmo theta en el hipocampo (Jouvet, 1969).

Más recientemente pudo observarse que la información adquirida durante la vigilia activa también es reproducida en las *place cells* hipocámpicas durante el sueño (Wilson y McNaughton, 1994). En concreto, durante las fases de sueño REM se produce la repetición de secuencias temporales de activación de células hipocámpicas que ya han tenido lugar durante la realización de movimientos voluntarios en la vigilia, lo que podría explicar el mecanismo por el que la fase REM del sueño favorece la consolidación de la memoria y su recuperación. (Louie y Wilson, 2001). Los registros electrofisiológicos de neuronas hipocámpicas realizados en ratas durante sueño y vigilia demuestran que las escalas temporales se mantienen en secuencias de hasta varios minutos de duración. Estos mismos mecanismos pueden tener lugar en el circuito completo de representación espacial, incluyendo hipocampo, córtex entorrinal y parasubiculum (Hasselmo, 2008).

El flujo de acetilcolina liberado en la fase REM permite que se active de nuevo esta oscilación en el hipocampo. Estas condiciones producen un estado en el que la reactivación de los circuitos hipocámpicos en el mismo orden temporal que en la vigilia favorecería la consolidación de la memoria (Muzur, 2005).

1.2.3 Organización estructural básica y conectividad intrínseca del hipocampo

La formación hipocámpica es un grupo de áreas que comprende el giro dentado (fascia dentada), el asta de Ammon (campos CA), el presubiculum, el subiculum, el parasubiculum y la corteza entorrinal. Estas áreas comparten una estructura de corteza de tres capas, aunque cada una con propiedades diferenciadas.

El circuito trisináptico del hipocampo fue descrito por Cajal en 1901 (Figura 1.3). Una de las principales características de la circuitería hipocámpica es que la mayor parte de sus conexiones son unidireccionales.

De manera resumida, el circuito hipocámpico consiste en una ruta que se inicia en el cortex entorrinal, que constituye así la aferencia cortical al hipocampo. A través de la ruta perforante, las fibras del córtex entorrinal proyectan a la capa principal del giro dentado, formada por células granulares y piramidales.

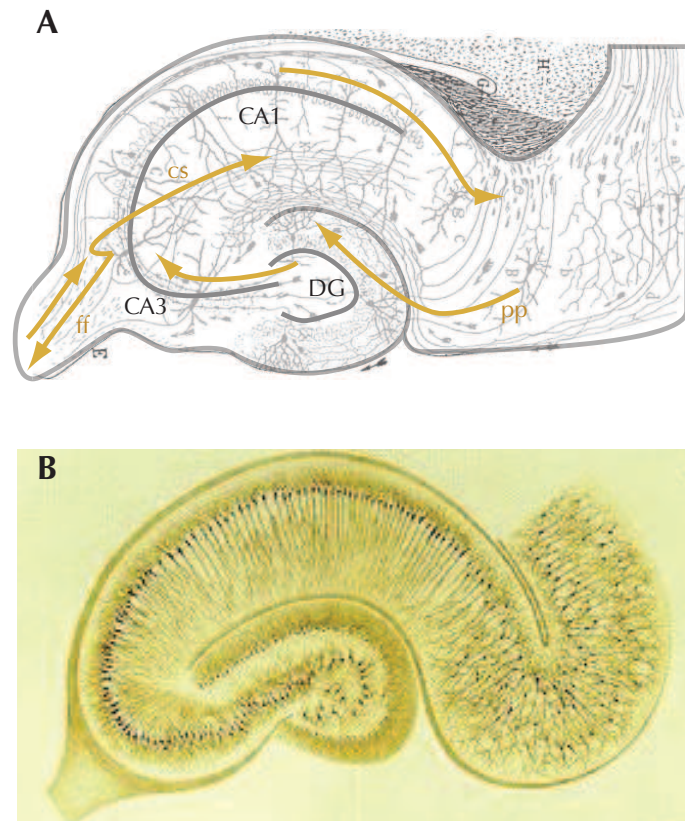


Figura 1.3: A. Esquema del circuito trisináptico hipocámpico sobre la representación de Ramón y Cajal. B. Representación del hipocampo realizada por Camilo Golgi.

Las dendritas de estas células son recorridas por axones paralelos que las conectan. Las células granulares, a su vez, inervan neuronas principales, piramidales, del campo CA3. Los axones colaterales principales de éstas, llamados colaterales de Schaffer, proyectan sobre células piramidales de CA1 y, además, establecen un circuito recurrente de retroalimentación excitatoria. En el hipocampo ventral, el circuito recurrente incluso llega a alcanzar células granulares, aunque esto es menos frecuente en la porción dorsal del hipocampo (Li et al., 1994). Finalmente, la mayor parte de las fibras que se originan en CA1 terminan en el subiculum y en la capa profunda del córtex entorrinal.

El giro dentado constituye una compuerta para la memoria

El giro dentado constituye el punto de entrada al hipocampo. Es una región cortical simple de tres capas con tres tipos fundamentales de células: granulares, piramidales y musgosas, además de una extensa red de interneuronas inhibitorias (para revisión, Amaral et al. 2007).

Una de las principales características de las células de la fascia dentada es la gran cantidad de conexiones que puede establecer con células piramidales de CA3, lo que le otorga una enorme flexibilidad sináptica (para revisión, Freund y Gulyás 1997; Amaral et al. 2007). En la rata, únicamente las células granulares del giro dentado proyectan sobre el campo CA3. Las proyecciones de las células musgosas, en roedores, se quedan a nivel del giro dentado y proporcionan una retroalimentación excitatoria.

Diversos autores han atribuido al giro dentado una función de compuerta o filtro para la entrada de información al hipocampo (Hsu, 2007). Las células granulares de esta región, que presentan una baja excitabilidad, constituyen una diferencia significativa respecto de otras áreas corticales (Sloviter et al., 1996). Estas células parecen reforzar aquellas rutas de CA3 asociadas a estímulos capaces de desencadenar una experiencia de aprendizaje y, de esta manera, favorecer su potenciación a largo plazo (Buzsáki, 1989, 2006). Por otra parte, la red de interneuronas del giro dentado está implicada en la activación rítmica de las células granulares, lo que hace que participen en la generación del ritmo theta. Las aferencias de la fascia dentada pueden modular, por tanto la consolidación de memoria en el hipocampo a través de esta vía (Sik et al., 1997).

El giro dentado, además de ser diana de la información procedente del córtex entorrinal, recibe aferencias subcorticales del complejo septal (Mosko et al., 1973; Swanson et al., 1978; Amaral y Cowan, 1980). La principal proyección hipotalámica a esta parte del hipocampo procede de la región supramamilar (SUM) (Vertes et al., 1993; Maglóczky et al., 1994). Desde el tronco del encéfalo, recibe también proyecciones noradrenérgicas, dopaminérgicas (Pickel et al., 1974; Swanson y Hartman, 1975; Loughlin et al., 1986) y serotoninérgicas, ésta última procedente de los núcleos medial (MR) y dorsal (DR) del rafe (Conrad et al., 1974; Moore y Halaris, 1975; Köhler et al., 1984; Vertes et al., 1999). El NI también proyecta a esta región del hipocampo ventral (Olucha-Bordonau et al., 2003).

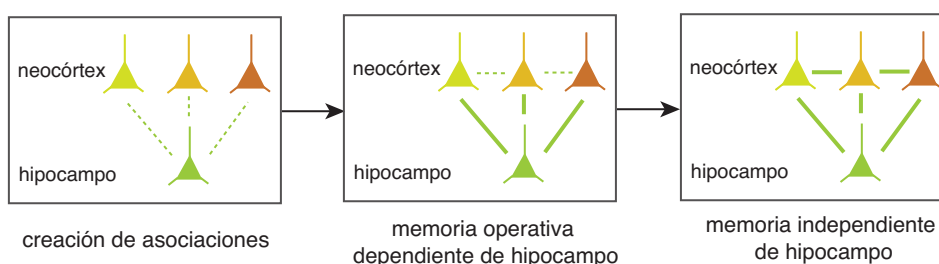


Figura 1.4: Hipocampo como asociador. En la creación de nuevos recuerdos, el hipocampo actúa como asociador. La posterior consolidación del recuerdo, en caso de producirse, robustece las sinapsis implicadas.

Los campos CA convierten al hipocampo en un asociador

El axón de cada neurona piramidal de CA3 es capaz de establecer entre 25.000 y 50.000 sinapsis dentro del hipocampo ipsilateral y aproximadamente la mitad en el contralateral (Li et al., 1994), lo que supone una densa red de conexiones intrahipocámpicas. Las conexiones entre neuronas piramidales de CA3 se producen de manera aleatoria, sin preferencia por las células vecinas. En conjunto, estas características convierten al hipocampo en un *autoasociador* (Papp et al., 2007). Este concepto computacional hace referencia a una red auto-correctible que puede recrear un patrón completo previamente almacenado a partir de una nueva entrada de información, aunque esta entrada sea sólo una parte del patrón almacenado. Estas características de autoasociador confieren al hipocampo un papel de *buscador* de información (Buzsáki, 2006).

Las neuronas piramidales de CA1 suponen una salida glutamatérgica hacia otras áreas corticales y subcorticales y codifican información espacial y temporal. Cada una de estas células recibe aproximadamente 30.000 *inputs* sinápticos a través de varios tipos de dendritas. Sin embargo, su especialización para la integración parece venir determinada por la amplia variedad de interneuronas hipocámpicas GABAérgicas, que no sólo provocan una inhibición general sino que consiguen también la regulación temporal del disparo de las células piramidales (Klausberger y Somogyi, 2008).

Generación de la oscilación theta en el hipocampo

El control temporal de los potenciales de acción de las células piramidales durante cada ciclo oscilatorio parece estar determinado por una cooperación entre la propia actividad de las células de CA3 y la entrada desde el córtex entorrinal (Kocsis et al., 1999).

En el origen de esta oscilación, las interneuronas inhibitorias desempeñan un papel clave. La dinámica temporal de la acción sináptica de estas células parece ser un elemento determinante para el establecimiento de los distintos estados del cerebro y para el procesamiento cognitivo (Klausberger y Somogyi,

2008). Existe una subpoblación, las células del *stratum oriens - lacunosum-moleculare*, cuyas propiedades intrínsecas de membrana les permiten oscilar a frecuencia theta. Debido a la inhibición controlada que ejercen sobre las células piramidales, sólo una minoría de éstas disparan, y lo hacen de forma rítmica y con una relación de fase con la oscilación (Bragin et al., 1995).

Generalmente, la ritmicidad observada en el registro del potencial de campo extracelular se debe más a una entrada sináptica rítmica que a la ritmicidad en los disparos neuronales de la población registrada. Sin embargo, la actividad eléctrica que se registra en el hipocampo a una frecuencia de 3-12Hz se debe, no sólo a sus aferencias, sino también a los potenciales de campo originados por esta despolarización sincronizada de las neuronas piramidales hipocámpicas (Traub et al., 1989). De esta manera, el hipocampo, de forma independiente, es capaz de generar este tipo de ritmicidad en virtud de las propiedades intrínsecas oscilatorias de sus células.

De forma similar a como ocurre en la generación de oscilaciones *gamma* (Fries et al., 2008), en cada ciclo *theta*, tras una entrada excitatoria, la red de interneuronas inhibitorias se sincroniza en una actividad rítmica y ejerce una inhibición sincronizada y rítmica sobre las células piramidales. De esta manera, provoca una activación también rítmica de sus descargas. Esta activación de las neuronas piramidales se debe a que éstas únicamente pueden responder a la entrada excitatoria que reciben durante los periodos de desinhibición.

Buzsáki (1989) propuso un modelo de formación de memoria según el cual, durante la actividad exploratoria, la información es transmitida del neocórtex a la formación hipocámpica a través de las células granulares. Éstas producirían una potenciación en células piramidales de CA3, que disparan durante la exploración. En una segunda fase, tras la exploración, la información pasaría a CA1 favoreciendo la consolidación. En cualquier caso, los disparos de células granulares y piramidales asociados a determinadas fases de la oscilación pueden proporcionar el grado suficiente de despolarización de sus dianas sinápticas y, de esta manera, contribuir a la inducción de la plasticidad sináptica (Larson et al., 1986; Huerta y Lisman, 1996; Hölscher et al., 1997).

Siguiendo con el concepto de hipocampo como autoasociador, la recuperación de información a partir de elementos individuales se ve facilitada por el hecho de que el flujo de información desde CA3 hasta CA1 sigue la ruta de menor resistencia que determinan las sinapsis más robustecidas (Buzsáki, 2006). Es decir, las asociaciones que el hipocampo ha establecido de entre todas las posibles en la codificación de memoria y que han sido consolidadas facilita que se recupere la memoria a partir de elementos individuales del patrón completo y esta misma recuperación potencia a su vez las asociaciones formadas. La combinación de estos circuitos con la representación espacial de las *place cells* favorecería por tanto los procesos de navegación. Por otra parte, la posibilidad de inhibir la oscilación theta evita que el sistema se involucre en un bucle infinito de recurrencia (Buzsáki, 2006). La Figura 1.5 muestra un esquema de la activación hipocámpica durante los procesos de adquisición, consolidación y recuperación de memoria.

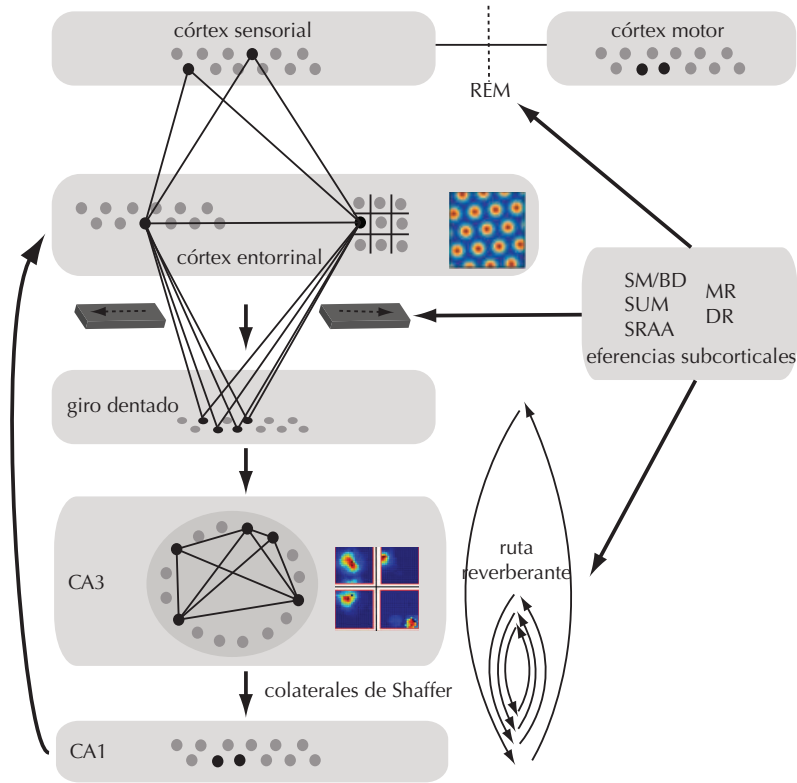


Figura 1.5: Circuito de formación, consolidación y recuperación de memoria. Durante la exploración, se produce una entrada de información sensorial y motora, a través del córtex entorrinal. La entrada al hipocampo implica una activación de células granulares del giro dentado, que favorecen el flujo de información entre CA3 y CA1. La activación de células piramidales al azar en CA3 favorece el almacenamiento de una gran cantidad de información. En conjunto, se forman patrones completos a partir de *items* de información individuales, atendiendo a la Ley de Hebb. En una segunda fase del aprendizaje, se activan circuitos recurrentes que fortalecen las sinapsis y que incluyen la activación de la vía CA1-corteza entorrinal. La activación de *grid cells* y *place cells* durante la adquisición de información sensorial permite la ubicación de los *items*. La temporalización del proceso es regulada por la combinación de los disparos con la oscilación theta. El SM/MB, SUM y el SRAA contribuyen a la entrada de información procedente del neocórtex, en virtud del estado atencional, la saliencia del estímulo y a la reactivación de estos circuitos. Las estructuras inhibitorias troncoencefálicas intervendrían en la desconexión del sistema para evitar la entrada en un bucle infinito y redirigir la atención. Las estructuras iniciadoras del sueño REM provocan una repetición de la actividad hipocámpica sin que se dé entrada sensorial y con desconexión motora. Durante una nueva navegación, la detección de *items* sensoriales provoca la reactivación de las sinapsis robustecidas y la recuperación del patrón completo.

1.2.4 El sistema septohipocámpico: contribución del prosencéfalo basal a la generación de ritmo theta hipocámpico

Las principales aferencias subcorticales del hipocampo proceden del prosencéfalo basal. Este sistema ha sido implicado en numerosas funciones comportamentales y cognitivas que incluyen alerta, procesamiento sensorial, motivación, emoción, aprendizaje y memoria (Olton et al., 1986; Sarter y Bruno, 2000).

El prosencéfalo basal incluye, entre otras estructuras, el septum lateral (SL), el septum medial, la banda diagonal de Broca, el *núcleo lecho de la estria terminal* (BNST), el núcleo basal de Meynert, la sustancia innominata y los núcleos septales posteriores.

Es especialmente relevante la contribución del complejo formado por el septum medial y la porción vertical de la banda diagonal (SM/BD) a la actividad theta hipocámpica (Petsche et al., 1962; Vinogradova, 1995). Este complejo presenta una proyección directa sobre la formación hipocámpica, a través de la fimbria-fórnix, además de proyectar a regiones hipotalámicas y al tálamo y, a nivel del troncoencéfalo, al área tegmental ventral y núcleos del rafe (Vertes, 1992; Vertes et al., 1995; Olucha-Bordonau et al., 2003). Por otra parte, mientras que el SL recibe su principal entrada del hipocampo y proyecta al SM/BD y a áreas hipotalámicas (Risold y Swanson, 1997), el SM/BD recibe sus aferencias principales de núcleos del tronco del encéfalo, que incluyen al rafe mediano y al NI.

La lesión del SM/BD conlleva la pérdida de la ritmicidad theta en el hipocampo (Petsche et al., 1962; Givens y Olton, 1990), al igual que ocurre con la desconexión de ambos sistemas mediante lesiones de la fimbria-fórnix (Andersen et al., 1979). La naturaleza de su conectividad implica que ambas estructuras están funcionalmente acopladas (Bland y Colom, 1993), formando el *sistema septohipocámpico*, de tal manera que, a pesar de que otras estructuras subcorticales influyen en la oscilación hipocámpica, el SM/BD es comúnmente considerado su marcapasos y generador último (*pacemaker*) (Petsche et al., 1962).

En el SM/BD fueron descritas células que disparaban rítmicamente con la oscilación theta (Gaztelu y Buño, 1982; Stewart y Fox, 1990; Colom y Bland, 1991; Bland y Colom, 1993; Brazhnik y Fox, 1997). Más tarde se ha podido verificar que el complejo septal posee propiedades oscilatorias autónomas, capaces de generar una ritmicidad tanto en el hipocampo como en el cortex entorrinal. Además, el disparo rítmico de las células del SM/BD persiste pese a la abolición de ritmo theta hipocámpico tras su desconexión mediante lesiones de la fimbria-fórnix (Vinogradova, 1995). Los datos electrofisiológicos sugieren que el ritmo theta depende de la proporción de neuronas septales implicadas en la oscilación y que su frecuencia de disparo determina a su vez la frecuencia del ritmo (Bland y Colom, 1993; Vinogradova, 1995).

Este sistema está compuesto por un grupo heterogéneo de neuronas. Han sido descritas tres poblaciones neuronales, con neuroquímica definida, implicadas en la generación de la oscilación theta: colinérgicas (Frotscher y Léránth,

1985), GABAérgicas (Köhler et al., 1984) y glutamatérgicas (Manns et al., 2001; Colom et al., 2005; Gritti et al., 2006).

Las proyecciones colinérgicas modulan la excitabilidad de las células hipocámpicas (Freund y Antal, 1988), aumentando la cantidad de neuronas rítmicas implicadas en la oscilación (Apartis et al., 1998; Kocsis et al., 1999). Esto explica que la eliminación selectiva de la población colinérgica disminuya la amplitud de la oscilación theta pero no la suprime completamente (Lee et al., 1994).

A diferencia del efecto facilitador de la población colinérgica, las propiedades de las células GABAérgicas justifican función del SM/BD como marcapasos de la oscilación. Las células piramidales hipocámpicas son fuerte y rítmicamente inhibidas por una red local intrahipocámpica de interneuronas, cuya actividad está regulada por neuronas GABAérgicas del SM/BD. La proyección de estas células sobre el hipocampo se limita únicamente a las interneuronas, sin contactar con células piramidales ni granulares (Freund y Antal, 1988). Así, la activación fásica de las células GABAérgicas del SM/BD resulta en una desinhibición rítmica de las células piramidales del hipocampo con la consiguiente generación de ritmicidad (Bland et al., 1999). La capacidad del SM/BD de actuar como marcapasos se debe a que las propiedades de membrana de las interneuronas permiten un disparo rítmico de estas neuronas (Xu et al., 2004).

Además de estas dos poblaciones neuronales, existe también una proyección glutamatérgica septohipocámpica (Colom et al., 2005), que parece contribuir al establecimiento de los estados funcionales que subyacen al procesamiento de información, tanto en el hipocampo como en redes corticales (Colom, 2006).

Luis Colom propuso un modelo que integra la contribución de los circuitos locales septales, septohipocámpicos e intrahipocámpicos propuestos por diversos autores (Andersen et al., 1979; Colom y Bland, 1991; Borhegyi y Freund, 1998; Bland et al., 1999; Alreja et al., 2000; Gulyás et al., 2003; Sotty, 2003; Wu et al., 2003; Borhegyi et al., 2004; Hajszan et al., 2004; Manseau et al., 2005; Colom, 2006). Según este modelo, bajo la influencia de una ruta ascendente originada en niveles troncocefálicos y clásicamente considerada como relevante en núcleos del hipotálamo posterior, se produce una activación de las neuronas colinérgicas y GABAérgicas septales (Leranth y Kiss, 1996; Vertes y Kocsis, 1997; Borhegyi y Freund, 1998; Kiss et al., 2000; Vertes y McKenna, 2000). La excitación de las neuronas colinérgicas del SM/BD produce a su vez una activación de la población glutamatérgica local (Colom et al., 2005). La combinación de la influencia de ambas poblaciones proporciona el nivel de excitación necesario para el comienzo de la oscilación hipocámpica a frecuencia theta e incrementa la población activadora septal, a modo de retroalimentación positiva. Cuando el nivel de activación alcanza un nivel crítico, los circuitos septales, septohipocámpicos e intrahipocámpicos comienzan a resonar a frecuencias theta.

A nivel local septal, las poblaciones colinérgicas y glutamatérgicas activan tanto a interneuronas como a neuronas GABAérgicas de proyección hipocámpica. Las interneuronas intervienen en la propia oscilación del circuito local mediante una inhibición fásica (Hajszan et al., 2004). En estas circunstancias, el SM/BD se convierte en un sistema capaz de mantener su propia oscilación

bajo el efecto de las influencias activadoras (Colom, 2006). A nivel hipocámpico, la despolarización de las neuronas piramidales posibilita la generación de la oscilación, cuya ritmicidad es regulada de manera precisa por el circuito local de interneuronas hipocámpicas (Colom et al., 1987; Konopacki et al., 1992; Bland et al., 1999, 2002; Colom, 2006).

La activación del SM/BD como marcapasos del hipocampo ocurre en determinados estados funcionales, que dependen en último término del estado de activación de núcleos del tronco del encéfalo. En este sentido, clásicamente se ha considerado que el ritmo theta es inicialmente generado en el troncoencéfalo en forma de activación tónica y que, tras ser relevado en nodos hipotalámicos, alcanza el SM/BD, donde la actividad rítmica de las poblaciones septales transforman este flujo en una oscilación que es transmitida al hipocampo y otras estructuras corticales (Bland y Colom, 1993; Bland et al., 1994; Oddie et al., 1994; Vertes y Kocsis, 1997).

1.2.5 Influencia del hipotálamo posterior sobre la oscilación theta

A pesar de que la oscilación theta es más patente en el hipocampo, existen numerosas evidencias de que en ciertas situaciones, la actividad de campo de otras estructuras tanto corticales como subcorticales aparece sincronizada en este mismo rango de frecuencias. Estas estructuras que presentan actividad theta se encuentran interconectadas y constituyen un circuito complejo (Figura 1.7).

En el diencefalo, el núcleo SUM presenta una actividad altamente sincronizada con la ritmicidad hipocámpica, especialmente en condiciones de activación sensorimotora. El SUM es un nodo entre los núcleos activadores del tronco del encéfalo y el sistema septohipocámpico, con el que presenta conexiones bidireccionales (Kocsis, 2006). Dado que no se conocían vías directas desde núcleos troncoencefálicos activadores de la oscilación hipocámpica hasta el marcapasos septal, se propuso la existencia de una ruta que hacía relevo en el hipotálamo posterior. Desde el SUM, así como desde el núcleo posterior hipotalámico (PH), ascienden aferentes excitatorios sobre neuronas colinérgicas y GABAérgicas septales (Borhegyi y Freund, 1998; Leranthy y Kiss, 1996; Vertes y Kocsis, 1997; Kiss et al., 2000; Vertes y McKenna, 2000).

La inclusión del SUM como relevo en el circuito de control del theta fue postulada atendiendo inicialmente a sus proyecciones, estudiadas mediante autorradiografía. Este estudio sugería que el SUM recibía aferencias desde el principal núcleo generador de la oscilación theta, el núcleo reticularis pontis oralis (RPO) (Vertes y Martin, 1988). Se consideró que la ruta originada en el tronco del encéfalo ascendería desde RPO hasta SUM y de ahí sería relevada hasta SM/BD (Vertes, 1992), como se muestra en las Figuras 1.7 y 1.8.

Posteriormente, su papel en la regulación del ritmo theta fue interpretado como de integrador de la frecuencia de la oscilación hipocámpica. Kirk y McNaughton determinaron, mediante inyecciones de procaína en el circuito ascendente conocido hasta la fecha, que las realizadas en regiones rostrales al SUM reducían la amplitud del ritmo theta hipocámpico. Sin embargo, inyec-

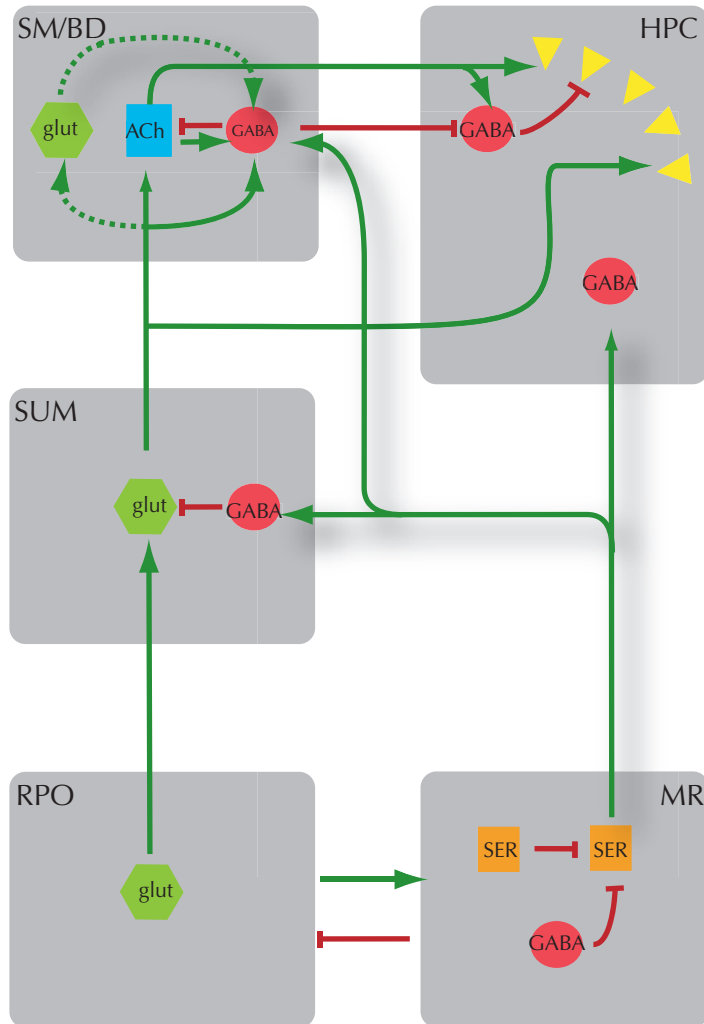


Figura 1.7: Esquema del circuito de control de la oscilación theta propuesto por Vertes (adaptado de Vertes, 2005) En el troncoencefalo, RPO ejerce una activación tónica sobre SUM, que éste transforma en rítmica modulando la frecuencia de disparo en el hipocampo. SM/BD actúa como marcapasos de la oscilación. Sobre estas estructuras, MR ejerce un control inhibitorio.

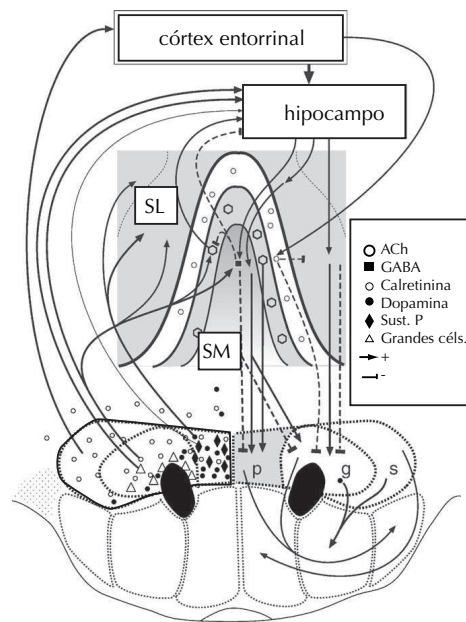


Figura 1.8: Esquema de las conexiones del núcleo SUM sobre el sistema septohipocámpico y el córtex entorrinal, tomada de Pan y McNaughton, 2004. Se especifican las proyecciones de las distintas poblaciones neuronales: colinérgicas, GABAérgicas y glutamatérgicas de SUM sobre células colinérgicas y GABAérgicas del septum medial (SM) y SL.

ciones posteriores al SUM, en la formación reticular, atenuaban la frecuencia, mientras que las realizadas en el propio SUM reducían ambos parámetros de la oscilación (Kirk y McNaughton, 1991). Este conjunto de evidencias sugerían, en condiciones de anestesia con uretano, una influencia tónica de la formación reticular sobre el SUM, que codificaría de forma fásica en la banda theta (Kirk y McNaughton, 1993; Vertes y Kocsis, 1997; Bland y Oddie, 1998).

La influencia rítmica del SUM se relaciona con la existencia en este núcleo de neuronas que disparan con una preferencia de fase respecto de la actividad de campo hipocámpica. El disparo rítmico de estas células se mantiene tras la inyección de procaína en el SM/BD, reduciéndose en estas condiciones la amplitud de la oscilación theta hipocámpica (Kocsis y Vertes, 1997). La actividad rítmica neuronal, tras ser inducida mediante inyección de carbacol en RPO, se mantiene intacta pese a la transección de áreas rostrales al SUM, lo que indica que su generación es independiente del sistema septohipocámpico (Kirk, 1997). Además, en animales anestesiados con uretano, el SUM presenta una actividad local de campo a frecuencias theta con una relación de fase con el EEG registrado en CA1, respecto al que presenta un ligero adelanto (Kocsis y Vertes, 1997).

No obstante, la contribución de SUM a la oscilación theta no está esclarecida en la actualidad. Existen datos contradictorios acerca de la conectividad entre RPO y SUM (Vertes y Martin, 1988; Hayakawa et al., 1993; Pan y McNaughton, 2004) e incluso ha sido cuestionada su relevancia para la generación de la rítmicidad (Thinschmidt et al., 1995), puesto que las lesiones de este núcleo, en animales no anestesiados, no suprimen la oscilación. Por otra parte, más recientemente ha sido propuesto un modelo de modulación de theta que implica que la dirección de la oscilación pueda variar entre hipocampo y SUM dependiendo del estado funcional del animal (Kocsis, 2006; Kocsis y Kaminski, 2006).

1.2.6 Control de la activación de la oscilación theta hipocámpica desde la formación reticular troncoencefálica

La coordinación de la actividad de determinados grupos neuronales del tronco encefálico y de los sistemas neuroquímicos en que se enmarcan origina el establecimiento de estados funcionales diferenciados. Dichos estados se caracterizan, entre otros factores, por la actividad oscilatoria que aparece en estructuras corticales, entre ellas, el hipocampo. De esta manera, el tronco es capaz de generar estados de mayor o menor sincronización a nivel cortical. En el tronco del encéfalo existen grupos de estructuras que pueden ser considerados parte integrante de un *sistema activador*, inductoras de la sincronización, y estructuras de naturaleza inhibitoria o *desincronizadora*.

La implicación del troncoencefalo en el control del estado de activación procede de estudios de von Economo de principios del siglo XX, que permitieron observar por vez primera que la letargia era un síntoma común en enfermos con lesiones del tronco (para revisión Triarhou 2006).

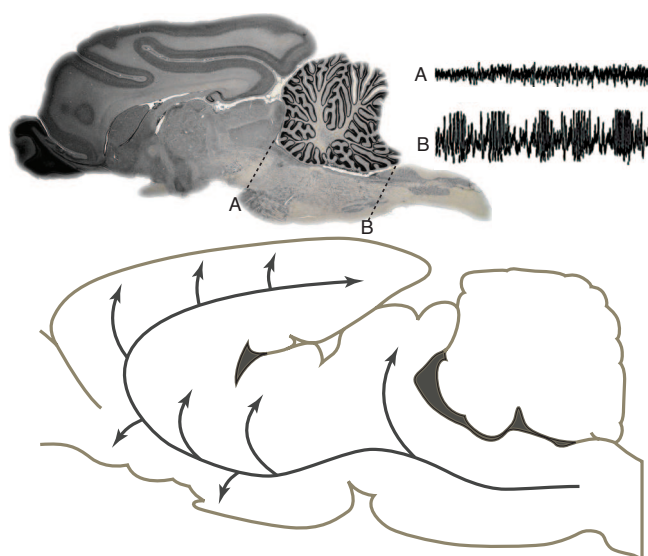


Figura 1.9: Sistema reticular activador ascendente. Arriba, preparaciones de Bremer en gato de *cerverau isolé* (A) y *encephale isolé* (B). Abajo, representación del SRAA en la rata.

El Sistema Reticular Activador Ascendente

Las preparaciones quirúrgicas de Bremer constituyeron las primeras pruebas experimentales que apoyaban esta observación clínica. A diferencia de la transección del neuroeje a nivel de la transición bulbomedular, que provocaba escasas alteraciones de los ciclos de sueño-vigilia en los gatos a los que había sido practicada, la sección intercolicular tenía un efecto neto de somnolencia en el animal. Los animales con transección bulbomedular, que denominó preparaciones de *encephale isolé*, presentaban un ciclo de sueño-vigilia normal y mantenido. En las fases de sueño se registraba un EEG sincronizado y pupila miótica, mientras que en las fases de vigilia el EEG se encontraba *desincronizado* y las pupilas presentaban midriasis. Por el contrario, en las preparaciones de *cerverau isolé*, la sección del tronco a nivel de la transición intercolicular provocaba un estado mantenido caracterizado por un EEG sincronizado y miosis (Figura 1.9). Estos resultados fueron inicialmente interpretados como una desafrenciación de los nervios craneales.

Los experimentos de estimulación eléctrica de la formación reticular realizados por Moruzzi y Magoun (1949) contribuyeron a modificar la interpretación de los mecanismos troncoencefálicos de control del estado de consciencia: estimulaciones realizadas en la zona medial del tronco, desde el bulbo raquídeo hasta el diencefalo caudal, provocaban una activación del EEG característica de los es-

tados de vigilia y atención. Los autores consideraron que la formación reticular del tronco del encéfalo sería el origen de un sistema reticular de activación ascendente (SRAA) que, a través de sus conexiones con los núcleos intralaminares del tálamo, responsables de las proyecciones difusas talamocorticales, activara el córtex de forma generalizada (Moruzzi y Magoun, 1949).

Posteriormente, el SRAA fue delimitado de manera más precisa gracias a la continuación de los estudios de Moruzzi por Batini (1958), realizando transecciones troncoencefálicas a distintos niveles. Rossi y Zirondoli ya habían demostrado que transecciones rostrales a los niveles en que se encuentra el núcleo del trigémino daban lugar a patrones electroencefalográficos de sueño, mientras que secciones *postrigeminales* originaban patrones propios de vigilia (Rossi y Zirondoli, 1954). Batini contribuyó a precisar la zona implicada en la activación cortical, mediante lesiones electrolíticas en gatos. Se pudo determinar así que la transección de la porción más rostral del puente, anterior a los niveles en que se encuentra el núcleo del trigémino, era el nivel más inferior capaz de inducir estados de sueño permanente. La preparación *rostopontina pretrigeminal* presentaba una actividad eléctrica similar a la descrita en el *cerveau isolé*. A diferencia de éstas, las transecciones inmediatamente más caudales, a niveles medios de la protuberancia (preparación *mediopontina pretrigeminal*), provocaban estados de vigilia, con un EEG activo, aunque interrumpidos por breves periodos de sueño. En conjunto, estas observaciones permitieron determinar que la porción más caudal del mesencéfalo y la más rostral del puente suponen una región crítica para el mantenimiento de la activación encefálica propia de la vigilia. Dado que en el *encephale isolé* los ciclos de sueño-vigilia estaban intactos, se dedujo que las estructuras responsables del control inhibitorio del SRAA debían estar comprendidas entre la región pretrigeminal y niveles bulbares (Batini et al., 1958).

La formación reticular ha sido, posteriormente, mejor caracterizada, tanto respecto de su organización como de su contribución a la generación, mantenimiento o modulación de los estados de consciencia, sin que todavía en la actualidad estos aspectos están completamente esclarecidos.

Organización básica de la formación reticular troncoencefálica

La formación reticular del troncoencefalo recibe su nombre por la apariencia que le confiere el paso de haces de fibras entre las agrupaciones neuronales y se extiende desde la médula hasta el mesencéfalo. La falta de medios para proporcionar una mejor caracterización determinó durante largo tiempo el empleo de este término para referirse a una gran región troncoencefálica (Parvizi y Damasio, 2001).

La descripción de una estructura en que se intercalan células y fibras, que se extiende desde el rombencéfalo hasta el diencefalo, se remonta al siglo XIX (Meynert, 1872) y fue también observada por Cajal (1909). A diferencia de niveles encefálicos filogenéticamente más avanzados, la formación reticular presenta una distribución neuronal organizada en columnas orientadas en sentido rostrocaudal (Herrick, 1948). Esta región se caracteriza también por una amplia

capacidad integrativa de conexiones. Las dendritas de las neuronas *reticulares* no se encuentran circunscritas a una región cercana al soma, como ocurre habitualmente en los núcleos bien definidos, sino que alcanzan áreas más alejadas y difusas (Ramon-y Cajal, 1909; Scheibel y Scheibel, 1958; Leontovich y Zhukova, 1963; Ramón-Moliner y Nauta, 1966). El patrón de arborización de los axones es también más extenso y ramificado que el de núcleos neuronales más concretos, alcanzando a numerosas estructuras (Ramon-y Cajal, 1909; Scheibel y Scheibel, 1958; Valverde, 1961). En conjunto, este patrón general de conexiones confiere a la formación reticular un papel integrador sensorial y motor (Kappers, 1936).

La formación reticular ha sido parcelada en núcleos (Meessen y Olszewski, 1949; Olszewski y Baxter, 1954) o campos neuronales (Brodal, 1957; Leontovich y Zhukova, 1963; Ramón-Moliner y Nauta, 1966; Berman, 1968), de acuerdo con las diferencias que presenta en sus niveles rostrocaudales y mediolaterales.

De caudal a rostral, la organización de esta estructura puede entenderse como una transición entre la organización columnar, sencilla, de la médula y la organización más especializada, en núcleos, de niveles más rostrales. Por otra parte, respecto a la citoarquitectura, pueden definirse grupos neuronales más o menos homogéneos, desde la línea media hacia la periferia como patrón costante a lo largo del eje longitudinal. De esta manera, se puede parcelar el neuroeje de medial a lateral, diferenciando entre núcleos del rafe, en la línea media, grupos neuronales mediales o intermedios y grupos laterales. De acuerdo a la tipología celular, lateralmente a los grupos neuronales que ocupan la línea media se observan células *gigantes*. Hacia la periferia, las células presentan tamaños progresivamente más pequeños. Atendiendo a este criterio, lateralmente a los núcleos *del rafe*, se definen los campos *gigante*, *intermedio* y *parvocelular* a lo largo de todo el eje rostrocaudal, lo que permite subdividir la formación reticular rombencefálica, pontina y mesencefálica en los campos que actualmente se consideran (Figura 1.11). Dorsalmente, en torno al IV ventrículo, se localizan los núcleos tegmentales, de límites más definidos (Figuras 1.10 y 1.11).

A nivel de la formación reticular rombencefálica, existe una transición clara desde la médula espinal, siguiendo el patrón descrito (Figura 1.11). En el *tegmento bulbar* se localizan, de medial a lateral, los núcleos *del hipogloso* (N12), *del vago* (N10) y *del tracto solitario* (Sol). Más rostralmente, se encuentran los núcleos *prepósito* y *vestibular medial*.

La formación reticular se continúa a niveles de la protuberancia o puente (Figura 1.11). La zona ventral o *basilar* está constituida por grupos neuronales dispersos y por lo general con poca densidad neuronal, atravesados por gran cantidad de fibras, tanto transversales (pontocerebelosas) como longitudinales (corticopontinas, corticobulbares y corticoespinales). La parte dorsal, en relación con el cuarto ventrículo, constituye el *tegmento pontino* o *calota protuberancial*, que se continúa con el bulbar y el mesencefálico.

En la línea media se encuentran los núcleos del rafe pontino. Cabe señalar, por su interés para nuestro estudio, que en niveles más rostrales de la protuberancia aparece en la línea media el *núcleo del rafe mediano* (MR), limitado lateralmente por el *núcleo del rafe paramediano* (PMR).

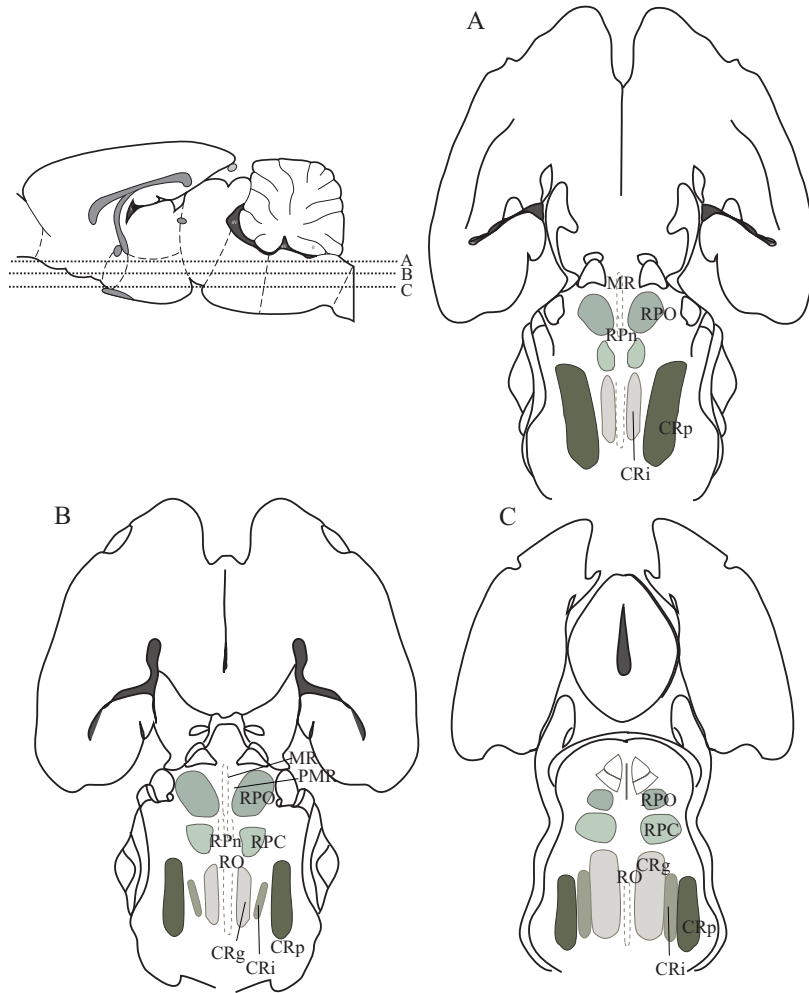


Figura 1.10: Organización de la formación reticular. Representación en cortes horizontales.

El grupo de campos neuronales mediales pontinos, laterales a los núcleos del rafe, incluye a los núcleos reticulares pontinos caudal (RPC) y oral (RPO). Ambas estructuras incluyen células de tamaños variados y presentan mayor densidad celular en la porción ventral. RPC fue denominado posteriormente campo reticular pontino caudal en el trabajo clásico de Meessen y Olszewski (1949) y está limitado lateralmente por el *núcleo subcoeruleus* (SubC) y por núcleos del trigémino (N5) (Figura 1.11). En la región más rostral de la protuberancia, el lugar medial lo ocupa RPO (Meessen y Olszewski, 1949). Este campo neuronal inicialmente se consideró una continuación del RPC pero posteriormente ha sido considerado como una entidad independiente, debido principalmente a su patrón de conexiones y a su funcionalidad (Shammah-Lagnado et al., 1987). Este núcleo se sitúa lateral a los núcleos MR y PMR, de los que queda separado por fibras del haz tectoespinal, procedentes del techo mesencefálico. Ventromedial a RPO se sitúa la porción más rostral del *núcleo reticular tegmental* (RTg), que caudalmente se hace más dorsal. Dorsalmente a RPO se sitúan núcleos tegmentales y la decusación de los pedúnculos cerebelosos superiores. El límite ventral del núcleo lo constituyen fibras del tracto trigeminotalámico (tt) y del lemnisco medial (ml). Lateralmente a RPO se encuentra, en los niveles más caudales, el SubC y más rostralmente, el área 7 de neuronas noradrenérgicas (A7).

El tegmento pontino (Figura 1.11) está representado por distintos grupos neuronales a niveles caudales y rostrales. En la región más caudal, el cuarto ventrículo forma un surco en la línea media. Tal y como se ha mencionado previamente, la línea media del tegmento queda ocupada, excepto en una región posterior, por *núcleo del rafe dorsal* (DR), en contacto con el ventrículo. Este núcleo se continúa en el mesencéfalo, en contacto con el acueducto. Una serie de agrupaciones neuronales, más o menos compactas, se ubican inmediatamente laterales a la línea media y protruyendo hacia el ventrículo. De éstos, el núcleo más caudal es el *núcleo supragenual*. En niveles ligeramente más rostrales, la prominencia hacia la luz del ventrículo la ocupa el *núcleo posterodorsal tegmental* (PDT), sobre el que aparece el pequeño *núcleo esfenoide*. En niveles anteriores, coincidentes con la porción más caudal de RPO, en esta posición se localiza el núcleo dorsal tegmental (DT).

Ventromedial a estos núcleos dorsales, rodeándolos en algunos niveles hasta su porción lateral y también en contacto con el ventrículo, se encuentra el núcleo incertus (NI). En los niveles más caudales de este núcleo, presenta una porción medial que no coexiste con DR. Dado su papel central de NI en este estudio, más adelante se describe esta estructura en detalle.

Más periféricamente se localizan los núcleos *laterodorsal tegmental* (LDT), *de Barrington* (Ba) y *locus coeruleus* (LC) (Figura 1.11). En la región lateral del tegmento pontino, se localizan los núcleos del trigémino y el núcleo parabraquial (PB). En niveles rostrales, en la región lateral, ocupando ya el pedúnculo cerebral, aparece el *núcleo tegmental pedunculopontino* (PPT). Ventral a la región del tegmento dorsal, transcurre el *fascículo longitudinal medial* (mlf). Este haz de fibras separa los núcleos mediales mencionados de los *núcleos tegmentales ventral* (VTg) y *dorsomedial* (DMTg).

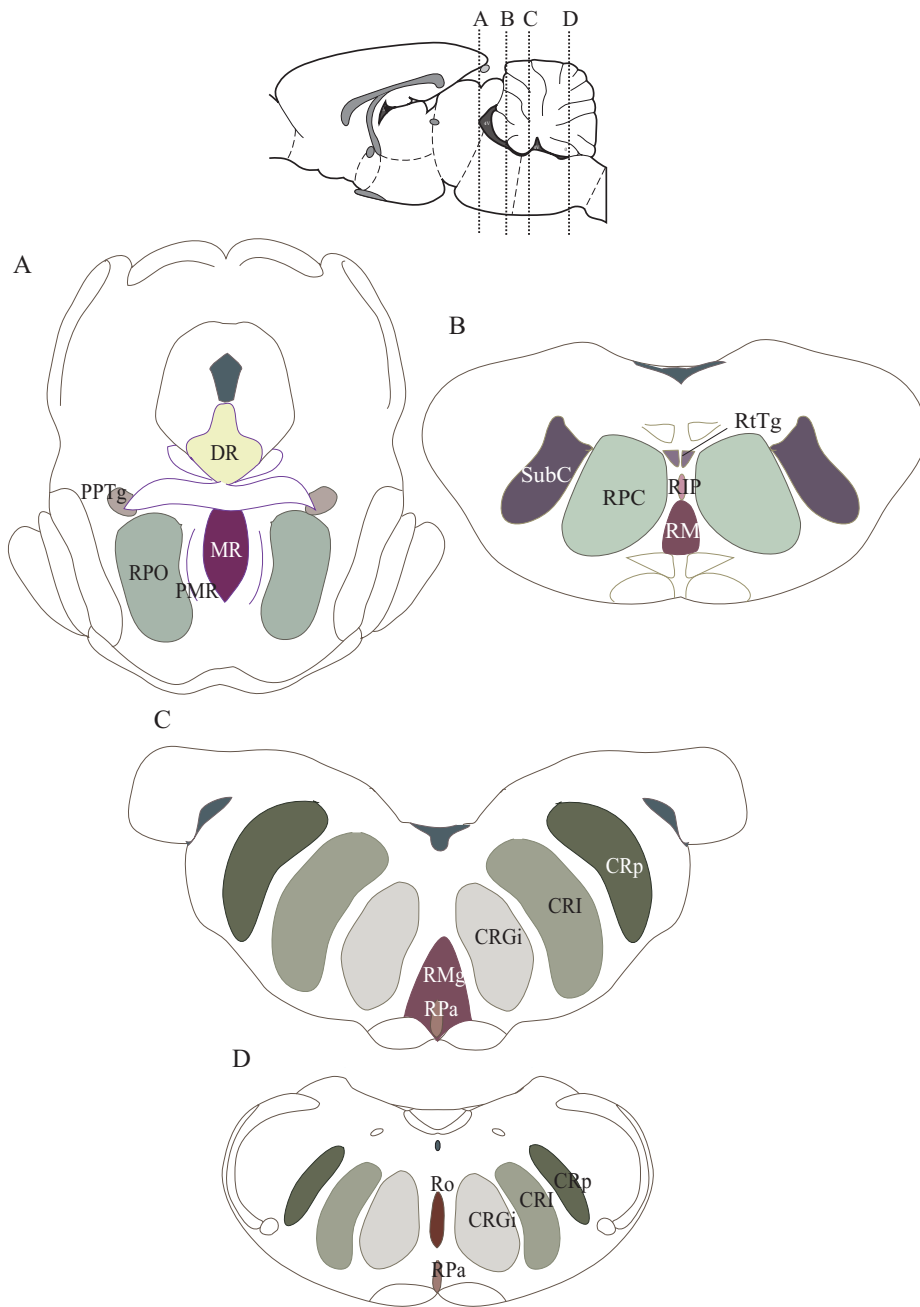


Figura 1.11: Organización de la formación reticular. Representación en cortes coronales a nivel pontino rostral (A), pontino caudal (B), bulbar rostral (C) y caudal (D).

En niveles mesencefálicos cabe señalar que la región más ventral, en la línea media, queda ocupada por el *núcleo interpeduncular* (IP). El tegmento a estos niveles está constituido, aparte del DR, por la *sustancia gris periacueductal* (PAG) .

Modulación del estado de activación por los distintos sistemas neuroquímicos de la formación reticular troncoencefálica

La coordinación de los diferentes sistemas neuroquímicos que tienen origen en la formación reticular del tronco del encéfalo permite la modulación del grado de activación cortical. Actualmente se considera que las rutas colinérgica, monoaminérgica y glutamatérgica constituyen los componentes clave del denominado SRAA. Su coordinación y modulación a través de otras vías neuroquímicas da lugar al establecimiento de los distintos estados de activación comportamental, a través de su influencia sobre el prosencéfalo basal y el hipotálamo. Estos sistemas controlan los ciclos de sueño y vigilia, además de permitir al encéfalo regular el nivel de activación en estados tales como el *arousal*, la atención focalizada o el estrés (Semba, 1993; Lydic y Baghdoyan, 1999).

El sistema colinérgico mesopontino participa en los estados activos del cerebro, contribuyendo tanto al control de la vigilia como en la generación del sueño REM. Las estructuras principales responsables de la liberación de acetilcolina son los núcleos PPT y LDT (Steriade et al., 1991).

En el mantenimiento de la vigilia, las neuronas serotoninérgicas de los núcleos del rafe MR y DR parecen tener también un papel clave, dado que su actividad se reduce durante el sueño y desaparece durante el sueño REM. Se ha propuesto que su función en el control comportamental está relacionada con su implicación en la regulación de la actividad motora y su integración con la información sensorial. El mismo patrón lo presentan las neuronas noradrenérgicas del *locus coeruleus*, que desempeñan un papel fundamental en los estados activados de la vigilia, de manera especialmente remarcable en las situaciones de estrés.

Además, en la formación reticular existen también poblaciones glutamatérgicas que se activan selectivamente en determinados estados comportamentales. Los sistemas colinérgico y glutamatérgico parecen actuar de manera sinérgica en la formación reticular pontina (Elazar y Berchanski, 2001). Durante la fase REM del sueño, actúan sobre el prosencéfalo basal, regulando la actividad EEG y sobre niveles medulares, interviniendo en el tono muscular (Fuller et al., 2007).

Además de estas poblaciones, existen neuronas GABAérgicas que ejercen un control inhibitorio del sistema (Lydic y Baghdoyan, 1999).

Por otra parte, el ciclo de sueño y vigilia es regulado por otros sistemas. Entre éstos destaca el sistema orexinérgico/hipocretinérgico, que, originado en el área lateral hipotalámica (LHA) y núcleo PH, actúa sobre los núcleos tegmentales (Xi et al., 2001). A pesar de que los mecanismos por los que este sistema modula el nivel de activación no están esclarecidos, se ha propuesto que podrían excitar neuronas troncoencefálicas que promuevan el *arousal* y la activación cortical (de Lecea et al., 1998; Kilduff y Peyron, 2000). Estos péptidos

activan neuronas colinérgicas y monoaminérgicas de la formación reticular y el prosencéfalo basal, promoviendo el mantenimiento de la vigilia y la atención.

Las orexinas contribuyen a la regulación del estado comportamental variando el nivel de vigilancia, entre otros mecanismos, mediante la interacción con el sistema mediado por la hormona liberadora de corticotropina (CRH) (Winsky-Sommerer et al., 2004). La CRH, que desempeña un papel clave en la respuesta al estrés, liberada al espacio ventricular contribuye, en ausencia de agentes estresantes, a la regulación de la vigilia (Sanford et al., 2008). En la formación reticular, existen receptores para CRH en los núcleos tegmentales, principalmente en el NI y, en menor medida, en LDT y PPT, así como en los núcleos del rafe (Potter et al., 1992, 1994; Chalmers et al., 1995).

Influencia de la formación reticular troncoencefálica en el ritmo theta hipocámpico

Los estados comportamentales corticalmente activos, ya sea por un nivel elevado de activación generalizada (*arousal*) o durante la exploración, se correlacionan con la aparición de la oscilación theta hipocámpica. Determinadas estructuras del SRAA participan de forma señalada en la sincronización de la actividad eléctrica del hipocampo o en su desincronización.

Entre los primeros, el núcleo RPO ha demostrado ser el más efectivo para la generación de la oscilación theta, tal y como se observa tras su estimulación tanto eléctrica como química (Klemm, 1972; Macadar et al., 1974; Nuñez et al., 1991; Vertes et al., 1993). En esta estructura se han descrito neuronas GABAérgicas, catecolaminérgicas y serotoninérgicas (Jones, 1991; Rodrigo-Angulo et al., 2000; Reinoso-Suárez et al., 2001). El control de este núcleo reticular parece depender principalmente de aferencias colinérgicas pontomesencefálicas, procedentes de PPT y LDT, así como glutamatérgicas y serotoninérgicas (para revisión, (Reinoso-Suárez et al., 2001)).

Por su parte, el núcleo MR es el principal responsable de la desincronización del ritmo theta hipocámpico (Assaf y Miller, 1978). Este núcleo del rafe ejerce un efecto inhibitorio sobre las estructuras clave del sistema: SM/BD, SUM e hipocampo (Acsády et al., 1996; Vertes et al., 1999) y su lesión o inhibición GABAérgica origina la aparición de una oscilación theta persistente (Maru et al., 1979; Kinney et al., 1995).

Si bien las conexiones que intervienen en la desincronización de la oscilación parecen estar bien establecidas, la vía de activación no se conoce con exactitud, dado que RPO no proyecta sobre el principal marcapasos del ritmo, SM/BD.

Como ya hemos mencionado, se propuso que RPO debía ejercer su efecto activador sobre el sistema septohipocámpico mediante una ruta multisináptica a través de SUM (Vertes, 1992). Este circuito propuesto se basaba en la existencia de una proyección directa desde RPO hasta este núcleo (Vertes y Martin, 1988) y en que la inhibición de SUM altera la sincronización hipocámpica generada por estimulación de RPO (Kirk y McNaughton, 1991).

