

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Biología Celular



**DESCOMPOSICIÓN DE POTENCIALES DE CAMPO LOCAL
EN SUS FUENTES PRESINÁPTICAS Y SU APLICACIÓN AL
ESTUDIO DE DINÁMICA DE REDES NEURONALES EN EL
HIPOCAMPO**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

María Alejandra Korovaichuk

Bajo la dirección del doctor

Óscar Herreras Espinosa

Madrid, 2013



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Biología Celular

*Descomposición de potenciales de campo local en sus fuentes
presinápticas y su aplicación al estudio de dinámica de redes
neuronales en el hipocampo.*

Memoria presentada por **María Alejandra Korovaichuk**

El presente trabajo ha sido llevado a cabo en el Instituto Cajal (CSIC),
en el Laboratorio de Electrofisiología experimental y computacional
bajo la dirección del **Dr. Oscar Herreras**

Madrid, Septiembre 2012

Para mi hermana Yiyi

Lista de abreviaturas

CE: Corteza entorrinal

FD: Fascia Dentada

G1: Generador inhibitor de la fascia dentada

G2: Generador del estrato lacunoso moleculare

G3: Generador de Schaffer

G4: Generador de la vía perforante

NS/BDB: Núcleo septal/Banda Diagonal de Broca

PA: Potencial de acción

PEPSc: Potencial excitador postsináptico de campo

VP: Vía Perforante

INDICE

CAPÍTULO 1

Introducción general

1.1 El hipocampo como modelo para el estudio de la dinámica de redes neuronales complejas.	2
1.2 Actividad eléctrica poblacional en el cerebro	6
1.2.1 Actividad eléctrica poblacional en el hipocampo	8
1.2.1.1 Ritmo gamma	10
1.2.1.2 Ritmo theta	11
1.2.1.3 Ritmos, actividad irregular, en definitiva, actividad poblacional	12
1.3 Monitorizando la actividad neuronal	13
1.4 Los potenciales de campo reflejan actividad en tiempo real	14
1.4.1 Naturaleza sináptica y multi-origen de los potenciales de campo	14
1.4.2 Electrogénesis de potenciales provocados	16
1.4.2.1 Localización de las corrientes eléctricas subyacentes a los potenciales	18
1.4.3 Cómo separar las fuentes mezcladas en un LFP	19
1.4.3.1 Análisis de componentes independientes (ACI)	19
OBJETIVOS GENERALES	23

CAPÍTULO 2

De la aplicación del Análisis de Componentes Independientes a los Potenciales de Campo Local.

2.1 INTRODUCCIÓN	25
2.2 HIPOTESIS Y OBJETIVOS	27
2.3 MÉTODOS	27
2.3.1 Métodos experimentales	27
2.3.1.1 Animales	27
2.3.1.2 Cirugía	28

2.3.1.3 Electroodos	28
2.3.2 Potenciales provocados	29
2.3.3 Análisis de densidad de fuentes de corriente (DFC)	31
2.3.4 Análisis de Componentes Independientes (ACI)	34
2.4 RESULTADOS	37
2.4.1 Precisión espacial y temporal de los generadores del LFP	37
2.4.1.1 Separación de artefactos y actividad neuronal	
2.4.1.2 La activación subumbral de una vía aferente es capturada como un sólo generador con definición espacio-temporal precisa	38
2.4.2 Separación de actividad LFP provocada por múltiples entradas sinápticas	42
2.4.2.1 Estímulos no coincidentes	42
2.4.2.2 Estímulos coincidentes	43
2.4.3 Aplicación de ACI a LFPs de actividad LFP hipocámpica irregular espontánea	45
2.4.3.1 Identificación de la actividad poblacional de Schaffer y VP en LFPs espontáneos	45
2.4.3.2 Reconstrucción de LFP específicos de vía sináptica y su correlación con dominios subcelulares de neuronas individuales	46
2.4.3.3 Contribución mínima de las vías excitadoras al LFP de hipocampo	49
2.5 DISCUSIÓN	49
 CAPÍTULO 3: De la composición en frecuencias de los generadores LFP hipocámpicos	
3.1 INTRODUCCIÓN	53
3.2 HIPOTESIS Y OBJETIVOS	56
3.3 MÉTODOS	56
3.3.1 Métodos experimentales	56
3.3.1.1 Análisis de contenido en frecuencias	56

3.4 RESULTADOS	57
3.4.1 Estacionalidad de los generadores principales del hipocampo	57
3.4.2 La localización fina y contribución de cada generador al LFP es alterada por pre-filtrado	60
3.4.3 Variaciones de la potencia de los generadores durante LFP irregular y ritmo theta	61
3.4.4 ¿Tienen los generadores LFP de hipocampo una firma de frecuencias característica?	64
3.4.5 Distribución laminar espectral	65
3.5 DISCUSION	67

CAPÍTULO 4.

De la aplicación de ACI al estudio de la conectividad funcional del hipocampo

4.1 INTRODUCCION	72
4.2 HIPOTESIS Y OBJETIVOS	73
4.3 MÉTODOS	74
4.3.1 Métodos experimentales	74
4.3.1.1 Inactivación transitoria por lidocaína	74
4.3.1.2 Registro de espigas unitarias.	75
4.3.1.3 Potencia de los generadores y envolvente temporal	76
4.4 RESULTADOS	77
4.4.1. Inactivación transitoria de la región CA3 contralateral	78
4.4.1.1 Potenciales provocados	78
4.4.1.2 Actividad LFP y sus generadores	78
4.4.1.3 Cambios en la tasa de descarga de neuronas individuales	80
4.4.2. Inactivación transitoria de la Vía Perforante	81
4.4.2.1 Potenciales provocados	81
4.4.2.2 Actividad LFP y sus generadores	82
4.4.2.3 Cambios en la tasa de descarga de neuronas individuales	84
4.4.3 Inactivación de la región septal	85
4.4.3.1 Abolición del ritmo theta hipocámpico	85
4.4.3.2 Actividad LFP y sus generadores	85

4.4.3.3 Cambios en las descargas de neuronas individuales	87
4.5 DISCUSIÓN	87
4.6 Apéndice I: Visión anatómico-computacional del hipocampo	90
4.6.1 La región CA3: un comparador lógico	90
4.6.2 El Núcleo septal/Banda Diagonal de Broca: La entrada de información nueva	92
4.6.3 La corteza entorrinal	93

CAPÍTULO 5

De la aplicación de ACI para discriminar cambios en la dinámica de poblaciones hipocámpicas durante el envejecimiento.

5.1 INTRODUCCION	96
5.1.1 El hipocampo envejecido	96
5.1.2 Disminución de la plasticidad sináptica: depresión a largo plazo	97
5.1.3 Actividad oscilatoria en el LFP del hipocampo de ratas envejecidas	98
5.2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	98
5.3 METODOS	99
5.3.1 Métodos experimentales	99
5.4 RESULTADOS	100
5.4.1 Actividad de los generadores principales en hipocampo de ratas viejas	100
5.4.2 Cambios en la actividad del generador Schaffer en animales viejos	101
5.4.3 Actividad oscilatoria gamma en la región CA3	103
5.4.4 Cambios en la plasticidad sináptica relacionados con el envejecimiento	105
5.5 DISCUSION	107

CAPITULO 6 DISCUSION

6.1 Discusión	113
6.2 Conclusiones	118

7 BIBLIOGRAFIA

120

8 ANEXOS

134

Introducción general

1.1 El hipocampo como modelo para el estudio de la dinámica de redes neuronales complejas

El Sistema Nervioso (SN) recibe y procesa información mediante la actividad coordinada de múltiples poblaciones neuronales que forman un complejo sistema de circuitos locales y de largo alcance. La complejidad de las distintas redes interconectadas es tal que, tras más de un siglo de estudio, apenas hemos podido atisbar algunos mecanismos generales. La disciplina de la Neurociencia con mayor desarrollo es la Anatomía (Ramón y Cajal, 1902), gracias a la cual conocemos en buena medida los principales subsistemas, estructuras, núcleos y la compleja maraña de interconexiones. Pero es evidente que la estructura y la conectividad por sí solas no son suficientes para entender ni la función ni los mecanismos operativos del SN. Éstos son tan complejos y variados que ni aun conociendo a fondo la conectividad podemos predecir el enrutamiento selectivo de las distintas modalidades de información que circulan por las numerosas estructuras cerebrales.

Para centrar el objeto del presente estudio es necesario introducir los conceptos básicos de (1) *procesamiento de información* nerviosa y (2) de *bioelectrogénesis*. Cada vez es más frecuente utilizar la analogía computacional del SN, y así haremos a menudo en esta Memoria por su carácter gráfico y familiar que nos sirve para situarnos en el marco conceptual de la *estructura funcional*, esto es, de la actividad y la función. Y es aquí donde encontramos los mayores obstáculos. Es el flujo selectivo de información por neuronas y conexiones específicas lo que cuenta. Cada grupo más o menos homogéneo de neuronas procesa e *integra* varias entradas que llegan desde otros tantos grupos neuronales, cada uno con un contenido cualitativamente uniforme, y genera a su vez un contenido cualitativamente distinto a los anteriores que, igualmente, transfiere a las siguientes poblaciones. Los distintos grupos de neuronas conectados funcionalmente conforman una *red neuronal* o subsistema. Pues bien, las redes neuronales locales pueden dar preferencia a una u otra entrada, anularlas, mezclarlas, o cambiar su ganancia, dependiendo del estado. Siendo éste el objetivo final de la Neurociencia, su aproximación experimental requiere de una capacidad técnica y analítica muy superiores a las actuales.

En un sentido mecanicista, empleamos el término *transmisión neuronal* para describir el conjunto de eventos por los cuales la descarga de potenciales de acción o espigas en una vía nerviosa desencadena, a su vez, la descarga de espigas en las células diana, estableciendo un flujo de espigas en nodos sucesivos de forma secuencial, denominadas *cadena de disparo sincrónico* (*synfire chains*, Abeles 1991). Este concepto tan simple subyace al conjunto de

procesos neurales que conforman nuestra percepción del mundo y nuestra adaptación a él en forma de respuesta continuada. Cuando escuchamos una canción, por ejemplo, nuestro cerebro maneja e interpreta secuencias temporales de espigas de miles de neuronas que llegan a través del nervio auditivo, y no las variaciones de amplitud y frecuencia que caracterizan a las señales acústicas que fueron codificadas en el órgano sensorial. Los potenciales de acción son descargas eléctricas de tipo *todo o nada* y se propagan distancias considerables a través de los axones. La transmisión es, por tanto, un fenómeno activo, y la tasa o frecuencia de descarga cambiante, o patrón temporal, nos da pistas sobre las características del estímulo, proceso al que denominamos *codificación*. Además, la actividad de cada una de estas neuronas dependerá tanto de sus características estructurales y propiedades intrínsecas (citoarquitectura, metabolismo, distribución de sus receptores, características electrogénicas), como de su modulación extrínseca (factores tróficos, composición iónica del medio extracelular, actividad aferente).

Para entender el comportamiento global de una estructura nerviosa, esto es, las operaciones lógicas que realiza con la información entrante y su transformación final en forma de respuesta o mensaje aferente a otro núcleo, es habitual (aunque no suficiente) dilucidar el comportamiento dinámico de cada uno de los grupos neuronales que la componen, de acuerdo al método científico. Durante décadas, el estudio del SN ha seguido los cánones clásicos de *disección* e introducción de *estímulos* por parte del observador para cuantificar la respuesta de las partes. Sin embargo, la propia naturaleza de la función cerebral, el procesamiento *instantáneo* de información, exige una aproximación distinta, global y no parcial. Esto es así porque el rango posible de respuestas de cada una de las partes, determinable por método experimental clásico, es mucho más amplio que el *rango fisiológico*, aquel en el que realmente oscila durante la operación del sistema en su conjunto. La observación simultánea del mayor número posible de sus elementos en estado natural es, tal vez, la única aproximación que podrá generar datos cuantitativos que definan de forma rigurosa (y predecible) su extraordinaria complejidad y capacidad. Por su difícil abordaje, quizá el más relevante de los inconvenientes es que, en mayor o menor grado, todas las estructuras cerebrales trabajan simultáneamente.

Podría decirse que *la actividad de cada región cerebral es un reflejo casi instantáneo de las actividades individuales de todos sus núcleos aferentes y, por tanto, difícilmente puede ser entendida sin ellas.*

Por otro lado, también es conocido que dentro de una población homogénea de neuronas cada una genera respuestas ligeramente distintas a una información entrante aparentemente similar. Esta “*variabilidad*” que no es tal, sino consustancial al procesamiento distribuido de la información, puede tener un impacto significativo en, y seguramente conforma la respuesta global de la población. Hoy día se acepta que la información relevante transmitida entre núcleos se codifica no tanto por la respuesta de cada neurona sino por la respuesta conjunta e instantánea de un grupo de neuronas o *clúster*. Según esta modalidad de *codificación multineuronal* la información que fluye por canales paralelos (las múltiples conexiones neurona-neurona) tiene un carácter *combinatorial* que sólo tiene significado para la/s poblaciones receptoras si ocurre en un grupo concreto de neuronas activadas simultáneamente. La vertiginosa sucesión de grupos de neuronas distintos que se activan en cada instante constituye la quintaesencia del flujo de información neural, y como es fácil de apreciar, un difícil problema, muy posiblemente el reto más complejo que presenta la Biología actualmente. En el SN existen varios tipos neuronales diferentes en cada región anatómica o núcleo que conforman redes locales, lo que dificulta enormemente su estudio. Dado que el flujo de información es, al menos en núcleos corticales, fundamentalmente escaso (*sparse*: sólo una pequeña fracción de las neuronas de cada núcleo se activan en cada instante) y *distribuido*, la dificultad práctica para detectar qué neuronas se activan secuencialmente durante la codificación de un estímulo natural cualquiera es extremadamente alta y no está al alcance de las técnicas actuales. Es esta la principal razón por la que las regiones cerebrales que presentan cierta simplicidad en su citoarquitectura, así como segregación espacial de su conectividad interna y aferente son especialmente útiles para abordar el estudio del procesamiento y flujo de información en el SN: *en ellas podemos aprovechar algunas manifestaciones eléctricas de la actividad conjunta (sincrónica) de neuronas durante el procesamiento de estímulos naturales.*

Una de estas estructuras es el hipocampo (Figura 1), una formación de la arquicorteza cerebral de vertebrados superiores que ofrece características anatómicas y electrofisiológicas idóneas para abordar el estudio de las relaciones dinámicas entre poblaciones neuronales. Durante décadas, esta estructura ha suscitado gran interés y aún continúa siendo uno de los principales focos de atención por diversas razones. Por un lado, procesa una gran variedad de información que incluye entre otras, diversas modalidades sensoriales. Por otro, la actividad del hipocampo está asociada a numerosos comportamientos y capacidades cognitivas, y tanto su actividad como diversos elementos estructurales son particularmente sensibles a modificaciones duraderas causadas por la experiencia (fenómenos de plasticidad sináptica relacionados con memoria y aprendizaje) (Vanderwolf, 1969; Bliss y Lomo, 1973; O’Keefe y Nadel, 1978; Jarrard, 1978; Morris et al., 1982; Muller et al., 1987; Amaral y Witter, 1989;

Lopes da Silva et al., 1990; Muller et al., 1991; Wilson y McNaughton, 1993; Burgess y O'Keefe 1996; Buzsáki et al. 1996; Shapiro y Eichenbaum, 1999).

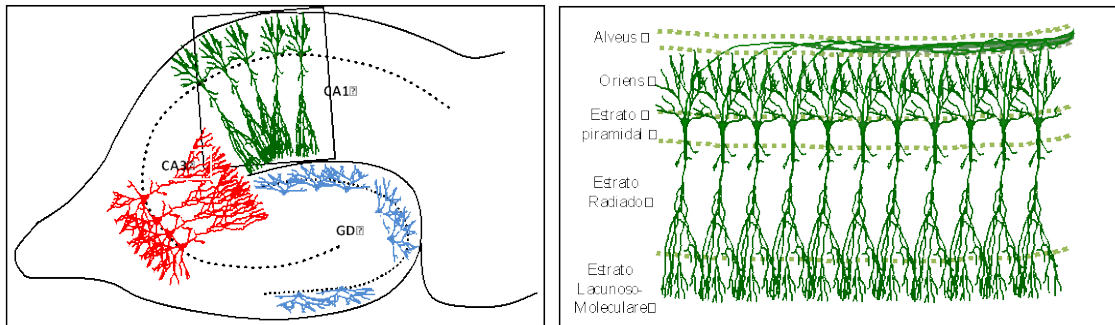


Figura 1: Representación de las características anatómicas del hipocampo A la derecha mostramos sus áreas principales: CA1, CA3 Y FD (Fascia Dentada). Como se puede apreciar en el panel de la derecha el hipocampo posee una estructura en empalizada: sus células principales están ordenadas en paralelo formando capas (en sentido dorsoventral: alveus, oriens, piramidal, radiado y estrato lacunoso moleculare).

En el hipocampo, la exquisita segregación espacial de varias de sus conexiones entrantes y salientes ha permitido visualizar (registrar) que las neuronas de una misma subpoblación aferente (o presináptica) desarrollan cierta actividad sincrónica (Figura 2).

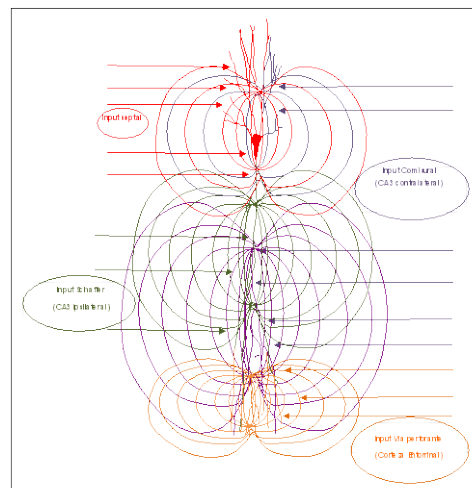


Figura 2: Esquema de la población de neuronas principales de CA1 donde podemos apreciar la segregación espacial de las entradas y la actividad postsináptica restringida a diferentes zonas, lo que facilita su registro. Los bucles coloreados representan los campos eléctricos localizados en subdominios celulares tras activación de vías específicas.

Esta sincronía es inherente al procesamiento simultáneo por un cierto número de las mismas ante cualquier estímulo natural, necesariamente complejo y con multitud de matices importantes para determinar el comportamiento del animal. Utilizando una pantalla de video

como analogía de procesamiento, es la combinación precisa y sincrónica de un grupo de píxeles concreto (las neuronas presinápticas) lo que aporta información visual interpretable en cada instante. Durante la actividad eléctrica de las membranas neuronales parte de la corriente eléctrica fluye por su espacio circundante, el medio extracelular (Figura 3). Pues bien, sólo durante activación sincrónica de numerosas neuronas es posible la concentración suficiente de actividad eléctrica en el espacio extracelular con magnitud suficiente para (1) poder registrarla y (2) tipificarla. Esta actividad eléctrica *poblacional* es una de las variables de carácter mesoscópico que mejor refleja la compleja dinámica de la actividad neuronal espontánea, es fácilmente registrable, y constituye el objeto de estudio de la presente Memoria. Su interpretación, en cambio es muy difícil y requiere conocimiento geométrico preciso de todas las fuentes de corriente en cada instante, motivo por el cual su abordaje tampoco ha sido posible hasta el momento con una eficiencia aceptable. En esta Memoria describiremos un nuevo método que combina las últimas técnicas de multiregistro y aplicaciones matemáticas de última generación mediante los cuales podemos empezar a resolver el problema de las contribuciones eléctricas de distintas poblaciones neuronales y estudiar sus relaciones dinámicas en vivo y en estado natural, esto es, por primera vez, sin interferencia del experimentador.

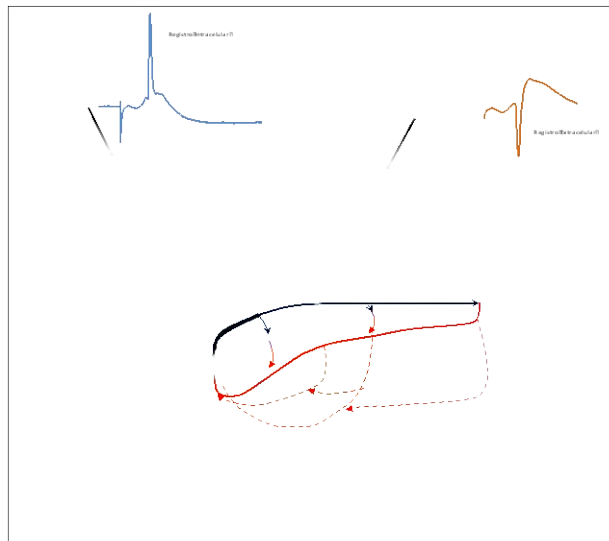


Figura 3: Ejemplo de registro intra y extracelular. En este esquema mostramos cómo la corriente fluye dentro de la célula y también a través de sus membranas al espacio extracelular, siempre en circuito cerrado; en ambos casos puede ser registrado. Mientras que el registro intracelular es exclusivo de una célula, el extracelular es susceptible de -y de hecho suele- mezclarse con la actividad de células circundantes y otras fuentes lejanas.

1.2 Actividad eléctrica poblacional en el cerebro

El cerebro presenta actividad eléctrica correlacionada entre sus diferentes núcleos, buena parte de la cual se ha descrito como oscilaciones rítmicas. La búsqueda de ritmos cerebrales ha sido una constante en la investigación en animales y en humanos. Ya los trabajos pioneros de Canton (1875) y Berger (1929) mostraron oscilaciones rítmicas del potencial eléctrico cerebral asociadas a diferentes estados conductuales en registros intracraneales y de superficie, respectivamente. Estos sencillos trabajos condujeron a una clasificación de las oscilaciones observadas en el electroencefalograma (EEG)¹ en *bandas de frecuencias* (ver apartado siguiente para una clasificación de las mismas), a las que fueron asociados los diferentes comportamientos animales a medida que se iban describiendo. Desde entonces, y a pesar de la carencia de fundamento biofísico, el estudio intensivo de estas bandas de frecuencia en el EEG que en realidad sólo son características de algunas estructuras cerebrales en algunos animales y en situaciones comportamentales muy concretas, les ha ido confirmando entidad “funcional”, como si de estados cerebrales se tratara, llegando a convertirse en un *objeto* de estudio en sí mismas. Pero ¿qué nos dice la aparición de una actividad oscilatoria en el EEG acerca de la identidad y actividad de una población neuronal? ¿Qué información podemos extraer de las poblaciones pre- y postsinápticas implicadas? Ciertamente, sin un conocimiento previo de la geometría precisa de las fuentes eléctricas, los datos que se obtienen son muy poco fiables y las interpretaciones tienen un alto grado de especulación e incertidumbre. El EEG es un *reflejo a distancia* de la actividad eléctrica de grandes poblaciones neuronales, operen en patrón rítmico o no. En definitiva, un epifenómeno de la actividad de las poblaciones neuronales, para cuya interpretación necesitamos mucha información previa. Tal es así, que la presencia de un ritmo macroscópico en una determinada región, de ninguna manera implica que esta sea la única actividad generada ni la más relevante, aunque por su amplitud pueda ocluir cualesquiera otras actividades eléctricas simultáneas de tipo irregular. En todo caso, una visión más equilibrada de la actividad cerebral entendería que una fracción de la misma es aleatoria, otra estaría temporalmente estructurada en formato rítmico y una tercera mantendría patrones temporales repetidos no rítmicos (Bullock et al., 2003).

Independientemente de las respuestas parciales y mecanismos neuronales que se puedan desvelar con el estudio de actividades EEG rítmicas, lo cierto es que la actividad no

¹ EEG es el término clásico para referirse a los registros de actividad eléctrica macroscópica y que actualmente se utiliza en la literatura para nominar aquellos realizados en superficie (extracraneales), mientras que para los registros intracraneales se ha ido imponiendo el término de **potencial de campo local**, más comúnmente conocido por sus siglas en inglés, LFP (*local field potencial*). Aunque la palabra *local* es impropio, mantendremos su uso en esta Memoria por mor del entendimiento.

rítmica o irregular no sólo constituye la parte dominante del EEG en la mayor parte de las estructuras cerebrales sino que además se ha estudiado muy esporádicamente y de la que se conoce muy poco (Bullock et al., 1995, 2003; Freeman y Zhai, 2009). La imposibilidad analítica de separar la actividad de cada una de las diversas aferencias cuyas corrientes, inevitablemente mezcladas (ver Figura 2), dan lugar al potencial de campo macroscópico, ha constituido el principal problema a la hora de desentrañar las bases celulares del EEG o LFP¹, como denominamos a su versión intracerebral.

Describir la relación entre la electrogénesis de una sola neurona y las manifestaciones eléctricas de una población es una tarea compleja. Existen numerosos factores que impiden establecer una correspondencia directa entre los trenes de potenciales de acción de las neuronas presinápticas y el LFP producido en la región diana. Entre estos, destacamos el solapamiento de diferentes entradas sinápticas en una misma célula, la compleja geometría de las neuronas y su organización espacial, la cancelación mutua de corrientes sinápticas en una célula individual, la propagación por volumen y la cancelación extracelular de las corrientes (Varona et al., 2000; López-Aguado et al., 2002; Makarova et al., 2010). Como se puede apreciar, son en su mayor parte *factores espaciales*. Mientras que los electrodos de registro tienen capacidad suficiente para captar las evoluciones temporales del potencial eléctrico por rápidas que sean, éstas son incluso más complejas en el espacio y, por tanto, su registro en un único punto apenas proporciona información útil sobre la posición, extensión, intensidad y polaridad de la fuente eléctrica original. El registro múltiple es, por tanto, una práctica irrenunciable para captar las variaciones de voltaje en las tres dimensiones del volumen por el que se propagan las corrientes neuronales y dentro del cual están inmersos los generadores eléctricos: las neuronas.

1.2.1 Actividad eléctrica poblacional en el hipocampo

La literatura delimita los ritmos cerebrales observados en el EEG en diferentes bandas de frecuencias debido a que fueron encontrados mientras se observaban en estados conductuales concretos del animal en estudio, tales como el ritmo delta característico del sueño (oscilaciones lentas en el rango de 0,5-3Hz), el ritmo theta (4-12Hz) durante la exploración, el ritmo alfa (8-15Hz) observable durante cierre ocular o en la transición sueño-vigilia, y otros ritmos rápidos como el beta (15-30 Hz) o el gamma (30-100 Hz) asociados a diferentes estados de actividad cognitiva.

Esta clasificación se realiza tras calcular el *espectro de frecuencias* de la señal registrada a partir de la transformada rápida de Fourier (FFT), que cuantifica las amplitudes relativas de bandas de frecuencias definidas arbitrariamente sobre una única señal del potencial eléctrico registrado en un punto concreto. A menudo, el propósito es caracterizar la dinámica de sincronización de oscilaciones, tratando cada pico en el espectro de frecuencias como una oscilación. Es necesario tener en cuenta que los componentes del espectro de frecuencias aparecen no sólo como resultado de procesos oscilatorios de frecuencia constante sino también de series temporales no rítmicas y transitorias, como por ejemplo el ruido blanco. Aunque el espectro de potencias del LFP es poco fiable como indicador de procesos rítmicos y no refleja ninguna información sobre la distribución espaciotemporal de las corrientes subyacentes a la señal, el trabajo experimental en Neurofisiología ha sido claramente influenciado por la disponibilidad casi exclusiva de esta herramienta de análisis y por la fascinación por los ritmos cerebrales.

Claramente, la idea de redes oscilatorias es seductora y ha sido objeto de infinidad de observaciones y acercamientos experimentales desde los comienzos del estudio de la actividad neuronal, iniciados por Jung y Kornmuller (1938) con sus estudios en el hipocampo del conejo. En 1969, Vanderwolf describe, también en el hipocampo, pero en ratas despiertas, tres estados o patrones electrográficos diferenciados una actividad irregular de gran amplitud o **LIA** (por sus siglas en inglés *large irregular activity*), una actividad irregular de pequeña amplitud o **SIA** (por sus siglas en inglés *small irregular activity*), y un estado rítmico denominado en un primer momento actividad rítmica lenta o RSA (por sus siglas en inglés *rythmical slow activity*), hoy conocido como *ritmo theta* por presentar actividad en esa banda de frecuencia (Figura 4).

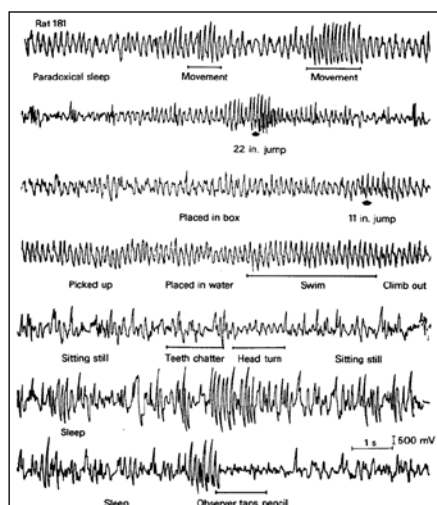


Figura 4: Actividad eléctrica registrada en el mismo sitio del hipocampo (región CA1) durante distintos comportamientos del animal. RSA durante el sueño paradójico, mientras está nadando y al mover la cabeza. Actividad LIA, en estado de alerta y mientras castaña los dientes. Actividad SIA durante el sueño de ondas lentas y cuando la rata está despierta pero sin moverse. Puede observarse el incremento en la frecuencia y amplitud del RSA asociado a diferentes movimientos. (Figura tomada de Whishaw y Vanderwolf, 1973).

Los correlatos conductuales de estas actividades poblacionales del hipocampo son numerosos. El ritmo theta, en ratas despiertas, se ha observado y relacionado con muchas conductas en su mayor parte asociadas a movimientos de traslación del animal (nadar, mover la cabeza, explorar, andar, saltar), aunque también se observa durante la fase REM del sueño, la atención inmóvil o en la reacción del despertar (Whishaw y Schallert, 1977; Vanderwolf et al, 1977; Buszáki et al., 1979; Vertes, 1979; Leung, 1984). El patrón irregular LIA ha sido asociado a comportamientos en los que el animal no cambia su localización (comer, beber o acicalarse). Este patrón irregular de difícil caracterización presenta algunas ondas rápidas (denominadas *Sharp Waves, SPW*) de unos 100 ms de duración que ocurren aleatoriamente con una frecuencia promedio de 0.1-1 por segundo. Asociadas a éstas se encuentran otras oscilaciones de alta frecuencia, o *ripples*, de unos 120-200 Hz de frecuencia, que presumiblemente reflejan actividad de una red inhibitoria (Thompson, 1975; Ylinen et al, 1995; Grenier et al, 2001). También se han registrado oscilaciones en otras bandas de frecuencia como la banda alfa, beta y gamma mencionadas anteriormente. Finalmente, el patrón denominado SIA, menos frecuente, aparece en períodos de transición entre estados, por ejemplo, de descanso a atención, o tras un largo período de actividad theta.

Como la inmensa mayoría de los estudios de actividad eléctrica poblacional espontánea son de actividades de LFP rítmicos, a continuación haremos una muy breve descripción de los mismos, si bien crítica, refiriendo al lector a las numerosas monografías específicas para un análisis exhaustivo de las mismas (Bland, 1986; Leung, 1992; 1998; Buzsáki, 1996; Hasselmo et al, 2002; Freund 2003; Mann y Paulsen, 2005; Düzel et al, 2010). No podemos dejar de mencionar que estas asociaciones de LFP rítmico y comportamiento animal podrían ser puramente circunstanciales y no reflejarían el contenido informativo que se pueda estar procesando en las distintas estructuras del SN ni los mecanismos celulares y poblacionales implicados. Tal es el grado de especulación sobre las mismas, indefectiblemente enraizado en el escaso conocimiento de la génesis de actividad eléctrica poblacional en el cerebro.

1.2.1.1 Ritmo gamma

Una de estas “familias de bandas de frecuencia”, es la constituida por oscilaciones en la frecuencia gamma (30-100 Hz). Los investigadores de distintas disciplinas de la Neurociencia, ávidos por describir las bases neurales del comportamiento animal, han relacionado esta banda con procesos corticales y cognitivos superiores, como el

procesamiento sensorial (Gray, 1994; Singer, 2009), la atención selectiva (Fries et al, 2001), y la memoria (Buzsáki y Chrobak, 1995; Fell et al, 2001).

Los mecanismos propuestos para su generación son muy variados. Diversos estudios *in vivo* han mostrado emergencia local de oscilaciones en la frecuencia gamma en algunas regiones corticales que parecen propagarse hacia áreas vecinas (Csicsvari et al, 2003), si bien su generación espontánea sólo ocurriría en aquellas regiones con un sistema excitador recurrente, como la subregión CA3 del hipocampo (Bragin et al, 1995). En esta zona la actividad podría estar “controlada” por inhibición anterógrada desde la Fascia Dentada (FD). Algunos autores proponen una “red gamma interneuronal”, en la que un grupo de interneuronas, excitadas por un mecanismo común, descargarían sincronizadamente sobre las células principales o piramidales, provocando oscilaciones en ellas (Whittington et al. 1995).

En estudios realizados sobre rodajas de hipocampo mantenidas *in vitro* se han conseguido generar oscilaciones aplicando agentes químicos diversos, como agonistas de receptores muscarínicos (Fisahn et al, 1998, 2004; Shimono et al 2000), aunque su frecuencia estaría más bien en la banda beta. Como ejemplo de inconsistencia biofísica de este tipo de aproximaciones los autores atribuyen este desfase de frecuencias con el animal completo a un “fallo” experimental, ya que las oscilaciones gamma no podrían ser generadas a menos de 32 grados mientras que las rodajas no podrían ser mantenidas a más de 25. Obviamente, los autores también se podrían haber cuestionado si esta oscilación generada por activación química exógena es la misma que la observada en el animal. Lo cierto es que la inducción química de actividad oscilatoria en sistemas mantenidos *in vitro* es un modelo frecuente para estudiar los mecanismos celulares que subyacen a oscilaciones macroscópicas por la mayor accesibilidad de técnicas de registro unicelular o de imagen, pero es raro encontrar pruebas de su identidad o correspondencia fisiológica.

1.2.1.2 Ritmo theta

Una extensa parte de la literatura sobre la fisiología del hipocampo está inevitablemente asociada a este ritmo, por lo que resulta complicado hablar del hipocampo sin detenerse un poco en él. Los primeros en observar esta actividad rítmica lenta en hipocampo, de conejo en este caso, fueron Jung y Kornmüller (1938) al estimular los nervios periféricos. No fue sino hasta la década de los 50 cuando se volvió a observar este ritmo en respuesta a la estimulación sensorial (MacLean et al 1952; Liberson y Cadilhac, 1954; Green y Arduini,

1954). A partir de aquí el ritmo theta de hipocampo fue asociado inicialmente con procesos de memoria (Adey, 1966, 1977; Elazar y Adey, 1967), atención del animal hacia indicios ambientales (Bennett, 1969, 1970), y sueño REM (Brown, 1968; Coleman y Lindsley, 1977; Frederickson et al., 1978, 1980; Kemp y Kaada, 1975).