No obstante, el efecto de la lesión de SUM únicamente afectaba a la frecuencia de la oscilación (Kirk y McNaughton, 1991). Además, la proyección desde

RPO hasta SUM observada mediante autorradiografía no se vieron respaldados por el estudio mediante trazadores neuronales (Hayakawa et al., 1993; Pan y McNaughton, 2004). Como resultado, la implicación de SUM como mediador del efecto activador troncoencefálico fue cuestionada (Pan y McNaughton, 2004; Thinschmidt et al., 1995), por lo que la ruta de influencia de la formación reticular troncoencefálica sobre el sistema septohipocámpico permanece en discusión.

1.3 EL NÚCLEO INCERTUS

El NI, en el tegmento pontino, constituye un candidato óptimo para el control troncoencefálico de la oscilación theta, dado que presenta conexiones directas con las principales estructuras implicadas en su generación y modulación (Goto et al., 2001; Olucha-Bordonau et al., 2003). Además, nuestro grupo ha podido demostrar que, en efecto, participa en la activación de la ritmicidad theta (Nuñez et al., 2006). En este trabajo se pretende profundizar en su contribución a la sincronización hipocámpica.

1.3.1 Nomenclatura y delimitación

La región del tegmento dorsal es un área compleja y su parcelación anatómica ha sido objeto de controversia. En las primeras descripciones, la región que se estudia en este trabajo era referida como parte del *núcleo dorsal tegmental* (Morest, 1961; Cowan et al., 1964). Ya en estos trabajos se hablaba de una subdivisión de este *núcleo* sugerida por Guillery y Powell, atendiendo a las diferentes proyecciones de cada zona sobre la región mamilar (Guillery, 1957). Estas subdivisiones eran denominadas *partes centralis* (DTc), *anterior* (DTa), *posterior* (DTp) y *ventromedialis* (DTvm) (Morest, 1961). Este DTvm se corresponde con la región que en nuestro trabajo es referida como NI.

La *pars centralis* corresponde al *núcleo q* de Meessen y Olszewski, con células de tamaño medio y un rico plexo de fibras. El DTc se continúa, rostral y caudalmente, respectivamente, por las partes denominadas DTa y DTp, con menor densidad celular y formadas por neuronas de menor tamaño.

La denominada *pars ventromedialis* comienza más posterior a DTc y, también formada por células medianas, se sitúa a los lados de la línea media. Cowan (1964) adoptó esta nomenclatura y describió la DTvm como rodeando ventromedialmente a DTc y DTp y dorsal al mlf. Sin embargo, atendiendo al distinto patrón de conexiones que mostraban DTc y DTvm, Liu y colaboradores propusieron que fuesen considerados entidades diferenciadas (Liu et al., 1984).

El área ventromedial se corresponde con el *núcleo O* de Meessen y Olszewski, al *núcleo recessus pontis medialis* de Jennes y colaboradores (Tanaka et al., 2005) y al *núcleo incertus*, introducido por Streeter en 1903. Este último término, que se adopta en el presente trabajo, fue empleada por primera vez, en humanos, para describir una región situada en el suelo del cuarto ventrículo que se extendía desde los niveles en que se observa la rodilla del nervio facial hasta

la sustancia gris periacueductal. Posteriormente, esta misma nomenclatura fue adoptada para el gato (Papez, 1929), el conejillo de indias (Castaldi, 1926) y sustituida por *locus incertus* el hámster (Chatfield y Lyman, 1954).

En el atlas del troncoencéfalo del gato, Berman (1968) limitó el *núcleo incertus* a la porción medial y ventral de la sustancia gris tegmental pontina, dorsal al mlf. Esta descripción se corresponde con núcleo O referido en el conejo (Meessen y Olszewski, 1949), terminología adoptada por otros autores (Takagi et al., 1980; Kubota et al., 1983).

Lateralmente a la agrupación medial de células se describió una parte diferenciada, denominada *pars alpha de la sustancia gris periacueductal* (CGA), de acuerdo a su distinta reactividad a la acetilcolinesterasa. Esta terminología se ha mantenido hasta la actualidad en la elaboración de los atlas de rata de Paxinos (1986), incluyendo nuevas subdivisiones de la porción ventral y lateral: *pars beta* (CGB) y *gamma* (CGG), siempre rodeando al *núcleo tegmental dorsal* que según la terminología de Guillery y Powell se correspondería con las partes *centralis*, *anterior* y *posterior* y referido aquí como DT y PDT. Las neuronas que rodean lateral y dorsalmente al DT y PDT son denominadas en el atlas de Paxinos como sustancia gris del puente (CGPn).

El grupo de Cowan y Swanson adoptó también finalmente el término de *núcleo incertus* para la rata (1979). En este trabajo, era descrito como un grupo neuronal formado por células multipolares de tamaño medio que ocupaba una posición inmediatamente caudal al DR y dorsal al mlf. Otros autores consideraron a este grupo neuronal como una prolongación del propio DR (Taber, 1961; Hayakawa y Zyo, 1983).

Más recientemente han sido realizados estudios más específicos acerca de esta agrupación neuronal (Goto et al., 2001; Olucha-Bordonau et al., 2003; Tanaka et al., 2005; Nuñez et al., 2006; Ma et al., 2007; Teruel-Martí et al., 2008; Miyamoto et al., 2008). La adopción de la nomenclatura de *núcleo incertus* (NI) en los trabajos específicos acerca de esta estructura motiva el empleo del término en el presente estudio.

1.3.2 Organización citoarquitectónica y neuroquímica

En el trabajo de Goto y colaboradores (2001) se diferencian de forma clara dos divisiones del núcleo: un grupo paramedial que fue denominado *núcleo incertus pars compacta* (NIc), integrado por neuronas densamente empaquetadas inmediatamente laterales a la línea media, que a estos niveles está exenta de somas y una división ventrolateral, con menor densidad neuronal, la *pars dissipata* (NIId). El NIc se corresponde con el núcleo O de Meessen y Olszewski (1949), mientras que el NIId se correspondería con las subdivisiones CGA, CGB y CGG. Ambas regiones, NIc y NIId, comparten similares características hodológicas y citoarquitectónicas, lo que llevó al grupo de Goto a considerarlas partes del mismo núcleo.

En trabajos recientes de nuestro grupo y de Goto (Goto et al., 2001; Olucha-Bordonau et al., 2003), se realizó un estudio exhaustivo de la organización citoarquitectónica y neuroquímica del NI. El reconocimiento de las agrupaciones

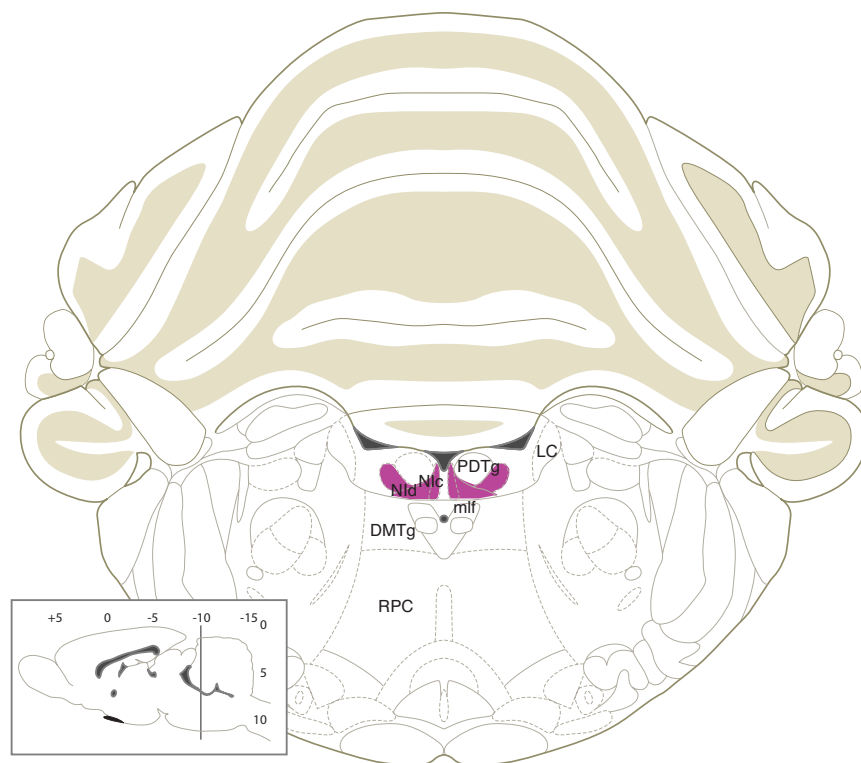


Figura 1.12: Localización y subdivisión de NI.

neuronales mediante la tinción de Giemsa planteaba dificultades para distinguir los límites con el DR, lo que justificaba la interpretación del NI como parte de DR que aparece en algunos estudios (Taber, 1961; Hayakawa y Zyo, 1983). Sin embargo, mientras que el DR puede reconocerse como prolongación caudal de la sustancia gris periacueductal, el NI se ubica completamente, tal y como puede observarse en los distintos estudios de la literatura, en el suelo del cuarto ventrículo y a ambos lados de la línea media.

La distinción definitiva de ambos núcleos se pudo realizar en base a su diferente naturaleza neuroquímica (Teruel-Martí, 2004; Olucha-Bordonau et al., 2003), dada la naturaleza serotoninérgica de DR y la presencia de neuronas CCK positivas en NI (Kubota et al., 1983). A diferencia del DR, que ocupa la línea media, las células CCK positivas se sitúan siempre a ambos lados de ésta, delimitadas dorsalmente por tejido ependimario, laterodorsalmente por DT o PDT, dependiendo del nivel estudiado y ventralmente por el mlf. Esta región identificada como NI resultaba además acetilcolinesterasa (AChE) positiva. En la línea media, sin embargo, más rostralmente, se observó una reactividad negativa para CCK y AChE y un aumento de células positivas para 5-HT, lo que permitía identificarlas como pertenecientes a DR. El DT también presenta negatividad frente a AChE, lo que permitió delimitar los contornos del NI. La identificación a niveles más caudales resulta más sencilla dada la organización en dos columnas de neuronas AChE y CCK positivas a ambos lados de la línea media aneuronal, que se continúa lateralmente con una región menos empaquetada, ventral a DT. A niveles más caudales el surco del IV ventrículo separa los NI izquierdo y derecho, y el patrón de inmunoreactividad para AChE, CCK y 5-HT se mantiene, siendo en estos niveles limitado laterodorsalmente por PDT.

1.3.3 Conectividad del núcleo incertus

En conjunto, el tegmento dorsal de la formación reticular pontina constituye un importante origen de proyecciones hacia el diencefalo y el prosencefalo basal.

Existen tres vías desde el tegmento hasta el hipotálamo y al prosencefalo basal: el *pedúnculo mamilar* (mp), el *haz prosencefálico medial* (mfb) y el *sistema periventricular* (Guillery, 1957; Cowan et al., 1964). A través del mp, los núcleos tegmentales proyectan principalmente sobre los núcleos mamilares, aunque algunas de las fibras continúan hacia la región supramamilar, hipotálamo lateral e incluso al septum. El mfb, por su parte, conduce fibras originadas en el tegmento atravesando las regiones supramamilar, lateral hipotalámica y preóptica hacia los núcleos septales. Las fibras periventriculares, originadas en las regiones adyacentes al cuarto ventrículo y al acueducto, se dirigen principalmente a las áreas periventriculares del hipotálamo, aunque algunas de ellas se desprenden para incorporarse al mfb en el hipotálamo lateral (Guillery, 1957; Nauta, 1958).

El trabajo de Morest de degeneración axonal, realizado en conejo, permite observar el diferente patrón de proyecciones diencefálicas y prosencefálicas de los núcleos del tegmento dorsal. Tal como se ha comentado previamente, en este trabajo se consideraba el área que corresponde a NI como la porción ventromedial del *núcleo dorsal tegmental*. De acuerdo con este estudio, la lesión de DTc

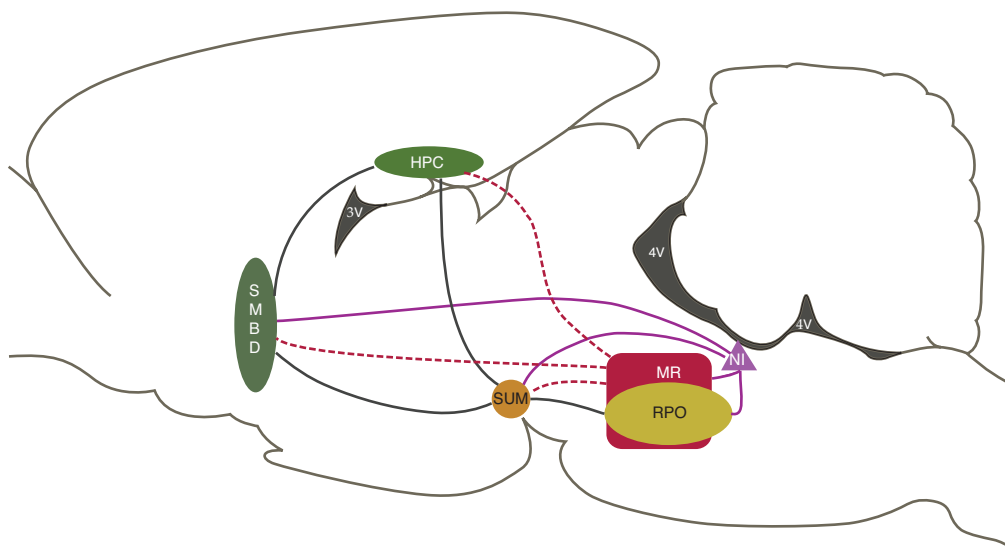


Figura 1.13: Proyecciones eferentes de NI sobre estructuras relacionadas con el control del ritmo theta hipocámpico

provoca una degeneración en el núcleo mamilar medial (MM), mientras que la destrucción de DTvm, sin embargo, provoca la degeneración del núcleo mamilar lateral (ML). Se observan en ambos casos una degeneración de fibras del mfb que llegan hasta el SM/BD (Morest, 1961). Este patrón fue corroborado en rata también mediante degeneración axonal por el grupo de Cowan (Cowan et al., 1964).

Más recientemente, la conectividad de este núcleo se ha descrito mediante el empleo de trazadores neuronales. En 1984, el grupo de Liu realizó un estudio mediante inyección de peroxidasa de rábano (HRP) y *fast blue* en DTc y en DTvm, con el objetivo de confirmar el diferente patrón de conexiones que mostraban estas regiones (Liu et al., 1984).

Los estudios sistemáticos del grupo de Goto y de nuestro propio grupo acerca de la conectividad y la organización de NI han demostrado este núcleo, distinto de DT y de DR, presenta un extenso patrón de conexiones que le sitúan en una posición crítica en la red troncoencefálica ascendente (Goto et al., 2001; Olucha-Bordonau et al., 2003).

Goto y colaboradores emplearon para el marcaje neuronal la subunidad B de la toxina colérica (CTb) como trazador retrógrado y Phaseolus vulgaris-leucoaglutinina (PHA-L) como trazador anterógrado. En el trabajo de nuestro grupo se emplearon CTb y diaminobencidina (DAB), respectivamente.

El estudio mediante inyección de trazador retrógrado en NI indicaba que este núcleo recibe sus principales aferencias de niveles superiores, no presentando

inputs desde niveles más caudales a él, a excepción del *núcleo prepositus*. Las estructuras que mayor marcaje retrógrado presentaban eran los núcleos del rafe MR y PMR, el núcleo de la habénula lateral (LHb) y el IP. Además de los núcleos mencionados, existe una proyección significativa hacia NI desde áreas hipotalámicas y desde el córtex prefrontal. Atendiendo al análisis del grupo de Goto, en conjunto, este patrón de aferencias otorga al NI la capacidad de integrar información asociada al procesamiento por parte de la habénula, a la planificación, a la función hipocámpica y al control oculomotor (Goto et al., 2001).

Con respecto a las proyecciones eferentes, tanto el trabajo de Goto como el de nuestro grupo presentan un patrón de conexiones ascendentes muy distribuido y significativo (Goto et al., 2001; Teruel-Martí, 2004; Olucha-Bordonau et al., 2003). Las principales proyecciones ascendentes de NI terminan, a través del mfb y del sistema periventricular, en núcleos del denominado *sistema límbico*. Por una parte, NI constituye un importante origen de conexiones sobre el prosencéfalo basal, en concreto sobre el complejo SM/BD. Las conexiones telencefálicas de NI incluyen además al giro dentado (DG) del hipocampo ventral, al subiculum y al cortex entorrinal, así como a regiones de la amígdala. En el diencefalo, las proyecciones de NI terminan de forma mayoritaria sobre los núcleos hipotalámicos SUM, PH y ML y sobre el LHA. Las principales eferencias talámicas son sobre el núcleo reuniens (Re) y el romboide. En el troncoencéfalo, fibras de NI aparecen principalmente en los núcleos del rafe RM, RPM y DR, aunque proyectan también a LDT, PPT, RPO, RPC, determinadas regiones de la PAG y los colículos superior e inferior (Goto et al., 2001; Olucha-Bordonau et al., 2003).

1.3.4 Implicación de NI en el control del estado de activación y de la oscilación theta hipocámpica

El patrón de aferencias y las proyecciones ascendentes que presenta este núcleo lo sitúan en una posición crítica como parte del SRAA y como integrador de la respuesta emocional (Goto et al., 2001). El planteamiento de esta hipótesis formulada por Marina Goto surgió no sólo de la observación de que las principales proyecciones al núcleo procedían del eje habenulo-interpeduncular, sino, además, a partir del estudio de la sensibilidad del NI al efecto de la hormona CRH, relacionada con la regulación del estado de activación durante la vigilia y el estrés (Goto, 1998). Existen evidencias de que NI presenta, de manera selectiva en la región, una elevada expresión para receptores de esta molécula (Potter et al., 1992, 1994; Chalmers et al., 1995), como se muestra en la Figura 1.14. Por otra parte, el papel de CRH ha sido ligado al péptido relaxina-3 (RLX3), originado de manera selectiva en el NI (Burazin et al., 2002; Banerjee et al., 2010). Recientemente se ha demostrado que la inyección de este péptido en el SM/BD induce la generación de ritmo theta hipocámpico (Ma et al., 2009).

Las conexiones ascendentes de NI, por su parte, incluyen a las principales estructuras implicadas en la generación o modulación del ritmo theta hipocámpico: SM/BD, SUM, PH y MR, así como al DG. Estas eferencias lo capaci-

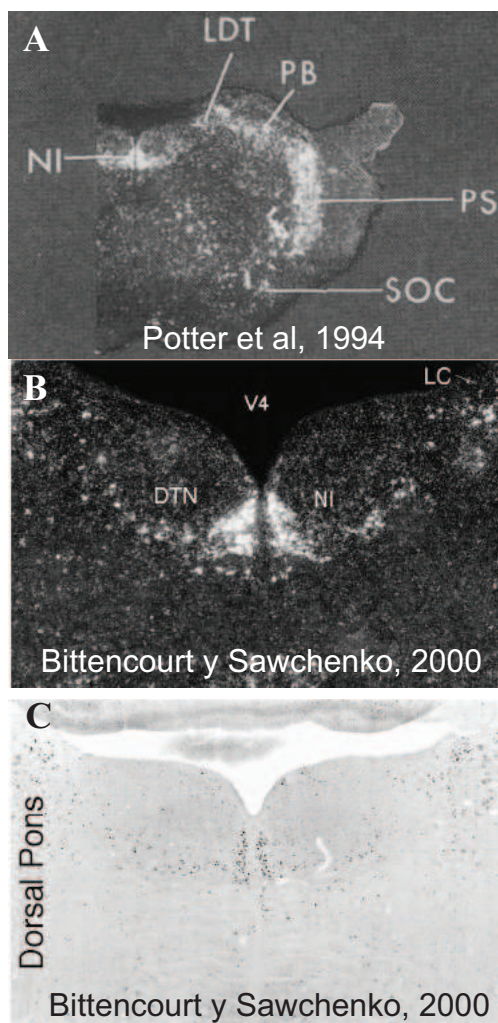


Figura 1.14: NI como mediador de la respuesta a CRH. A y B, expresión de ARNm para el receptor R1 de CRH, tomadas de Potter et al, 1994 y Bittencourt y Sawchenko, 2000. C, expresión de c-fos en NI tras inyección intracerebroventricular de CRH, tomada de Bittencourt y Sawchenko, 2000.

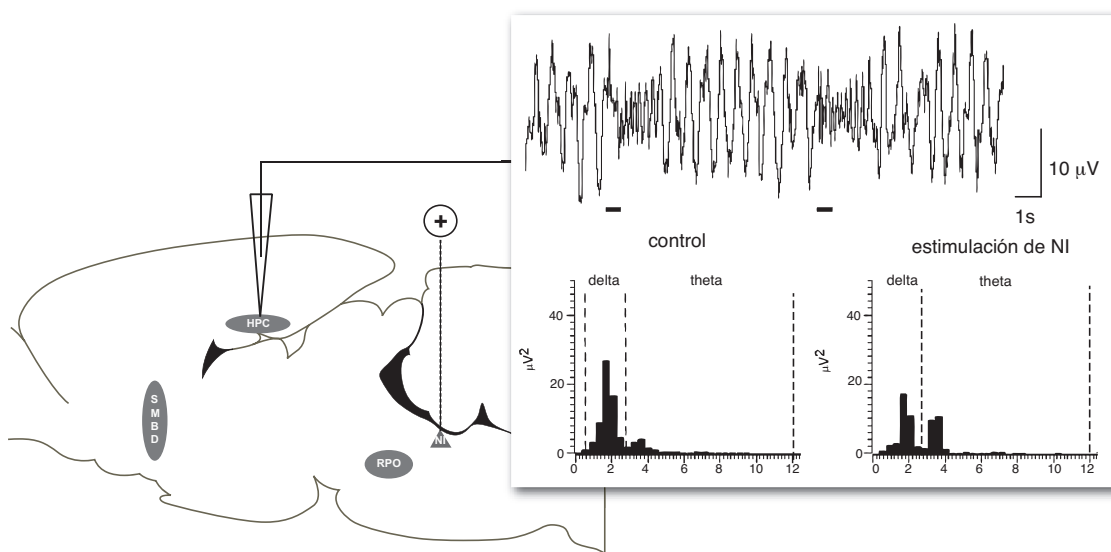


Figura 1.15: La estimulación de NI mediante pulsos o trenes eléctricos origina episodios de ritmicidad theta en el hipocampo. Tomada de Nuñez et al, 2006

tan como activador o modulador de la oscilación hipocámpica. Los estudios de nuestro grupo se orientaron a verificar esta implicación en la funcionalidad del hipocampo. En los trabajos recientes de nuestro grupo se ha realizado una primera verificación de esta influencia, dado que mediante estimulaciones eléctricas del NI en ratas anestesiadas con uretano se pudo demostrar que NI induce la aparición de ritmo theta hipocámpico (Teruel-Martí, 2004).

Continuando en esta misma línea de investigación, en el presente trabajo se analiza la actividad neuronal unitaria en NI en rata anestesiada con uretano, en condiciones de theta inducido. Además, bajo el efecto de la anestesia, se presentan los efectos de su lesión o inhibición farmacológica sobre la generación de la actividad theta hipocámpica. El estudio en anestesia se complementa con la comprobación de su equivalencia a lo largo del ciclo de sueño/vigilia en animales no anestesiados con electrodos implantados de forma crónica. Además, con el objetivo de caracterizar la posible coordinación de la actividad del tegmento pontino con la hipocámpica, se estudia asimismo la relación entre la actividad de campo de este núcleo con la sincronización hipocámpica, tanto en rata anestesiada como durante el ciclo de sueño/vigilia. Por último, dado que algunos de los resultados obtenidos sugerían la importancia de una vía RPO-NI-SM/BD no descrita en los trabajos de conexiones referenciados, una parte de esta investigación se dirigió a elucidar la existencia de dicha ruta.

2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La oscilación theta hipocámpica subyace a los procesos de adquisición, consolidación y recuperación de la memoria, particularmente asociada a la elaboración de mapas cognitivos, espaciales y temporales, que permiten la integración sensorimotora. En la actualidad, existe abundante información acerca del circuito septohipocámpico generador de la ritmicidad *theta*. Sin embargo, el substrato estructural y conectivo que, desde el tronco del encéfalo, conduce a la aparición de dicha sincronización y a su modulación en los distintos estados de consciencia no está suficientemente esclarecido. El objetivo de nuestro estudio se ha centrado en corroborar la implicación del NI en el circuito de control del ritmo *theta* hipocámpico, dado su patrón de conexiones y los resultados preliminares de su estimulación.

2.2 HIPÓTESIS

Los antecedentes presentados permiten formular la hipótesis de que *el NI constituye un elemento indispensable de la red troncoencefálica implicada en el control de la activación del ritmo theta hipocámpico a través de sus conexiones y de su contribución a un sistema de osciladores acoplados. Esta contribución se manifiesta durante la activación pontina del ritmo theta, tanto en anestesia con uretano como durante el sueño REM y también durante la exploración activa del entorno por parte del animal.*

Desglosadas, las hipótesis de trabajo que hemos planteado han sido:

- I. *NI podría ocupar un papel clave en la generación de ritmo theta hipocámpico en ratas anestesiadas con uretano*
 - a) *La actividad de las neuronas de NI, en la rata, se debería correlacionar con la presencia de ritmo theta hipocámpico durante la anestesia con uretano.*
 - b) *La integridad de NI, en la rata, sería necesaria para la generación de ritmo theta hipocámpico en este modelo experimental*

- II. *La actividad de campo en NI, en la rata, podría estar correlacionada con el EEG hipocámpico durante la anestesia con uretano*
- III. *La actividad de NI, en la rata, se correlacionaría con la presencia de ritmo theta hipocámpico durante el ciclo de sueño/vigilia*
 - a) *La actividad de las neuronas de NI, en la rata, variará dependiendo de la presencia de ritmo theta hipocámpico durante el ciclo de sueño/vigilia*
 - b) *La actividad local de campo en NI, en la rata, podría correlacionarse con el EEG hipocámpico durante el ciclo de sueño/vigilia*
- IV. *Los efectos de NI sobre la actividad hipocámpica podrían estar mediados por su participación en un sistema de proyecciones pontoseptal*
 - a) *NI podría recibir aferencias desde el principal generador pontino de ritmo theta*
 - b) *Podría existir una ruta pontoseptal a través de NI*

2.3 OBJETIVOS

Los objetivos del estudio realizado persiguen verificar las hipótesis planteadas:

- I. *Analizar si NI interviene de forma relevante en la generación de ritmo theta en el hipocampo ratas anestesiadas con uretano*
 - a) *Estudiar el patrón de disparo de las neuronas de NI y comprobar si existe correlación entre la actividad unitaria en NI y la presencia de ritmo theta hipocámpico en rata anestesiada con uretano.*
 - b) *Analizar si NI es necesario para la generación de ritmo theta en el hipocampo mediante lesiones e inhibiciones del núcleo.*
- II. *Analizar la relación entre la actividad de campo en NI y en hipocampo en rata anestesiada con uretano, en distintas condiciones de generación de ritmo theta en el hipocampo.*
 - a) *Describir la actividad local de campo en NI en condiciones espontáneas durante la anestesia con uretano.*
 - b) *Estudiar el efecto que produce sobre la actividad local de campo en NI la estimulación eléctrica de RPO.*
 - c) *Describir el efecto de la estimulación colinérgica de RPO como modelo de reproducción de un estado similar al sueño REM.*
 - d) *Analizar el efecto de la estimulación sensorial mediante el modelo de tail pinch en la actividad local de campo en NI.*

- e) *Estudiar la relación de la actividad local de campo en NI con la de CA1 hipocámpico.*
- III. *Comprobar si existe correlación entre la actividad de NI y el EEG hipocámpico en rata no anestesiada y estudiar su relación con los distintos estados de activación.*
- a) *Analizar la actividad unitaria y de campo en NI durante la vigilia tranquila y la vigilia activa exenta de locomoción.*
 - b) *Estudiar la correlación entre la actividad unitaria y de campo en NI y en hipocampo en rata no anestesiada y analizar su evolución a lo largo del ciclo sueño/vigilia.*
- IV. *Verificar la existencia de una proyección desde RPO hasta NI que lo capacite para intervenir en la generación de ritmo theta.*
- a) *Analizar el patrón de proyecciones eferentes de RPO y determinar si NI constituye un campo de terminación de las fibras de RPO.*
 - b) *Verificar las conexiones aferentes al complejo SM/BD, con especial interés en la delimitación de sus aferencias tegmentales.*
 - c) *Estudiar la existencia de rutas consecutivas RPO-NI-SMBD. Se pretende elucidar si existe una ruta multisináptica desde RPO hasta SM/BD a través de NI y si dicha vía es de magnitud similar a la observada en áreas hipotalámicas.*

2.4 PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO

El estudio que se describe a continuación fue abordado desde una doble perspectiva, de acuerdo a los objetivos planteados: la caracterización electrofisiológica de la actividad de NI tanto en el animal anestesiado como durante distintos estados de activación del ciclo de sueño/vigilia y la descripción anatómica del sistema que justifica su funcionalidad.

Estudios anteriores (Goto et al., 2001; Olucha-Bordonau et al., 2003) señalaban la existencia de conexiones aferentes y eferentes del NI que lo capacitaban para ejercer una influencia sobre la activación hipocámpica. Posteriormente fue demostrado que su estimulación es capaz de generar ritmo theta en el hipocampo (Nuñez et al., 2006).

Los experimentos electrofisiológicos que se presentan en este trabajo fueron orientados a describir en mayor detalle la implicación funcional del NI en el circuito de control de la oscilación theta hipocámpica. Paralelamente, el estudio anatómico consistió en verificar la existencia de una ruta desde el origen pontino de la oscilación theta hasta el *marcapasos* septal de la misma a través del NI, dado que los resultados electrofisiológicos apuntaban en esa dirección a pesar de que la bibliografía anatómica disponible hasta la fecha no lo respaldaba. A continuación se exponen en distintos capítulos cada uno de estos bloques de la investigación.

En primer lugar, se intentó demostrar que la actividad neuronal del NI estaba ligada a la generación de ritmo theta en el hipocampo, analizando el comportamiento de la red implicada. Para abordar este estudio se escogió adoptar técnicas de electrofisiología, que incluyen registros de actividad de campo y de actividad neuronal unitaria, y manipulaciones sobre el sistema, bien mediante estimulación o lesión eléctrica bien por medio de intervención farmacológica, cuyos fundamentos son explicados en el capítulo correspondiente a la metodología.

Con la finalidad de analizar si los resultados observados en el animal anestesiado eran reproducibles durante la aparición de ritmo theta durante la exploración activa y durante el sueño REM, se analizó también la actividad del NI, tanto unitaria como de campo, durante el ciclo de sueño y vigilia, en animales no anestesiados. Los experimentos orientados a describir la actividad de NI tanto en anestesia como rata no anestesiada se describen en el primer capítulo de resultados.

Por otra parte, dado que los resultados observados sugerían la participación de NI en un circuito anatómico no descrito en la literatura, una parte fundamental de nuestro trabajo consistió en verificar la existencia de una ruta pontoseptal a través del NI. Para ello, se analizó la existencia en el NI de las conexiones neuronales necesarias para constituir un nodo relevante entre el substrato reticular pontino, zona clave en la generación de la ritmicidad, y el complejo considerado como marcapasos de la oscilación theta. Para alcanzar este objetivo, el método elegido fue el trazado de conexiones mediante el uso de trazadores fluorescentes complementado con inmunohistoquímica. Más adelante en este capítulo se detallarán los métodos empleados para la realización de dobles inyecciones, en las estructuras mencionadas. Se describirá en detalle también la metodología utilizada en el estudio de las proyecciones de la región reticular del puente. Los resultados de estos experimentos se exponen en un segundo capítulo.

El estudio que presentamos se desarrolló en distintas fases, en las que se intercaló el estudio anatómico con el electrofisiológico. El orden seguido en la descripción de la metodología utilizada no se corresponde con dichas fases, sino que hemos adoptado el criterio de detallar separadamente el estudio anatómico del electrofisiológico por considerarlo más coherente en su estructura interna pese a no serlo con el orden natural de la investigación.

Los experimentos de electrofisiología comenzaron a realizarse durante varias estancias en el Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia de la Universidad Autónoma de Madrid, gracias a la colaboración y guía del Prof. Ángel Núñez Molina, quien puso a nuestra disposición el equipamiento y la planificación necesarios para alcanzar los objetivos que nos habíamos propuesto. Los estudios de sincronización de actividad de campo en NI e hipocampo en ratas anestesiadas se realizaron en el Departamento de Anatomía y Embriología Humana gracias a la colaboración con los Profs. Juan Guerrero y Manuel Mompeán, del Grupo de Procesado de Señales de la Universitat de València (GPDS). El estudio de trazado de conexiones e inmunohistoquímica fue realizado en el Departamento de Anatomía y Embriología Humana.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD NEURONAL Y DE CAMPO

3.1.1 Fundamentos teóricos

Bioelectricidad: origen del flujo de corrientes extracelulares

Las propiedades eléctricas de una célula derivan principalmente de las de su membrana. La naturaleza aislante de la membrana permite que se establezca entre el interior celular y el medio extracelular una diferencia de potencial eléctrico o voltaje (V , ΔV , medido en voltios) que condicionará el tránsito iónico a su través. La composición iónica del interior celular, mayor en iones K^+ y menor en Na^+ , le confiere a la membrana un potencial de reposo de aproximadamente -70 mV respecto del exterior celular, considerada ésta cero por convención.

La llegada al terminal postsináptico de una señal neuroquímica excitatoria desencadena un incremento en el potencial de membrana (*excitatory postsynaptic potential*, EPSP). En el caso de sinapsis inhibitorias, se produce un flujo de iones Cl^- o de K^+ , que incrementa la electronegatividad intracelular, alejando el umbral de excitación (*inhibitory postsynaptic potential*, IPSP). En conjunto y atendiendo a la ley del *todo-o-nada* (Figura 3.1), si el efecto neto de la actividad sináptica de la neurona de estudio permite que la despolarización de la membrana postsináptica supere su umbral de excitación, se produce la apertura de canales de Na^+ . Esta apertura condiciona la rápida entrada de estos iones a favor de gradiente y el incremento rápido de potencial, generando un potencial de acción o espiga (*spike*).

Esta entrada de cationes provoca a su vez la despolarización de la membrana. Como consecuencia, se produce la apertura de canales de K^+ , iniciándose la salida de cationes al medio extracelular. Llegado a un potencial máximo de aproximadamente $+40$ mV respecto del exterior, los canales de Na^+ se hacen refractarios y cesa su entrada, continuando la salida de K^+ . En conjunto, esto implica la repolarización de la membrana y la vuelta de los canales a sus configuraciones de reposo. En esas condiciones se alcanza el periodo refractario de la célula por una excesiva hiperpolarización. Finalmente, la membrana retorna al estado de reposo eléctrico con restablecimiento de las concentraciones intracelulares de equilibrio.

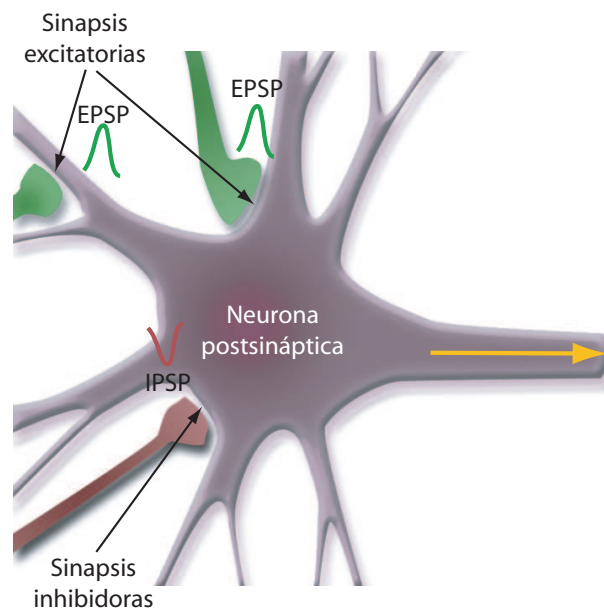


Figura 3.1: Contribuciones excitatorias e inhibitorias a la generación de un potencial de acción. Si, en conjunto, el potencial que alcanza la membrana supera el potencial umbral, se inicia un potencial de acción que se desplazará a través del axón.

El flujo de cargas y la despolarización e hiperpolarización de la membrana va transmitiéndose, provocando los mismos cambios conformacionales descritos en los canales iónicos. El periodo refractario evita que la propagación del potencial se produzca en sentido contrario.

Detección de la actividad bioeléctrica

Las corrientes generadas por las neuronas atraviesan el espacio extracelular y pueden ser detectadas mediante electrodos ubicados en las cercanías: de superficie, extracelulares o intracelulares, acoplados a un sistema de registro. Los sistemas de registro electrofisiológico permiten la detección de potenciales y de corriente. Habitualmente, las intensidades registradas se encuentran en el orden de los microamperios (mA).

En el caso de registro de potenciales de campo, extracelulares, en una determinada localización (*local field potentials*), la información obtenida refleja la concentración de cargas en el espacio extracelular y, por tanto, la suma lineal de las corrientes que salen desde el espacio intra al extracelular (picos en la oscilación, *sources*) o su entrada desde el exterior al interior celular (valles, *sinks*) de múltiples neuronas.

La actividad registrada en estos casos desde el espacio extracelular se corresponde con el flujo de iones inverso al que se produce en un potencial de acción y resultado del sumatorio en el tiempo de la actividad de toda la población neuronal registrada. En estos casos, el electrodo recoge información de múltiples células cercanas. Su activación simultánea o cercana en el tiempo genera una acumulación de cargas procedentes de sus respectivos potenciales de acción que sí es detectable, denominadas espigas poblacionales (Andersen et al., 1966).

Sin embargo, las propiedades capacitivas del medio extracelular hacen que esta señal sea filtrada y significativamente disminuida en amplitud conforme aumenta la distancia entre el lugar de registro y la membrana celular. De esta manera, la contribución individual de los potenciales de acción individuales a un EEG registrado mediante un electrodo de gran tamaño es muy pequeña (Nádasdy, 1998). Además de las espigas, existen procesos más lentos procedentes de las contribuciones sinápticas, EPSP e IPSP, que forman parte de los potenciales locales de campo.

Las cargas detectadas por el electrodo han de atravesar las membranas, el tejido extracelular, y finalmente el propio electrodo. Se forma así un circuito completo constituido por conductores y resistencias y que en conjunto presenta un elevado nivel de impedancia (oposición al paso de los electrones). Así, la intensidad de la corriente que circula por el circuito viene determinada por la diferencia de potencial que la genera y por la resistencia total del sistema (R, medida en Ohms), de acuerdo con la Ley de Ohm.

La impedancia de un electrodo depende de su superficie activa. En el caso de que el electrodo sea lo suficientemente pequeño y presente una impedancia adecuada, el flujo de corriente puede referirse a una única o pocas células, lo que permite caracterizarlas independientemente si se ubica el electrodo lo sufi-

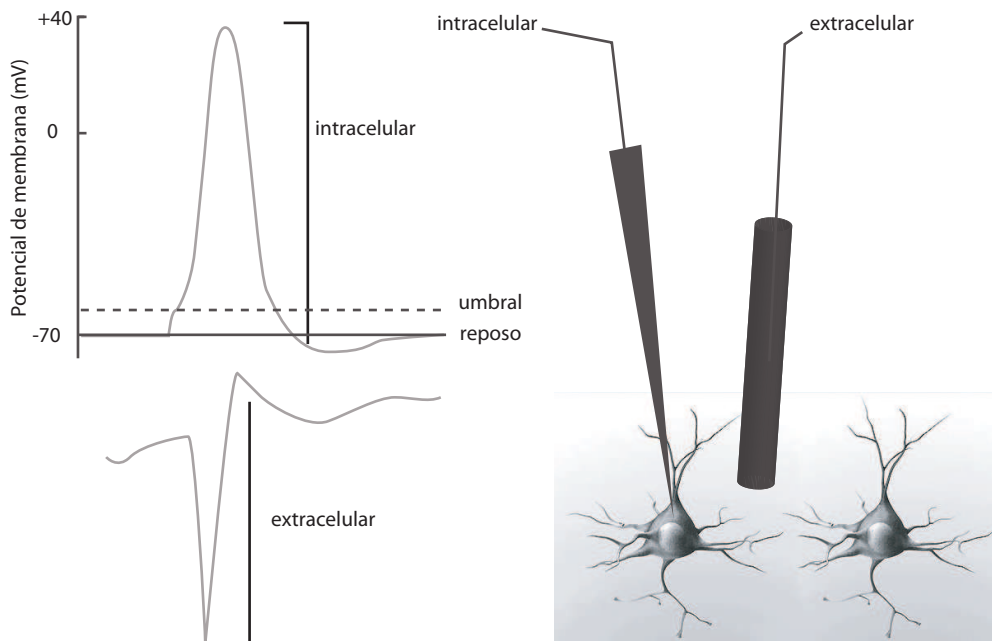


Figura 3.2: Potenciales intra y extracelulares

cientemente cerca, constituyendo en este caso un registro unitario extracelular (ver Figura 3.2).

En la Figura 3.2 se representa la relación entre los potenciales de acción registrados desde el interior celular y los extracelulares, así como las espigas poblacionales.

Código neuronal. Análisis de la actividad neuronal unitaria

La información neuronal se codifica en patrones espacio-temporales (Swadlow y Waxman, 1975). La cuestión de la codificación neuronal es uno de los retos fundamentales de la neurociencia. La actividad eléctrica permite dicha codificación mediante diferentes esquemas temporales y de frecuencia de disparo. Su estudio puede aportar mucha información sobre los circuitos neuronales y su funcionalidad, especialmente si se ven complementados con análisis de sus conexiones, morfología o neuroquímica de las neuronas implicadas en el circuito.

Código neuronal: tiempo y frecuencia

Habitualmente, la actividad eléctrica se distribuye en sucesiones de disparos neuronales o trenes de espigas. Dado que los potenciales de acción en un tren suelen ser discriminables unos de otros por estar separados en el tiempo, pueden

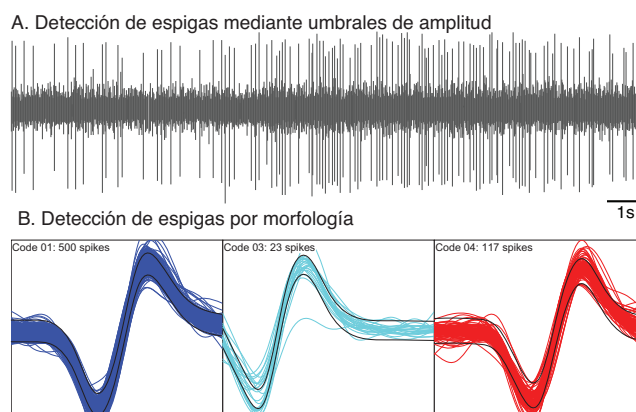


Figura 3.3: Procedimientos de selección de espigas (capturas de pantalla de Spike2) mediante (A.) umbrales de amplitud y (B.) selección mediante morfología de la espiga.

ser descritos como series de eventos puntuales del tipo *todo-o-nada* organizados en el tiempo (Gerstner, 2002).

Ya en la década de los 60 se postuló que la información podría ser transmitida entre poblaciones neuronales en forma de espigas sencillas o patrones temporales de disparo (Perkel y Bullock, 1968). Los métodos utilizados para la caracterización neuronal han sido frecuentemente orientados a elucidar dichos mecanismos de transmisión de información.

Existen distintas teorías acerca de cómo se transmite la información en los disparos neuronales. Ésta podría estar contenida en la latencia de disparo frente a un evento (Hopfield, 1995), la repetición de secuencias específicas de disparos (Lestienne, 1996), el disparo sincrónico de distintas poblaciones (Singer, 1993), diferencias de fase entre neuronas individuales o poblaciones durante periodos de disparo oscilatorio (König y Engel, 1995) o en la alteración de dichas fases respecto de la actividad oscilatoria a la que están vinculadas (Dragoi y Buzsaki, 2006).

Identificación de espigas

El uso de microelectrodos extracelulares permite el registro de neuronas individuales, aislándolas de las señales de neuronas más alejadas. La identificación de los potenciales como generados por una u otra neurona puede realizarse en base a diferentes criterios: atendiendo a la amplitud de la señal o a la morfología de la espiga (Figura 3.3). En nuestro caso, la selección de espigas se realizó atendiendo al primer criterio.

- I. Umbrales de amplitud (ver Figura 3.3, A) Dado que los potenciales de acción se encuentran en unos márgenes de voltaje muy estrechos, podemos asumir que todas las neuronas que se encuentren en las cercanías del

electrodo dispararán, si lo hacen, en forma de potenciales de aproximadamente igual amplitud. La impedancia del medio extracelular provoca que los potenciales, al atravesar dicho medio, resulten rápidamente atenuados. En consecuencia, los potenciales registrados por electrodo serán de mayor amplitud cuanto mayor sea la cercanía a la neurona generadora. De esta manera, si el electrodo se sitúa lo suficientemente cerca de una célula y lejos, a la vez, de otras neuronas cercanas, el registro puede permitir la discriminación de la señal de la neurona más cercana, o al menos de pocas de ellas, respecto del fondo.

- II. Morfología del potencial de acción (ver Figura 3.3, B). En el caso de registros uni-extracelulares, la forma de los potenciales registrados depende también de la zona en que se esté registrando, mostrando una morfología diferente en función de la región de la neurona cercana al registro. Pese a que las propiedades eléctricas del axón favorecen la propagación de los potenciales de acción generados, la excitabilidad de las membranas en la arborización dendrítica permite que, además, exista cierta propagación en dicho compartimento, en las distintas direcciones de la estructura tridimensional de la neurona (Huguenard et al., 1989). En la forma del potencial unitario registrado influirán además de la morfología dendrítica (Li et al., 1992), las propiedades capacitivas de la membrana celular (que afectan al umbral de excitación y a la latencia) (Buzsàki y Eidelberg, 1981) y el potencial de membrana de partida de la célula, afectado por efectos puntuales.

La señal aislada puede ser convertida digitalmente en un evento puntual del tipo *todo-o-nada*, o en varios eventos si es posible separar varios potenciales claramente diferenciables como de neuronas distintas y, de esa manera, obtener un registro de eventos correspondientes a descargas individuales.

Potenciales evocados ortodrómicos y antidrómicos

Un método habitual para la detección de actividad es el registro de potenciales evocados, garantizando el disparo neuronal mediante una estimulación conocida o normalizada, bien sensorial o bien de algún punto de la vía de estudio.

La localización del electrodo determina que la estimulación se produzca sobre un soma o sobre el axón. Si la estimulación se produce en un soma, puede desencadenar potenciales de acción que se transmiten en el sentido normal de la propagación, a través del axón hasta las siguientes neuronas de la vía, lo que recibe el nombre de potenciales evocados ortodrómicos (ver Figura 3.4).

Si la estimulación eléctrica, por el contrario, se produce en un axón, se generan dos potenciales de acción, uno en sentido ortodrómico, que se transmite a lo largo del propio axón en dirección al extremo terminal y otro en dirección al soma, donde es registrable como potencial antidrómico.

Para discriminar si la respuesta evocada es ortodrómica o antidrómica se han desarrollado distintos criterios que, si bien no son definitivos por si mismos,

la correcta utilización de varios de ellos simultáneamente sí puede ser indicativa de la dirección de la activación. Para considerar que un potencial de acción ha sido generado antidrómicamente, han de verificarse siguientes criterios representados en la Figura 3.4 (Boulton et al., 1990):

- I. Ausencia de *EPSP's* previos a la espiga generada por el estímulo, en un registro intracelular
- II. Latencia aproximadamente constante a la intensidad umbral de estimulación
- III. Ausencia de una reducción marcada en la latencia a 2-3x veces la intensidad umbral de estimulación, ni aparición de múltiples espigas
- IV. Capacidad de responder a estímulos a velocidad de repetición elevada
- V. Colisión entre espigas espontáneas y evocadas por la estimulación

El primero de los criterios mencionados se refiere exclusivamente a registros intracelulares, por lo que en el caso que nos ocupa únicamente los siguientes son válidos.

Pruebas de latencia entre estimulación y disparo

La estimulación antidrómica a intensidad umbral de activación en un punto del axón provoca descargas de potenciales evocados muy constantes, dado que son independientes de los mecanismos fisiológicos de generación de los potenciales de acción y son la respuesta directa de la aplicación de una corriente a través de la membrana. Esto condiciona que la latencia a la que se puede detectar un potencial producido por la estimulación depende casi exclusivamente de la velocidad del axón, con las ligeras desviaciones que son inherentes a cualquier proceso que tiene lugar en un sistema biológico.

La determinación del tiempo en que la respuesta es detectada, en relación con la distancia de la vía y su velocidad de conducción ((100-120 m/s a 1 m/s, dependiendo del diámetro y la mielinización), permite conocer el número de nodos atravesados por la corriente aplicada.

En este caso, el potencial de membrana no es constante en todo momento, así como no lo es el umbral de excitación, sino que se mantienen en un estrecho rango. En el caso de estimulación antidrómica a intensidad umbral, la variación típica en la latencia es menor al 20 % de la duración de la espiga.

En el caso de potenciales evocados de forma ortodrómica, están sometidos a las reglas que rigen la comunicación neuronal y, por tanto, influidos por los procesos implicados, como la liberación de neurotransmisores y neuromoduladores o la interacción con otras respuestas postsinápticas, entre otros factores. En conjunto, estos procesos afectan a la latencia de la respuesta y a su constancia. La relevancia de estos factores se incrementa cuando existen varias sinapsis entre el punto de estimulación y el de registro.

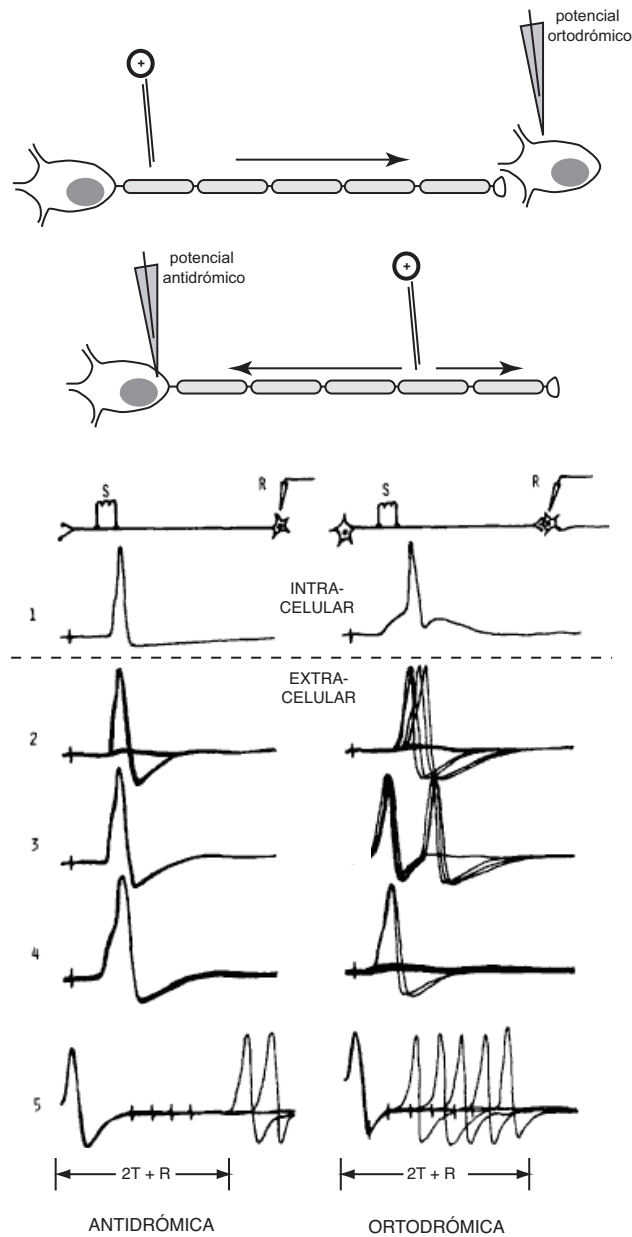


Figura 3.4: Potenciales ortodrómicos y antidrómicos. A. Los potenciales ortodrómicos se transmiten en sentido normal; los potenciales antidrómicos son originados en el axón y se transmiten hacia el propio soma. B. Criterios de clasificación (tomado de (Boulton et al., 1990)). 1. EPSPs previos a la espiga generada por el estímulo, en un registro intracelular. 2. Latencia de disparo a la intensidad umbral de estimulación. 3. Latencia a 2-3x veces la intensidad umbral de estimulación y aparición de múltiples espigas. 4. Respuesta a estímulos a velocidad de repetición elevada. 5. Prueba de colisión.

También en relación con la latencia, cabe señalar que en el caso de potenciales antidrómicos, el incremento de la intensidad de estimulación hasta el doble o triple del umbral provoca una muy ligera reducción en la latencia del potencial evocado (del orden de fracciones de milisegundo), mientras que en el caso de potenciales evocados de manera ortodrómica, esta reducción en la latencia es mucho mayor (del orden de varios milisegundos), de forma que la neurona registrada puede responder al incremento de intensidad de estimulación con varias descargas consecutivas

Prueba de respuesta a estímulos repetidos a alta velocidad o de seguimiento de la frecuencia

El tercer criterio para considerar una respuesta evocada como antidrómica consiste en la fiabilidad de su respuesta a altas frecuencias de estimulación (trenes de 100-300 pulsos/s). La activación antidrómica típicamente provocará respuestas a cada pulso, mientras que la estimulación ortodrómica, sometida una vez más a las leyes de la comunicación sináptica, generalmente responderá bien al primer pulso pero su respuesta ante los siguientes será intermitente.

Existen excepciones a las reglas expuestas, como es el caso de las respuestas antidrómicas en circuitos inhibitorios recurrentes.

Prueba de colisión.

Este criterio es el más ampliamente utilizado por considerarse el más fiable de manera individual (Boulton et al., 1990). Consiste en la colisión de potenciales espontáneos (o provocada por estimulación no eléctrica) con potenciales evocados antidrómicos que resulta en su extinción cuando éstos se producen en un intervalo de tiempo adecuado (Darian-Smith et al., 1963).

Se considera que una neurona se activa antidrómicamente si, durante un periodo tras la descarga espontánea, la estimulación no es capaz de provocar un nuevo disparo de la neurona registrada. Sin embargo, si la activación es ortodrómica, cada estimulación provocará una nueva descarga en la célula registrada. Esto sucede porque, en neuronas activadas en sentido antidrómico, la estimulación produce un potencial de axón que viaja por el axón en dirección al soma y puede colisionar con el potencial de acción que se hubiera producido de manera espontánea en el soma y en dirección al axón. Ninguno de los dos potenciales puede propagarse dado que a ambos lados del punto de colisión, la membrana del axón se encuentra en periodo refractario (Sommer y Wurtz, 1998).

El intervalo mínimo que ha de existir entre una descarga espontánea y un estímulo antidrómico eficaz es el tiempo que tarda el potencial espontáneo en desplazarse desde su origen hasta el terminal del axón (L) y en iniciarse en el terminal y llegar hasta el soma tras el periodo refractario (R) (Darian-Smith et al., 1963). Asumiendo que la velocidad de conducción es igual para potenciales ortodrómicos y antidrómicos, este intervalo mínimo será

$$I_m = 2L + R$$

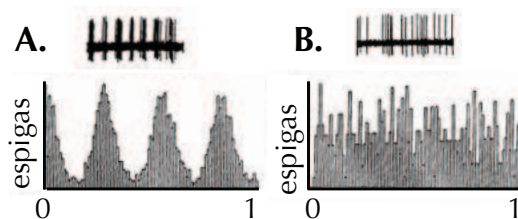


Figura 3.5: Histograma de autocorrelación. A. Neurona rítmica. Muestra picos de actividad a intervalos regulares. B. Neurona no rítmica. Ambas imágenes adaptadas de (Bland y Oddie, 1998)

Análisis de correlación de actividad neuronal: histogramas de autocorrelación y correlogramas cruzados

En la caracterización de neuronas, uno de los aspectos que puede resultar más interesante es el patrón de disparo que presentan de manera espontánea, así como analizar si este patrón cambia en distintas condiciones de estimulación.

El patrón de disparo de una neurona representa sus descargas a lo largo del tiempo. Una vez clasificadas las espigas detectadas en un registro unitario como eventos asignables al disparo de una misma neurona, mediante uno de los métodos descritos, se puede proceder a su análisis en el tiempo. El método elegido para este estudio es la representación de histogramas de autocorrelación o autocorrelogramas (ACH).

El análisis de correlación de eventos permite ubicar eventos -el disparo de la misma neurona en los autocorrelogramas - en el eje temporal, tomando otro evento como referencia. En este caso nos centraremos únicamente en los autocorrelogramas.

En la serie de eventos indicativos de una descarga neuronal, cada uno de ellos actúa como eje de coordenadas para el barrido en el tiempo del resto de eventos de la serie. El resultado que se representa es el promedio de la distribución en el tiempo de los disparos respecto a un disparo dado. De esta manera, si una neurona tiene un patrón de descarga rítmico, el intervalo entre disparos será constante (ver Figura 3.5). Por tanto, el primer barrido del análisis localizará a tiempos regulares disparos que sigan al primero, tomado éste como referencia. A continuación, tomando el segundo disparo como referencia, se ubicarán los restantes. En conjunto, el autocorrelograma mostrará picos de actividad a tiempos concretos, correspondientes a los momentos de mayor frecuencia de disparo tras el de referencia.

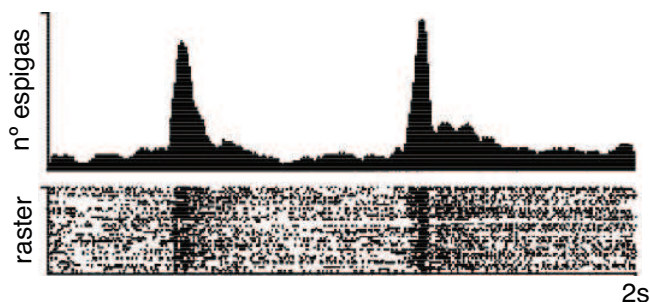


Figura 3.6: Representación de la relación entre un estímulo y el disparo neuronal mediante PSTH. A. Ejemplo de PSTH, con cuantificación de espigas a lo largo del tiempo y representación correspondiente en distribución de puntos, adaptada de (Funke y Eysel, 1998)

Análisis de la correlación con un evento externo: histograma de tiempo periéstímulo

Con el objeto de analizar la influencia de un núcleo neuronal sobre otro, es frecuente la aplicación de estímulos eléctricos en el primero durante un registro neuronal unitario en el segundo, o la aplicación de estímulos sensoriales.