En relación a los aspectos fisiológicos de esta actividad se propuso que la principal zona del hipocampo generadora de este ritmo es la región piramidal de CA1, debido a que revierte su fase justo por debajo de esta región (Petsche y Stumpf, 1960; Green y Rawlins, 1979). Winson (1974) fue el primero en describir un segundo generador de actividad theta localizado en el estrato molecular de la FD en ratas. Registros intracelulares de células piramidales de la región CA1 sostienen la idea de que estas células estarían involucradas en su generación, habiéndose propuesto tanto un origen sináptico excitador (Fujita y Sato, 1964), como inhibidor (Leung y Yim, 1991).

En la misma época se formula la teoría del marcapasos septal para la actividad theta (Petsche et al., 1962,1965; Stumpf et al., 1962; Gogolak et al., 1968; Tombol y Petsche, 1969), aunque la entrada desde la corteza entorrinal también parece estar implicada (Alonso y García Austt, 1987). En resumen, las oscilaciones theta reflejan un conjunto de mecanismos a niveles celulares, de circuitos locales y sistemas neuronales que aún no han sido definitivamente descifrados a pesar de intensa actividad investigadora.

1.2.1.3 Ritmos y actividad irregular: en definitiva, actividad poblacional

Ya sea observando actividad rítmica o irregular estamos enfrentándonos a la naturaleza de la codificación de la información en el SN y las preguntas inevitables que surgen al estudiarlo. Una pregunta obvia es si existen poblaciones neuronales que operan exclusivamente mediante actividad rítmica y otras de manera irregular. O bien, ¿pueden las mismas poblaciones neuronales funcionar en las dos modalidades dependiendo del estado? ¿La actividad poblacional sincrónica, rítmica o no, es consecuencia de la conectividad del circuito o bien es impuesta por una entrada sináptica común? Este tipo de preguntas son evidentes y necesarias al encarar un registro de actividad cerebral, y debiera ser la inquietud principal al plantear un diseño experimental, porque lo cierto es que si los registros de LFPs nos han mostrado algo es que los distintos patrones se intercalan de manera continua, estén o no asociados a tareas comportamentales concretas, pero no sabemos si estos cambios corresponden a la entrada en juego de distintas poblaciones neuronales en distintos momentos o a simples cambios en la modulación temporal de las mismas poblaciones. Ya hemos mencionado que incluso en estructuras

que despliegan actividad rítmica, esta no es ni mucho menos constante, sino que la actividad irregular predomina, no hay un patrón estable, lo cual tampoco debería sorprender dado el carácter estocástico de la información entrante desde el mundo exterior. Nos podemos preguntar ahora: si el estudio intensivo de las actividades LFP estereotipadas durante décadas ha sido tan complejo y poco concluyente, ¿tenemos alguna posibilidad de explorar con eficiencia la actividad irregular?

1.3 Monitorizando la actividad neuronal

Existen diferentes aproximaciones para explorar las bases Neurofisiológicas subyacentes a los procesos cognitivos y conductuales. Una parte importante en el análisis de la funcionalidad del hipocampo ha sido, y sigue siendo, el uso de registros extracelulares mediante microelectrodos para monitorizar la actividad de neuronas individuales e intentar relacionar sus características de descarga con comportamientos específicos en animales despiertos (Vinogradova et al, 1970; O'Keefe y Dostrovsky, 1971; Ranck, 1973). En el hipocampo, es posible identificar algunos tipos neuronales concretos por sus características temporales de descarga. James Ranck, uno de los electrofisiólogos pioneros en el registro de neuronas en animales despiertos, comenzó su estudio con el temor de que dada la lejanía de estas neuronas desde la entrada sensorial y a la salida motora, su patrón de descarga tendría un correlato conductual pobre o difuso, sólo como parte de una red neuronal extensa, con demasiados relés previos y posteriores. Pero en su trabajo más destacado (Ranck, 1973) ya consiguió describir gran variedad de correlatos conductuales de estas neuronas, incluyendo la descarga neuronal asociada a comportamientos de orientación y a movimientos de acercamiento o interrupción del mismo, entre otros. Este tipo de estudios ha continuado e incluso se ha intensificado en los últimos años, centrándose en dos grandes temas, los patrones de descarga de los numerosos subtipos de interneuronas en esta región (Buzsáki, 1984, 1997; Bernard y Wheal, 1994; Jones y Yakel, 1999; Somogyi y Klausberger, 2005; Lasztóczy et al., 2011) , y el registro simultáneo de muchas neuronas principales, enfocado este último a obtener información de la codificación multineuronal de diversas modalidades sensoriales y procesos cognitivos (Bramham, 1998; Hölscher et al., 2003; Komorowski et al., 2009; Burgess y O'Keefe, 2011).

Por otro lado contamos con técnicas de imagen funcional (fMRI, MEG, PET, etc.) que permiten monitorizar actividad cerebral global e identificar regiones cerebrales implicadas en una tarea concreta. Por su carácter poco invasivo, estas técnicas de registro

son muy utilizadas en primates y humanos.

Pero, a pesar de su evidente utilidad, ambas aproximaciones, micro y macroscópica, carecen de la resolución suficiente para captar de una manera mínimamente fiel la actividad de las diferentes subpoblaciones neuronales interconectadas en circuitos que interactúan en tiempo real. Por un lado, las aproximaciones unitarias adolecen de graves problemas, el escaso muestreo de la población, la imposibilidad de captar información codificada multineuronamente, y la difícil identificación del tipo neuronal reflejado, dato este último que es imprescindible para conocer a cuál de las muchas redes locales pertenece. Por su parte, las técnicas de imagen global no tienen suficiente sensibilidad espacial para discriminar actividad unitaria y son excesivamente lentas, de manera que no pueden seguir la activación cambiante de grupos neuronales dispersos. Otros inconvenientes son que suelen medir parámetros secundarios a la actividad neuronal y que requieran promediación de eventos para alcanzar señal medible, inhabilitándolas para el seguimiento de actividad espontánea.

1.4 Los potenciales de campo reflejan actividad en tiempo real

1.4.1 Naturaleza sináptica y multi-origen de los potenciales de campo

Entre los niveles unitario y macroscópico existen otras variables físicas de actividad neuronal de nivel mesoscópico con suficiente resolución espacial y temporal como para reflejar la actividad de pequeñas poblaciones neuronales en núcleos distintos y en tiempo real, como el ya mencionado LFP. Los LFPs han sido históricamente utilizados para explorar mecanismos implicados en el procesamiento sensorial (Mitzdorf, 1985; Di et al., 1990; Kandel y Buzsaki, 1997; Henrie y Shapley, 2005; Belitski et al., 2008; Montemurro et al., 2008; Szymanski et al., 2009) y en procesos cognitivos superiores como la atención, la memoria o la percepción (Pesaran et al., 2002; Kreiman et al., 2006; Liu y Newsome, 2006; Montgomery y Buzsaki, 2007; Colgin et al., 2009).

Fue Rafael Lorente de Nó (1947), en sus trabajos pioneros sobre el *núcleo hipogloso motor*, quien inició un estudio pormenorizado de los potenciales de campo y su relación con las corrientes eléctricas transmembrana de elementos neuronales, para lo cual aplicó las ecuaciones de Maxwell (1865) a generadores de corriente eléctrica en elementos celulares con membrana excitable y geometría compleja en un conductor de volumen (el espacio extracelular circundante). Ya en los años 50, las entonces denominadas *ondas*

cerebrales (“*brain waves*”) eran consideradas una manifestación de los *potenciales dendríticos*, en contraposición a los potenciales de acción que se consideraban una manifestación exclusivamente somato-axónica. La contribución de estos últimos al LFP se considera despreciable, pues la falta de sincronía en la descarga de espigas de distintas neuronas, entre otras razones, impide la generación de campos eléctricos de magnitud instantánea reseñable (salvo en casos excepcionales). Se acepta por tanto que la principal contribución al LFP son las corrientes eléctricas sinápticas generadas en las membranas neuronales de las células diana tras su activación por series temporales de espigas presinápticas (Purpura 1959; Elul, 1971). Así, en un punto concreto de registro, el LFP está mayoritariamente contribuido por las corrientes más o menos lentas que generan las membranas neuronales cercanas al electrodo. Actualmente se refiere como LFP a la fracción de baja frecuencia (<500Hz) de la señal extracelular de voltaje registrada intracranealmente. Aunque su interpretación, como veremos en esta Memoria, está sometida a diversas restricciones, podemos avanzar que un LFP, al estar constituido por corrientes sinápticas que requieren la descarga previa de neuronas en núcleos/poblaciones presinápticas, constituye un reflejo a distancia de la actividad de las mismas. Buscando su utilidad, podríamos definirlo como un instrumento de “*multi-tele-registro*”: un sólo punto de registro nos proporciona acceso a la actividad de muchas subpoblaciones neuronales localizadas en distintas estructuras (Figura 5). Es interesante notar que estas poblaciones presinápticas convergen en una misma zona (la de registro) y por tanto tienen una relación funcional en cuanto que son las que han de integrarse para generar una nueva información en las neuronas diana. Pero, como veremos a continuación, también ha sido esta característica multi-origen la principal razón que ha impedido su explotación eficiente hasta el momento.

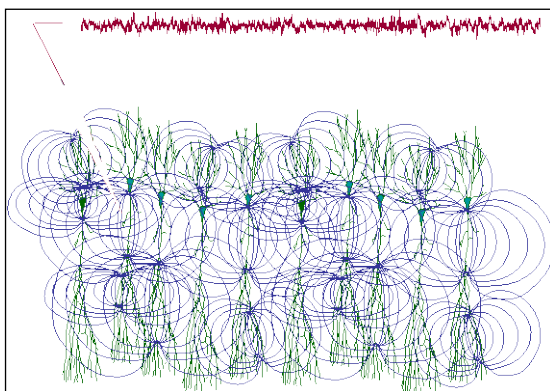


Figura 5: Si registramos en un solo punto del espacio extracelular el LFP resultante nos muestra la actividad convergente de la respuesta de las poblaciones neuronales mas cercanas al electrodo, dificultando su separación y el poder determinar su origen presináptico.

Con el objeto de exponer de forma sencilla la relevancia crítica de las características *poblacional* y *multiorigen* del LFP, haremos un breve repaso por la literatura comenzando

con los potenciales poblacionales más fácilmente identificables con la actividad eléctrica de una sola neurona y una sola vía aferente, los *potenciales provocados* en el hipocampo.

1.4.2 Electrogénesis de potenciales provocados

Muchos grupos utilizaron y explotaron la presencia de capas o estratos en el hipocampo para estudiar los potenciales de campo asociados a la activación de contactos sinápticos en bandas dendríticas restringidas tras estimulación eléctrica exógena. Andersen (1960a, 1960b), por ejemplo, registrando en varias posiciones dendríticas describió cómo las fibras comisurales aferentes a las regiones CA1 y CA3 provocaban un potencial de campo local negativo en el mismo estrato donde los anatomistas habían descrito que terminaban las fibras principales de estas entradas (Ramón y Cajal, 1902; Lorente de Nó, 1934; Blackstad 1956). Tal campo eléctrico negativo fue interpretado como la despolarización celular producida por la actividad sináptica excitadora y se denominó potencial excitador postsináptico de campo (**PEPSc**). Curiosamente, los potenciales extracelulares medibles producidos por una sola neurona son los potenciales de acción (o espiga extracelular), pues las corrientes generadas por una única sinapsis son demasiado débiles. Pero tanto en el hipocampo, como en otras estructuras laminares (cerebelo, corteza), la sincronización espontánea de muchas corrientes sinápticas débiles generadas por un grupo numeroso de neuronas sí alcanza magnitud suficiente. Dado que en el espacio extracelular las corrientes se suman algebraicamente, la magnitud del PEPSc se utiliza como medida de entrada sináptica poblacional. Lo mismo sucede con las sinapsis inhibitoras, pero con polaridad opuesta.

Cuando la estimulación es de poca intensidad (activación de pocas neuronas aferentes), la corriente sináptica total en cada neurona permanece por debajo del umbral para la generación del potencial de acción, de manera que a nivel poblacional se genera un PEPSc puro. Con estimulación mayor, las células descargan sincrónicamente originando una espiga poblacional (EP), la cual se superpone con la fase creciente del PEPSc. A diferencia del potencial de acción generado por una sola neurona que es todo-o-nada, la EP es una respuesta graduada: a medida que aumenta la intensidad del estímulo se incrementa el número de neuronas que descargan, lo que se ve reflejado en el tamaño de la EP por sumación extracelular de corrientes de acción de neuronas individuales. La amplitud de este potencial provocado no es un mero índice del número de neuronas que han descargado, pues intervienen también importantes factores no lineales, como la dominancia dendrítica en la geometría neuronal (relación de superficies), la dirección del

potencial de acción (anti u ortodrómica), y las propiedades eléctricas heterogéneas del medio extracelular (López-Aguado et al. 2000, 2001; Varona et al 2000).

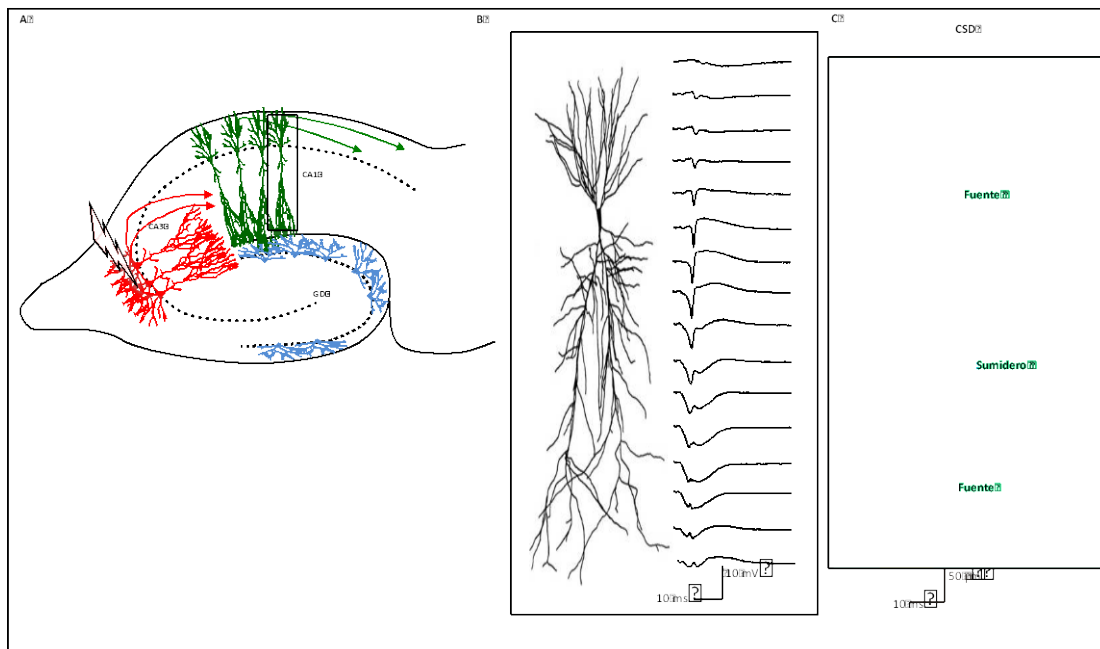


Figura 6: Perfil espacial de la actividad provocada en la región CA1 por estimulación de su aferencia desde la región CA3. A. Esquema del hipocampo de rata y de sus neuronas principales. B. Registro laminar (realizado con 16 canales en línea) de la población piramidal de CA1, mostrando la respuesta a un estímulo supraumbral. C. Mapa espacio-temporal de la densidad de fuentes de corriente (CSD) correspondiente, donde pueden observarse el sumidero principal causado por la entrada de corriente en la zona donde los colaterales Schaffer hacen contacto sináptico en las dendritas del estrato radiado, y las dos fuentes pasivas o de retorno, una débil en el *estrato lacunosum* y otra más fuerte en la región somática. La ruptura al inicio del sumidero principal correspondiente al PEPSc corresponde a la generación de la espiga poblacional (EP).

Las corrientes generadas por la apertura de canales sinápticos fluyen hacia el interior de las dendritas en la zona de membrana (zona activa) generando un *sumidero extracelular* de corriente. Desde ahí, la corriente se distribuye proximal y distalmente cargando la capacidad eléctrica de las membrana (despolarización) y saliendo de nuevo (*fuentes extracelular*) a través de otras zonas de membrana para cerrar el circuito. Un electrodo con referencia de *tierra* lejana registra estas corrientes extracelulares como un PEPSc negativo en la región de *sumideros* de corriente y positivo en la región de *fuentes* más intensas. En el ejemplo se observa el sumidero de corriente en la capa dendrítica generado por la activación sináptica, mientras que las fuentes pasivas se observan en la capa de somas y en las dendritas distales. Lo contrario sucede con la EP, en la que el sumidero activo se sitúa en el soma y dendritas proximales mientras que las fuentes pasivas se ubican en dendritas más lejanas. Debido a la distinta región de membrana activa para los potenciales sinápticos que para la EP, estos dos potenciales aparecen con una polaridad opuesta en un mismo punto de registro, incluso siendo ambos

despolarizantes. Como veremos, esta aparente “paradoja espacial” es crítica para la interpretación de potenciales de campo y ha generado una enorme confusión entre los investigadores menos expertos: ocurre continuamente durante entradas sinápticas en distintos dominios de las mismas neuronas. No es ni más ni menos que un reflejo de la regionalización de la electrogénesis: la neurona no es un generador eléctrico único y simple, sino un multi-generador capaz de generar corrientes transmembrana en distintos puntos de su anatomía de forma independiente y por tanto de generar campos extracelulares distintos dependiendo de que dominio dendrítico sea activado sinápticamente.

1.4.2.1 Localización de las corrientes eléctricas subyacentes a los potenciales

Como acabamos de mencionar, la polaridad del potencial eléctrico extracelular registrado en un punto no determina si la corriente activa en origen es excitadora o inhibitoria, por lo que se requiere un mapa completo del campo eléctrico alrededor de la célula activada para poder determinar la localización y naturaleza de la corriente. Por otro lado, la propagación de las corrientes en el volumen hace que los potenciales generados ocupen un espacio mayor que el de la fuente eléctrica en el dominio de membrana neuronal activo. La acción de estos dos factores conlleva que las corrientes generadas por distintas fuentes se mezclen con pesos diversos en distintos puntos del espacio extracelular, por lo que un potencial registrado en un sólo punto es, de hecho, la suma de corrientes procedentes de tantas fuentes eléctricas independientes como hubiere, por ejemplo desde distintas sinapsis activadas por axones procedentes de núcleos distintos. En el caso de los potenciales provocados en hipocampo, existe una técnica que permite estimar la *densidad de corriente*, cuya localización es más ajustada a la zona con membranas activas que el potencial de campo. Esta magnitud física es un escalar que cuantifica la corriente neta (con su polaridad) en un volumen de tejido suficientemente pequeño como para eliminar las contribuciones de fuentes de corriente lejanas. La técnica se denomina *análisis de fuentes de corriente* (AFC) y nos permite trazar con precisión los dominios subcelulares de entrada y salida de corriente. Nicholson y Freeman (1975) optimizaron este método, inicialmente implementado por Lorente de Nó (1934), para analizar los potenciales de campo generados en estructuras planares y activadas homogéneamente, esto es, generadores multi-neuronales homogéneos en el espacio. Como los gradientes de potencial son similares en todas las direcciones salvo en una, en este caso particular no es necesario el registro simultáneo de los potenciales alrededor de todo el espacio que rodea la fuente eléctrica, sino un simple perfil lineal en su interior (Herrerías 1990). Así, el AFC

revelará el sitio de las sinapsis excitadoras o inhibitoras a lo largo de la anatomía celular, que son fácilmente cotejables con la arquitectura celular y la conectividad.

Sin embargo, durante actividad espontánea, sólo unas pocas neuronas se activan cada instante, y en sitios distintos de su anatomía, por lo que el AFC no es idóneo para estimar la localización de las membranas activadas. Es esencial recordar para su aplicación al estudio de LFPs que tanto las entrada excitadoras como inhibitoras generan simultáneamente sumideros y fuentes en el espacio, esto es, una redistribución espacial de cargas positivas y negativas, por lo cual la presencia de un sumidero o una fuente *per se* no es suficiente para localizar la corriente sináptica ni su carácter.

1.4.3 ¿Cómo separar las fuentes mezcladas en un LFP?

Para sacar el máximo partido de los LFPs es necesario poder separar las múltiples fuentes que lo contribuyen, identificar las poblaciones tanto pre- como postsinápticas y establecer el *código de traducción* desde actividad unitaria a poblacional. Sólo así se podrá obtener una lectura fiable de su curso temporal.

Durante muchas décadas, este problema ha sido el *nudo gordiano* para interpretar la actividad poblacional espontánea; es el denominado “cocktail party”: ¿cómo escuchar qué está diciendo una población aferente si muchas otras están hablando al mismo tiempo? El objetivo de esta Memoria es separar dichos componentes que por conveniencia práctica, llamaremos *generadores de LFP*. Cada generador LFP es una entidad dual que consta de una parte presináptica, la población de células aferentes cuyos potenciales de acción activan sinapsis en las células diana, y otra postsináptica, la de las células diana homólogas que producen las corrientes sinápticas generadoras del potencial postsináptico a través de sus membranas y el LFP propiamente dicho.

1.4.3.1 Análisis de componentes independientes (ACI)

En la última década se han utilizado diferentes aproximaciones para aislar componentes de una mezcla de señales cerebrales, como el análisis de coherencia (Kocsis et al. 1999; Montgomery et al. 2009), análisis de componentes principales (PCA) o el análisis de poblaciones laminares (Einevoll et al. 2007). Entre las técnicas de análisis estadístico de señales múltiples complejas, los análisis de separación ciega de fuentes son cada vez más utilizados. El término “ciego” proviene del hecho de que el algoritmo “desconoce” tanto las fuentes como el mecanismo que las mezcla (Figura 7).

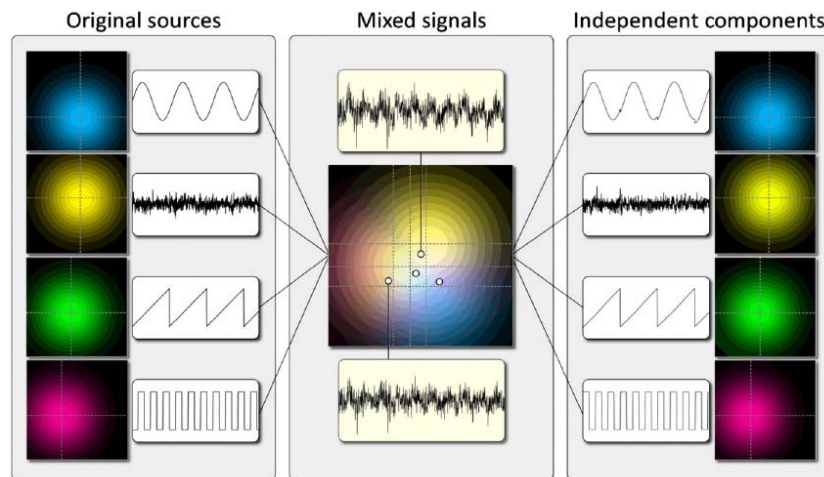


Figura 7: Esquema de un análisis de separación ciega de fuentes utilizando ACI. Cuatro fuentes (panel izquierdo) con diferentes cursos temporales son proyectadas en un plano bi-dimensional donde se observa su solapamiento espacial. La mezcla lineal de estas fuentes solapadas espacialmente y temporalmente independientes se observa en el panel del medio (nótese el color blancuzco de varios tonos generado en la mezcla por fusión de los colores originales). Estas señales mezcladas pueden ser separadas utilizando el ACI (panel derecho). El algoritmo es capaz de recuperar, además, el curso temporal y las distribuciones espaciales de los componentes independientes que estaban mezclados en la señal. (Figura tomada de Mouraux y Iannetti, 2008).

El objetivo del algoritmo es encontrar relaciones constantes en los distintos sensores o canales. Aprovechando la enorme ventaja de que las fuentes que componen el LFP son espacialmente estacionarias (inmóviles) y por tanto los potenciales eléctricos de cada fuente guardan relación constante en los distintos puntos de registro, entonces, la mejor extracción de fuentes independientes de LFPs se obtiene mediante el Análisis de Componentes Independientes (ACI) (Makarov et al, 2010). Esta técnica consigue mayor independencia entre los componentes calculados (para una revisión ver Choi et al., 2005). El principal requisito para aplicar ACI es que los componentes de la mezcla a analizar sean independientes a lo largo del tiempo, lo cual viene dado por la naturaleza impredecible de las entradas sinápticas. No hay requisitos en cuanto a su topografía porque la finalidad no es localizar componentes, sino separarlos. Con todo, la localización es posible en su aplicación particular al hipocampo, como veremos más adelante.

El ACI ha sido aplicado al EEG de superficie para identificar y separar actividad coherente en grupos de electrodos (Bell y Sejnowski, 1995; Castellanos y Makarov, 2006). Sin embargo, la heterogeneidad en las propiedades eléctricas del medio conductor, la cancelación espacial de corrientes de signo opuesto y el filtrado de frecuencias en el volumen desde las fuentes hasta los puntos de registro (López-Aguado et al., 2001; Bédard et al., 2004; Makarova et al., 2008) limitan su utilidad a una localización grosera de fuentes eléctricas de gran tamaño sin especificación del tipo celular. Estos problemas son menos

relevantes en el estudio de los LFPs registrados intracranealmente (Tanskanen et al., 2005). En el laboratorio del Dr. Herreras se ha desarrollado una aplicación de ACI a los LFPs del hipocampo de la rata anestesiada registrados mediante multielectrodos lineales, cuya resolución espacial y registro dentro de la propia fuente (*in source*) elimina los problemas inherentes a los registros distantes (Makarov et al., 2010, Korovaichuk et al., 2010).

Las distintas subregiones del hipocampo de rata presentan un gran número de ventajas para la aplicación de este método y la identificación celular de las fuentes separadas. La mayoría de neuronas en cada subregión corresponden a un único tipo, las células piramidales en las regiones CA1 y CA3 y los granos en la FD, en ambos casos orientadas en paralelo y con sus somas en una sola capa compacta. Su estructura morfológica, muy polarizada (axial), es muy favorable a la producción de intensos potenciales. Son neuronas con configuración de *campo abierto*, como las definió Lorente de Nó (1947). Por el contrario la simetría radial de la mayoría de los otros tipos celulares (interneuronas), no genera potenciales que puedan ser registrados fuera de la región ocupada por la célula en cuestión (neuronas de *campo cerrado*). Así, los LFPs en esta región están básicamente producidos por la actividad sináptica en un único tipo de célula. También resulta muy ventajoso el hecho ya comentado de que las diversas poblaciones neuronales aferentes así como las interneuronas locales (Figura 8) tengan sus terminales axónicos limitados a dominios dendríticos discretos y estratificados, bien conocidos por estudios histológicos (Lorente de Nó, 1934; Somogy y Klausberger, 2005). Por ello, es de esperar que la actividad sináptica de cada subpoblación aferente contribuya al LFP en bandas espacialmente fijas que correspondan con su territorio de inervación sináptica.

Figura 8: Interneuronas de la región de CA1. Actualmente se conocen al menos 12 tipos de interneuronas que inervan dominios específicos de las neuronas piramidales de CA1, y 4 tipos de interneuronas que inervan mayoritariamente otras interneuronas. Tomada de Somogyi y Klausberger (2005).

En esta Memoria nos proponemos describir un cambio sustancial en la manera de enfrentarnos al registro y análisis de los LFPs. Huyendo del clásico “despiece” de señales en bandas de frecuencia, nuestra estrategia es captar en su totalidad el campo eléctrico generado en el espacio por las corrientes sinápticas espontáneas, de manera que podamos utilizar técnicas modernas de análisis matemático para descomposición de señales complejas basadas en la diferente distribución espacial de sus múltiples fuentes.

OBJETIVOS GENERALES

El objetivo general de este trabajo ha sido estudiar las relaciones funcionales entre diferentes subpoblaciones neuronales interconectadas, utilizando como herramienta las manifestaciones eléctricas de su actividad conjunta reflejadas en el potencial de campo local (LFP) y una técnica de separación ciega de fuentes, el ACI, para separar las contribuciones de cada núcleo o población aferente a la población de registro. De esta manera se busca acceso a los flujos de información natural que ocurren entre los distintos relés de las redes en las que participan las poblaciones neuronales de hipocampo. Para ello, utilizamos diferentes aproximaciones e innovaciones tanto teóricas como metodológicas. A continuación se desglosan los objetivos parciales específicos que serán detallados en cada uno de los capítulos sucesivos correspondientes.

1. Aplicación del Análisis de Componentes Independientes (ACI) a los Potenciales Locales de Campo (LFP), para discriminar y separar las contribuciones relativas de las múltiples entradas sinápticas convergentes, tanto excitadoras como inhibitorias.

2. Analizar el contenido en bandas de frecuencias de los LFPs y su significado fisiológico, así como la actividad de las poblaciones presinápticas no rítmicas durante un LFP rítmico.

3. Estudiar los cambios dinámicos en la transferencia de información en diferentes puntos de la red neuronal de hipocampo inactivando farmacológicamente cada uno de ellos.

4. Aplicación práctica del ACI para detectar/catalogar cambios en la dinámica de circuitos funcionales relacionados con la edad.

De la aplicación del Análisis de Componentes Independientes a los Potenciales de Campo Local.

2.1 INTRODUCCIÓN

En este Capítulo presentamos un método de separación de fuentes mezcladas en una señal captada por varios sensores en el espacio (los electrodos de registro). En concreto, hemos utilizado el Análisis de Componentes Independientes (ACI), que ya ha sido empleado en diversas aplicaciones en Neurociencia, y cuyo uso ha ido creciendo en la última década, especialmente en electroencefalografía de superficie y resonancia magnética funcional, para identificar y separar actividad coherente en grupos de electrodos o de voxels, respectivamente (Ikeda y Toyama, 2000; Jung et al, 2001, 2005; Delorme y Makeig 2004; Onton et al, 2006; Moeller et al, 2011). También ha sido usado sobre trenes de espigas para estudiar interacciones poblacionales (Laubach et al, 1999), así como para la asignación de espigas a neuronas individuales (*sorting*) obtenidas en registros multi-unitarios (Brown et al, 2001), entre otros.

Una primera aplicación de algoritmos de ACI a registros lineales de LFP intracerebral fue presentada por Tanskanen et al (2005), pero fue tímidamente orientada a mostrar que puede detectar coherencias laminares y no tuvo repercusión. Aprovechando la estabilidad espacial de las fuentes eléctricas cerebrales a escala temporal de los LFPs, el grupo del Dr. Herreras, en colaboración con el Dr. Valeri Makarov, desarrollaron una estrategia que combinaba el ACI, reducción de dimensiones, agrupación de componentes en familias (clústeres), reconstrucción de LFPs virtuales y CSD (Makarov et al, 2010). A priori, la técnica permitiría asociar los generadores LFP obtenidos con las poblaciones neuronales presinápticas correspondientes y cuantificar la contribución de cada una de estas al LFP total. Su utilización en nuestros registros nos permitiría conocer, por ejemplo, la extensión espacial de los generadores, su evolución y desarrollo temporal, su actividad con respecto a otros e incluso su naturaleza sináptica, características e información de la actividad presináptica a las que no se ha podido acceder hasta el momento mediante LFPs.

Las características del ACI son ideales para separar fuentes de actividad eléctrica intracerebral, pues maximiza la independencia estadística entre señales que han sido mezcladas de forma desconocida (Bell y Sejnowski, 1995; Makeig et al, 2004), lo que se ajusta de manera exacta al gran problema biofísico que supone la mezcla de corrientes en el espacio extracelular, y que ha retenido el avance del campo durante décadas. Bell y Sejnowski (1995) fueron los primeros en intentar explicar el problema de la separación ciega de fuentes desde un punto de vista del manejo de la información. El ACI también presenta limitaciones y condiciones de aplicación. Entre éstas, el número máximo de fuentes separables es igual al de sensores, lo que *a priori* podría ser un problema si fuera menor que el de fuentes reales. Además, debe existir independencia de los componentes a lo largo del tiempo, si bien esta característica es irrelevante en la práctica por la naturaleza de las señales (Bell y Sejnowski, 1995). Por otro lado, el ACI no aporta información sobre la varianza de la señal original ni sobre la polaridad de la misma. Estos datos son cruciales, pues sin ellos es imposible conocer ni la magnitud ni la naturaleza excitadora o inhibitoria de la señal. En este Capítulo se presenta una solución mediante reconstrucción del LFP virtual de cada generador LFP independiente, sobre el cual se actuará posteriormente para comprobar si el perfil espacial de cada componente separado es, o no, fisiológicamente posible mediante el cálculo del CSD virtual, cuyo patrón espacial debe cumplir unas condiciones específicas ya conocidas para las vías sinápticas de entrada en la zona de registro de las señales. Finalmente, el ACI no permite restaurar el orden de los componentes, pero mostraremos que los perfiles espaciales formados por los pesos conjuntos de cada componente en todos los electrodos proporcionan configuraciones espaciales conocidas y comparables con la anatomía y entradas sinápticas de la región que se estudia, por lo que el orden no es relevante.

El ACI no requiere una localización concreta de los electrodos con los que se captarán las señales, pero el conocimiento de los mismos resulta muy ventajoso al poder equiparar los pesos relativos de cada componente en cada sitio de registro a lo largo del eje axial de las neuronas, consiguiéndose una precisión subcelular. Para ello, nos hemos guiado de los perfiles en profundidad

de los potenciales provocados característicos del hipocampo generados por activación de vías específicas bien conocidas (Andersen et al, 1971; Herreras 1990; Leung et al. 1995). Las señales simultáneas se registran mediante lancetas con múltiples contactos lineales (*silicon linear arrays*).

La región elegida para comprobar la aplicabilidad y eficiencia del ACI será la región CA1 del hipocampo dorsal. Esta zona presenta múltiples ventajas. Una de las más relevantes es que la mayoría de sus neuronas son de tipo piramidal y están orientadas en paralelo ofreciendo una configuración en empalizada en la que los distintos elementos subcelulares se encuentran estratificados, de tal manera que su activación conjunta genera dipolos eléctricos laminares de fácil identificación e interpretación (Makarov et al, 2010). Por último, presentaremos un método de identificación de los componentes LFP separados mediante estimulación selectiva de vías aferentes, cuya actividad provocada debería aparecer en componentes LFP específicos, si en verdad lo fueren. Utilizaremos dos de las vías aferentes excitadoras principales del hipocampo, la entrada excitadora desde la región CA3 a la región de CA1 (vía colaterales de Schaffer) y la entrada excitadora desde la corteza entorrinal (vía Perforante, VP) a las células granulosas o granos de la FD. La razón de esta elección fue trabajar con vías conocidas que pudiéramos manipular experimentalmente.

2.2 HIPOTESIS Y OBJETIVOS

La hipótesis de trabajo es que el registro en profundidad de LFPs espontáneos en subregiones de hipocampo puede ser descompuesto mediante el ACI en componentes independientes de estructura laminar equiparables con entradas sinápticas de poblaciones homogéneas.

Los objetivos parciales son:

- a. Comprobar la especificidad del Análisis de Componentes Independientes utilizando LFPs generados por una sola vía mediante potenciales provocados.

- b. Identificar los generadores del LFP más prominentes y estables del hipocampo.
- c. Estudiar la actividad poblacional de las vías excitadoras conocidas: CA3-CA1 y VP-FD
- d. Explicar la distribución espacial de los generadores encontrados y su relación con las corrientes transmembrana a nivel subcelular.

2.3 MÉTODOS

2.3.1 Métodos experimentales

Todos los experimentos fueron realizados siguiendo las directrices de la Unión Europea (86/609/EU), así como la legislación española BOE 67/8509-12, 1988), concernientes al uso de animales de laboratorio. Los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Investigación del Instituto Cajal del CSIC.

2.3.1.1 Animales

Se utilizaron ratas hembra adultas Sprague-Dawley, de 200–220 g adquiridas de *Harlan Laboratories Inc*, o criadas en las dependencias del Instituto Cajal. Los animales fueron anestesiadas con uretano (1.2 g/kg, i.p.), y una vez alcanzado el plano anestésico adecuado, fueron colocados en un aparato estereotáxico (Narishige Co). La temperatura del animal se mantuvo constante a 37° C por medio de una manta eléctrica con retroalimentación mediante sonda rectal (Cibertec). Como indicador de las constantes vitales, se monitorizó la frecuencia cardiaca a través de electrodos subcutáneos en las patas delanteras del animal, conectados a un amplificador y monitor de audio. Posteriormente, se inyectó bajo la piel de la calota 1 ml de anestésico local de larga duración (bupivacaína 0,75%, Braun).

2.3.1.2 Cirugía

Se practicó una incisión anteroposterior en la piel de la cabeza, dejando al descubierto una amplia zona que descubrió las suturas coronal y lambda, liberándose el hueso del periostio, y desinsertando las apófisis de los músculos

temporales en su región más dorsal. Para mantener la calota descubierta y libre se utilizó un separador de piel entre los huesos y músculos temporales, entre los cuales se introdujeron sendas torundas de algodón con fines hemostáticos y de reservorio de anestésico local. A continuación se realizaron trépanos de 1-2mm de diámetro con una broca, utilizando coordenadas estereotáxicas desde el bregma (Paxinos y Watson (1982). Se retiró la duramadre hasta dejar descubierta la superficie cortical y se cubrió cada trépano con una gota de vaselina líquida para evitar su desecación.

Las coordenadas utilizadas en estos experimentos fueron las siguientes (mm desde Bregma):

- Estimulación eléctrica de CA3: AP: -3.2, L: 2.6, V: -3.3 mm
- Estimulación del alveus: AP: -5.5, L: 2.6, V: -1.8 mm
- Estimulación eléctrica del haz angular (Vía Perforante) AP: -8; L: 4-5 V: 3.5-4
- Registro en CA1: AP: -4.5; L:2.6; V: 2.2-2.9

2.3.1.3 Electroodos

Se fabricaron electrodos de estimulación bipolares concéntricos a partir de una cánula de acero inoxidable de 400 μm de diámetro externo (Small Parts Inc) y un hilo interior de tungsteno de 50 μm de diámetro, aislado con teflón (76 μm de diámetro total; A.M. Systems Inc.). Para aumentar la zona activa de estimulación los electrodos son liberados de la cobertura de teflón unas 200 μm . Mediante estos electrodos se aplicaron pulsos rectangulares de corriente de 0.1 ms a diferentes intensidades (0.1 - 1mA) y frecuencias.

Los potenciales de campo extracelulares fueron registrados inicialmente mediante micropipetas de vidrio (borosilicato, A-M Systems Inc.) de 7-10 μm en la punta construidas a partir de un estirador (Narishige), rellenas con una solución conductora (NaCl 150 mM), y conectadas a un transistor con efecto de campo (FET) de alta impedancia mediante alambre de plata clorurada (Ag/AgCl). Estos registros iniciales son utilizados para optimizar los sitios de estimulación mediante el potencial provocado característico sin dañar el tejido en su búsqueda.

A continuación se sustituyó la micropipeta por multielectrodos lineales de una o dos lancetas (electrodos "Michigan") colocados en el sitio de registro correspondiente a la zona de CA1 y conectados a un cabezal múltiple de alta impedancia que sirve para reducir la pérdida de la señal por manipulación y disminuir las interferencias por ruido eléctrico ambiental. Los modelos empleados para estos experimentos fueron: A1x16-5mm50-177 y A1x32-6mm50-413 (Neuronexus Technologies, Ann Arbor, MI). Las sondas de 16 contactos fueron usadas para registrar a lo largo del eje principal de las neuronas piramidales de CA1, mientras que las de 32 contactos se extendieron en profundidad hasta las regiones CA3/FD. Como electrodo indiferente se utilizó un alambre de plata clorurada (Ag/AgCl) introducido bajo la piel del cuello.

Las señales son adquiridas a un PC mediante interfase digitalizadora con una frecuencia de muestreo que varió de 10 a 50 kHz según los casos. Se utilizó equipo de amplificación/filtro de bajo ruido ($<5 \mu\text{V}$) y software de MultiChannel Systems (Reutlingen, Germany).

2.3.2 Potenciales provocados.

Las poblaciones de células principales del hipocampo, piramidales y granulosas, pueden ser activadas monosinápticamente y de forma sincrónica por estimulación eléctrica de haces de fibras aferentes procedentes de neuronas de un mismo núcleo o subpoblación. Durante esta activación se generan corrientes transmembrana que dan lugar a variaciones estereotipadas del potencial extracelular o potenciales provocados. Debido a la disposición en empalizada de estas células, los potenciales provocados presentan una estructura espacial característica de tipo laminar y una evolución temporal cuya morfología y latencia son bien conocidas y fáciles de identificar con los procesos electrogénicos que ocurren en dominios subcelulares de una sola célula.

En el Capítulo 1 se describieron las principales características y la electrogénesis de los potenciales provocados mejor conocidos, aquellos

generados por un estímulo eléctrico en la región CA3 ipsilateral y activación subsecuente de las fibras o colaterales axónicas de Schaffer, que hacen contacto sináptico en una banda dendrítica estrecha de la células piramidales de la región CA1 en el estrato radiado. Los potenciales provocados han sido utilizados para estudiar la excitabilidad global de poblaciones neuronales del hipocampo en numerosos diseños experimentales. Su validez como índice de excitabilidad y de relaciones sinápticas está apoyada por innumerables registros intra- y extracelulares (Andersen, 1960; Fujita y Sakata, 1962; Andersen y Lomo, 1966; Andersen et al, 1971; Herreras, 1990)

En este Capítulo utilizamos los potenciales provocados con cuatro finalidades: (1) comprobar la eficiencia de ACI para separar fuentes eléctricas de origen neuronal de otras de origen artefactual; (2) comprobar la resolución espacial de los generadores independientes separados por ACI; (3) comprobar la resolución temporal de los mismos en mezclas controladas de señales; y (4) identificar la vía y origen presináptico de los componentes sinápticos en registros de actividad LFP espontánea.

(1) ACI se ha utilizado a menudo como una técnica capaz de eliminar artefactos (Iriarte et al, 2003; Zhou et al, 2005; Escudero et al, 2007), esto es, señales no deseadas, por lo general de origen desconocido, que se introducen casual e incontroladamente en la señal de interés, o conocidas pero de carácter exógeno y contaminante, como es el caso de los campos eléctricos introducidos por la corriente de estimulación durante la aplicación de pulsos eléctricos en el parénquima. En esta sección se utilizaron estímulos en el alveus que generan una espiga poblacional antidrómica (Varona et al, 2000). La intensidad del estímulo fue de 0.4-0.8 mA.

(2) Para comprobar la resolución espacial de ACI sobre una fuente eléctrica cerebral única pero espacialmente compleja se utilizaron los perfiles espaciales del potencial postsináptico excitador poblacional (PEP_{Sp}) generados con pulsos subumbrales en la vía de Schaffer. El objetivo es disponer de una señal que presentara variaciones espaciales de amplitud notables en los

distintos puntos de registro pero que mantuvieran una proporción constante entre ellas, como corresponde al campo eléctrico generado por una fuente eléctrica única inmóvil, detectada desde diferentes sitios. Se utilizaron estímulos subumbrales con el objetivo de evitar la activación de corrientes intrínsecas por canales de voltaje en las células piramidales (Herreras 1990; Magee y Johnston 1995; Canals et al, 2005) que podrían constituir una fuente eléctrica añadida a la sináptica y de localización espacial distinta y no controlable.

(3) La resolución temporal de ACI se estimó aplicándolo a perfiles en profundidad generados por combinaciones de dos potenciales provocados en vías sinápticas distintas, la entrada de Schaffer a CA1 y la entrada de la VP a la FD. En el primer caso, se ajustó la intensidad hasta provocar un PEPSp < 0.5 mV en el estrato radiado, y en el segundo un potencial positivo en el hilus < 1 mV (inferior a 0.5 mV en la capa molecular de la FD). Los estímulos fueron aplicados en una sola vía o en ambas, en combinaciones temporales diferentes, y con intensidad variable, desde subumbral (la mínima activación eléctrica de una vía para emular su activación espontánea), a supramáximos (que provocan una espiga poblacional máxima). Para esta sección, los artefactos eléctricos producidos por los estímulos fueron eliminados de los perfiles LFP antes de su análisis por ACI.

(4) Para identificar las poblaciones presinápticas que corresponden a los generadores separados de los registros LFP espontáneos se estimularon vías aferentes conocidas con pulsos subumbrales en cadencia aleatoria, con la finalidad de introducir actividad conocida de vías específicas en instantes conocidos, evitando iteraciones regulares que pueden generar plasticidades sinápticas no deseadas en este diseño experimental. Así, tanto la actividad LFP espontánea, constituida por la envolvente sináptica global generada durante el procesamiento ordinario y continuo de un núcleo presináptico concreto, y cuya secuencia temporal e intensidad son desconocidas, como la provocada por estímulo eléctrico de esa misma vía, deben tener la misma distribución espacial, definida por sus terminales axónicos sobre las dendritas de las células principales. En experimentos preliminares se comprobó que estímulos

subumbrales a frecuencia promedio no superior a un 1Hz, y en número menor de 20, no afectan a la varianza total de la señal ni alteran el resultado del ACI. Se realizaron series de estimulación en una o varias vías, intercalados temporalmente, y se analizaron segmentos de LFP que contuvieron un período con estímulos y otro sin ellos, siendo este último al menos el 50 % del tiempo de señal analizado.

2.3.3 Análisis de densidad de fuentes de corriente (DFC)

En el Capítulo 1 (apartado 1.4.2.1) se introdujeron el concepto de densidad de corriente y su relación con la distribución espacial de los potenciales eléctricos generados por la actividad eléctrica neuronal. A continuación realizamos una extensión de los mismos, tanto histórica como metodológica, por su relevancia para la comprensión integral de los potenciales eléctricos generados en el tejido cerebral y la necesidad de formular un discurso común de la electrogenesis de poblaciones neuronales y neuronas individuales, que habitualmente aparecen disociados en la literatura. Si bien esta sección se ajusta a la configuración de un Apéndice, la ubicamos aquí por su contenido metodológico, que es utilizado tanto en la sección experimental de este Capítulo como en los siguientes.

En una conexión excitadora, la apertura de canales en la membrana subsináptica de las células diana provoca un movimiento neto de corriente hacia el interior, generando **sumideros** de corriente extracelulares y despolarización intracelular. Un sumidero neto de corriente produce, contra la impedancia eléctrica del tejido, un potencial de campo negativo. Las cargas positivas que ingresan a las células en cualquiera de sus dominios, deben abandonarla de forma instantánea por dominios adyacentes para mantener el principio de electroneutralidad. Esta salida de corriente genera una **fuerza** (capacitativa y/u óhmica) que cierra, así, el circuito de corriente. Una fuerza de corriente neta extracelular se refleja habitualmente como un potencial de campo positivo, si bien, cuando ésta es pasiva (p. ej. la corriente de retorno de un sumidero activo), su escasa densidad de membrana produce un campo

eléctrico positivo muy débil que se restringe a una “vaina” o “manga” envolvente del proceso dendrítico y por tanto no suele revertir la negatividad principal generada por el sumidero activo a distancias incluso cercanas a la membrana que actúa como fuente (Rall, 1962a; 1962b). Son precisamente estos flujos de corriente transmembrana los que, en su componente intersticial, generan las variaciones del potencial extracelular (V_o). Como se puede entender fácilmente, un solo evento sináptico produce potenciales extracelulares positivos y negativos alrededor de la neurona, cuyo alcance y gradientes son diferentes y prácticamente imposibles de estimar salvo que se conozca con precisión la geometría celular exacta y su disposición en el espacio así como sus propiedades eléctricas activas y pasivas. Por la misma razón, sólo mediante conocimiento preciso del V_o en el espacio se pueden estimar con fiabilidad la magnitud y localización de los flujos de corriente transmembrana mediante el AFC. Ahora bien, en el caso de que las neuronas no posean una morfología con un patrón espacial determinado de sus procesos neuríticos, puede producirse la cancelación algebraica de las corrientes que se inyectan al espacio extracelular instantáneamente desde distintos puntos de la membrana.

Lorente de Nó propuso una clasificación de las neuronas de acuerdo a la estructura espacial de sus neuritas, que bien permitirían la acumulación de corrientes extracelulares (neuronas de *campo abierto*) o llevaría a su cancelación (neuronas de *campo cerrado*). Las últimas tienen distribución radial de sus dendritas con respecto a su soma (Figura 10)

Un análisis de esta disposición geométrica indica que las corrientes tenderían a cancelarse algebraicamente, y la línea isopotencial cero se sitúa en el centro geométrico del núcleo. Este patrón es típico de algunos núcleos motores del tronco del encéfalo, como por ejemplo, el *abducens*, cuyo potencial antidrómico decae muy rápidamente en el espacio extracelular (Delgado-García et al, 1988). En cambio, una disposición paralela de neuronas de simetría axial permite la suma de todas sus corrientes, al estar sus dendritas orientadas en el mismo sentido. Con esta explicación tratamos de hacer énfasis en una realidad escasamente ponderada, cual es que los LFPs constituyen tan sólo una parte de

la actividad eléctrica neuronal visible, aquella generada por neuronas con morfología idónea, por lo que hemos de ser cautos al interpretar los mismos en clave global de núcleo o red.

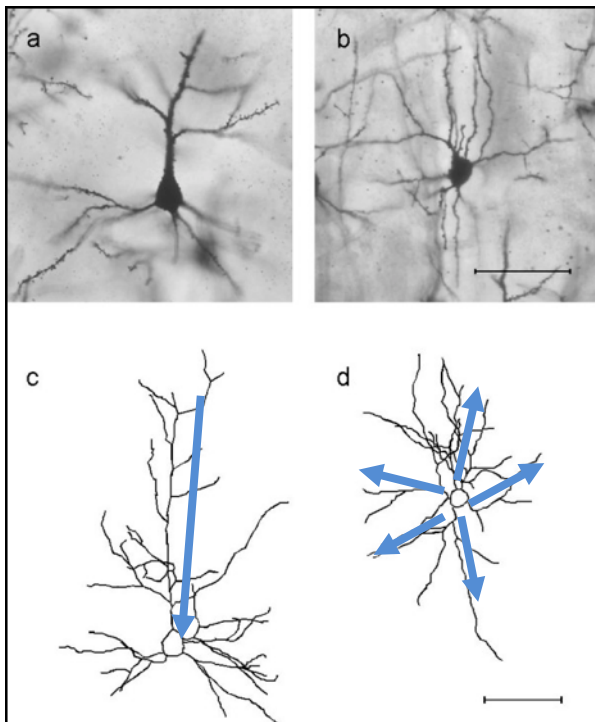


Figura 10: Fotomicrografías y reconstrucciones de neuronas por el método de Golgi. A) Célula piramidal de corteza (capa II/III) prototipo de campo abierto. B) Célula estelada espinal de capa IV, prototipo de campo cerrado. C y D: Reconstrucciones de ambas células. Calibración: $\square\square\square$ m (de Churchill *et al*, *BMC Neuroscience* 2004). Las flechas representas el dipolo de corriente.

El método de estimación de corrientes transmembrana a partir de los V_0 fue desarrollado por Lorente de Nó (1947), pero su aplicación para estudiar actividad neuronal no fue aprovechada hasta años después por Nicholson y Llinás en 1971. La principal ventaja de esta técnica es la eliminación de los llamados efectos de volumen (propagación pasiva de corriente por el medio extracelular) que, implícitos en los registros de los potenciales provocados, enmascaran fuentes y sumideros cuya presencia no puede ser inferida directamente a partir de los potenciales de campo.

Para realizar este análisis es necesario asumir:

- 1.-La curvatura de la región de CA1 produce errores desechables en el cálculo de la ecuación de Poisson para la distribución de fuentes continuas (Leung, 1979; Mitzdorf, 1985)
- 2.-El medio extracelular es isotrópico (Leung, 1979), o bien la anisotropía

existente es de escasa relevancia práctica (Holsheimer, 1987).

3.-La heterogeneidad del medio es desestimable a efectos del cálculo de los tensores de conductividad, dada la homogeneidad de la activación (Mitzdorf, 1985).

4.- Sólo en el trayecto de registro de máxima activación se consigue una evaluación precisa de la amplitud de fuentes y sumideros de corriente.

5.- El medio extracelular obedece la ley de Ohm.

6.-La activación de la población registrada es uniforme y estable durante el tiempo requerido para el trayecto completo del registro.

En condiciones ideales (Mitzdorf, 1985; Freeman y Nicholson, 1975; Rappelsberger et al, 1981), la variación de la densidad de la corriente en un tiempo determinado t en el eje z , $I_z(t)$, viene calculada como:

$$I_z(t) = -\sigma_z [\delta^2 \phi_z(t) / \delta z^2]$$

donde $\phi_z(t)$ es el potencial a un tiempo t y σ_z es el valor del tensor de conductividad en el eje Z . Aunque existe una variación de la conductividad a lo largo del eje Z (López-Aguado et al, 2001), en la práctica no es lo suficientemente grande para modificar la distribución calculada de los generadores de corriente. Podemos entonces asumir que el medio extracelular es isotrópico y homogéneo. De todas formas, el cálculo experimental del tensor de conductividad es complejo y puede no ser preciso, por lo que habitualmente se utiliza el término proporcional $-I/\sigma_z$ o su término equivalente, que es la segunda derivada espacial del potencial extracelular, cuyos resultados se expresan en V/mm^2 y se puede aproximar numéricamente por la siguiente ecuación diferencial:

$$\delta^2 \phi_z / \delta z^2 = [\phi(z+h) - 2\phi(z) + \phi(z-h)] / h^2$$

donde h es la distancia entre dos puntos de registro consecutivos.

Este proceso genera un notable nivel de ruido en los resultados por lo que es frecuente utilizar métodos de suavizado espacial del potencial. Uno de los

más ventajosos es la promediación simétrica ponderada del potencial alrededor de un punto dado (Freeman y Nicholson, 1975). Sin embargo, el suavizado espacial del potencial produce una atenuación del valor real o efecto filtro de las fuentes y sumideros correspondientes generados en dominios de membrana reducidos en relación a los más extensos. Por este motivo, en los experimentos hemos utilizado un método no distorsionante consistente en la eliminación por filtrado de los componentes lentos del EEG previos a la aplicación del pulso eléctrico, lo que reduce notablemente el ruido base (Herreras, 1990).

2.3.4 Análisis de Componentes Independientes (ACI)

El procedimiento matemático completo y detallado puede consultarse en Makarov et al (2010), adjuntado en el Apéndice. Brevemente, x señales de LFPs registradas simultáneamente pueden representarse como la suma de pesos de la actividad de N fuentes neuronales o generadores del LFP:

$$u(t) = \sum_{n=1}^N V_n s_n(t) \quad - \sigma \Delta V_n = I_n \quad \forall n \in [1, N]$$

donde $V = [V_1, V_2, \dots, V_N]^T$ es la matriz de mezclas compuesta por los pesos espaciales de todos los generadores, $\{s_n(t)\}_{n=1}^N$ son los cursos temporales de todos los generadores, σ es la conductividad del espacio extracelular y $\{I_n\}_{n=1}^N$ son las densidades de corriente. Por lo tanto, el LFP observado en cualquiera de los electrodos resulta de la mezcla lineal de la actividad eléctrica de varios generadores independientes, los cuales describen las corrientes transmembrana de las células principales donde son generados. Una vez que se separan estos generadores del LFP nativo podemos analizar su actividad de forma aislada, e incluso reconstruir el perfil espacial del LFP que generaría cada uno por sí mismo, como si los demás generadores no estuvieran participando.

Al aplicar el análisis de ACI a diferentes registros de LFPs, obtenemos varios generadores, lo que nos obliga a encontrar un método para compararlos y clasificarlos. Cada generador se caracteriza por su activación $s_k(t)$ y

distribución espacial V_k . Puesto que las activaciones son específicas del tiempo en el que se esté efectuando el análisis, no pueden ser utilizadas para comparaciones. Sin embargo, los pesos espaciales dependen de la distribución de los terminales axónicos y por lo tanto han de ser similares entre generadores que correspondan a la misma población de neuronas presinápticas. Así, para definir una medida de similitud entre un par de generadores cualesquiera, se utilizó una medida de distancia entre las curvas formadas por sus pesos espaciales ordenados de acuerdo a los puntos de registro que siguen el eje de las células principales (Makarov et al., 2010). Posteriormente fueron agrupados en familias mediante análisis de clúster jerarquizado, usando la medida de distancia introducida y el algoritmo de *linkage* promediado.

El ACI puede aislar tantos generadores como señales de LFPs estemos registrando, pero sólo unos pocos son estables y significativos estadísticamente. El número final de componentes que pueden extraerse con este método dependerá de varios factores, tales como la región particular de estudio, la relación señal-ruido y la fuerza relativa y extensión espacial de sus componentes activos. Algunas poblaciones neuronales, como la piramidal en el hipocampo, disparan de forma muy escasa (Ranck 1973; Thompson y Best, 1989) por lo que se esperaría que la actividad postsináptica en sus células diana contribuya poco al LFP de esa región. En este estudio se considerarán generadores de LFP aquellos que cumplan al menos una de las siguientes condiciones: (a) contribución mínima a la varianza total del 5%; (b) que se pueda relacionar de forma inequívoca con vías conocidas y que produzca un CSD limpio tras un AFC de su LFP virtual reconstruido, esto es con una línea base plana y poco nivel de ruido.

Para identificar los generadores más estables de un LFP espontáneo utilizamos un algoritmo de dos pasos (Makarov et al. 2010). Primero se identifican los generadores “globales”, registrados en un tiempo suficientemente largo (decenas de segundos). Luego se dividen los mismos registros en segmentos contiguos cortos, de 1 segundo, y se les aplica de nuevo ACI. Así, esperamos que los generadores más estables estén presentes en todos

los segmentos, mientras que los más débiles e inestables fluctúen en su distribución espacial entre segmentos. Una vez que fue comprobado que estos perfiles son constantes y característicos de cada estructura, el tiempo de análisis mínimo fue irrelevante y únicamente limitado por la capacidad del ordenador.

La reconstrucción de LFPs virtuales específicos para cada componente aislado se realiza multiplicando su curva de pesos espaciales por la activación temporal específica del segmento analizado. De esta manera, se recupera la polaridad correcta de los potenciales en los distintos sitios de registro que podría estar oculta o dominada por generadores concomitantes de mayor potencia en el LFP nativo. Además, nos proporciona una estimación cuantitativa de la varianza y potencia de una vía específica. La mayor ventaja de los LFPs específicos de vía es que generan mapas espacio-temporales de CSD simples, los cuales describen la estructura espacial de corrientes de entrada y salida. Estos mapas pueden ser fácilmente cotejados con aquellos obtenidos de los potenciales provocados estándar del hipocampo, cuya naturaleza y distribución espacial bien definida a lo largo de la anatomía de las células principales ayuda a la identificación de vías (Lømo 1971; Herreras et al, 1987; Herreras 1990; Leung et al, 1995). La potencia de un generador medida en mV^2 fue calculada en el electrodo que mostró la amplitud máxima durante actividad LFP irregular, excluyendo períodos de actividad oscilatoria como la actividad theta:

$$P_{G_k} = \max_{m \in [1, K]} \left(\frac{1}{T} \int_0^T u_m^2(t) dt \right)$$

donde T es el período analizado. La evolución temporal de la potencia se estimó mediante un algoritmo de ventana deslizante

$$P_{G_k}(t) = \int H(t - \tau) s_k^2(\tau) d\tau$$

2.4 RESULTADOS

El primer paso fue comprobar la efectividad del método de ACI por medio de potenciales provocados cuyo perfil espacial es conocido y permitirá detectar errores y contaminaciones.

2.4.1 Precisión espacial y temporal de los generadores del LFP

2.4.1.1 Separación de artefactos y actividad neuronal

Varios estudios previos han demostrado la capacidad de ACI para suprimir artefactos del EEG (Castellanos y Makarov, 2006; Vigarío et al, 2000). Aquí mostramos su capacidad para aislar los artefactos producidos por el estímulo eléctrico aplicado a registros cerebrales profundos. Durante la estimulación antidrómica de la población piramidal de CA1 desde el alveus (Figura 11), el pulso eléctrico produjo un potencial negativo rápido o artefacto de gran amplitud ($>40\text{mV}$), que normalmente revirtió su polaridad fuera de hipocampo. El artefacto fue seguido por un LFP provocado con un perfil característico de una espiga poblacional antidrómica (Varona et al 2000). El mapa de CSD correspondiente mostró el sumidero somato-dendrítico correspondiente a la entrada de corriente durante el disparo de espigas (en color azul; electrodos 7-11) rodeado por fuentes pasivas (amarillo/rojo). Como puede observarse en el CSD de la Figura 11, la polaridad de las corrientes revirtió en la cola lenta subsiguiente, como es de esperar por activación de la inhibición somática a través de los colaterales recurrentes sobre las interneuronas en cesto (fuentes somáticas activas flanqueadas por sumideros dendríticos pasivos basal y apical). La aplicación de ACI al perfil del potencial provocado antidrómico reveló actividad significativa en tan sólo dos componentes. El artefacto apareció exclusivamente en el componente G1, mientras que la actividad neuronal lo hizo en el G2 (Figura 11). Puede observarse cómo la distribución espacial del generador correspondiente al artefacto (azul) es plana. Este generador, mostró actividad en todos los electrodos con la misma fuerza o, cuando menos, con una apariencia global lineal, y mostró un CSD nulo, lo cual indica que su origen estuvo fuera de la zona de registro y fue captado gracias a la propagación por volumen. En cambio, el segundo generador que contuvo mayoritariamente la actividad neuronal, incluyó en este caso tanto la espiga poblacional como las corrientes inhibitorias. Pudimos observar que cuando un LFP provocado contiene un artefacto muy grande, que contribuye la mayor parte de la varianza de la señal total analizada, deteriora la resolución de la actividad neuronal real si esta contribuye en

pequeña proporción. Por esta razón en análisis subsecuentes se eliminaron los artefactos provenientes de estímulos exógenos antes de aplicar ACI.

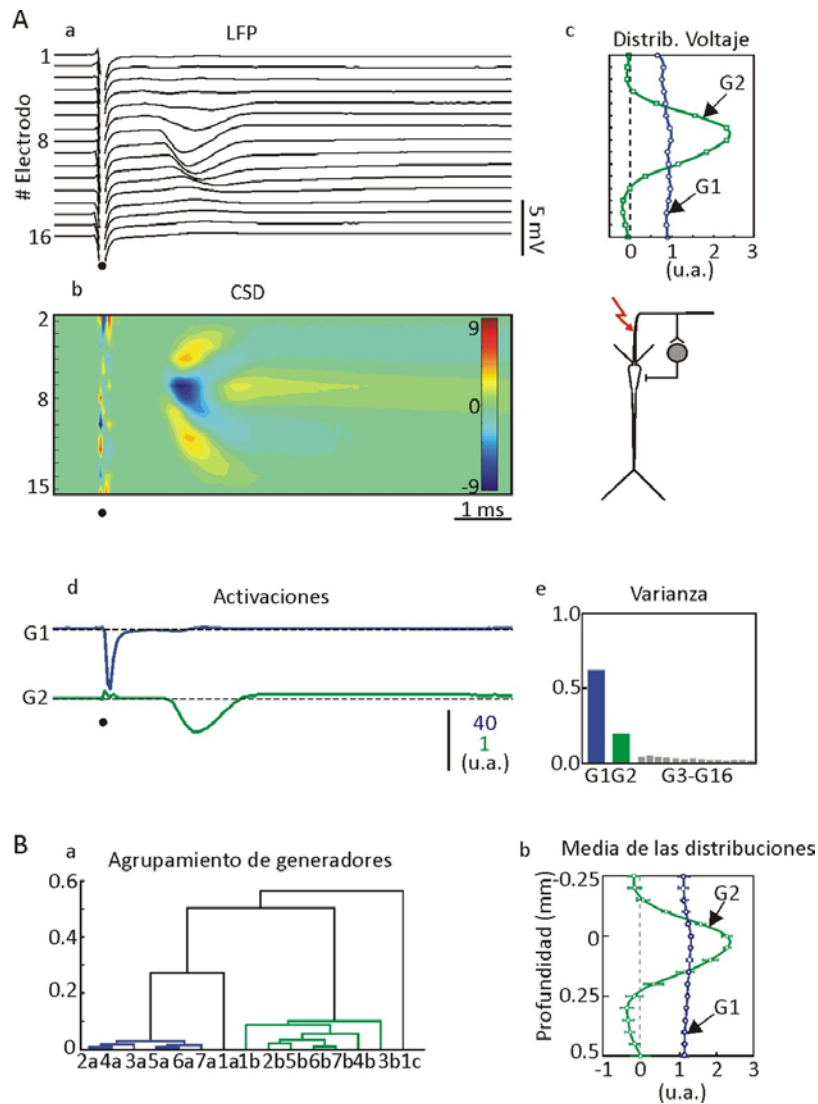


Figura 11: Separación de artefactos y actividad neuronal. Esta figura corresponde al análisis de un LFP obtenido durante la activación antidrómica de CA1. A: El shock eléctrico en el alveus produce un artefacto de voltaje (truncado por el punto negro en Aa), acompañado por la espiga poblacional antidrómica. El artefacto es pequeño y difuso en el CSD correspondiente (Ab), mientras que se observan claramente un sumidero activo posterior con sus fuentes pasivas. ACI muestra dos (de 16) generadores significativos (Ae). G1 contiene el artefacto del estímulo (Ab) que aparece en todos los electrodos con peso similar (distribución de voltaje plana en Ac). Por su parte, G2 contiene toda la actividad neuronal mostrando una curva de distribución de voltaje con forma de campana, la cual se extiende a los dominios somatodendríticos activados (Ac) B: el análisis de clúster de todas las curvas de distribución de voltaje obtenidas discrimina 2 grupos claros (azul y verde) que corresponden al artefacto y a la espiga poblacional, respectivamente.

2.4.1.2 La activación subumbral de una vía aferente es capturada como un sólo generador con definición espacio-temporal precisa

A continuación examinaremos la capacidad de ACI para recuperar con eficiencia la distribución espacial de los pesos correspondientes a una única entrada sináptica, usando perfiles espaciales correspondientes a una excitación subumbral de la vía de Schaffer. La intensidad del estímulo se ajustó al 50% del umbral para la espiga poblacional, con el fin de minimizar las corrientes intrínsecas secundarias (Herreras 1990). La figura 12 muestra el perfil espacial de un potencial provocado y su CSD correspondiente. Puede apreciarse un único sumidero activo centrado en el estrato radiado rodeado por dos fuentes de corriente pasivas, una en la región del soma y otra en las dendritas apicales distales. El análisis de ACI identificó 16 generadores (tantos como electrodos de registro utilizamos), pero sólo uno con amplitud estadísticamente significativa, G1. Por su parte, la activación temporal se ajustó con precisión al curso temporal del potencial nativo en el sitio de máxima amplitud (electrodo 9 en la figura 12 Aa y activación de G1 Ba). Este componente, al ser el único presente en la señal, contuvo toda la varianza del perfil, presentó una distribución espacial en forma de campana con máximo en las dendritas apicales, y su polaridad revirtió en la capa de somas, en correspondencia precisa con el perfil espacial del potencial reconstruido, calculado para ese instante temporal marcado por la flecha en la Figura 12 Bc. La dinámica espacio-temporal en el CSD obtenido tras la reconstrucción del LFP virtual a partir de G1 se correspondió con el mapa de CSD calculado a partir del perfil del LFP nativo. Así pues, hemos demostrado que la distribución tri-laminar fuente-sumidero-fuente, causada por la excitación sináptica y sus corrientes de retorno, no fue descompuesta por ACI en componentes diferentes, sino que se mantuvieron agrupadas en un único generador. Este resultado sencillo era esperable, pues la actividad ha de ser coherente en todos los puntos del espacio dado que la corriente se inyecta simultáneamente desde todos los subdominios neuronales y su sumación es lineal, lo cual anticipa que el perfil espacial generado por cada vía aferente deberá mantenerse en los generadores de actividad espontánea si su separación es eficiente.

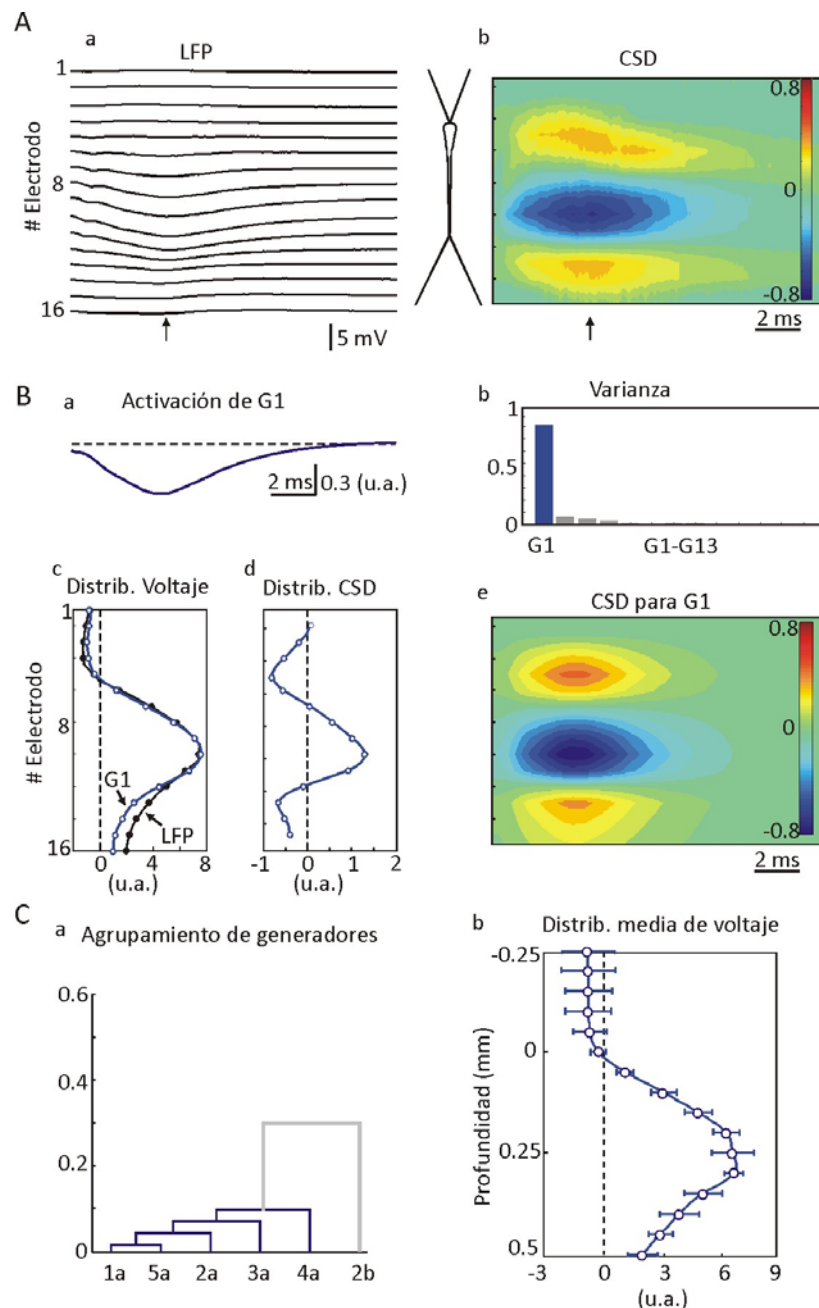


Figura 12: La activación subumbral de una vía aferente es capturada como un solo generador con una definición espacio temporal precisa: vía de Schaffer. A. Un estímulo eléctrico en la CA3 ipsilateral provoca un potencial negativo en el árbol dendrítico apical (Aa) La neurona esquemática indica la posición de registro aproximada. El CSD reveló el sumidero activo centrado en el estrato radiado, rodeado por sus dos fuentes pasivas, una en soma y otra en el estrato lacunoso (Ab) B. El ACI mostró un solo generador significativo (Bb) con un curso temporal que se correspondió perfectamente con el cambio de voltaje en los electrodos centrales (Ba). C. Las distribuciones de voltaje y de CSD (Ca y b) coincidieron con los perfiles espaciales del LFP y del CSD crudo. El CSD calculado a partir del LFP reconstruido de G1 (Cb) fue idéntico al CSD crudo (Ab). D. El análisis de clúster para las distribuciones de voltaje obtenidas de 4 animales mostraron un solo grupo (Da). La distribución de voltaje promedio mostrada en Db fue construida utilizando al estrato piramidal como referencia espacial.