Uno de los métodos más empleados para averiguar si la estimulación tiene efecto sobre el patrón de disparo de las neuronas registradas es el histograma de tiempo periéstímulo (*peristimulus time histogram*, PSTH) o postestímulo si no se consideran tiempos negativos.

Este método de análisis es similar al descrito para los histogramas de correlación, tomando en este caso como evento de referencia para el barrido, el estímulo. Permite así distribuir las espigas registradas en relación al momento del estímulo, promediándolo.

De acuerdo a este análisis, la distribución cercana en el tiempo a continuación del estímulo indicará que la estimulación es efectiva para inducir el disparo de las neuronas registradas. Sin embargo, una distribución aleatoria en el tiempo será indicativa de una ausencia de efecto de la estimulación (ver Figura 3.6).

Registro de actividad de campo

El EEG es una representación de la actividad eléctrica cerebral a lo largo del tiempo. La medida de potenciales de campo constituye una valiosa herramienta para conocer con una alta resolución temporal la cooperatividad espacio-temporal de estructuras interconectadas. Sin embargo, si los mecanismos neuronales subyacentes no se conocen, el análisis de la actividad de campo únicamente proporciona un correlato bastante grosero de la actividad cerebral, sin ser capaz por sí mismo de proporcionar información acerca de las alteraciones anatómicas o funcionales específicas (Nádasdy, 1998).

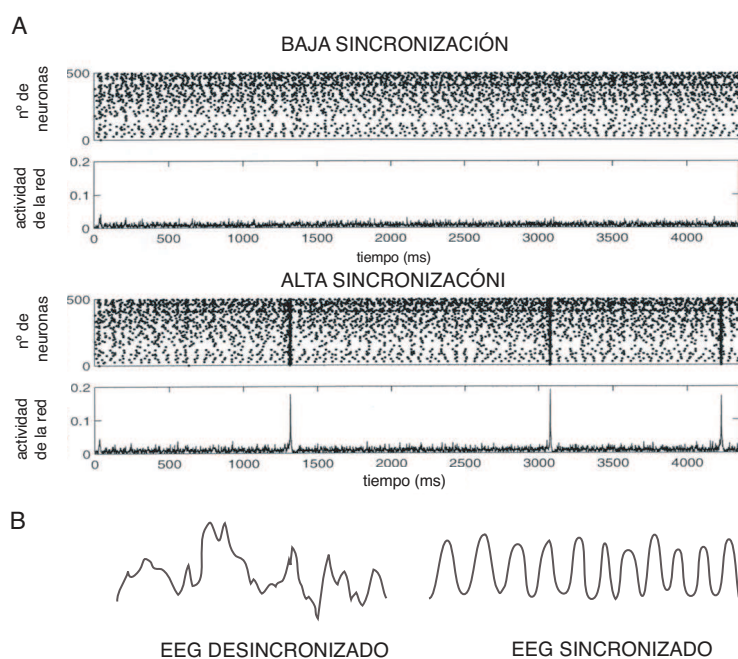


Figura 3.7: Representación de actividad neuronal sincronizada y desincronizada. A. Puntos: espigas registradas; la actividad de la red representa el sumatorio de la actividad eléctrica de las neuronas que se disparan individualmente en un instante de tiempo dado. Si la actividad neuronal está poco sincronizada, la actividad de la red es irregular. En cambio, si las neuronas se sincronizan en sus disparos, en los instantes de máxima sincronización, la red refleja una actividad elevada. B. Representación de EEG desincronizado y sincronizado. En el segundo caso, la oscilación presenta un aspecto sinusoidal, con picos y valles claramente diferenciados que se corresponden con el flujo sincronizado de iones entre el interior y el exterior celular.

No obstante, sí resulta muy interesante la medición de potenciales de campo en el caso en que exista la posibilidad de relacionarlos con la actividad intrínseca de neuronas individuales y de su integración en un circuito, por ejemplo cuando lo que se busca averiguar es la implicación de neuronas en procesos cooperativos como son las oscilaciones a frecuencia theta o gamma en el hipocampo.

Sincronización de la actividad oscilatoria

Si la acción de las neuronas vecinas registradas está sincronizada, los flujos iónicos se producen en el mismo sentido y en una ventana temporal estrecha. Esto provoca que el conjunto de la actividad registrada en el EEG presente una actividad oscilatoria aproximadamente sinusoidal, en la que los mínimos se corresponden con la despolarización y los máximos, con la hiperpolarización neuronal. La actividad sincrónica de las neuronas y su correlato en el EEG se

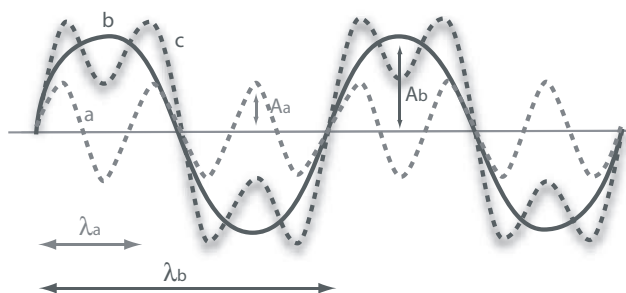


Figura 3.8: Superposición de ondas. Atendiendo al criterio de Fourier, la señal del EEG (ejemplificada en c) está compuesta por ondas sinusoidales (a y b) de diferentes frecuencias ($1/\lambda$) y amplitudes (A).

encuentra representada en la Figura 3.7. Además de ser originada por disparos rítmicos, la ritmicidad observada en la actividad local de campo puede también deberse a la llegada de un *input* rítmico al área registrada.

Transformada rápida de Fourier y espectros de potencia

La señal representada por la onda del EEG es una serie temporal, compuesta por señales de diferentes frecuencias y amplitudes. Para cada instante muestreado, la señal presenta una composición de ondas de diferentes frecuencias y amplitudes, generando una serie de datos continuos.

El análisis del EEG mediante la transformada rápida de Fourier (*fast Fourier transform*, FFT) es uno de los más ampliamente empleados para la descomposición del espectro en sus diferentes componentes, permitiendo cuantificar así las componentes de distintas frecuencias de la oscilación global. Aplicada a la interpretación de señales, la FFT transforma una señal del dominio de tiempo en el dominio de la frecuencia.

Este algoritmo se basa en el teorema de Joseph Fourier, según el cual, una serie temporal puede ser considerada como la suma de un conjunto de ondas sinusoidales (ver Figura 3.8).

La ventaja del algoritmo FFT es que permite la resolución, reduciendo el tiempo de cálculo, que puede realizarse en tiempo real, de manera prácticamente simultánea a la adquisición de la señal. La principal desventaja radica precisamente en que la selección de segmentos para el análisis es subjetiva, dado que se seleccionan manualmente los rangos de frecuencias de interés.

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, habitualmente, el módulo al cuadrado del voltaje asignado a cada banda de frecuencia. En la Figura 3.9 se muestra un ejemplo de esta descomposición.

Una consideración importante es que la frecuencia de muestreo de la señal determinará las frecuencias que puedan representarse en el espectro, condicio-

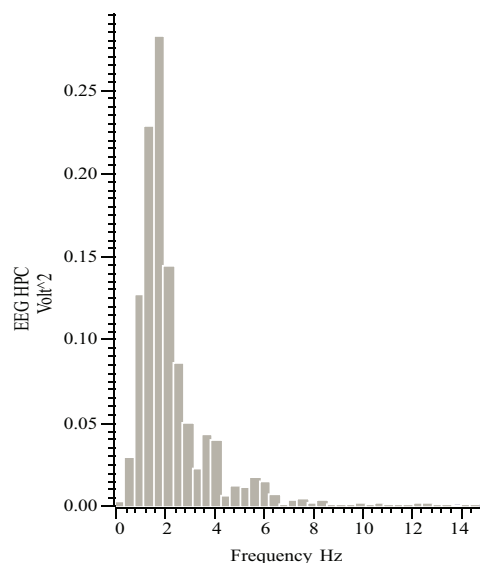


Figura 3.9: Espectro de potencia de una señal EEG calculado mediante FFT. A. Señal EEG original, muestreada a 500 Hz. B. Espectro de potencia calculado con FFT de tamaño 256. Se analizan las potencias desde 0 a 250 Hz con una resolución de 0.3898 Hz.

nando la frecuencia de Nyquist. Ésta es la mitad de la frecuencia a la que se está muestreando y es la frecuencia máxima que podrá ser representada en el espectro. En el caso del EEG del animal anestesiado, si nos interesan frecuencias entre 0.5 y 30 Hz, la frecuencia mínima a la que deberá realizarse el muestreo será de 60 Hz.

Análisis de tiempo-frecuencia

La FFT permite descomponer una oscilación en sus componentes de distintas frecuencias para un tiempo dado. Sin embargo, no permite conocer la evolución temporal de un EEG. Para obtener esta información, en este estudio se ha recurrido, por una parte, al estudio de la frecuencia media y frecuencia dominante a lo largo del tiempo del registro. Ambos parámetros hacen referencia a las frecuencias que predominan en el espectro de una señal (Figura 3.10). Se ha analizado también la densidad de energía espectral y la energía espectral de bandas concretas de frecuencias dadas a lo largo del tiempo. Mediante estos parámetros puede observarse la energía de una onda a frecuencias concretas a lo largo del tiempo, o en un rango de frecuencias. (ilustrado en las Figuras 4.10 y 4.11).

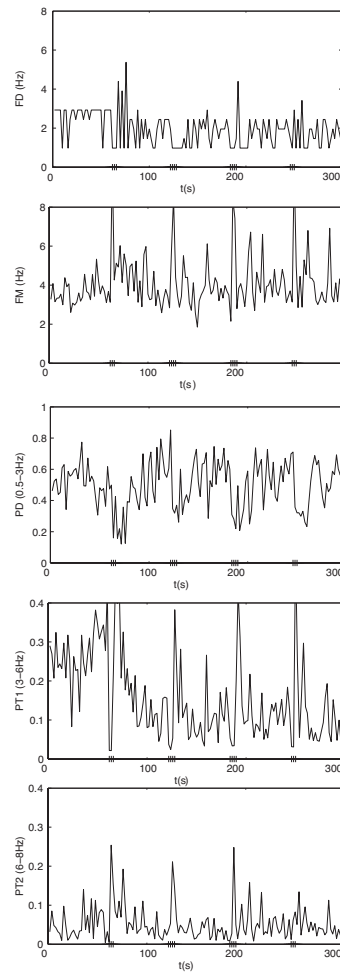


Figura 3.10: Ejemplos de análisis de tiempo frecuencia. Representación de la frecuencia dominante, frecuencia media y potencia en las bandas 0.5-3, 3-6 y 6-8 Hz a lo largo del tiempo.

Análisis de la coherencia espectral

En el presente trabajo se ha estudiado un circuito neuronal capaz de originar una actividad sincrónica en varios de sus componentes. Una parte de este estudio se ha centrado en analizar la relación entre la actividad de campo en distintos nodos del circuito (hipocampo-NI).

Para analizar la semejanza entre las señales procedentes de ambas estructuras, se ha empleado el estudio de la coherencia espectral. La coherencia describe la correlación entre distintas ondas respecto a sus valores de frecuencia en una unidad de tiempo. Este parámetro mide la relación entre las fases relativas de dos ondas. Se considera que dos ondas son coherentes si tienen una fase relativa constante. En el caso de ser idénticas, el valor de la coherencia sería igual a 1. Esta coherencia se mide por la función de correlación cruzada, que cuantifica la capacidad de predecir el valor de la segunda onda a partir del valor de la primera.

A diferencia de la correlación cruzada, que proporciona información para un intervalo de tiempo dado, este método permite el análisis continuo a lo largo del tiempo. Puede analizarse, de esta manera, la evolución de la coherencia entre las bandas de frecuencias de interés y la influencia de la manipulación del sistema sobre la sincronización de dos oscilaciones a frecuencias determinadas.

3.1.2 Procedimientos experimentales generales

Animales de experimentación

En los experimentos realizados en la Universidad Autónoma de Madrid se utilizaron ratas Wistar de 200-250 g (de Iffa-Credo, Francia). Para los experimentos realizados en la Universitat de València se emplearon ratas adultas Sprague-Dawley (Blackthorn, Bicester, Inglaterra) de ambos sexos, de entre 200 y 275 g de peso.

En ambos casos, los animales fueron estabulados en el animalario de la facultad correspondiente hasta la fecha de experimentación. Debido a la toxicidad crónica del anestésico utilizado para el registro electrofisiológico, para evitar sufrimiento injustificado de los animales, tras los registros en experimentos agudos, los animales fueron sacrificados inmediatamente tras finalizar la sesión de registro. En el caso de los registros crónicos y en el trazado de conexiones los animales fueron mantenidos durante una semana.

En todo caso se cumplieron las normas para la buena práctica con animales de experimentación del Consejo Europeo (86/609/EEC) y el Real Decreto 1201/2005, con la autorización del Comité de Ética de la Universitat de València. Se procuró, para ello, minimizar el número de animales empleados para cada experimento y su sufrimiento innecesario, controlando en todo momento las condiciones de anestesia, analgesia y cuidado general de los animales. Durante el tiempo que permanecieron en el laboratorio, los animales de experimentación fueron estabulados en un animalario con condiciones de temperatura controlada y ciclos de luz de 12 horas y recibieron agua y alimento *ad libitum*.

Cirugía

La anestesia empleada dependió del tipo de experimento a realizar y se encuentra detallada en cada uno de los apartados correspondientes.

Tras comprobar la pérdida completa de reflejo pupilar, se procedió al rasurado de la cabeza del animal y a su fijación en un cuadro estereotáxico (SR-6R, Narishige, Japón).

Para ello, se situó la barra de los oídos en el interior del conducto auditivo externo, de forma que la cabeza pudiese bascular en el eje de las barras. A continuación, se sujetaron los incisivos superiores adecuando la separación y la altura.

Tras desinfectar la superficie de la piel de la cabeza con povidona yodada (Betadine), se realizó una incisión medial longitudinal de aproximadamente 1.5 cm, con un bisturí, procurando no cortar musculatura de la nuca. Se retiró el periostio hacia los lados utilizando una espátula y se mantuvo apartada la piel para despejar el área durante toda la operación mediante retractores.

Se localizaron las coordenadas de bregma y lambda, modificando la altura y posición de la pieza de los incisivos hasta que ambos puntos de referencia se encontraran situados a la misma altura, para asegurar la posición horizontal de la parte superior del cráneo, como se indica en la Figura 3.11.

La determinación de las coordenadas para la localización de los puntos de interés se basó en el atlas estereotáxico (Paxinos y Watson, 1986). Dado que las coordenadas teóricas se refieren a cráneos en los que la distancia entre bregma e interaural es de 9 mm y la distancia entre interaural y la barra de los oídos 10 mm, se corrigieron las coordenadas a utilizar en función de las distancias reales en cada ejemplar, con el objetivo de aumentar la precisión de las inyecciones.

A pesar de que esta corrección no sea estrictamente necesaria en núcleos grandes o muy superficiales, la consideramos muy recomendable para núcleos de pequeño tamaño y profundos. Como factor de corrección anteroposterior y lateral, se utilizó la proporción entre la distancia entre bregma y la proyección vertical del punto interaural dividida por la longitud estándar tomada en el atlas para ratas de aproximadamente 290g (9.0 mm). Para la coordenada de profundidad, el factor de corrección utilizado fue la distancia dorsoventral entre la línea interaural y la altura de bregma y lambda, dividido por el estándar del atlas (10.0 mm).

$$f_{AP,L} = \frac{AP_{bregma} - AP_{interaural}}{9,0}$$

$$f_{DV} = \frac{H_{bregma} - H_{interaural}}{10,0}$$

No obstante, las coordenadas que se indican se corresponden con las teóricas sin corrección.

Tras realizar los trépanos, se procedió a retirar meninges para evitar la ruptura de la punta de la micropipeta o el deterioro de los electrodos. En algunos

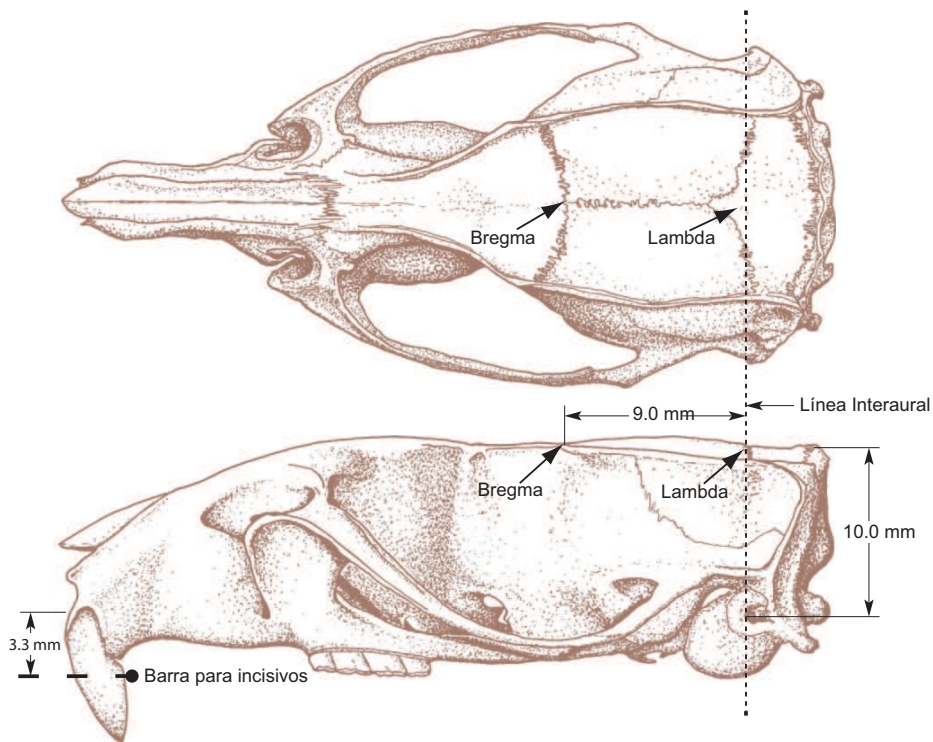


Figura 3.11: Visiones lateral y dorsal del cráneo de ratona de aproximadamente 290 g (adaptada de (Paxinos y Watson, 1986)). En el diagrama se representa la situación de las referencias estereotáxicas bregma, lambda y la línea interaural. Lambda se encuentra 0.3 mm anterior al plano coronal que pasa a través de la línea interaural. Las referencias estereotáxicas están dadas considerando 9 mm como distancia entre bregma y la línea interaural y 10 mm entre el punto medio de la barra de los oídos y la altura de lambda.

Estructura	Antero-posterior	Lateral	Dorso-ventral
CA1	-3.5	+2.5	2.5
SM/DB	+0.5, +1	+0, +0.2	6.2, 7.6 (B); 5.7, 7.1 (S)
RPO	-7.8, 8.8	+1.3	8,9 (B)
NI	-9.5, -9.8	0, +0,1	7.3, 7.8 (B); 5.9, 6.4 (S)

Cuadro 3.1: Coordenadas utilizadas en los experimentos de electrofisiología. B: referencia de profundidad tomada desde la altura de bregma; S: referencia de profundidad tomada desde la superficie

casos, fue necesario controlar hemorragias con gelatina hemostática (Espingotan ©).

Sistema de registro

El sistema consta de varios electrodos de registro y de electrodos de referencia, llevados a áreas indiferentes de corteza motora o a la piel. La señal de cada par de electrodos es conducida a un preamplificador y a un amplificador, en los que es filtrada y amplificada de acuerdo a las necesidades del registro. La señal es después transmitida a un osciloscopio para su visualización y al sistema de adquisición para su conversión analógica-digital.

La información de los registros es almacenada en un ordenador para su procesamiento. En el caso de los registros unitarios, la señal del amplificador se lleva también a un sistema de audio para su detección acústica. Por otra parte, el sistema incluye un estimulador conectado a un sistema de aislamiento de estímulo de voltaje constante y conectado también al sistema de adquisición (ver Figura 3.12).

Tanto los registros como la estimulación eléctrica se realizó mediante electrodos implantados intracranalmente. Como referencia, se empleó la piel del animal o un electrodo indiferente en corteza frontal contralateral.

Electrodos de registro

Para los registros extracelulares de actividad de campo se emplearon macroelectrodos monopares de acero inoxidable recubiertos de teflón de 120 μm de diámetro (World Precision Instruments; Aston, Stevenage, UK). En los registros extracelulares de actividad neuronal unitaria, se utilizaron microelectrodos de tungsteno de 2.0 y de 5.0 MOhm (World Precision Instruments).

Para los registros de NI en animales no anestesiados, se empleó cable trenzado de nichrome/formvar de 0.063 mm de diámetro.

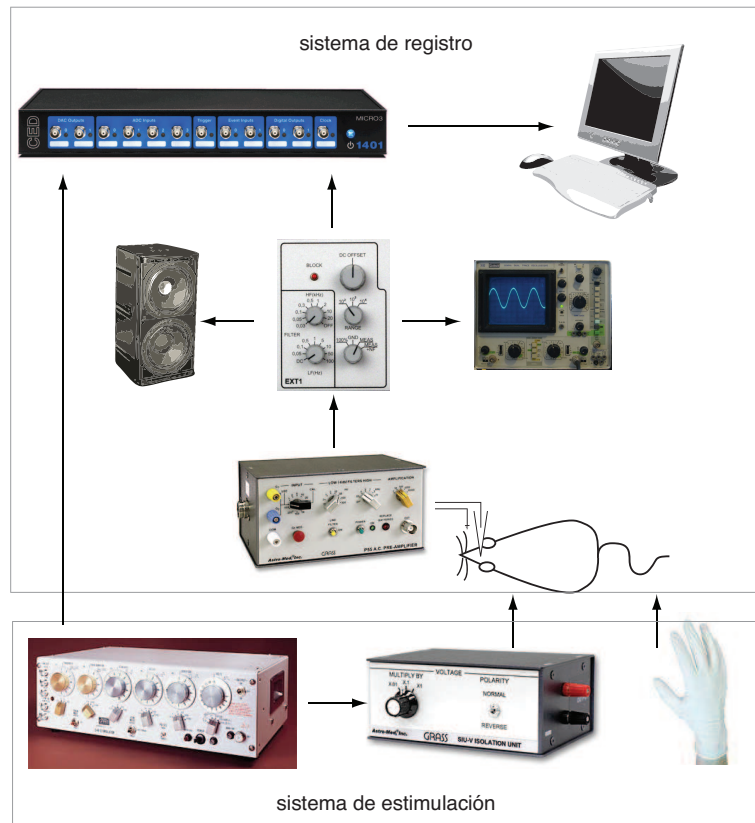


Figura 3.12: Esquema del sistema de registro empleado. Los electrodos son conectados a un preamplificador, distinto según se trate de un macro o microelectrodo. Éste se conecta a un amplificador, a un osciloscopio y a un sistema de audio. La señal amplificada es recogida por dos sistemas de adquisición para su procesado *off-line*

Electrodos de estimulación

Los electrodos de estimulación consistieron en electrodos bipolares trenzados de acero inoxidable sin filo ($120\ \mu\text{m}$ de diámetro), aislados con teflón excepto en sus extremos, con una separación entre las puntas de 1 mm.

Los electrodos fueron insertados conectados al osciloscopio, lo que permite observar los cambios que se van produciendo. La coordenada de profundidad de los electrodos de registro se detalla referida al contacto con la superficie del cerebro. La profundidad exacta de los microelectrodos se obtuvo mediante un micromanipulador, utilizando como guía tanto la actividad neuronal registrada en el osciloscopio como por la señal acústica obtenida acoplado un dispositivo de audio a la salida del amplificador. La ubicación de los electrodos se determinó posteriormente mediante análisis histológico por los métodos Nissl y Giemsa, en secciones de $50\ \mu\text{m}$.

El orden de inserción de electrodos dependió del tipo de experimento a realizar. En todos los casos, el primer electrodo insertado fue el macroelectrodo para registro de actividad de campo en el área CA1 del hipocampo. Finalmente, todo el casquete de electrodos fue asegurado con acrílico dental para evitar su desprendimiento por infiltración de posibles sangrados procedentes de los trépanos o de la musculatura lateral. Los microelectrodos fueron desplazados mediante un micromanipulador y no fueron fijados en ningún caso, para permitir su movimiento y su posterior recuperación.

Registro de EEG hipocámpico

El EEG hipocámpico se registró mediante un macroelectrodo de acero inoxidable aislado con teflón ($120\ \mu\text{m}$ de diámetro) implantado en CA1. El electrodo de tierra fue sujeto a la piel separada en la incisión.

La localización del electrodo se verificó mediante la observación directa en el osciloscopio de los cambios en el EEG provocados por un leve pinchazo en la cola del animal seguida de un primer registro de prueba en el que se empleó la herramienta de análisis de Spike2 *Power Spectrum*. Se calculó el espectro de forma automática y simultánea al registro en ventanas de 10s, actualizado cada 10s y con una resolución de 0.512 Hz. Se consideró adecuada la localización cuando la estimulación táctil fue capaz de provocar una aparición de ondas de al menos 3 Hz en la oscilación y de provocar un aumento perceptible en la banda de frecuencias theta del espectro de potencia hipocámpico.

Filtrado y amplificación

Los electrodos fueron conectados al sistema de registro a través de un preamplificador (P55, Grass Technologies) y un amplificador de cuatro canales (Cibertec), ambos con acoplamiento AC.

Las señales de campo local registradas fueron filtradas en la banda 0.3-30 Hz y amplificadas 1000 veces. Para el registro de actividad unitaria se utilizó

un preamplificador AC (DAM80; World Precision Instruments). La señal fue filtrada entre 0.3-3 KHz y la ganancia en este caso fue de 10000.

Reducción de interferencias en la señal

El principal problema de la captación de señales bioeléctricas reside en sus valores de amplitud y frecuencia. Dado que habitualmente se trata de señales de pequeña amplitud -la amplitud del EEG suele oscilar entre 5 y 300 μV - es frecuente que aparezcan contaminadas de ruido que puede superar incluso a la propia señal.

Una gran fuente de ruido es la corriente alterna de la red (a frecuencia 50 Hz), del sistema o de otros dispositivos electrónicos presentes o cercanos al laboratorio. Para reducirlo, se emplearon varios electrodos de tierra, unidos al cuadro estereotáxico, a la piel del animal y en los casos en que fue necesario, a su cráneo. El aislamiento se incrementó cuando fue preciso mediante la utilización de una jaula de Faraday.

Adquisición de datos

La adquisición de datos en los experimentos de análisis de la oscilación en el NI se realizó a través de una tarjeta acoplada a la placa base de un PC, con entrada para hasta 14 canales, tanto de registro como procedentes del estimulador. Las manipulaciones sensoriales o farmacológicas fueron indicadas manualmente en el programa Neurolab (GPDS).

En los restantes experimentos, se empleó una unidad de adquisición CED micro 1401 (Cambridge Electronic Design, UK) unida mediante conexión USB al PC. En este caso, la señal procedente del estimulador fue enviada a un canal de entrada generador de eventos, con su propio tratamiento en el programa Spike2 (CED). De manera similar a lo descrito para el programa Neurolab, los indicadores de manipulación no eléctrica fueron introducidos manualmente en Spike2.

La frecuencia de muestreo fue de 100-500 Hz para los registros de actividad de campo y de al menos 8 KHz para los registros unitarios.

Análisis histológico

Tras la finalización de los registros, los animales fueron sacrificados con una sobredosis de pentobarbital sódico, perfundidos con suero salino y paraformaldehído. Sus cerebros fueron extraídos y procesado para la verificación histológica de la localización de los electrodos, mediante tinción de Giemsa.

3.1.3 Procedimientos experimentales específicos para los registros bajo anestesia con uretano

El estudio de la influencia de NI como parte de un sistema ascendente de sincronización hipocámpica se realizó en ratas anestesiadas con uretano y en

registros a lo largo del ciclo de sueño/vigilia en ratas con electrodos implantados crónicamente. Para ello se emplearon registros extracelulares de actividad de campo y registros de actividad neuronal unitaria, registrada también en el espacio extracelular.

Sujetos de experimentación

Para los registros unitarios se emplearon 16 ratas de ambos sexos. En los experimentos de inactivación de NI se utilizaron un total de 20 animales (8 para lesión, 6 con inyección de muscimol y 6 controles con inyección de salino). Para el estudio de sincronización de las oscilaciones de NI e hipocampo se emplearon 6 ratas para estimulación eléctrica, 6 para estimulación colinérgica y 7 para estimulación sensorial. Para el estudio de actividad en animales no anestesiados mediante la implantación de electrodos crónicos se emplearon 7 animales.

Anestesia

En el estudio electrofisiológico, se utilizó uretano como agente anestésico dado que, pese a sus efectos adversos, permite una anestesia útil para la cirugía sin interferir en la medida de la actividad eléctrica cerebral (Maggi y Meli, 1986). El uretano actúa como agente disociativo, como la ketamina, a diferencia del efecto de anestésicos generales como el pentobarbital o el isoflurano. Bajo este tipo de anestesia, el animal puede mantener la actividad oscilatoria y sin embargo estar completamente anestesiado.

El control óptimo del grado de anestesia se realiza mediante la verificación del reflejo pupilar. Si la pupila se encuentra contraída y localizada en el centro del ojo, el animal puede considerarse completamente inconsciente y profundamente anestesiado, pese a que pueda responder a estímulos dolorosos. La pupila puede también dilatarse en respuesta a un estímulo luminoso directo, al contrario de lo que sucedería en un animal consciente. En este tipo de anestesia, este control resulta más eficaz que la pérdida de reflejos dolorosos.

Además, durante el transcurso del experimento, el propio registro del EEG permite comprobar la profundidad de la anestesia. Bajo anestesia con uretano, existe alternancia de forma espontánea entre una actividad irregular de gran amplitud y baja frecuencia (ondas delta, de entre 0.5-3 Hz) y una actividad rítmica, aproximadamente sinusoidal, de una frecuencia de entre 3-12Hz (actividad theta). Además de estas dos componentes principales, aparece también en el EEG hipocámpico una contribución minoritaria de frecuencias mayores (12-25 Hz).

A niveles de anestesia ligera (1-1.2 g/kg), predominan en el espectro hipocámpico las ondas delta de forma espontánea, con cortos periodos espontáneos de actividad theta. En estas condiciones, un ligero pinzamiento de la cola del animal (*tail pinch*) induce la aparición de un periodo theta durante la duración del estímulo, lo que ha sido utilizado como modelo de theta inducido por estimulación sensorial (Bland et al., 1994).

Nervio	Punto de bloqueo	Dosis (ml)
N. oftálmico	Sobre cada ojo	0.1
N. zigomático	Entre ojo y oído	0.05
Fibras C2	Múltiples entre ambos oídos	0.2 ml total

Cuadro 3.2: Anestesia local (lidocaína s.c.)

A dosis superiores de anestésico, la actividad hipocámpica está claramente dominada por ondas lentas y la estimulación mediante pinzamiento de la cola no es tan efectiva. No obstante, sí es posible su inducción mediante estimulación eléctrica o química de la formación reticular pontina (Bland et al., 1994). A dosis superiores a 1.5 g/kg, el uretano deprime las funciones respiratoria y cardíaca (Maggi y Meli, 1986) y la mortalidad aumenta hasta un 25%. Por todo ello, las dosis utilizadas en los presentes experimentos fueron de 1.3-1.5 g/kg, 15% en salino, mediante inyección intraperitoneal.

Con el objetivo de obtener un nivel de anestesia ligero evitando infringir sufrimiento innecesario al animal, se empleó anestesia local para bloquear la sensibilidad en el área sometida a cirugía y a presión del aparato estereotáxico. En primer lugar, se administró lidocaína-adrenalina tópica en el oído externo para evitar el dolor por presión de las barras del aparato estereotáxico y sobre la piel en el área de incisión. Tras esperar 10 minutos, se administró lidocaína s.c. en diferentes puntos de bloqueo, en las dosis especificadas en la tabla 3.2. La anestesia local se repitió a lo largo del experimento.

El efecto anestésico tarda aproximadamente 30 minutos en aparecer y abarca toda la duración del experimento, habitualmente entre 5-7 horas. En estas condiciones, el estado del EEG hipocámpico refleja una situación de semiconsciencia, sin que el animal sienta dolor. Este procedimiento es similar al utilizado en craneotomías en humanos. En los casos en que fue necesario aumentar el grado de anestesia se utilizó una sola dosis suplementaria de 0.375 g/kg como máximo.

3.1.4 Descripción de los experimentos bajo anestesia

Experimento 1: estudio del efecto de la estimulación de RPO sobre la actividad unitaria del NI y correlación con la actividad hipocámpica

Dado que estudios previos de nuestro grupo habían demostrado que la estimulación del NI era capaz de provocar la generación de actividad theta en el hipocampo (Nuñez et al., 2006) y que RPO es la estructura del troncoencéfalo considerada la más eficaz generadora de theta en el hipocampo (Vertes, 1981), se planteó el análisis del efecto que la estimulación de RPO tenía sobre la actividad neuronal unitaria en NI y su correlación con la oscilación hipocámpica.

Se realizó registro extracelular de potenciales de acción mediante microelectrodos de tungsteno en NI simultáneamente al registro de la actividad electroencefalográfica en la capa CA1 del hipocampo.

El protocolo experimental consistió en registros continuos que constaban de un primer periodo de 60 s en condiciones espontáneas seguido de dos periodos de igual duración en condiciones de generación de ondas theta hipocámpicas, generadas primero por estimulación táctil y finalmente por estimulación eléctrica de RPO.

Se analizaron las características de frecuencia y ritmicidad de las neuronas del NI y la modificación de su frecuencia de disparo en condiciones de theta hipocámpico.

Generación de periodos de actividad theta hipocámpica

La estimulación sensorial consistió en acariciar la piel de la espalda del animal o un leve pinchazo en la cola.

Se empleó estimulación eléctrica en RPO mediante electrodos bipolares de acero inoxidable con una separación entre puntas de 1 mm. Se utilizaron pulsos rectangulares (0.3 ms, 50-500 μ A) a una frecuencia de estimulación de 0.1-1 PPS y trenes de pulsos (50 Hz durante 500 ms, con pulsos de 0.3 ms; 0.1 TPS). Se empleó un estimulador Grass S88 y una unidad de aislamiento de estímulos SIU5 (Grass Medical Instruments, Quincy, MA).

El electrodo de estimulación en RPO fue fijado tras realizar varios experimentos de prueba de ubicación óptima. Dichas pruebas fueron de dos tipos. En primer lugar, se observaron en el osciloscopio los potenciales evocados por pulsos cuadrados de 0,3 ms a medida que se profundizaba en el lugar de estimulación (NI o RPO), comenzando siempre 1 mm por encima de las coordenadas y descendiendo 200 μ m cuando el lugar de estimulación fue RPO. La profundidad óptima fue aquella en que se obtuvieron mejores potenciales evocados.

El segundo tipo de pruebas, consistió en realizar un registro con un periodo de control de 60 s seguido de un periodo de estimulación consistente en trenes de pulsos de 6-8 s y 100 Hz cada 30-60 s. La estimulación comenzó 200 μ m por encima de las coordenadas calculadas para el límite superior de RPO y se hizo descender el electrodo 200 μ m hasta 200 μ m por debajo de las coordenadas calculadas para el límite inferior del núcleo reticular, de modo que en cada profundidad se produjesen dos trenes de estimulación. La profundidad a la que se fijaron los electrodos fue aquella en que se obtuvo periodos de theta más estables.

Análisis de datos

El análisis de los resultados se realizó *off-line* mediante el programa Spike 2. Para el cálculo de espectros de potencia se empleó el método de FFT de periodos de 60 s para frecuencias 0.1-20 Hz, con una resolución de 0.2 Hz. Los valores medios utilizados de las bandas de frecuencias fueron: 0.1-3 Hz (*delta*) y 3-10 Hz (*theta*).

El análisis del efecto de la estimulación en RPO sobre los disparos en NI se realizó mediante histogramas PSTH. Para ello, se tomó como referencia ($t=0$) el estímulo eléctrico en RPO y se calculó la actividad neuronal durante 1 ms en torno a la referencia, promediado en 40 estímulos. La latencia se calculó como el tiempo entre el estímulo y el pico mayor de actividad evocada del PSTH. Para el estudio de la ritmicidad se utilizaron ACH, considerando tiempos de 2 ms y un mínimo de 3 picos a intervalos regulares para considerar actividad rítmica.

Todos los datos fueron presentados como media \pm error. Se utilizó el test de Wilcoxon para la comparación estadística.

Experimento 2: estudio del efecto del NI en la generación de ritmo theta hipocámpico dependiente de RPO y de ritmo theta provocado por estimulación sensorial

Con el objetivo de analizar la relevancia del NI en la generación de ritmo theta hipocámpico, se realizaron estudios de lesión del núcleo en condiciones que inducen que aparezca dicha actividad electroencefalográfica. Para descartar que los efectos observados pudiesen ser debidos a la lesión de fibras de paso, se provocó también la inactivación farmacológica de las neuronas de NI mediante el agonista GABAérgico muscimol. Se realizaron controles mediante inyección de suero salino fisiológico.

Se analizó el espectro del EEG hipocámpico en condiciones espontáneas bajo el efecto de la anestesia y su modificación por estimulación sensorial táctil y por estimulación eléctrica de RPO con el NI intacto. Posteriormente, se estudió la actividad hipocámpica en las mismas condiciones tras la lesión o inhibición del NI. La activación del EEG hipocámpico se realizó siguiendo el mismo procedimiento descrito en el experimento previo.

Lesión e inhibición

Las lesiones de NI fueron provocadas aplicando una corriente constante de 1 mA durante 5s, mediante un electrodo bipolar, repetidas 2-3 veces alternando la polaridad del estímulo en la unidad SIU.

En el estudio de inhibición, se realizó inyección continua de muscimol durante 30-60 s. Se realizaron inyecciones de 0.1-0.15 μ l 5mM (Sigma, St. Louis, MO, USA) disuelto en tampón fosfato (pH = 7.4). Para la microinyección se empleó jeringa de 1 μ L (Hamilton Co., USA) con aguja de acero inoxidable (30G).

Como control, se utilizó solución salina (0.9 %, 0.1 μ l)), inyectada mediante jeringa Hamilton.

En ambos casos se dejó transcurrir 1 minuto antes de la retirada de la aguja para evitar el reflujo.

Análisis de datos

El análisis del efecto de la integridad del NI sobre el EEG hipocámpico se basó en el cálculo de espectros de potencia mediante FFT. Se estudió la diferencia entre los valores medios de potencia de las bandas delta y theta en las distintas condiciones experimentales. La comparación estadística se realizó mediante el test de Wilcoxon.

Experimento 3: estudio de la sincronización de NI e hipocampo en ratas anestesiadas con uretano

La activación de las neuronas de NI durante periodos de theta hipocámpico y el descubrimiento de neuronas con actividad rítmica en este núcleo permitieron plantear la hipótesis de que en el NI hubiese cierta actividad de campo rítmica. Nos propusimos el estudio de la actividad de campo en NI y su relación con la actividad hipocámpica.

Para ello, se realizaron registros de campo simultáneos en NI e hipocampo en ratas anestesiadas con uretano. Se analizó el EEG en ambas estructuras en condiciones espontáneas y en condiciones de inducción de theta hipocámpico.

En cada registro se tomó un periodo inicial de 60s como control de actividad espontánea. Dependiendo de la técnica empleada para generar ritmo theta en el hipocampo, los experimentos se clasificaron en tres grupos: (a) estimulación eléctrica de RPO, (b) inyección del agonista colinérgico carbacol en RPO y (c) estimulación sensorial, mediante pinzamiento de la cola.

Estimulación eléctrica de RPO

Puesto que estimulaciones de distintas intensidades en RPO generan frecuencias diferentes dentro del rango de la actividad theta en el hipocampo (Kinney et al., 1999; Li et al., 2007), se realizó un estudio previo del efecto de estimulaciones pontinas de intensidades crecientes sobre las frecuencias medias y dominantes de ambos EEGs y su evolución en el tiempo. En una serie de registros preliminares, se realizó una curva previa de intensidad-frecuencia. Durante el registro, se emplearon intensidades capaces de generar principalmente theta de entre 4-6 Hz (Th1) y de entre 6-12 Hz (Th2), abarcando el rango de entre 0.03-0.15 mA.

La estimulación eléctrica se realizó mediante trenes de estímulos en RPO (A: -7.8, L: 1.2, P: 7.5-8.5 mm). De manera similar a lo descrito en experimentos previos, la profundidad óptima del electrodo se determinó mediante la aplicación secuencial de trenes de intensidad constante a profundidades crecientes.

La estimulación eléctrica en RPO se realizó de manera similar a la descrita en los experimentos previos. En este caso, tras 1 minuto de registro control, el paradigma de estimulación consistió en trenes de entre 6 y 8s (pulsos de 0.3ms a 50-100 Hz), aplicados a una velocidad de 0.02 trenes/s para permitir la recuperación parcial de las ondas lentas del EEG, con orientación del osciloscopio.

Entre registros consecutivos transcurrió un tiempo de entre 10-15 min. para permitir el retorno a un nivel de EEG basal con predominancia de ondas lentas. En cada caso se realizaron al menos dos registros consecutivos a la misma intensidad. Tras la verificación inicial de que las intensidades crecientes inducían aparición de actividad theta de frecuencias crecientes, se escogieron aquellas intensidades capaces de generar una actividad theta en el hipocampo superior a 6 Hz (Th2) (0.08-0.11 mA).

Estimulación colinérgica de RPO

Con la doble finalidad de analizar la contribución del sistema colinérgico en la activación de NI y al mismo tiempo evitar el posible efecto de una estimulación rítmica sobre RPO que interfiriese en los resultados, se realizó la estimulación de RPO mediante el agonista de ACh carbacol (0.1 μ l 0.156 μ g/ μ l en suero salino a 0.1 μ l/min) (Jiang y Khanna, 2006). Como control se inyectó previamente suero salino (0.1 μ l 0.9% a 0.1 μ l/min) en el mismo animal.

El protocolo en este caso consistió en un registro control inicial de 60s seguido de la inyección de salino o carbacol, registrando un total de 15-30 minutos para permitir la difusión y establecimiento del efecto. Se realizó una única inyección de carbacol por ejemplar.

Estimulación sensorial

En estos experimentos, tras 60s de registro control, como paradigma de estimulación sensorial, se empleó el pinzamiento de cola del animal durante 20s. Se dejó transcurrir un tiempo entre cada tramo de estimulación mediante la observación en el osciloscopio del retorno a valores cercanos a los iniciales. En cada registro se realizaron al menos dos estimulaciones como verificación, aunque el análisis posterior se realizó únicamente sobre el primero de los estímulos.

Adquisición de la señal

Los registros obtenidos en estos experimentos fueron adquiridos mediante un sistema diseñado por el Grupo de Procesado de Señal (GPDS) de la Universitat de València y adaptado para las necesidades de nuestro estudio. El módulo de adquisición controla una tarjeta de adquisición de 32 canales y 12 bits de resolución (PCI 1202H, ICP DAS) mediante un software desarrollado sobre LabView. Los ficheros se generan en un formato propio binario que incluye cabecera, con un máximo de 16 canales y frecuencia de muestreo programable hasta 12 kHz. En algunos casos, la señal fue llevada también a una unidad de adquisición CED Micro 1401 para comparar su análisis mediante Spike2.

Análisis de datos

La mayor parte del análisis fue realizado mediante el programa Neurolab, desarrollado por el GPDS. Únicamente algunos de los espectros de potencia fueron realizados mediante Spike2.

En los experimentos de estimulación eléctrica de RPO, por una parte, se realizó el espectro de potencia mediante FFT de los 5s previos a cada tren y 5s desde el comienzo del mismo, considerando la proporción de las bandas de 0-4 Hz, 4-12 Hz y 12-40 Hz.

La distribución de las frecuencias para cada instante de tiempo se analizó mediante el estudio de las densidades de energía espectral por frecuencias (en el rango de 0-40Hz) y con el tiempo.

Con el objetivo de caracterizar mejor la relación entre ambas oscilaciones se subdividió la banda theta en bajas y altas frecuencias: Th1 (4-6 Hz) y Th2 (6-12 Hz) y se analizó su energía espectral en situación control, estimulación y post-estimulación. Para el estudio de la correlación en estas bandas de frecuencia entre hipocampo y NI se empleó el análisis de la coherencia espectral (CTh1 y CTh2).

Se efectuó, por otro lado, el estudio de tiempo-frecuencia. Se analizó la frecuencia media y dominante a lo largo del tiempo de registro. Asimismo, se estudió la evolución temporal de la energía espectral en las frecuencias Th1 y Th2, tomando ventanas temporales de 2s.

En el estudio estadístico se emplearon estudio no paramétricos para muestras emparejadas, dado que el estudio de la normalidad y de la homogeneidad de varianzas indicaron su conveniencia. Para las comparaciones entre dos grupos se empleó el test de Wilcoxon y en aquellos casos que implicaron comparación entre más de dos grupos, se empleó el test de Friedman. Las comparaciones múltiples se realizaron mediante el test de Wilcoxon con corrección de Bonferroni.

En todos los casos se consideró significativa una $p < 0.05$.

En los registros de estimulación colinérgica de RPO se estudió gráficamente la evolución temporal de la potencia en las bandas de 0-4 Hz, 4-12 Hz y 12-40 Hz para los canales de hipocampo y de NI, en ventanas de 30s a los tiempos 0, 120, 300, 600 y 900s. Se analizó también la evolución temporal de la energía espectral y la frecuencia dominante.

3.1.5 Registros crónicos en rata no anestesiada

Para este estudio se realizó la inserción estereotáxica de electrodos. Tras permitir la recuperación del animal y su habituación a la manipulación y al casquete de electrodos, dejando transcurrir el tiempo habitual en estos estudios, se procedió a realizar registros de campo simultáneos en NI e hipocampo durante un periodo nunca superior a una semana. Posteriormente, se analizó el EEG en ambas estructuras y la actividad multiunitaria en el NI durante diferentes estados de consciencia.

Fundamentos

Los fundamentos de la metodología empleada en el análisis de la actividad de campo y multiunitaria en animales no anestesiados son los mismos que para el estudio bajo condiciones de anestesia. La diferencia en este caso radica en la necesidad de implantar los electrodos crónicamente y de manera que el sistema permita el movimiento de los animales en su entorno, sin afectar de forma relevante a su actividad. Los métodos empleados se detallan a continuación.

En esta parte del estudio no se pretendió realizar un análisis comportamental exhaustivo sino complementar los resultados observados en animales anestesiados. Se buscó, pues, analizar el grado de actividad neuronal en NI y la sincronización de su actividad de campo con la actividad hipocámpica en estados de activación comportamental diferenciables. La base de este estudio consistió en diferenciar los distintos estados de activación.

Las características del EEG hipocámpico y del EMG durante los distintos estados de activación están bien documentadas (Robert et al., 1996). Durante la vigilia, predomina la actividad de bajo voltaje y alta frecuencia en el EEG, con una actividad EMG alta y variable, dependiente del movimiento. La selección de periodos de vigilia activa puede ser realizada mediante el cálculo del ratio entre la potencia relativa de la banda theta y la de delta (Csicsvari et al., 1999). Durante el sueño no-REM o de ondas lentas, es característica la presencia de oscilaciones de baja frecuencia y gran amplitud, acompañadas de una actividad moderada de EMG. El sueño REM se caracteriza por la presencia de ritmo theta en el hipocampo y baja actividad EMG (Robert et al., 1996).

3.1.6 Descripción del experimento 4: registros crónicos

Anestesia y cirugía

Para la inserción estereotáxica de electrodos, el animal fue anestesiado i.p. con una mezcla de ketamina (60 mg/kg), diazepam (0.2 mg/ml) y atropina (0.1 mg/ml), preparada de forma que se inyectara 1ml/100g de peso.

Se insertó un macroelectrodo bipolar de acero inoxidable aislado con *formvar* en CA1 del hipocampo. Se empleó un electrodo similar como electrodo de referencia en corteza frontal. Para el registro en NI se empleó un electrodo trenzado formado por tres hebras de hilo de níquel-cromo aislado con *formvar* (0.063 mm; A-M systems). Al extremo libre de los electrodos se conectaron pines macho en miniatura (WPI). Se insertó también un macroelectrodo en la musculatura cervical o en el músculo masetero. Los electrodos fueron fijados con acrílico dental formando un casquete que recubría toda el área expuesta durante la cirugía.

Para favorecer la recuperación del animal se le administró metamizol magnésico (0.04 mg en 0.5 ml i.p.) postoperatorio.

Registro y adquisición de datos

Tras la operación se dejó transcurrir 48 horas para la adaptación del animal a los electrodos. El estudio se realizó en la propia caja de estabulación, con un sistema de rotor que permitía el movimiento libre de la rata.

Se observó el comportamiento de los animales durante un periodo de tres días, clasificando su actividad en vigilia tranquila (*quiet waking*, QW), vigilia activa (*active waking*, AW), sueño lento (*slow wave sleep*, SWS) y sueño paradójico (*rapid eyes movement*, REM). Para esta clasificación se consideraron los criterios de vigilia/sueño, inmovilidad/movimiento o exploración, movimiento de vibrisas, EEG hipocámpico y EMG. La clasificación fue comprobada *off-line* de acuerdo a las características electrofisiológicas.

Las señales fueron filtradas y amplificadas. Para el registro multiunitario en NI se empleó un primer filtro de 0.3 Hz-3 KHz. La señal fue amplificada mediante un preamplificador y conducida a dos canales del amplificador. En el primero de estos canales se empleó un filtro de 300 Hz-3 KHz. En el segundo, la señal fue filtrada entre 0.3-30 Hz para el registro de campo. Los datos fueron digitalizados mediante un sistema de adquisición CED 1401, con un muestreo a 8 KHz.

Análisis de datos

Tras la verificación histológica de la ubicación de los electrodos, se analizaron los registros en periodos de 30s, atendiendo al estado de activación. Los periodos QW fueron caracterizados por estado de reposo y una potencia de la banda theta hipocámpica inferior al 30 %. Las fases de AW fueron escogidas atendiendo a la exploración o a la respuesta a estímulos del animal, con un EEG hipocámpico con más del 30 % de potencia en la banda theta. Los periodos de sueño fueron clasificados en SWS atendiendo al predominio de ondas lentas en el EEG hipocámpico o en REM, caracterizado por una potencia de theta superior al 30 %, movimiento de vibrisas y atonía muscular.

Para cada tramo, se obtuvieron las potencias en las bandas 0-4 Hz, 4-12 Hz y 12-40 Hz mediante FFT, así como la frecuencia de disparo. Se analizaron las diferencias en la banda theta en NI y en la tasa de disparo para los distintos estados, así como su correlación con la actividad theta en el hipocampo.

3.2 TRAZADO DE CONEXIONES E INMONOHISTOQUÍMICA

3.2.1 Fundamentos

Trazado de conexiones

El trazado de conexiones neuroanatómicas se emplea para responder a cuestiones fundamentales relacionadas con la conectividad neuronal. Habiendo evolucionado los métodos desde los clásicos experimentos de degeneración axonal o

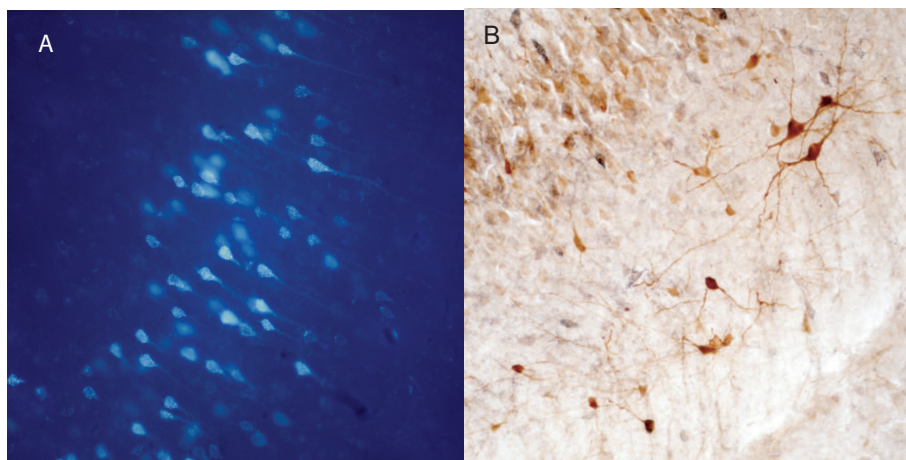


Figura 3.13: Neuronas con marcaje retrógrado de FG. A. Visualización mediante microscopía de fluorescencia. B. Preparación permanente tras inmunohistoquímica y aplicación del método ABC-DAB-peroxidasa.

walleriana (Waller, 1850), los métodos modernos de trazado de conexiones implican la inyección de trazadores o colorantes que son captados por las células y transportados (ver Figura 3.15) desde los somas hacia los terminales nerviosos (anterógrado) o en sentido contrario (retrógrado). La combinación de diferentes trazadores permite el estudio de múltiples conexiones en el mismo animal, cuantitativa y cualitativamente (Vercelli et al., 2000), así como verificar la existencia de proyecciones consecutivas y circuitos completos.

Estos métodos son en su mayoría compatibles con inmunocitoquímica, lo que permite, además, determinar la naturaleza neuroquímica de los circuitos descritos. Nosotros elegimos el uso de trazadores fluorescentes por la facilidad de revelado y por la resolución de la imagen histológica.

Los compuestos empleados como trazadores pueden ser visualizados utilizando diferentes técnicas que dependen de la naturaleza del compuesto. La utilización de proteínas como trazadores permite el uso de la inmunocitoquímica para el revelado del trazador. Además, el uso de trazadores con propiedades fluorescentes inherentes facilita la visualización del trazado con anterioridad al revelado definitivo por inmunocitoquímica. Ambas posibilidades se pueden complementar mediante la utilización de fluorocromos unidos a un trazador no fluorescente (ver Figura 3.13).

La inyección de sustancias en el tejido cerebral merece considerar algunos aspectos técnicos que puedan facilitar o limitar su uso en el trazado de conexiones. En primer lugar cabe obtener inyecciones de trazador de extensión adecuada a la estructura de estudio. La limitación de la extensión de las inyecciones se favorece mediante inyección iontoforética frente a inyecciones por presión, más rápidas. El tiempo de inyección y la intensidad de corriente son en este caso los

determinantes. En el caso de moléculas ya ionizadas, la carga de la corriente debe favorecer la salida del trazador. En el caso de moléculas no cargadas, es necesario emplear un tampón de pH adecuado para la ionización en el sentido conveniente. El uso de carga eléctrica contraria a la de inyección evita además el rastro en los movimientos de la pipeta tanto en la colocación como en la extracción.

La siguiente de las consideraciones en el método de inyección del trazador es la región sobre la que se desea realizar el estudio conectivo. El tamaño, la configuración y las estructuras adyacentes son los factores limitantes en este caso.

La fluorescencia de las neuronas rellenas con sustancias trazadoras puede desvanecerse rápidamente, especialmente en las terminaciones más finas de la arborización dendrítica, por lo que la observación de la fluorescencia no es un método permanente en el tiempo. Para preparaciones a largo plazo, es necesario amplificar y perpetuar la señal, mediante métodos de inmunohistoquímica o de detección ultraestructural.

Trazadores utilizados

En el desarrollo experimental de este estudio, se escogió la utilización de los trazadores Fluorogold y Miniruby, retrógrado y anterógrado respectivamente. Fluorogold es un trazador retrógrado muy versátil, que se transporta rápidamente hasta el soma, dando marcajes desde las 24 - 48h. Tiempos de supervivencia mayores favorecen un marcaje más intenso, permitiendo distinguir parte de la arborización dendrítica.

El componente activo del fluorogold como trazador retrógrado es la hidroxistilbamidina. Es una base débil capaz de cruzar membranas celulares en su forma no ionizada que es posteriormente atrapada en lisosomas y endosomas merced al gradiente de pH y transportada en éstos desde las terminaciones axonales hasta el soma neuronal (Wessendorf, 1991). Su fluorescencia resiste los métodos habituales de fijación y es posible su detección por inmunohistoquímica mediante anticuerpo específico anti fluorogold (marcaje retrógrado con FG representado en la Figura 3.13).

Por su parte, los trazadores basados en dextranaminas biotiniladas ofrecen una elevada flexibilidad en sus usos ((Reiner et al., 2000) para revisión). Las dextranaminas de elevado peso molecular (10 kDa) son efectivas como trazadores anterógrados en el marcaje de terminales axonales, mientras que las de bajo peso molecular (3 kDa) son utilizables como trazadores retrógrados, ofreciendo resultados de calidad de tinción de tipo Golgi. Las de peso molecular intermedio, por su parte, como es el caso del miniruby, permiten la obtención de marcaje anterógrado mayoritario con cierta proporción de marcaje de somas. Estas dextranaminas pueden utilizarse ligadas a fluorocromos, como la fluoresceína, permitiendo así su observación directa por microscopía de fluorescencia. Su naturaleza biotinilada, por otra parte, permite la reacción con diaminobencidina para su intensificación y revelado en preparaciones permanentes.

Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica es un método, basado en el trabajo original de Nakane y Pierce (1966), orientado a estudiar la localización de antígenos celulares que se expresan en tejidos, a través de la utilización de anticuerpos (inmunoglobulinas G, IgG) contra los antígenos de interés (representado en la Figura 3.14).