A continuación examinamos un perfil de potenciales provocados en otra subregión, la FD, igualmente monosináptico y subumbral, cual es el generado por la entrada de la VP que contacta con las células granulares (Figura 13). La

FD es una estructura más compleja que la región CA1, al presentar una curvatura muy pronunciada que, de hecho, duplica las láminas en un trayecto de registro vertical, si bien en orden inverso. Como ya es conocido, se registró un potencial provocado negativo en la capa molecular de ambas hojas y un fuerte potencial positivo a través del hilus, interpuesto entre ambas capas celulares. El CSD mostró fuertes sumideros en ambas capas moleculares (sk 1 y sk 2) y un sumidero débil (sk3) producido por las células piramidales de CA1 en el estrato lacunoso, correspondiente a terminaciones de estas fibras en esa zona. Las fuentes pasivas (corrientes de retorno) aparecieron en la capa de somas de las células granulosas. Al analizar con ACI el perfil de potenciales obtuvimos de nuevo un solo generador significativo G1. El CSD de los LFPs virtuales reconstruidos para este único generador coincidió con el de la señal en crudo, así como las curvas de distribución espacial de pesos de voltaje y del CSD virtual. De este modo, determinamos que un solo generador aislado por ACI podría contener la actividad sináptica de varias poblaciones neuronales separadas físicamente siempre y cuando sean activadas simultáneamente por una entrada común, en este caso la VP cuyos axones tras la bifurcación “barren” las dos hojas y las activan simultáneamente.

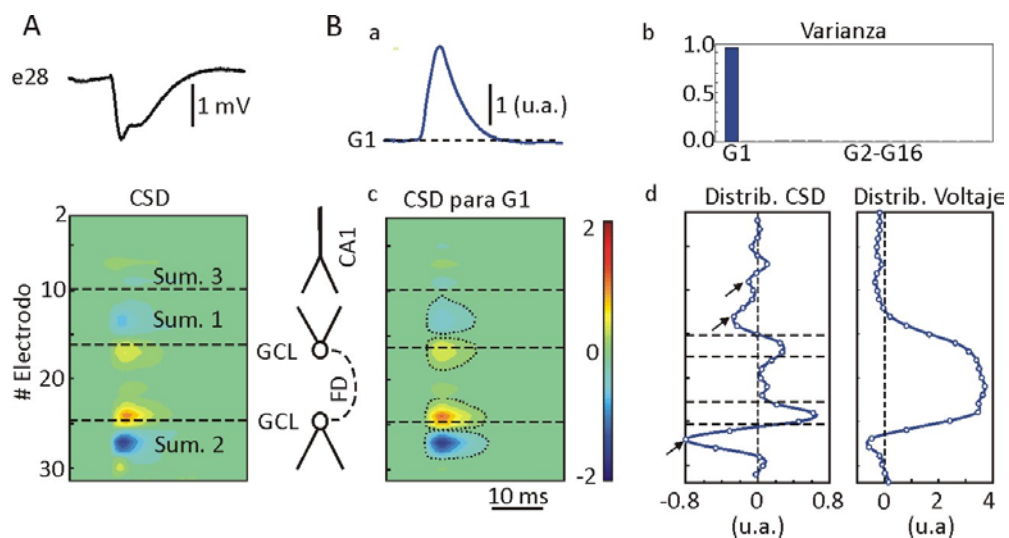


Figura 13: La activación subumbral de una vía aferente es capturada como un solo generador con una definición espacio temporal precisa. Vía Perforante. A. Un estímulo eléctrico en la vía perforante ipsilateral provocó un potencial negativo en ambas hojas moleculares de la FD (Aa). El CSD mostró sumideros activos en ambas capas moleculares (sm1 y sm2) y un sumidero débil en el estrato lacunoso de CA1 (sm3). Las fuentes pasivas pueden verse en las capas de células granulosas. Las neuronas esquemáticas muestran los sitios aproximados de registro. B. ACI mostró un solo componente significativo, G1, (Bc), con un curso temporal que se correspondió con el cambio de voltaje de la capa molecular. (Ba) El CSD calculado para este generador fue similar al CSD crudo (Bb). La distribución de voltaje y de CSD (Bd y Be) coincidieron con los perfiles espaciales del LFP y CSD crudos.

2.4.2 Separación de actividad LFP provocada por múltiples entradas sinápticas

Como consecuencia de la propagación por volumen de las corrientes extracelulares un LFP registrado en un punto concreto contiene actividad de varios dominios de la misma neurona, e incluso de poblaciones distantes diferentes y alejadas del electrodo de registro. Por esta motivo, testamos la capacidad de ACI para descomponer un LFP contribuido por dos vías, Schaffer y VP, que activaron dos subregiones, CA1 y FD, respectivamente, pero cuyos potenciales correspondientes entran, aunque con menor amplitud, en la otra subregión, contaminando los nativos. Afortunadamente, las poblaciones piramidal y granulosa están segregadas espacialmente, y pueden ser abarcadas por grupos de electrodos distintos de un único multielectrodo lineal con 32 sitios de registro. Como veremos, esto facilitará la interpretación de resultados. En los experimentos que detallamos en la Figura 14 se estimularon las vías de Schaffer y Perforante con pares de pulsos subumbrales a una frecuencia de 0.2Hz. La estimulación consistió en estimulación simultánea de ambas vías, o bien alternativa, con una separación entre pulsos de 100 ms. La intensidad del estímulo se mantuvo constante en la vía Schaffer, mientras se incrementó gradualmente en la VP durante los estímulos en patrón alternativo, o se disminuyó en el formato simultáneo, siempre manteniéndose por debajo del umbral de 0.5x (Figura 14 A).

2.4.2.1 Estímulos no coincidentes

Un estímulo eléctrico en la región CA3 ipsilateral produjo un PEPSp en CA1, así como un campo multifásico local en CA3/FD. El CSD mostró la distribución característica de corrientes fuente-sumidero-fuente a lo largo del eje de la célula piramidal de CA1, y un dipolo local fuente-sumidero en CA3 (figura 14 B). Este dipolo tardío contuvo una mezcla del sumidero antidrómico en el área de las células granulosas (por activación de las fibras musgosas procedentes de los granos que barren el estrato lúcido de CA3, cercano al electrodo de estímulo), y del PEPSp ortodrómico recurrente en CA3. La activación de la VP produjo un sumidero en la capa molecular (100 μm por debajo del sumidero de CA3), así

como sus correspondientes fuentes somáticas en ambas capas granulosas. También observamos un sumidero más débil en el estrato lacunoso de CA1. En este caso, el ACI mostró tres generadores significativos (Figura 14 C). Puede apreciarse cómo la activación temporal de G1 desarrolló un incremento gradual de acuerdo a la elevación de la intensidad del estímulo de la VP. El comienzo de los brotes de actividad en G1 coincidió con el inicio del estímulo para esta vía. Los otros dos generadores, G2 y G3 exhibieron brotes de amplitud constante, en concordancia con la estimulación de Schaffer, y cuyo inicio coincidió, igualmente, con los instantes de estimulación de esta vía. Así, el generador G1 representa, exclusivamente, la actividad en la capa molecular de la FD, mientras que los LFPs provocados por estímulo de CA3 fueron separados en dos generadores: G2, responsable de la excitación de CA1, mediada por los colaterales de Schaffer, y G3, correspondiente a la activación local en CA3/FD. Los CSD de los LFPs reconstruidos a partir de cada uno de los generadores confirmaron con su perfil espacial característico la vía y naturaleza específicas de estos generadores. De esta manera se probó que el ACI proporciona una descomposición correcta de entradas sinápticas múltiples no coincidentes en el tiempo.

2.4.2.2 Estímulos coincidentes

En principio, la ajustada coincidencia temporal de múltiples fuentes debería disminuir la eficiencia de ACI para separarlos, pues una evolución temporal muy similar podría confundir la relación espacial de pesos entre las dos vías. Para investigar este punto se activaron ambas entradas con sincronización perfecta (Figura 14A). El CSD resultante del AFC apareció como un mapa complejo de fuentes y sumideros. La proximidad de las capas de CA3 y FD produjo la fusión de sus sumideros respectivos en uno sólo, ligeramente deformado, lo cual dificulta su diferenciación e interpretación. Pero incluso en casos extremos como este, pudimos observar que ACI retorna tres generadores significativos, cada uno de ellos con una distribución espacial similar a la encontrada en el caso de potenciales no coincidentes (Figura 14 C). Sí se apreció cierta contaminación introducida por el generador más potente G1, responsable de la entrada de la VP, en los otros dos. Esta contaminación cruzada pudo ser

apreciada comparando las dos curvas de pesos espaciales. De este experimento podemos concluir que incluso en un caso extremo de coincidencia temporal perfecta de dos o más entradas diferentes se puede obtener una separación de componentes sinápticos con una distribución espacial y temporal correcta. Véase como sólo G1 mostró el decremento gradual en la amplitud de los brotes de actividad provocada correspondiente a la intensidad decreciente de los pulsos de estimulación, mientras que G2 mantuvo amplitud estable en concordancia con la estimulación constante de la vía Schaffer.

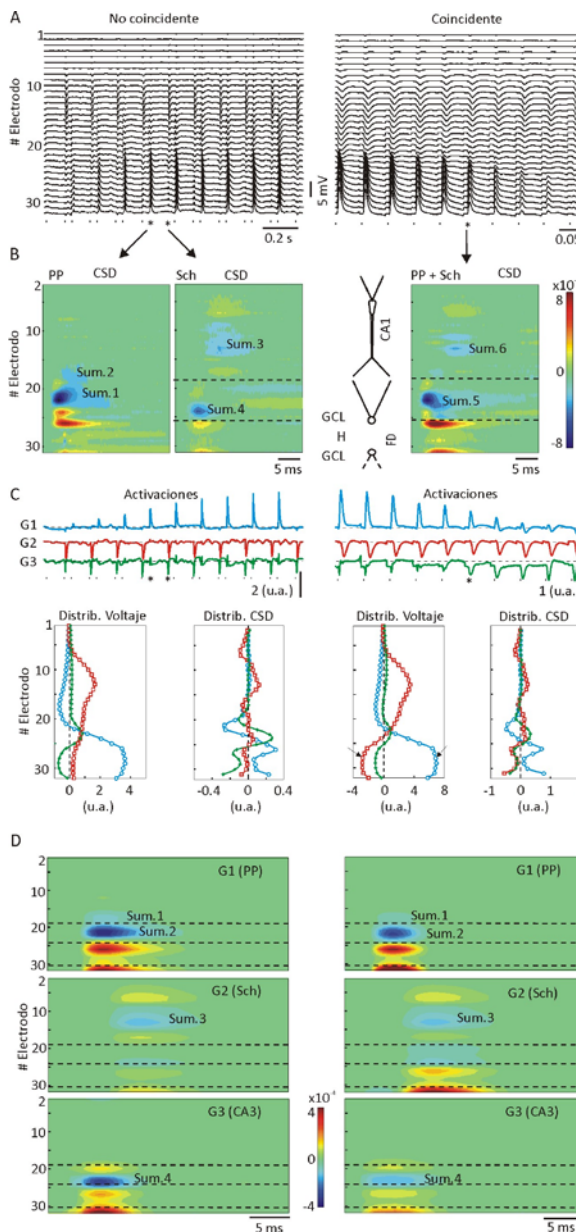


Figura 14: Separación de actividad provocada por múltiples vías. A. LFPs registrados a lo largo de CA1-CA3/GD: estímulos no coincidentes (izquierda) y estímulos coincidentes (derecha). B. CSDs de los potenciales provocados para cada una de las vías por separado (izquierda), o simultáneas (derecha). La estimulación en la VP produjo un sumidero principal en el estrato molecular (sm1) y otro más débil en el estrato lacunoso de CA1 (sm2). La activación de CA3 causó un sumidero en el estrato radiado de CA1 (sm3) y otro local (sm4). Los estímulos proporcionados simultáneamente causaron un sumidero complejo (sm5) en la FD, además del sumidero de Schaffer en CA1 (sm6). C. El ACI mostró tres generadores significativos en ambos casos. G1 y G2 corresponden a la VP y Schaffer, respectivamente, y G3 a actividad local de CA3/FD. Los trazos superiores muestran la activación temporal de estos generadores, y los inferiores la distribución de voltaje y CSD de cada uno. Las distribuciones de G1 y G2 fueron idénticas a la estimulación de cada vía por separado. D. CSD virtuales del LFP reconstruido para cada generador por separado.

2.4.3 Aplicación de ACI a LFPs de actividad LFP hipocámpica irregular espontánea

Hemos comprobado que el ACI puede separar la actividad provocada por estímulos de dos vías sinápticas, Schaffer y VP, esto es, cuando los LFPs han sido contribuidos únicamente por estas dos vías en concreto, y cuyas características espacio-temporales se pueden recuperar con fidelidad desde la señal LFP mezclada. A continuación se muestran los resultados obtenidos al aplicar ACI a segmentos de actividad LFP espontánea del animal cuya composición en vías sinápticas, sus intensidades, y sus cursos temporales son desconocidos (Figura 15). El objetivo fue comprobar si los generadores resultantes del análisis podían ser identificados con vías sinápticas conocidas. Para facilitar la detección de algunas de estas vías se introdujeron estímulos subumbrales cuya amplitud fue equivalente a la de los LFP espontáneos.

2.4.3.1 Identificación de la actividad poblacional de Schaffer y VP en LFPs espontáneos

Se analizaron fragmentos de LFP espontáneo que incluyeron estímulos subumbrales aleatorios a una tasa promedio de 1Hz. Debido a la baja intensidad aplicada, las respuestas provocadas son difíciles de discernir en los LFPs nativos (Figura 15A; las líneas verticales rojas y azules marcan los tiempos de estimulación de Schaffer y VP, respectivamente). El ACI restituyó, en este caso, cinco generadores significativos, dos de los cuales contienen las respuestas provocadas exclusivamente por Schaffer (G2) y VP (G4). Puede observarse cómo la distribución de pesos espaciales para estos dos generadores es esencialmente idéntica a aquellas encontradas en análisis de fragmentos que tan sólo contuvieron actividad provocada. La fracción de la varianza total explicada por estas dos vías principales fue pequeña (<5% en ambos casos). En principio, esta contribución tan reducida de dos de las vías excitadoras principales del hipocampo podría poner en duda su significación estadística, pero como hemos comprobado cada generador capta exclusivamente los brotes de actividad provocada de su vía correspondiente, sin contaminaciones notables hacia los demás generadores (condición 2 de fiabilidad).

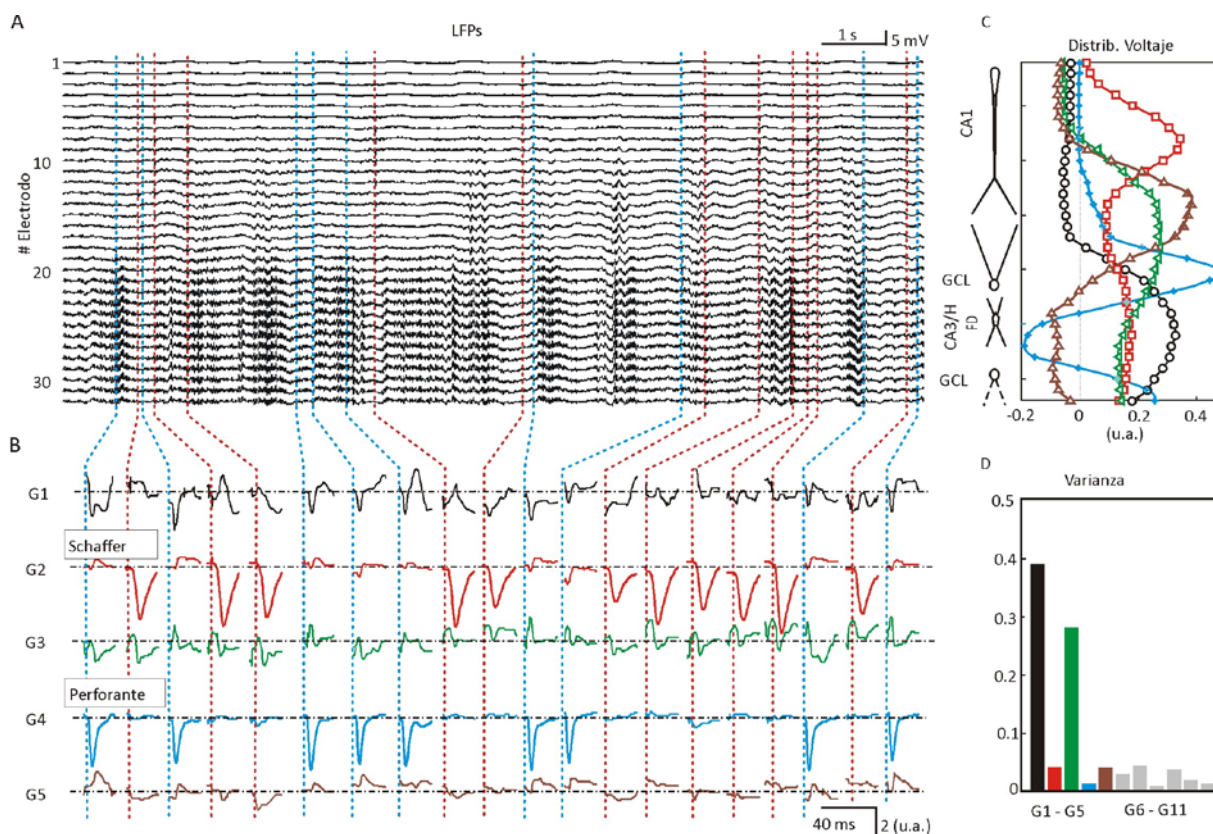


Figura 15: Identificación de la actividad poblacional de Schaffer y VP en LFPs espontáneos. A. Segmento de un LFP registrado en el hipocampo completo. Los LFPs fueron cebados con estímulos aleatorios en ambas vías excitadoras, Schaffer y VP. Las líneas verticales en color marcan el momento de estimulación (azul para VP y rojo para CA3). B-D. Con ACI se encontraron 5 generadores en este fragmento de LFP, de los cuales 2 contuvieron la activación de las vías conocidas y descritas anteriormente, y los otros tres nos sugieren, con sus perfiles espaciales, correspondencias con otras vías del hipocampo. B. Ampliación de las respuestas tras cada estímulo. C. Las distribuciones espaciales de los generadores obtenidos. D. Varianza relativa de los generadores aislados.

2.4.3.2 Reconstrucción de LFP específicos de vía sináptica y su correlación con dominios subcelulares de neuronas individuales

La separación de los generadores que componen el LFP espontáneo nos permite reconstruir los LFP producidos por vías específicas de forma virtual, y analizarlos por separado. La figura 16 muestra un ejemplo donde puede apreciarse un fragmento de LFP registrado por una lanceta de 32 canales que contuvo tres pulsos (subumbrales) aplicados a la vía de Schaffer o a la VP. El CSD resultante mostró una mezcla equívoca de fuentes y sumideros producidos por actividad espaciotemporal irregular de diferentes orígenes presinápticos (Figura 16 B). El ACI reveló, de nuevo, los mismos 5 generadores, de los cuales G2 y G4 corresponden con las vías ya descritas. Los otros generadores mostraron distribución de pesos espaciales característica y estable y deberían corresponderse con entradas sinápticas conocidas anatómicamente. En la figura

16 D se muestra el LFP virtual reconstruido para el generador de Schaffer. Comparando detenidamente ambos perfiles, crudo y reconstruido, es claro que la actividad espontánea es más prominente en el hilus de la FD (electrodos inferiores), mientras que la actividad mediada por Schaffer es más conspicua en CA1. En este, también se aprecia actividad en la región CA3/FD, presumiblemente causada por la excitación recurrente de las células piramidales en la región de CA3.

Como confirmación ulterior de la especificidad del generador identificado como de la vía Schaffer, podemos observar en su activación temporal ondas de corta duración y gran magnitud, tipo *sharp-wave* (Figura 16 C, G2), en coincidencia con actividad "*ripple*" de alta frecuencia en el LFP crudo filtrado (100-200 Hz). La localización precisa y la magnitud de las corrientes transmembranas subyacentes fueron obtenidas evaluando el CSD del LFP reconstruido (Figura 16 D), que reflejó, como era de esperar, un sumidero principal centrado en el estrato radiado rodeado por fuentes pasivas en el estrato piramidal y lacunoso, repitiendo el perfil conocido de la actividad provocada en esta vía (Herreras 1990). Los mapas temporales de CSD virtual específico de Schaffer contrastan, por su sencillez laminar, con la complejidad de los obtenidos de la señal LFP original, que es multisináptica. Por lo tanto, los generadores LFP aislados por ACI permiten examinar las corrientes transmembrana específicas de cada población con resolución subcelular, a pesar de la contaminación que puedan introducir otras entradas al LFP nativo.

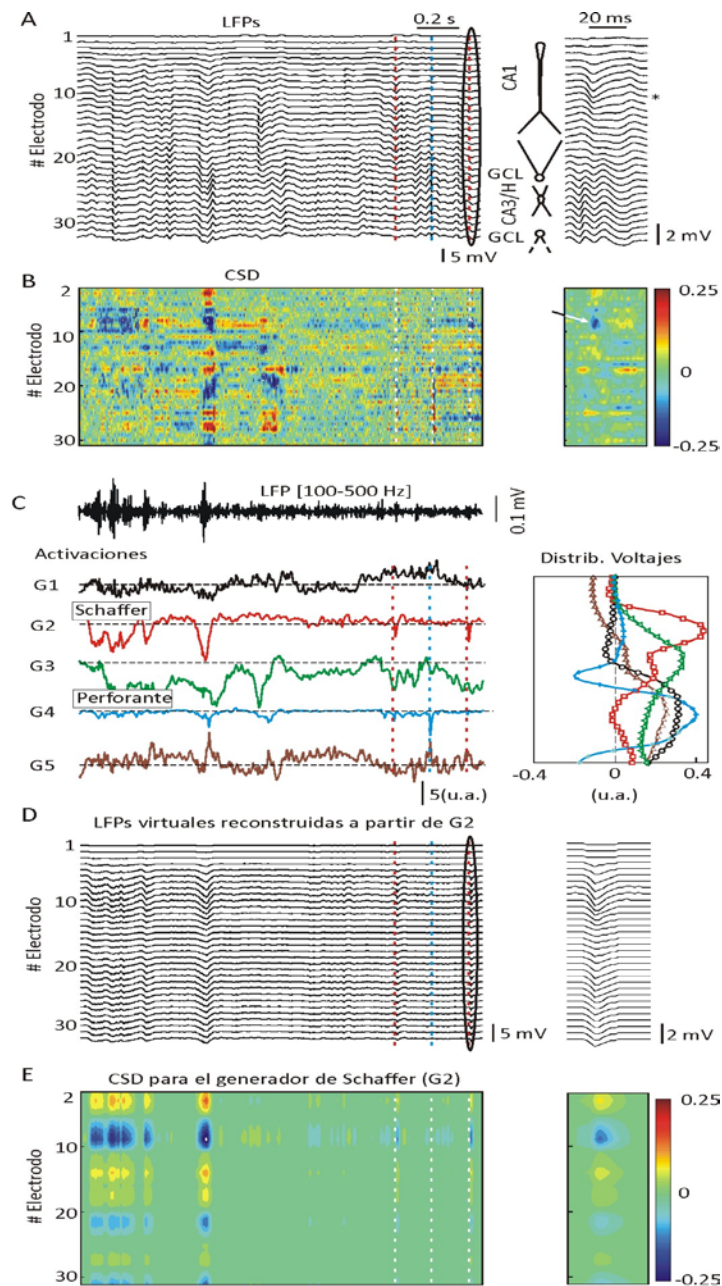


Figura 16: Caracterización de la actividad específica en actividad irregular. A. Segmento de actividad irregular en hipocampo completo. Las dos vías excitatorias fueron cebadas con estímulos aleatorios de baja intensidad, como en la figura anterior. A la derecha se muestra un esquema de los sitios aproximados de registro y una ampliación de un fragmento con un PEPsP provocado por estímulo en Schaffer (marcado con un asterisco). B. El CSD para el LFP crudo mostró una compleja mezcla de corrientes. A la derecha, en la ampliación del mismo momento, puede apreciarse débilmente la entrada de Schaffer en el estrato radiado. C. Actividad de los 5 generadores separados por ACI. Los periodos de oscilaciones rápidas coinciden temporalmente con actividad Schaffer, G2, que corresponden a sharp-waves. D. Reconstrucción de los LFPs a partir del G2. A la derecha podemos observar una ampliación donde se observa el PEPsP generado por esta entrada idéntico al LFP crudo. E. CSD a partir del LFP reconstruido para G2, en el que ya pueden observarse las fuentes y sumideros con perfil característico para esta vía.

2.4.3.3 Contribución mínima de las vías excitadoras al LFP de hipocampo.

La identificación de los generadores LFP específicos de Schaffer y VP, que describen la activación temporal de sus vías correspondientes, permiten

cuantificar la actividad de las poblaciones presinápticas correspondientes (CA3 y corteza entorrinal, respectivamente) en cualquier segmento temporal sin condicionamientos. En general, están compuestos por pequeños eventos de amplitud variable más o menos encadenados a frecuencia gamma (40-45 Hz), cuyo estudio en profundidad ha sido desarrollado por otros miembros del laboratorio (Fernández et al., 2012). En capítulos posteriores se presentarán datos detallados sobre la estructura temporal y significación fisiológica de estos eventos específicos de la vía de Schaffer. La potencia promedio que contribuye cada vía en particular puede ser estimada desde el LFP reconstruido. Así, las vías de Schaffer y Perforante produjeron 0.045 y 0.031 mV² de promedio (n= 5 animales), respectivamente, que supusieron un 7 y 5% de la potencia total, mientras que las contribuciones de los otros generadores aún no identificados fue notablemente mayor (0.13 y 0.24 mV²). Estos resultados indican una contribución relativa reducida de estas dos vías excitadoras a la varianza total del LFP observado.

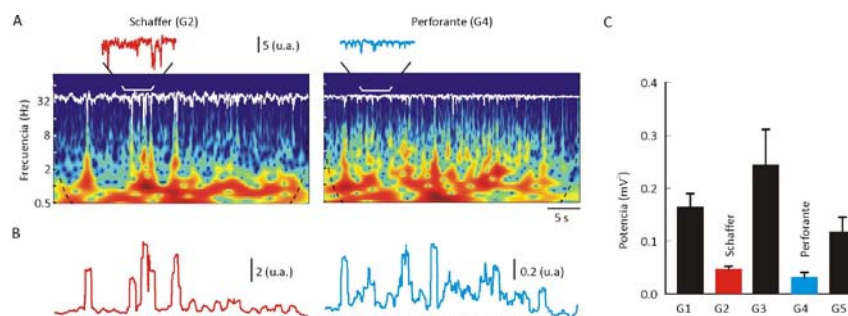


Figura 17 Contribución mínima de las vías excitatorias de Schaffer y perforante al LFP. A. Contenido en frecuencias de ambos generadores durante la actividad irregular. El espectrograma muestra una actividad dominante en el rango de 2-3Hz. Los trazos en blanco muestran la activación temporal de los generadores, amplificados arriba. B. Envolvente temporal de la actividad de cada generador por separado en ventanas de 1 segundo. C. Potencia promedio de los LFPs reconstruidos a partir de la actividad de cada generador en 6 animales, durante actividad irregular. Nótese la pequeña contribución relativa de estas dos vías excitadoras.

2.5 DISCUSIÓN

El estudio de los mecanismos de procesamiento de la información neural requiere principalmente de cierto conocimiento de los circuitos implicados y de las relaciones funcionales y causales entre los grupos que lo integran. Este punto es esencial para aprovechar toda la información que pueda proporcionarnos cualquiera de los métodos de estudio y aproximaciones

disponibles, pero es más importante si cabe cuando desarrollamos uno nuevo y deseamos sacar conclusiones fiables. En este Capítulo hemos mostrado evidencias de la fiabilidad y efectividad del ACI para separar generadores independientes de actividad específica de vías sinápticas concretas y conocidas, en registros de actividad LFP, con multielectrodos lineales.

El principal requisito para una correcta separación de los generadores es la distribución espacial diferenciada de las corrientes transmembrana a lo largo del eje somato-dendrítico de las células principales. Mucho menos importante resulta el patrón de activación temporal, que puede ser indistintamente rítmico, irregular o mixto. Por otro lado, la activación subumbral de vías sinápticas excitadoras conocidas nos permitió describir las características espaciotemporales de estos dos generadores aislados y, además, cuantificar su contribución específica al LFP nativo durante actividad irregular. En el caso del generador Schaffer, pudimos observar brotes de tipo *sharp-wave*, cuyo origen sináptico es conocido en la región CA3 ipsilateral (Buzsáki et al, 1983), corroborando su correcta extracción. En relación a la contribución relativa de las diferentes entradas al LFP total hemos mostrado que ambas vías contribuyen en un porcentaje menor al esperado, pero razonable considerando que son entradas excitadoras, procedentes de células principales y que descargan a frecuencia baja o muy baja (Ranck 1973), a menudo con un elevado porcentaje de células silentes, mientras que las interneuronas disparan a una tasa más elevada (Ranck 1973; Somogyi y Klausberger, 2005).

El ACI puede separar eficientemente señales que provienen de sitios diferentes y que estén contenidas en el mismo registro (Choi et al, 2005). Los mismos principios matemáticos son aplicables a registros de actividad eléctrica intracerebral (Makarov et al, 2010). La separación de estos componentes LFP, o generadores, se basa en la activación sincrónica de fibras individuales homólogas en una escala temporal de milisegundos en un volumen de tejido suficiente en relación a la distancia entre registros, colocados en emplazamientos estratégicamente idóneos para abarcar los distintos dominios subcelulares activados específicamente por cada generador. Así, hemos podido

mostrar que la configuración de las curvas espaciales de CSD para los generadores de Schaffer y de la VP coincide con la configuración de las corrientes de entrada y salida conocidas para estas dos poblaciones.

Este análisis no es dependiente de actividad rítmica ni de eventos estereotipados, y por lo tanto puede ser aplicado en infinidad de situaciones. Como ya se ha mencionado anteriormente, el ACI ha sido utilizado para separar artefactos, pero aquí ponemos en relieve que su capacidad de separación basada en discriminación espacial es mucho más poderosa aplicado a registros intracerebrales: no sólo separa la actividad neuronal de los artefactos, sino los distintos componentes sinápticos de la propia actividad neuronal. Sin embargo puesto que la presencia de los artefactos disminuye la eficacia del análisis al introducir gran cantidad de varianza de origen no neuronal en la señal analizada se recomienda eliminarlos antes de ejecutar el análisis.

La escasa contribución relativa de las vías excitadoras principales al total de actividad LFP dificulta su identificación, lo que podría estar sucediendo también con otras vías aferentes. Hemos mostrado lo ventajoso que resulta poder introducir de manera controlada (“cebar”) actividad en las vías sinápticas que estemos buscando para una primera aproximación a su estudio. Para identificar las distintas poblaciones neuronales de origen de cada generador del LFP y su naturaleza excitadora o inhibitoria hemos utilizado técnicas adicionales complementarias al ACI, como AFC, reconstrucción del LFP virtual específico de subpoblación aferente, y el “cebado” con potenciales provocados subumbrales de vías excitadoras conocidas (Entorrino-hipocámpico y CA3-CA1). Hemos podido mostrar una resolución temporal continua y precisa de las variaciones de amplitud de cada generador. También encontramos que la actividad de la vía entorrino-hipocámpica aparece en un solo generador a pesar de estar dividida físicamente en las dos hojas de la FD. La explicación que encontramos en este caso es que, a pesar de la bifurcación axonal de esta vía en dos colaterales separados espacialmente, ACI encuentra que la activación es simultánea e idéntica en ambas hojas por lo que los pesos relativos de los electrodos en una y otra hoja mantienen una relación constante y son capturados en un único

componente. Afortunadamente, la simplicidad anatómica del hipocampo permite que la estimación de los CSD virtuales defina con precisión la extensión total de las corrientes transmembrana de cada generador, permitiendo una adscripción rápida y sencilla por simple inspección visual bien a células piramidales bien a granulosas.

Con estos experimentos pudimos comprobar que la utilización de ACI combinado con CSD permite una identificación subcelular muy precisa de los componentes sinápticos específicos de vía del LFP nativo incluso cuando este presenta un patrón general irregular, lo cual nos da acceso, por primera vez, a estudiar las relaciones dinámicas entre subpoblaciones de hipocampo en un segmento de actividad y comportamientos asociados, por los que apenas se había mostrado interés.

ALEJANDRA KOROVAICHUK

3.1 INTRODUCCIÓN

El patrón temporal de las fluctuaciones del potencial de campo está definido por la cadencia de los potenciales postsinápticos generados por las neuronas cercanas al registro, y por tanto reflejan, con la transformación adecuada, las series temporales de descarga de las neuronas presinápticas cuyas proyecciones convergen en una misma región. Además de factores espaciales idóneos que promuevan la acumulación de corrientes sinápticas de la misma polaridad en un punto concreto del intersticio, el otro factor indispensable para que esta acumulación sea efectiva y genere LFPs de magnitud considerable es la sincronización. Si no existe coincidencia temporal precisa en la generación de las corrientes postsinápticas, difícilmente se observarán LFPs, puesto que, como es intuitivo y hemos mostrado en el Capítulo anterior, cualquier punto recibe en un momento dado corrientes de ambas polaridades provenientes de dominios celulares distintos o neuronas diferentes, que tienden a cancelarse. No existen, por el momento, estimaciones de la fracción de la actividad sináptica total que se refleja en un LFP, pero es obvio que debe ser una fracción muy pequeña. Aún así, su estudio ha acaparado buena parte de la atención de los investigadores, que obviamente han comenzado por aquellos más simples y fáciles de reproducir, los de patrón temporal oscilatorio (Whishaw y Gogolak et al., 1963; Fujita, 1963; Vanderwolf, 1973; Kemp y Kaada, 1975). El término *actividad oscilatoria* se utiliza en electroencefalografía para referirse a las fluctuaciones rítmicas del potencial eléctrico, sea registrado en superficie (EEG) o en profundidad (LFP). Los registros de células individuales han mostrado repetidamente una correlación entre la descarga en trenes de potenciales de acción de una neurona o un clúster de neuronas y un LFP rítmico simultáneo en numerosas estructuras y situaciones. Si bien la interpretación es, con demasiada frecuencia, errónea, dando por sentado que los trenes de espigas registrados conjuntamente con el LFP son los causantes de los potenciales sinápticos que componen localmente el mismo, es evidente que debe existir una población presináptica cuyas neuronas descargan rítmicamente.

La búsqueda de ritmos cerebrales y su asociación a funciones complejas, ha sido, y aún es, el tópico dominante en la investigación de los LFPs. Como

explicamos en el Capítulo 1, estos ritmos fueron clasificados por su frecuencia de oscilación, y asociados a estados conductuales complejos, lo cual ha llevado “deslizamientos” arbitrarios en la definición de estas bandas a medida que otras actividades u otros rangos eran añadidos al acervo electrográfico. Siempre ha existido la idea de que las oscilaciones en los LFPs reflejan estados funcionales del cerebro (Llinás, 1988), y que surgen de la actividad correlacionada de un importante número de neuronas con interacciones de dinámica no lineal (Lopes da Silva, 1991). Así por ejemplo, una población de neuronas excitadoras interconectadas, pero con diferentes niveles de excitabilidad, producirían patrones de descarga sincrónica o asincrónica dependiendo de la topología y fuerza de la conectividad recurrente. Naturalmente, un ritmo en el LFP también puede manifestarse a distancia de la población marcapasos por entrada sináptica común a subpoblaciones de neuronas diana.

Ahora bien, sin excepción, la totalidad de las neuronas registradas en cualquier estructura cerebral muestran que el patrón temporal de descarga fluctúa. Incluso en aquellas neuronas cuyo disparo más característico es rítmico, este no es permanente, sino que alterna entre varios estados, desde silente a múltiples patrones irregulares, más o menos estereotipados o totalmente caóticos. La dinámica temporal de un registro LFP también presenta períodos intercalados de actividad irregular y otros de oscilación. Su carácter poblacional indica que las oscilaciones pueden estar provocadas por una o varias entradas sinápticas distintas, estén o no asociadas a comportamientos concretos. En general, estos patrones suelen estar asociados a poblacionales discretas, y su cadencia puede ser un indicativo de una modulación temporal entre un mismo grupo neuronal o entre varios.

En períodos en los que las neuronas descargan irregularmente, sus descargas también pueden ocurrir de manera sincronizada, y por tanto, generar fluctuaciones LFP irregulares en la región postsináptica. En otras palabras, la sincronización también se manifiesta mediante actividad cerebral arrítmica, sin periodicidad aparente (Eckhorn, 1994; Thivierge y Cisek, 2008): *oscilación y sincronización no son el mismo fenómeno*. De hecho, cuando estudiamos un

período de actividad LFP que presenta una cadencia rítmica, nos podemos preguntar si las variaciones de potencial que estamos observando corresponden a eventos fisiológicos reales o a los intervalos a los que éstos se repiten. Esta pregunta no es posible responderla con certeza examinando un registro de LFP en el dominio de las frecuencias. En él, obtendremos necesariamente una imagen sesgada de la realidad, que puede estar altamente distorsionada (ver Fig. EPSP).

El carácter multi-origen de un LFP permite albergar toda la gama posible de combinaciones de actividad temporal de cada una de las poblaciones convergentes, incluso escenarios opuestos. Puede darse el caso de que un LFP nativo muestre actividad oscilatoria rítmica generada por una sola población, que ocluya la actividad irregular de todas las demás que convergen en la misma (p. ej., el ritmo theta de hipocampo), o exactamente lo contrario, que una entrada rítmica de baja magnitud no sea perceptible por la contribución irregular dominante de otras (p. ej., ritmo gamma de hipocampo). Incluso, puede ocurrir que una actividad rítmica esté contribuida por varias entradas rítmicas a la misma frecuencia desde poblaciones presinápticas diferentes (Makarov et al., 2010), o que no se observe actividad rítmica por convergencia en antifase espacial o temporal de dos rítmicas a la misma frecuencia. En definitiva, las posibilidades de composición de un LFP registrado en un solo punto son muy variadas, y por consiguiente, sólo es posible analizar la cadencia temporal de una población presináptica concreta si su contribución al LFP está separada de las demás junto a las cuales conforma el LFP nativo en la zona de registro, lo cual podemos llevar a cabo, por primera vez en investigación en Neurofisiología experimental, mediante nuestra aproximación usando el ACI.

En este capítulo presentamos un análisis pormenorizado del contenido en frecuencias de la actividad de cada generador LFP de hipocampo, así como la composición y contribución relativa de los distintos generadores que contribuyen a conformar las bandas de frecuencia tradicionales hasta el momento. Como escenarios más habituales del hipocampo, hemos realizado el análisis cuando el LFP estuvo dominado por los dos patrones macroscópicos

más comunes, actividad irregular y actividad rítmica theta.

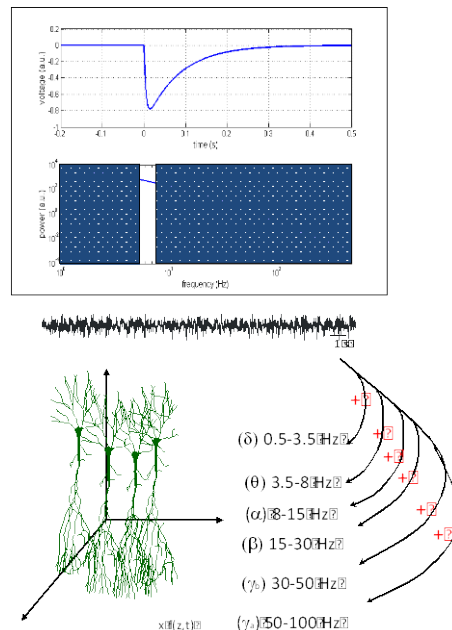


Figura 18: El análisis del LFP en el dominio de las frecuencias no permite estimar eventos fisiológicos, sino una fracción de los mismos. Un evento fisiológico elemental, como un PEPS contiene energía en toda la gamma de frecuencias (panel superior), por lo que el filtrado en bandas necesariamente trocea la información de los eventos que lo conforman, sin producir una separación real de sus componentes electrogénicos (panel inferior)

3.2 HIPOTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis: La naturaleza multi-origen de los LFPs se mantiene en sus distintas bandas de frecuencia.

Los objetivos genéricos son averiguar si los generadores de LFP pueden equipararse o no a bandas de frecuencia concreta, y si es posible acceder a la información temporal de generadores ocluidos por la actividad rítmica dominante theta del hipocampo.

Objetivos Específicos:

- a. Estudiar el contenido en frecuencias (firma) de cada generador LFP de hipocampo.
- b. Determinar la contribución relativa de cada generador a las bandas de frecuencia tradicionales y determinar si existen bandas específicas de generador.

3.3 MÉTODOS

3.3.1 Métodos experimentales

Para la descripción de animales, preparación experimental y métodos generales de estimulación y registro, ver Capítulo 2 (Sección 2.3). Igualmente, para la descripción del tratamiento de las señales y análisis comunes de datos (Potenciales provocados, ACI y AFC).

3.3.1.1 Análisis de contenido en frecuencias

Los experimentos fueron realizados en dos fases. Primero se registraron períodos de actividad irregular con duración variable, nunca inferior a 1 minuto (hasta 20). Posteriormente, se provocó ritmo theta sensorial, (pinzamiento de la cola). El ACI permite la concatenación o eliminación de fragmentos temporales, por lo que cuando la estimulación se hizo ineficaz por acomodación, fue interrumpida y retomada 15-20 segundos después. El período total de registro durante actividad theta se consiguió en ocasiones mediante la concatenación de varios fragmentos, hasta completar una duración total de al menos 1 minuto (Figura). Los registros, bien durante período irregular o theta, fueron analizados con ACI mediante dos protocolos distintos de acuerdo a los objetivos declarados anteriormente.

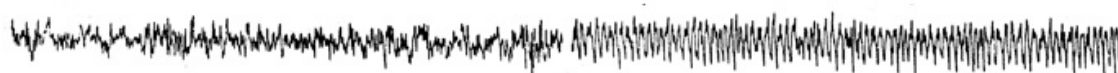


Figura 19: Ejemplo de registro en un solo canal extraído de un multiregistro en el estrato lacunosomolecular de la región CA1 mostrando la apariencia global del LFP durante actividad irregular y durante estimulación sensorial (obsérvese el ritmo theta característico).

Protocolo 1: Para cumplir con el objetivo 1 (averiguar el contenido en frecuencias de cada generador), primero se aislaron los generadores del perfil de LFP crudo mediante ACI como en el capítulo anterior. De cada generador LFP, se reconstruyó el LFP virtual, es decir, aquel que hubiera producido por sí mismo en ausencia de contribución de los otros, y por tanto sin la distorsión

espacial causada por la mezcla. De esta manera pudimos obtener la potencia absoluta (virtual) de cada uno de ellos y su variación en el tiempo, así como el contenido en frecuencias de cada generador del LFP mediante análisis espectral. Como la evolución temporal de cada generador es proporcional en cada sitio de registro, se utilizó un único sitio: aquel que mostró el mayor peso en cada generador.

Protocolo 2: Para la consecución del Objetivo 2, en primer lugar los LFP nativos fueron filtrados en las distintas bandas de frecuencia seleccionadas (Tabla 1). Los distintos perfiles espaciales así obtenidos fueron analizados por ACI, obteniendo así la composición en generadores y las contribuciones temporales de cada uno a las distintas bandas de frecuencia tradicionales.

	Delta	Theta	Alfa	Beta	Gamma
Rango de Frecuencias Analizadas	0.5-3Hz	4-8Hz	8-15Hz	15-30Hz	30-100Hz Gamma_bajo:30-50Hz Gamma_alto:50-100Hz

3.4 RESULTADOS

3.4.1 Estacionalidad de los generadores principales del hipocampo

En esta sección experimental hemos analizado el contenido en frecuencias de cada uno de los generadores principales obtenidos en los múltiples registros. Estos fueron:

G1: denominado GCsom, localizado en la FD, con actividad LFP dominante en el hilus y cambio de polaridad entre la capa de granos y el estrato molecular.

G2: denominado L-M, con actividad LFP a ambos lados de la fisura hipocámpica.

G3: generador Schaffer, con actividad máxima en el estrato radiado de la región CA1 y también, aunque mucho menor, en la CA3.

G4: generador VP, con actividad en la FD y algo menor también en la CA1.

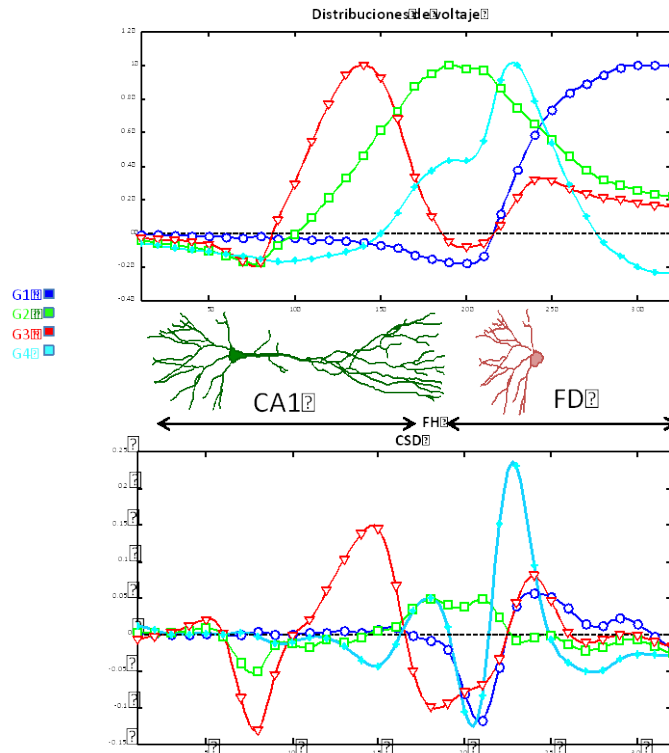


Figura 20: El ACI de LFPs de hipocampo muestran los 4 generadores principales. La figura muestra las distribuciones espaciales características de los pesos de voltaje (arriba) y su segunda derivada espacial (abajo), proporcional a las corrientes transmembrana. Los códigos de colores se mantendrán en el resto del Capítulo para facilitar su identificación.

Los LFPs son esencialmente señales no estacionarias, es decir, sus propiedades estadísticas varían en el tiempo. Sabemos que la contribución de cada generador no es constante, y tampoco podemos predecirla, por lo que *a priori*, un fragmento analizado contendrá contribuciones relativas cambiantes de uno u otro y la estimación de sus propiedades no sería generalizable. En principio, la variabilidad observada a simple vista permite augurar que en tiempos de análisis suficientemente prolongados algunas de sus características puedan ser estimadas con fiabilidad. En cualquier caso, hemos preferido utilizar LFPs reales para determinar el tiempo mínimo de registro necesario para considerar que nuestra variable, aun no siendo estacionaria, si es representativa estadísticamente y se puede generalizar. Así, utilizamos un test discriminador de estacionalidad para obtener el intervalo de registro mínimo necesario para determinar la energía promedio de cada generador en cada banda de frecuencia. Para ello, fragmentamos un LFP de larga duración (20 minutos) en ventanas temporales de duración creciente y se estimó el coeficiente de variación de la señal, en crudo y de la actividad temporal de cada generador extraído por ACI

tras filtrar el LFP nativo en las distintas bandas de frecuencia de interés. Consideramos como tiempo mínimo aquel que mostró un coeficiente de variación inferior al 5 %. La figura X muestra los resultados para los distintos generadores obtenidos desde LFPs pre-filtrados que mostraron patrón irregular (bloque de paneles izquierdo) o actividad theta (bloque derecho). Puede apreciarse una convergencia global a intervalos cercanos a los 30 segundos, con algunas excepciones notables, como las bandas delta y theta para los generadores 1, 3 y 4 (GCsom, Schaffer y VP, respectivamente) específicamente durante ritmo theta, que requirieron tiempos mayores. Los tiempos de análisis mínimos que hemos utilizado en este trabajo fueron de 60 s para LFP irregular y de 400 s para ritmo theta, que aseguran un error menor del 5%. Es importante resaltar que una vez realizado el análisis de un fragmento con fiabilidad estadística, la resolución temporal de los generadores es precisa en distintas escalas temporales, inferiores al milisegundo (ver Makarova et al, 2011).

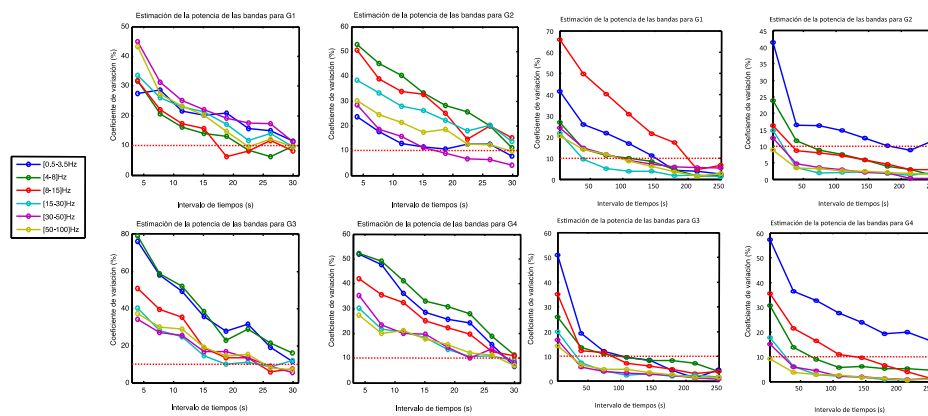


Figura 21: Estimación del tiempo de análisis requerido para estimar con fiabilidad el contenido de frecuencias en los distintos generadores, durante LFPs irregulares (bloque izquierda) y períodos theta (derecha). El coeficiente de variación disminuye con la duración del intervalo y alcanza valores menores del 10% para intervalos distintos dependiendo del generador y banda de frecuencia concretos.

3.4.2 La localización fina y contribución de cada generador al LFP es alterada por pre-filtrado

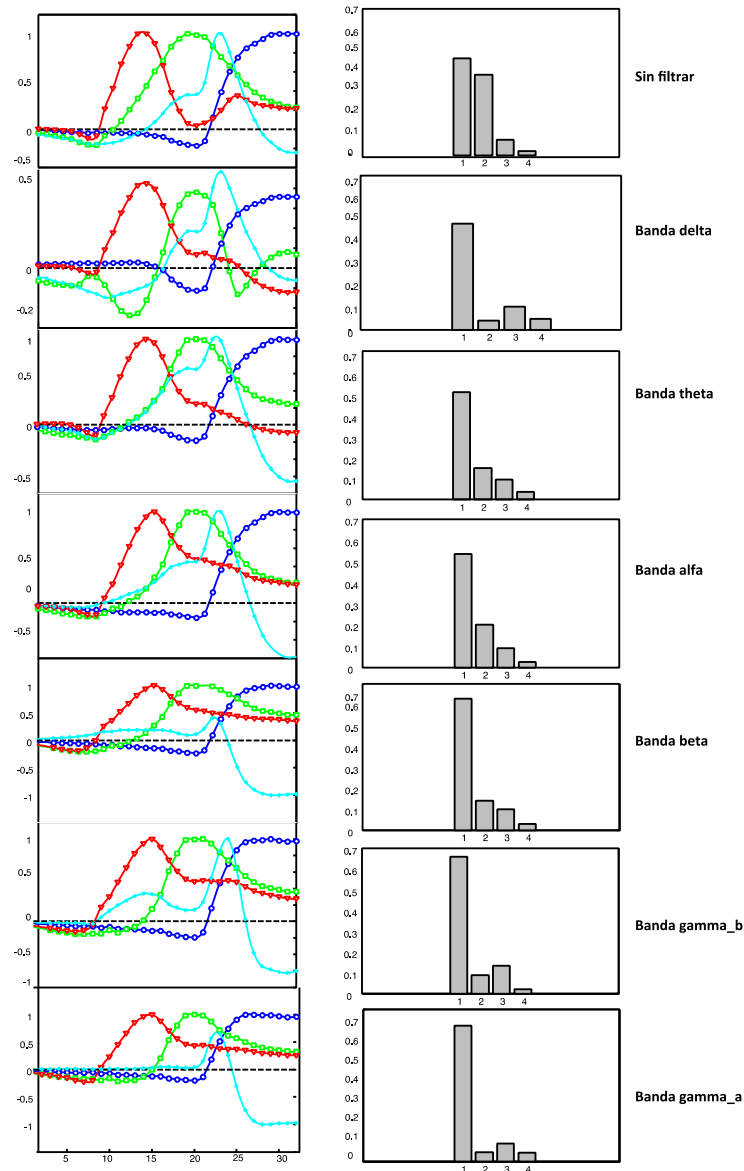


Figura 21: Distribución espacial y varianza relativa de los generadores LFP en los mismos registros pre-filtrados en bandas de frecuencia durante actividad irregular. En todos los casos se obtuvieron los mismos cuatro generadores (G1-G4), pero su distribución espacial cambió, así como su contribución relativa.

Para investigar el efecto del pre-filtrado de LFPs sobre sus características espaciales se aplicó el ACI a segmentos de LFPs nativos y pre-filtrados en distintas bandas de frecuencia. La Figura xx muestra que el prefiltrado no modifica el número de generadores ni su localización regional, pero sí produjo distorsiones considerables y heterogéneas de su perfil espacial, en algunos casos muy marcadas (compárense los perfiles del panel superior obtenidos desde el LFP nativo, con los inferiores obtenidos

tras pre-filtrado). La severidad de las distorsiones fue específica para cada generador y banda de frecuencias, impidiendo su normalización. Esta distorsión espacial se corresponde con alteraciones notables de la contribución relativa de cada generador al LFP, mostradas en los paneles de la fila izquierda. Puede apreciarse una tendencia global que promovió una dominancia (ficticia) del generador correspondiente al GCsom de la FD, posiblemente a costa del LM que fue el más afectado reduciendo enormemente su contribución en todas las bandas. El menos afectado fue el de Schaffer, que mantuvo una cuota similar. La explicación a estos cambios relativos admite múltiples posibilidades, y por tanto analizamos otras variables.

3.4.3 Variaciones de la potencia de los generadores durante LFP irregular y ritmo theta

Analizamos, a continuación, las potencias medias de cada uno de los generadores LFP tras reconstrucción del LFP virtual específico de cada uno, esto es la energía promedio si fueran entradas únicas a la población principal postsináptica. Comoquiera que la extensión espacial de cada generador es diferente, abarcando mayor o menor zona dendrítica de acuerdo a sus características anatómicas, su homologación carece de sentido y por tanto sólo se estimó en un punto de registro virtual, aquel que contiene la actividad máxima para ese generador. Una vez obtenido los datos sin filtrar el LFP nativo en cada uno de los animales (n=10), se repitió el análisis pre-filtrando en cada una de las bandas de frecuencia, tanto para fragmentos de actividad irregular como para períodos con actividad theta provocada.

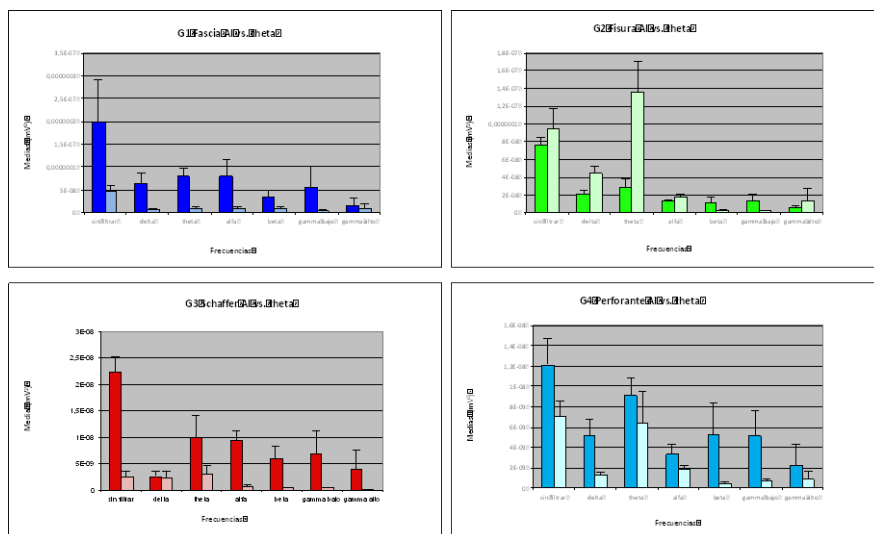


Figura 22: Potencias absolutas de los generadores. Comparativa de medias (n=10) de la potencia de cada uno de los generadores en todas las situaciones analizadas: sin aplicar filtro y filtrando el LFP en cada banda de frecuencias. AI (actividad irregular, en colores más oscuros); actividad theta (colores claros)

Los datos obtenidos son complejos y difíciles de interpretar globalmente. Podemos destacar algunas observaciones más evidentes. La primera es una pronunciada disminución de la potencia en las frecuencias más altas para todos los generadores y bandas de frecuencia, si bien con una notable heterogeneidad en la tasa de reducción para los distintos generadores. Otra diferencia notable es que la potencia absoluta fue mayor para todos los generadores y bandas de frecuencia durante actividad irregular que durante ritmo theta, con una excepción notable, como es el generador LM (G2), que fue más potente tanto en el LFP sin filtrar como en sus distintas bandas, excepto beta y gamma bajo. Es evidente cierta especificidad de este generador y la banda theta, pues alcanza su máxima potencia y diferencia con respecto al LFP irregular tras filtrar en esa misma banda.

La visualización global de los datos se favorece con una representación semilogarítmica de la potencia. Los perfiles de energía correspondientes a cada generador obtenidos tras prefiltrado del LFP en distintas bandas se muestran en la Figura x para actividad irregular, y en la Figura X para actividad LFP theta.

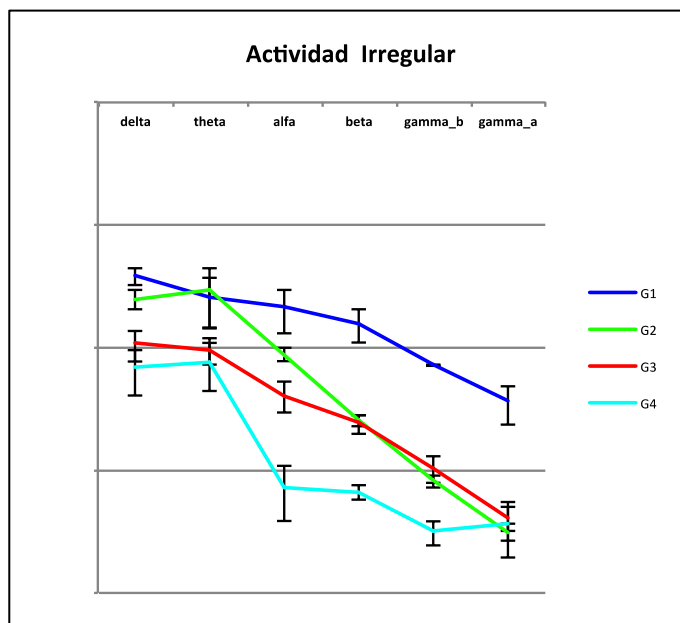


Figura 23: Actividad promedio de cada uno de los generadores del LFP en la banda de frecuencia prefiltrada (media \pm error estándar, n = 10 animales).

Las observaciones más llamativas que podemos destacar en esta representación son el descenso de la potencia en bajas frecuencias durante actividad theta para todos los generadores excepto el LM, así como el cambio a

frecuencia dominante beta en el generador GCsom de FD. Dadas la distorsión espacial y de contribución relativa producidas por el prefiltrado del LFP, mostrados en la sección anterior, no podemos descartar que este efecto, lejos de suponer un cambio real en la cadencia temporal de la actividad de las poblaciones presinápticas correspondientes, sea causado por un efecto “atractor” de carácter artefactual hacia la frecuencia dominante theta, claramente relacionada con el generador LM, y que sustraería varianza (energía) del resto de los generadores en su banda más característica.

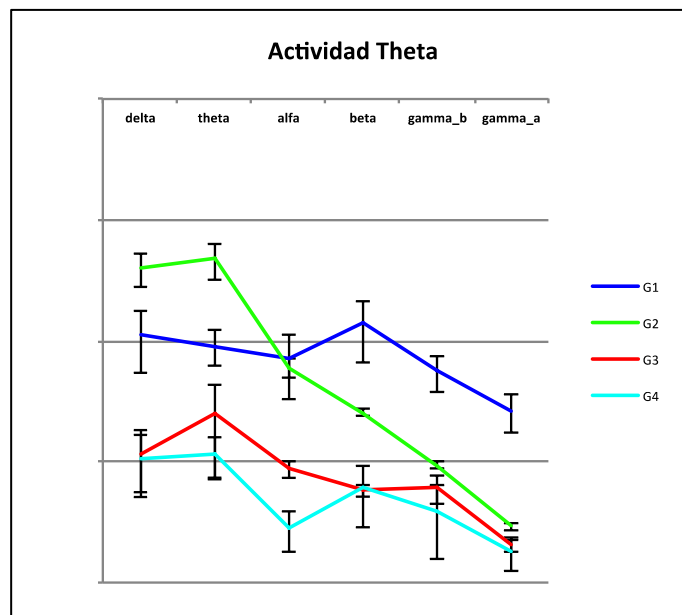


Figura: 24 Actividad promedio de cada uno de los generadores del LFP en la banda de frecuencia pre-filtrada (media \pm error estándar, n = 10 animales).

Una representación de los mismos datos, en forma de contribución porcentual de cada generador a las distintas bandas de frecuencia (Figura 24), refleja más claramente que éstas no son contribuidas por generadores concretos, sino por fragmentos de éstos en cantidad variable y específica de patrón global de actividad (irregular o rítmica theta).

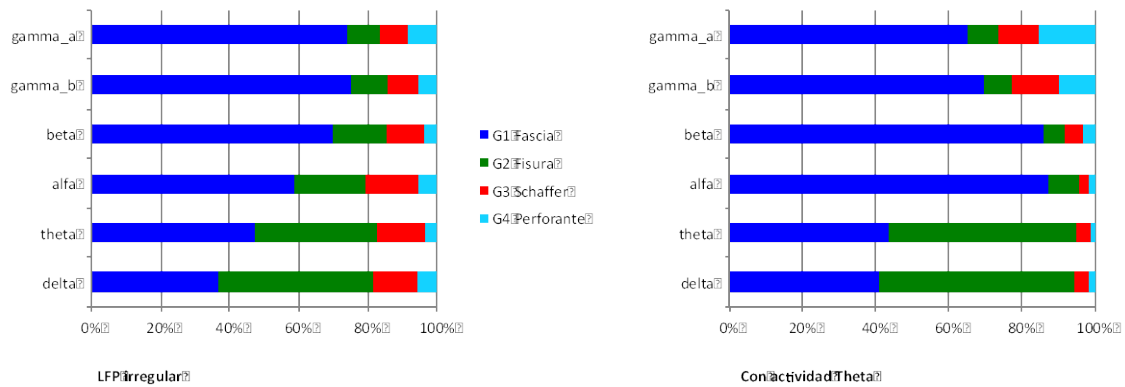


Figura 25: Porcentaje relativo de la actividad de cada uno de los generadores extraídos de LFPs pre-filtrados en distintas bandas de frecuencia a esas mismas bandas; izda.: actividad irregular; dcha.: actividad theta.

3.4.4 ¿Tienen los generadores LFP de hipocampo una firma de frecuencias característica?

Hasta el momento hemos apreciado de los datos que las bandas de frecuencia no se corresponden ajustadamente con generadores LFP concretos, lo cual es razonable teniendo en cuenta que un generador LFP recoge la envolvente temporal de todas las corrientes sinápticas generadas por las descargas de una población aferente y cuyas cadencia temporales conjunta tiene, habitualmente, fuertes fluctuaciones aperiódicas. Ahora bien, podemos preguntarnos si cada generador posee un espectro de frecuencias característico que recogiera algunas características temporales que resistan la promediación masiva de corrientes sinápticas elementales. Es evidente que la presencia de LFPs oscilatorios indica su existencia en algunos casos concretos, como el ritmo theta o actividad gamma.

Para examinar este punto, se aplicó ACI a LFPs nativos sin prefiltrado previo, y tras extraer los generadores se realizó un espectro de frecuencias a la activación temporal de cada uno, tanto en períodos de actividad irregular como cuando el LFP nativo mostró actividad theta. Aunque los resultados anteriores no abogan por el mantenimiento de las bandas de frecuencia clásicas, la comparación entre animales fue mucho más asequible calculando la media de la potencia en bandas prefijadas, por lo que mantuvimos su definición. La figura

26 muestra las distribuciones obtenidas. Pudimos observar que, efectivamente, cada generador presentó una composición en frecuencias característica que lo discrimina de los demás, bien sea por su potencia absoluta o por la diferente pendiente y heterogeneidades en la reducción con la frecuencia. Además, algunos generadores presentaron una firma distinta durante actividad irregular y theta, como el Schaffer y la VP. Curiosamente, el perfil del generador LM, que contiene la práctica totalidad de la actividad rítmica theta (en el animal anestesiado) no mostró cambios notables.

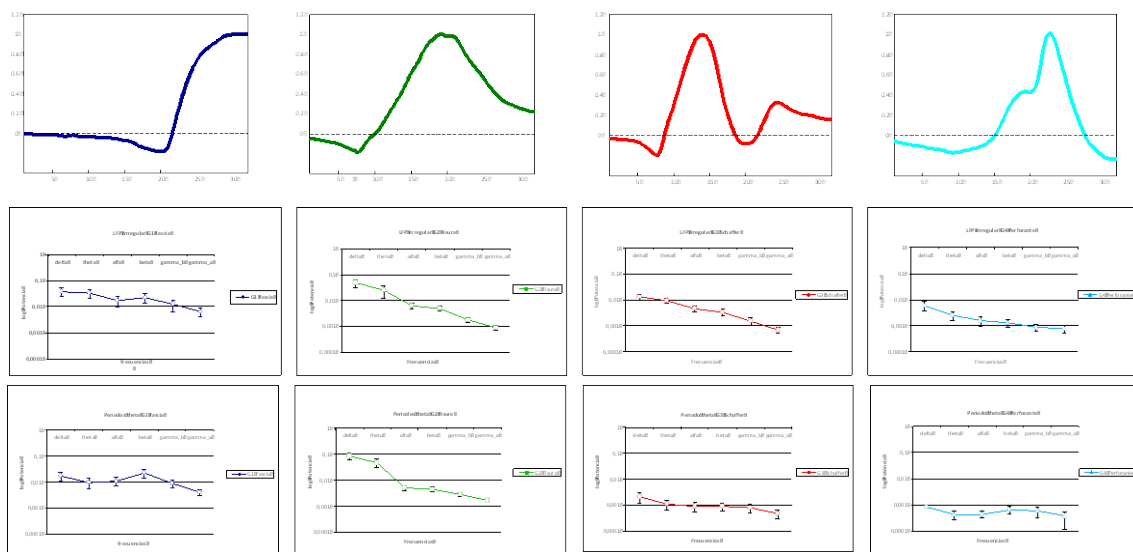


Figura 26: Firma de frecuencias. La composición de frecuencias de cada generador es característica, aunque en algunos mostró diferencias notables durante las actividades theta e irregular.

3.4.5 Distribución laminar espectral

Los espectros de potencia se utilizan a menudo en Neurofisiología para caracterizar señales no estacionarias registradas en un solo punto del espacio. Teniendo en cuenta que cada punto del espacio está contribuido por corrientes de distinto origen y cuyos generadores tienen distribución espacial diferente, sería de esperar que los espectros de potencia muestren diferencias de acuerdo a la composición específica de generadores en cada punto de registro.

Realizamos espectros de potencia del mismo segmento de LFP nativo en diferentes profundidades del mismo trayecto simultáneo, durante actividad

irregular y theta. Las figuras xx y xxx muestran los datos obtenidos en puntos separados 350 μ m. La densidad espectral durante actividad irregular presentó una distribución bastante similar en cada punto, con mayor potencia en frecuencias bajas. Aunque el patrón no muestra picos en frecuencias concretas y se acerca al formato $1/f$ característico del ruido, se puede apreciar mayor contenido de señal en un amplio rango de frecuencias en los registros más inferiores, desde la zona del estrato LM (e#15) hasta el hilus de la FD (e#29).