Aplicado a la neuroanatomía, este antígeno puede ser, entre otros, un neurotransmisor o neuromodulador, una enzima implicada en la vía de síntesis, transporte o degradación de neurotransmisores, un receptor de membrana o cualquier proteína de expresión específica relacionada con la actividad neuronal. Para ello, el tejido ha de estar previamente fijado, de manera que las proteínas permanezcan en su ubicación sin alterarse ni degradarse. Los anticuerpos utilizados, bien policlonales bien monoclonales, son moléculas marcadas mediante metales pesados, isótopos radiactivos o moléculas orgánicas (como es el caso de la biotina), fluorocromos o enzimas, de forma que puedan ser detectables a través de métodos que impliquen al tipo específico de marcaje.

La utilización de anticuerpos como marcadores citoquímicos implica el uso de métodos directos o indirectos. En el caso del método directo, son los anticuerpos que se unen a los antígenos específicos (primarios) los que están marcados, lo que incrementa la especificidad. En su lugar, en el método indirecto, se utilizan anticuerpos genéricos contra IgG del animal del que ha sido obtenido el anticuerpo primario no marcado, unidos a compuestos que permiten su visualización. Los anticuerpos marcados se unen al anticuerpo primario unido a su vez a su antígeno específico y permiten así su detección en el tejido. Este método origina más posibilidad de marcajes inespecíficos, pero ofrece en cambio una mayor flexibilidad en la utilización de anticuerpos secundarios.

Técnicamente, la unión de los anticuerpos a las proteínas específicas ha de tener lugar en cortes finos de tejido, para permitir el acceso a las estructuras fijadas. En el caso de que las proteínas de interés sean intracelulares y no ligadas a la membrana, es preciso facilitar la entrada del anticuerpo al interior de la célula, mediante técnicas que abren o destruyen la estructura de la membrana celular, como la electroporación o la utilización de agentes tensioactivos.

Otra limitación de la técnica es la posibilidad de que los anticuerpos realicen interacciones inespecíficas con proteínas del tejido, por lo que una parte fundamental del método consiste en la preparación del tejido de forma que queden bloqueadas las posibles uniones cruzadas. Esta preparación consiste principalmente en incubar el tejido en suero del animal y en una solución de albúmina, lo que satura en gran medida los posibles sitios de unión. Posteriormente, el anticuerpo específico desplazará las uniones con mayor afinidad.

En cuanto a la especificidad de la técnica, dependiendo del tipo de marcador utilizado, es necesario tomar precauciones que permitan evitar un marcaje de fondo confuso. Es el caso en el que la reacción de detección implique la utilización de peroxidasa, directamente unida al anticuerpo o a través de anticuerpos biotinilados que sean revelados por interacción con diaminobencidina unida a peroxidasa. Esta técnica supone la reacción de la enzima reduciendo peróxido

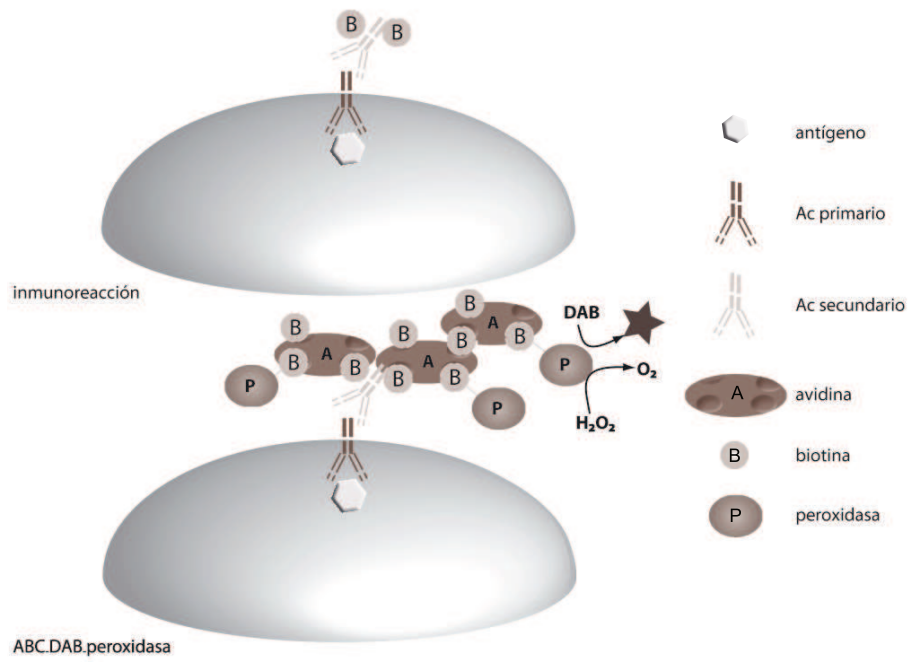


Figura 3.14: Inmunohistoquímica y método de detección mediante el complejo avidina-biotina-peroxidasa

de hidrógeno y oxidando a la diaminobenzidina, que pasa a adquirir coloración. Como requisito, es preciso bloquear previamente los sitios activos de las peroxidases endógenas, mediante una exposición previa a peróxido de hidrógeno.

La detección de moléculas biotiniladas mediante el método del complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC) permite la posibilidad de obtener preparaciones perpetuas en las que se obtiene además una amplificación de la señal, tal y como será descrito más adelante.

La técnica del complejo ABC (ver Figura 3.14), introducida por Hsu y Reiner (Hsu et al., 1981) ha sido utilizada desde hace décadas en estudios de diagnóstico y de investigación.

Este método permite la detección de moléculas unidas a biotina mediante su unión a moléculas de avidina. La avidina es una glicoproteína extraordinariamente afín por la vitamina biotina, para la que presenta cuatro sitios de unión. De hecho, su constante de disociación es de 10^{-15} M (Livnah et al., 1993). El caso del complejo avidina-biotina constituye uno de los escasos ejemplos de constantes sub-nanomolares entre moléculas unidas por enlaces no covalentes (Livnah et al., 1993).

A su vez, la biotina presenta capacidad de unirse mediante enlaces covalentes a anticuerpos y a la enzima peroxidasa, entre otras moléculas, como los trazadores. No todos los sitios de unión de la avidina son ocupados por moléculas de biotina unidas a anticuerpos, lo que permite su unión a biotinas incluidas en el complejo, lo que favorece la intensificación. En conjunto, esto permite que anticuerpos o trazadores unidos a biotina sean reconocidos por complejos ABC.

Estos complejos son fácilmente detectables, posteriormente, mediante la utilización del cromógeno 3,3'-diaminobenzidina tetrahidrocloruro (DAB). Este compuesto forma un precipitado coloreado marrón e insoluble al ser oxidado por la peroxidasa en presencia de peróxido de oxígeno, lo que permite su visualización en preparaciones permanentes. La utilización de níquel en la reacción intensifica el color obtenido, pasando de una tonalidad marrón a negra. La combinación de revelados con y sin intensificación por níquel permite la visualización, mediante revelados sucesivos, de marcajes para distintos anticuerpos o trazadores (ver Figura 3.13).

3.2.2 Procedimientos experimentales

El estudio de proyecciones fue realizado en el Dpto. de Anatomía y Embriología Humana y en las instalaciones de la Unidad Central de Investigación de la Facultad de Medicina de la Universitat de València.

En esta fase del estudio, se pretendió demostrar la existencia de una proyección pontoseptal a través del NI. El método de estudio empleado fue el trazado de conexiones. En concreto, se analizó la presencia, en ratas, de una proyección desde el núcleo RPO hasta el NI y su continuidad con una proyección desde el NI hasta el complejo SM/BD.

Para ello, se realizaron las siguientes inyecciones:

I. Trazador retrógrado en NI

- II. Trazador anterógrado en RPO
- III. Trazador retrógrado en SM/BD
- IV. Inyección simultánea de trazador anterógrado en RPO y trazador retrógrado en SM/BD

Los trazadores utilizados son visibles mediante fluorescencia directa, lo que permitió la verificación de los puntos de inyección y realizar microfotografías de fluorescencia y estudio en microscopía confocal de los marcajes en una primera fase. A continuación, los ejemplares fueron procesados para adquirir preparaciones permanentes y fueron estudiados mediante inmunohistoquímica. El trazador retrógrado utilizado fue detectado mediante anticuerpo específico y posteriormente revelado mediante el método ABC-DAB sin níquel. Los trazadores anterógrados elegidos fueron dextranaminas biotiniladas, por lo que fue posible su detección directa mediante la técnica ABC-DAB con níquel.

Animales de experimentación

En los experimentos de estudio anatómico de conexiones e inmunohistoquímica se utilizaron veinticuatro (n=24) ratas adultas Sprague-Dawley (Blackthorn, Bicester, Inglaterra) de ambos sexos, de entre 200-350 g de peso.

Anestesia

Los animales fueron anestesiados utilizando una mezcla de ketamina 60-75 mg/kg i.p. (Imalgen, 0.05 g/ml; Rhône Mérieux, Lyon, France) y xilacina 10 mg/kg i.p. (Xilagesic, 20 mg/ml; Lab. Calier, Barcelona, Spain). La dosis utilizada permitió mantener a los animales anestesiados durante aproximadamente dos horas. En los casos en que fue necesario utilizar dosis suplementarias, se añadió la mitad de la dosis inicial, nunca antes de 20 minutos tras la primera inyección. El estado de consciencia se fue comprobando mediante verificación de reflejos. Durante la cirugía y hasta que el animal recuperó la consciencia se controló su temperatura corporal mediante una manta eléctrica.

Inyección de trazadores

La inyección de trazadores se realizó mediante micropipetas capilares de vidrio con un diámetro interno de 20-25 μm y punta de aproximadamente 8 mm confeccionadas mediante un estirador de pipetas (Narishigue, Japón).

Una vez insertada la pipeta hasta la profundidad deseada de acuerdo con las coordenadas de referencia, se retrajo 100 μm antes de proceder a la inyección del trazador con el fin de crear un reservorio.

Para el transporte anterógrado se empleó dextranamina biotinilada (BDA; Molecular Probes, D1956 Eugene, OR) o dextran-tetrametilrodamina y biotina (miniruby, mR; Invitrogen-Molecular Probes) al 10% en TBS 0.05M pH 7.6. Las inyecciones se realizaron por iontoforesis en RPO (7.7-8.3 mm posterior a

bregma, 1.2-1.5 mm lateral, 8.2-8.8 mm ventral respecto de bregma) mediante una corriente de $+5\mu\text{A}$, 7s *on*/7 s *off* durante 10 minutos.

Para el estudio retrógrado se utilizó hidroxistibamina (Fluorogold, FG, 80014 Biotium, Hayward, CA) al 5 % en tampón acetato, pH 4, inyectada por iontoforesis en SM/BD (0.5-1 mm anterior a bregma, 0-0.2 mm lateral, 7.5-7.6 mm ventral respecto de bregma) o en NI (9.5-9.8 mm posterior a bregma; 0-0.1 mm lateral; 7.3-7.8 mm ventral respecto de bregma). La intensidad de corriente utilizada fue $+3\mu\text{A}$, 2s. *on*/2 s *off* y los tiempos de inyección fueron 8-10 minutos en SM/BD y 5 minutos en NI.

La Figura 3.15 representa el montaje utilizado y la localización de las pipetas para las inyecciones en RPO y SM/BD.

La difusión óptima del trazador se consiguió tras una serie de experimentos preliminares con distintas condiciones de corriente y tiempo de inyección. En ambos tipos de experimentos, el reflujo de trazador al extraer la micropipeta fue evitado esperando 5 minutos tras finalizar la inyección y utilizando una corriente inversa durante la salida del cerebro.

Fijación y procesado del tejido

Tras pervivencia de 7 a 9 días, se procedió al sacrificio de los animales con dosis letal de pentobarbital sódico (100 mg/kg 20 %, Dolethal ©, Vetoquinol, Madrid, España). Tras anestesia profunda y antes de que cesara el latido cardíaco, los animales fueron perfundidos transcardialmente con 500 ml suero salino (NaCl 0.9 % pH7) heparinizado al 0.1 % a temperatura ambiente (TA) y, posteriormente, con 500 ml de líquido fijador constituido por una mezcla de paraformaldehído al 4 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), glutaraldeído al 0.2 % (Sigma-Aldrich) y ácido pícrico saturado al 15 % (Sigma-Aldrich), todo ello disuelto en tampón fosfato 0.1 M (PB) pH 7.4 y enfriado con hielo.

Tras completar la perfusión, el cerebro fue sometido a postfijación mediante la conservación de la cabeza en frío (4°C). De este modo se facilita que el fijador remanente en los vasos continúe fijando el tejido. Una hora después, el cerebro fijado fue extraído del cráneo y almacenado en PB 0.1 M (pH 7.4) con azida sódica al 0.05 % (Sigma-Aldrich) para su posterior procesado.

De cada cerebro se obtuvieron 6 series de cortes coronales de $50\mu\text{m}$ de espesor mediante vibratomo (Leica VT-1000 M, Leica Microsystems, Cambridge, Reino Unido). Para realizar los cortes, cada cerebro se dividió inicialmente en 4 fragmentos de aproximadamente el mismo espesor. Cada sección fue adherida a la pletina de soporte mediante cianoacrilato e inmersa en un baño de PBS, y rodeado éste de hielo, sin que entrase en contacto con el tejido. El corte se realizó a velocidad de avance muy baja y elevada velocidad de vibración. La primera serie fue recogida en PBS para su montaje inmediato. Las restantes series fueron almacenadas en PB 0.1 M (pH 7.4) con azida sódica al 0.05 %, protegidas de la luz mediante papel de aluminio para evitar la pérdida de fluorescencia del tejido y almacenadas a 4°C . Durante todo el procesamiento se procuró preservar la fluorescencia evitando la exposición directa a la luz.

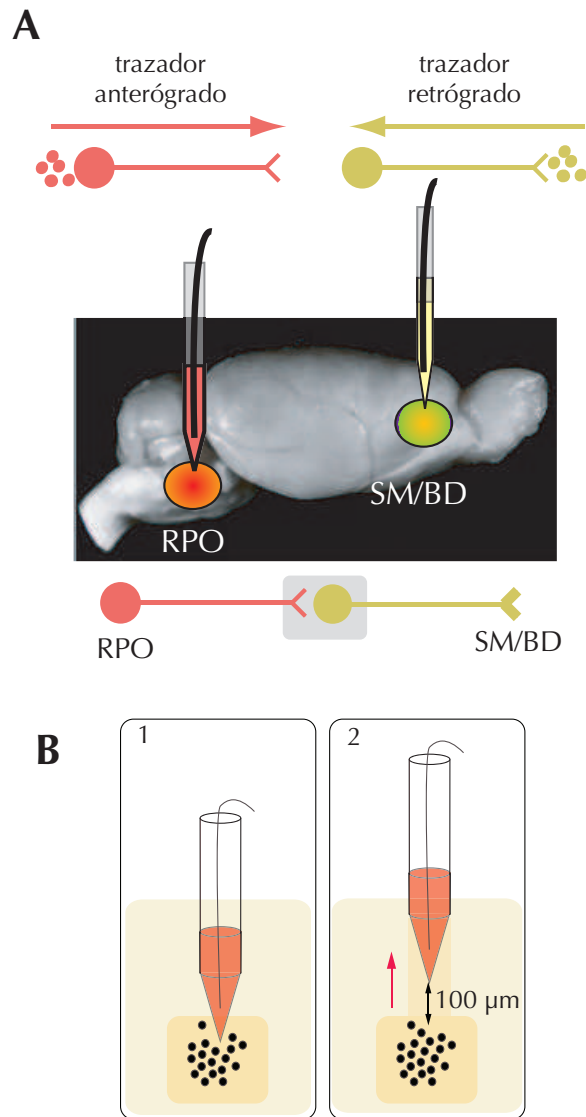


Figura 3.15: Inyección de trazadores. Arriba, esquema de la dirección de transporte de trazadores anterógrados y retrógrados; Abajo, representación de los lugares de inyección de trazador anterógrado en RPO y retrógrado en SM/BD. Retracción del capilar para la creación de un reservorio de trazador. Tras alcanzar la profundidad deseada, la pipeta es extraída 100 μm .

Inmunohistoquímica

La corrección de los puntos de inyección se verificó por visualización directa de la fluorescencia. Los ejemplares con inyecciones adecuadas fueron procesados para su estudio. Algunos de los ejemplares fueron empleados para microscopía confocal. Los ejemplares para preparaciones permanentes fueron revelados mediante inmunohistoquímica (ver Figura 3.14 en página 79).

Inmunohistoquímica en ejemplares con marcaje sencillo

La inmunohistoquímica de la BDA para el trazado anterógrado se realizó adaptando el protocolo de Veenman para dextranaminas biotiniladas (Veenman et al., 1992). El mismo protocolo fue utilizado en el procesamiento de los ejemplares con inyección sencilla de FG en NI.

En primer lugar, las secciones fueron tratadas para la saturación de las peroxidasas endógenas y evitar así una posterior reacción inespecífica. Para ello, fueron sometidas a una disolución de H_2O_2 durante 30 minutos en agitación continua y aireadas a TA.

Las secciones fueron después incubadas durante 90 minutos (TA) en un complejo de avidina-biotina peroxidasa (Vectastain ABC Elite kit ©; Vector Laboratories, Burlingame, CA) preparado en PB 0.1 M al menos 30 minutos antes. Transcurrido el tiempo de incubación y tras varios lavados en PB 0.1 M y en Tris/HCl 0.05M pH 8. Las secciones fueron reveladas en Tris/HCl pH 8 con la DAB realizada con $NiNH_4SO_4$ y activada con H_2O_2 . La reacción fue detenida mediante lavados sucesivos con Tris/HCl 0.05M pH 8 y PB 0.1 M.

paragraphInmunohistoquímica en ejemplares con marcaje anterógrado y retrógrado En los ejemplares con doble inyección de mR o BDA y FG, el protocolo fue similar, aunque modificado para permitir la diferenciación de ambos marcajes. En estos casos, se adaptó un protocolo de inmunohistoquímica para doble marcaje (Lanciego et al., 1998). El tejido fue procesado en primer lugar para la detección inmunohistoquímica del trazador anterógrado y posteriormente para el trazador retrógrado.

El marcaje del trazador anterógrado se realizó de acuerdo a lo descrito anteriormente, con la salvedad de que en este caso el tampón utilizado fue Tris/HCl pH 8. Los cortes fueron incubados en complejo ABC durante 90 minutos (TA). La BDA o el mR fueron revelados en tampón Tris-HCl pH8 intensificado con $NiNH_4SO_4$ y DAB, que proporciona una coloración negra a las fibras marcadas.

Para la inmunohistoquímica de FG, el tampón utilizado fue Tris-HCl pH 8 salino (TBS) con el tensioactivo Triton X100 (TBS-Tx), para favorecer el acceso de los anticuerpos al interior de la célula. Las secciones fueron preincubadas en TBS-Tx pH 8 con suero normal de cabra con la finalidad de preparar el tejido y saturar las posibles uniones inespecíficas. Posteriormente, se incubaron en el mismo medio con anticuerpo anti-FG (24h, TA) preparado en conejo (Sigma). Las secciones fueron incubadas en inmunoglobulina G biotinilada de cabra anti conejo (Vector Laboratories) con suero normal de cabra. Finalmente, se trataron con complejo avidina-biotina peroxidasa (90 minutos, RT; Vectastain ABC Elite

kit ©; Vector Laboratories). Por último, fueron reveladas en Tris-HCl pH 7.6 con DAB sin NiNH_4SO_4 , para obtener una coloración más clara, marrón, de los somas marcados con el trazador retrógrado y activado con H_2O_2 0.04 %. Finalmente, la reacción fue detenida del modo descrito previamente, utilizando en este caso Tris-HCl pH 7.6.

En todos los casos, los cortes procesados fueron conservados en PB 0.1 M con azida sódica al 0.05 %.

Visualización, análisis y representación de los resultados

Previamente al procesado para inmunohistoquímica, como ya se ha comentado, se verificó la adecuación de los puntos de inyección mediante la observación directa de los cortes correspondientes de la primera serie, montados y cubiertos en glicerina tras su secado al aire. Para su montaje se utilizó tampón HEPES salino para mejorar la fluorescencia. Se visualizaron en microscopio Nikon Eclipse E600 (Nikon, Japón), utilizando los filtros para fluorescencia adecuados para cada fluorocromo: UV-2A (EX 330-380, DM 400, BA 420) para el FG, B-2A (EX 450-490, DM 505, BA 520) para la BDA y G-2A (EX 510-560, DM 575, BA 590) para el mR. La microscopía de fluorescencia se empleó también para la observación inicial de los marcajes más intensos obtenidos.

Los cortes escogidos para la detección de dobles marcajes mediante microscopía confocal fueron también montados en glicerina. Las imágenes de confocal fueron adquiridas mediante la unidad de escaneado láser confocal multifotón Leica TCS SP2 equipada con rayo laser de argón y helio-neón y unida a un microscopio invertido Leica DM1RB, ubicada en la Unidad Central de Investigación de la Facultad de Medicina y Odontología y Hospital Clínico Universitario. Para el doble marcaje se utilizó mR para observar fibras y FG para localizar somas.

Las longitudes de ondas de excitación para los fluorocromos fueron 543 nm para el mR y 364 nm para el FG. La apertura de emisión para la detección de fluorescencia fue 575-650 nm para mR y 380-485 nm para FG. Para el estudio de los contactos establecidos se realizaron captaciones seriadas en Z y posteriormente las imágenes fueron procesadas para la obtención de la proyección máxima con el propio software del microscopio (Leica Confocal Software, version 2.61, Leica Microsystems, Heidelberg, GMBH).

Los marcajes fueron estudiados en mayor detalle en las secciones reveladas por inmunohistoquímica, tal y como se ha detallado en el apartado anterior. Las secciones reveladas fueron montadas, deshidratadas en cadena de alcoholes y xilol y finalmente cubiertas, utilizando DPX como medio de montaje para histología. Los cortes fueron visualizados mediante microscopía óptica estándar (Nikon Eclipse E600).

La adquisición de imagen de los ejemplares visualizados en el microscopio Nikon Eclipse E600 fue realizada mediante una cámara Nikon DMX-2000 unida al microscopio y enviada a un PC equipado con el programa de adquisición ACT-1 (Nikon).

Las microfotografías fueron exportadas a los programas Adobe Photoshop CS2 © o Aperture © para compensar los niveles, brillo y contraste y para convertir las imágenes en escala de grises.

Dada la escasa densidad neuronal de las regiones reticulares y su especial relevancia en nuestro estudio, la localización de somas marcadas en las dichas regiones fue analizada en detalle. Puesto que no hemos encontrado en la bibliografía una metodología explícita para estudios semejantes, el método utilizado para dicho análisis se detalla a continuación.

La ilustración de los somas en niveles reticulares se basó en el estudio minucioso de las preparaciones a 40X a lo largo de todo el espesor de cada sección. La representación de los somas en la imagen adquirida en ACT-1 y exportada a Adobe Photoshop © fue realizada de manera simultánea al estudio en el microscopio. Sobre la base de la imagen a 40X se creó una nueva capa en Adobe Photoshop ©, que fue utilizada para realizar un punteado sobre cada soma detectado, mediante la herramienta Pincel de sección circular. El mismo procedimiento se utilizó para analizar toda la extensión de las secciones de interés. Para ello, se adquirieron imágenes a dicha resolución de toda la sección, procurando que en todas hubiese una zona común a la fotografía previa. A continuación se realizó un montaje de todas las fotografías a 40X sobre la microfotografía tomada a 4X ó 2X, variando la transparencia de las capas y basándose en las zonas comunes para garantizar la fidelidad de la imagen. Se corrigió el punteado de las zonas comunes a fotografías contiguas para evitar un recuento incorrecto por repetición. Una vez realizado el montaje, se unificó como una única capa y se realizaron las representaciones finales de estos niveles realizando los perfiles y el punteado definitivo de cada sección con Adobe Illustrator CS2 ©, utilizando como base el montaje descrito.

4 RESULTADOS I

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DEL NÚCLEO INCERTUS EN RELACIÓN CON LA OSCILACIÓN THETA HIPOCÁMPICA EN RATA

4.1 CARACTERIZACIÓN DE LA INFLUENCIA DEL NÚCLEO INCERTUS SOBRE EL RITMO THETA HIPOCÁMPICO DURANTE LA ANESTESIA CON URETANO

De acuerdo a estudios previos de nuestro grupo, el sistema de proyecciones ascendentes del NI lo capacitan para ocupar un papel relevante en el control de la oscilación theta del hipocampo (Olucha-Bordonau et al., 2003). Su estimulación eléctrica confirmó esta implicación (Nuñez et al., 2006). Con el objetivo de describir en mayor detalle la naturaleza de su participación en el circuito de control del ritmo theta hipocámpico, se realizaron una serie de experimentos en ratas anestesiadas con uretano. El trabajo que presentamos incluyó en primer lugar la realización de registros extracelulares unitarios orientados a analizar la actividad unitaria de las neuronas de NI en condiciones de aparición de esta ritmicidad. Se analizó también el efecto de la lesión o inhibición de NI sobre la generación de theta en el hipocampo. En otro bloque de experimentos bajo el efecto de la anestesia se estudió la actividad de campo en NI y su relación con la registrada en el hipocampo. En estos experimentos se analizó el efecto de distintas condiciones de inducción de ritmo theta, así como su dependencia del sistema colinérgico.

4.1.1 Registro unitario en NI

En primer lugar, se pretendió observar si la actividad del NI variaba en condiciones de generación de theta hipocámpico. Dado que el principal generador troncocefálico del ritmo theta se ha considerado habitualmente RPO, el primero de los experimentos realizados consistió en el registro de actividad

unitaria en el NI tras la estimulación eléctrica de RPO y en condiciones de generación de *theta* hipocámpico mediante estimulación táctil. Para ello, además del registro unitario mediante microelectrodo en NI, se realizó el registro simultáneo de actividad de campo en hipocampo. La localización de los electrodos en el experimento puede observarse en la Figura 4.1).

Los análisis histológicos revelaron que el registro de campo hipocámpico fue obtenido a nivel de CA1. Se realizaron registros en condiciones espontáneas y en condiciones de *theta* forzado, tanto mediante estimulación sensorial como por estimulación eléctrica de RPO. En condiciones espontáneas, el patrón del EEG hipocámpico presentaba una predominancia de ondas lentas y una ausencia total de altas frecuencias.

Las neuronas elegidas para el estudio de su registro en condiciones de anestesia con uretano (n=41) fueron seleccionadas mediante el método de detección de umbrales de amplitud de las espigas, tras comprobar que efectivamente pertenecían al NI, al analizar el recorrido del microelectrodo en preparaciones con tinción histológica (ver Figura 4.1). El registro se realizó atendiendo a las coordenadas del Atlas (Paxinos et al., 1999) y tras la verificación de haber atravesado el cuarto ventrículo, tal y como se ha descrito en las consideraciones generales.

En condiciones espontáneas y atendiendo a su patrón de descarga, pudieron ser diferenciados dos tipos de neuronas de NI. Un 76 % de las neuronas de NI registradas (n=31) presentaban un patrón de disparo de espigas únicas a una frecuencia de 9.0 ± 1.3 Hz. Su patrón de descarga resultó ser no rítmico, como puede deducirse de los ACHs planos (Figura 4.2). Este tipo de neuronas fueron denominadas como tipo I. El 24 % de neuronas restante (n=10), caracterizadas como neuronas tipo II (Figura 4.3, manifestó un patrón de disparo rítmico a 13-25 Hz (18.3 ± 3.2 Hz). Los ACHs se corresponden a esta actividad rítmica, mostrando picos periódicos.

Se indujo la generación de ritmo *theta* hipocámpico, mediante estimulación sensorial, acariciando la piel de la espalda del animal o pinzando ligeramente la cola, o bien mediante la estimulación de RPO. Tanto la estimulación táctil como la estimulación eléctrica puntual de RPO (pulsos cuadrados de 0.3 ms, 0.5 Hz, durante 60 s) o mediante trenes de estímulos (50 Hz, 500 ms) provocó la generación de ritmo *theta* en el hipocampo, como puede observarse en el espectro de potencia de la actividad de campo hipocámpica en la Figura 4.4.

En presencia de ritmo *theta* provocado por estimulación sensorial, la frecuencia media de disparo de las dos subpoblaciones de neuronas de NI descritas, rítmicas y no rítmicas, aumentó de 9.95 ± 2.8 Hz a 21.2 ± 2.8 Hz (n=14; $p < 0.01$), como se observa en la Figura 4.4. No se detectó, sin embargo, actividad rítmica a frecuencia *theta*. Tampoco se detectó que existiese concordancia entre el disparo de las neuronas de NI con una de fase concreta de la oscilación. Se tomó para este análisis el resultado conjunto de ambos tipos de neuronas dado que ambos aumentaron su tasa de disparo.

La estimulación eléctrica de RPO provocó una actividad *theta* similar. *Shocks* eléctricos individuales (0.3 ms a 0.5 Hz durante 60 s) o en trenes (50 Hz durante 500 ms) en RPO indujeron ritmo *theta* a frecuencia de aproximadamente 4 Hz en el hipocampo. Las tasas de disparo de las neuronas de NI aumentaron

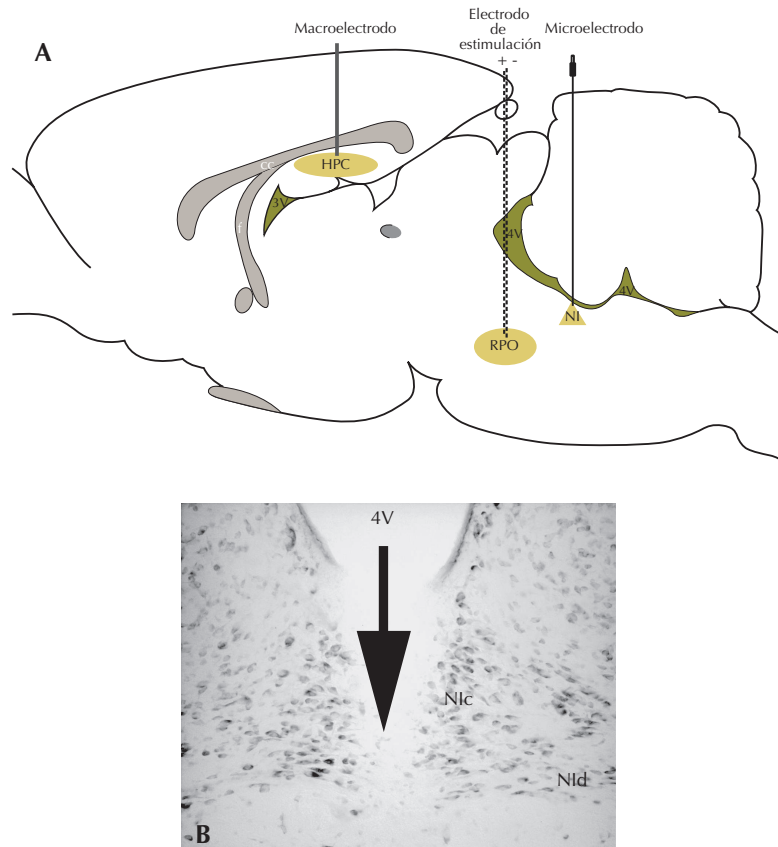


Figura 4.1: A. Localización de los electrodos para el registro unitario en NI. Se ubicó un macroelectrodo de acero aislado ($100\ \mu\text{m}$ de diámetro) en CA1 del hipocampo y un microelectrodo de tungsteno ($5\ \text{M}\Omega$) para el registro unitario en NI. La estimulación eléctrica de RPO se realizó mediante un electrodo bipolar de acero trenzado ($100\ \mu\text{m}$ de separación entre puntas). B. Recorrido del microelectrodo en NI.

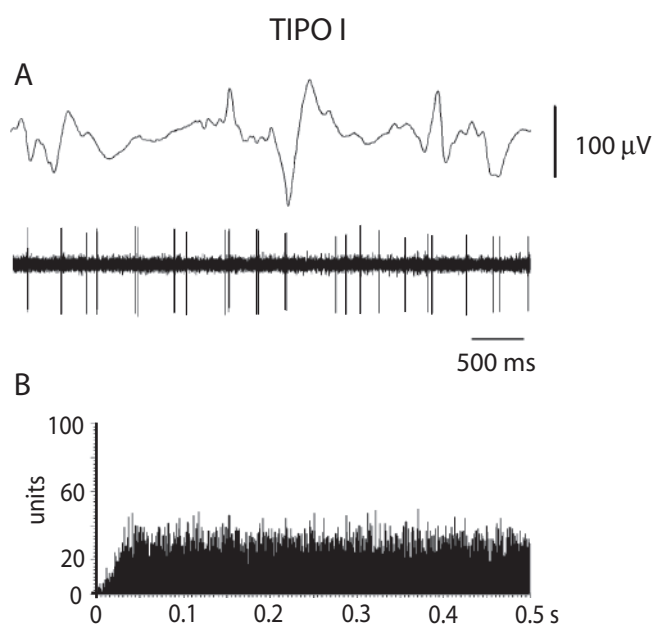


Figura 4.2: Patrón de disparo de neuronas de NI caracterizadas como tipo I. La mayoría de las células presentaron un patrón no rítmico de disparo, como se observa en los datos en crudo (A) y en el correspondiente ACH (B).

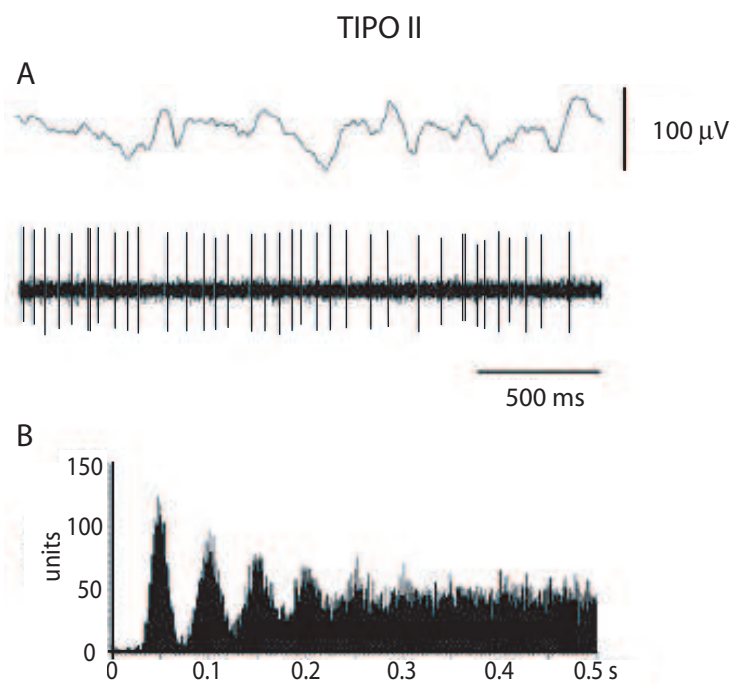


Figura 4.3: Patrón de disparo de neuronas de NI caracterizadas como Tipo II. A. Ejemplo de disparo de una neurona con patrón rítmico de disparo. B. Los picos en el ACH indican que los disparos de esta neurona se producían rítmicamente a 20 Hz.

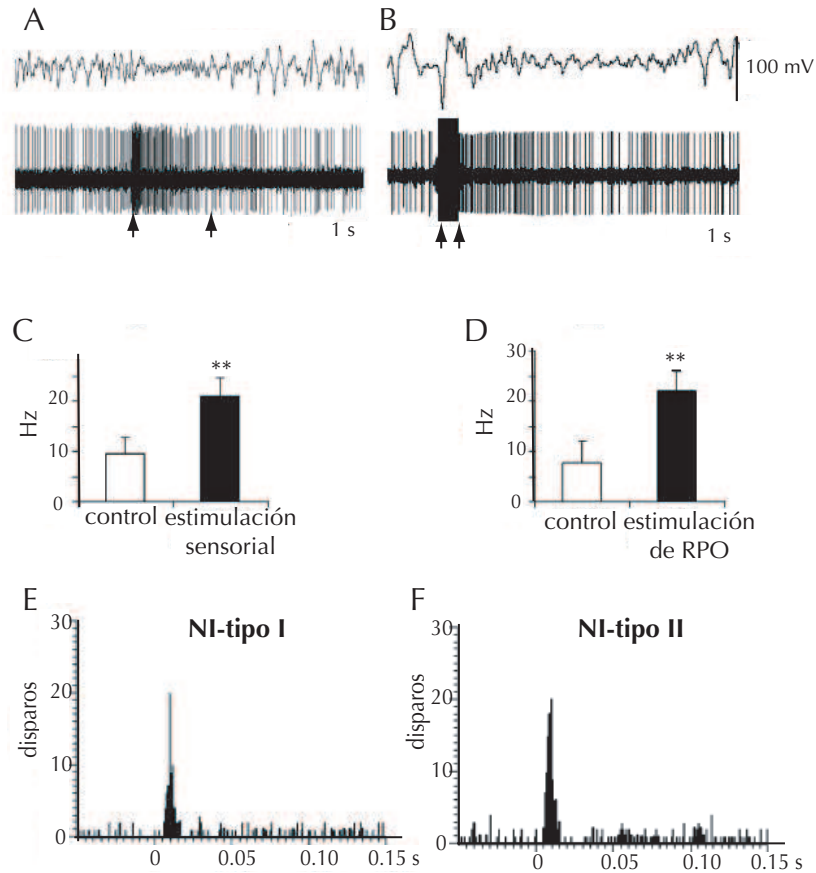


Figura 4.4: Tanto la estimulación sensorial como la estimulación eléctrica de RPO generaron ritmo theta y provocaron un aumento en la tasa de disparo en neuronas de NI. (A) Los datos en crudo de la actividad de campo hipocámpica y del registro unitario en NI (diagramas superior e inferior, respectivamente) muestran un incremento en la actividad unitaria de NI durante la estimulación sensorial del animal (acariciando la piel de la espalda del animal, representado por flechas verticales). (B) La estimulación eléctrica de RPO (50 Hz, pulsos de 0.3 ms durante 500 ms, representada por flechas verticales) provocó también un incremento en la actividad de las neuronas de NI y ritmo theta hipocámpico. (C) Tasa media de disparo de neuronas de NI en control y durante estimulación sensorial (n=14). (D) Tasa media de disparo de neuronas de NI en control y durante estimulación eléctrica de RPO (n=30) ** $p < 0.01$. (E) La estimulación de RPO (0.3 ms a 0.5 Hz) provocó activación ortodrómica de las neuronas tipo I, como se observa en el PSTH de la respuesta celular. (F) PSTH de la respuesta de una neurona de tipo II

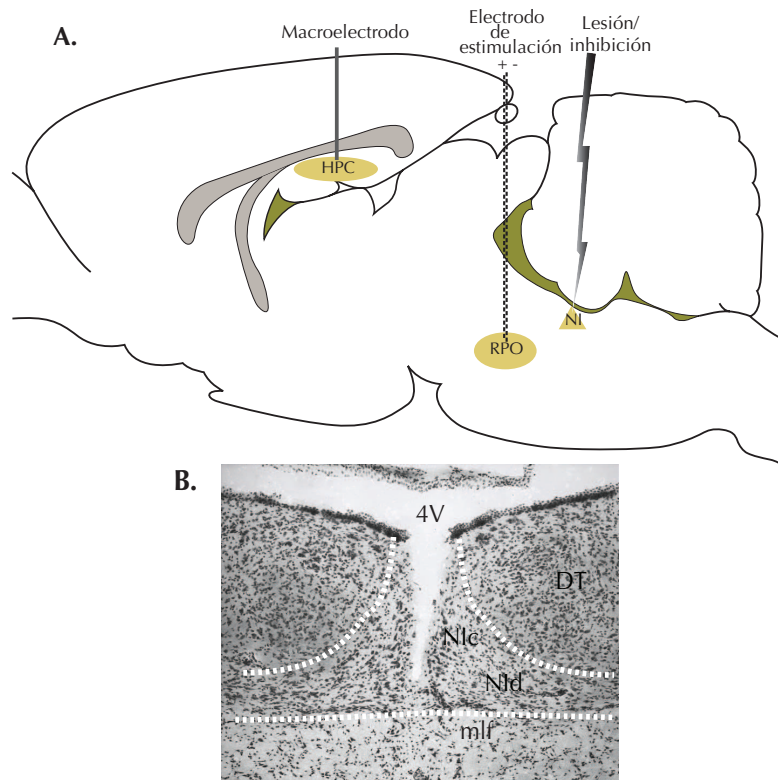


Figura 4.5: Localización de los electrodos para el experimento de supresión de la actividad del NI. Como en los restantes experimentos, se localizó un macroelectrodo de acero aislado (100 μm de diámetro) en CA1 del hipocampo. En este caso, la estimulación eléctrica de RPO se realizó tras lesión electrolítica o inhibición mediante inyección de muscimol en NI.

durante el ritmo *theta* evocado por estimulación de RPO de 7.5 ± 4.5 Hz a 22.1 ± 3.8 Hz ($n=30$; $p<0.01$; ver Figura 4.4). Puede observarse el PSTH como ambos tipos de neuronas respondieron con una latencia muy breve (<2 ms) a la estimulación mediante pulsos puntuales de RPO (Figura 4.4).

El análisis individualizado de ambos grupos reveló que la respuesta de las neuronas de NI tras la estimulación ipsilateral de RPO consistió en 1-3 espigas evocadas de forma ortodrómica, como demostraban las pruebas de colisión y de seguimiento de altas frecuencias. Esta respuesta se produjo en 12/22 células de tipo I (55%) y en 2/8 de tipo II (25%) con una latencia media de 9.2 ± 0.5 ms y 10.1 ± 1.2 ms, respectivamente. El efecto de la estimulación de RPO sobre ambas subpoblaciones se muestra en la Figura 4.4.

4.1.2 Efecto de la lesión y la inactivación de NI

Los potenciales evocados de manera ortodrómica obtenidos en los experimentos anteriormente descritos permitían suponer, al menos desde el punto de vista de la electrofisiología, una proyección en sentido RPO-NI, implicada en la generación o regulación del ritmo theta hipocámpico. Como complemento a los experimentos descritos y a los de estimulación del NI y con el objetivo de profundizar en la caracterización de la posible ruta funcional, se realizaron a continuación experimentos de lesión del NI. Bajo estas condiciones, se realizaron las mismas pruebas de estimulación relatadas en el apartado previo para la generación de actividad theta hipocámpica (Figura 4.5). Se analizó el patrón de oscilación hipocámpica en situación espontánea y en condiciones de generación de theta, bien mediante estimulación sensorial bien mediante estimulación eléctrica de RPO.

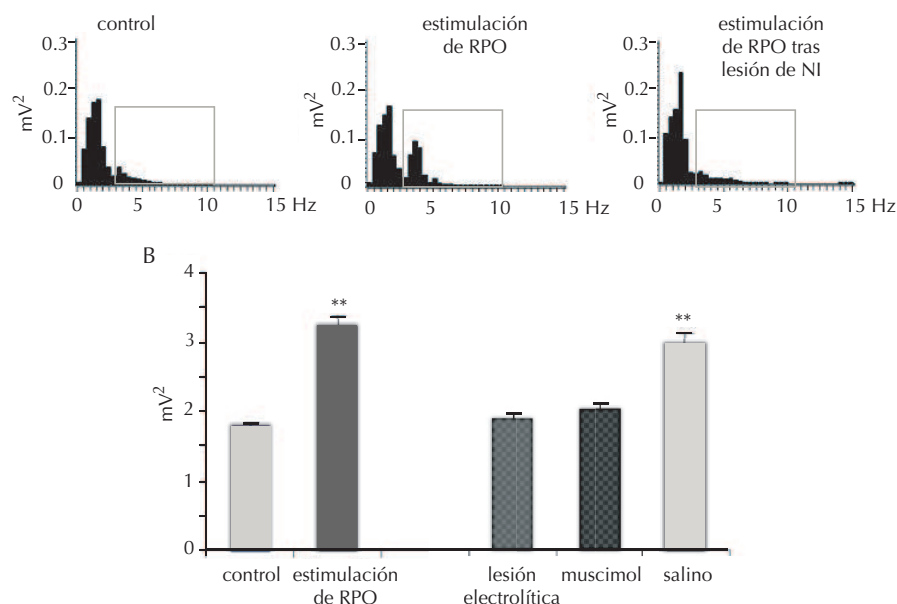


Figura 4.6: Tanto la lesión como la inhibición de NI eliminó el ritmo *theta* evocado por estimulación de RPO. (A) Espectro de potencia de la actividad de campo hipocámpica. En el control predominaba la actividad delta. La estimulación de RPO (0.3 ms a 0.5 Hz durante 60 s) indujo ritmo *theta* a 4 Hz. Tras lesión electrolítica de NI, la estimulación de RPO no produjo actividad *theta* en el hipocampo. (B) Representación del potencial medio de la banda *theta* de la actividad de campo hipocámpica en controles, tras estimulación de RPO sin alteración de NI y tras estimulación de RPO con lesión electrolítica de NI, microinyección de muscimol o de salino. El ritmo *theta* provocado por la estimulación de RPO fue abolido en los casos de lesión y de microinyección de muscimol en NI, pero no por la microinyección de salino en NI. ** $p < 0.01$

En condiciones espontáneas, la actividad de campo hipocámpica manifestó un predominio de las ondas delta, inducido por la anestesia con uretano. La estimulación de RPO provoca un aumento de la actividad *theta* en el hipocampo, como ya se ha mencionado y puede observarse en el histograma de frecuencias de la Figura 4.4. Tras la lesión electrolítica del NI, sin embargo, la estimulación de RPO no provocó un incremento de actividad *theta*, y el espectro de potencia de la actividad de campo hipocámpica calculado mediante FFT se mostró similar al presente en condiciones espontáneas. No obstante, la estimulación sensorial tras la lesión sí indujo un ligero incremento en la banda *theta*.

Para comprobar que el efecto de la lesión electrolítica no fuera debido a la afectación de fibras de paso sino al bloqueo farmacológico de la actividad de NI, se inyectó muscimol 5 mM, agonista $GABA_A$ (n=6). Los resultados muestran que 3 minutos tras la inyección de muscimol en NI, la estimulación de RPO no provocaba un incremento de ritmo *theta*. Se inyectó solución salina como control en NI (n=6). La inyección de salino en NI no evitó que la estimulación de RPO provocase un aumento en el ritmo *theta*. La Figura 4.6 representa la potencia media de la banda *theta* en condiciones espontáneas, tras estimulación de RPO sin lesión, tras estimulación de RPO con lesión, inyección de muscimol y de salino.

Resumen

Los resultados observados mediante los registros unitarios en NI realizados en ratas anestesiadas con uretano indican una activación ortodrómica de las neuronas de NI en condiciones de estimulación eléctrica de RPO. Por otra parte, tanto la lesión como la inhibición de NI suprimen la aparición de ritmo theta en el hipocampo si éste es generado mediante este mismo tipo de estimulación. No obstante, pese a que las neuronas de NI incrementan su actividad en condiciones de generación de ritmo theta hipocámpico mediante estimulación sensorial, este tipo de estimulación sigue generando actividad theta pese a la supresión de NI.

4.1.3 Análisis de la sincronía entre las actividades locales de campo en el núcleo incertus y el hipocampo en rata anestesiada con uretano

Numerosas áreas encefálicas relacionadas con la actividad hipocámpica presentan una actividad de campo a frecuencias theta. Este es el caso del SUM (Grabowski et al., 1996) y, en la formación reticular, de RPO y DR (Faris y Sainsbury, 1990; Simões et al., 1996; Fonoff et al., 1999).

La detección de neuronas rítmicas en NI y la activación de NI durante la aparición de ritmo theta en el hipocampo condujo a hipotetizar que podría encontrarse actividad de campo oscilatoria que guardara relación con el ritmo theta hipocámpico.

El objetivo de esta parte del trabajo fue describir la actividad local de campo presente en NI y analizar si existía una correlación entre ésta y la registrada

en el hipocampo. Para ello, se realizaron registros de campo simultáneos en ambas estructuras, como se muestra en la Figura 4.7.

El análisis se llevó a cabo tras la verificación histológica de la correcta ubicación de los electrodos. Se estudió la relación entre las oscilaciones detectadas en ambas estructuras en condiciones espontáneas bajo el efecto de la anestesia y en situaciones de generación de ritmo theta en el hipocampo. Se emplearon para ello tres modelos de estimulación que han sido ampliamente utilizados en la literatura: la estimulación eléctrica de RPO, su estimulación colinérgica mediante microinyección de carbacol y la estimulación sensorial mediante un ligero pinzamiento de la cola.

Los primeros modelos se eligieron con el objetivo de mimetizar la activación hipocámpica inducida por el núcleo que es considerado el generador troncoencefálico del ritmo theta. La estimulación eléctrica proporciona un método fácilmente reproducible, en que las frecuencias alcanzadas por la oscilación hipocámpica son controlables mediante la modulación de la intensidad de estimulación. Esta manipulación permite un estudio más detallado de las características de las oscilaciones observadas.

Por otra parte, dado que, de forma fisiológica, la activación de RPO tiene lugar a través de influencias colinérgicas, se ha pretendido analizar el comportamiento de NI tras este tipo de estimulación. Además, atendiendo a su farmacología, la ritmicidad theta hipocámpica ha sido clasificada como colinérgica y no colinérgica (Kramis et al., 1975; Bland, 1986). La manipulación farmacológica permite, además, el estudio del efecto una activación a lo largo de un periodo más largo de tiempo. Por otra parte, este tipo de activación proporciona una influencia tónica sobre RPO, al contrario que la estimulación mediante trenes de pulsos a una frecuencia dada, por lo que permite evitar una posible influencia de un *input* ya rítmico sobre las estructuras implicadas.

Por último, la estimulación sensorial se ha empleado como modelo de generación de un ritmo theta no únicamente mediado por la activación de RPO sino de todo el sistema, lo que permite estudiar si la participación de NI es similar en distintas condiciones de generación de ritmo theta o si, por el contrario, se observan diferencias en la actividad del sistema activador.

Efecto de la estimulación eléctrica de RPO

Para este estudio, se realizaron 34 registros en un total de 6 ratas. Se evaluó el efecto de la estimulación eléctrica de RPO sobre distintos aspectos de las oscilaciones observadas simultáneamente en NI e hipocampo.

Tal y como se ha descrito en el apartado de Metodología, en cada registro, tras un minuto en condiciones espontáneas, se realizaron varias estimulaciones eléctricas, separadas en el tiempo de tal manera que se permitiese el retorno a valores próximos al control.

En una primera fase de cada registro, se realizó una determinación de la intensidad adecuada de estimulación, escogiéndose aquellos rangos que permitían la obtención de un ritmo theta hipocámpico claro y de alta frecuencia (6-12 Hz).

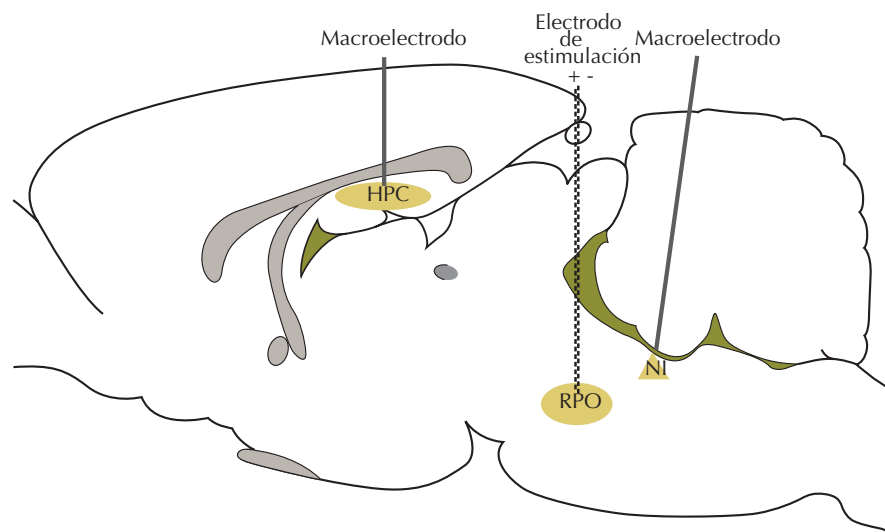


Figura 4.7: Localización de los electrodos para el experimento de comparación de actividades de campo en NI e hipocampo. En esta ocasión, además del macroelectrodo en CA1, se ubicó otro de iguales características en NI. Se fijó también un electrodo bipolar en RPO.

Se estudió la evolución de la frecuencia dominante (FD) en ambas oscilaciones con la estimulación. Durante el registro en condiciones espontáneas en estado de anestesia, la FD en ambos canales se encontró por debajo de 4Hz, siendo siempre ligeramente superior en NI que en hipocampo. Durante los periodos de estimulación, en ambos canales, la FD experimentó picos de entre 4 y 12 Hz de corta duración. Para un rango de intensidades de 0.06-0.2 mA, pudo comprobarse que la frecuencia obtenida en hipocampo era dependiente de la intensidad de estimulación, y que resultaban muy similares a la obtenida en NI (Figura 4.8). Intensidades menores a 0.08 mA, con los electrodos de estimulación separados 1 mm en la punta, generalmente produjeron efectos poco claros. A partir de 0.08 mA, considerada estimulación de alta intensidad, las FD obtenidas se encontraban en el rango clasificado como Th2, con picos claros (Figura 4.8).

Tras detectar que la estimulación eléctrica de RPO era capaz de inducir el incremento de la frecuencia dominante en la actividad local de campo tanto en NI como en hipocampo, se analizó el efecto de la estimulación sobre la potencia relativa de la actividad theta alcanzada en cada canal. Para ello, se empleó el cálculo de FFT de ambos registros, realizado en ventanas de 5s antes, durante la estimulación y tras finalizar ésta. El estudio reveló un incremento de la potencia de la banda theta a expensas de la banda delta en ambos canales, sin inducir cambios relevantes en la banda de 12-30 Hz (Figura 4.9).

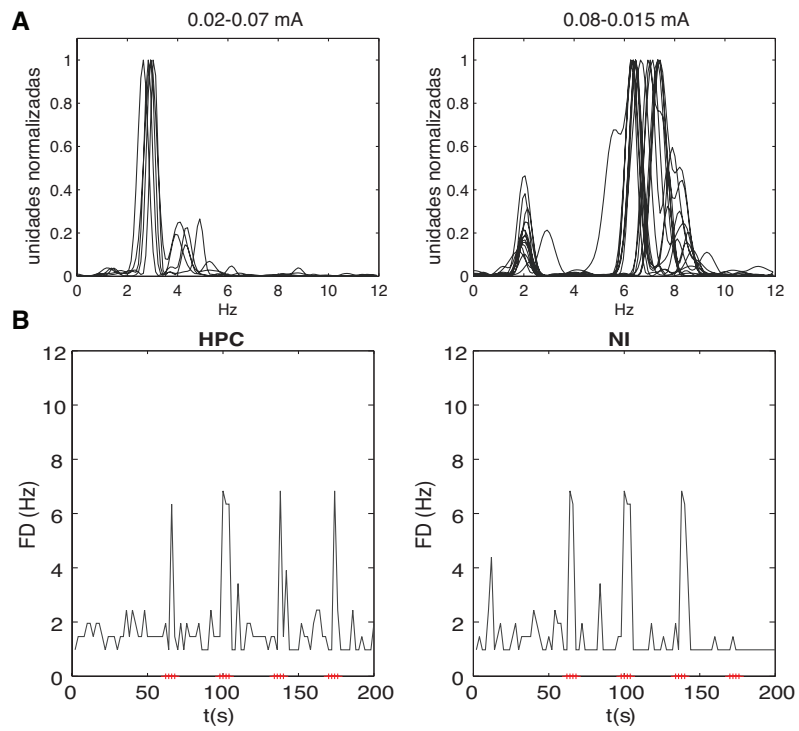


Figura 4.8: A. Espectros normalizados y solapados tras la estimulación eléctrica de RPO a bajas (izquierda) y altas (derecha) intensidades. B. Evolución temporal de la frecuencia dominante en hipocampo (izquierda) y NI (derecha).

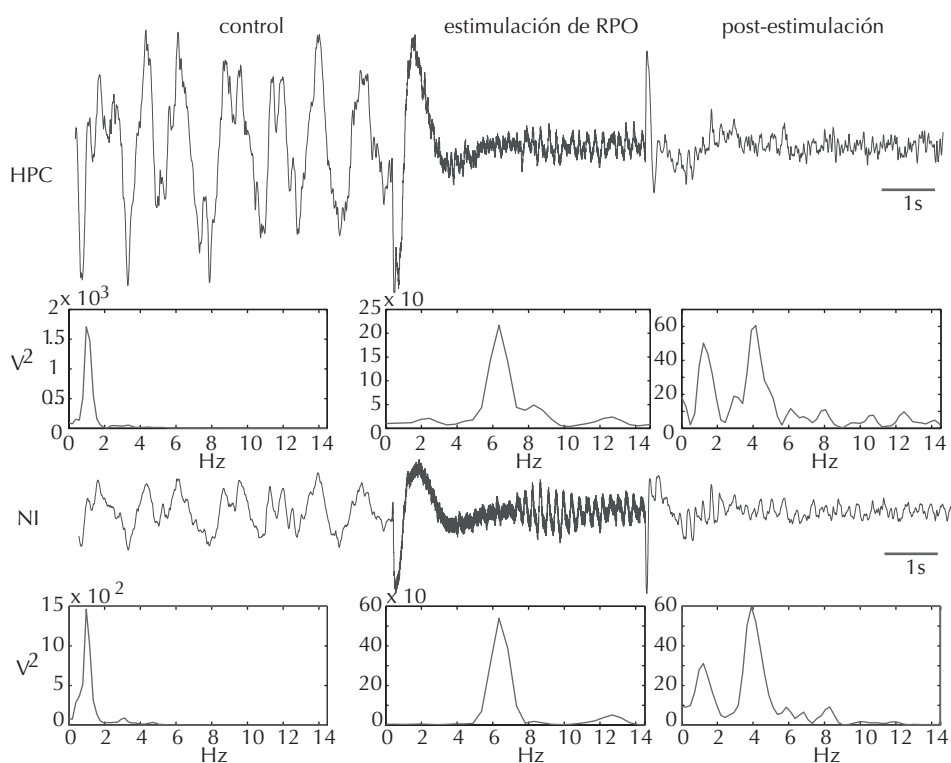


Figura 4.9: Efecto de la estimulación eléctrica de RPO sobre los EEGs de hipocampo y NI. A. EEGs de hipocampo y NI, con aplicación de un tren de estimulación de 100Hz. B. Espectro de potencias de hipocampo (arriba) y NI (abajo) en ventanas de 5s previos al estímulo (izquierda), durante la estimulación (centro) y tras finalizar (derecha), calculado mediante periodograma de Welch.