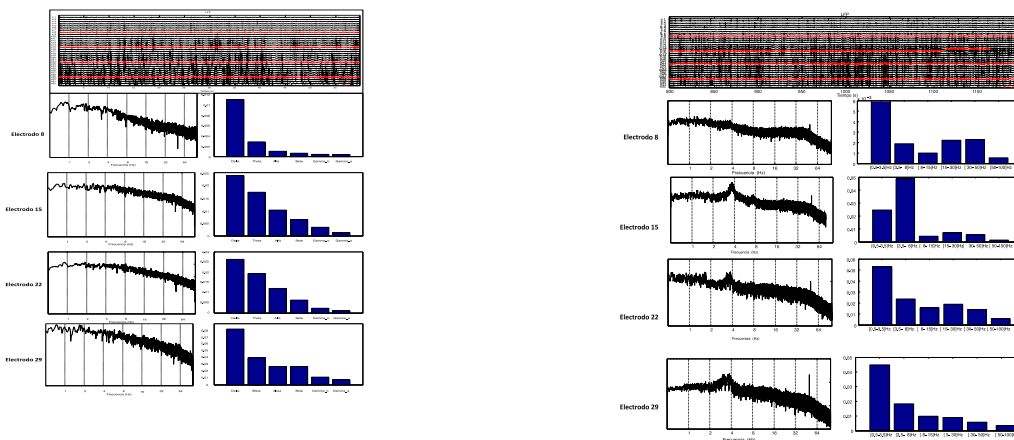


Figura 26: Espectros de frecuencias en profundidad durante actividad irregular (izdo.) y durante actividad rítmica theta (der.): registro de LFP en un solo punto. El panel superior muestra el registro del LFP completo, señalando en rojo los canales elegidos para el análisis. Cal. 5mV

Durante actividad rítmica theta, los espectros reflejan su presencia en modo de pico en aquellos sitios donde el generador presentó más potencia alrededor de la fisura hipocámpica (e#15). Además, en registros superiores se aprecia un aumento de potencia en la frecuencia 15-50 Hz (beta y gamma lento). El patrón global de los espectrogramas difiere claramente de $1/f$ en todos los casos, pero también entre distintos sitios de registro, debido a que la composición relativa de las corrientes contribuidas por cada generador varía, pues cada uno activa distintos dominios subc1ares y distintas poblaciones.

También se calcularon espectros de potencia de los distintos generadores sobre su LFP reconstruido a distintas profundidades. Como era de esperar dada la coherencia laminar intrínseca a los generadores separados mediante ACI, los

espectros mostraron un perfil laminar idéntico salvo en el valor absoluto que mostró proporcionalidad sitio-dependiente.

3.5 DISCUSION

En este capítulo se han explorado las características espacio-temporales de los generadores LFP con el objetivo de cotejarlas con las bandas de frecuencia electrográficas definidas en la literatura. Como ya se ha comentado anteriormente, estas bandas se definieron como rangos específicos por observación empírica, particularmente a partir de los EEGs registrados en superficie en el humano. Es sobradamente conocido que el EEG de superficie está contribuido fundamentalmente por las capas corticales más cercanas a la calota (Elul 1971; Gloor, 1985) y por tanto refleja actividad coordinada de neuronas en esta estructura. Evidentemente, el EEG en otras especies y estructuras tiene sus propias características y ni tan siquiera es de esperar que se ajusten a las observaciones en humanos en los inicios de la Elect

Algunas estructuras muestran un LFP con cierta dominancia de algunas frecuencias concretas sobre otras, siendo los casos más evidentes aquellos donde se desarrollan actividades oscilatorias rítmicas, como el hipocampo de roedores. En principio, una frecuencia concreta en un EEG o LFP debería reflejar una o varias de estas posibilidades relacionadas con la duración o la cadencia de los eventos sinápticos: (a) la duración característica del evento sináptico elemental que causa cada neurona de esa población en la región diana; (b) un patrón temporal de descarga estereotipado de cada célula presináptica, que ocasionaría una envolvente sináptica igualmente estereotipada en las células diana; (c) una combinación temporal estereotipada de dos o más entradas de distinto origen. Es obvio que cualquiera de estas posibilidades, a su vez tendría que competir con cualesquiera patrones irregulares o combinaciones temporales de las otras entradas sinápticas, cuya contribución concreta en un punto dado podría superarlas en energía y ocluir su presencia. En definitiva, el escenario más común a esperar es que la promediación masiva e instantánea de millares de corrientes sinápticas, de distintas duraciones, amplitudes, latencias y sitios de origen, y por tanto con contribuciones de pesos distintos a un punto

concreto de registro, resulte en un LFP/EEG de baja amplitud y escasas periodicidades. Y esta es, en realidad, la situación dominante en los registros de actividad macroscópica.

No es objetivo de este estudio explorar los mecanismos de generación de un ritmo u oscilación periódica del LFP, tales como el ritmo theta o gamma del hipocampo, que por otro lado son intuitivos, sino de explorar la posibilidad de monitorizar la actividad irregular, que siendo de menor magnitud suele quedar ocluida por la presencia de aquellos. Así, hemos podido comprobar que la separación por ACI de generadores, incluso en presencia de ritmo theta, nos permite seguir accediendo a la evolución temporal irregular (o no) de otros generadores con menor contribución en varianza relativa al LFP, tales como el de Schaffer o la VP.

Durante un LFP irregular cada banda o dominio de frecuencias analizados muestran actividad en todos los generadores sinápticos y viceversa. El hecho de que cada banda de frecuencias mantenga actividad de todos los generadores indica que su composición sigue siendo multiorigen y por tanto no permite separar cualidades o características de la señal nativa que pudieran ser útiles. Podemos concluir que las bandas de frecuencia durante actividad irregular constituyen un troceado sin fundamento biofísico de la señal analizada, de forma que cada banda contiene partes irreconocibles de la información original que no han sido seleccionadas por característica neurofisiológica relevante alguna.

También se ha comprobado que cada generador tiene una firma propia de frecuencias, lo cual indica que algunas características temporales de las listadas arriba se mantienen una vez separado de las influencias temporales de otros generadores. En cambio, estas no se pueden apreciar en el espectro de potencias del LFP nativo, lo que indica de nuevo que la mezcla de generadores puede enmascarar la estructura temporal de las señales originales. Además, los espectros de potencia varían con la posición de registro, como era de esperar por la diferente contribución de los generadores originales en cada sitio. Esta

observación llama a la precaución a la hora de interpretar los rasgos sobresalientes de un espectro de potencias, pues al ser sitio-dependientes pueden no ser homologables en diferentes estudios.

No existen bandas de frecuencias especialmente asociadas a un generador específico, salvo durante los episodios theta en el generador L-M de CA1. Este es el sitio reflejado en la literatura como de origen de tal actividad (Brankack et al 1993), pero hemos observado algunas diferencias en la eficiencia del ACI durante actividad irregular en comparación con este ritmo de gran amplitud que nos lleva a ser cautos. En concreto, el perfil espacial del generador LM sufre algunos cambios que sugieren la participación de varias entradas sinápticas en los mismos dominios subcelulares y que el ACI no puede separar eficientemente. Los cambios podrían deberse a diferencias drásticas en la descarga de las poblaciones neuronales involucradas entre los dos estados. Además, la potencia del generador LM alcanza valores muy elevados, así como su varianza relativa, lo que supone un riesgo añadido de contaminación cruzada hacia y desde otros generadores (Makarova et al, 2011).

También se ha observado un contenido diferencialmente elevado de actividad gamma en el generador Schaffer, que ha sido caracterizado por el laboratorio (Fernández-Ruiz et al 2012). Este generador tiene una varianza relativa muy baja y por este motivo la contribución de su periodicidad en esa banda es escasamente visible en el espectro y sólo se desenmascara por superposición de espectros normalizados de otros generadores. Sin embargo, tal práctica no promete estabilidad ni eficiencia pues existen brotes de actividad gamma en prácticamente todos los generadores (Makarov et al 2010).

Hemos observado una distorsión de las características espaciales de los generadores por pre-filtrado de la señal nativa. Este efecto es especialmente preocupante pues afectó a la contribución relativa de cada generador, lo que no sólo afecta la precisión del ACI, sino que está implícito en los LFPs crudos y filtrados que se utilizan asiduamente para buscar relaciones temporales con descargas unitarias en la construcción de histogramas de fase, promedios

alrededor de espigas, y otros estadísticos comunes. No sólo introduce un error considerable, sino que es heterogéneo, pues afecta diferencialmente a unos generadores sobre otros y varía con las frecuencias de corte elegidas, lo que dificulta, aún más si cabe, inferir la cuantía del sesgo cometido.

Se observaron algunas variaciones en la firma de frecuencias característica de cada generador entre estados (irregular y theta), que podrían indicar un cambio sustancial en alguna de las características temporales de descarga de las poblaciones involucradas. Hay que tener en cuenta que **Word no encontró ninguna entrada para la tabla de contenido.** las frecuencias en una envolvente poblacional sináptica captan una mezcla de características temporales unitarias y poblacionales pre y postinápticas del mismo generador, y por tanto los espectros de potencia son sensibles a sus fluctuaciones incluso para generadores aislados. Por otro lado, fue sorprendente la estabilidad de la firma del generador LM durante actividad irregular y theta, cuya potencia tras prefiltrado en esa banda aumenta enormemente como era de esperar. Esta paradoja solo se puede explicar por un efecto artefactual del pre-filtrado del LFP. Una posibilidad es que el pre-filtrado en banda theta promueve la preservación del contenido de ondas theta con cadencia rítmica (oscilatoria) sobre eventos theta aperiódicos, de tal manera que el contenido absoluto en potencia de la banda estuviera compensado en los dos patrones de actividad sin pre-filtrado, por ejemplo con presencia de ondas theta aisladas y de mayor amplitud, o fundidas temporalmente con envolventes más lentas que ocultaran su visualización durante actividad irregular. Alternativamente, la distorsión espacial produjo un simple deslizamiento del contenido theta a bandas sub-armónicas, masivamente presentes en la banda delta del generador de FD, y cuya distorsión espacial por pre-filtrado en theta muestra un bache coincidente con el pico máximo del generador LM o generador theta, lo que supone una captura de actividad que no le corresponde.

Como conclusión, este capítulo aporta datos empíricos que soportan la inferencia teórica de que las bandas de frecuencia de un LFP multisináptico son fracciones incompletas y todavía multi-origen y, por lo tanto, sus relaciones

temporales con la actividad unitaria podrían contener diversos errores. Estos errores conceptuales, en la práctica experimental se plasman en forma de ruido en la cuantificación de las observaciones, dispersión, o actividad base no específica, que dificultan el tratamiento estadístico de los datos, incrementando el índice de significación y, a menudo, impidiendo desvelar relaciones entre variables.

Finalmente queremos destacar que el uso de bandas de frecuencia no está justificado, pues la entidad funciona lo que contribuye al LFP son los generadores sinápticos, y como hemos visto, estos tienen una contribución en todas las frecuencias y variable en el tiempo.

De la aplicación de ACI al estudio de la conectividad funcional del hipocampo

4.1 INTRODUCCION

El hipocampo es una estructura en la que podemos distinguir fácilmente varias regiones bien definidas, tanto anatómica como funcionalmente. Si consideramos sólo la conectividad anatómica, se podría inferir que la información fluye siguiendo patrones fijos de rutas establecidas. Sin embargo, hoy día existen numerosas evidencias que indican que los circuitos funcionales son menos rígidos que las conexiones anatómicas, entendiéndose que la dinámica de las poblaciones neuronales que forman redes locales y las fluctuaciones en la actividad de núcleos aferentes son quienes determinan la conectividad funcional de estas redes (McCormick, 2009), dando flexibilidad a los circuitos. Esta flexibilidad implica que al silenciar alguno de los nodos, la red no pierde todas sus características ni capacidades. Como ejemplo, podemos citar el efecto de lesiones en distintas zonas del hipocampo en animales despiertos realizando diferentes tareas de memoria. Lesiones en la corteza entorrinal (Schenk y Morris, 1985; Holscher y Schmidt, 1994), la fimbria (Whishaw et al., 1995), o la FD (Jarrard et al., 1984), sólo producen pequeñas alteraciones en el aprendizaje o ejecución de tareas relacionadas con la memoria espacial, mientras que lesiones de la región CA3 causa un mayor número de errores de ejecución, pero de ninguna manera anulan las capacidades espaciales (Kesslak, 1986). Algunos autores han sugerido que la inhabilitación completa de las capacidades de aprendizaje espacial, al menos en roedores, requeriría una lesión completa tanto del hipocampo como de sus estructuras asociadas (Jarrard 1995).

Esta hipótesis es compatible con la noción más genérica de que una estructura cerebral concreta no es la responsable absoluta y única de las funciones cognitivas o comportamentales que se le atribuyen, sino que éstas residen en muchas áreas, las cuales estarían conectadas funcionalmente. En términos fisiológicos, esto significa que la actividad de un grupo o población de neuronas tendría la capacidad de influir de forma crítica en otro grupo del mismo circuito, incluso sin una vía anatómica directa. Por tanto, alteraciones en alguno de sus nodos podrían modificar la actividad de una o más poblaciones y afectar al funcionamiento de la red completa. En el presente estudio, cada componente separado de los LFPs refleja la salida global de una población presináptica que hace contacto sináptico bien con la población piramidal o con la granulosa. En esta sección presentamos los cambios que podemos observar en varias estaciones de la red hipocámpica interfiriendo específicamente en una u otra de sus entradas principales.

Para mayor flexibilidad y precisión decidimos utilizar una técnica de inactivación

reversible, que nos permita localizar y analizar funciones en el cerebro intacto sin ocasionar un daño permanente. Elegimos para ello la inyección tópica de lidocaína, un bloqueante de canales de sodio (Hille, 1966) que inhabilita transitoriamente (unos 30 minutos) la actividad de una región concreta y asegura la recuperación total de la actividad, permitiendo estudiar el papel de la región inactivada por ausencia de su actividad en el circuito.

El hipocampo es evidentemente una estructura compleja que contiene una intrincada maraña de redes locales, y que, a su vez, forma parte de sistemas conectivos o redes de largo alcance de orden superior por las que fluye información que modula mediante procesamientos que podemos equipar a operaciones lógicas. Al final de la discusión del presente capítulo hemos incluido un Apéndice en el que hemos recogido la visión anatómo-funcional preponderante en la literatura actual del hipocampo y cuyo contenido es útil tanto para introducir como para discutir los resultados del presente capítulo. Su lectura previa podría ser interesante, pero lo dejamos a discreción del lector. Con este Apéndice pretendemos dar una alternativa funcional a la descripción conectiva estándar que es más rígida y que, aun siendo necesaria, es insuficiente para entender los flujos de información y los resultados de esta Memoria.

4.2 HIPOTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis: La inactivación transitoria de una estructura o población neuronal aferente al hipocampo debe anular el generador LFP correspondiente si está presente, y en su caso, alterar la actividad de otros generadores LFP que representen actividad sináptica de subpoblaciones en relés posteriores.

Objetivos Específicos:

- a. Estudiar el efecto de la deaferentación septal, comisural o entorrinal en los generadores-LFP del hipocampo.
- b. Estudiar el efecto de la deaferentación septal, comisural o entorrinal en la tasa de descarga de unidades neuronales de las distintas poblaciones hipocámpicas.
- c. Explorar las relaciones polisinápticas existentes tras deaferentación de vías principales al hipocampo como método para revelar circuitos funcionales y las relaciones más notables entre subpoblaciones específicas.

4.3 MÉTODOS

4.3.1 Métodos experimentales

Para la descripción de animales, preparación experimental y métodos generales de estimulación y registro, ver Capítulo 2 (Sección 2.3). Igualmente, para la descripción del tratamiento de las señales y análisis comunes de datos (Potenciales provocados, ACI y AFC). El número de animales que se utilizó para el estudio de cada vía fue de 8.

N total=24

4.3.1.1 Inactivación transitoria por lidocaína.

La lidocaína se inyectó mediante unos electrodos bifuncionales de lesión y estimulación fabricados *ad hoc*. Estos consistieron en una extensión funcional de electrodos bipolares concéntricos estándar realizados a partir de una cánula de acero inoxidable de 400 μm de diámetro externo (Small Parts Inc.) que sirvió de cátodo y un hilo interno de tungsteno de 30 μm de diámetro aislado con teflón (A.M. Systems Inc.) que sobresalió de la cánula en unas 200 μm y fue pelado en sus 100 μm distales para aumentar la zona activa de estimulación. Además del hilo de tungsteno, se introdujo por el interior de la cánula de acero otra de sílice de 120 μm diámetro externo, conectada a un tubo de polietileno (P20) y éste a su vez a una jeringa (Hamilton) graduada de 5 μl . Esta cánula de sílice serviría para realizar las inyecciones en el mismo sitio donde se estimula eléctricamente, permitiendo tanto el control eléctrico como químico de una zona aferente a la de registro. Además, el electrodo de estímulo también se pudo conectar a un FET para registrar *in situ* la pérdida y recuperación de la zona inactivada. La solución de lidocaína (en NaCl 150 mM) fue inyectada hasta un máximo de 1 μl de forma gradual en un tiempo de 1 minuto.

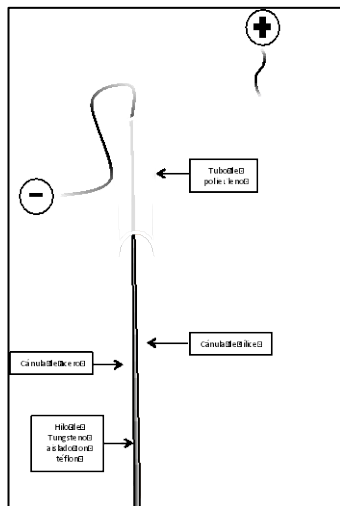


Figura 28: Esquema de un electrodo difuncional utilizado en estos experimentos para lesionar y estimular simultáneamente las regiones de interés.

Entre las ventajas del uso de técnicas reversibles están la disminución del número de animales necesarios los que además, pueden funcionar como sus propios controles; permiten réplicas; y pueden reutilizarse para inactivar otras estructuras en estudio combinado. Además, permite alcanzar zonas cerebrales más profundas y con más precisión que las técnicas irreversibles. Entre las desventajas a tener en cuenta, el tamaño del sitio de inactivación se limita a la extensión y características de solubilidad del agente inactivante, así como el tamaño de la gota de inyección, que no puede superar cierto límite para no comprometer regiones que no sean de nuestro interés o que pudieran causar efectos secundarios y podrían contaminar la interpretación de nuestros resultados. Esta técnica es preferible a la inactivación irreversible (ablación, técnicas químicas o electrolíticas), que entraña diversos problemas como efectos compensatorios o la degeneración colateral de sitios distintos al deseado, que pueden influenciar en otros sistemas y afectar los resultados de nuestras observaciones (Lomber, 1999).

4.3.1.2 Registro de espigas unitarias.

El registro de espigas fue realizado con el método de clasificación de espigas por amplificación de formas de onda (Pavlov et al., 2007)

Este método optimiza la separación de espigas en sondas lineales multielectrodos. Se utilizan tres registros de LFPs contiguos para obtener las corrientes transmembrana locales. Este procedimiento permite la cancelación efectiva de las corrientes extracelulares en paralelo al eje principal (importante fuente de contaminación para la separación de espigas) y destaca las corrientes transmembrana somáticas que contribuyen a las espigas. Luego se realiza un análisis de componentes principales sobre las espigas encontradas y se ajustan los parámetros de las formas de onda para una mejor discriminación.

Las espigas fueron clasificadas en dos subtipos: células piramidales e interneuronas, de acuerdo con la localización del sitio de registro (dentro o fuera de la capa piramidal), y con otros criterios electrofisiológicos estándar (Csicsvari et al., 1998): (1) picos máximos de las espigas (>0.4 y <0.4 ms para piramidales e interneuronas respectivamente); (2) tasa media de disparo (<1 vs >5 Hz); (3) relación con el ritmo theta (tasa de disparo disminuida para células piramidales e incrementada para interneuronas)

El número total de espigas para este estudio se ve limitada por el uso de las sondas multielectrodos lineales que necesitamos a su vez para poder realizar los mapas espaciales de los LFPs que requiere ACI.

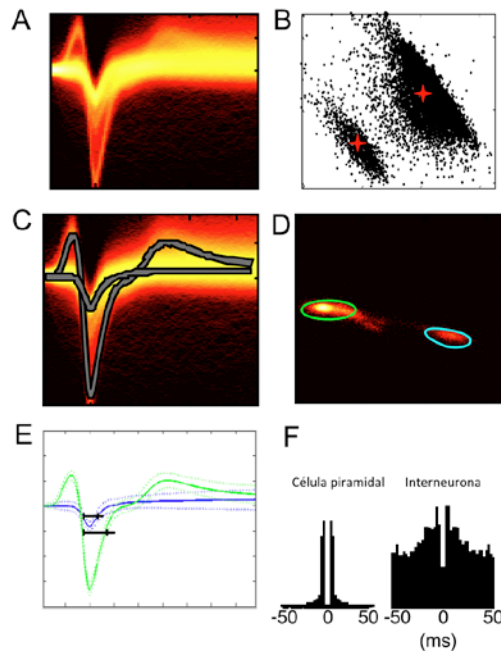


Figura 29: Registro de espigas (*sorting*) y clasificación. Las espigas se obtuvieron de los LFPs sin filtrar, registrados por tres canales contiguos (50 μm entre ellos) en las regiones de CA1/CA3 **(A)** Espigas superpuestas obtenidas de un solo registro. **(B)** Pesos espaciales en el plano de los primeros dos componentes principales. **(C)** Análisis de formas de onda **(D)** Las elipses en verde y en azul delimitan dos clusters de espigas producidas por dos células diferentes. **(F)** Autocorrelogramas de las espigas obtenidas. Las diferencias entre ambas células sugiere que una de ellas es una piramidal y la otra una interneurona.

4.3.1.3 Potencia de los generadores y envolvente temporal.

Las envolventes temporales son estimadas como variaciones instantáneas de la potencia del generador a analizar. El análisis se realiza con los mismo tiempo de análisis a los generadores del LFP.

4.5 RESULTADOS

En este capítulo presentaremos los cambios en la relación dinámica entre poblaciones de hipocampo producidos por interferencia farmacológica de vías sinápticas en uno o varios puntos de la red. Además de los generadores del LFP excitadores correspondientes a las vías de Schaffer y Perforante, presentados en el Capítulo 2 (Korovaichuk et al, 2010), aquí mostraremos resultados relativos a otras dos poblaciones. La eficacia del análisis puede observarse mediante una simple comparación visual entre periodos concretos de actividad LFP y su correlato temporal en los generadores LFP extraídos mediante ACI (Figura 30). Debido a la estabilidad espacial de los generadores sinápticos, la activación espontánea de los mismos genera brotes de actividad LFP que se

registra en el mismo grupo de electrodos contiguos en el espacio.

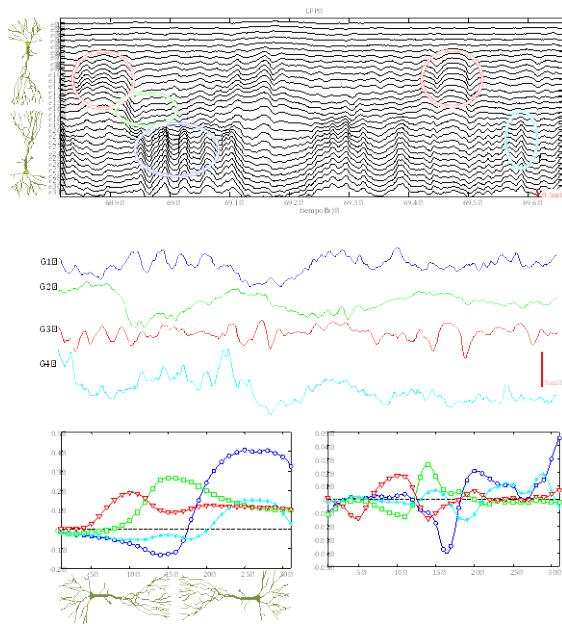


Figura 30: Los registros de LFP (panel superior) muestran zonas de actividad delimitadas por grupos de electrodos contiguos en el espacio (en vertical). Para determinar a qué poblaciones presinápticas pertenecen las entradas que provocan los distintos brotes de actividad LFP en estratos diferentes utilizamos el ACI. En el segmento de la figura, el ACI muestra 4 generadores significativos del LFP, cada uno con su actividad específica en el tiempo (panel central). Cuando los brotes espontáneos de actividad en una vía concreta están suficientemente aislados, se pueden identificar con claridad incluso en los registros del LFP nativo (círculos). Además, el ACI proporciona la distribución espacial de pesos para cada generador (panel inferior, izquierda) a partir del cual podemos extraer la distribución de corrientes transmembrana (panel inferior, derecha).

Los generadores principales cuya actividad describiremos a lo largo de este capítulo son: **G1** o GCsom, que corresponde a un generador en la región de la FD (azul oscuro); **G2** o L-M que corresponde a un generador en el estrato lacunoso-molecular de la región de CA1 (verde); **G3** o Schaffer (rojo); y **G4** o VP.

Durante y después de la inactivación transitoria de cada vía aferente estudiada se analizaron segmentos de LFP de duración equiparable a los controles. Siempre se encontraron los mismos generadores LFP (identificados por su distribución espacial característica), si bien su patrón temporal sufrió los cambios que se describen a continuación.

4.5.1. Inactivación transitoria de la región CA3 contralateral

4.5.1.1 Potenciales provocados

La región CA3 realiza contacto sináptico con la región CA1 ipsilateral vía colaterales de Schaffer, y con las regiones CA1 y CA3 del hipocampo contralateral a través de la comisura anterior. La inactivación reversible de la región CA3 contralateral al registro por inyección de lidocaína provocó la desaparición total y selectiva de los potenciales provocados por activación eléctrica de la comisura (ver Figura 31). Nótese la permanencia de los provocados por estimulación en la vía Schaffer ipsilateral.

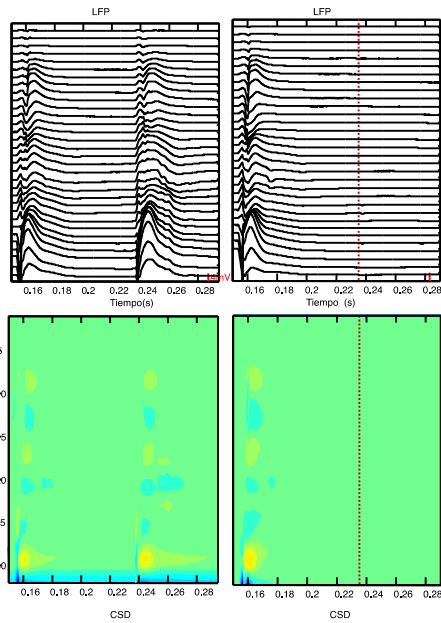


Figura 31: Pares de pulsos de estimulación en las regiones CA3 ipsi- y contralateral, sucesivamente, mostrando los potenciales provocados de Schaffer (ipsilateral) y comisural (contralateral). Los paneles superiores muestran los potenciales provocados registrados en profundidad a lo largo de la región CA1 y FD/CA3 en situación control (izquierda) y durante la inactivación de la región CA3 contralateral (derecha). Nótese la desaparición selectiva del segundo durante lidocaína contralateral. En los paneles inferiores se muestra el AFC correspondiente a estos registros. La línea roja indica el instante de estimulación comisural (el artefacto fue eliminado para evitar interferencias en el análisis). Cal. Vertical: 4mV.

4.5.1.2 Actividad LFP y sus generador

La inyección de lidocaína en la región CA3 contralateral al registro causó una disminución visible de la actividad LFP en la región del estrato radiado (Figura 32).

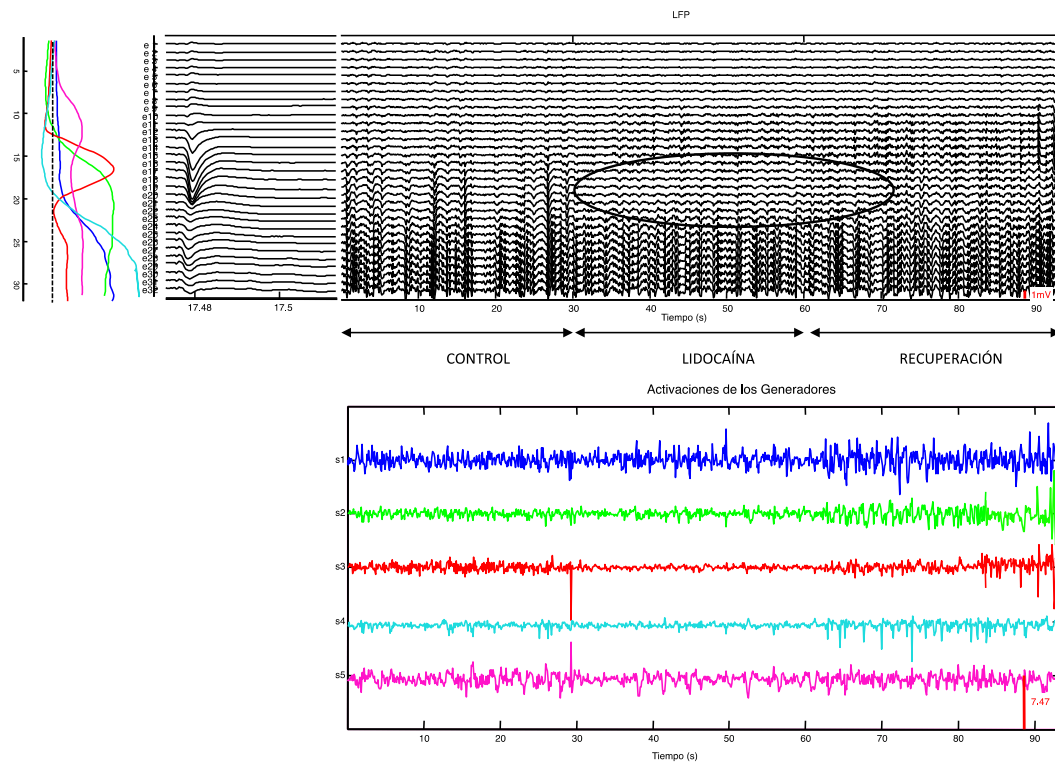


Figura 32: Inactivación temporal de la CA3 contralateral. En esta figura observamos los 4 generadores principales (G1-G4), y además un 5 generador con actividad en CA1 el cual pensamos sería un generador perisomático probablemente de naturaleza inhibitora (G5) En el panel central de arriba mostramos un segmento de un potencial provocado en la CA3 contralateral como control y para poder mostrar espacialmente la ubicación de la lesión. En los LFP remarcamos la zona con una disminución de la actividad (círculo negro), la cual coincide con el estrato radiado. Debajo vemos la actividad de los generadores en el tiempo.

El análisis ACI revela cambios en todos los generadores LFP durante el período de inactivación de esta vía.

Para poder dimensionar los cambios de actividad se analizaron las potencias de los generadores en el sitio de máxima potencia en el LFP reconstruido, específico de cada generador, y se representó en el tiempo como una envolvente temporal (Figura 33).

En el G1 (GCCom) vemos una aparición de eventos rápidos luego durante el periodo de inactivación temporal. G2 L-M, G3 Sch y G4 VP disminuyen su actividad y G5 la aumenta.

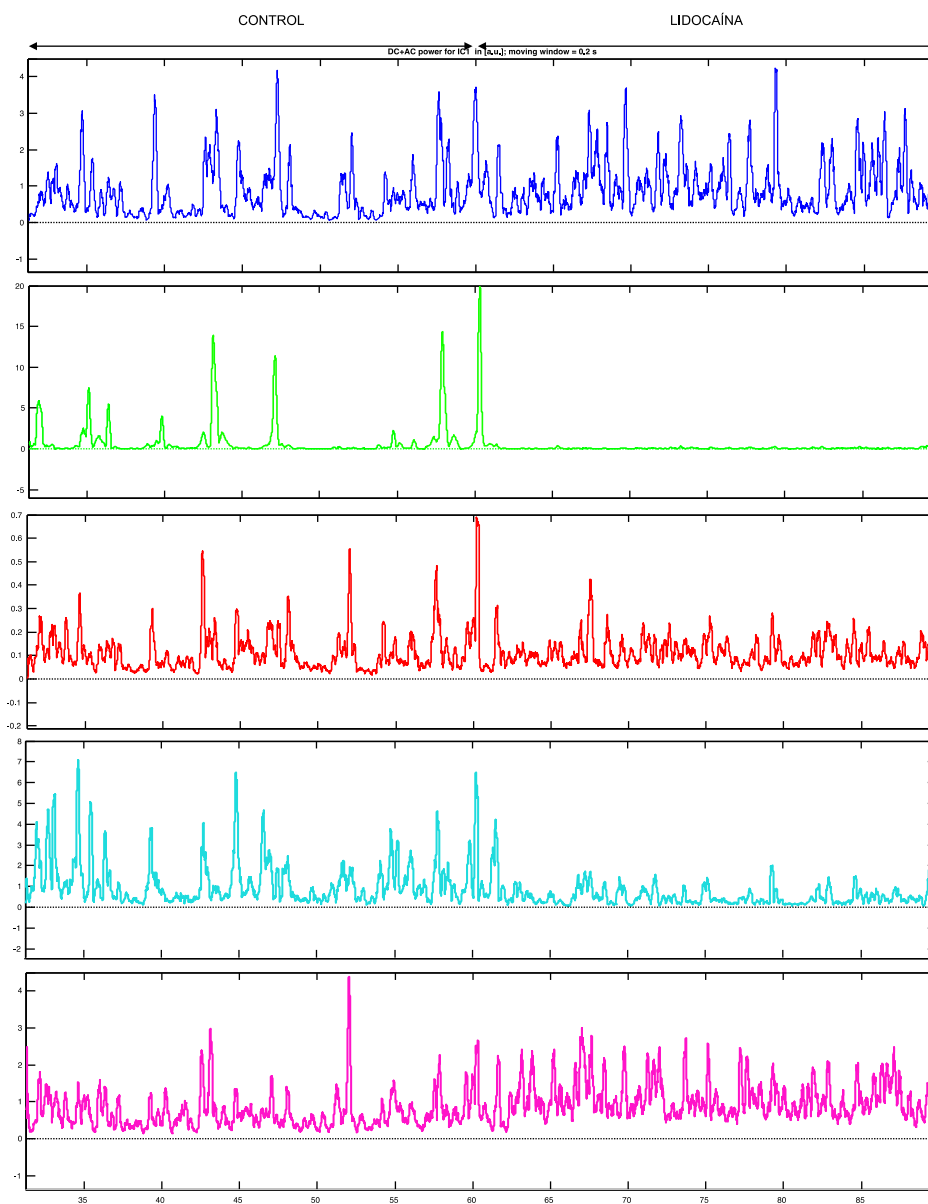


Figura 33: Experimento ilustrativo de la evolución de la potencia de los generadores LFP hipocámpicos antes y durante inactivación por lidocaína de la región CA3 contralateral. Se respetan los colores para mostrar cada uno de los generadores mencionados.

4.5.1.3 Cambios en la tasa de descarga de neuronas individuales

La inactivación de la región CA3 contralateral al hipocampo de registro también produjo cambios evidentes en las descargas unitarias de neuronas individuales, registradas con los mismos electrodos que el LFP. Se analizaron trenes de espigas de unidades que se mantuvieron durante el tiempo suficiente (30 minutos) para comparar su tasa de descarga antes y durante la lesión. La localización de las unidades en diferentes estratos fue posible gracias a la morfología característica de los perfiles en profundidad de los potenciales provocados, así como de las curvas de pesos espacial de los distintos generadores LFP, que proporcionaron referencias espaciales conocidas. La mayor parte de las unidades registradas se encontró fuera de las capas de células principales, indicando que pertenecen a interneuronas con el soma en el estrato correspondiente.

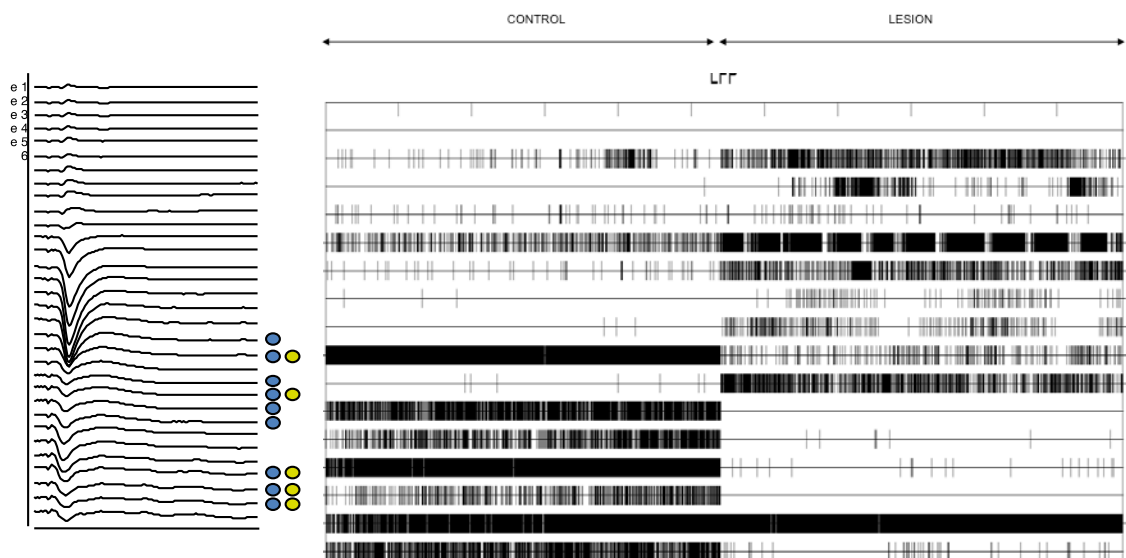


Figura 34: Registro en CA1/CA3. A la derecha hemos colocado un potencial provocado del mismo registro para ubicar las descargas de trenes de espigas espacialmente. Cada círculo representa una neurona individual, los colores diferentes significan dos neuronas distintas registradas en el mismo electrodo. Puede observarse que solo pudimos ver descargas en el estrato lacunoso moleculare y en CA3. Ninguna de esas correspondían a células principales.

Los estratos donde se encontraron mayor número de unidades con patrón alterado durante la inactivación contralateral fueron el estrato lacunoso-moleculare de la región CA1 (coincidentemente con la disminución del G2 LM), así como unidades dispersas en la región de CA3/FD/hilus. En neuronas identificadas electrofisiológicamente como células piramidales registradas en las capas somáticas de CA1 y CA3 no observamos cambios notables en su tasa de disparo.

4.5.2. Inactivación transitoria de la Vía Perforante

4.5.2.1 Potenciales provocados

Al igual que con la vía comisural, la inactivación reversible de la vía perforante provoca la desaparición total de los potenciales provocados generados por estimulación de esta vía en el haz angular, así como de las corrientes sinápticas correspondientes en los mapas espaciotemporales de corriente obtenidos por AFC. (Figura 35). Al igual que en el caso anterior, la desaparición selectiva del potencial provocado por el haz angular asegura la inhabilitación de la aferencia espontánea desde la corteza entorrinal. Como control de selectividad de la inactivación por lidocaína se activó la vía de Schaffer (ipsilateral).

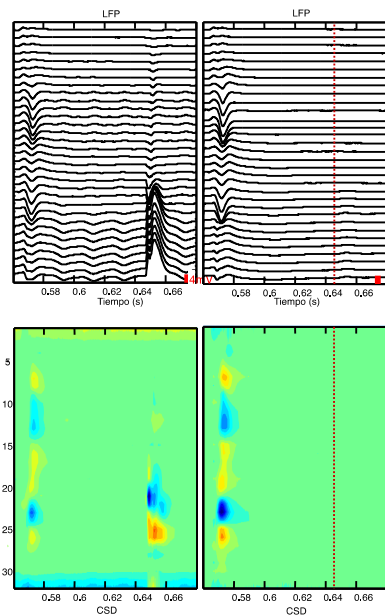


Figura 35: Pares de pulsos mostrando los potenciales provocados por las Vías de Schaffer y Perforante (ambos ipsilateral). Los paneles superiores muestran los registros en profundidad a lo largo de la región CA1 y FD/CA3 en situación control (izquierda) y durante la inactivación del haz angular con lidocaína (derecha). Nótese la desaparición selectiva del segundo. En los paneles inferiores se muestra el AFC correspondiente a estos registros. La línea roja indica el instante de estimulación comisural (el artefacto fue eliminado para evitar interferencias en el análisis). Cal. Vertical: 4mV.

4.5.2.2 Actividad LFP y sus generadores

La inyección de lidocaína en la región de la zona pre-subicular por donde circulan las fibras de la VP que forman el haz angular procedentes de la corteza entorrinal causó una disminución visible de la actividad LFP en la región de la FD (Figura 36).

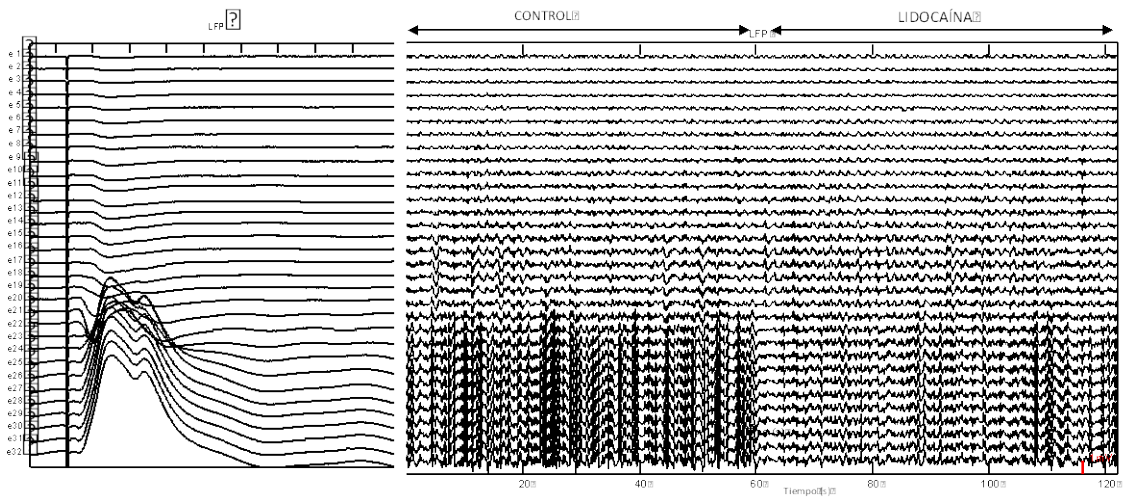


Figura 36: Inactivación temporal de la Vía Perforante. En el panel de la izquierda se muestra un registro de un potencial provocado en esta vía. A la derecha se muestra un segmento de LFP antes y durante la inactivación. Obsérvese la disminución específica de actividad LFP en la zona de la FD.

Como se puede apreciar en los registros de LFP crudo, la disminución de actividad no fue completa. Analizando los mismos mediante ACI pudimos comprobar en todos los casos ($n= 8$ animales) una disminución significativa de actividad en uno sólo de los generadores LFP habituales de la FD (Figura 37)

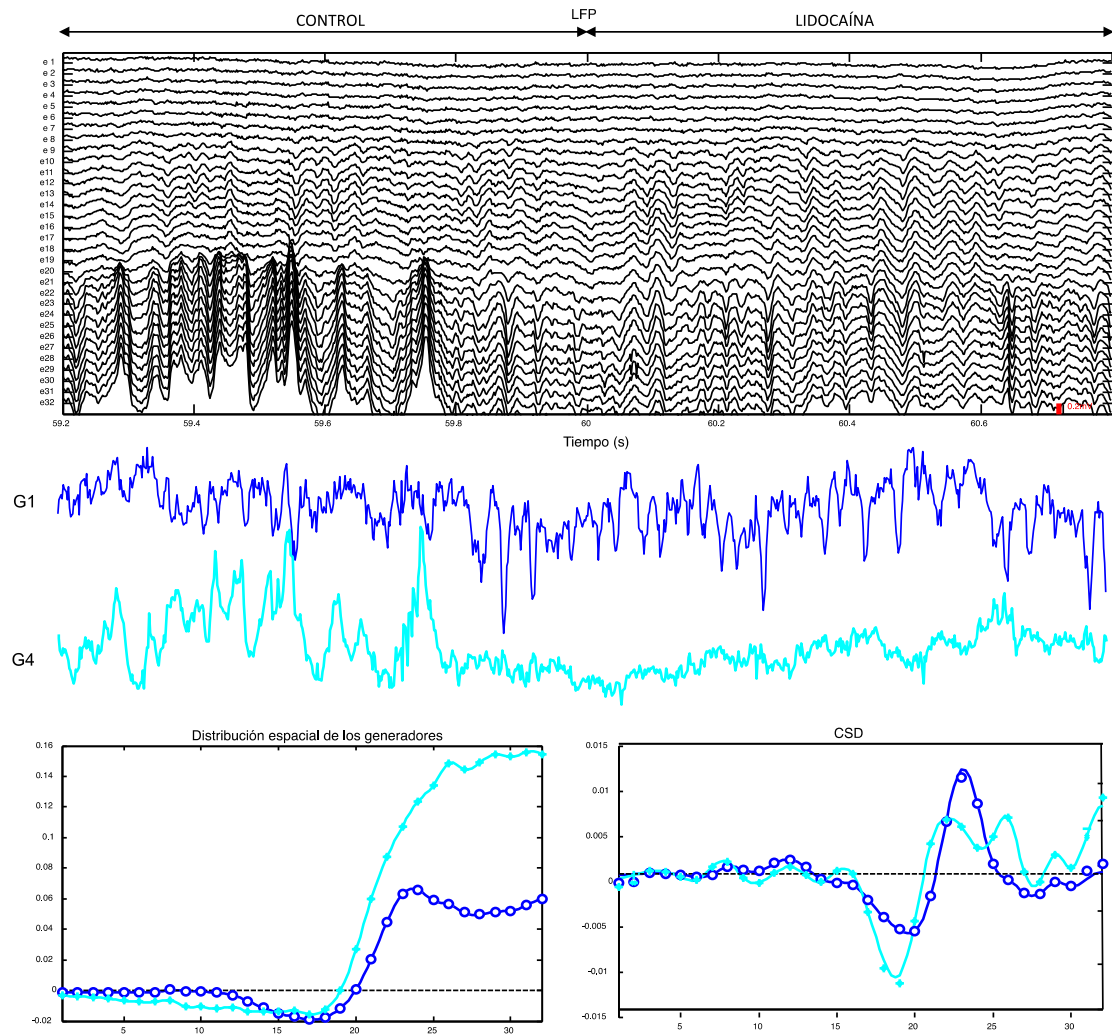


Figura 37: Segmento del LFP de 1.6 segundos, donde se ve una ampliación de la lesión en la FD. La actividad de los dos generadores principales de la región (G1-G4) muestran cambios, pero sólo el que corresponde a la vía perforante una notable disminución en su actividad. La distribución de pesos espaciales muestra curvas muy parecidas, pero ACI consigue separarlos como dos fuentes de actividad diferentes. Calibración 0.2mV

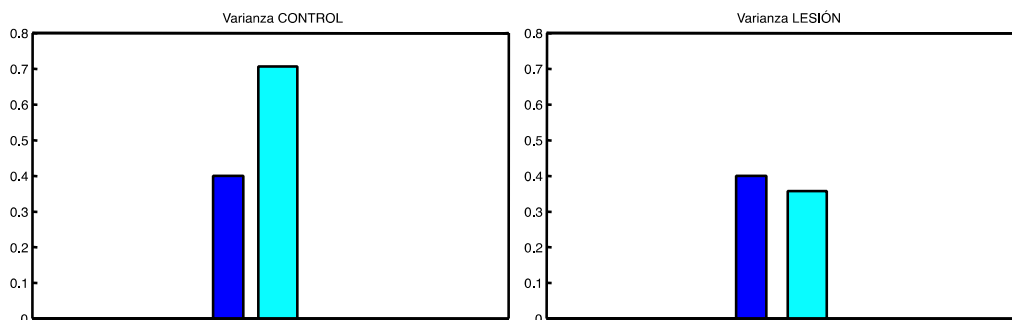


Figura 38: Varianzas relativas de los dos generadores de la FD analizados mas arriba. Varianza relativa de G1 previo a la inactivación 0,4 la cual se mantiene durante la lesión. En cambio el G4 VP disminuye de 0,7 en el período previo a 0,38 en el periodo de inactivación.

Por las curvas de pesos espaciales (Figura x), así como por la captura selectiva del potencial provocado por la VP (Capítulo 2), se pudo identificar el generador LFP excitador correspondiente a esta vía (G4, en azul claro) que resultó ser el único de la región CA3/FD que sufrió una disminución, mientras que otro generador de gran potencia que presentó fuentes activas en la zona granular (G1, azul oscuro) (Fernández-Ruiz, et al, datos no publicados) mantuvo un nivel de fluctuación temporal similar y elevado. En el segmento ampliado en la Figura 37 puede apreciarse la desaparición de los brotes de actividad característicos de la VP (azul claro), que adoptó un perfil mucho más plano, mientras que el generador G1 mostró un cambio de patrón en el que se observan fluctuaciones incluso más marcadas que antes de la inhabilitación de la VP. El histograma de las varianzas relativas (Figura 38) muestra cuantitativamente el efecto de la lidocaína (n= 8). Obsérvese que la varianza de la VP no se anula por completo, como cabría esperar de una inactivación total, posiblemente debido a la cobertura parcial de la droga en el extenso abanico formado por el haz angular. La alteración concomitante de un generador LFP distinto del de la vía lesionada estaría presumiblemente relacionado con la desorganización funcional de las redes locales en la FD provocada por la inactivación de la entrada primaria desde la corteza entorrinal.

4.5.2.3 Cambios en la tasa de descarga de neuronas individuales

La inactivación de la VP por lidocaína también produjo cambios notables en la tasa de disparo de unidades, igualmente en su mayoría clasificables como interneuronas por su posición de registro fuera de las capas de somas piramidal y granulosa. En este caso, el cambio más notable se observó en unidades registradas en la región de la FD, que en promedio, incrementaron notablemente su tasa de disparo. La falta de especificación del subtipo neuronal concreto no permite realizar un análisis más detallado por el momento.

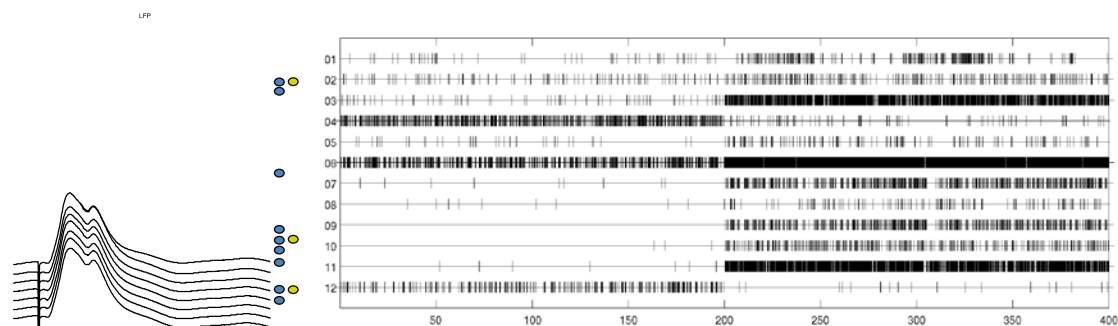


Figura 39: Potencial provocado por la Vía Perforante (panel izdo.) que sirve como referencia espacial para mostrar la ubicación de los trenes de espigas registrados.

4.5.3 Inactivación de la región septal

En este caso, no disponemos de un potencial provocado específico suficientemente estudiado que podamos utilizar como control de la extensión de la inactivación. Sin embargo, algunos núcleos de esta región, como el septum medial y la banda diagonal de Broca, son muy bien conocidos como marcapaso generador del ritmo theta hipocámpico provocado por estimulación sensorial (Pestche et al., 1962; Herreras et al 1988a,b), cuya presencia/ausencia pudimos utilizar a modo de control mediante un leve pinzamiento en la cola del animal.

4.5.3.1 Abolición del ritmo theta hipocámpico

La expresión de este ritmo de hipocampo depende de la proporción de células del NS/BDB involucradas en el proceso oscilatorio (Vinogradova, 1995), de tal forma que las lesiones en esta región provocan su desaparición, tanto en la región CA1 como en la FD, e impiden que pueda ser provocado (Andersen et al, 1979; Gray, 1971). En nuestros experimentos, la inyección de lidocaína causó el efecto esperado e impidió la generación de ritmo theta por estimulación sensorial, lo que constituyó nuestro control de de-aferentación transitoria septo-hipocámpico, incluyendo las fibras directas procedentes del tronco que cursan por esa región.

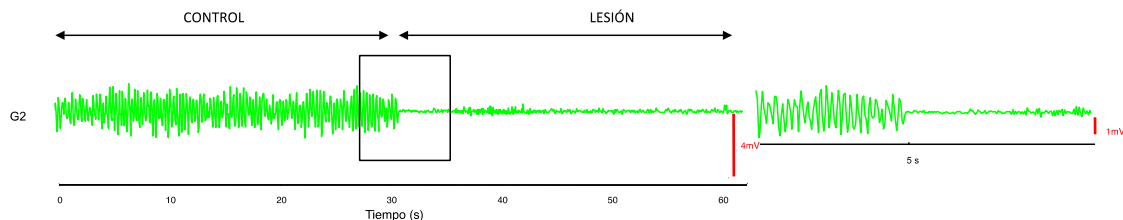


Figura 40: Actividad del G2 antes y durante la inactivación septal por lidocaína. El G2 es un generador LFP localizado en el estrato lacunoso-moleculare de la región CA1, en el cual se observa el ritmo theta cuando está presente. Pude apreciarse su supresión durante la inactivación de la región septal.

4.5.3.2 Actividad LFP y sus generadores

El cambio principal de la actividad LFP que pudimos observar tras inactivar la región septal fueron se localizó preferentemente en la región CA1 (Figura 41).



Figura 41: Inactivación temporal del NS/BDB. En el LFP se ve la lesión restringida a la región de CA1. El generador de la FD (G1) no se ve afectado en su actividad, tampoco el de la vía perforante (G4) Si se ven afectados los generadores de Schaffer (G3) y el del estrato lacunoso moleculare (G2)

Tras realizar el pertinente ACI a segmentos de LFP registrados antes y durante la inactivación septal, no se preció una disminución en los generadores locales de la FD ni el de la VP, pero pudimos apreciar una disminución casi completa de actividad en el generador Schaffer y en el correspondiente al estrato lacunoso-moleculare de CA1. En algunos animales la abolición fue tal que ni tan siquiera ACI pudo reflejar su mera presencia, o bien tuvo una apariencia temporal desorganizada o que reflejó contaminación con la actividad de otros generadores. Este es un caso frecuente cundo los generadores disminuyen su aporte al LFP total (Makarova et al., 2011).

4.5.3.3 Cambios en las descargas de neuronas individuales

La inactivación de la región septal por lidocaína igualmente produjo cambios notables en la tasa de disparo de unidades hipocámpicas. Los cambios más destacables fueron una disminución en la descarga de neuronas piramidales de CA3 y en algunas interneuronas del estrato radiado de la región CA1, y un aumento de la descarga de interneuronas de las regiones de CA1 y CA3/hilus.

Figura 42: Descarga de neuronas individuales tras la inactivación de la región septal.

4.6 DISCUSIÓN

Para poder responder a preguntas tan directas y habituales como, por ejemplo, cuáles son las funciones superiores en las que está implicado el hipocampo, primero debemos admitir, para evitar conclusiones precipitadas, que es una pieza computacional compleja y sofisticada. La información que fluye a través de las subregiones del hipocampo no es fácil de inferir de su conectividad anatómica, como era costumbre cuando ésta era la única información disponible. Es más, el refinamiento de las técnicas histológicas ha permitido describir conexiones menores que constituyen asociaciones directas e indirectas entre y dentro de cada una de sus subregiones, así como de sus conexiones aferentes más conocidas, lo cual plantea interesantes alternativas a la visión clásica de flujo lineal a través del denominado circuito trisináptico excitador formado por las tres principales tipos de células, granos de la FD y piramidales de CA3 y CA1, respectivamente (Andersen et al 1971). Un estudio funcional completo sería extremadamente complejo y requeriría una observación simultánea de todas las subpoblaciones que conforman los distintos nodos y subnodos (redes locales) durante la ejecución de todas las tareas en las que está involucrado, lo cual, por el momento está fuera del alcance de las técnicas actuales. Inactivar las aferencias cuantitativamente más importantes al hipocampo nos ha permitido aislarlo funcionalmente de vías de entrada de información y cuantificar, aunque

sea de forma transitoria y fuera de contexto comportamental, su aporte global, permitiendo inferir algunos aspectos de su participación en la transmisión entre nodos.

Los procedimientos de inactivación interrumpen la asociación y la contribución de una zona al procesamiento global de muchos elementos neuronales, como en los casos aquí señalados donde una interrupción de la entrada CA3 contralateral afecta principalmente a las redes inhibitorias, disminuyendo, en la mayoría de los casos, la tasa de descarga. De las interneuronas descritas hasta el momento (Somogyi y Klausberger, 2005) sólo las denominadas células neurogliales y las células asociadas a la VP presentan sus somas en el estrato L-M. Comoquiera que la entrada contralateral de CA3 no coincide con este estrato, un cambio en su tasa de descarga no correspondería a una interacción directa. A esta zona llegan aferencias desde el tálamo y la corteza entorrinal, por lo que cabría la posibilidad de una acción indirecta relacionada con una interrupción más global del flujo en sistemas extrahipocámpicos causado por la disfunción de la CA3 contralateral, por ejemplo, de la entrada glutamatérgica desde tálamo a CA1. Por otro lado, la mayor disminución y posterior recuperación de disparos ha sido en la zona de CA3/FD, donde las interneuronas del estrato lúcido de CA3 reciben aferencias excitatorias tanto de los granos a través de las fibras musgosas como de los colaterales recurrentes de CA3, formando una red muy interconectada (Toth y McBain, 1998; McBain y Fisahn, 2001; Henze et al., 2002)

Por otro lado, también hemos observado una importante disminución de la actividad causada por la inactivación de la CA3 contralateral en dos generadores LFP en los cuales, *a priori*, no esperaríamos una reducción tan evidente basándonos en la conectividad anatómica, como son el generador del estrato L-M y el generador de la VP (contralateral a la lesión). Esto nos lleva a pensar que dos vías de procesamiento aparentemente distantes podrían tener una relación funcional más estrecha de la que se puede inferir anatómicamente. Una posible explicación sería a través de una interacción indirecta que requeriría una perturbación previa en la actividad de los núcleos septales, que reciben, en su núcleo lateral, entrada desde la región CA3, y cuya inactivación también causa cambios en ambos generadores, LM y VP.

La inactivación de la VP genera la pérdida del potencial provocado por esta vía así como el de su actividad espontánea reflejada en el generador VP, cumpliendo las expectativas del diseño experimental. Trabajos previos han reportado que la lesión de la corteza entorrinal, estructura de origen de la VP, ocasionan actividad LFP anormal y persistente en animales despiertos (Suzuki y Smith 1988). Nuestra principal observación

indica que el origen de tales anomalías sería una consecuencia multisináptica centrada en redes locales inhibitorias de la FD, puesto que la alteración más notable es un cambio del patrón temporal en el generador GCsom. Este componente del LFP fue identificado en trabajos paralelos del laboratorio (Benito et al 2012) como originado en una red inhibitoria con diana sináptica en los somas de las células granulosas, presumiblemente originado en células tipo básquet. En el trabajo citado (Suzuki y Smith, 1988) también observaron una disminución en la tasa de descarga de interneuronas ubicadas en el estrato radiado que no hemos podido refrendar en el presente estudio. Sí en cambio encontramos una modulación de las interneuronas locales y neuronas principales de la región de CA3, consistente en un aumento en la tasa de descargas. No tenemos una explicación definitiva de tal discrepancia y tan sólo podemos atribuirle a diferencias en la especificidad de la lesión, que en nuestro caso sólo afecta a la entrada de la VP al hipocampo, pero no altera directamente la fisiología de la propia corteza entorrinal. La lesión de ésta puede ocasionar modulaciones polisinápticas más complejas e indirectas.

Finalmente, la inactivación de los núcleos septales y sistemas retículo-ascendentes de paso ocasiona una disminución marcada de la actividad LFP específicamente en la región CA1, que se refleja claramente en la disminución de la potencia de los generadores de esta región, el de Schaffer y el de LM. En principio, el resultado parecería estar en contraposición con la regionalización de la proyección septo-hipocámpica, cuyas aferencias estarían más concentradas en la región de CA3/FD (Swanson y Cowan, 1979). En realidad, no hay paradoja pues el origen presináptico del generador LFP de Schaffer es precisamente la región de CA3. En cuanto al espectacular efecto sobre el generador LM, no ha supuesto sorpresa, por ser éste el generador LFP que despliega actividad rítmica theta, cuyo marcapasos reside en los núcleos septales. En cuanto a si es una acción directa o indirecta, tan sólo podemos especular. Si el origen de las corrientes extracelulares que subyacen a la presencia de ritmo theta es mixto, excitador e inhibitorio, como aseveran en su completo análisis Branckack et al., (1993), entonces cabe admitir una acción indirecta, quizá a través de la corteza entorrinal. Sin embargo el origen de este ritmo, tan estudiado como disperso en mecanismos y postulados, no tiene porqué estar indefectiblemente ligado al del generador LM aquí estudiado, pues en su presencia hemos observado cambios en la distribución espacial de pesos asociada a este generador que nos hace pensar en la entrada o salida de una contribución sináptica en relación a las presentes durante actividad irregular. En trabajos paralelos del laboratorio (Benito et al 2012) han confirmado que este es el único generador LFP del hipocampo con contribución mixta de al menos dos poblaciones presinápticas que el ACI no puede separar en situación control,

por lo que en aras de incrementar la confusión ya existente, creemos más positivo no añadir más especulación en tanto en cuanto no se resuelvan las distintas contribuciones. Por otro lado, cualquier modificación en la funcionalidad del septum medial alteraría la entrada colinérgica al hipocampo ocasionando disfuncionalidades conductuales y de plasticidad muy importantes (Hasselmo et al., 1995; Rogers y Kesner, 2003), así como una disminución de la respuesta de hipocampo a las entradas ambientales (Vinogradova et al., 1996). La presente contribución mediante descomposición de LFPs en sus generadores parece indicar que, al menos en parte, el origen de estas disfunciones parece estar en una quiescencia de la región CA1 producido por alteración severa de varias de sus aferencias directas e indirectas.

Poder separar los componentes del LFP específicos de cada vía nos ha permitido estudiar cómo se modifica la actividad en diferentes segmentos de la red del hipocampo y sus estructuras asociadas de una manera mucho menos obvia que la que cabría esperar tras inactivación de poblaciones presinápticas concretas. Así, hemos observado alteraciones en poblaciones que constituyen estaciones posteriores a la directamente deaferentada, permitiendo monitorizar la influencia global de una población en la transferencia de la información a lo largo de distintos relés. Es claro que la posibilidad de descomponer el LFP hipocámpico en la contribución de vías específicas que portan información de diversas subpoblaciones neuronales extrínsecas y locales nos proporciona una herramienta y una nueva visión para el estudio de dinámica poblacional en circuitos complejos.

4.7 Apéndice I: Visión anatómico-computacional del hipocampo

El hipocampo es una estructura bilateral que forma la arquicorteza de mamíferos y procesa información procedente de diversas áreas y modalidades sensoriales. Anatómicamente, recibe tres aferencias principales. La mayor de ellas proviene de la corteza entorrinal por la VP, otra llega desde la región CA3 del hipocampo contralateral por la vía comisural y la tercera desde el complejo septum medial/banda diagonal de Broca (Figura).

4.7.1 La región CA3: un comparador lógico

Con el fin de promover una visión de la importancia de la red más allá de la de la simple estructura, es de gran utilidad el compendio realizado por Olga Vinogradova en su

última revisión (2001). Define al hipocampo como un sistema comparador constituido por dos grandes subsistemas circulares. Al primero de ellos lo denomina **circuito regulatorio**, que conecta el hipocampo (especialmente el área CA3) a estructuras del tallo cerebral a través del *núcleo septal*. Este subsistema introduce en la región CA3 información primaria acerca de los cambios que ocurren en un ambiente relativamente estable, y además controlaría el nivel general de actividad. La influencia excitadora de la *formación reticular* es necesaria para la respuesta de orientación del animal, permitiendo un procesamiento efectivo y ayudando a fijar la información en la corteza. Su supresión por el hipocampo, a través de un núcleo intermediario como el *rafe medial*, es necesaria para la interrupción atencional requerida al cambiar de estímulo.

El otro subsistema, conectado principalmente a través de la región CA1, introduce al hipocampo señales que sufrieron un procesamiento previo en la corteza y tras complejas transformaciones adicionales por sus múltiples relés retorna a la misma. Podríamos considerarlo como **circuito informativo**, debido a que las respuestas neuronales conservan las características cualitativas del estímulo. Este presenta una dinámica de incremento en la respuesta, que es más lenta cuanto más lejos de CA1 se encuentre el relé. Esto nos permite considerar a las estructuras del *circuito límbico* principal como una cadena de integradores conectados sucesivamente, en los cuales el nexa siguiente se vuelve más activo sólo después de que la señal sea formada en el nodo precedente y con una línea de retraso que previene la fijación rígida de señales espurias de baja probabilidad. Visto así, ayudaría a obtener una mejor organización del almacenamiento de la memoria a largo plazo.

Ambos subsistemas conectan a través de la región CA3, que podría considerarse un elemento comparador porque, como zona donde convergen las entradas del tallo cerebral y de la corteza, detectaría la novedad del estímulo en caso de no encontrar su rastro en el sistema de memoria. Las señales, antes de entrar a la región CA3, han sido procesadas previamente en estructuras previas: Núcleo septal/Banda Diagonal de Broca (NS/BDB) y Fascia Dentada (FD). Las neuronas del NS/BDB, con sus dendritas muy distribuidas, podrían sumar y mezclar las señales ascendentes desde el tallo cerebral. Por su parte, la VP, que introduce la información desde la corteza entorrinal, contacta con las células granulosas del GD y éstas a su vez, por las fibras musgosas, con las neuronas piramidales de la CA3, lo que permite considerar al GD como una estructura de procesamiento previo de la información cortical hacia CA3. En definitiva, la región CA3 desempeñaría una importante función de detección de coincidencia/divergencia del peso de la señal

(presencia y nivel) en estas dos entradas, además de las características concretas del estímulo entrante.

Los axones de proyección de las células piramidales de esta región distribuyen las fibras tanto dentro del hipocampo ipsilateral como del contralateral, conocidas estas últimas como **proyecciones comisurales**. Además de las conexiones funcionales descritas por Vinogradova, las células piramidales de CA3 proyectan prácticamente a todas las áreas del hipocampo, incluyendo a sí mismas formando un extenso circuito recurrente (Blackstad, 1956; Ishizuka, 1990), y subcorticalmente comunican, además, con el núcleo septal lateral. La interrupción de la entrada comisural en cualquiera de los dos hipocampos podría, en principio, alterar la actividad en la estructura completa, o al menos en varias regiones de la misma.

4.7.2 El Núcleo septal/Banda Diagonal de Broca: La entrada de información nueva

El complejo NSM/BDB contiene principalmente neuronas GABAérgicas y colinérgicas que proyectan hacia el hipocampo (Kölher et al. 1984; Amaral y Kurz 1985; Onteniente et al. 1986). Los aferentes del septum medial se concentran en la FD y en CA3, y son mucho más escasos en CA1. Las aferencias colinérgicas inervan principalmente células piramidales y granulosas, pero se han visto además en algunas células que probablemente serían clasificadas hoy día como interneuronas (Frotscher y Léránth, 1985). De hecho, Herreras et al (1988b) mostraron que la llegada septal colinérgica a la región CA1 tiene como diana redes locales inhibitorias, habilitando un sistema de inhibición septo-hipocámpico. Más tarde, Smythe et al. (1992) mostraron también conexión septal GABAérgica con interneuronas hipocámpicas, que habilitaría un mecanismo opuesto de desinhibición. Esta estructura permite por tanto un control completo de distintas regiones del hipocampo, aún no aclarado. Los estudios mediante lesiones reversibles en esta estructura han mostrado que la denervación septal altera la tasa espontánea de disparo de las células granulosas, de células del hilus/CA3 y de interneuronas tipo basket en CA1 (Mizumori et al, 1989). Es bien conocido que las neuronas de esta región tienen un tipo de disparo rítmico esencial para la generación del ritmo theta de hipocampo, y que lesiones en esta zona normalmente lo suprimen (Petsche et al. 1962; Rawling et al. 1979; Buzsaki et al. 1983). Bajo las condiciones de anestesia profunda con uretano en las que nosotros trabajamos, sólo se observa un ritmo theta que es farmacológicamente atropin-sensible, o de tipo 2. Lesiones selectivas del sistema septal colinérgico sólo parecen reducir su amplitud y potencia, pero no su frecuencia (Bassant et

al. 1995; Jenkins et al. 1993; Lee et al. 1994). No sucede lo mismo al lesionar el sistema GABAérgico (Lee et al., 1994), lo que indicaría una participación esencial de esta conexión.

Considerando la compleja implicación del septum en cada una de las regiones del hipocampo, una inactivación temporal podría causar un gran número de efectos indirectos difíciles de predecir.