Con el objetivo de caracterizar más detalladamente el efecto de la estimulación en ambos canales, se realizó el estudio de la densidad de energía espectral a lo largo de los registros. Este tipo de análisis permitiría observar la evolución de todas las frecuencias de los rangos estudiados a lo largo del tiempo. Asimismo, podría analizarse la existencia de sincronización de la actividad a una o pocas frecuencias y comparar el comportamiento de ambos canales.

El estudio de la evolución temporal de la densidad de energía espectral en la banda de frecuencias de 0-15 Hz reveló una dispersión espectral en el hipocampo y en NI previa a la estimulación. Durante el tren de estimulación, aparecía una banda más intensa en frecuencias de la banda theta en ambos canales. La frecuencia alcanzada resultó la misma en ambos casos. En ambos EEGs, al finalizar la estimulación, se volvió a un estado más desincronizado, en el que dominaban las ondas a frecuencias por debajo de 4 Hz. En este estado post-

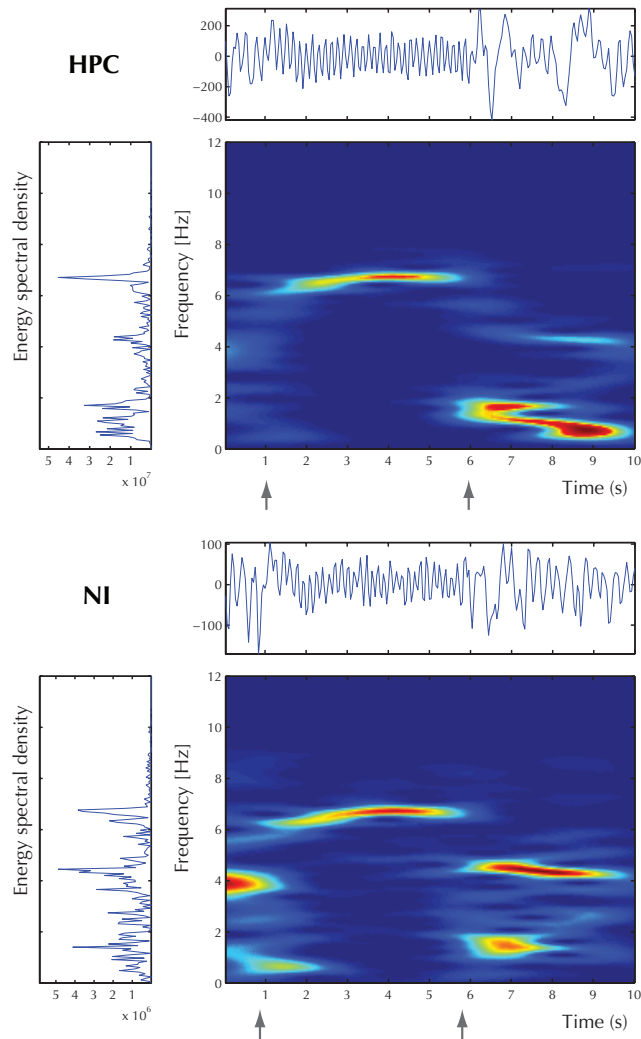


Figura 4.10: Evolución temporal de la densidad de energía espectral. Se muestra el registro obtenido antes, durante y tras un tren de estimulación, durante un tiempo total de 20s. A la izquierda, se representa el espectro total de los 20s. La Figura principal muestra la evolución de las frecuencias con el tiempo, siendo representada la energía para un instante dado en escala de color de azul oscuro a rojo de menor a mayor intensidad. Se representa la evolución para hipocampo (arriba) y NI (abajo). En el periodo previo al estímulo existe una dispersión de frecuencias dominantes. Durante la estimulación, señalada por flechas en el registro, el EEG se sincroniza a mayor frecuencia, coincidiendo ésta en ambos canales. Al finalizar la estimulación, el EEG se desincroniza, apareciendo múltiples bandas de frecuencias y siendo la dominante menor a 4 Hz.

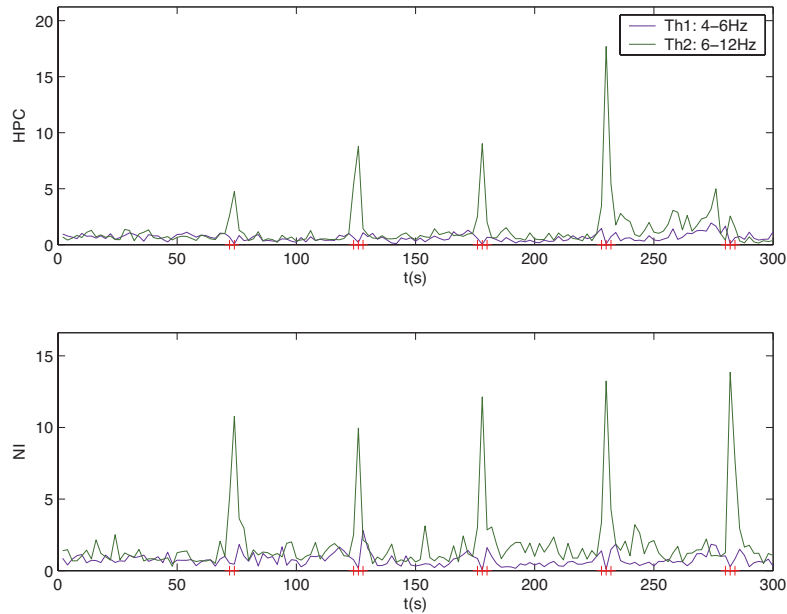


Figura 4.11: Evolución temporal de la energía espectral para las bandas Th1 y Th2 con la estimulación de alta intensidad. Se observan picos de energía espectral en la banda Th2 en los momentos de estimulación (rojo).

estimulación persistió durante un tiempo cierta sincronización, a frecuencias menores a la banda theta y más bajas en el hipocampo (Figura 4.10).

Puesto que el estudio preliminar había revelado que, dependiendo de las intensidades empleadas, la estimulación de RPO inducía una sincronización en un estrecho margen de frecuencias dentro de la banda theta, se procedió a la distinción de dos bandas diferentes dentro del rango 4-12 Hz. Se realizó el análisis de la energía espectral en la banda theta, fraccionada en actividad theta de baja y de alta frecuencia (Th1 y Th2, respectivamente), para experimentos de estimulación a alta intensidad (Figura 4.11). Para ello se tomaron ventanas de 2s en situación basal previa a la estimulación, durante la misma y post-estimulación. El análisis reveló un comportamiento distinto en cada banda.

Para el análisis estadístico, en este caso, se empleó el test de Friedman para muestras emparejadas para el estudio de la significatividad en las diferencias entre los tres grupos: control, estimulación y post-estimulación, dado que los tests de normalidad y de homogeneidad de varianzas sugerían también en este caso la necesidad de emplear pruebas no paramétricas. Para las comparaciones *post-hoc* se empleó el test de Wilcoxon con corrección de Bonferroni.

El efecto de la estimulación a alta intensidad sobre la energía espectral de las bandas Th1 y Th2 se encuentra representado en la Figura 4.12. Únicamente se obtuvieron cambios significativos ($p < 0.001$) en la banda Th2, en ambos canales. La estimulación indujo un incremento en la banda theta Th2 desde un $5.6 \pm$

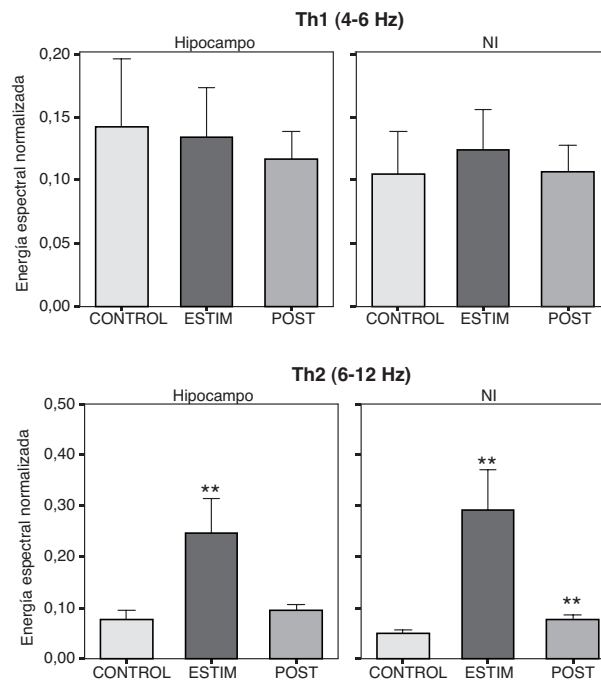


Figura 4.12: Energía espectral normalizada en Th1y Th2 para hipocampo y NI en situación control, estimulación y post-estimulación. La energía de la banda se ha normalizado a 1 respecto del total de la banda 0.5-30 Hz (** $p < 0.001$).

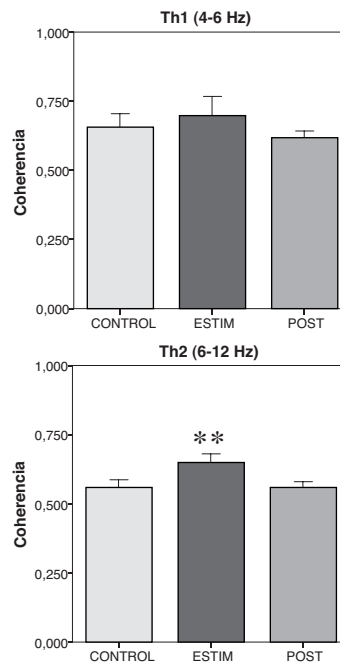


Figura 4.13: Comparación de las medias de coherencia espectral en Th1 (arriba) y Th2 (abajo) entre los canales de hipocampo y NI en las situaciones control, estimulación y postestimulación. La estimulación produjo un efecto estadísticamente significativo sobre la coherencia energía espectral en la banda Th2, pero no en Th1. Para CTh2, la coherencia ascendió de manera significativa durante la estimulación y disminuyó al finalizar ésta hasta los valores control (** $p < 0.001$).

NI	ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA DE RPO								
	Th1				Th2				post-hoc
	media	desv.est	error est	p	media	desv.est	error est	p	
control	0,114	0,069	0,012	0,095	0,056	0,021	0,004	<0,001	-
estimulación	0,136	0,062	0,011		0,272	0,148	0,025		≠ control
post-estimulación	0,120	0,066	0,011		0,067	0,024	0,004		= control
HPC	Th1				Th2				post-hoc
	media	desv.est	error est	p	media	desv.est	error est	p	
control	0,170	0,115	0,020	0,678	0,072	0,030	0,005	<0,001	-
estimulación	0,149	0,084	0,014		0,309	0,173	0,030		≠ control
post-estimulación	0,138	0,075	0,013		0,091	0,035	0,006		= control
NI-HPC	CTh1				CTh2				post-hoc
	media	desv.est	error est	p	media	desv.est	error est	p	
control	0,671	0,094	0,016	0,318	0,569	0,050	0,0086	<0,001	-
estimulación	0,681	0,117	0,020		0,643	0,073	0,0125		≠ control
post-estimulación	0,636	0,068	0,012		0,563	0,045	0,0077		= control

Figura 4.14: Estadísticos y significatividad analizada mediante el test de Friedman para la energía espectral normalizada en las bandas Th1 y Th2 en los canales de hipocampo y NI y de la coherencia espectral entre ambos canales en cada banda.

0.4% hasta un $27.2 \pm 2.5\%$ en NI y desde un $7.2 \pm 0.5\%$ hasta un $30.9 \pm 2.5\%$ en hipocampo. Tras la estimulación, la energía volvió a valores similares al control.

La comparación por parejas permitió observar en ambos canales el efecto significativo de la estimulación, que se perdía tras cesar ésta.

Los resultados anteriores indicaban que ambas oscilaciones respondían de manera semejante a la estimulación, incrementando su actividad en los mismos rangos de frecuencias. Se analizó la similitud de las oscilaciones en cada una de estas bandas de frecuencias. Para ello, se calculó la coherencia espectral entre ambas oscilaciones en las bandas Th1 (CTh1) y Th2 (CTh2). Los resultados obtenidos Figuran en la tabla de la Figura 4.14 y pueden observarse en la Figura 4.12.

Se observó una coherencia entre las oscilaciones en ambas bandas de NI e hipocampo en las situaciones control de un 0.671 ± 0.016 en Th1 y de 0.569 ± 0.013 en Th2. Al igual que en el caso de la energía espectral, el test de Friedman únicamente reveló efectos significativos con la estimulación en la coherencia en la banda Th2. En este caso, la coherencia aumentó respecto al control hasta un $0.863 \pm 0.014\%$ ($p < 0.001$), mientras que la coherencia en Th1 se mantuvo en valores cercanos al control ($0.681 \pm 0.020\%$; $p = 0.318$). Las comparaciones múltiples demostraron que la estimulación producía un aumento significativo mientras que tras cesar ésta se volvió a los niveles del control.

Efecto de la estimulación colinérgica de RPO

Con el objetivo de analizar la contribución del sistema colinérgico a la actividad oscilatoria de NI, se inyectó carbacol en RPO. En estos experimentos, tras el registro de un minuto en condiciones control, se realizó la inyección de carbacol en 6 animales (n=6) o de salino (n=6). Se analizó la evolución temporal de la frecuencia dominante, el espectro de potencias y la densidad de energía espectral.

La inyección de salino no provocó efectos apreciables en el EEG. En estos casos, la frecuencia dominante se mantuvo en rangos similares al periodo de control previo a la inyección en ambos canales.

Sin embargo, la inyección de carbacol indujo la aparición de actividad en la banda theta en ambos registros, alcanzando la misma frecuencia dominante en hipocampo y en NI. En las Figuras 4.15, 4.16 y 4.17 se muestra la evolución temporal en un registro representativo.

Como puede observarse en las Figuras 4.15 y 4.16, el espectro de potencias en situación control mostró una predominancia de las frecuencias inferiores a 4 Hz de cerca del 90 %. La inyección de carbacol indujo un incremento en la potencia de la banda de 4-12 Hz a partir del primer minuto desde la inyección a expensas de una reducción de la banda delta, sin afectar a la potencia de la banda 12-30 Hz. Esta disminución ya fue apreciable en el espectro de potencias a partir de los 5 minutos de la inyección. En el espectro realizado a ese tiempo se pudo observar ya la aparición de un pico a frecuencias theta, de frecuencia media más alta en NI (3.3 Hz) que en hipocampo (4.5 Hz). La potencia de la banda theta a los 10 minutos de comenzar el registro resultó del 40 % en hipocampo y del 63 % en NI, con una frecuencia media similar en ambos canales, de 4.5 Hz. En el registro a 15 minutos, la frecuencia media en la banda theta de ambos canales había aumentado ligeramente hacia los 4.75 Hz y la potencia resultó de 49 % en hipocampo y 75 % en NI. La banda de 12-30 Hz no presentó alteraciones con la inyección de carbacol.

El análisis de la densidad de energía espectral del mismo caso reflejó la progresiva sincronización a frecuencias theta en ambos canales tras la inyección de carbacol. Pudo observarse que inicialmente la actividad de ambas estructuras se encontraba a frecuencias bajas. Al minuto de terminar la inyección de carbacol, disminuyó la dispersión espectral y se observó la aparición de actividad por encima de 4 Hz. A los 5 minutos de registro, la frecuencia resultó mayor que al inicio, siendo ligeramente más elevada en NI. A los 600s ya fue patente en ambas estructuras la actividad en la banda theta, si bien se encontró en valores de frecuencia cercanos a 4 Hz, siendo muy similar en NI y en hipocampo. A los 15 minutos de registro, la frecuencia dominante en la banda theta fue la misma en ambas estructuras, habiendo desaparecido prácticamente las ondas lentas en NI.

El estudio estadístico de la evolución de la frecuencia dominante (FD) muestra que este patrón se mantuvo en los distintos ejemplares, pese a encontrar variabilidad en las frecuencias alcanzadas y las latencias del efecto del carbacol. Los resultados se muestran la Figura 4.18. A los 5 minutos de la inyección de

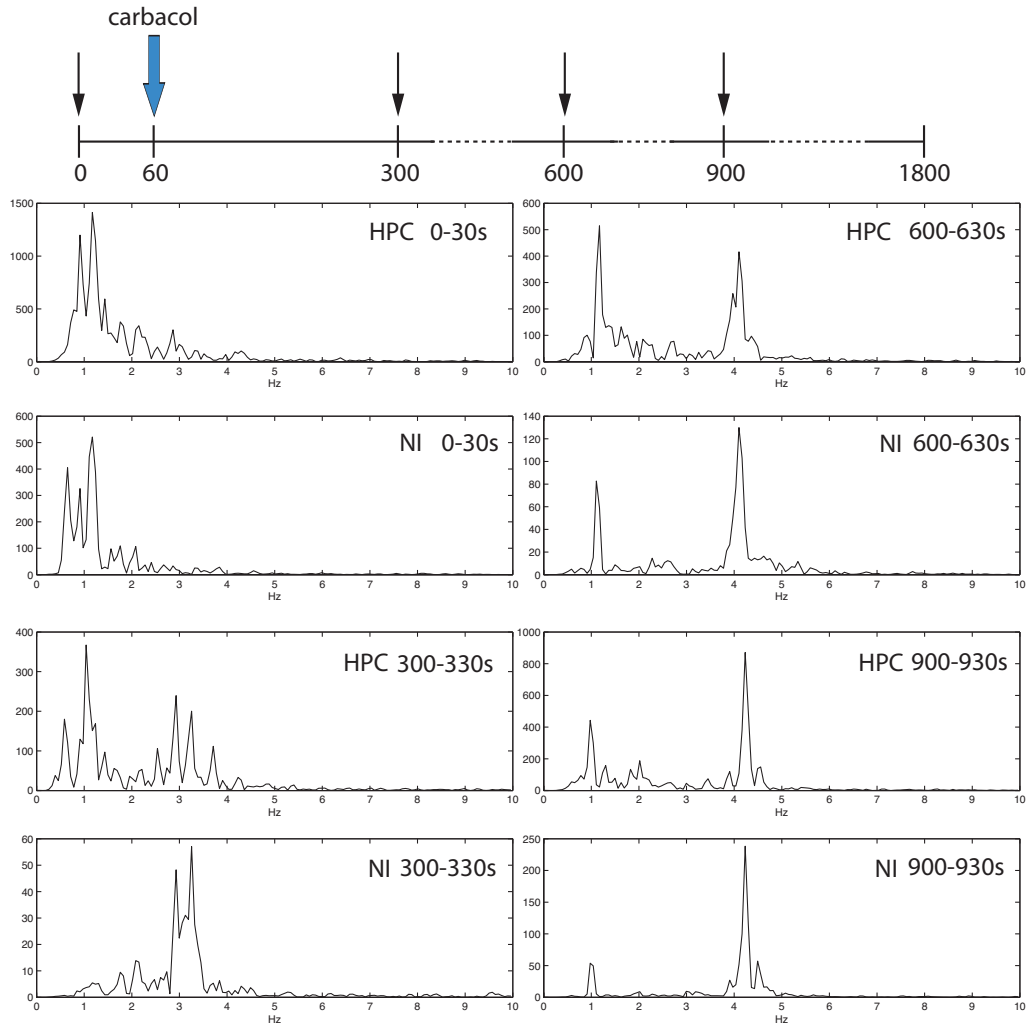


Figura 4.15: Arriba. Protocolo de inyección y registro. Abajo. Espectro de potencias en hipocampo y NI (30s) a los tiempos 0, 300, 600 y 900s.

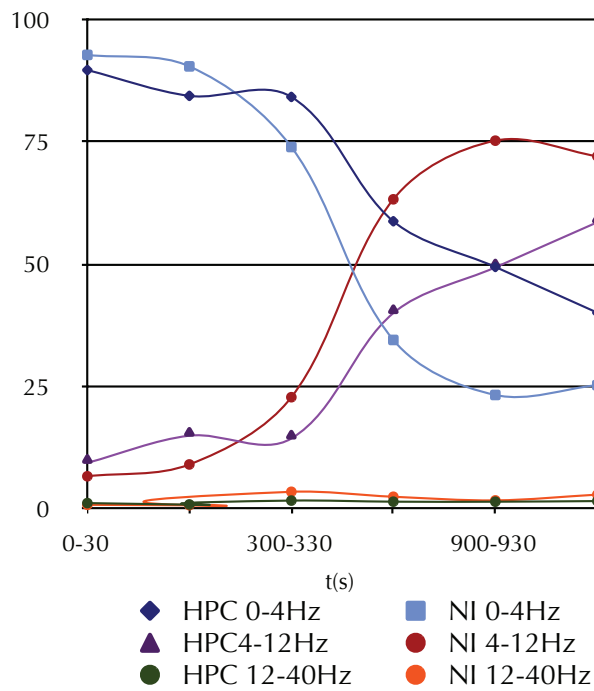


Figura 4.16: Evolución temporal de la potencia relativa de cada banda para el caso mostrado en la Figura 4.15. Se muestra un descenso de ondas en la banda delta y un incremento en theta, más marcado en el caso de NI. La banda de 12-30 Hz permanece constante a lo largo del tiempo.

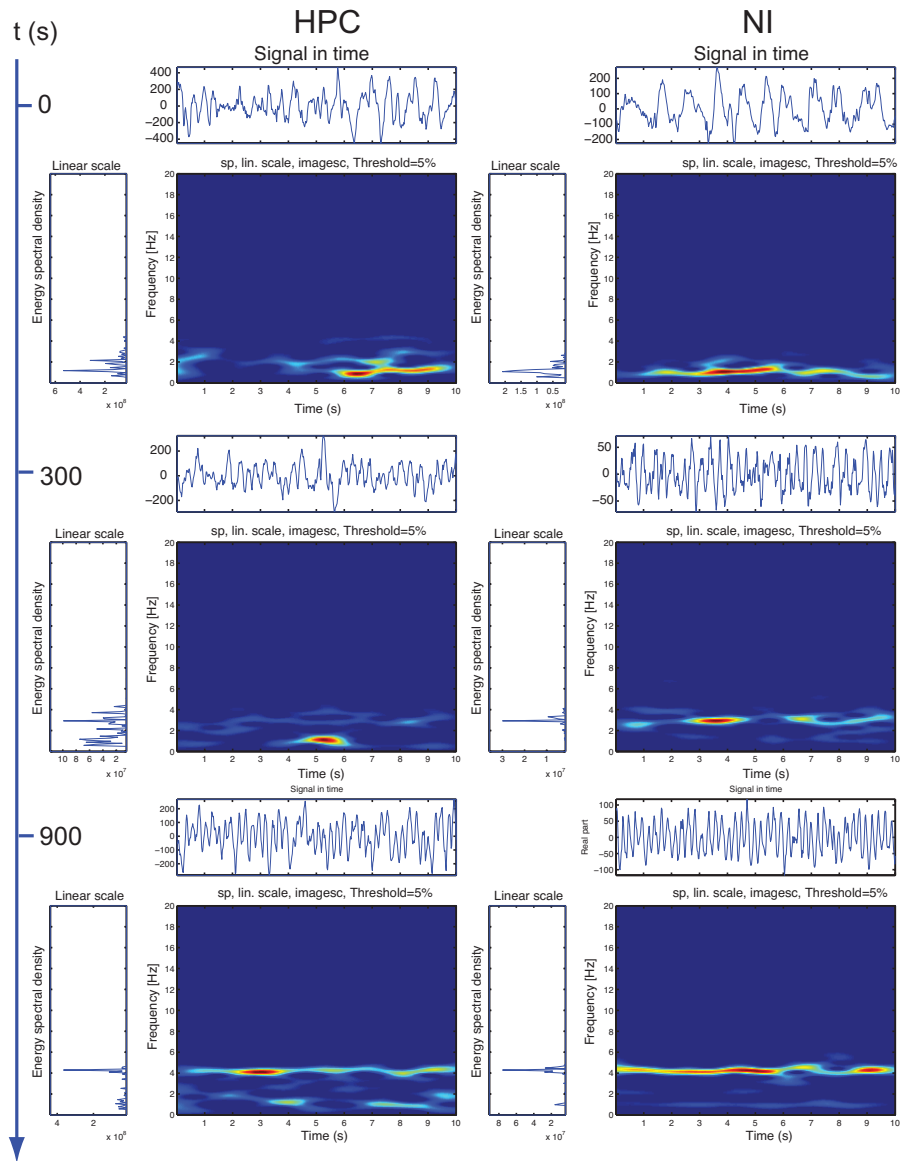
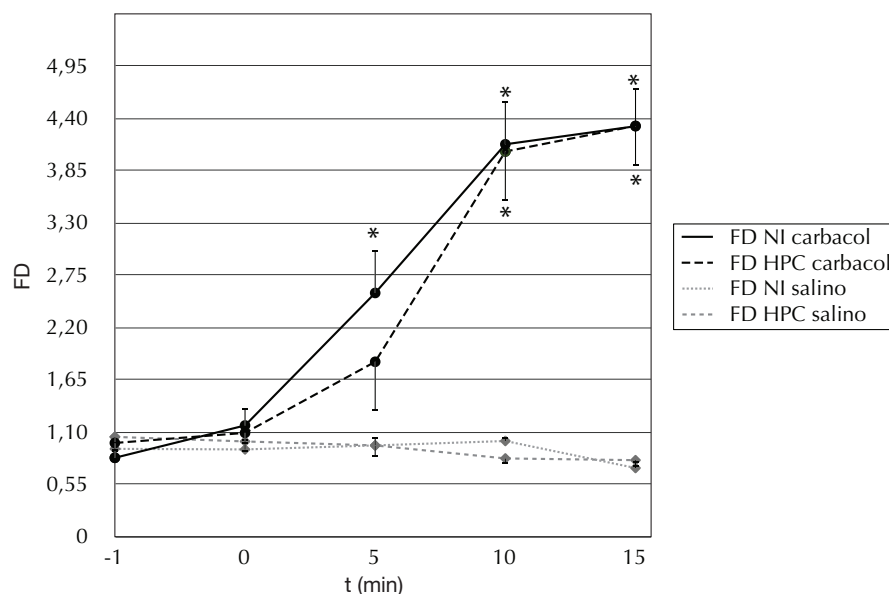


Figura 4.17: Evolución temporal de la densidad de energía espectral para el caso mostrado en las Figuras previas. Se muestran periodos de 10s en la transición desde el inicio hasta los 15 minutos de registro. Previamente a la inyección, la actividad se encuentra a frecuencias bajas en ambos registros. A partir del primer minuto desde la inyección de carbacol, comienza a observarse un incremento en la frecuencia. El descenso de actividad lenta es más patente en NI. Obsérvese que la frecuencia dominante alcanzada tras la inyección en ambos espectros es la misma.



CARBACOL											
FD hipocampo						FD NI					
periodo	t (min)	media	desv. est.	err. est.	p	post-hoc	media	desv. est.	err. est.	p	post-hoc
pre-infusion	-1	0,99	0,12	0,05	0,0032	-	0,83	0,09	0,09	0,0016	-
infusion	0	1,09	0,15	0,07		= pre	1,17	0,17	0,17		= pre
post-infusion1	5	1,84	0,45	0,20		= pre	2,56	0,45	0,45		≠ pre
post-infusion2	10	4,05	0,40	0,18		≠ pre	4,13	0,37	0,37		≠ pre
post-infusion3	15	4,32	0,33	0,15		≠ pre	4,32	0,79	0,79		≠ pre
SALINO											
FD hipocampo						FD NI					
periodo	t (min)	media	desv. est.	err. est.	p	post-hoc	media	desv. est.	err. est.	p	post-hoc
pre-infusion	-1	1,04	0,21	0,10	0,1185	-	0,96	0,20	0,10	0,609	-
infusion	0	1,02	0,28	0,14		-	0,87	0,29	0,15		-
post-infusion1	5	0,96	0,23	0,12		-	0,96	0,21	0,11		-
post-infusion2	10	0,81	0,27	0,13		-	0,94	0,24	0,12		-
post-infusion3	15	0,81	0,13	0,07		-	0,72	0,17	0,08		-

Figura 4.18: Evolución temporal de la frecuencia dominante. A los 5 minutos desde la inyección de carbacol en RPO, NI muestra un incremento significativo ($p < 0,05$) de la FD, mientras que el incremento en hipocampo no es tan acentuado. A los 10 minutos postinyección, las FD tienden a igualarse, por encima de 3 Hz y ambos canales muestran un aumento significativo respecto del control. A los 15 minutos puede observarse que las FD medias se igualan entre ambos canales. $*p < 0,05$

carbacol, NI ya muestra un incremento significativo de la FD ($p < 0,05$; test de Friedman), mientras que hipocampo tarda más en presentar un efecto significativo. La gráfica de evolución temporal muestra también que ambos canales tienden a alcanzar las mismas frecuencias tras la estimulación por carbacol. Pese a la variabilidad en las frecuencias alcanzadas, en todos los casos se observó esta tendencia. En los ejemplares estudiados, las frecuencias obtenidas mediante este tipo de estimulación no superaron los 6 Hz.

En conjunto, se observa que la inyección de carbacol produce una desaparición progresiva de las ondas lentas tanto en el hipocampo como en NI, más marcada en éste último y una sincronización de la actividad en la banda theta, más rápida en NI. Se observa también mediante este análisis que la actividad local de campo llega a exhibir la misma frecuencia en ambos canales tras la microinyección de carbacol.

Efecto de la estimulación sensorial

La oscilación theta puede registrarse en el hipocampo en ratas anestesiadas durante la estimulación sensorial. En este bloque de experimentos analizamos la relación entre la actividad de campo en NI e hipocampo en estas condiciones. Para este estudio, se realizaron un total de 24 registros en 7 animales.

Los resultados obtenidos reflejaron un efecto diferente en los canales de hipocampo y de NI producido por la estimulación sensorial.

La estimulación indujo una disminución instantánea de las ondas de 0-4 Hz y la aparición de actividad rítmica lenta, con una sincronización de la actividad en ambos canales (Figura 4.19). Se observó que, mientras que en hipocampo, esta actividad rítmica alcanzó las frecuencias de 4-6Hz, en NI, la oscilación adquirió una frecuencia de entre 3-5 Hz.

Al igual que en los otros dos tipos de estimulación, se realizó el estudio de la evolución temporal de la densidad de energía espectral, con el objetivo de obtener una mejor caracterización de la actividad de NI. Este análisis refleja un cambio en la actividad provocado por la estimulación sensorial, tanto en hipocampo como en NI (Figura 4.20). Durante la estimulación sensorial, desaparece la actividad a bajas frecuencias en ambos canales y se produce una sincronización de la actividad. En estas condiciones, en el hipocampo la frecuencia dominante supera los 4 Hz. Sin embargo, en NI la frecuencia dominante es ligeramente más baja.

El análisis estadístico de las distintas bandas de frecuencia theta también reveló un comportamiento diferente de hipocampo y NI tras la estimulación sensorial. En este caso se compararon únicamente los periodos control y estimulación, mediante el test de Wilcoxon. Como puede observarse en las Figuras 4.21 y 4.22, únicamente se obtuvieron resultados estadísticamente significativos en el canal del hipocampo. En este caso, la estimulación indujo un incremento en la energía espectral en las bandas Th1 ($p < 0.001$) y Th2 ($p < 0.005$). El canal de NI, sin embargo, no presentó un aumento significativo en ninguna de las dos bandas. El estudio de la coherencia, no obstante, refleja un incremento en la coherencia de las oscilaciones a frecuencias Th2 entre ambas bandas ($p < 0.001$).

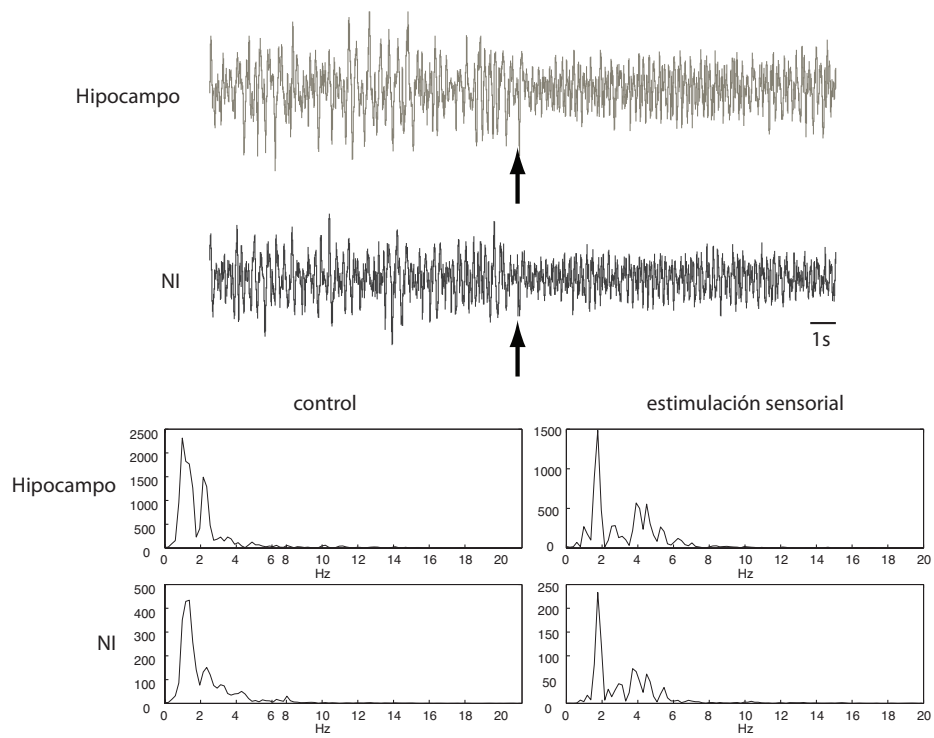


Figura 4.19: Ejemplo de registro en NI e hipocampo, con espectros de potencia realizados en ventanas de 10s antes del comienzo de la estimulación (izquierda) y durante la misma (derecha). La estimulación provoca un desplazamiento hacia frecuencias más rápidas, con aparición de picos a frecuencias ligeramente inferiores en NI que en hipocampo.

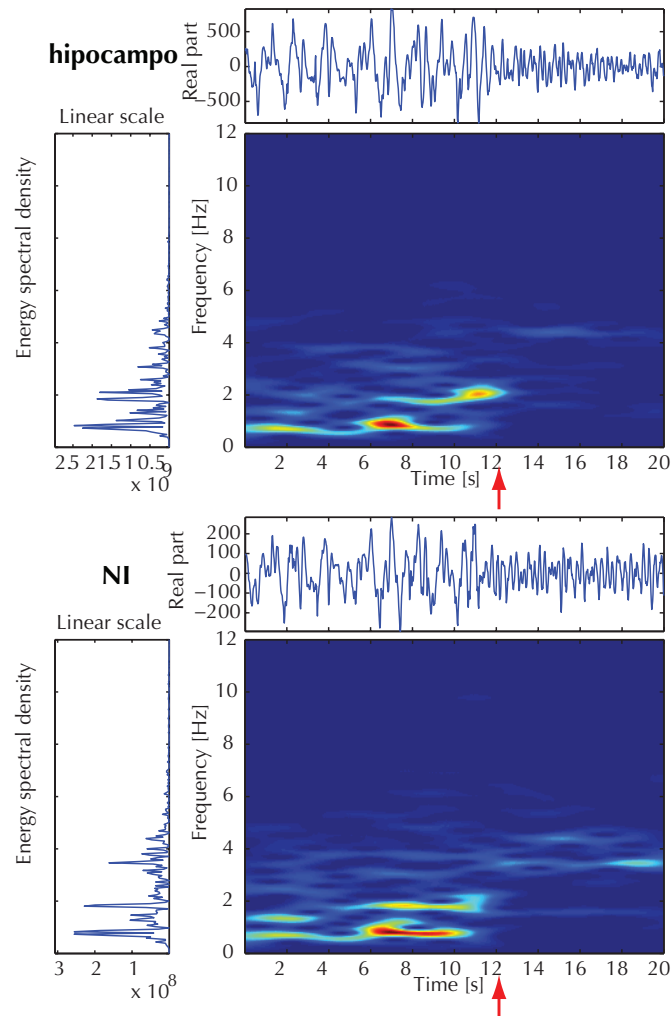


Figura 4.20: Evolución de la densidad de energía espectral en hipocampo (arriba) y en NI (abajo). Se muestra un tramo de registro en situación control seguido del correspondiente a una estimulación sensorial mediante *tail pinch*. La representación de la densidad espectral muestra una desincronización en la situación control, con predominio de actividad por debajo de 4 Hz. Tras la estimulación, la actividad se sincroniza, en ambos canales, a frecuencias cercanas a los 4 Hz. Se observan diferencias en las frecuencias alcanzadas en cada canal, resultando más bajas en NI.

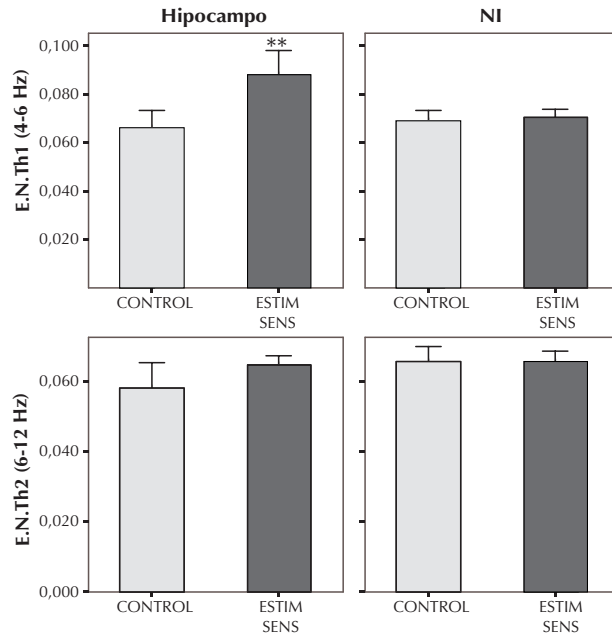


Figura 4.21: Efecto de la estimulación sensorial sobre la media de la actividad theta en hipocampo (izquierda) y NI (derecha), desglosado en actividad Th1 y Th2, analizando tiempos de 20s. En hipocampo, se observa un incremento en la energía espectral en la banda Th1. La estimulación induce también un incremento medio de Th2 pero no resulta significativo. En NI no resulta significativo en ninguna de las bandas. ** p<0.001

NI	ESTIMULACIÓN SENSORIAL							
	Th1				Th2			
	media	desv.est	error est	p	media	desv.est	error est	p
control	0,068	0,009	0,002	0,053	0,065	0,010	0,002	0,071
estimulación	0,069	0,007	0,001		0,065	0,008	0,002	
HPC	Th1				Th2			
	media	desv.est	error est	p	media	desv.est	error est	p
control	0,064	0,016	0,003	<0,001	0,057	0,016	0,003	0,019
estimulación	0,085	0,023	0,005		0,065	0,008	0,002	
NI-HPC	CTh1				CTh2			
	media	desv.est	error est	p	media	desv.est	error est	p
control	0,765	0,090	0,018	0,943	0,818	0,075	0,015	<0,001
estimulación	0,764	0,106	0,022		0,863	0,083	0,017	

Figura 4.22: Estadísticos descriptivos y significatividad proporcionada por el test de Wilcoxon para la energía espectral en las bandas Th1 y Th2 en los canales de NI e hipocampo y de la coherencia espectral entre ambos.

En conjunto, los resultados de estimulación sensorial reflejan que ésta induce una sincronización de la actividad oscilatoria en ambos canales y un incremento en la frecuencia dominante, desapareciendo la actividad a frecuencias menores a 2 Hz. No obstante, el efecto en hipocampo y en NI en este caso es diferente. Mientras que en el hipocampo las frecuencias alcanzan la banda theta, en NI resultan ligeramente más bajas. altas que en situaciones control. Paradójicamente, la coherencia entre las oscilaciones de hipocampo y NI en la banda Th2, se incrementó significativamente durante la estimulación sensorial.

Resumen

Los resultados obtenidos en este grupo de experimentos han permitido verificar la existencia de una oscilación a frecuencias theta en el NI en ratas anestesiadas con uretano. Esta actividad aparece en condiciones de generación pontina de ritmo theta en el hipocampo, mientras que el registro en situaciones control se corresponde con un EEG desincronizado con predominancia de frecuencias inferiores a 4 Hz. Cuando la generación de esta ritmicidad es originada por la estimulación eléctrica o colinérgica de RPO, se produce un incremento en la coherencia entre las oscilaciones en ambas estructuras. La estimulación eléctrica de RPO provoca que la oscilación en ambas estructuras se produzca a las mismas frecuencias, que resultan dependientes de la intensidad de corriente empleada. La estimulación colinérgica de RPO provoca que la sincronización a frecuencia theta se alcance antes en NI que en el hipocampo, siendo en este caso menores las frecuencias alcanzadas que mediante la estimulación eléctrica de RPO a alta intensidad. No obstante, la generación de ritmo theta en el hipocampo mediante estimulación sensorial no se ve correlacionada de forma tan exacta con la aparición de actividad theta en NI. En estas condiciones, las frecuencias alcanzadas en NI son ligeramente menores que en el hipocampo, si bien resulta evidente la desaparición simultánea de la actividad a frecuencias delta en ambos canales. En este tipo de estimulación se observa también un incremento en la coherencia entre ambos canales a frecuencias Th2, pese a no producirse un incremento en la energía espectral de la banda 4-12 Hz en NI.

4.2 ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DEL NI EN DIFERENTES ESTADOS DE ACTIVACIÓN

El descubrimiento, por una parte, de que la actividad neuronal del NI se incrementaba, bajo el efecto de la anestesia con uretano, durante periodos de theta hipocámpico y, por otra, de que la actividad de campo en este núcleo presentaba también periodos de sincronización, con una elevada correlación con el hipocampo, nos indujeron a plantear el estudio de ambas actividades, unitaria (multiunitaria) y de campo, en ratas no anestesiadas. La implicación del NI en la sincronización hipocámpica en el animal anestesiado sugería la posibilidad de que su actividad fuese equivalente también en periodos del ciclo de sueño y vigilia en que el ritmo theta es predominante, tales como la exploración activa

o el sueño REM. Por otra parte, la observación de que la integridad del NI era necesaria para la sincronización theta originada por estimulación de RPO pero no para su inducción mediante estimulación sensorial y las diferencias en cuanto a la actividad de campo en ambos tipos de estimulación ofrecía la posibilidad de que el NI estuviese implicado únicamente en una de las posibles vías de generación del theta. Observar la actividad tanto unitaria como de campo del NI en condiciones de movimiento libre suponía la posibilidad de establecer con mayor exactitud el papel que este núcleo podría desempeñar en la regulación de los estados de consciencia.

Con el objetivo de complementar los estudios realizados bajo el efecto de la anestesia con uretano, se analizó la actividad de campo y multiunitaria del NI en ratas no anestesiadas, con electrodos crónicos en hipocampo y NI.

Esta parte de nuestro trabajo fue realizada en el Laboratorio de Actividad Neuronal de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid (UAM), bajo la supervisión del Dr. Ángel Núñez.

Resultados

Para este estudio se emplearon seis animales ($n=6$) a los que se había implantado electrodos crónicos en hipocampo y NI. 29 registros fueron analizados tras comprobar la localización de los electrodos. Se promedió tramos de 30s en las distintas condiciones. Únicamente en 7 de los registros los animales exhibieron periodos de sueño, por lo que el estudio estadístico se restringió a estos casos. El reducido número de casos incluidos en el estudio cuantitativo hace de éste un análisis preliminar y requiere una verificación futura.

En general se pudo observar un elevado grado de correlación entre las actividades locales de campo en hipocampo y en NI, mostrando ambos canales patrones oscilatorios similares en los distintos estados del animal. Los resultados sugieren que la actividad neuronal en NI se incrementa en la vigilia durante los periodos de vigilancia o de exploración. Esta actividad disminuye, en cambio, durante el sueño de ondas lentas, pero se incrementa hasta un nivel cercano a la vigilia tranquila durante el sueño REM. Los resultados indican además que en el animal no anestesiado también es posible registrar actividad theta en NI y que su patrón de aparición es similar al observado en el hipocampo, incrementándose durante la vigilia activa y el sueño REM.

Diferencias en la actividad entre vigilia tranquila y activa

En primer lugar, se analizó la actividad de NI durante el estado de vigilia. Se descartó el estudio de los periodos de actividad motora para evitar la interferencia de artefactos provocados por el movimiento. En cuanto al estudio del potencial de campo, en la vigilia tranquila se observó un patrón desincronizado, con actividad theta en el hipocampo inferior al 30% y poca actividad rápida (12-30 Hz). Durante los periodos de actividad exploratoria -olfateo- o de estimulación auditiva, se observó un aumento de las oscilaciones en la banda theta en los dos canales. En estos estados, la actividad neuronal detectada en

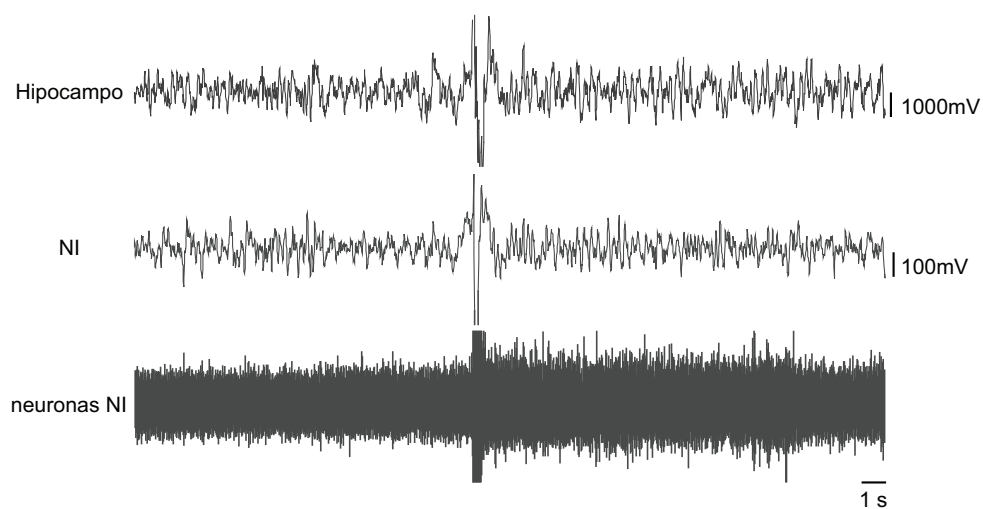


Figura 4.23: Ejemplo de registro empleado, con incremento en el estado de activación provocado por estimulación sensorial. En verde, registro de campo hipocámpico. En rojo, arriba, registro de campo en NI. Abajo, registro multiunitario en NI. Al estimular al animal (mediante un chasquido), la actividad neuronal en NI se incrementa de forma correlativa al incremento de actividad theta tanto en hipocampo como en NI. Tras cesar la estimulación, la actividad, tanto neuronal como de campo en NI y en hipocampo, retorna a valores propios de la vigilia tranquila.

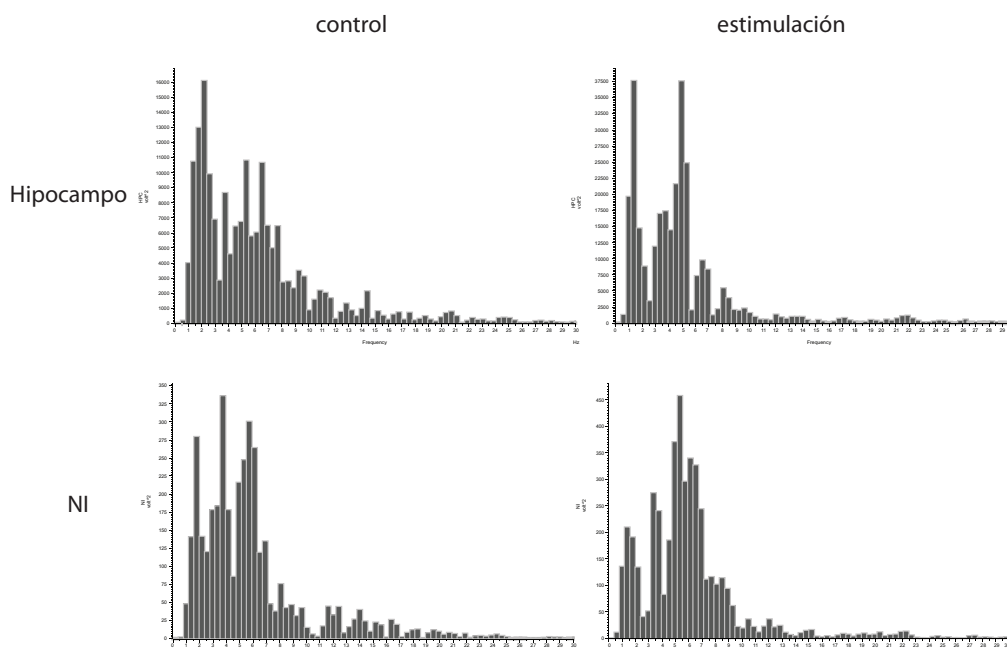


Figura 4.24: Espectros de potencia correspondientes al registro mostrado en la Figura 4.23. Se representa la actividad en los 10 s. previos a la estimulación y en los 10 s. inmediatamente posteriores. Se observa una sincronización de la actividad en la banda theta, con un pico máximo a 5.5 Hz tanto en hipocampo como en NI.

el registro multiunitario también aumentó respecto de la vigilia tranquila. En la Figura 4.23 se muestra un ejemplo de registro, en un tramo de estimulación sensorial del animal. En la Figura 4.24 se han representado los espectros de potencia correspondientes a este registro. Como puede observarse, inmediatamente tras la realización de un estímulo sonoro, se pudo observar un incremento de la banda theta, desplazándose la actividad hacia frecuencias más altas que antes del estímulo. El estudio de estas estimulaciones puntuales reflejó también que la estimulación sensorial auditiva inducía el reinicio en la actividad oscilatoria local tanto en hipocampo como en NI (Figura 4.25).

Respecto de la actividad neuronal en NI, como puede observarse en las Figuras 4.23 y 4.26, la estimulación indujo un incremento en la frecuencia de disparo en NI. La actividad neuronal disminuyó progresivamente tras cesar la estimulación, simultáneamente a la recuperación de un EEG correspondiente a la vigilia tranquila.

Durante periodos de actividad theta por exploración espontánea sin locomoción, con olfateo, (Figura 4.27) se encontró un elevado grado de similitud entre ambos registros, presentando frecuencias similares en NI e hipocampo, como se observa en el espectro de potencia de ambos canales (Figura 4.28). La

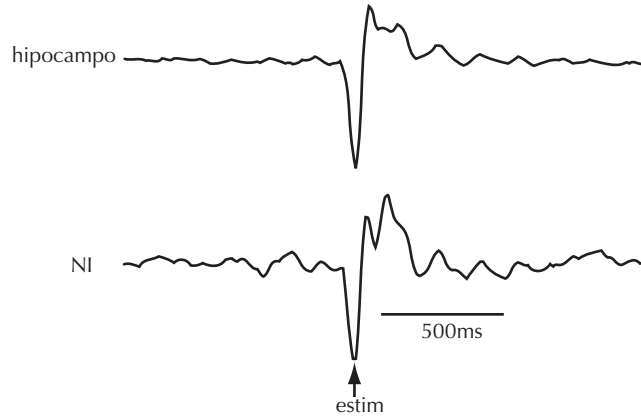


Figura 4.25: Reinicio de la actividad local de campo a frecuencias theta tras la estimulación sensorial del animal (mediante un chasquido). Indica una sincronización de la actividad de campo tanto en el hipocampo como en NI. En este caso, la frecuencia alcanzada en ambas oscilaciones es de 7.57 Hz.

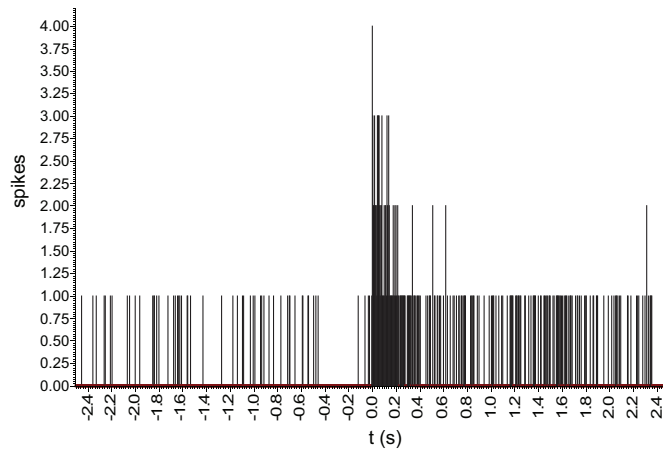


Figura 4.26: Histograma periéstímulo de la actividad unitaria en NI. Puede observarse como la actividad neuronal aumenta tras la estimulación (9 espigas/s en los 2s previos a la estimulación; 45 espigas/s en los 2s tras la estimulación), disminuyendo a partir de los 600 ms (promedio tomado tras 4 estímulos).

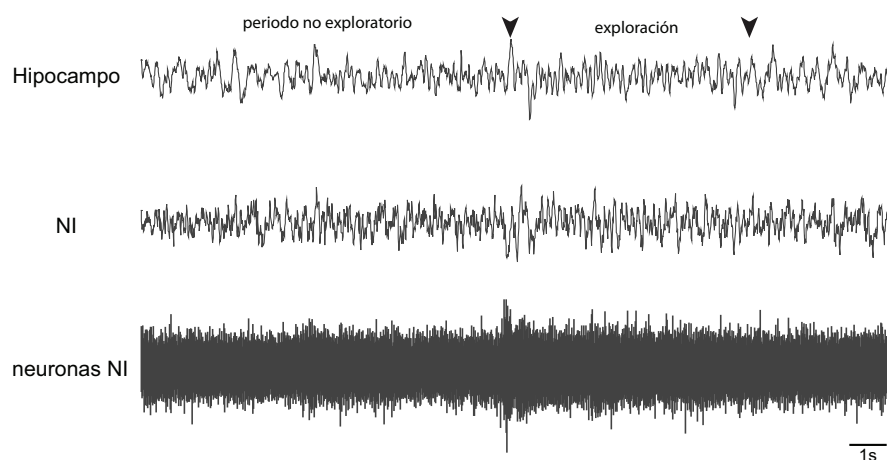


Figura 4.27: Registro correspondiente a un periodo theta en vigilia activa inducido por actividad exploratoria sin locomoción, con olfateo.

actividad exploratoria indujo la sincronización de la actividad en ambos canales dentro de la banda theta. Además, pudo observarse cómo la exploración producía un incremento en la correlación entre ambos canales, como puede observarse en esta misma Figura.

Pese a tratarse de registros multiunitarios, en estos tramos de mayor actividad theta tanto en hipocampo como en NI se observó que algunas de las neuronas registradas mostraban un patrón de disparo correspondiente a neuronas rítmicas, a frecuencia theta. El reducido ratio señal/ruido obtenido en los registros no permitió el aislamiento claro de neuronas individuales, por lo que no se cuantificó en este estudio de forma sistemática la frecuencia de disparo de las neuronas de NI. No obstante, la actividad neuronal rítmica observada se representa en la Figura 4.29.

Diferencias entre el sueño y la vigilia

Se estudió también la actividad de NI durante los periodos de sueño. Se observó que, durante el sueño de ondas lentas, la actividad neuronal del núcleo disminuyó respecto de la vigilia. En la Figura 4.30 se puede comparar la actividad de sueño con la vigilia tranquila en un tramo en el que se registra el despertar del animal. Se puede observar el incremento de actividad neuronal que se producía en NI durante el despertar, así como un incremento en la frecuencia de las oscilaciones. Durante el sueño REM, en cambio, se observó una mayor actividad en NI, tanto neuronal como de campo, respecto de la presente en el SWS, similar a la observada durante la vigilia tranquila. La actividad de campo experimentó un incremento de la banda theta durante el sueño REM, mientras que los cambios en sueño lento no fueron significativos.

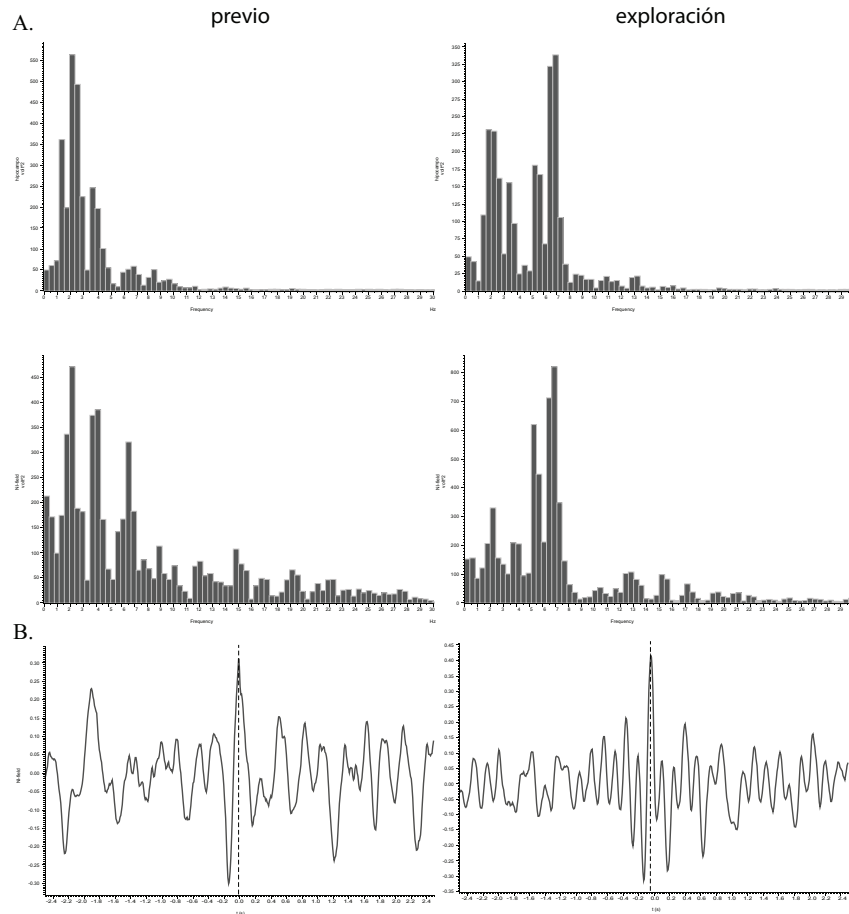


Figura 4.28: Actividad de hipocampo y NI antes y durante la actividad exploratoria. A. Espectros de potencia realizados en hipocampo y NI correspondientes al registro mostrado en la Figura 4.27. En el periodo no exploratorio se observan espectros diferentes en ambos canales. Durante la exploración se observa la aparición de un pico máximo de actividad a frecuencias similares en ambos espectros, cercano a 6.5 Hz. B. La correlación entre las oscilaciones de NI (ordenadas) e hipocampo (abscisas) muestra un incremento durante la exploración.

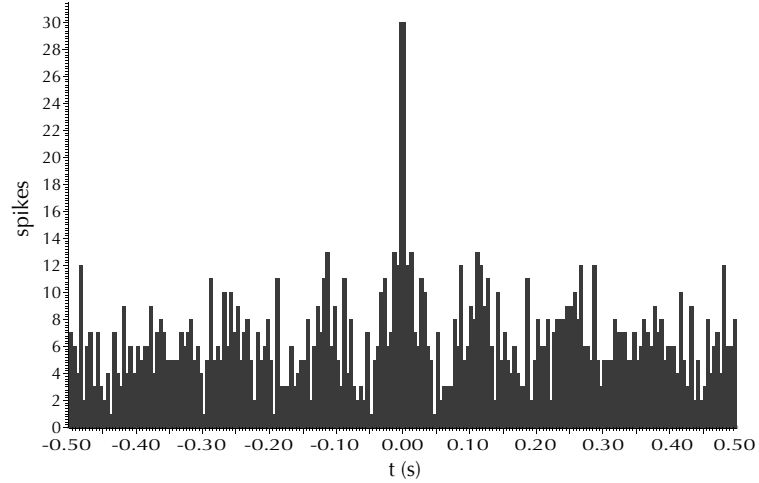


Figura 4.29: ACH multiunitario de NI, posiblemente rítmicas a frecuencia de aproximadamente 8.3 Hz.

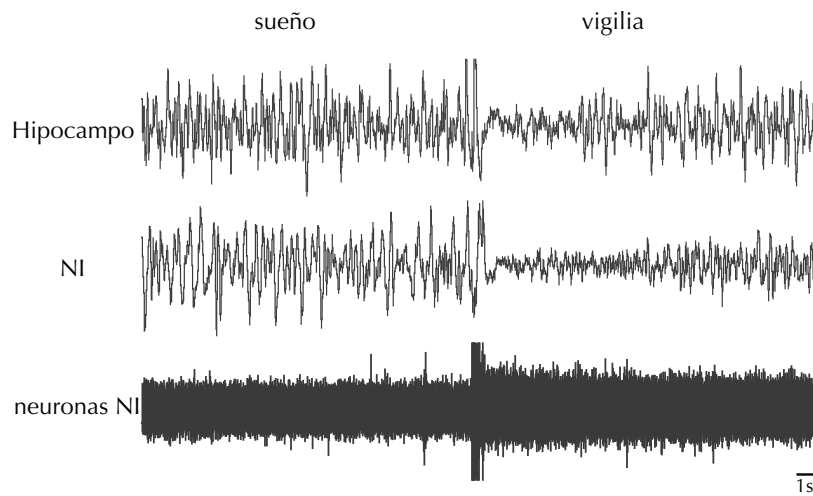


Figura 4.30: Diferencias en la actividad de NI en el sueño y la vigilia. Se observa un incremento en la actividad neuronal en NI en el despertar, simultáneo a una disminución en la amplitud de la actividad de campo, que muestra una elevada similitud con el EEG hipocámpico.

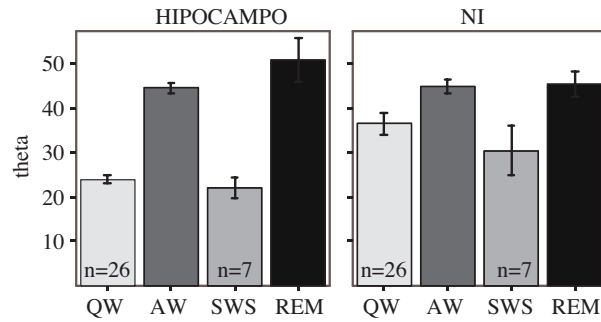


Figura 4.31: Diferencias en la actividad theta de hipocampo y NI en el sueño y la vigilia en el conjunto de registros estudiados. La banda theta aumentó de manera clara durante la vigilia activa y el sueño REM. En SWS no se pudo observar un descenso marcado en ninguno de los dos canales.

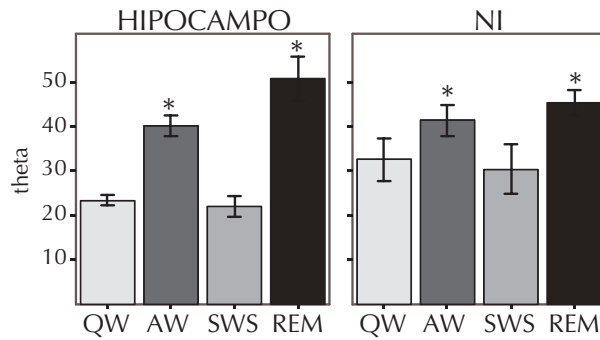


Figura 4.32: Diferencias en la actividad theta de hipocampo y NI en el sueño y la vigilia en los casos en que se registraron periodos de sueño. Los incrementos de la actividad theta durante la vigilia activa y el sueño REM resultaron significativos, mientras que el descenso en SWS no alcanzó significación estadística. * $p < 0.05$

	COMPARACIÓN POR ESTADOS											
	% THETA HIPOCAMPO				% THETA NI				ACTIVIDAD NEURONAL NI (frecuencia relativa a QW)			
	media	desv.est	error est	p	media	desv.est	error est	p	media	desv.est	error est	p
QW	23,40	3,18	1,20	-	32,57	12,95	4,89	-	1,00	0,00	0,00	-
AW	40,28	6,15	2,33	0,02	41,39	9,21	3,48	0,03	1,44	0,51	0,19	0,02
SWS	21,98	6,02	2,28	0,74	30,40	14,89	5,63	0,50	0,52	0,22	0,08	0,02
REM	50,83	13,07	4,94	0,02	45,35	7,67	2,90	0,02	1,03	0,50	0,19	1,00

Figura 4.33: Resultados obtenidos en el estudio de los casos en que se pudo registrar los cuatro estados. Las comparaciones múltiples (no mostradas) también reflejaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los estados de SWS y REM en todos los casos.

Cualitativamente, el estudio de la actividad neuronal y de campo en NI se realizó en el total de registros analizados. Para ello, se estudió la actividad de NI en los diferentes estados de activación incorporando al estudio los tramos de sueño del animal, diferenciando en periodos de sueño de ondas lentas y REM. Como muestran las Figuras 4.31 y 4.34, el número de tramos analizados en cada estado fue distinto. Debido a la diferente cantidad de registros, las comparaciones múltiples para el estudio estadístico se limitaron a los casos en que pudieron registrarse todos los periodos. Los resultados obtenidos en este subgrupo de casos coincidió con lo observado en el total, como puede observarse comparando estos resultados con los mostrados en las Figuras 4.32 y 4.35.

Las comparaciones se realizaron mediante el test de Wilcoxon. Durante la vigilia tranquila, la potencia de la banda theta en el hipocampo resultó de $23.40 \pm 1.20\%$ y de $35.57 \pm 4.89\%$ en NI. En vigilia activa, aumentó significativamente hasta un $40.28 \pm 2.33\%$ en hipocampo y $41.39 \pm 3.48\%$ en NI. Durante el sueño de ondas lentas, no se observaron diferencias estadísticamente significativas, resultando de $21.98 \pm 2.28\%$ en hipocampo y $30.40 \pm 5.63\%$ en NI. En los periodos de REM, alcanzó $50.83 \pm 4.94\%$ en hipocampo y $45.35 \pm 2.90\%$ en NI, suponiendo en este caso un incremento significativo. Comparaciones no mostradas evidenciaron que el cambio entre ambas fases del sueño resultó significativo ($p < 0.05$).

Debido al carácter multiunitario de los registros de actividad neuronal en NI, ésta se analizó respecto de la registrada en la vigilia tranquila. Se observó que durante la vigilia activa aumentó 1.44 ± 0.19 veces su valor y que durante el sueño de ondas lentas se redujo hasta un 0.52 ± 0.08 de su valor control, resultando ambos significativos ($p < 0.05$). Durante el sueño REM, aumentó significativamente respecto del sueño SWS (no mostrado), alcanzando un valor similar al de la vigilia tranquila, de 1.03 ± 0.19 .

Resumen

Los datos estadísticos reflejados en este estudio han de interpretarse únicamente como orientativos, debido al reducido número de registros en los que coexistieron los cuatro estados analizados. Los resultados observados reflejan un

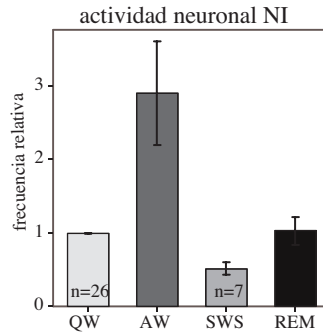


Figura 4.34: Diferencias en la actividad neuronal en NI en los distintos estados, en el conjunto de registros analizados. La actividad durante la vigilia activa experimenta un gran aumento con respecto a la vigilia tranquila. Durante el sueño de ondas lentas, disminuye por debajo del control, mientras que en sueño REM se mantiene a nivel similar a la vigilia tranquila.

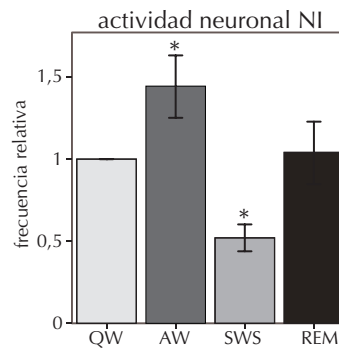


Figura 4.35: Diferencias en la actividad neuronal en NI en los distintos estados, en los casos en que se pudieron registrar todos ellos. Tanto el incremento en la actividad durante durante la vigilia activa como el descenso durante el sueño de ondas lentas resultaron significativos, mientras que en sueño REM la actividad no varió significativamente respecto de la vigilia tranquila. * $p < 0.05$

incremento en la actividad de las neuronas y en la potencia relativa de la banda theta en NI en la vigilia activa respecto de la vigilia tranquila. La actividad neuronal disminuye durante el sueño de ondas lentas, no coincidiendo en este caso con un descenso claro en la banda theta ni en hipocampo ni en NI en los resultados estadísticos. Durante el sueño REM, la actividad theta experimenta un incremento en NI. La actividad neuronal en este estado es similar a la hallada en la vigilia tranquila. No obstante, esta actividad sí resulta significativamente mayor a la observada durante el sueño de ondas lentas. La actividad de campo experimentó una variación en los distintos estados similar a la observada en el hipocampo.

5 RESULTADOS II

UNA RUTA PONTO-SEPTAL PARA CONTROLAR LA GENERACIÓN DEL RITMO THETA HIPOCÁMPICO.

Los estudios de conexiones de NI existentes hasta la fecha no proporcionaban una explicación de los resultados obtenidos en el análisis de la actividad de NI. Por una parte, la tasa de disparo en NI experimentaba un incremento de forma ortodrómica tras la estimulación en RPO. Por otro lado, la lesión de NI suprime el efecto de esta estimulación sobre la generación de ritmo theta en el hipocampo. Ambos descubrimientos apuntan a la existencia de una proyección desde RPO a NI. El trabajo de Goto y cols. (2001) descartaba esta conexión y el estudio posterior realizado por nuestro grupo sugería una proyección en sentido contrario Olucha-Bordonau et al. (2003). Con el objetivo de elucidar los fundamentos conectivos que subyacen al papel de NI en el control troncoencefálico del ritmo theta, una parte del estudio realizado ha consistido en la verificación de las proyecciones aferentes a NI desde la formación reticular. Este estudio ha sido realizado mediante la inyección de trazador retrógrado en NI y verificado a través de la inyección de trazador anterógrado en RPO.

Por otra parte, no se conocen conexiones directas desde RPO hasta SM/BD, por lo que, basándose principalmente en la fisiología, se acepta la existencia de una ruta multisináptica a través de SUM. Dado el patrón de conexiones de NI, se ha analizado la posibilidad de que exista una vía multisináptica a través de NI. Para ello se ha planteado un estudio mediante inyección simultánea de trazador retrógrado en SM/BD y anterógrado en RPO. Este estudio permitiría, además, comparar las posibles vías a través de NI y SUM.

Resultados

Las conexiones aferentes del NI previamente descritas por Goto y colaboradores Goto et al. (2001) y por nuestro grupo Olucha-Bordonau et al. (2003) permitieron hipotetizar una implicación del NI en la generación del ritmo theta hipocámpico, lo que pudo verificarse tras los experimentos de estimulación del

NI con registro en hipocampo Nuñez et al. (2006). Como continuación del trabajo de tesis citado, en el presente estudio se profundizó en la caracterización electrofisiológica de dicha participación, tal y como ha sido descrito en la sección anterior.

La detección de potenciales ortodróxicos en los experimentos de estimulación en RPO con registro unitario en NI y los resultados presentados del efecto de la lesión de NI sobre el efecto de RPO sobre la activación hipocámpica apuntaban a la existencia de una conexión anatómica desde RPO hacia NI, descartada por el grupo de Goto Goto et al. (2001). La verificación de la existencia de dicha ruta fue, en consecuencia, el objetivo primero de esta fase de nuestro trabajo. Por otra parte, la intensa proyección desde NI sobre el complejo SM/BD permitiría suponer que el efecto, al menos parcialmente, de la estimulación de NI sobre el hipocampo tenía lugar a través del complejo septal. En esta parte de nuestro estudio se intentó, además de comprobar la proyección de RPO a NI, analizar si, en parte, ésta se realizaba sobre neuronas de proyección septal.

Para alcanzar este objetivo, en primer lugar intentamos reproducir los experimentos de Goto y colaboradores de inyección de trazador anterógrado en NI (n=9) y comparar nuestros resultados con los obtenidos en su estudio. En este caso, nuestro análisis se centró especialmente en los niveles reticulares. Esta parte del estudio se complementó con la inyección de trazador anterógrado a distintos niveles de RPO (n=4). Además, se realizaron inyecciones de trazador retrógrado en SM/BD (n=6). Por último, con el objetivo de visualizar las posibles rutas multisinápticas desde RPO hacia SM/BD se realizaron inyecciones simultáneas de trazador retrógrado en SM/BD y anterógrado en RPO (n=5). La localización de las inyecciones se ha representado de forma esquemática en la Figura 5.1.

Los resultados que se describirán en mayor detalle a continuación serán aquellos más relevantes para clarificar las rutas pontoseptales y los que supusieron diferencias que consideramos señaladas respecto a lo descrito previamente.

Atendiendo a las divisiones experimentales de esta parte del trabajo, se describirán los cuatro de los 24 ejemplares que se consideraron más significativos. En estos casos, las inyecciones fueron muy restringidas en los lugares deseados y presentaron escasa o nula difusión a áreas cercanas o debida al trazo de la pipeta.

5.1 INYECCIÓN DE TRAZADOR ANTERÓGRADO EN RPO

El estudio de la inyección sencilla de trazador anterógrado en RPO se basó en 4 casos en los que se utilizó BDA unido a fluoresceína o miniruby. En tres de estos casos, el punto de inyección fue restringido en RPO sin presentar difusión a áreas adyacentes. Este estudio se complementó con los ejemplares utilizados para inyección doble de trazador anterógrado y retrógrado. En los ejemplares estudiados, las inyecciones se localizaron principalmente en la porción media del total de extensión rostro-caudal del núcleo y a distintos niveles dorso-ventrales (ver Figura 5.1).

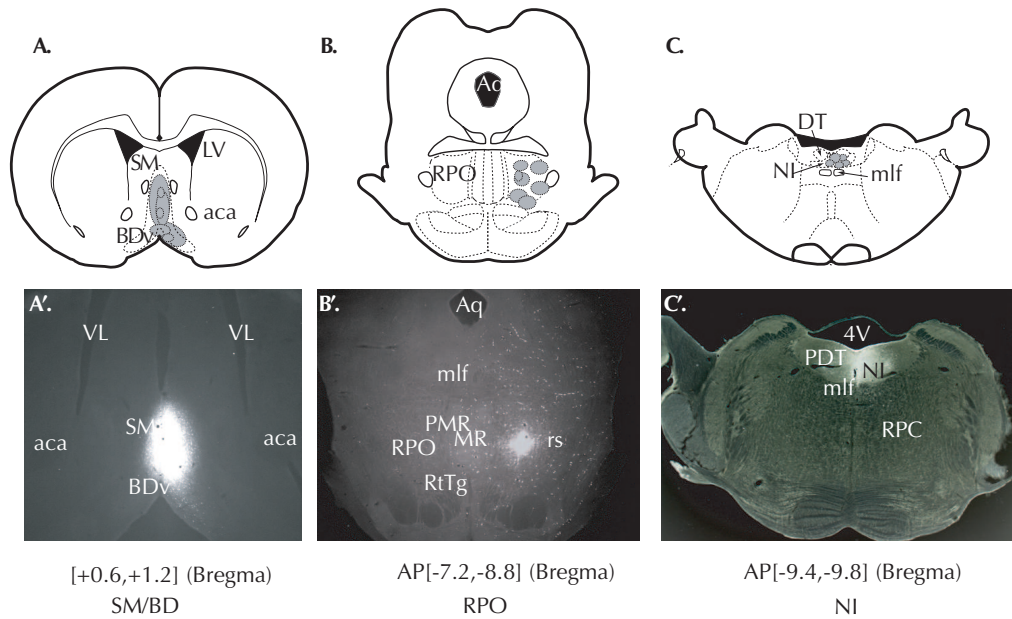


Figura 5.1: Representación esquemática de las localizaciones más representativas de las inyecciones de (A) FG en SM/BD, (B) BDA o miniruby en RPO y (C) fluorogold en NI. Téngase en cuenta que, tanto en SM/BD como en RPO, se representan las inyecciones correspondientes a los experimentos de inyección sencilla y a los de doble inyección de trazador retrógrado y anterógrado. Únicamente se describen en el texto las inyecciones con difusión mínima a áreas adyacentes. Las coordenadas antero-posteriores de los niveles se indican en cada Figura respecto a bregma. Fotomicrografías de fluorescencia de casos representativos en SM/BD y RPO mostradas en (A') y (B'), respectivamente y fotomicrografía de campo claro de un ejemplar con inyección de fluorogold en NI revelado con DAB. Para las abreviaturas, ver Anexo.

Núcleos reticulares del tronco

A lo largo de toda la extensión rostro-caudal estudiada, se observó un patrón de abundantes fibras y aparentes terminales que presentaban un marcaje con trazador anterógrado. Pese a que gran parte de fibras marcadas cruzaban inmediatamente desde la zona de inyección en RPO al área contralateral, una elevada proporción permanecieron en el lado ipsilateral, recorriendo toda la extensión reticular del puente, a lo largo de todos los niveles rostro-caudales de RPO e incluyendo fibras que alcanzaban la porción caudal del núcleo, RPC y el núcleo reticular gigantocelular, llegando incluso a niveles medulares ventrales.

Tegmento pontino

En el tegmento pontino, el marcaje fue preferentemente ipsilateral, pese a presentarse marcaje contralateral tanto en el tegmento ventral como en el dorsal. Pudo observarse cierto marcaje de fibras que penetraban en el fascículo longitudinal medial (mlf). Sin embargo, con mayor frecuencia, los grupos de axones parecían atravesar el fascículo para alcanzar el área del tegmento dorsal, donde presentaron aspecto de terminales. Este grupo de axones condensados en el tegmento fue el marcaje más intenso observado en áreas pontinas. La concentración más elevada de fibras y terminales aparentes fue apreciada en el NI, donde se pudo distinguir de manera notablemente significativa (ver Figura 5.2). A estos niveles, las fibras invadían de manera clara ambas subdivisiones del NI: tanto la división medial (*pars compacta*) como la lateral (*pars dissipata*), con preferencia ipsilateral. Se observaron fibras que cruzaban la línea media. En los niveles más caudales, en los que el NI coexiste con el posterodorsal tegmental (PDT), las fibras de RPO ocuparon también la región dorsal a éste, inmediatamente ventral al epéndimo, que apareció invadido también por axones marcados. Atendiendo a las subdivisiones que hacen Paxinos y Watson de esta estructura nuclear Paxinos y Watson (1986); Paxinos et al. (1999), esta región es identificada como sustancia gris del puente (CGPn) y la consideramos una subdivisión del NId subventricular al cuarto ventrículo. No obstante, pese a la elevada intensidad de fibras marcadas en estos niveles, éstas se ubicaron en todos los casos rodeando los núcleos dorsal tegmental (DT) y PDT. En estos núcleos se localizaron únicamente escasas fibras y, en estas ocasiones, aparentemente, los cruzaban en dirección a la periferia del tegmento. La distribución de fibras marcadas puede observarse también en las Figuras 5.8, 5.7 y 5.9, correspondientes a las inyecciones dobles.

A niveles más rostrales, los núcleos LDT, LC y subcoeruleus (SubC) dorsomedial tegmental (DMTg) presentaron una densidad de fibras significativa aunque menos intensa que en el NI.

Se observó también un marcaje moderado de terminales y fibras en el núcleo ventral tegmental y su cápsula, predominantemente ipsilateral, así como en el núcleo dorsal del rafe (DR).

Las columnas lateral y ventrolateral de la sustancia gris periacueductal (PAG) presentaron un patrón de axones marcados dispersos, pero continuo a

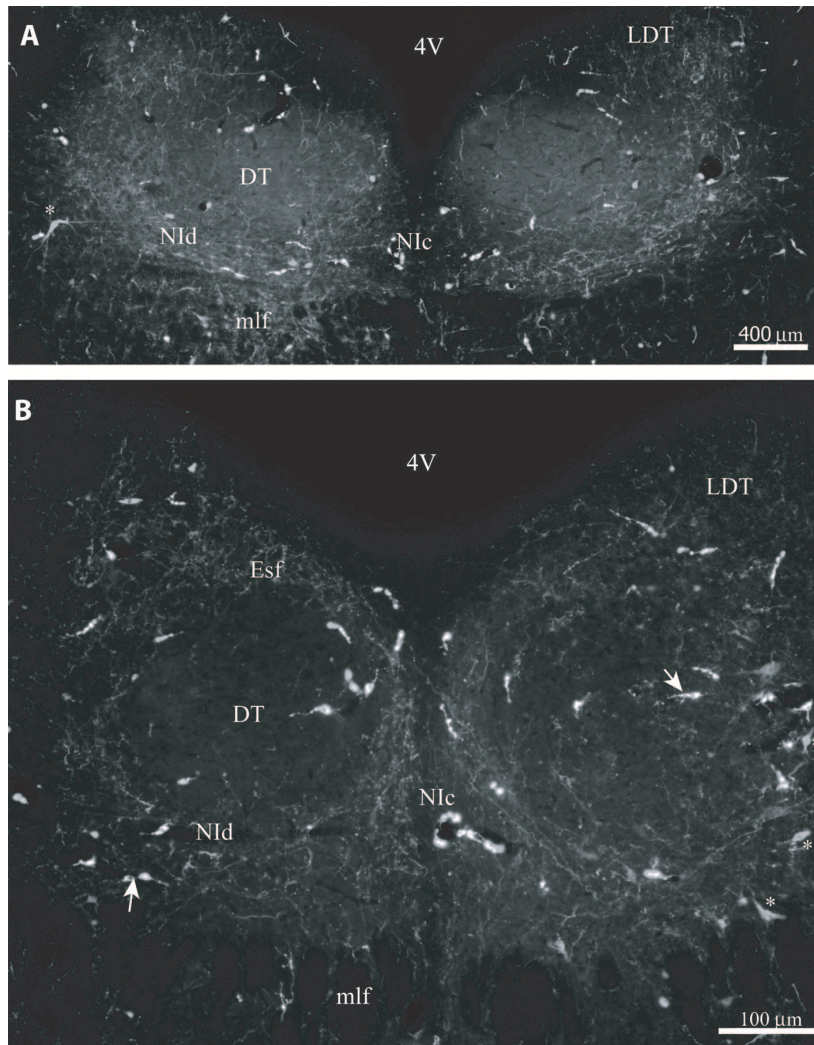


Figura 5.2: Fotomicrografía de fluorescencia del marcaje anterógrado tras inyección de miniruby en RPO. (A) Nivel rostral del NI y núcleos tegmentales adyacentes. A pesar de que la porción NIc es reducida a este nivel, se observan ya fibras con aspecto de terminales. En el NId el marcaje es abundante y bilateral, rodeando ventralmente al DT, en el que se observan pocas fibras. LDT también muestra marcaje anterógrado bilateral consistente. (B) Detalle del marcaje en un nivel más caudal del NI. El marcaje en la porción compacta resulta más evidente y con continuidad con el NId. Se observan fibras que cruzan la línea media. Se mantiene el marcaje en LDT, continuándose dorsalmente al DT y ventral al epéndimo, en Esf. Se detecta fluorescencia originada por somas marcados retrógradamente debido al bajo peso molecular del miniruby (asterisco) y por la respuesta glial (flecha). Para las abreviaturas, ver Anexo.

lo largo de su extensión. A estos mismos niveles, se pudo distinguir marcaje anterógrado en el núcleo pedunculopontino (PPT), con extensiones de marcaje de terminales en el complejo cuneiforme.

Además del marcaje anterógrado propio del minirruby, su bajo peso molecular le confiere cierta proporción de transporte retrógrado, tal y como se comentó en el capítulo Material y Métodos. Este hecho supone que los núcleos que proyectan de forma profusa sobre el punto de inyección presenten un marcaje retrógrado de somas.

En estos niveles, aparecieron somas marcadas a distintos niveles reticulares. En la parte rostral, cerca de los niveles de inyección, el marcaje fue tanto ipsilateral como contralateral. A nivel más caudal, en RPC, el marcaje fue predominantemente ipsilateral.

En el tegmento, el marcaje retrógrado nos permitió verificar la proyección desde NI al RPO. A niveles más rostrales, el principal marcaje retrógrado apareció en PPT.

5.2 INYECCIÓN DE TRAZADOR RETRÓGRADO EN NI

Con el objetivo de visualizar la proyección desde RPO hasta NI sugerida por los resultados descritos de potenciales evocados en NI por estimulación de RPO, realizamos inyecciones de trazador retrógrado en el área dorsomedial del tegmento pontino. Obtuvimos 9 casos (n=9) con inyección de fluorogold centrada principalmente en el NI.

Las coordenadas fueron seleccionadas para evitar en lo posible la difusión de trazador a los núcleos vecinos, principalmente DR, DT y PDT. Para ello, se procuró realizar las inyecciones en las porciones más caudales de NI. En la mayor parte de casos, los depósitos de trazador se procuraron hacer mediales, en NIc. En los casos en que la inyección se realizó en NI_d, la coordenada de profundidad fue tomada más ventral. El tránsito del tracto mlf limitó la difusión de trazador anterógrado hacia los núcleos RTg, a DMTg y al núcleo del RPn. En cinco de los casos, la inyección se limitó a NI, sin difusión a áreas vecinas. El reducido tamaño del núcleo condiciona que en estos casos, las inyecciones fueran extremadamente reducidas. Como control, se emplearon inyecciones en las áreas vecinas mencionadas.

En general, el marcaje observado correspondió con el descrito en el trabajo de Goto y colaboradores Goto et al. (2001), excepto en el caso de los niveles reticulares.

Las principales fuentes de aferencias se localizaron en el MR y en el núcleo del rafe paramediano (PMR), en el núcleo interpeduncular y en habénula lateral (LHb). También de acuerdo con estudios previos, se encontraron somas marcadas en SM/BD, principalmente en la banda diagonal, en SUM, PH, área lateral hipotalámica, zona incerta y en la periferia del tracto mamilar. Cabe señalar aquí que el marcaje encontrado en la región hipotalámica resultó menos intenso que en el tegmento, descrito en detalle más adelante.

Marcaje retrógrado en niveles pontinos

El estudio sistemático de los niveles pontinos (ver Figura 5.3) reveló una proyección consistente desde los núcleos reticulares pontinos hacia el NI. Se encontraron somas marcadas a lo largo de toda la extensión rostro-caudal y dorso-ventral de RPO y RPC, preferentemente en el lado ipsilateral. La mayor concentración de neuronas con marcaje retrógrado se detectó en los niveles ventrales y ventromediales de RPO. La distribución diseminada de los somas neuronales en los niveles reticulares implicó que la visualización de neuronas marcadas requiriese de la inspección detallada de todo el espesor de cada sección.

A estos mismos niveles, también apareció marcaje retrógrado en PPT y en la periferia de mlf y el tracto rubroespinal (rs), rodeándolos. Un número señalado de neuronas marcadas apareció también en RtTg, en su porción ventral a RPO. En el tegmento, se detectó marcaje en DR, lo que no puede ser excluido como efecto de cierta difusión de trazador.

A nivel técnico, cabe señalar que el revelado del marcaje simple intensificado con níquel permitió la visualización en RPO de un mayor número de somas, aunque también originó un mayor marcaje de fondo que suscitó confusión en la identificación a bajos aumentos. El revelado sin níquel, sin embargo, pese a presentar un marcaje menos profuso, permitió la visualización más nítida de los somas marcados. Las diferencias entre ambos tipos de revelado pueden apreciarse en las Figuras 5.5 y 5.4.

5.3 INYECCIÓN DE TRAZADOR RETRÓGRADO EN SM/BD

La distribución de neuronas que proyectasen a SM/BD se estudió mediante la inyección de fluorogold como trazador retrógrado .

Para confirmar los límites de la proyección a SM/BD, se obtuvieron seis (n=6) ejemplares con inyección confinada al área medial septal. De éstos, dos recibieron inyecciones centradas en el septum medial (MS; n=2), y cuatro presentaron difusión o la recibieron centrada en la banda diagonal de Broca, porción vertical (DBv; n=4). El área medial septal resulta sencilla para la realización de inyecciones localizadas de trazadores mediante iontoforesis. En ninguno de los casos estudiados para esta descripción hubo difusión al septum lateral.

Marcaje en el tegmento pontino

El patrón de proyecciones observado fue muy similar en todos los ejemplares (ver Figura 5.6). Se encontró un patrón muy denso de somas marcadas en toda la extensión rostro-caudal del NI, tanto en la *pars compacta* como en la *pars dissipata*. La proyección bilateral desde NI se manifestó muy claramente y en gran contraste con las estructuras vecinas. En el área adyacente del tegmento dorsal, únicamente se observaron células marcadas de forma dispersa en el LC, LDT y el núcleo de Barrington (Ba). Se encontró también marcaje de somas

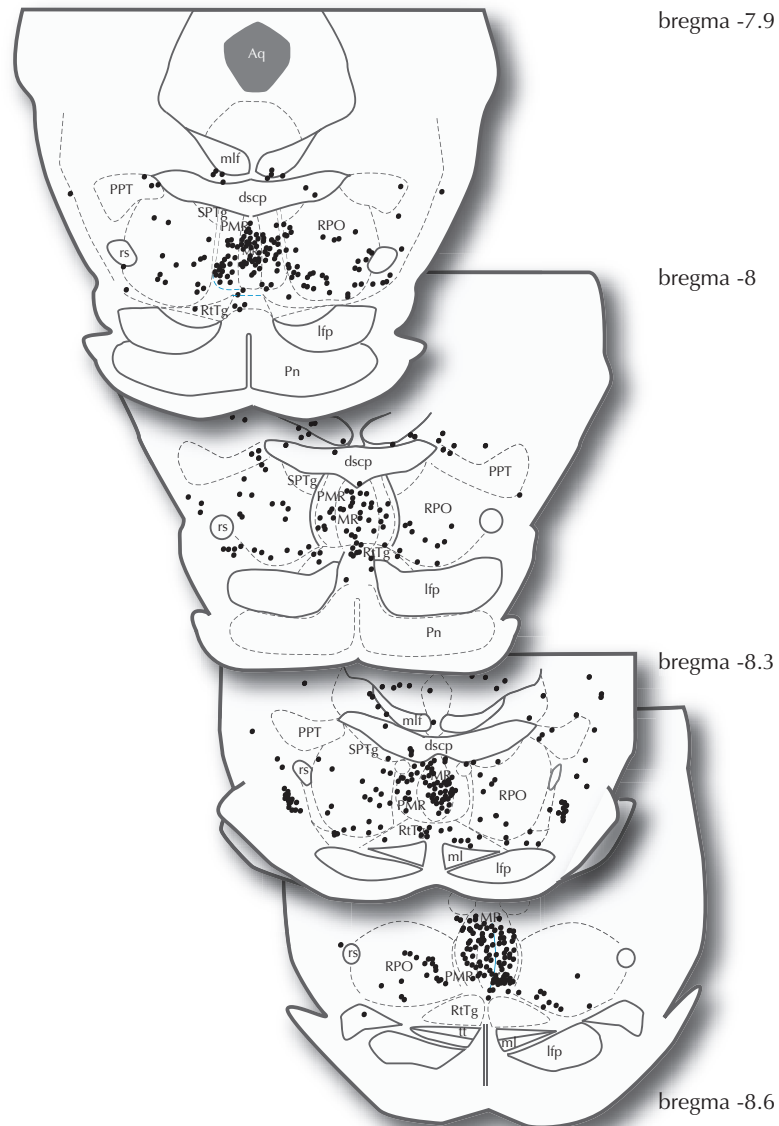


Figura 5.3: Diagramas esquemáticos de los somas marcados retrógradamente (puntos negros) en niveles pontinos tras la inyección de fluorogold en NI. Los diagramas corresponden al estudio bajo un objetivo de 40x. La inyección de fluorogold dio como resultado el marcaje de somas en todos los niveles rostrocaudales de RPO. Tal y como se muestra, se encontraron neuronas marcadas retrógradamente también en los núcleos MR, PMR, PPT, RtTg y rodeando los haces mlf y rs. Para las abreviaturas, ver Anexo.

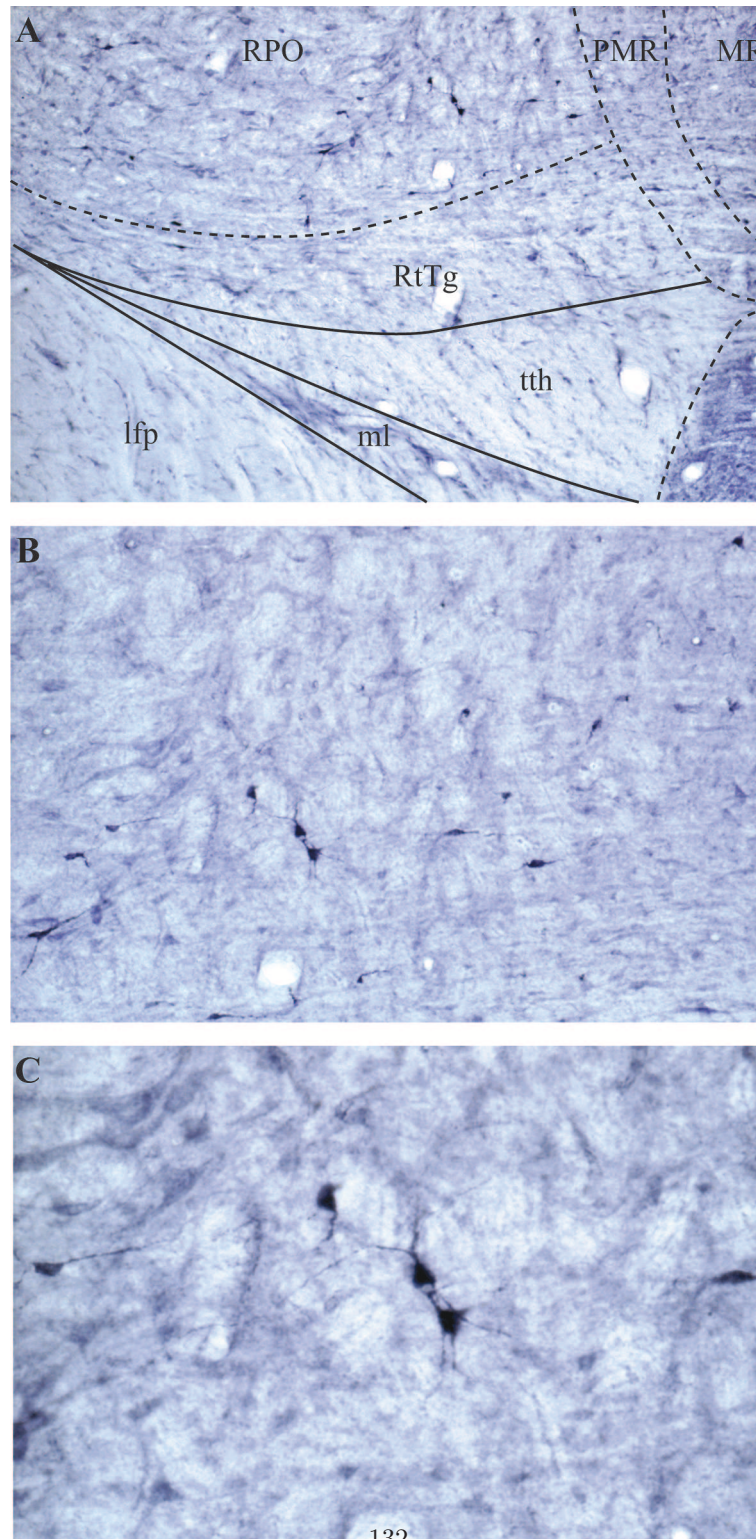


Figura 5.4: Fotomicrografía en campo claro tras revelado intensificado con níquel del marcaje retrógrado tras inyección de FG en NI. (A) Distribución de somas en RPO y núcleos adyacentes. Se observa un marcaje intenso en MR y algo menos en PMR. En RPO, el marcaje retrógrado es disperso, de forma coherente a la distribución neuronal en esta región. Se detectaron algunos somas marcados en RtTg. (B) Ampliación de la región ventral de RPO. (C) Detalle de somas con marcaje retrógrado. Apréciase la distribución reticular de los somas, dispersos entre haces de fibras. Para las abreviaturas, ver Anexo.

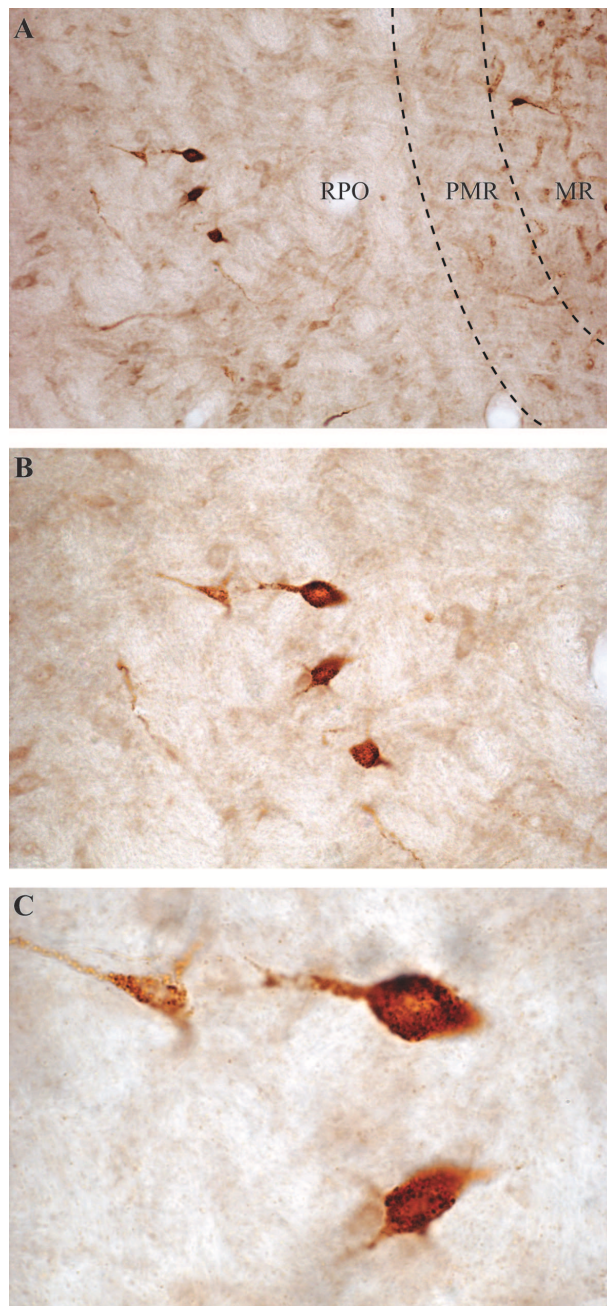


Figura 5.5: Fotomicrografía en campo claro tras revelado sin níquel del marcaje retrógrado tras inyección de FG en NI. (A) Se aprecia de nuevo la distribución dispersa de somas marcados en RPO en comparación con el claro marcaje en los núcleos del rafe (MR y PMR), con una distribución neuronal más compacta. (B) y (C) Detalles de somas de RPO con proyección a NI. Para las abreviaturas, ver Anexo.

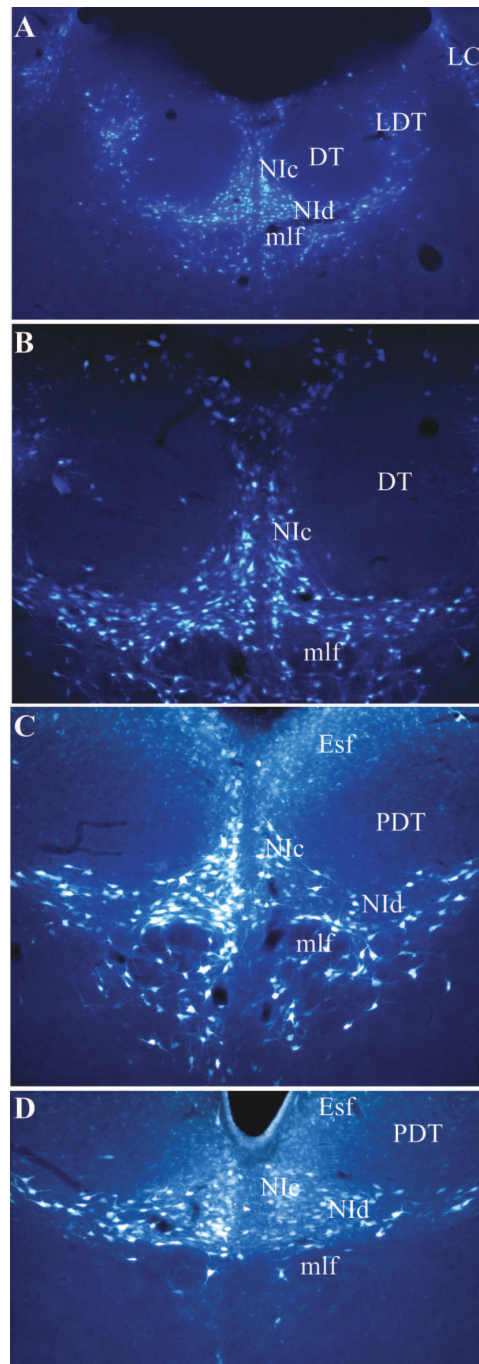


Figura 5.6: Fotomicrografía de fluorescencia del marcaje retrógrado tras inyección de FG en SM/BD en varios niveles rostrocaudales del NI. Para las abreviaturas, ver Anexo.

rodeando el mlf e invadiendo la zona inmediatamente ventral. El rafe pontis (RPn) presentó también células marcadas retrógradamente. Cabe señalar que únicamente la zona ventral en la porción más caudal de DR presentó células con marcaje retrógrado. Esta zona había sido previamente caracterizada como el polo más rostral del NIc Olucha-Bordonau et al. (2003) y en los ejemplares estudiados presentaba una clara continuidad con el marcaje en niveles caudales más característicos de NI. Por tanto, se consideró excluida la proyección desde DR. Tampoco se encontró marcaje retrógrado en el núcleo DT ni PDT.

Marcaje en núcleos reticulares pontinos

Tras el análisis detallado de áreas reticulares, el marcaje en RPO y RPC resultó escaso o nulo, de acuerdo con los estudios previos que señalan a la conexión ponto-septal como una ruta multisináptica.

Marcaje retrógrado en otras áreas relevantes

A pesar de que nuestro estudio se centró principalmente en delimitar las aferencias al área medial septal desde el tegmento pontino, se pudo visualizar también un patrón de proyección significativo desde otras estructuras que merecen atención para la clarificación de las aferencias del SM/BD.

También en la región del puente, se encontró marcaje retrógrado intenso en los núcleos del rafe mediano y paramediano. A nivel de diencéfalo, como se muestra en la Figura 5.17, destacó el marcaje de somas en la región del hipotálamo posterior, en los núcleos posterior hipotalámico (PH) y supramamilar (SUM) y en la región hipotalámica lateral, incluyendo las divisiones tuberal y perifornical del núcleo lateral hipotalámico y en el cuerpo mamilar lateral. En el epitálamo se localizaron cuerpos celulares marcados en el núcleo medial de la habénula.

5.4 INYECCIÓN SIMULTÁNEA DE TRAZADOR RETRÓGRADO EN SM/BD Y ANTERÓGRADO EN RPO

Se llevaron a cabo experimentos de doble inyección de trazadores con el propósito de realizar una descripción completa de las rutas multisinápticas completas desde RPO hasta MS/DB. En este grupo de experimentos, se obtuvieron cinco animales (n=5) con depósitos de fluorogold en MS/DB y miniruby en RPO. Los resultados obtenidos en estas inyecciones fueron complementados con los experimentos de inyección sencilla previamente descritos.

Los resultados observados en este grupo de ejemplares fueron coherentes con los obtenidos en los experimentos de inyección única de trazador.

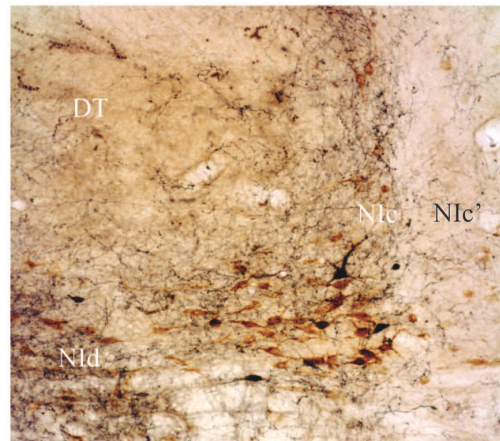
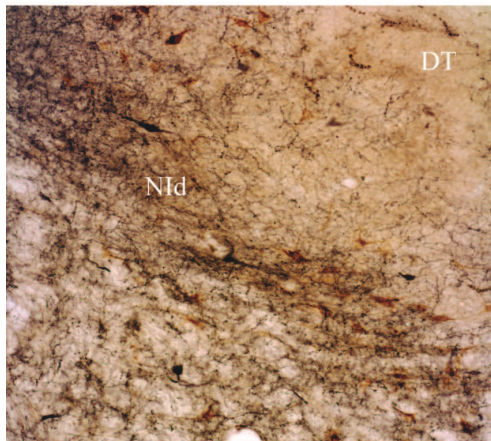
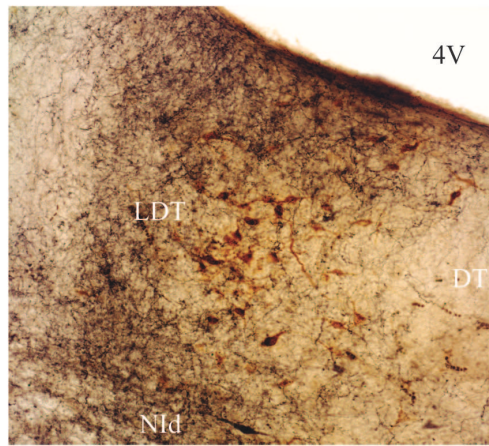
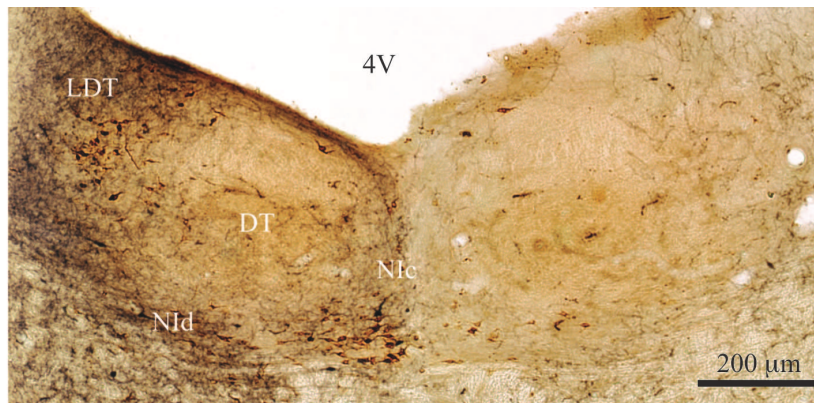


Figura 5.7: Fotomicrografía a 20x y ampliaciones a 40x de un nivel rostral de NI en el que se muestran dobles marcajes desde RPO (negro) y SM/BD (marrón). Para las abreviaturas, ver Anexo.

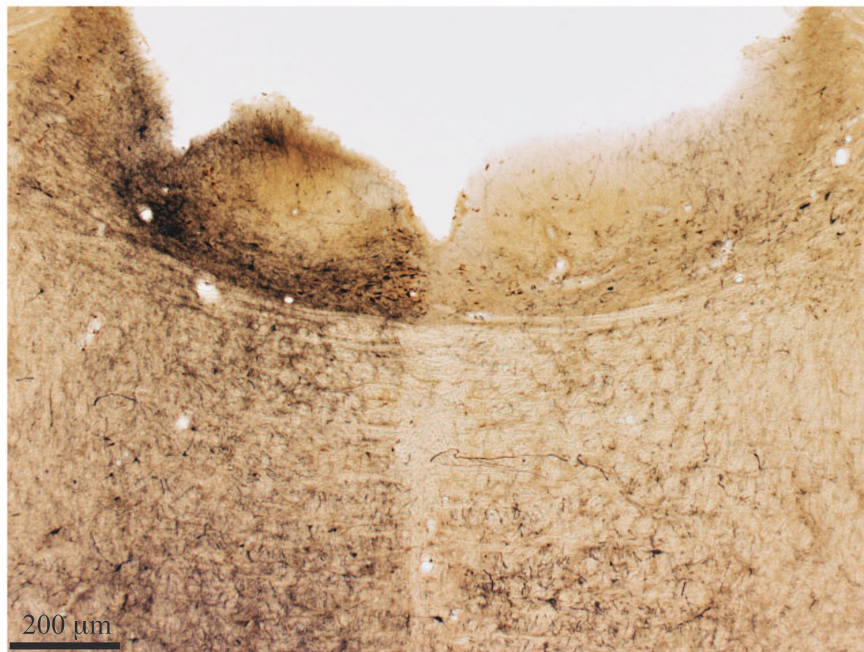
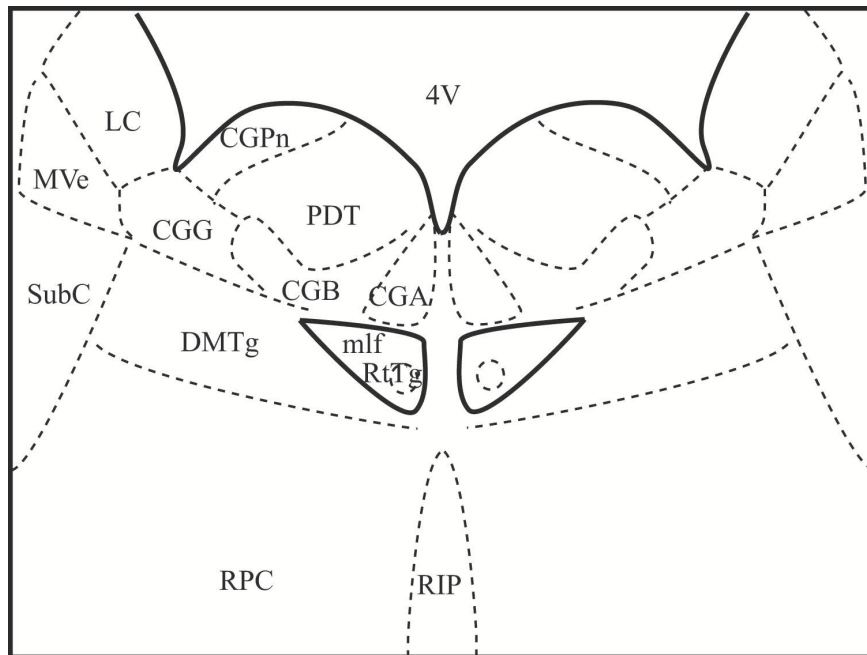


Figura 5.8: Arriba. Parcelación del tegmento pontino a niveles caudales de NI. Abajo. Fotomicrografía a 20x a nivel equivalente al perfil con dobles marcajes. Para las abreviaturas y equivalencias, ver Anexo.

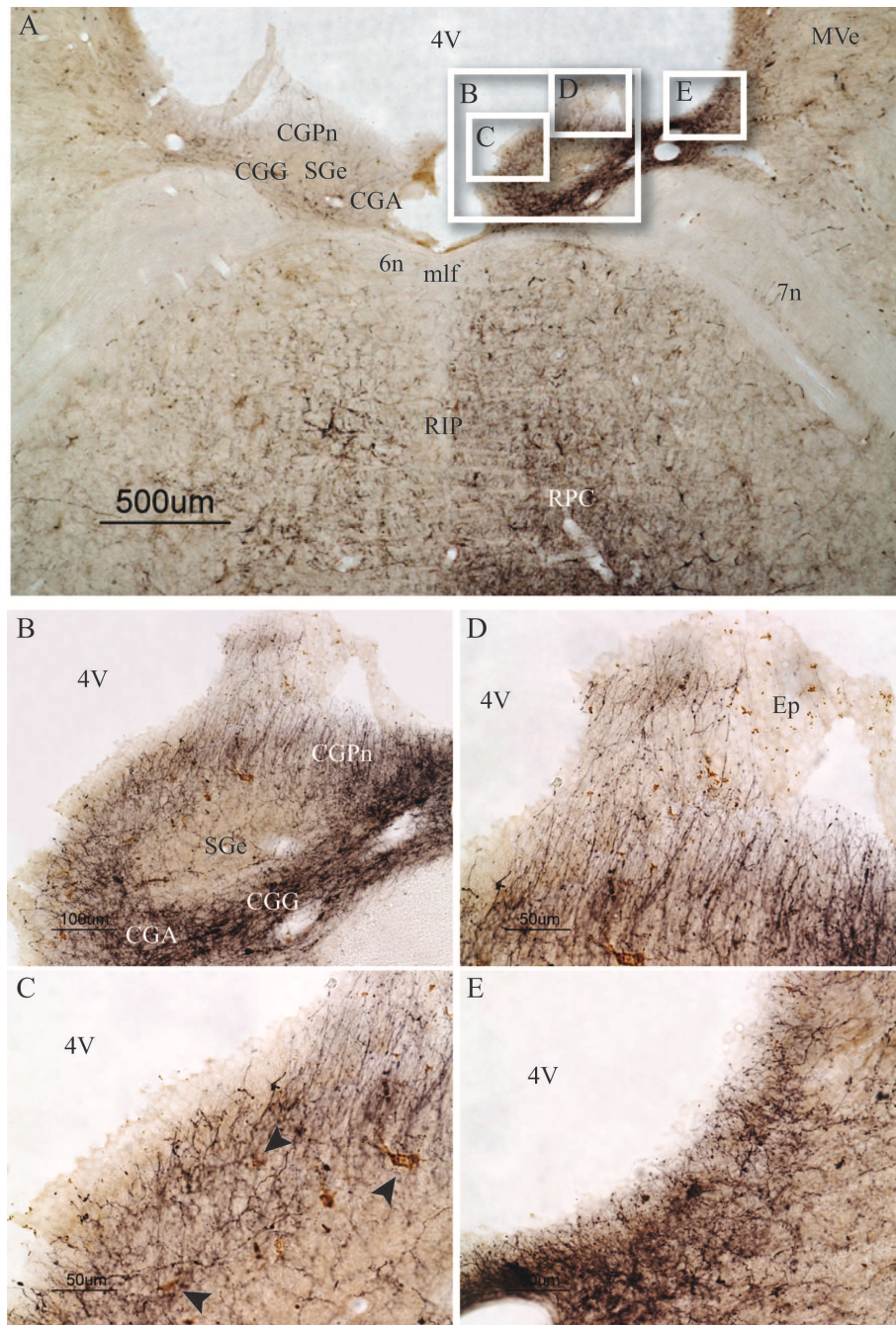


Figura 5.9: Fotomicrografía de marcaje anterógrado desde RPO y retrógrado desde SM/BD en los últimos niveles del NI. Se observa un marcaje muy intenso en el tegmento, en las regiones CGA, CGB y CGPn, con una orientación clara de las fibras hacia el 4V, observándose dobles marcajes también en la región más dorsal. Para las abreviaturas, ver Anexo.

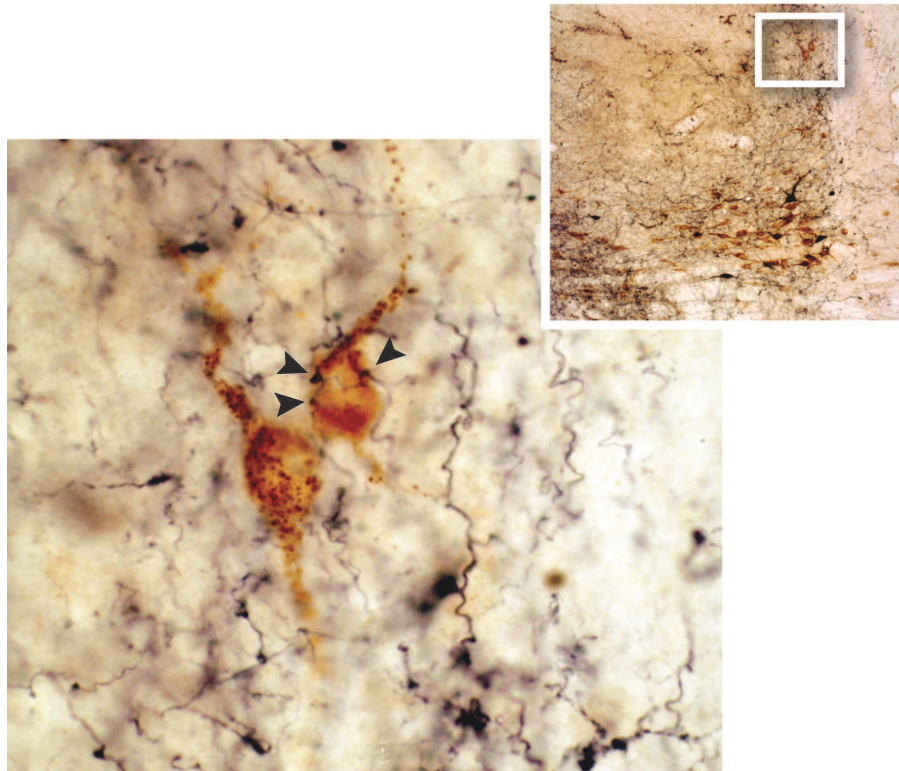


Figura 5.10: Fotomicrografía a 100x de neuronas en la región medial y rostral de NI que proyectan a SM/BD (marrón) y fibras procedentes de RPO. Las puntas de flecha indican botones sinápticos de estas fibras sobre neuronas de proyección.

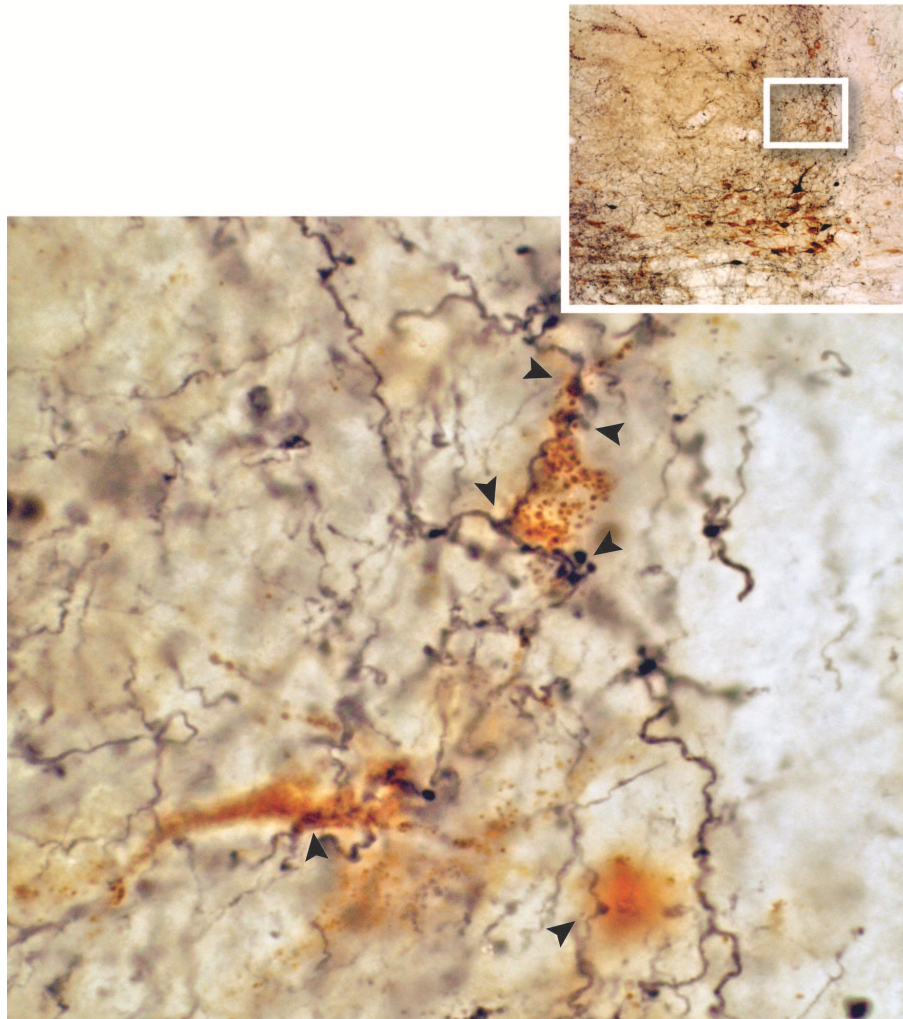


Figura 5.11: Fotomicrografía de neuronas en la región medial de NI que proyectan a SM/BD (marrón) y fibras procedentes de RPO. Las puntas de flecha indican botones sinápticos de estas fibras sobre neuronas de proyección.

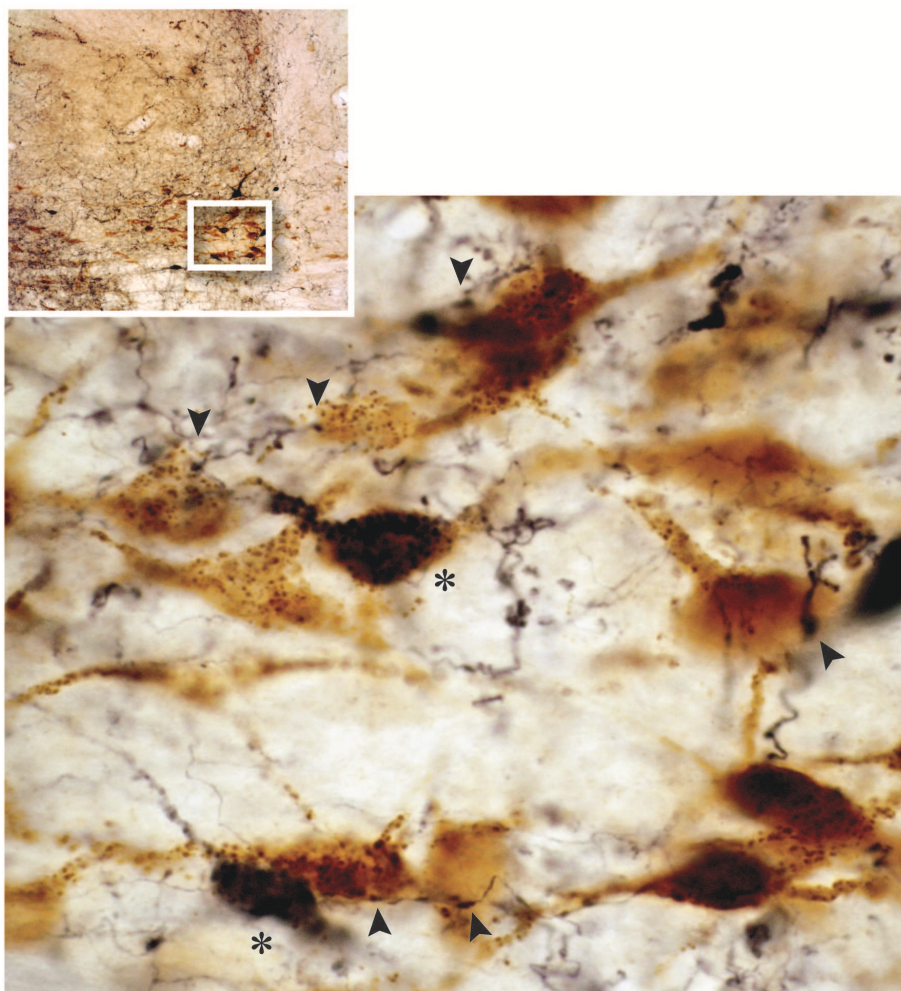


Figura 5.12: Fotomicrografía del doble marcaje de un subgrupo de neuronas de la región medial ventral de NI. Se observan neuronas que proyectan a SM/BD (marrón), fibras con botones *en passant*, haciendo sinapsis en neuronas de NI (negro, puntas de flecha) y neuronas que proyectan simultáneamente a SM/BD y RPO (asterisco).

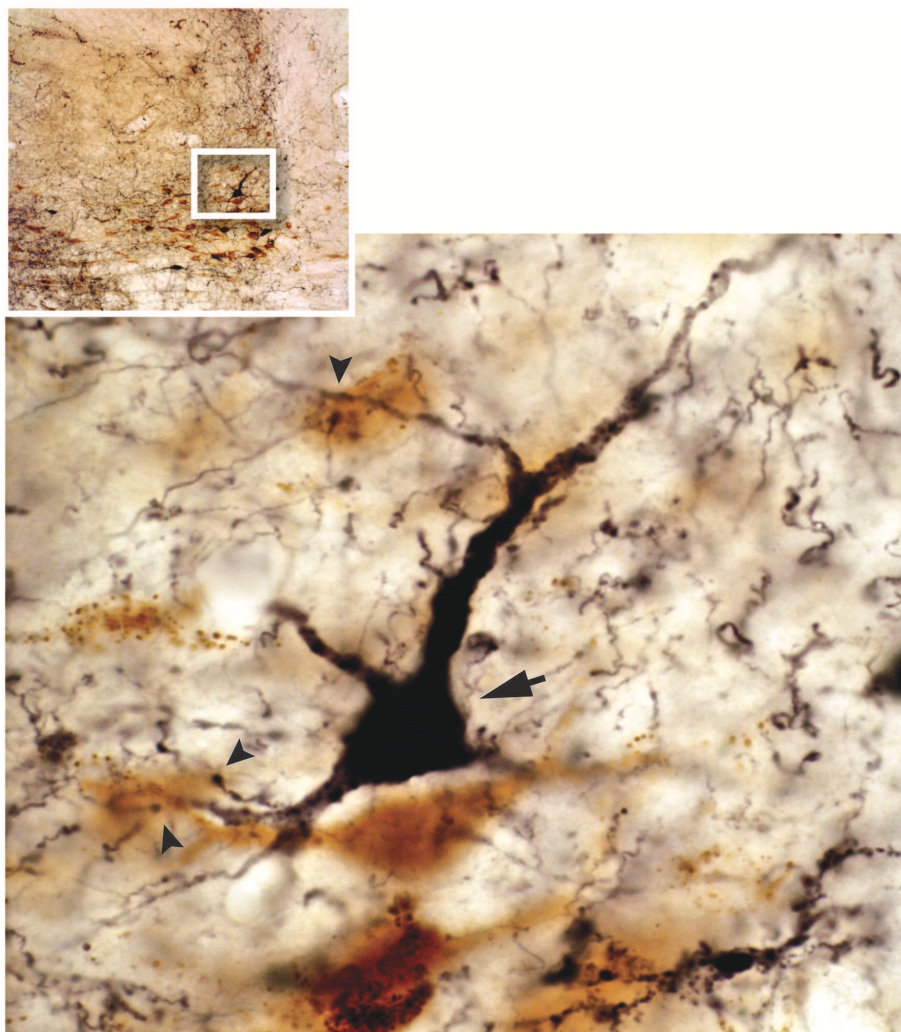


Figura 5.13: Fotomicrografía de marcateo retrógrado desde SM/BD (marcación marrón) y anterógrado desde RPO (negro). Se observa una neurona marcada retrógradamente desde RPO, que representa una proyección desde NI hasta RPO.

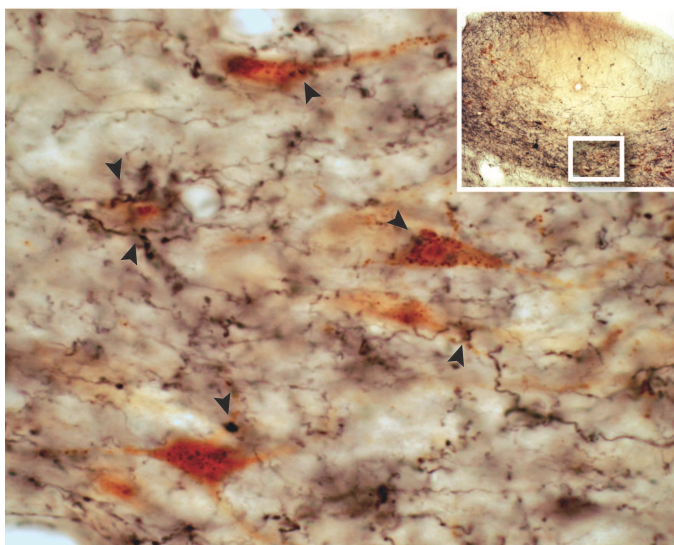


Figura 5.14: Fotomicrografía de dobles marcajes en NId. Las puntas de flecha representan botones sinápticos de fibras procedentes de RPO que contactan con neuronas de NI que proyectan a SM/BD.

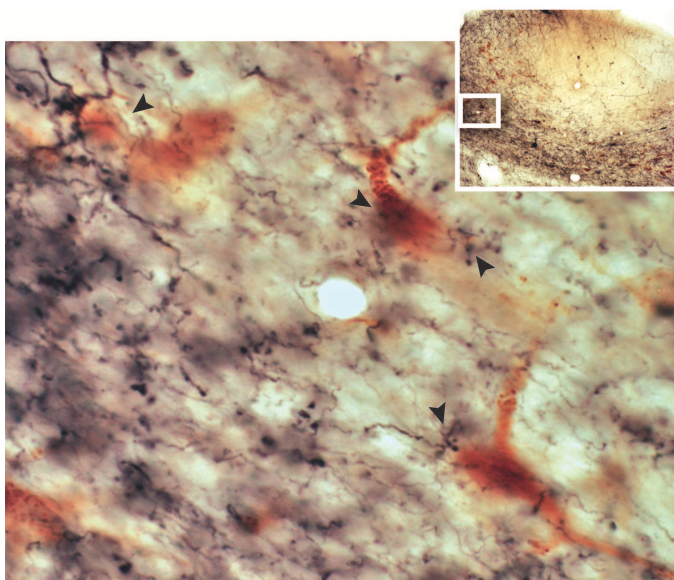


Figura 5.15: Fotomicrografía de dobles marcajes en la región más lateral de NId. Las puntas de flecha representan contactos sinápticos de fibras procedentes de RPO sobre neuronas de NI que proyectan a SM/BD.

Marcaje en el tegmento pontino

En la región dorsal del tegmento pontino, se encontró en NI una elevada correlación entre la localización de somas marcados en sentido retrógrado desde MS/DB y la de las fibras con apariencia de terminales procedentes de RPO (ver Figuras 5.7 a 5.15). El estudio detallado en microscopía óptica con magnificación al 100x permitió la visualización de fibras con apariencia de terminales coincidentes con neuronas de NI marcadas retrógradamente. El análisis en microscopía confocal corroboró la colocalización (ver Figura 5.16).

En el NI se observaron dos tipos de posibles contactos axo-somáticos o axo-dendríticos proximales: marcaje de aparentes terminales en fibras marcadas anterógradamente sobre somas con marcaje retrógrado y fibras *en passant* con varios botones en la misma fibra sobre un soma.

Doble marcaje en otras áreas relevantes

En el diencefalo, se observó también marcaje doble en SUM, PH y en la región posterior del núcleo LH (PLH), como se muestra en la Figura 5.17. Sin embargo, a pesar de que en estos casos el patrón de marcaje fue similar, la densidad de la proyección desde RPO fue menos densa que en la región del tegmento dorsal, apareciendo fibras en estos niveles más dorsal y lateralmente, principalmente en la zona incerta (ZI). En la habénula también se pudieron colocalizar algunos somas marcados con fluorogold con terminales procedentes de RPO. Sin embargo, cabe señalar que en el núcleo lateral de la habénula aparecieron principalmente somas marcados por el transporte retrógrado del miniruby y, por tanto, con proyección en sentido descendente sobre RPO. En la habénula lateral se detectaron también células con doble marcaje retrógrado, lo que implica la existencia de colaterales a SM/BD y RPO desde este núcleo.

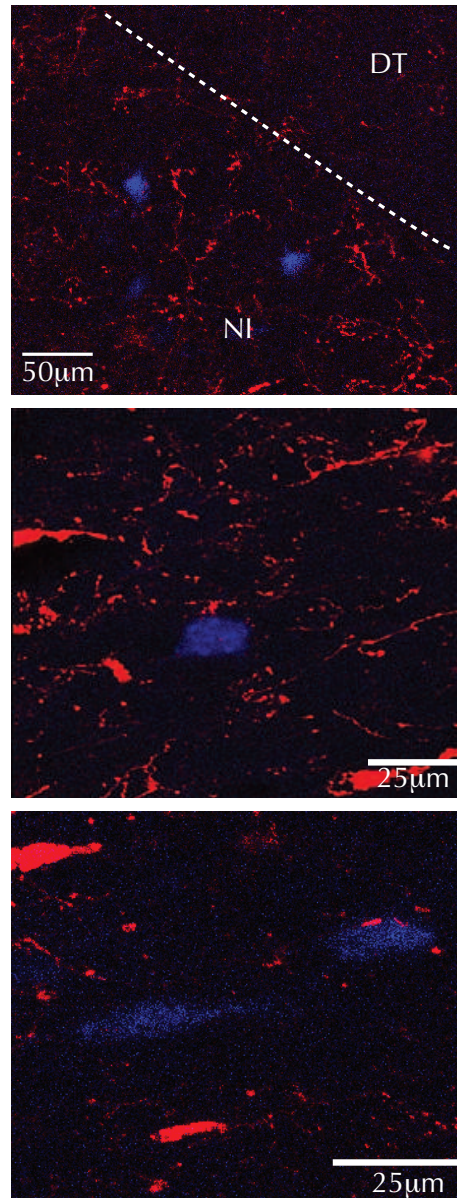


Figura 5.16: Fotomicrografías al microscopio confocal que muestran somas marcados con fluorogold (azul) y fibras con aspecto de terminales (rojo) en NI. Se observa la diferencia de fluorescencia entre NI y DT y la terminación de fibras sobre somas marcados.

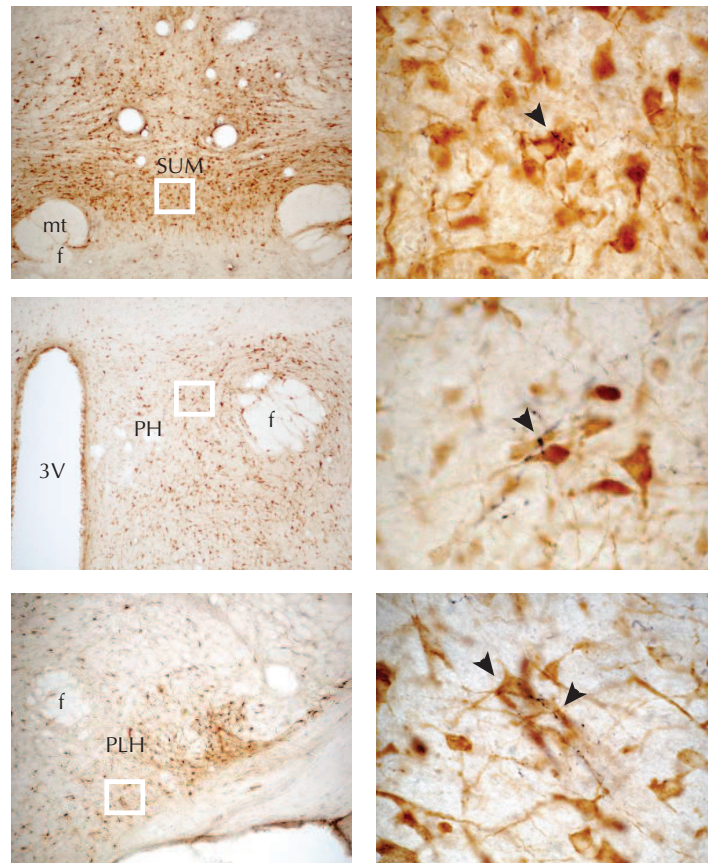


Figura 5.17: Fotomicrografía de dobles marcajes en SUM (arriba), PH (centro) y PLH (abajo). Se observa un gran marcaje retrógrado y escasa densidad de fibras marcadas.

6 RESUMEN DE LOS RESULTADOS

Experimentos de registro unitario y lesión en NI en rata anestesiada

- Los registros neuronales unitarios evidenciaron la existencia de dos subpoblaciones neuronales en NI, siendo un 24 % de ellas rítmicas.
- Las neuronas de NI, tanto rítmicas como no rítmicas, incrementaron su frecuencia de disparo en condiciones de generación de ritmo theta hipocámpico, ya fuera generado mediante estimulación eléctrica de RPO o mediante estimulación sensorial por *tail pinch*.
- Las neuronas de NI respondieron de forma ortodrómica a la estimulación en RPO.
- La lesión o inyección de muscimol en NI indujeron una disminución de actividad theta hipocámpica generada por estimulación eléctrica de RPO, mientras que se mantuvo la generación mediante *tail pinch*.

Registro de campo local en NI e hipocampo en rata anestesiada

- El potencial de campo en NI en condiciones de anestesia con uretano presentó actividad oscilatoria a frecuencias menores a 3 Hz tanto en hipocampo como en NI.
- La estimulación eléctrica de RPO indujo una pérdida de ondas lentas y la sincronización de la actividad oscilatoria frecuencias theta tanto en NI como en hipocampo.
- La frecuencia dominante de las oscilaciones generadas en hipocampo y NI resultó similar y dependiente de la intensidad de corriente aplicada en RPO.
- A las frecuencias alcanzadas, la estimulación indujo un incremento en la coherencia espectral entre las oscilaciones de ambas estructuras.
- El efecto en NI e hipocampo no se mantuvo tras finalizar la estimulación eléctrica de RPO, sino que se observó una desincronización de la actividad de campo mayor a la existente en situación control.
- La estimulación colinérgica de RPO indujo una sincronización progresiva de la actividad local en la banda theta en detrimento de la actividad lenta, tanto en hipocampo como en NI.
- El efecto del carbacol se observó más rápidamente en NI y las frecuencias alcanzadas en el momento de máxima actividad theta resultaron las mismas en ambas estructuras.
- La estimulación sensorial mediante tail pinch produjo un efecto diferente en hipocampo y en NI. Pese a que en ambos casos se produjo una sincronización de la actividad a frecuencias mayores de las presentes en situación control, en hipocampo se alcanzó la banda de Th1, mientras que en NI la frecuencia resultó ligeramente menor, entre 3-4 Hz, sin una desaparición completa de la actividad lenta.

Estudio de la actividad multiunitaria y de campo en NI en rata no anestesiada

- Durante la vigilia tranquila, la potencia relativa de la banda theta supuso aproximadamente un 40 % de la actividad de campo en NI, siendo mayor a la existente en hipocampo, inferior al 30 %.
- Durante los periodos de vigilia activa consistente en exploración sin locomoción o respuesta a estímulos sensoriales, tanto la actividad theta local como la actividad neuronal en NI aumentaron significativamente, presentando correlación con el incremento de la actividad theta hipocámpica.
- En condiciones de estimulación sensorial, la correlación cruzada sugirió que la oscilación theta en NI precedía a la de hipocampo.
- La exposición a estímulos sensoriales (chasquidos) indujo un reinicio de la actividad oscilatoria a frecuencias theta tanto en NI como en hipocampo.
- Los ACH realizados a partir de registros neuronales multiunitarios sugirieron que existe una población de neuronas que disparan en trenes rítmicos a frecuencias theta en NI, más activas durante la vigilia activa.
- Durante el sueño no-REM, tanto la actividad local de campo como la actividad neuronal en NI disminuyeron de manera significativa.
- En los periodos de sueño REM, caracterizados por el aumento de ritmo theta hipocámpico, se produjo incrementos de la actividad neuronal y oscilatoria a frecuencias theta en NI.

Estudio de las rutas pontoseptales

- La inyección de trazador anterógrado en diferentes niveles de RPO originó el marcaje de fibras en la formación reticular pontina y medular, a distintos niveles del propio RPO, RPC, Gi y Mdv. La mayor intensidad de marcaje anterógrado desde RPO se detectó en NI, abarcando las subdivisiones NIc y Nid, así como las áreas CGG y CGPn, que consideramos pertenecientes a NI, rodeando DT y PDT. Se encontraron también fibras procedentes de RPO en LDT, LC, SubC, DMT, PPT, VTg, DR, núcleo cuneiforme y las porciones lateral y ventrolateral de la PAG, en todos ellos de menor intensidad que en NI.
- Fuera de áreas reticulares y tegmentales, se detectó marcaje en SUM, PH, LH, ZI y en el complejo habenular. Cabe señalar que en estas áreas, el marcaje resultó menos intenso que en el tegmento pontino.
- El marcaje retrógrado en NI originó el marcaje mayoritario de somas en MR, PMR, IP y lHb. También se encontraron somas marcadas en SM/BD, SUM, PH, área lateral hipotalámica, ZI y en la periferia del mt.
- A niveles reticulares pontinos, además de MR y PRM, se encontró marcaje en RPO, principalmente en las porciones ventral y ventromedial, RPC, PPT, RtTg, DR y en la periferia de los tractos mlf y rs.
- Tras la inyección de trazador retrógrado en SM/BD, se detectaron somas marcadas en el tegmento pontomesencefálico en NI, LC, LDT, Ba, RPn y la periferia del mlf. Se observaron neuronas marcadas en una región ventral y caudal de DR, previamente señalada por nuestro grupo como la porción más rostral de NIc. No se observaron somas marcadas en otras regiones de DR ni en DT o PDT.
- Fuera del tegmento se encontraron neuronas marcadas en los núcleos del rafe pontino RM, RPM y en los núcleos PH, LH, SUM y ML hipotalámicos, así como en la mHb.
- Los experimentos de doble inyección de trazador retrógrado en SM/BD y anterógrado en RPO, estudiados por microscopía óptica y confocal, demostraron una elevada colocalización de fibras procedentes de RPO con somas de proyección a SM/BD en NI. También se encontraron dobles marcajes en PH, SUM, LH y Hb, resultando de menor intensidad a estos niveles.

7 DISCUSIÓN

En la actividad rítmica del hipocampo también influyen determinadas estructuras del hipotálamo caudal. Pese a no estar clara cuál es su implicación en el sistema, diversos estudios apuntan a que participan en la modulación de la frecuencia y que contribuyen a la integración sensorimotora (Oddie et al., 1994; Bland y Oddie, 1998). En el hipotálamo, el núcleo SUM fue propuesto por Vertes como estructura de relevo para la influencia troncoencefálica sobre SM/BD y el hipocampo, dado que recibe aferencias de RPO y que proyecta sobre ambos constituyentes del sistema septohipocámpico (Vertes, 1992). El núcleo PH también ha demostrado estar relacionado con la modulación de la frecuencia del theta hipocámpico y está implicado en el componente motor de la integración sensorimotora (Bland et al., 2005).

En la formación reticular pontina, el NI presenta un patrón de proyecciones ascendentes que lo capacita para la generación o modulación del ritmo theta hipocámpico, que incluyen a las principales estructuras implicadas en su control: SM/BD, SUM, PH y MR (Olucha-Bordonau et al., 2003) (Figura 7.1). Un estudio previo de nuestro grupo permitió verificar que su estimulación eléctrica es capaz de inducir la sincronización en el hipocampo a estas frecuencias (Nuñez et al., 2006), como se muestra en la Figura 1.15.

Globalmente, los resultados obtenidos en este trabajo de tesis contribuyen al conocimiento acerca de la regulación que el tronco del encéfalo realiza sobre el estado de activación del animal.

El estudio de la actividad coordinada en una red neuronal distribuida podría proporcionar un modelo para la integración a distintos niveles cognitivos y de los mecanismos de integración sensorimotora del cerebro.

El propósito de esta tesis ha sido evaluar la capacidad del NI de influir en la aparición de una actividad neuronal sincrónica en el hipocampo, clave para su funcionamiento como mapa cognitivo. Con este estudio se pretende consolidar la relevancia del NI entre los núcleos tegmentales, que consideramos constituyen un sistema complejo coordinado dentro del SRAA, capaz de modular los estados de activación. En conjunto, el trabajo que se presenta aporta nuevos datos acerca del papel que el NI, en el tegmento pontino, desempeña en este sistema de control de las funciones cognitivas.

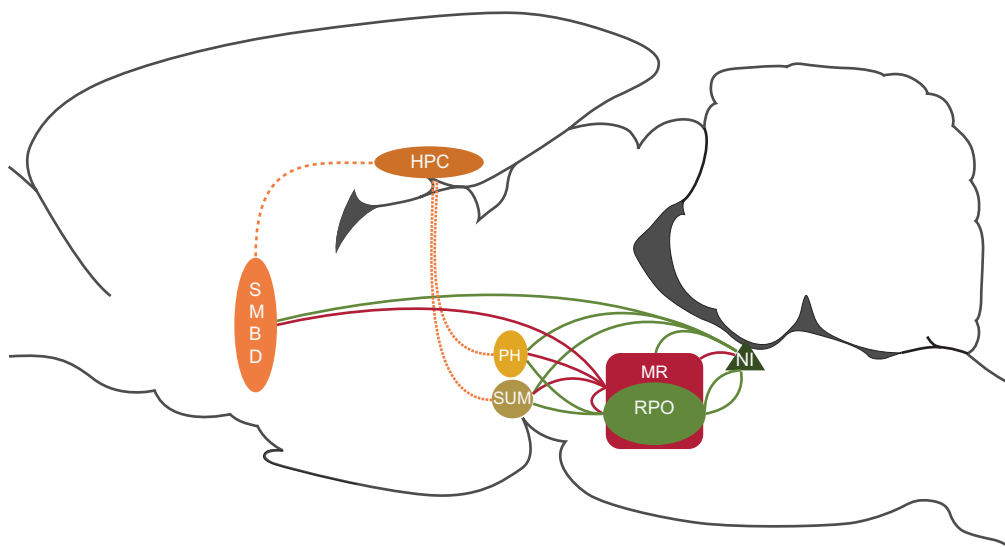


Figura 7.1: Principales conexiones implicadas en la activación, modulación e inhibición del ritmo theta hipocámpico y proyecciones de NI sobre las estructuras implicadas.

7.1 EL NÚCLEO INCERTUS COMO CANDIDATO AL CONTROL DEL ESTADO DE ACTIVACIÓN Y DE LA FUNCIÓN HIPOCÁMPICA.

Cabe señalar que los núcleos LC y central de la amígdala, claves en la respuesta de estrés y el *arousal*, no presentan receptores de CRH, por lo que su implicación en la respuesta de vigilancia debe ser secundaria a la activación de otras estructuras. Las proyecciones de NI sobre ambas estructuras (Goto et al., 2001; Olucha-Bordonau et al., 2003) podrían actuar como mediadoras en dicha respuesta.

Tal y como se demostró en el ratón, los animales que presentan un nivel de CRH elevado crónicamente infraexpresan CRH-R1, entre otros lugares en el hipocampo, septum medial y lateral, la sustancia gris pontina, PPT y LDT y sobreexpresan CRH-R2, especialmente en DR, como mecanismo de regulación (Brunson et al., 2002; Korosi et al., 2006). Esta última respuesta ha sido interpretada como un posible mecanismo para el efecto del estrés crónico sobre la liberación de serotonina (Korosi et al., 2006). Esta regulación podría mediar, además, en las deficiencias cognitivas asociadas al estrés crónico.

Nuestras hipótesis principales a lo largo del trabajo que presentamos son (1) que el NI presenta unas conexiones críticas que permiten que establezca un sistema activador, en coordinación con RPO, sobre el sistema septohipocámpico y (2) que este patrón conectivo origina que, en condiciones de activación del SRAA, la actividad de NI está asociada a la aparición de ritmo theta en

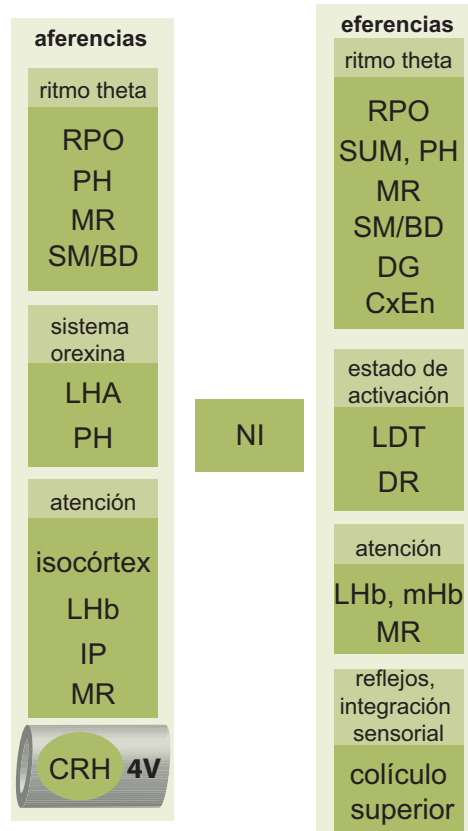


Figura 7.2: Conexiones y sensibilidad de NI que lo sitúan en una posición clave para el control de los procesos cognitivos dependiente del estado de activación.

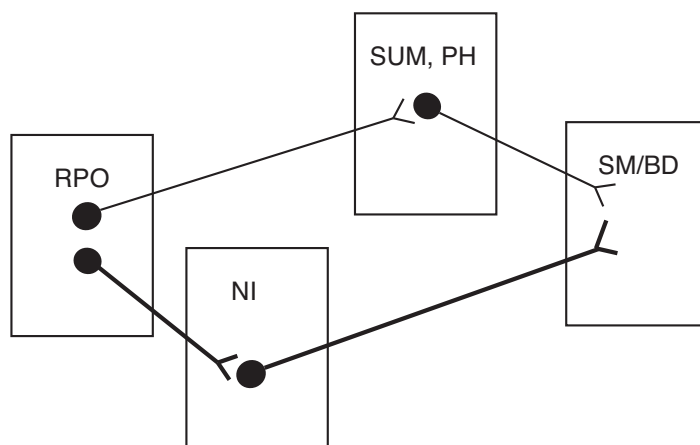


Figura 7.3: Vías pontoseptales. Nuestros resultados corroboran la existencia de dos vías diferenciadas desde RPO hasta SM/BD: una a través del hipotálamo caudal, de acuerdo a lo descrito en la bibliografía y una a través del NI, siendo ésta la mayoritaria.

el hipocampo. Además, consideramos que (3), funcionalmente, el NI, junto con otras estructuras de la formación reticular, del hipotálamo posterior, del prosencéfalo basal y el propio hipocampo, constituyen un sistema de osciladores límbicos acoplados que contribuyen a la correcta integración de la información en respuesta a estímulos relevantes.

7.2 ACTIVIDAD NEURONAL EN EL NÚCLEO INCERTUS EN RELACIÓN CON EL RITMO THETA HIPOCÁMPICO

7.2.1 Organización de las proyecciones reticulares sobre el prosencéfalo basal y la corteza límbica

Consideramos que NI, junto con otras estructuras, constituyen un sistema coordinado que, mediante la interacción de diferentes vías neuroquímicas, interviene en la modulación de la actividad

Si bien las proyecciones eferentes del DT no han sido convenientemente descritas, el estudio de sus aferencias demostró un patrón claramente distinto del de NI y, en parte contribuyó a su delimitación como núcleo diferenciado (Liu et al., 1984).

Por otra parte, existe un elevado grado de interconexión entre todos los núcleos tegmentales mencionados, como puede observarse en todos los estudios referidos, además de presentar patrones topográficos de proyecciones complementarias respecto a otras áreas del encéfalo (Contestabile y Flumerfelt, 1981; Hayakawa y Zyo, 1984; Groenewegen et al., 1986), por lo que podrían conside-

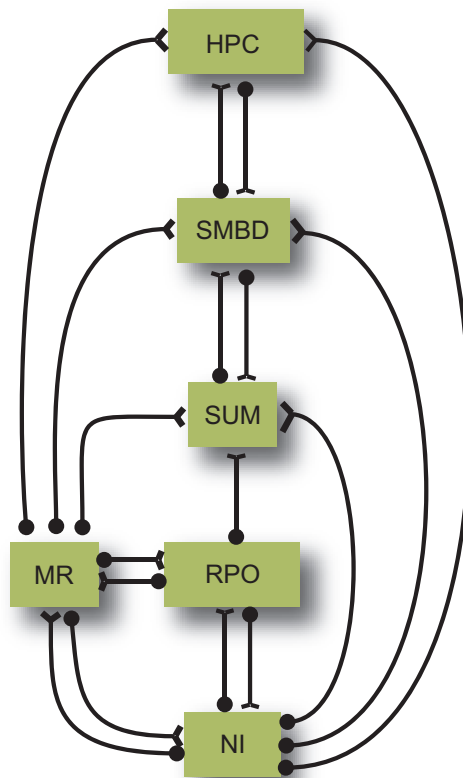


Figura 7.4: Circuito propuesto de control de la oscilación theta hipocámpica, incluyendo al NI.

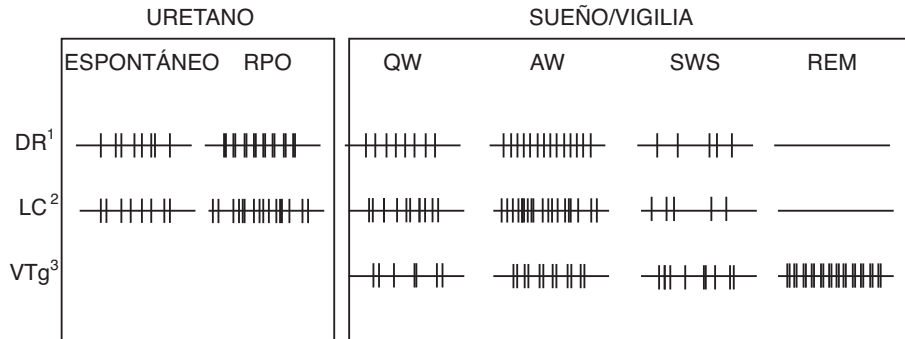


Figura 7.5: Patrón de disparo de los núcleos DR, LC y VTg durante anestesia y en el ciclo de sueño/vigilia. En anestesia se compara la actividad descrita en condiciones espontáneas y durante la estimulación de RPO. Se compara también la actividad en vigilia tranquila (QW), activa (AW), sueño de ondas lentas (SWS) y REM. Adaptado de (1) Jacobs y Fornal, 1993 y de Kocsis y Vertes, 1996, (2) Gervasoni et al, 1998 y Fenik et al, 2005 y (3) de Aston-Jones y Bloom, 1981.

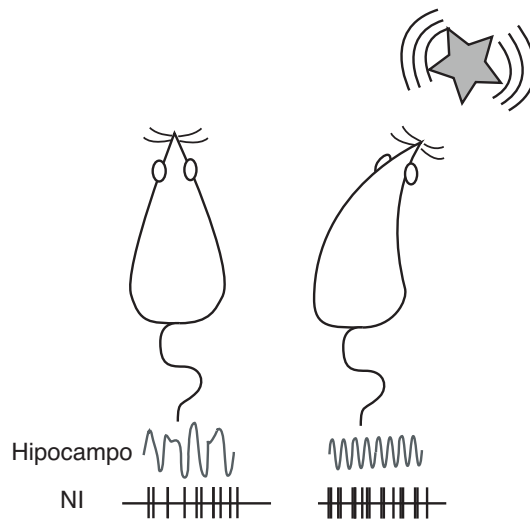


Figura 7.6: En respuesta a un estímulo, la actividad de NI aumenta en correlación con la oscilación theta hipocámpica y de manera simultánea a la orientación de la cabeza hacia el estímulo.

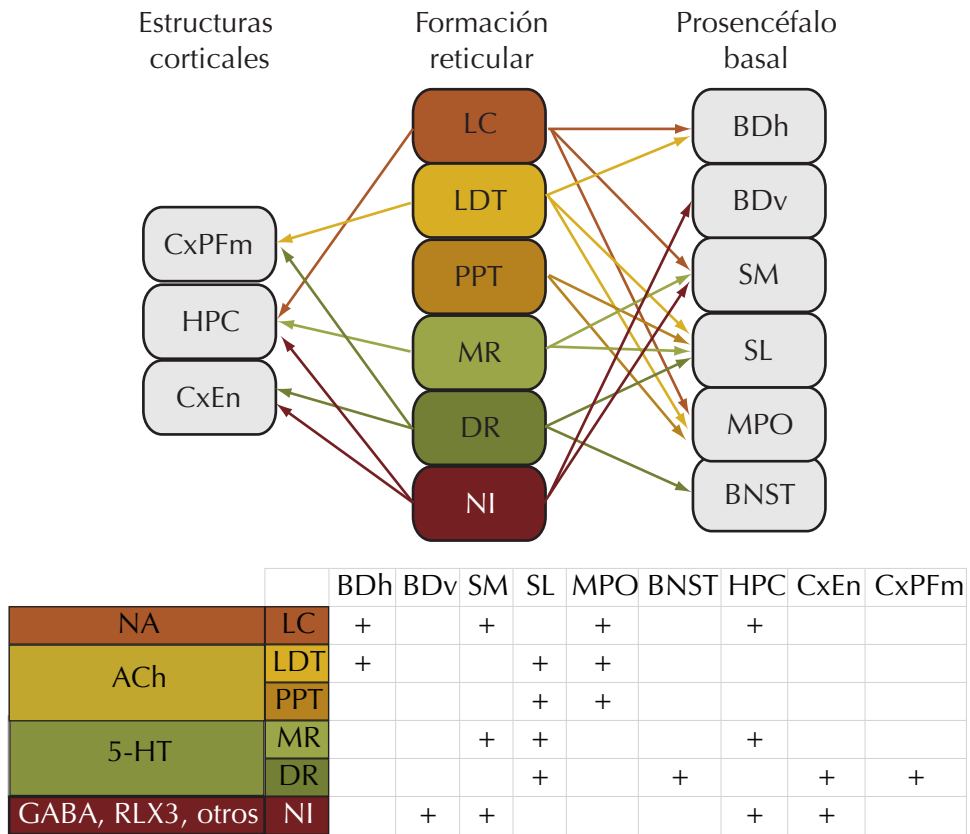


Figura 7.7: Proyecciones desde el tegmento pontomesencefálico sobre el prosencéfalo basal, hipocampo, corteza entorrinal y prefrontal medial.

rarse constituyente de un sistema coordinado de control septohipocámpico y de las regiones corticales relacionadas.

7.2.2 Contribución de la formación reticular a los distintos estados de vigilancia

En este sentido, se ha considerado ya clásicamente que las neuronas colinérgicas del SRAA tienen un papel relevante en la vigilia y en los estados de activación atencional (Shute y Lewis, 1967; Lydic y Baghdoyan, 1999). Este hecho se ve respaldado por la activación de las neuronas de los núcleos LDT y PPT en estos estados (el Mansari et al., 1989; Mesulam et al., 1989; Steriade et al., 1990; Kamondi et al., 1992). El sistema colinérgico que tiene su origen en el troncoencéfalo activa al tálamo y al prosencéfalo basal, contribuyendo a la activación cortical (Steriade, 1993). Además, la inyección de agonistas colinérgicos tanto muscarínicos como nicotínicos han demostrado provocar un incremento en la atención y la vigilancia (Mirza y Stolerman, 1998; Levin y Simon, 1998; Tejada et al., 2007).

En el animal despierto, la actividad de las neuronas serotoninérgicas del DR aumenta con la aparición de ritmo theta en el hipocampo y adquieren un patrón rítmico de activación, específicamente si la oscilación coincide con actividad motora (Kocsis y Vertes, 1992).

El perfil de disparo de las neuronas de NI es distinto respecto al de los núcleos vecinos mencionados. El patrón que exhibe constituye una diferencia respecto del DR, cuya actividad parece especialmente ligada a la realización de movimientos automatizados y no a la respuesta a estímulos (Fornal et al., 1996). Según Jacobs y Fornal, puesto que DR parece tener un papel inhibitorio sobre la activación hipocámpica, evitando la integración sensorial durante la realización de conductas motoras automatizadas. Atendiendo a esta hipótesis y al papel complementario al DR que parece tener el NI, éste podría participar en la inhibición de este tipo de conductas en respuesta a estímulos novedosos o relevantes. El incremento observado de actividad rítmica a frecuencias theta, aunque no pueda cuantificarse debido a la realización de registros multiunitarios, lo sitúa, al igual que VTg (Bassant y Poindessous-Jazat, 2001), en una posición crítica respecto a la generación de la oscilación hipocámpica.

La sinergia entre la actuación de la formación reticular y del sistema noradrenérgico, así como el efecto inhibitorio de la serotonina procedente de los núcleos del rafe ya fue propuesta por Kitchigina (2004), quien además mantiene la hipótesis de que las oscilaciones theta constituyen un filtro para la selección y almacenamiento de la información, útil en los estados de atención focalizada.

Las neuronas GABAérgicas, por su parte, deben contribuir al control de cada una de estas poblaciones (Jones, 2003), permitiendo la alternancia entre los diferentes estados de activación.

7.2.3 Contribución de la formación reticular a la oscilación theta hipocámpica

7.2.4 Contribución de los sistemas reticulares al sueño REM

El patrón electroencefalográfico presente durante el sueño REM es similar al de la vigilia. Sin embargo, las diferencias entre ambos estados son notables. El sueño REM se caracteriza también por la atonía muscular y una baja reactividad frente a los estímulos externos, así como la experimentación de sueños vívidos, por lo que ha sido denominado también sueño paradójico (Aserinsky y Kleitman, 1953; Jouvet, 1962). Es también característica de esta fase del sueño *activado* la aparición de ondas rápidas fásicas ponto-geniculo-occipitales (PGO), originadas en la región pontina y claramente registrables en el núcleo geniculado lateral, que coinciden con el movimiento rápido de ojos que confiere el nombre a esta fase del sueño (Morrison y Bowker, 1975).

Durante el sueño REM se activa un sistema distribuido de estructuras de la formación reticular pontina, algunas de ellas estrechamente relacionadas con la generación de ritmo theta hipocámpico.

A pesar de que los diferentes aspectos que pueden observarse durante el estado de sueño REM pueden generarse de manera individual mediante la estimulación de regiones bien definidas de la formación reticular, la estructura responsable del inicio de este estado ha sido objeto de controversia.

Las proyecciones serotoninérgicas proceden no sólo de los núcleos del rafe sino, principalmente, de células distribuidas en la formación reticular (Rodrigo-Angulo et al., 2000).

Además, mediante estudios de microdiálisis ha podido observarse que la liberación de ACh en el tegmento dorsal pontino es mayor en este estado que en la vigilia o en el sueño no-REM (Kodama et al., 1990). El empleo de agonistas colinérgicos ha permitido delimitar las regiones mesopontinas implicadas en los distintos aspectos característicos del sueño paradójico, permitiendo disociar las áreas implicadas en la generación de ondas PGO, atonía o sueño (Vanni-Mercier et al., 1989; Katayama et al., 1984).

Las diferentes proyecciones y mecanismos presinápticos de liberación de ACh en los núcleos colinérgicos troncoencefálicos permiten que participen en ambos estados (Lydic y Baghdoyan, 1999).

Sin embargo, las neuronas monoaminérgicas de la formación reticular pontina y mesencefálica presentan un perfil de actividad diferente. Así como las estructuras implicadas en la generación de los diferentes componentes del sueño REM se hallan localizados en las regiones mediolaterales o laterales de la formación reticular mesopontina, la mayoría de las células de la región medial a estos niveles presenta sus máximos niveles de actividad durante la vigilia.

Tanto la serotonina como la noradrenalina inhiben a las células colinérgicas del tegmento (Luecke et al., 1992; Williams y Reiner, 1993; Leonard y Llinás, 1994). Sin embargo, dados los elevados niveles de ACh que se observan durante la vigilia, este mecanismo no debe producirse en este estado. E

Conjuntamente, estos datos sugieren que un incremento de la actividad de las neuronas colinérgicas de LDT y PPT origina una liberación masiva de ACh en la formación reticular pontina, que inicia la generación de los procesos tónicos y fásicos que caracterizan el estado de sueño REM.

7.2.5 Actividad neuronal en el núcleo incertus: conclusiones

La actividad neuronal de las principales estructuras diencefálicas y proencefálicas implicadas en la sincronización hipocámpica ha sido estudiada en profundidad. No obstante, a nivel del tronco del encéfalo, esta actividad dista todavía de estar caracterizada de manera precisa. El trabajo realizado aporta nuevos datos en este sentido pese a que la correlación con su neuroquímica es un estudio pendiente.

En conclusión, los resultados observados demuestran que, en la rata anestesiada, NI se activa de manera preferente en las condiciones que originan la sincronización hipocámpica. En la rata no anestesiada, su actividad es mayor en la vigilia que durante el sueño, principalmente en estados de vigilancia. Durante el sueño de ondas lentas, su frecuencia de disparo disminuye, mientras que durante el sueño REM manifiesta una frecuencia de disparo similar a la de la vigilia tranquila. La actividad de NI durante el sueño REM constituye una diferencia respecto de los núcleos monoaminérgicos tegmentales, con los que consideramos que podría constituir un sistema coordinado para el establecimiento de los distintos estados de activación.

7.3 EL NÚCLEO INCERTUS PARTICIPA DE MANERA DIFERENTE EN LAS DISTINTAS VÍAS DE GENERACIÓN DE RITMO THETA HIPOCÁMPICO

A esta función de NI contribuirían tanto sus aferencias desde el sistema habenulo-interpeduncular como su sensibilidad a la CRH. El patrón de conexiones ascendentes que presenta lo capacita como activador del sistema septohipocámpico, constituyendo un núcleo clave en la integración de la información en condiciones de vigilancia elevada. La sincronización de su actividad de campo a frecuencia theta en estas condiciones, así como durante el sueño REM podrían permitir el procesamiento conjunto de la información espaciotemporal, proporcionada por el hipocampo, y de la activación asociada a los estímulos procesados. De esta manera, la oscilación theta permitiría, a estos niveles la formación y consolidación de memoria dependiente de la relevancia de los estímulos procesados.

8 CONCLUSIONES

Los resultados presentados en este trabajo constituyen nuevas evidencias de que el núcleo incertus o NI participa de forma relevante en la activación de la oscilación theta hipocámpica. A favor de esta tesis aportamos los siguientes argumentos: este núcleo se encuentra activo de manera preferente durante la aparición de la ritmicidad theta hipocámpica; su lesión suprime el efecto sobre la generación de dicha oscilación; y el propio NI manifiesta la aparición de una oscilación a frecuencia theta altamente coherente con la actividad hipocámpica.

La verificación de la existencia de la ruta RPO-NI-SM/BD explica la mayor parte de los resultados observados y proporciona el sustrato para incluir a NI en una posición clave del sistema de control del ritmo theta hipocámpico. Esta nueva ruta descrita nos permite proponer un nuevo e hipotético circuito de generación y modulación de la oscilación theta.

El estudio que hemos realizado nos permite resaltar las siguientes conclusiones:

- I. NI constituye una estructura fundamental en la vía pontoseptal con origen en RPO, pudiendo considerarse parte del sistema troncoencefálico reticular ascendente implicado en la activación del sistema septohipocámpico.
- II. NI presenta dos poblaciones neuronales diferenciadas en base a su patrón de actividad de disparo en rata anestesiada con uretano. La población mayoritaria muestra un perfil no rítmico con una frecuencia de disparo cercana a los 9 Hz; la población minoritaria muestra un patrón de disparo rítmico con frecuencias de 13-25 Hz.
- III. Las dos poblaciones funcionales de NI se activan en condiciones de generación de ritmo theta en el hipocampo y lo hacen de forma independiente al tipo de estimulación aplicada.
- IV. En la rata anestesiada con uretano, el mantenimiento de la actividad de las neuronas que integran NI es imprescindible para la activación de ritmo theta en el hipocampo mediada por RPO. Sin embargo, la generación de ritmo theta por estimulación sensorial no depende exclusivamente de NI.
- V. La actividad del potencial de campo en NI presenta una gran sincronización con la actividad hipocámpica.

- VI. La actividad oscilatoria de NI e hipocampo muestra una elevada coherencia en la banda de frecuencias theta tras la activación mediada por RPO.
- VII. En la rata no anestesiada, tanto la actividad neuronal como la banda theta de la actividad de campo en NI se incrementan durante los diferentes patrones de vigilia activa. En este estado se observa un incremento en la actividad rítmica de las neuronas de NI.
- VIII. La actividad poblacional de NI mantiene los mismos patrones oscilatorios que el hipocampo en los diferentes estados de activación.
- IX. La actividad neuronal de NI es manifiestamente superior en los estados coincidentes con la aparición de actividad theta y el menor grado de actividad coincide con las fases no REM del sueño.
- X. NI forma parte de un circuito neuronal distribuido, implicado en la generación y modulación de la oscilación theta hipocámpica. En este sentido, puede sugerirse que NI forma parte del sistema responsable de la integración sensorimotora dependiente del estado de activación cerebral.

BIBLIOGRAFÍA

- ACKERMANN, H.; HERTRICH, I.; DAUM, I.; SCHARF, G. y SPIEKER, S.: «Kinematic analysis of articulatory movements in central motor disorders.» *Mov Disord*, 1997, **12(6)**, pp. 1019–1027.
- ACSÁDY, L.; ARABADZISZ, D.; KATONA, I. y FREUND, T. F.: «Topographic distribution of dorsal and median raphe neurons with hippocampal, septal and dual projection.» *Acta Biol Hung*, 1996, **47(1-4)**, pp. 9–19.
- ALREJA, M.; WU, M.; LIU, W.; ATKINS, J. B.; LERANTH, C. y SHANABROUGH, M.: «Muscarinic tone sustains impulse flow in the septohippocampal GABA but not cholinergic pathway: implications for learning and memory.» *J Neurosci*, 2000, **20(21)**, pp. 8103–8110.
- AMARAL, D. G. y COWAN, W. M.: «Subcortical afferents to the hippocampal formation in the monkey.» *J Comp Neurol*, 1980, **189(4)**, pp. 573–91.
- AMARAL, D. G.; SCHARFMAN, H. E. y LAVENEX, P.: «The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies).» *Prog Brain Res*, 2007, **163**, pp. 3–22.
- ANDERSEN, P.; BLAND, H. B.; MYHRER, T. y SCHWARTZKROIN, P. A.: «Septo-hippocampal pathway necessary for dentate theta production.» *Brain Res*, 1979, **165(1)**, pp. 13–22.
- ANDERSEN, P.; HOLMQVIST, B. y VOORHOEVE, P. E.: «Entorhinal activation of dentate granule cells.» *Acta Physiol Scand*, 1966, **66(4)**, pp. 448–460.
- APARTIS, E.; POINDESSOUS-JAZAT, F. R.; LAMOUR, Y. A. y BASSANT, M. H.: «Loss of rhythmically bursting neurons in rat medial septum following selective lesion of septohippocampal cholinergic system.» *J Neurophysiol*, 1998, **79(4)**, pp. 1633–1642.
- ARNOLDS, D. E.; DA SILVA, F. H. LOPES; AITINK, J. W. y KAMP, A.: «Hippocampal EEG and behaviour in dog. I. Hippocampal EEG correlates of gross motor behaviour.» *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 1979, **46(5)**, pp. 552–570.
- ASERINSKY, E. y KLEITMAN, N.: «Regularly occurring periods of eye motility, and concomitant phenomena, during sleep.» *Science*, 1953, **118(3062)**, pp. 273–274.
- ASSAF, S. Y. y MILLER, J. J.: «The role of a raphe serotonin system in the control of septal unit activity and hippocampal desynchronization.» *Neuroscience*, 1978, **3(6)**, pp. 539–550.
- BANERJEE, A.; SHEN, P.-J.; MA, S.; BATHGATE, R. A. D. y GUNDLACH, A. L.: «Swim stress excitation of nucleus incertus and rapid induction of relaxin-3 expression via CRF1 activation.» *Neuropharmacology*, 2010, **58(1)**, pp. 145–155.
- BASSANT, M.H. y POINDESSOUS-JAZAT, F.: «Ventral tegmental nucleus of Gudden: A pontine hippocampal theta generator?» *Hippocampus*, 2001, **11(6)**, pp. 809–813.

- BATINI, C.; MORUZZI, G.; PALESTINI, M.; ROSSI, G. F. y ZANCHETTI, A.: «Persistent patterns of wakefulness in the pretrigeminal midpontine preparation». *Science*, 1958, **128**(3314), pp. 30–2.
- BERMAN, A.: «The brain stem of the cat: a cytoarchitectonic atlas with stereotaxic coordinates». *University of Wisconsin Press Madison*, 1968.
- BLAIR, H. T.; K. GUPTA y K. ZHANG: «Conversion of a phase- to a rate-coded position signal by a three-stage model of theta cells, grid cells, and place cells.» *Hippocampus*, 2008, **18**(12), pp. 1239–1255.
- BLAND, B. H.: «The physiology and pharmacology of hippocampal formation theta rhythms». *Prog Neurobiol*, 1986.
- BLAND, B. H.; BIRD, J.; JACKSON, J. y NATSUME, K.: «Medial septal modulation of the ascending brainstem hippocampal synchronizing pathways in the freely moving rat». *Hippocampus*, 2005, **16**(1), pp. 11–19.
- BLAND, B. H. y COLOM, L. V.: «Extrinsic and intrinsic properties underlying oscillation and synchrony in limbic cortex.» *Prog Neurobiol*, 1993, **41**(2), pp. 157–208.
- BLAND, B. H.; KONOPACKI, J. y DYCK, R. H.: «Relationship between membrane potential oscillations and rhythmic discharges in identified hippocampal theta-related cells.» *J Neurophysiol*, 2002, **88**(6), pp. 3046–3066.
- BLAND, B. H. y ODDIE, S. D.: «Anatomical, electrophysiological and pharmacological studies of ascending brainstem hippocampal synchronizing pathways». *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 1998, **22**(2), pp. 259–73.
- BLAND, B. H. y ODDIE, S. D.: «Theta band oscillation and synchrony in the hippocampal formation and associated structures: the case for its role in sensorimotor integration.» *Behav Brain Res*, 2001, **127**(1–2), pp. 119–136.
- BLAND, B. H.; ODDIE, S. D. y COLOM, L. V.: «Mechanisms of neural synchrony in the septohippocampal pathways underlying hippocampal theta generation». *J Neurosci*, 1999, **19**(8), pp. 3223–37.
- BLAND, B. H.; ODDIE, S. D.; COLOM, L. V. y VERTES, R. P.: «Extrinsic modulation of medial septal cell discharges by the ascending brainstem hippocampal synchronizing pathway». *Hippocampus*, 1994, **4**(6), pp. 649–60.
- BÓDIZS, R.; KÁNTOR, S.; SZABÓ, G.; SZÜCS, A.; ERŐSS, L. y HALÁSZ, P.: «Rhythmic hippocampal slow oscillation characterizes REM sleep in humans.» *Hippocampus*, 2001, **11**(6), pp. 747–753.
- BORHEGYI, Z. y FREUND, T. F.: «Dual projection from the medial septum to the supramammillary nucleus in the rat». *Brain Res Bull*, 1998, **46**(5), pp. 453–9.
- BORHEGYI, Z.; VARGA, V.; SZILÁGYI, N.; FABO, D. y FREUNDEUND, T. F.: «Phase segregation of medial septal GABAergic neurons during hippocampal theta activity.» *J Neurosci*, 2004, **24**(39), pp. 8470–8479.
- BOULTON, A. A.; BAKER, G. B. y VANDERWOLF, C. H. (Eds.): *Neurophysiological Techniques*. Clifton, N.J: Humana Press, 1990.
- BRAGIN, A.; JANDÓ, G.; NÁDASDY, Z.; VAN LANDEGHEM, M. y BUZSÁKI, G.: «Dentate EEG spikes and associated interneuronal population bursts in the hippocampal hilar region of the rat.» *J Neurophysiol*, 1995, **73**(4), pp. 1691–1705.

- BRAZHNIK, E. S. y FOX, S. E.: «Intracellular recordings from medial septal neurons during hippocampal theta rhythm». *Experimental brain research Experimentelle Hirnforschung Expérimentation cérébrale*, 1997, **114(3)**, pp. 442–53.
- BRODAL, A.: *The reticular formation of the brain stem. Anatomical aspects and functional correlations*. London: Oliver and Boyd, 1957.
- BRUNSON, KRISTEN L; GRIGORIADIS, DIMITRI E; LORANG, MARGE T y BARAM, TALLIE Z: «Corticotropin-releasing hormone (CRH) downregulates the function of its receptor (CRF1) and induces CRF1 expression in hippocampal and cortical regions of the immature rat brain.» *Exp Neurol*, 2002, **176(1)**, pp. 75–86.
- BURAZIN, T. C. D.; BATHGATE, R. A. D.; MACRIS, M.; LAYFIELD, S.; GUNDLACH, A. L. y TREGGAR, G. W.: «Restricted, but abundant, expression of the novel rat gene-3 (R3) relaxin in the dorsal tegmental region of brain». *J Neurochem*, 2002, **82(6)**, pp. 1553–7.
- BURGESS, N.; CACUCCI, F.; LEVER, C. y O'KEEFE, J.: «Characterizing multiple independent behavioral correlates of cell firing in freely moving animals». *Hippocampus*, 2005, **15(2)**, pp. 149–153.
- BUZSÁKI, G.: «Two-stage model of memory trace formation: a role for "noisy" brain states». *Neuroscience*, 1989, **31(3)**, pp. 551–70.
- BUZSÁKI, G.: «Theta Oscillations in the Hippocampus». *Neuron*, 2002.
- BUZSÁKI, G.: «Theta rhythm of navigation: link between path integration and landmark navigation, episodic and semantic memory.» *Hippocampus*, 2005, **15(7)**, pp. 827–840.
- BUZSÁKI, G.: *Rhythms of the Brain*. Oxford University Press, 2006.
- BUZSÁKI, G. y EIDELBERG, E.: «Commissural projection to the dentate gyrus of the rat: evidence for feed-forward inhibition.» *Brain Res*, 1981, **230(1-2)**, pp. 346–350.
- CANTERO, J. L.; ATIENZA, M.; STICKGOLD, R.; KAHANA, M. J.; MADSEN, J. R. y KOCSIS, B.: «Sleep-dependent theta oscillations in the human hippocampus and neocortex.» *J Neurosci*, 2003, **23(34)**, pp. 10897–10903.
- CAPLAN, J. B.; MADSEN, J. R.; SCHULZE-BONHAGE, A.; ASCHENBRENNER-SCHEIBE, R.; NEWMAN, E. L. y KAHANA, M. J.: «Human theta oscillations related to sensorimotor integration and spatial learning.» *J Neurosci*, 2003, **23(11)**, pp. 4726–4736.
- CASTALDI, L.: «Studi sulla struttura e sullo sviluppo del mesencefalo: ricerche in Cavia cobaya». *Arch. ital. Anat. Embryol*, 1926, **23**, pp. 481–609.
- CHALMERS, D. T.; LOVENBERG, T. W. y DE SOUZA, E. B.: «Localization of novel corticotropin-releasing factor receptor (CRF2) mRNA expression to specific subcortical nuclei in rat brain: comparison with CRF1 receptor mRNA expression». *J Neurosci*, 1995, **15(10)**, pp. 6340–50.
- CHATFIELD, P. O. y LYMAN, C. P.: «An unusual structure in the floor of the fourth ventricle of the golden hamster, *Mesocricetus auratus*». *J Comp Neurol*, 1954, **101(1)**, pp. 225–35.
- COLOM, L. V.: «Septal networks: relevance to theta rhythm, epilepsy and Alzheimer's disease». *J Neurochem*, 2006, **96(3)**, pp. 609–23.
- COLOM, L. V. y BLAND, B. H.: «Medial septal cell interactions in relation to hippocampal field activity and the effects of atropine.» *Hippocampus*, 1991, **1(1)**, pp. 15–30.
- COLOM, L. V.; CASTANEDA, M. T.; REYNA, T.; HERNANDEZ, S. y GARRIDO-SANABRIA, E.: «Characterization of medial septal glutamatergic neurons and their projection to the hippocampus.» *Synapse*, 2005, **58(3)**, pp. 151–164.

- COLOM, L. V.; FORD, R. D. y BLAND, B. H.: «Hippocampal formation neurons code the level of activation of the cholinergic septohippocampal pathway.» *Brain Res*, 1987, **410(1)**, pp. 12–20.
- CONRAD, L. C.; LEONARD, C. M. y PFAFF, D. W.: «Connections of the median and dorsal raphe nuclei in the rat: an autoradiographic and degeneration study.» *J Comp Neurol*, 1974, **156(2)**, pp. 179–205.
- CONTESTABILE, A. y FLUMERFELT, B. A.: «Afferent connections of the interpeduncular nucleus and the topographic organization of the habenulo-interpeduncular pathway: an HRP study in the rat.» *J Comp Neurol*, 1981, **196(2)**, pp. 253–70.
- COWAN, W. M.; GUILLERY, R. W. y POWELL, T. P.: «The origin of the mammillary peduncle and other hypothalamic connexions from the midbrain.» *J Anat*, 1964, **98**, pp. 345–63.
- CSICSVARI, J.; HIRASE, H.; CZURKÓ, A.; MAMIYA, A. y BUZSÁKI, G.: «Fast network oscillations in the hippocampal CA1 region of the behaving rat.» *J Neurosci*, 1999, **19(16)**, p. RC20.
- DARIAN-SMITH, I.; PROCTOR, R. y RYAN, R. D.: «A single-neurone investigation of somatotopic organization within the cat's trigeminal brain-stem nuclei.» *J Physiol*, 1963, **168**, pp. 147–57.
- DE LECEA, L.; KILDUFF, T. S.; PEYRON, C.; GAO, X.; FOYE, P. E.; DANIELSON, P. E.; FUKUHARA, C.; BATTENBERG, E. L.; GAUTVIK, V. T.; BARTLETT, F. S.; FRANKEL, W. N.; VAN DEN POL, A. N.; BLOOM, F. E.; GAUTVIK, K. M. y SUTCLIFFE, J. G.: «The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity.» *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, **95(1)**, pp. 322–327.
- DRAGOI, G. y BUZSAKI, G.: «Temporal Encoding of Place Sequences by Hippocampal Cell Assemblies.» *Neuron*, 2006, **50(1)**, pp. 145–157.
- EDELMAN, G.: «Consciousness: the remembered present.» *Ann N Y Acad Sci*, 2001, **929**, pp. 111–22.
- EKSTROM, A. D.; CAPLAN, J. B.; HO, E.; SHATTUCK, K.; FRIED, I. y KAHANA, M. J.: «Human hippocampal theta activity during virtual navigation.» *Hippocampus*, 2005, **15(7)**, pp. 881–889.
- EKSTROM, A. D.; KAHANA, M. J.; CAPLAN, J. B.; FIELDS, T. A.; ISHAM, E. A.; NEWMAN, E. L. y FRIED, I.: «Cellular networks underlying human spatial navigation.» *Nature*, 2003, **425(6954)**, pp. 184–188.
- EL MANSARI, M.; SAKAI, K. y JOUVET, M.: «Unitary characteristics of presumptive cholinergic tegmental neurons during the sleep-waking cycle in freely moving cats.» *Exp Brain Res*, 1989, **76(3)**, pp. 519–529.
- ELAZAR, Z. y BERCHANSKI, A.: «Glutamatergic-cholinergic synergistic interaction in the pontine reticular formation. Effects on catalepsy.» *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 2001, **363(5)**, pp. 569–76.
- FARIS, P. D. y SAINSBURY, R. S.: «The role of the pontis oralis in the generation of RSA activity in the hippocampus of the guinea pig.» *Physiology & Behavior*, 1990, **47(6)**, pp. 1193–9.
- FONOFF, E. T.; SILVA, C. P.; BALLESTER, G. y TIMO-IARIA, C.: «Electro-oscillographic correlation between dorsal raphe nucleus, neocortex and hippocampus during wakefulness before and after serotonergic inactivation.» *Braz J Med Biol Res*, 1999, **32(4)**, pp. 469–72.

- FORNAL, C. A.; METZLER, C. W.; MARROSU, F.; DO VALLE, L. E. RIBIERO y JACOBS, B. L.: «A subgroup of dorsal raphe serotonergic neurons in the cat is strongly activated during oral-buccal movements.» *Brain Res*, 1996, **716(1-2)**, pp. 123-133.
- FOX, S. E.; WOLFSON, S. y RANCK, J. B.: «Hippocampal theta rhythm and the firing of neurons in walking and urethane anesthetized rats.» *Exp Brain Res*, 1986, **62(3)**, pp. 495-508.
- FREUND, T. F. y ANTAL, M.: «GABA-containing neurons in the septum control inhibitory interneurons in the hippocampus.» *Nature*, 1988, **336(6195)**, pp. 170-173.
- FREUND, T. F. y GULYÁS, A. I.: «Inhibitory control of GABAergic interneurons in the hippocampus.» *Can J Physiol Pharmacol*, 1997, **75(5)**, pp. 479-487.
- FRIES, P.; REYNOLDS, J. H.; RORIE, A. E. y DESIMONE, R.: «Modulation of oscillatory neuronal synchronization by selective visual attention.» *Science*, 2001, **291(5508)**, pp. 1560-3.
- FRIES, P.; WOMELSDORF, T.; OOSTENVELD, R. y DESIMONE, R.: «The effects of visual stimulation and selective visual attention on rhythmic neuronal synchronization in macaque area V4.» *J Neurosci*, 2008, **28(18)**, pp. 4823-4835.
- FROTSCHER, M. y LÉRÁNT, C.: «Cholinergic innervation of the rat hippocampus as revealed by choline acetyltransferase immunocytochemistry: a combined light and electron microscopic study.» *J Comp Neurol*, 1985, **239(2)**, pp. 237-46.
- FULLER, P. M.; SAPER, C. B. y LUCAS, J.: «The pontine REM switch: past and present.» *J Physiol*, 2007, **584(Pt 3)**, pp. 735-741.
- FUNKE, K. y EYSEL, U. T.: «Inverse correlation of firing patterns of single topographically matched perigeniculate neurons and cat dorsal lateral geniculate relay cells.» *Vis Neurosci*, 1998, **15(4)**, pp. 711-729.
- GAZTELU, J. M. y BUÑO, W.: «Septo-hippocampal relationships during EEG theta rhythm.» *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 1982, **54(4)**, pp. 375-87.
- GERSTNER, W., W. & KISTLER: *Spiking Neuron Models: Single Neurons, Populations, Plasticity*. Cambridge University Press, Cambridge., 2002.
- GIVENS, B. S. y OLTON, D. S.: «Cholinergic and GABAergic modulation of medial septal area: effect on working memory.» *Behav Neurosci*, 1990, **104(6)**, pp. 849-855.
- GOTO, M.: *Estudo hodológico e funcional do núcleo incertus e da pars alfa da substância cinzenta central / Hodological and functional study of the nucleus incertus and the pars alfa of the Central Gray*. Tesis doctoral, Universidade de São Paulo. Instituto de Psicologia, 1998.
- GOTO, M; SWANSON, L W y CANTERAS, N S: «Connections of the nucleus incertus.» *J Comp Neurol*, 2001, **438(1)**, pp. 86-122.
- GRABOWSKI, R.; BLASZCZYK, M.; ECKERSDORF, B.; GOLLEBIEWSKI, H. y KONOPACKI, J.: «The spontaneous theta rhythm recorded from the hypothalamus posterior in the cat in vivo.» *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 1996, **56(1)**, pp. 155-159.
- GREEN, J. D. y ARDUINI, A. A.: «Hippocampal electrical activity in arousal.» *J Neurophysiol*, 1954, **17(6)**, pp. 533-557.
- GRITTI, I.; HENNY, P.; GALLONI, F.; MAINVILLE, L.; MARIOTTI, M. y JONES, B. E.: «Stereological estimates of the basal forebrain cell population in the rat, including neurons containing choline acetyltransferase, glutamic acid decarboxylase or phosphate-activated glutaminase and colocalizing vesicular glutamate transporters.» *Neuroscience*, 2006, **143(4)**, pp. 1051-1064.

- GROENEWEGEN, H. J.; AHLENIUS, S.; HABER, S. N.; KOWALL, N. W. y NAUTA, W. J.: «Cytoarchitecture, fiber connections, and some histochemical aspects of the interpeduncular nucleus in the rat». *J Comp Neurol*, 1986, **249**(1), pp. 65–102.
- GUILLERY, R. W.: «Degeneration in the hypothalamic connexions of the albino rat». *J Anat*, 1957, **91**(1), pp. 91–115.
- GULYÁS, A. I.; HÁJOS, N.; KATONA, I. y FREUND, T. F.: «Interneurons are the local targets of hippocampal inhibitory cells which project to the medial septum.» *Eur J Neurosci*, 2003, **17**(9), pp. 1861–1872.
- HAFTING, T.; FYHN, M.; MOLDEN, S.; MOSER, M.-B. y MOSER, E. I.: «Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex.» *Nature*, 2005, **436**(7052), pp. 801–806.
- HAJSZAN, T.; ALREJA, M. y LERANTH, C.: «Intrinsic vesicular glutamate transporter 2-immunoreactive input to septohippocampal parvalbumin-containing neurons: novel glutamatergic local circuit cells.» *Hippocampus*, 2004, **14**(4), pp. 499–509.
- HASSELMO, M. E.: «What is the function of hippocampal theta rhythm?—Linking behavioral data to phasic properties of field potential and unit recording data.» *Hippocampus*, 2005, **15**(7), pp. 936–949.
- HASSELMO, M. E.: «Temporally structured replay of neural activity in a model of entorhinal cortex, hippocampus and postsubiculum.» *Eur J Neurosci*, 2008, **28**(7), pp. 1301–1315.
- HAYAKAWA, T.; ITO, H. y ZYO, K.: «Neuroanatomical study of afferent projections to the supramammillary nucleus of the rat.» *Anat Embryol (Berl)*, 1993, **188**(2), pp. 139–148.
- HAYAKAWA, T. y ZYO, K.: «Comparative cytoarchitectonic study of Gudden's tegmental nuclei in some mammals.» *J Comp Neurol*, 1983, **216**(3), pp. 233–44.
- HAYAKAWA, T. y ZYO, K.: «Comparative anatomical study of the tegmentomammillary projections in some mammals: a horseradish peroxidase study.» *Brain Res*, 1984, **300**(2), pp. 335–49.
- HEBB, D. O.: *The Organization of Behavior: A neuropsychological theory*. New York: Wiley, 1949.
- HERRICK, C. J.: *The brain of the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum**. Chicago: Univ. of Chicago Press, 1948.
- HÖLSCHER, C.; ANWYL, R. y ROWAN, M. J.: «Stimulation on the positive phase of hippocampal theta rhythm induces long-term potentiation that can be depotentiated by stimulation on the negative phase in area CA1 in vivo.» *J Neurosci*, 1997, **17**(16), pp. 6470–7.
- HOPFIELD, J. J.: «Pattern recognition computation using action potential timing for stimulus representation.» *Nature*, 1995, **376**(6535), pp. 33–36.
- HSU, D.: «The dentate gyrus as a filter or gate: a look back and a look ahead.» *Prog Brain Res*, 2007, **163**, pp. 601–613.
- HSU, S. M.; RAINE, L. y FANGER, H.: «Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures.» *J Histochem Cytochem*, 1981, **29**(4), pp. 577–80.
- HUERTA, P. T. y LISMAN, J. E.: «Synaptic plasticity during the cholinergic theta-frequency oscillation in vitro.» *Hippocampus*, 1996, **6**(1), pp. 58–61.
- HUGUENARD, J. R.; HAMILL, O. P. y PRINCE, D. A.: «Sodium channels in dendrites of rat cortical pyramidal neurons.» *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989, **86**(7), pp. 2473–2477.

- JENSEN, O. y TESCHE, C. D.: «Frontal theta activity in humans increases with memory load in a working memory task.» *Eur J Neurosci*, 2002, **15(8)**, pp. 1395–1399.
- JIANG, F. y KHANNA, S.: «Microinjection of carbachol in the supramammillary region suppresses CA1 pyramidal cell synaptic excitability.» *Hippocampus*, 2006, **16(10)**, pp. 891–905.
- JONES, B. E.: «Noradrenergic locus coeruleus neurons: their distant connections and their relationship to neighboring (including cholinergic and GABAergic) neurons of the central gray and reticular formation.» *Prog Brain Res*, 1991, **88**, pp. 15–30.
- JONES, B. E.: «Arousal systems.» *Front Biosci*, 2003.
- JOUVET, M.: «Research on the neural structures and responsible mechanisms in different phases of physiological sleep.» *Archives italiennes de biologie*, 1962, **100**, pp. 125–206.
- JOUVET, M.: «Biogenic amines and the states of sleep.» *Science*, 1969, **163(862)**, pp. 32–41.
- KAHANA, M. J.; SEELIG, D. y MADSEN, J. R.: «Theta returns.» *Curr Opin Neurobiol*, 2001, **11(6)**, pp. 739–744.
- KAMONDI, A.; WILLIAMS, J. A.; HUTCHEON, B. y REINER, P. B.: «Membrane properties of mesopontine cholinergic neurons studied with the whole-cell patch-clamp technique: implications for behavioral state control.» *J Neurophysiol*, 1992, **68(4)**, pp. 1359–1372.
- KAPPERS, C. U. A.: *The Comparative Anatomy of the Nervous System of Vertebrates, including Man*, 1936.
- KATAYAMA, Y.; DEWITT, D. S.; BECKER, D. P. y HAYES, R. L.: «Behavioral evidence for a cholinceptive pontine inhibitory area: descending control of spinal motor output and sensory input.» *Brain Res*, 1984, **296(2)**, pp. 241–262.
- KILDUFF, T. S. y PEYRON, C.: «The hypocretin/orexin ligand-receptor system: implications for sleep and sleep disorders.» *Trends Neurosci*, 2000, **23(8)**, pp. 359–365.
- KINNEY, G. G.; KOCSIS, B. y VERTES, R. P.: «Injections of muscimol into the median raphe nucleus produce hippocampal theta rhythm in the urethane anesthetized rat.» *Psychopharmacology (Berl)*, 1995, **120(3)**, pp. 244–8.
- KINNEY, G. G.; PATINO, P.; MERMET-BOUVIER, Y.; STARRETT, J. E. y GRIBKOFF, V. K.: «Cognition-enhancing drugs increase stimulated hippocampal theta rhythm amplitude in the urethane-anesthetized rat.» *J Pharmacol Exp Ther*, 1999, **291(1)**, pp. 99–106.
- KIRK, I. J.: «Supramammillary neural discharge patterns and hippocampal EEG.» *Brain Res Bull*, 1997, **42(1)**, pp. 23–6.
- KIRK, I. J. y MCNAUGHTON, N.: «Supramammillary cell firing and hippocampal rhythmical slow activity.» *Neuroreport*, 1991, **2(11)**, pp. 723–5.
- KIRK, I. J. y MCNAUGHTON, N.: «Mapping the differential effects of procaine on frequency and amplitude of reticularly elicited hippocampal rhythmical slow activity.» *Hippocampus*, 1993, **3(4)**, pp. 517–25.
- KISS, J.; CSÁKI, A.; BOKOR, H.; SHANABROUGH, M. y LERANTH, C.: «The supramammillo-hippocampal and supramammillo-septal glutamatergic/aspartatergic projections in the rat: a combined [3H]D-aspartate autoradiographic and immunohistochemical study.» *Neuroscience*, 2000, **97(4)**, pp. 657–69.
- KITCHIGINA, V. F.: «Mechanisms of the regulation and functional significance of the theta rhythm. Roles of serotonergic and noradrenergic systems.» *Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova*, 2004, **54(1)**, pp. 101–119.

- KLAUSBERGER, T. y SOMOGYI, P.: «Neuronal Diversity and Temporal Dynamics: The Unity of Hippocampal Circuit Operations». *Science*, 2008, **321**(5885), pp. 53–57.
- KLEMM, W. R.: «Ascending and descending excitatory influences in the brain stem reticulum: a re-examination». *Brain Res*, 1972, **36**(2), pp. 444–52.
- KOCH, C.: *The quest for consciousness: A neurobiological approach*. Roberts & Company Publishers, 2004.
- KOCSIS, B.: «The effect of descending theta rhythmic input from the septohippocampal system on firing in the supramammillary nucleus». *Brain Res*, 2006, **1086**(1), pp. 92–7.
- KOCSIS, B.; BRAGIN, A. y BUZSÁKI, G.: «Interdependence of multiple theta generators in the hippocampus: a partial coherence analysis». *J Neurosci*, 1999, **19**(14), pp. 6200–12.
- KOCSIS, B. y KAMINSKI, M.: «Dynamic changes in the direction of the theta rhythmic drive between supramammillary nucleus and the septohippocampal system». *Hippocampus*, 2006, **16**(6), pp. 531–40.
- KOCSIS, B. y VERTES, R. P.: «Dorsal raphe neurons: synchronous discharge with the theta rhythm of the hippocampus in the freely behaving rat.» *J Neurophysiol*, 1992, **68**(4), pp. 1463–7.
- KOCSIS, B. y VERTES, R. P.: «Phase relations of rhythmic neuronal firing in the supra-mammillary nucleus and mammillary body to the hippocampal theta activity in urethane anesthetized rats». *Hippocampus*, 1997, **7**(2), pp. 204–14.
- KODAMA, T.; TAKAHASHI, Y. y HONDA, Y.: «Enhancement of acetylcholine release during paradoxical sleep in the dorsal tegmental field of the cat brain stem.» *Neurosci Lett*, 1990, **114**(3), pp. 277–282.
- KÖHLER, C.; CHAN-PALAY, V y WU, J Y: «Septal neurons containing glutamic acid decarboxylase immunoreactivity project to the hippocampal region in the rat brain». *Anat Embryol*, 1984, **169**(1), pp. 41–4.
- KÖNIG, P. y ENGEL, A. K.: «Correlated firing in sensory-motor systems.» *Curr Opin Neurobiol*, 1995, **5**(4), pp. 511–519.
- KONOPACKI, J.; GOLLEBIEWSKI, H. y ECKERSDORF, B.: «Carbachol-induced rhythmic slow activity (theta) in cat hippocampal formation slices.» *Brain Res*, 1992, **578**(1-2), pp. 13–16.
- KOROSI, ANIKO; VEENING, JAN G; KOZICZ, TAMÁS; HENCKENS, MARLOES; DEDEREN, JOS; GROENINK, LUCIANNE; VAN DER GUGTEN, JAN; OLIVIER, BEREND y ROUBOS, ERIC W: «Distribution and expression of CRF receptor 1 and 2 mRNAs in the CRF over-expressing mouse brain.» *Brain Res*, 2006, **1072**(1), pp. 46–54.
- KRAMIS, R.; VANDERWOLF, C. H. y BLAND, B. H.: «Two types of hippocampal rhythmical slow activity in both the rabbit and the rat: relations to behavior and effects of atropine, diethyl ether, urethane, and pentobarbital.» *Exp Neurol*, 1975, **49**(1 Pt 1), pp. 58–85.
- KUBOTA, Y.; INAGAKI, S.; SHIOSAKA, S.; CHO, H. J.; TATEISHI, K.; HASHIMURA, E.; HAMAOKA, T.; KUBOTA, M. TOHYAMA Y.; INAGAKI, S.; SHIOSAKA, S.; CHO, H. J.; TATEISHI, K.; HASHIMURA, E.; HAMAOKA, T.; KUBOTA, M. TOHYAMA Y.; INAGAKI, S.; SHIOSAKA, S.; CHO, H. J.; TATEISHI, K.; HASHIMURA, E.; HAMAOKA, T. y TOHYAMA, M.: «The distribution of cholecystokinin octapeptide-like structures in the lower brain stem of the rat: an immunohistochemical analysis». *Neuroscience*, 1983, **9**(3), pp. 587–604.
- LANCIEGO, J. L.; WOUTERLOOD, F. G.; ERRO, E. y GIMÉNEZ-AMAYA, J. M.: «Multiple axonal tracing: simultaneous detection of three tracers in the same section.» *Histochem Cell Biol*, 1998, **110**(5), pp. 509–515.

- LARSON, J.; WONG, D. y LYNCH, G.: «Patterned stimulation at the theta frequency is optimal for the induction of hippocampal long-term potentiation.» *Brain Res*, 1986, **368(2)**, pp. 347–350.
- LEE, M G; CHROBAK, J J; SIK, A; WILEY, R G y BUZSÁKI, G: «Hippocampal theta activity following selective lesion of the septal cholinergic system.» *Neuroscience*, 1994, **62(4)**, pp. 1033–47.
- LEONARD, C. S. y LLINÁS, R.: «Serotonergic and cholinergic inhibition of mesopontine cholinergic neurons controlling REM sleep: an in vitro electrophysiological study.» *Neuroscience*, 1994, **59(2)**, pp. 309–330.
- LEONTOVICH, T. A. y ZHUKOVA, G. P.: «The specificity of the neuronal structure and topography of the reticular formation in the brain and spinal cord of carnivora.» *J Comp Neurol*, 1963, **121**, pp. 347–379.
- LERANTH, C. y KISS, J.: «A population of supramammillary area calretinin neurons terminating on medial septal area cholinergic and lateral septal area calbindin-containing cells are aspartate/glutamatergic.» *J Neurosci*, 1996, **16(23)**, pp. 7699–710.
- LESTIENNE, R.: «Determination of the precision of spike timing in the visual cortex of anaesthetised cats.» *Biol Cybern*, 1996, **74(1)**, pp. 55–61.
- LEVIN, E. D. y SIMON, B. B.: «Nicotinic acetylcholine involvement in cognitive function in animals.» *Psychopharmacology (Berl)*, 1998, **138(3-4)**, pp. 217–230.
- LI, S.; TOPCHIV, I. y KOCSIS, B.: «The effect of atropine administered in the medial septum or hippocampus on high- and low-frequency theta rhythms in the hippocampus of urethane anesthetized rats.» *Synapse*, 2007, **61(6)**, pp. 412–419.
- LI, X. G.; SOMOGYI, P.; TEPPER, J. M. y BUZSÁKI, G.: «Axonal and dendritic arborization of an intracellularly labeled chandelier cell in the CA1 region of rat hippocampus.» *Exp Brain Res*, 1992, **90(3)**, pp. 519–525.
- LI, X G; SOMOGYI, P; YLINEN, A y BUZSÁKI, G: «The hippocampal CA3 network: an in vivo intracellular labeling study.» *J Comp Neurol*, 1994, **339(2)**, pp. 181–208.
- LIU, R.; CHANG, L. y WICKERN, G.: «The dorsal tegmental nucleus: an axoplasmic transport study.» *Brain Res*, 1984, **310(1)**, pp. 123–32.
- LIVNAH, O.; BAYER, E. A.; WILCHEK, M. y SUSSMAN, J. L.: «Three-dimensional structures of avidin and the avidin-biotin complex.» *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993, **90(11)**, pp. 5076–5080.
- LOUGHLIN, S. E.; FOOTE, S. L. y GRZANNA, R.: «Efferent projections of nucleus locus coeruleus: morphologic subpopulations have different efferent targets.» *Neuroscience*, 1986, **18(2)**, pp. 307–319.
- LOUIE, K. y WILSON, M. A.: «Temporally structured replay of awake hippocampal ensemble activity during rapid eye movement sleep.» *Neuron*, 2001, **29(1)**, pp. 145–156.
- LUEBKE, J. I.; GREENE, R. W.; SEMBA, K.; KAMONDI, A.; MCCARLEY, R. W. y REINER, P. B.: «Serotonin hyperpolarizes cholinergic low-threshold burst neurons in the rat laterodorsal tegmental nucleus in vitro.» *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992, **89(2)**, pp. 743–747.
- LYDIC, R. y BAGHDOYAN, H.A.: *Handbook of behavioral state control: cellular and molecular mechanisms*. CRC Press, 1999.

- MA, S.; BONAVENTURE, P.; FERRARO, T.; SHEN, P.; BURAZIN, T. C. D.; BATHGATE, R. A. D.; LIU, C.; TREGEAR, G. W.; SUTTON, S. W. y GUNDLACH, A. L.: «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*, 2007, **144**(1), pp. 165–90.
- MA, S; OLUCHA-BORDONAU, F E; HOSSAIN, M. A; LIN, F; KUEI, C; LIU, C; WADE, J D; SUTTON, S W; NUÑEZ, A y GUNDLACH, A L: «Modulation of hippocampal theta oscillations and spatial memory by relaxin-3 neurons of the nucleus incertus.» *Learn Mem*, 2009, **16**(11), pp. 730–742.
- MACADAR, A. W.; CHALUPA, L. M. y LINDSLEY, D. B.: «Differentiation of brain stem loci which affect hippocampal and neocortical electrical activity». *Exp Neurol*, 1974, **43**(3), pp. 499–514.
- MAGGI, C. A. y MELI, A.: «Suitability of urethane anesthesia for physiopharmacological investigations in various systems. Part 1: General considerations». *Experientia*, 1986, **42**(2), pp. 109–14.
- MAGLÓCZKY, Z.; ACSÁDY, L. y FREUND, T. F.: «Principal cells are the postsynaptic targets of supramammillary afferents in the hippocampus of the rat.» *Hippocampus*, 1994, **4**(3), pp. 322–334.
- MAHUT, H.; ZOLA-MORGAN, S. y MOSS, M.: «Hippocampal resections impair associative learning and recognition memory in the monkey». *J. Neurosci*, 1982, pp. 1–16.
- MANN, I D; MAINVILLE, L y JONES, B E: «Evidence for glutamate, in addition to acetylcholine and GABA, neurotransmitter synthesis in basal forebrain neurons projecting to the entorhinal cortex». *Neuroscience*, 2001, **107**(2), pp. 249–63.
- MANSEAU, F.; DANIK, M. y WILLIAMS, S.: «A functional glutamatergic neurone network in the medial septum and diagonal band area.» *J Physiol*, 2005, **566**(Pt 3), pp. 865–884.
- MARKRAM, H.; LÜBKE, J.; FROTSCHER, M. y SAKMANN, B.: «Regulation of synaptic efficacy by coincidence of postsynaptic APs and EPSPs.» *Science*, 1997, **275**(5297), pp. 213–215.
- MARU, E.; TAKAHASHI, L. K. y IWAHARA, S.: «Effects of median raphe nucleus lesions on hippocampal EEG in the freely moving rat». *Brain Res*, 1979, **163**(2), pp. 223–34.
- MEESSEN, H. y OLSZEWSKI, J.: *A Cytoarchitectonic Atlas of the Rhombencephalon of the Rabbit*. Basel: S. Karger, 1949.
- MESULAM, M. M.; GEULA, C.; BOTHWELL, M. A. y HERSH, L. B.: «Human reticular formation: cholinergic neurons of the pedunculo-pontine and laterodorsal tegmental nuclei and some cytochemical comparisons to forebrain cholinergic neurons.» *J Comp Neurol*, 1989, **283**(4), pp. 611–633.
- MEYNERT, H.: *The brain of mammals. In S. Stricker (Ed) Manual of human and comparative histology (Vol.2)*. London: New Sydenham Society, 1872.
- MIRZA, N. R. y STOLERMAN, I. P.: «Nicotine enhances sustained attention in the rat under specific task conditions.» *Psychopharmacology (Berl)*, 1998, **138**(3-4), pp. 266–274.
- MISSENER, P.; DEIBER, M-P.; GOLD, G.; MILLET, P.; PUN, M. GEX-FABRY; FAZIO-COSTA, L.; GIANNAKOPOULOS, P. y IBÁÑEZ, V.: «Frontal theta event-related synchronization: comparison of directed attention and working memory load effects.» *J Neural Transm*, 2006, **113**(10), pp. 1477–1486.
- MIYAMOTO, Y.; WATANABE, Y. y TANAKA, M.: «Developmental expression and serotonergic regulation of relaxin 3/INSL7 in the nucleus incertus of rat brain». *Regul Pept*, 2008, **145**(1-3), pp. 54–9.

- MOITA, M. A. P.; ROSIS, S.; ZHOU, Y.; LEDOUX, J. E. y BLAIR, H. T.: «Hippocampal place cells acquire location-specific responses to the conditioned stimulus during auditory fear conditioning.» *Neuron*, 2003, **37**(3), pp. 485–497.
- MOORE, R. Y. y HALARIS, A. E.: «Hippocampal innervation by serotonin neurons of the midbrain raphe in the rat.» *J Comp Neurol*, 1975, **164**(2), pp. 171–183.
- MOREST, D. K.: «Connexions of the dorsal tegmental nucleus in rat and rabbit.» *J Anat*, 1961, **95**, pp. 229–46.
- MORRIS, R. G. M.; MOSER, E. I.; RIEDEL, G.; MARTIN, S. J.; SANDIN, J.; DAY, M. y O'CARROLL, C.: «Elements of a neurobiological theory of the hippocampus: the role of activity-dependent synaptic plasticity in memory.» *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2003, **358**(1432), pp. 773–786.
- MORRISON, A y BOWKER, R.: «The biological significance of PGO spikes in the sleeping cat.» *Acta neurobiologiae experimentalis*, 1975.
- MORUZZI, G. y MAGOUN, H. W.: «Brain stem reticular formation and activation of the EEG.» *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 1949, **1**(4), pp. 455–73.
- MOSKO, S.; LYNCH, G. y COTMAN, C. W.: «The distribution of septal projections to the hippocampus of the rat.» *J Comp Neurol*, 1973, **152**(2), pp. 163–174.
- MUZUR, A.: «Toward an integrative theory of sleep and dreaming.» *Journal of Theoretical Biology*, 2005, **233**(1), pp. 103–118.
- NÁDASDY, Z.: *Spatio-Temporal Patterns in the Extracellular Recording of Hippocampal Pyramidal Cells: From Single Spikes to Spike Sequences*. Tesis doctoral, Rutgers, The State University of New Jersey, 1998.
- NAKANE, P. K. y PIERCE, G. B.: «Enzyme-labeled antibodies: preparation and application for the localization of antigens.» *J Histochem Cytochem*, 1966, **14**(12), pp. 929–931.
- NAUTA, W. J.: «Hippocampal projections and related neural pathways to the midbrain in the cat.» *Brain*, 1958, **81**(3), pp. 319–40.
- NUÑEZ, A.; CERVERA-FERRI, A.; OLUCHA-BORDONAU, F.; RUIZ-TORNER, A. y TERUEL, V.: «Nucleus incertus contribution to hippocampal theta rhythm generation.» *Eur J Neurosci*, 2006, **23**(10), pp. 2731–2738.
- NUÑEZ, A.; DE ANDRÉS, I. y GARCÍA-AUSTT, E.: «Relationships of nucleus reticularis pontis oralis neuronal discharge with sensory and carbachol evoked hippocampal theta rhythm.» *Exp Brain Res*, 1991, **87**(2), pp. 303–308.
- ODDIE, S. D. y BLAND, B. H.: «Hippocampal formation theta activity and movement selection.» *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 1998, **22**(2), pp. 221–231.
- ODDIE, S. D.; BLAND, B. H.; COLOM, L. V. y VERTES, R. P.: «The midline posterior hypothalamic region comprises a critical part of the ascending brainstem hippocampal synchronizing pathway.» *Hippocampus*, 1994, **4**(4), pp. 454–73.
- O'KEEFE, J.: «Place units in the hippocampus of the freely moving rat.» *Exp Neurol*, 1976, **51**(1), pp. 78–109.
- O'KEEFE, J. y BURGESS, N.: «Dual phase and rate coding in hippocampal place cells: theoretical significance and relationship to entorhinal grid cells.» *Hippocampus*, 2005, **15**(7), pp. 853–866.
- O'KEEFE, J. y DOSTROVSKY, J.: «The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat.» *Brain Res*, 1971, **34**(1), pp. 171–175.

- O'KEEFE, J. y NADEL, L.: *The hippocampus as a cognitive map*. Oxford University Press, 1978.
- O'KEEFE, J. y RECCE, M. L.: «Phase relationship between hippocampal place units and the EEG theta rhythm». *Hippocampus*, 1993, **3(3)**.
- OLSZEWSKI, J. y BAXTER, D.: *Cytoarchitecture of the human brain stem*. Basel:Karger, 1954.
- OLTON, D. S.; WIBLE, C. G. y SHAPIRO, M. L.: «Mnemonic theories of hippocampal function.» *Behav Neurosci*, 1986, **100(6)**, pp. 852–855.
- OLUCHA-BORDONAU, F. E.; TERUEL, V.; BARCIA-GONZALEZ, J.; RUIZ-TORNER, A.; VALVERDE-NAVARRO, A. A. y MARTINEZ-SORIANO, F.: «Cytoarchitecture and efferent projections of the nucleus incertus of the rat». *J Comp Neurol*, 2003, **464(1)**.
- PAN, W.-X. y McNAUGHTON, N.: «The supramammillary area: its organization, functions and relationship to the hippocampus». *Prog Neurobiol*, 2004, **74(3)**, pp. 127–66.
- PAPEZ, J.W.: *Comparative Neurology*. New York: Thomas Crowell, 1929.
- PAPP, G.; WITTER, M. P. y TREVES, A.: «The CA3 network as a memory store for spatial representations». *Learning & Memory*, 2007, **14(11)**, pp. 732–744.
- PARVIZI, J. y DAMASIO, A.: «Consciousness and the brainstem». *Cognition*, 2001, **79(1-2)**, pp. 135–60.
- PAULSEN, O. y SEJNOWSKI, T. J.: «Natural patterns of activity and long-term synaptic plasticity.» *Curr Opin Neurobiol*, 2000, **10(2)**, pp. 172–179.
- PAXINOS, G.; CARRIVE, P.; WANG, H. y WANG, P.-Y.: *Chemoarchitectonic Atlas of the Rat Brainstem*. Academic Press, 1999.
- PAXINOS, G. y WATSON, C.: *The Rat Brain: In Stereotaxic Coordinates*. Academic Press; 2nd edition, 1986.
- PEDEMONTE, M.; RODRÍGUEZ, A. y VELLUTI, R. A.: «Hippocampal theta waves as an electrocardiogram rhythm timer in paradoxical sleep.» *Neurosci Lett*, 1999, **276(1)**, pp. 5–8.
- PENTTONEN, M.; KAMONDI, A.; ACSÁDY, L. y BUZSÁKI, G.: «Gamma frequency oscillation in the hippocampus of the rat: intracellular analysis in vivo.» *Eur J Neurosci*, 1998, **10(2)**, pp. 718–728.
- PERKEL, D.H. y BULLOCK, T.H.: «Neural coding: A report based on an NRP work session». *Neurosciences Research Program Bulletin*, 1968, **6**, pp. 219–349.
- PETSCHKE, H.; STUMPF, C. y GOGOLAK, G.: «The significance of the rabbit's septum as a relay station between the midbrain and the hippocampus. I. The control of hippocampus arousal activity by the septum cells.» *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 1962, **14**, pp. 202–11.
- PICKEL, V. M.; SEGAL, M. y BLOOM, F. E.: «A radioautographic study of the efferent pathways of the nucleus locus coeruleus.» *J Comp Neurol*, 1974, **155(1)**, pp. 15–42.
- POTTER, E.; BEHAN, D. P.; LINTON, E. A.; LOWRY, P. J.; SAWCHENKO, P. E. y VALE, W. W.: «The central distribution of a corticotropin-releasing factor (CRF)-binding protein predicts multiple sites and modes of interaction with CRF.» *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992, **89(9)**, pp. 4192–4196.

- POTTER, E.; SUTTON, S.; DONALDSON, C.; CHEN, R.; PERRIN, M.; LEWIS, K.; SAWCHENKO, P. E. y VALE, W.: «Distribution of corticotropin-releasing factor receptor mRNA expression in the rat brain and pituitary.» *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, **91(19)**, pp. 8777–8781.
- RAMÓN-MOLINER, E. y NAUTA, W. J.: «The isodendritic core of the brain stem.» *J Comp Neurol*, 1966, **126(3)**, pp. 311–335.
- RAMON-Y CAJAL, S.: *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés*. Paris: Maloine, 1909.
- RANCK, J. B. JR.: «Studies on single neurons in dorsal hippocampal formation and septum in unrestrained rats. I. Behavioral correlates and firing repertoires.» *Exp Neurol*, 1973, **41(2)**, pp. 461–531.
- REINER, A.; VEENMAN, C. L.; MEDINA, L.; JIAO, Y.; MAR, N. DEL y HONIG, M. G.: «Pathway tracing using biotinylated dextran amines.» *J Neurosci Methods*, 2000, **103(1)**, pp. 23–37.
- REINOSO-SUÁREZ, F.; DE ANDRÉS, I.; RODRIGO-ANGULO, M. L. y GARZÓN, M.: «Brain structures and mechanisms involved in the generation of REM sleep.» *Sleep Med Rev*, 2001, **5(1)**, pp. 63–77.
- RIEOLD, P. Y. y SWANSON, L. W.: «Connections of the rat lateral septal complex.» *Brain Res Brain Res Rev*, 1997, **24(2-3)**, pp. 115–195.
- ROBERT, C.; KARASINSKI, P.; NATOWICZ, R. y LIMOGÉ, A.: «Adult rat vigilance states discrimination by artificial neural networks using a single EEG channel.» *Physiol Behav*, 1996, **59(6)**, pp. 1051–1060.
- RODRIGO-ANGULO, M. L.; RODRIGUEZ-VEIGA, E. y REINOSO-SUAREZ, F.: «Serotonergic connections to the ventral oral pontine reticular nucleus: implication in paradoxical sleep modulation.» *J Comp Neurol*, 2000, **418(1)**.
- ROSE, G. M. y DUNWIDDIE, T. V.: «Induction of hippocampal long-term potentiation using physiologically patterned stimulation.» *Neurosci Lett*, 1986, **69(3)**, pp. 244–248.
- ROSSI, G. F. y ZIRONOLI, A.: «The anatomical structures with permit awakening in brain-isolated cats.» *Boll Soc Ital Biol Sper*, 1954, **30(6)**, pp. 494–495.
- SAINSBURY, R. S.; HEYNEN, A. y MONTROYA, C. P.: «Behavioral correlates of hippocampal type 2 theta in the rat.» *Physiol Behav*, 1987, **39(4)**, pp. 513–519.
- SAKATA, S.: «Timing and hippocampal theta in animals.» *Rev Neurosci*, 2006, **17(1-2)**, pp. 157–162.
- SANFORD, L. D.; YANG, L.; WELLMAN, L. L.; DONG, E. y TANG, X.: «Mouse strain differences in the effects of corticotropin releasing hormone (CRH) on sleep and wakefulness.» *Brain Res*, 2008, **1190**, pp. 94–104.
- SARGOLINI, F.; FYHN, M.; HAFTING, T.; MCNAUGHTON, B L; WITTER, M P; MOSER, N-B y MOSER, E I: «Conjunctive representation of position, direction, and velocity in entorhinal cortex.» *Science*, 2006, **312(5774)**, pp. 758–762.
- SARTER, M y BRUNO, J P: «Cortical cholinergic inputs mediating arousal, attentional processing and dreaming: differential afferent regulation of the basal forebrain by telencephalic and brainstem afferents.» *Neuroscience*, 2000, **95(4)**, pp. 933–52.
- SCHEIBEL, M.E. y SCHEIBEL, A.B.: *Structural substrates for integrative patterns in the brain stem reticular core. Reticular formation of the brain. In Reticular formation of the brain*. Oxford: Little, Brown., 1958.

- SCOVILLE, W. B. y MILNER, B.: «Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. 1957.» *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 2000, **12**(1), pp. 103–113.
- SEMBA, K.: «Aminergic and cholinergic afferents to REM sleep induction regions of the pontine reticular formation in the rat.» *J Comp Neurol*, 1993, **330**(4), pp. 543–56.
- SHAMMAH-LAGNADO, S. J.; NEGRÃO, N.; SILVA, B. A. y RICARDO, J. A.: «Afferent connections of the nuclei reticularis pontis oralis and caudalis: a horseradish peroxidase study in the rat.» *Neuroscience*, 1987, **20**(3), pp. 961–989.
- SHUTE, C. C. y LEWIS, P. R.: «The ascending cholinergic reticular system: neocortical, olfactory and subcortical projections.» *Brain*, 1967, **90**(3), pp. 497–520.
- SIK, A.; PENTTONEN, M. y BUZSÁKI, G.: «Interneurons in the hippocampal dentate gyrus: an in vivo intracellular study.» *Eur J Neurosci*, 1997, **9**(3), pp. 573–588.
- SIMÕES, C. A.; VALLE, A. C. y TIMO-IARIA, C.: «Correlation between concomitant theta waves in nucleus reticularis pontis oralis and in hippocampus, thalamus and neocortex during dreaming in rats.» *Braz J Med Biol Res*, 1996, **29**(12), pp. 1645–1650.
- SINGER, W.: «Neuronal representations, assemblies and temporal coherence.» *Prog Brain Res*, 1993, **95**, pp. 461–474.
- SINGER, W.: «Neuronal synchrony: a versatile code for the definition of relations?» *Neuron*, 1999, **24**(1), pp. 49–65, 111–25.
- SLOVITER, R. S.; DICHTER, M. A.; RACHINSKY, T. L.; DEAN, E.; GOODMAN, J. H.; SOLLAS, A. L. y MARTIN, D. L.: «Basal expression and induction of glutamate decarboxylase and GABA in excitatory granule cells of the rat and monkey hippocampal dentate gyrus.» *J Comp Neurol*, 1996, **373**(4), pp. 593–618.
- SOMMER, M. A. y WURTZ, R. H.: «Frontal eye field neurons orthodromically activated from the superior colliculus.» *J Neurophysiol*, 1998, **80**(6), pp. 3331–5.
- SOTTY, F.: «Distinct electrophysiological properties of glutamatergic, cholinergic and GABAergic rat septohippocampal neurons: novel implications for hippocampal rhythmicity.» *J Physiol (Lond)*, 2003, **551**(3), pp. 927–943.
- SQUIRE, L. R.: «Memory systems of the brain: a brief history and current perspective.» *Neurobiol Learn Mem*, 2004, **82**(3), pp. 171–177.
- STAUBLI, U. y LYNCH, G.: «Stable hippocampal long-term potentiation elicited by 'theta' pattern stimulation.» *Brain Res*, 1987, **435**(1-2), pp. 227–234.
- STERIADE, M.: «Cholinergic blockage of network- and intrinsically generated slow oscillations promotes waking and REM sleep activity patterns in thalamic and cortical neurons.» *Prog Brain Res*, 1993, **98**, pp. 345–355.
- STERIADE, M.; DATTA, S.; PARÉ, D.; OAKSON, G. y DOSSI, R. C. CURRÓ: «Neuronal activities in brain-stem cholinergic nuclei related to tonic activation processes in thalamocortical systems.» *J Neurosci*, 1990, **10**(8), pp. 2541–2559.
- STERIADE, M.; DOSSI, R. C. y NUÑEZ, A.: «Network modulation of a slow intrinsic oscillation of cat thalamocortical neurons implicated in sleep delta waves: cortically induced synchronization and brainstem cholinergic suppression.» *J Neurosci*, 1991, **11**(10), pp. 3200–17.
- STEWART, M. y FOX, S. E.: «Do septal neurons pace the hippocampal theta rhythm?» *Trends in Neurosciences*, 1990, **13**(5), pp. 163–8.

- SWADLOW, H A y WAXMAN, S G: «Observations on impulse conduction along central axons». *Proc Natl Acad Sci USA*, 1975, **72(12)**, pp. 5156–9.
- SWANSON, L. W. y HARTMAN, B. K.: «The central adrenergic system. An immunofluorescence study of the location of cell bodies and their efferent connections in the rat utilizing dopamine-beta-hydroxylase as a marker.» *J Comp Neurol*, 1975, **163(4)**, pp. 467–505.
- SWANSON, L. W.; WYSS, J. M. y COWAN, W. M.: «An autoradiographic study of the organization of intrahippocampal association pathways in the rat.» *J Comp Neurol*, 1978, **181(4)**, pp. 681–715.
- TABER, E: «The cytoarchitecture of the brain stem of the cat. I. Brain stem nuclei of cat». *J Comp Neurol*, 1961, **116**, pp. 27–69.
- TAKAGI, H.; SHIOSAKA, S.; TOHYAMA, M.; SENBA, E. y SAKANAKA, M.: «Ascending components of the medial forebrain bundle from the lower brain stem in the rat, with special reference to raphe and catecholamine cell groups. A study by the HRP method.» *Brain Res*, 1980, **193(2)**, pp. 315–337.
- TANAKA, M; IJIMA, N; MIYAMOTO, Y y FUKUSUMI, S: «Neurons expressing relaxin 3/INSL 7 in the nucleus incertus respond to stress.» *Eur J Neurosci*, 2005.
- TAUBE, J. S.; MULLER, R. U. y RANCK, J. B.: «Head-direction cells recorded from the postsubiculum in freely moving rats. II. Effects of environmental manipulations.» *J Neurosci*, 1990, **10(2)**, pp. 436–447.
- TEJADA, S.; RIAL, R. V.; COENEN, A. M L; GAMUNDI, A. y ESTEBAN, S.: «Effects of pilocarpine on the cortical and hippocampal theta rhythm in different vigilance states in rats.» *Eur J Neurosci*, 2007, **26(1)**, pp. 199–206.
- TERUEL-MARTI, V: *Conexiones telencefálicas del núcleo incertus y su contribución al ritmo theta*. Tesis doctoral, Universitat de València, 2004.
- TERUEL-MARTÍ, V.; CERVERA-FERRI, A.; NUÑEZ, A.; VALVERDE-NAVARRO, A. A.; OLUCHA-BORDONAU, F. E. y RUIZ-TORNER, A.: «Anatomical evidence for a ponto-septal pathway via the nucleus incertus in the rat». *Brain Res*, 2008, **1218**, pp. 87–96.
- TESCHE, C D y KARHU, J: «Theta oscillations index human hippocampal activation during a working memory task». *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97(2)**, pp. 919–24.
- THINSCHMIDT, J. S.; KINNEY, G. G. y KOCSIS, B.: «The supramammillary nucleus: is it necessary for the mediation of hippocampal theta rhythm?» *Neuroscience*, 1995, **67(2)**, pp. 301–12.
- TONONI, G. y EDELMAN, G. M.: «Consciousness and complexity». *Science*, 1998, **282(5395)**, pp. 1846–51.
- TRAUB, R.D; MILES, R y WONG, R.K.S: «Model of the origin of rhythmic population oscillation in the hippocampal slice», 1989, pp. 1–7.
- TRIARHOU, L. C.: «The percipient observations of Constantin von Economo on encephalitis lethargica and sleep disruption and their lasting impact on contemporary sleep research». *Brain Res Bull*, 2006, **69(3)**, pp. 244–58.
- VALVERDE, F.: «Reticular formation of the pons and medulla oblongata. A Golgi study.» *J Comp Neurol*, 1961, **116**, pp. 71–99.
- VANDERWOLF, C: «Hippocampal electrical activity and voluntary movement in the rat». *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 1969.

- VANNI-MERCIER, G.; SAKAI, K.; LIN, J. S. y JOUVET, M.: «Mapping of cholinergic brainstem structures responsible for the generation of paradoxical sleep in the cat.» *Arch Ital Biol*, 1989, **127(3)**, pp. 133–164.
- VEENMAN, C. L.; REINER, A. y HONIG, M. G.: «Biotinylated dextran amine as an anterograde tracer for single- and double-labeling studies.» *J Neurosci Methods*, 1992, **41(3)**, pp. 239–254.
- VERCELLI, A.; REPICI, M.; GARBOSSA, D. y GRIMALDI, A.: «Recent techniques for tracing pathways in the central nervous system of developing and adult mammals.» *Brain Res Bull*, 2000, **51(1)**, pp. 11–28.
- VERTES, R. P.: «An analysis of ascending brain stem systems involved in hippocampal synchronization and desynchronization.» *J Neurophysiol*, 1981, **46(5)**, pp. 1140–59.
- VERTES, R. P.: «PHA-L analysis of projections from the supramammillary nucleus in the rat.» *J Comp Neurol*, 1992, **326(4)**, pp. 595–622.
- VERTES, R. P.; COLOM, L. V.; FORTIN, W. J. y BLAND, B. H.: «Brainstem sites for the carbachol elicitation of the hippocampal theta rhythm in the rat.» *Experimental brain research Experimentelle Hirnforschung Expérimentation cérébrale*, 1993, **96(3)**, pp. 419–29.
- VERTES, R. P.; CRANE, A. M.; COLOM, L. V. y BLAND, B. H.: «Ascending projections of the posterior nucleus of the hypothalamus: PHA-L analysis in the rat.» *J Comp Neurol*, 1995, **359(1)**, pp. 90–116.
- VERTES, R. P.; FORTIN, W. J. y CRANE, A. M.: «Projections of the median raphe nucleus in the rat.» *J Comp Neurol*, 1999, **407(4)**, pp. 555–82.
- VERTES, R. P. y KOCSIS, B.: «Brainstem-diencephalo-septohippocampal systems controlling the theta rhythm of the hippocampus.» *Neuroscience*, 1997, **81(4)**, pp. 893–926.
- VERTES, R. P. y MARTIN, G. F.: «Autoradiographic analysis of ascending projections from the pontine and mesencephalic reticular formation and the median raphe nucleus in the rat.» *J Comp Neurol*, 1988, **275(4)**, pp. 511–541.
- VERTES, R. P. y MCKENNA, J. T.: «Collateral projections from the supramammillary nucleus to the medial septum and hippocampus.» *Synapse*, 2000, **38(3)**, pp. 281–93.
- VINOGRADOVA, O. S.: «Expression, control, and probable functional significance of the neuronal theta-rhythm.» *Prog Neurobiol*, 1995, **45(6)**, pp. 523–83.
- WAGATSUMA, H. y YAMAGUCHI, Y.: «Neural dynamics of the cognitive map in the hippocampus.» *Cogn Neurodyn*, 2007, **1(2)**, pp. 119–141.
- WALLER, A.: «Experiments on the section of the glossopharyngeal and hypoglossal nerves of the frog, and observations of the alterations produced thereby in the structure of their primitive fibres.» *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 1850, **140**, pp. 423–429.
- WESSENDORF, M. W.: «Fluoro-Gold: composition, and mechanism of uptake.» *Brain Res*, 1991, **553(1)**, pp. 135–48.
- WILLIAMS, J. A. y REINER, P. B.: «Noradrenaline hyperpolarizes identified rat mesopontine cholinergic neurons in vitro.» *J Neurosci*, 1993, **13(9)**, pp. 3878–3883.
- WILSON, M. A. y MCNAUGHTON, B. L.: «Reactivation of hippocampal ensemble memories during sleep.» *Science*, 1994, **265(5172)**, pp. 676–679.

- WINSKY-SOMMERER, R; YAMANAKA, A; DIANO, S; BOROK, E; ROBERTS, A J; SAKURAI, T; KILDUFF, T S; HORVATH, T L y DE LECEA, L: «Interaction between the corticotropin-releasing factor system and hypocretins (orexins): a novel circuit mediating stress response». *J Neurosci*, 2004, **24(50)**, pp. 11439–48.
- WINSON, J: «Patterns of hippocampal theta rhythm in the freely moving rat». *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 1974, **36(3)**, pp. 291–301.
- WU, M.; NEWTON, S. S.; ATKINS, J. B.; XU, C.; DUMAN, R. S. y ALREJA, M.: «Acetylcholinesterase inhibitors activate septohippocampal GABAergic neurons via muscarinic but not nicotinic receptors». *J Pharmacol Exp Ther*, 2003, **307(2)**, pp. 535–43.
- WYSS, J M; SWANSON, L W y COWAN, W M: «A study of subcortical afferents to the hippocampal formation in the rat». *Neuroscience*, 1979, **4(4)**, pp. 463–76.
- XI, M. C.; MORALES, F. R. y CHASE, M. H.: «Effects on sleep and wakefulness of the injection of hypocretin-1 (orexin-A) into the laterodorsal tegmental nucleus of the cat.» *Brain Res*, 2001, **901(1-2)**, pp. 259–264.
- XU, C; DATTA, S; WU, M y ALREJA, M: «Hippocampal theta rhythm is reduced by suppression of the H-current in septohippocampal GABAergic neurons». *Eur J Neurosci*, 2004, **19(8)**, pp. 2299–309.