4.7.3 La corteza entorrinal

La corteza entorrinal es otro de los aferentes más importantes al hipocampo al que introduce información por medio de la Vía Perforante. Esta estructura, ordenada en varias capas (I-VI), proyecta en varios subsistemas paralelos a los distintos relés del hipocampo. Las células de la capa II proyectan a la FD y CA3, mientras que las de capa III lo hacen a CA1 y subículo (Witter y Amaral, 1991). A pesar de la evidencia anatómica de esta proyección monosináptica a CA3 y CA1, sus correlatos electrofisiológicos son más complejos. Herreras et al (1988c) describieron una modulación muy diferente en la descarga mono y trisináptica de la región CA1 que sugiere una funcionalidad distinta de ambas entradas. Yeckel y Berger (1990) han descrito resultados muy sugerentes estimulando axones de neuronas de la CE *in vivo* y registrando respuestas de neuronas individuales así como de espigas poblacionales en las distintas regiones hipocámpicas, para determinar si la activación piramidal se produce por vía mono o trisináptica. Entre resultados funcionales esperables, como una secuencia de excitación monosináptica seguida por otra más débil a través de la vía trisináptica, describen otros más llamativos como una respuesta simultánea de neuronas en las tres regiones ante entrada de una subpoblación de la CE. También vieron respuestas que indican vías funcionales que cortocircuitan los relés clásicos del hipocámpico, como neuronas de CA3 que descargan antes que los granos o excitación de células piramidales de CA3 y CA1 en ausencia de excitación de los granos. Globalmente estos resultados son cuando menos argumento para admitir una conceptualización diferente de la organización funcional del hipocampo con respecto a la propagación de actividad a través de sus vías intrínsecas (Figura). Algunos trabajos sugieren que el papel de las poblaciones de la FD sería actuar como “filtro” o modulador de la actividad entorrinal que llega a CA3 (Treves y Rolls, 1994). En nuestra opinión, la excitación en dos fases mono y trisináptica de CA1 desde la corteza entorrinal abre una ventana temporal entre ambas que facilitaría la actuación de la segunda como puerta lógica para confirmar/denegar la descarga dependiendo de la novedad de la información entrante desde el tronco cerebral al relé intermedio de la región CA3, cuya

salida a CA1 estaría modulada por la convergencia de entradas desde los granos y el septum.

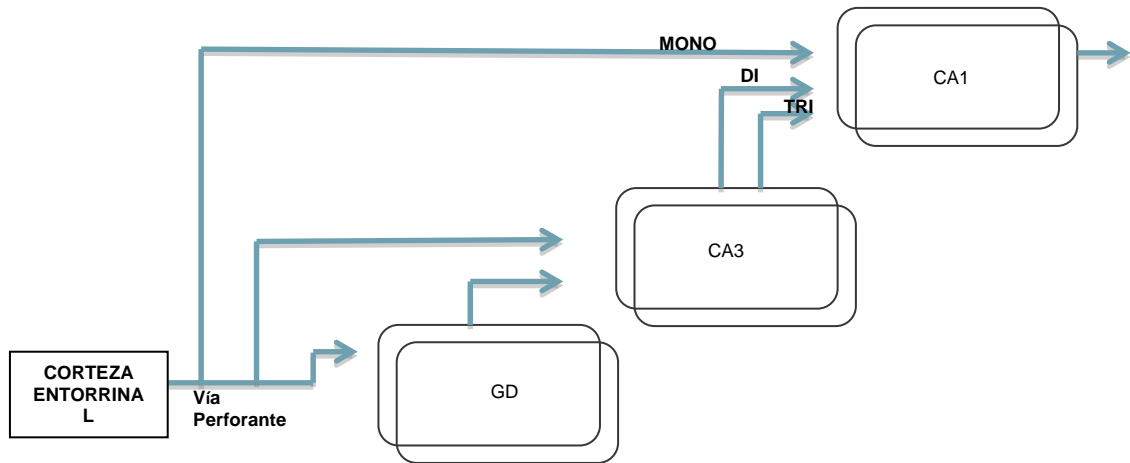


Figura 43: Esquema del modelo de Yeckel y Berger (1990) de excitación feedforward de las neuronas de CA1 en dos fases.

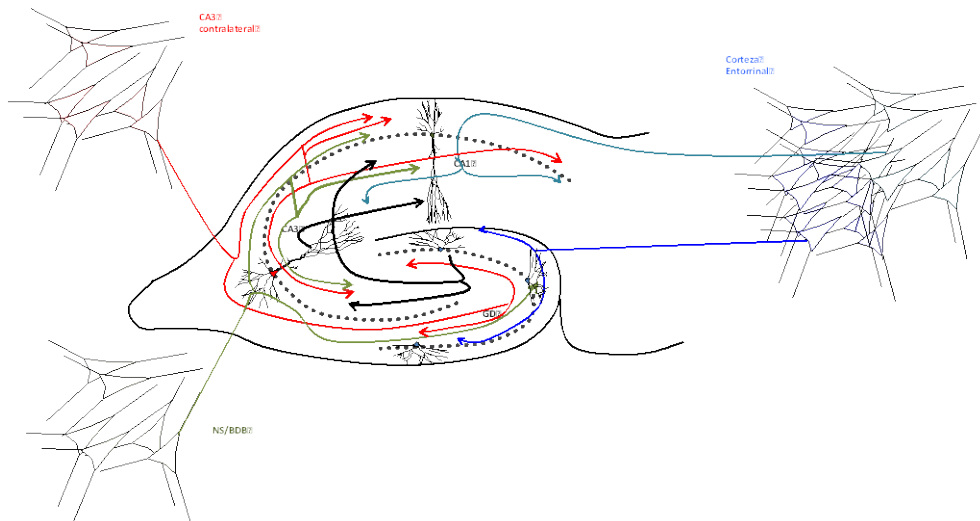


Figura 44: Vías aferentes principales a hipocampo. En azul las entradas de Corteza Entorrinal (en varios tonos de azul para representar la disposición en capas de esta estructura), vía perforante, en azul claro las que proyectan de la capa II inervan el estrato lacunoso molecular de CA1 y en azul oscuro las proyecciones de la capa III, que sinaptan con la capa molecular exterior del GD. En rojo la entrada de la vía comisural, la cual proyecta hacia el alveus, hacia el estrato oriens y radiado de CA1, y en las capa molecular interna del GD. Las proyecciones septales están representadas en verde. Las fibras aferentes del núcleo septal/banda diagonal de Broca terminan en ambas capas moleculares de GD, por debajo de la capa de granos. También llegan al estrato radiado y oriens de CA1. las fibras musgosas conectan específicamente el GD con CA3 y los colaterales de Schaffer CA3 con CA1. Ambas mostradas en negro.

De la aplicación de ACI para discriminar cambios en la dinámica de poblaciones hipocámpicas durante el envejecimiento.

5.1 INTRODUCCION

Es conocido que el SN sufre cambios estructurales graduales que se acentúan con la edad. Los cambios afectan en diferentes grados a la conectividad entre poblaciones, al número de neuronas y a los distintos elementos morfológicos de las mismas (ramificación dendrítica, número y forma de sinapsis, etc). En paralelo, las neuronas, y también los circuitos que éstas componen, exhiben cambios funcionales manifestados en su actividad eléctrica. Una de las hipótesis más aceptadas postula que las disminuciones cognitivas relacionadas con la edad estarían más asociadas con alteraciones en la conectividad sináptica que con la pérdida neuronal (Rosenzweig y Barnes, 2003; Kelly et al., 2006; Burke y Barnes, 2010). Algunas funciones superiores parecieran ser más vulnerables que otras al envejecimiento, como es el caso del aprendizaje o la memoria. Los cambios en este tipo de funciones son similares a los provocados por daño neuronal y provocan finalmente un notable deterioro en la calidad de vida y en las capacidades de un animal. Comoquiera que en última instancia los cambios estructurales, sean macroscópicos o celulares, sólo pueden manifestarse como alteraciones comportamentales a través de la actividad de las redes neuronales, decidimos testar la aproximación ACI expuesta en esta Memoria para estudiar cambios en la dinámica de redes neuronales durante el envejecimiento por constituir éste una evolución natural de un sistema dinámico complejo.

5.1.1 El hipocampo envejecido

El hipocampo participa, de forma esencial, en varias de las funciones afectadas por el envejecimiento, como la memoria episódica, o más específicamente la memoria relacionada con la información espacial y contextual (O'Keefe y Nadel, 1978; Squire, 1992; Corkin, 2002). En dos importantes trabajos sobre los déficits en aprendizaje y memoria provocados por el envejecimiento (Rapp y Gallagher, 1996; Rasmussen et al., 1996) no se apreciaron cambios en el número de neuronas, concluyéndose que la degeneración neuronal no es una consecuencia inevitable del envejecimiento ni un limitante para conseguir un buen desempeño en pruebas de memoria espacial. Tampoco se han descrito pérdidas masivas de sinapsis (Geinisman et al, 2004), pero sí otros cambios más sutiles, como la reducción de las densidades postsinápticas de la VP en CA1 (Nicholson et al, 2004), la pérdida de sinapsis en CA3, que también recibe entrada de la corteza entorrinal (Adams et al, 2010), así como en la capa molecular de la FD, procedentes de la misma estructura (Geinisman et al, 1992). Por otro lado la neurogénesis en esta región se encuentra seriamente afectada por el envejecimiento (Heine et al, 2004). Por su parte, en

la región CA3 se ha descrito una disminución de actividad génica asociada con la transmisión y plasticidad sinápticas en ratas viejas, aunque mantenían sus habilidades de aprendizaje espacial intactas (Haberman et al, 2011).

Es claro que tratar de asociar cambios de una función comportamental, definida por consenso a menudo cultural, y desprovista de observaciones mecanicistas, puede resultar en aparentes paradojas en estudios de este tipo, pues como avanzábamos en el Capítulo anterior, las funciones, si acaso, residen en redes formadas por numerosas estructuras, cuando no son la actividad que fluye por las mismas propiamente dicha. En lo que concierne a esta última, efectivamente se conocen numerosos cambios de la actividad eléctrica asociados a la edad en los distintos niveles de organización, desde actividad en neuronas individuales hasta la macroscópica. En este Capítulo vamos a describir dos relacionados uno con la estabilidad de la plasticidad sináptica y el otro con la manifestación oscilatoria de algunas actividades rítmicas LFP del hipocampo.

5.1.2 Disminución de la plasticidad sináptica: LTD

Otra de las capacidades que se supone comprometida con la edad es la plasticidad sináptica y sus mecanismos.

Muchos estudios aseveran que una red neuronal asociativa puede reproducir un patrón completo de actividad almacenada incluso cuando se le presenta sólo un fragmento de la información (Marr, 1971; Hopfield, 1982; Kohonen, 1987; McNaughton y Morris, 1987; O'Reilly y McClelland, 1994). Se interpreta que conservar patrones completos supondría un problema de almacenaje en el tiempo o incluso la posibilidad de activarse frente a patrones incorrectos. Se ha hipotetizado que para prevenir este problema de saturación una red podría reducir de alguna forma la fuerza sináptica de sus conexiones. Bajo ciertas condiciones, esta reducción de la fuerza sináptica de una red puede ser inducida tanto *in vitro* como *in vivo* (Dunwiddie y Lynch, 1978; Dudek y Bear, 1992; Thiels et al., 1994; Heynen et al., 1996, 2000; Manahan-Vaughan, 1997). Este fenómeno se ha denominado LTD (por sus siglas en inglés, *long term depression*), depresión o depotenciación a largo plazo.

Kemp et al (2000) han mostrado que existirían diferentes mecanismos para provocar LTD *in vitro* y que estos mecanismos difieren entre ratas jóvenes y adultos, posiblemente porque estos pueden ser alterados durante el desarrollo del SN en sí mismo.

Sin embargo, utilizando protocolos diferentes pueden conseguirse niveles de LTD similares en viejos y adultos (Thinschmidt et al, 2004). Cambios sutiles en, por ejemplo, las fuentes de calcio intracelular o en los mecanismos de señalización podrían aumentar el umbral de inducción de LTD durante el envejecimiento., (Kumar y Foster, 2007). Los mecanismos de plasticidad a largo plazo conllevan cambios en los receptores de glutamato tipo AMPA en la membrana postsináptica, en el caso de la LTD una pérdida parcial de los mismos Carroll et al. (1999), o al menos una redistribución de estos receptores lejos de la membrana postsináptica (Hollingsworth et al., 1985).

5.1.3 Actividad oscilatoria en el LFP del hipocampo de ratas envejecidas

Otra de las variaciones relacionadas con la edad podría aparecer en la actividad rítmica de la red. Por ejemplo, la actividad oscilatoria en la banda gamma (30-100Hz) (Sederberg et al, 2003), y esta oscilación es intrínseca de la región de CA3 del hipocampo (Bragin et al, 1995), una de las regiones o quizás la que más presenta disminución en sus capacidades con el paso del tiempo. *In vitro* han podido comprobar una pérdida dramática de las oscilaciones gamma en hipocampo de ratas viejas con preservación de las características oscilatorias básicas (Vreugdenhil y Toescu, 2005), pero aún no se han realizado análisis mas exhaustivos *in vivo*.

Todas las pequeñas variaciones que estamos nombrando indican que a pesar de su sutileza podrían traducirse en impedimentos funcionales substanciales y, además, si observamos en detalle este tipo de alteraciones pueden encontrarse de forma directa o indirecta en todos los subcampos de hipocampo. Estas alteraciones podría así mismo, trasladarse a las redes y circuitos que estas neuronas establecen.

5.2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

- a. Observar y comparar en ratas viejas las características básicas de los generadores descritos en jóvenes.
- b. Contrastar la actividad del circuito excitador de Schaffer y de Vía Perforante en animales viejos y si pueden reportarse cambios en los generadores con relación a la disminución en el numero de sinapsis reportada de estas zonas.
- c. Analizar el ritmo gamma en la región de CA3 de ratas viejas *in vivo*.
- d. Comprobar si existen cambios relacionados con la edad en un mecanismo de plasticidad sináptica como la LTD.

5.3 METODOS

5.3.1 Métodos experimentales

Para la preparación experimental y métodos generales de estimulación y registro, ver Capítulo 2 (Sección 2.3). Igualmente, para la descripción del tratamiento de las señales y análisis comunes de datos (Potenciales provocados, ACI y AFC).

Animales: Para estos experimentos se utilizaron dos grupos de ratas. Ratas macho Wistar de 4 meses de edad (control) y ratas macho adultas Wistar de 18-24 meses de edad. Fueron anestesiadas con uretano (1.2 g/kg, i.p.) y una vez alcanzado el plano anestésico adecuado fueron colocadas en un aparato estereotáxico (Narishige)

En el caso del grupo experimental al ser animales delicados por su avanzada edad debían ser monitorizados permanentemente, tanto en temperatura, nivel anestésico como frecuencia cardíaca. Fue muy frecuente encontrarnos con problemas de alta tensión y sangrado, o de la híper obesidad asociada a la edad y al sedentarismo sostenido de estos animales.

Inducción de LTD: Se aplicaron estímulos ortodróxicos en la CA3 ipsilateral a una intensidad suficiente para provocar una espiga poblacional al 40% de la amplitud máxima posible. Se recolectaron los fEPSP producidos en el estrato radiado de CA1, uno por minuto durante los 30 minutos previos a la inducción de LTD (CONTROL) y durante los 90 minutos posteriores a la misma. En estos casos tanto el registro como la inyección fueron realizados con una micropipeta (1-4 M Ω) conectada a un cabezal de alta impedancia. Las señales fueron adquiridas y amplificadas posteriormente con las mismas condiciones y con el hardware utilizado en todos los experimentos hasta ahora descriptos (ver capítulo 1)

Probamos varios protocolos para inducir LTD *in vivo*. Los más utilizados son los que involucran estimulación a baja frecuencia o LFS (por sus siglas en inglés low frequency stimulation) De estos probamos dos y uno para inducción química:

1. **Pares de pulsos:** 200 pares de pulsos de 100 μ s de duración, con una intensidad suficiente para provocar una espiga al 40% de la amplitud máxima posible, y a una frecuencia de 0,5Hz y una interdistancia de 25ms (Thiels et al, 1994)

2. **Pulsos simples:** 900 pulsos de 100 μ s de duración, con una intensidad suficiente para provocar una espiga al 40% de la amplitud máxima posible, y a una frecuencia de 1Hz (Manahan-Vaughan y Braunewell 1999)
3. Para la inducción de **LTD química** aplicamos NMDA de forma local (NMDA 100 μ M mas NaCl 1M) en el estrato radiado de la región de CA1. El volumen inyectado fue ajustado (\sim 1 μ l) para evitar los posibles efectos en los potenciales provocados no deseados que se producen por la simple inyección de volumen a la zona de registro (Canals et al. 2005). El fEPSP fue medido como el máximo slope de la fase negativa inicial.

5.4 RESULTADOS

5.4.1 Actividad de los generadores principales en hipocampo de ratas viejas

Como era de esperar, en animales viejos encontramos los mismos generadores del LFP que pudimos observar en animales adultos, los cuales describimos en capítulos anteriores de esta Memoria (G1-G4). Las distribuciones espaciales y activaciones son muy similares en todos los casos exceptuando el generador de Schaffer que si presenta diferencias claras en su actividad (ver mas adelante). El G2 L-M, como en adultos, también presenta actividad espontánea en periodos theta (ver recuadro) Esto indica que todas las poblaciones analizadas mantienen sus axones hacia la región postsináptica como indicarían estudios previos que mencionamos en la Introduccion a este capítulo.

En la figura 45 mostramos un ejemplo de sus activaciones en estas cuatro poblaciones, sus distribuciones espaciales y la varianza de los generadores en ese experimento (ejemplo en un animal)

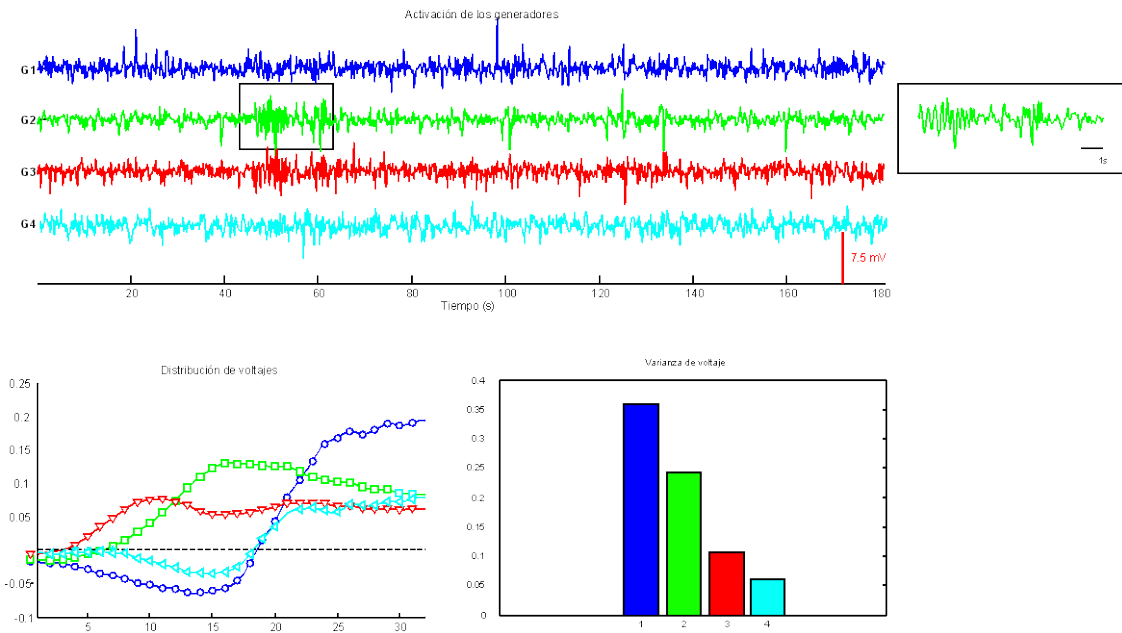


Figura 45: En este experimento podemos ver la presencia y distribución espacial de los 4 generadores del LFP principales encontrados tanto en animales adultos como ahora en animales viejos (en este experimento la edad del animal era de 24 meses) Los periodos de actividad característica de los generadores se mantienen, como el caso de la actividad theta en el G2 de L.M (ver recuadro)

5.4.2 Diferencias en potencias absolutas entre generadores de adultos versus viejos

Algunas diferencias aparecen al realizar una comparación poblacional ($n=5$ en cada grupo, adultos y viejos) de las potencias absolutas entre los generadores de Schaffer, FD y Vía Perforante, aunque el único que muestra una disminución estadísticamente significativa es la entrada de la vía perforante (**prueba $t=0,02115146$**), pero los otros dos muestran una tendencia (prueba $t=0,13$ para Schaffer y $0,18$ para el GD, aunque en este caso la potencia pareciera aumentar en vez de disminuir (Figura 46). El generador G2 LM no se muestra porque no se encontró ninguna diferencia entre grupos.

La disminución significativa para el generador de la vía perforante parece consistente con los estudios previos que muestran una disminución en la fuerza de las sinapsis de esta vía hacia hipocampo.

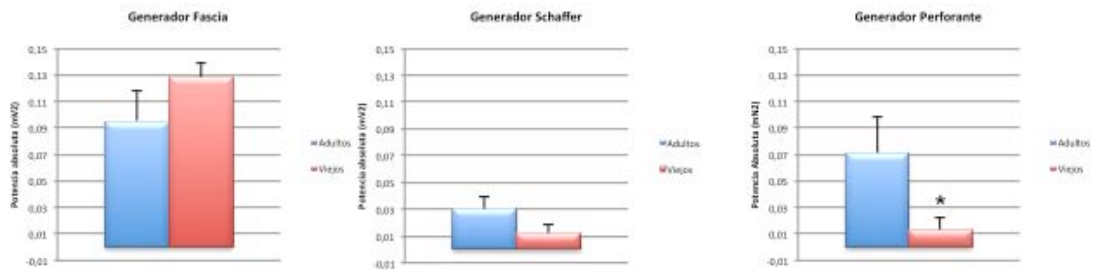


Figura 46: Comparativa poblacional entre las potencias (n=5) de 3 generadores del LFP entre adultos (edad 4 meses) y viejos (edad 21-24 meses). El único que muestra diferencias significativas es el G4 VP (prueba t <0,005)

5.4.3 Cambios en la región de CA3

Como hemos señalado en la introducción a este capítulo una de las zonas donde mas cambios se han reportado relacionados con la edad ha sido en la zona de CA3. Observando la distribución espacial del generador de Schaffer no se ven diferencias, pero si al estudiar sus activaciones con mas detalle.

El LFP del generador de Schaffer está compuesto de micro PEPSc provocados por la descarga de las células piramidales de CA3 (Fernández-Ruiz et al, 2012) Este patrón de actividad, propio de este generador, también se observa en los animales viejos pero si lo ampliamos y observamos con mas detalle vemos que incluso a simple vista las amplitudes y duraciones de estos son diferentes (Figura 47). Los eventos tienen una duración mayor y hay momentos de inactividad o “silencio” claros durante todo el registro.

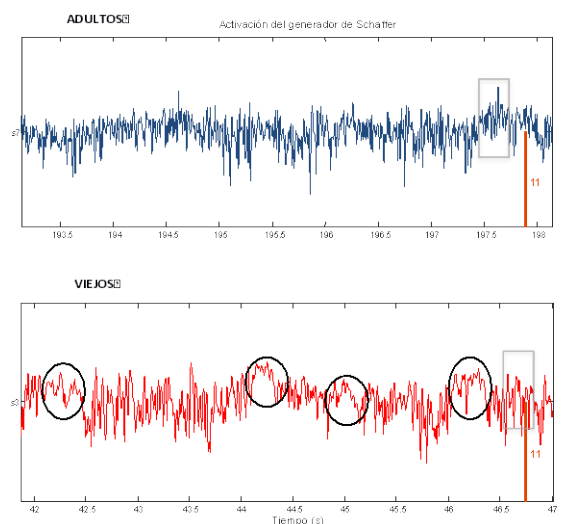


Figura 47: Detalle de 5 segundos de las activaciones del G3 Schaffer en animales adultos y en animales viejos (aquí se muestra en azul el G3 en adultos solo para poder distinguirlo del mismo generador en viejos) A la derecha se muestra un detalle de un segmento de 100 milisegundos de actividad para ejemplificar estos cambios en amplitud que mencionamos. En la activación en los animales viejos se marca con un círculo estos periodos de “silencio” que no se observan en animales adultos.

Si analizamos estadísticamente estos cambios ($n=5$ en cada grupo) podemos observar que los cambios significativos se observan en la duración de los eventos (tanto en su duración media como en la máxima) y no en la amplitud (Figura 48). También le aplicamos a estos datos un análisis de kurtosis y de Skewness los cuales nos dan valores menores comparados con los jóvenes (**Prueba $t= 6,60787E-05$ duracion media; 0,000697815 duracion máxima; 0,004119408 Kurtosis; 0,006477498 Skewness**)

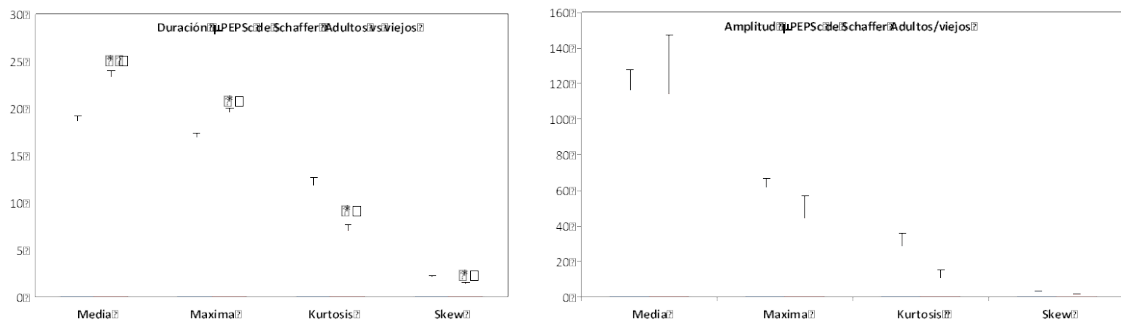


Figura 48: Análisis de duración y amplitud de los μ PEPSc del generador G3 Schaf, entre adultos versus viejos. Vemos diferencias significativas solo en la duración (en todos los análisis realizados) de los eventos pero no en la amplitud. Eje de duración en milisegundos y amplitud en μ V.

El no observar diferencias significativas en la amplitud de los eventos de G3 también puede deberse a que en el caso de los animales viejos los LFPs presentan una actividad no homogénea durante el registro, esto es momentos de actividad de los μ PEPSc de mayor duración e interrumpidos por momentos de “silencio” (Figura 47)

5.4.4 Actividad oscilatoria gamma en la región de CA3

Recientemente, nuestro grupo ha publicado resultados que apoyan la idea de que la región de CA3 trabajaría agrupándose en clústeres funcionales de neuronas piramidales, las cuales descargan sincrónicamente para producir estos μ PEPSc en los mismos dianas postsinápticos de CA1 (Fernández Ruiz et al, 2012)

Los μ PEPSc producidos en animales adultos forman un patrón oscilatorio global que coincide con una frecuencia gamma lenta, en el rango de 40-50Hz (Figura 49)

Los resultados observados indican que los clústeres funcionales de células piramidales de CA3 estarían sincronizados en una cadena de eventos de activación de a uno-por-vez bajo un supraclúster oscilatorio con dinámica en la frecuencia gamma.

Estos resultados coinciden con varios estudios que apuntan a una red de interneuronas en CA3 como mediador de la actividad gamma global (Whittington et al., 1995; Csicsvari et al., 2003; Mann y Paulsen, 2005).

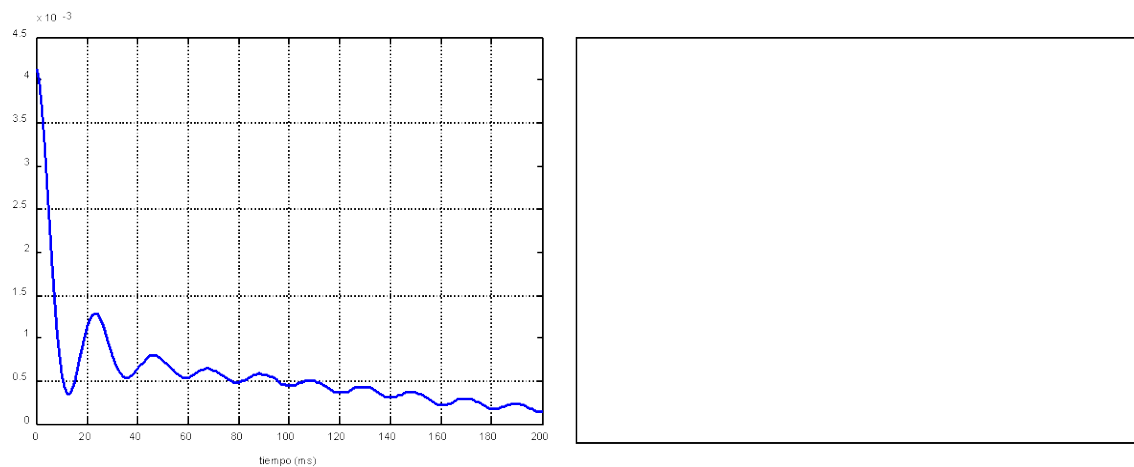


Figura 49: Autocorrelación del G3 Schaf en animales adultos y espectro de Fourier. Analizando tiempos largos (200 segundos) en ventanas de 200 milisegundos, vemos patrón oscilatorio global gamma en torno a los 40-50Hz.

En animales adultos, como mostramos mas arriba, los índices de autocorrelación se mantienen normalmente estables durante todo el tiempo de análisis con una potencia que varía entre animales en el rango de 40-60Hz.

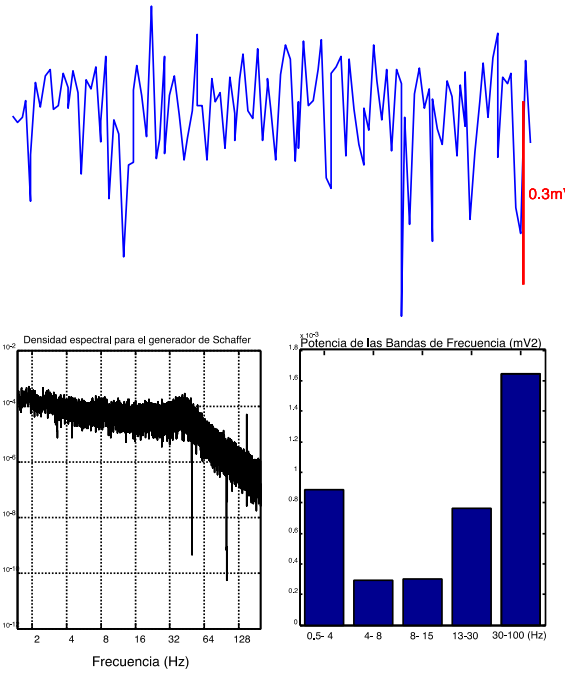


Figura 50: Fragmento de 1 segundo de actividad en el G3 Schaf de un animal adulto (en azul, calibración 1 segundo de duración y 0,3 mV de amplitud) La densidad espectral para este generador (analizado en 200 segundos) muestra un pico claro en frecuencias superiores a los 30 Hz, y si miramos su contenido en frecuencias este presenta mayor actividad en la banda de frecuencias entre los 30-100Hz

Siguiendo esta idea quisimos averiguar que sucedía con la actividad gamma en la región de CA3 en animales viejos. Analizamos las potencias espectrales (histogramas de frecuencias) y las autocorrelaciones, estas últimas en archivos de 200 segundos de duración analizados en ventanas de 200ms. A diferencia de los adultos, en los animales viejos los índices de autocorrelación se pierden a los pocos segundos de análisis y la potencia en la banda gamma se encuentra en frecuencias inferiores, entre los 10-30Hz (Figura 51)

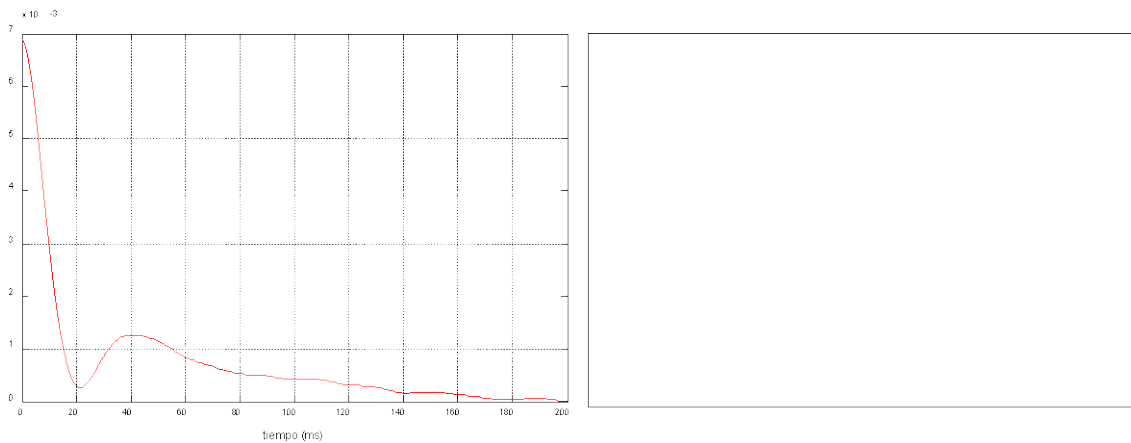


Figura 51: Autocorrelacion del G3 Schaf en animales adultos y espectro de Fourier. Analizando tiempos largos (200 segundos) en ventanas de 200 milisegundos, se observa que cualquier patrón oscilatorio se pierde a los pocos milisegundos. Espectro de Fourier muestra una actividad en torno a los 20Hz.

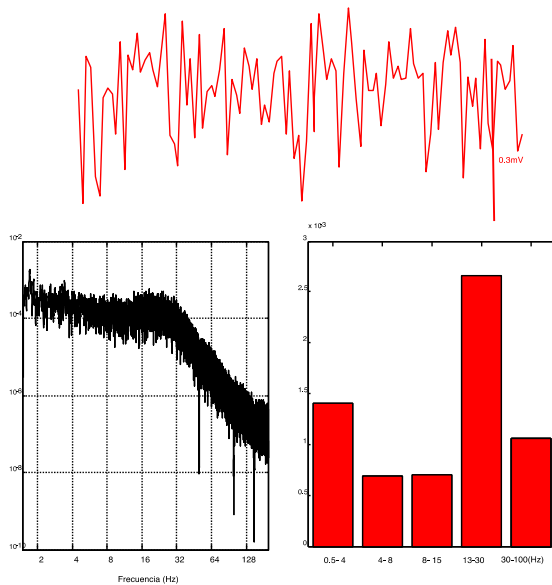


Figura 52: Fragmento de 1 segundo de actividad en el G3 Schaf de un animal viejo (en rojo, calibración 1 segundo de duración y 0,3 mV de amplitud) La densidad espectral para este generador (analizado en 200 segundos) muestra un pico claro en frecuencias en torno a los 20Hz, y si miramos su contenido en frecuencias este presenta mayor actividad en el dominio entre los 13-30Hz.

5.4.5 Cambios en la plasticidad sináptica relacionados con el envejecimiento. Experimentos con diferentes protocolos de LTD

Existe cierta controversia con respecto a la posibilidad de inducir este mecanismo de plasticidad sináptica en animales viejos. Mientras que algunos autores señalan que con la edad disminuyen los umbrales para la posibilidad de inducir LTD por estimulación de baja frecuencia (Rosenzweig y Barnes, 2003), otros aseguran que mas allá del mecanismo de generación esta solo puede producirse en animales o muy jóvenes (de alrededor de un mes), o en animales muy viejos (de mas de 20 meses de edad) (Dudek y Bear 1993; Vouimba et al. 2000; Hsu et al. 2002)

Generalmente, el envejecimiento se asocia a un cambio en la plasticidad sináptica. Siguiendo esta corriente los cambios que se produzcan en estos mecanismos debieran favorecer la disminución de la transmisión sináptica y reducir la capacidad de los circuitos de aumentar la transmisión sináptica a través de LTP. Teóricamente por esto se ve incrementada la LTD, o en otras palabras disminuido el umbral para su ocurrencia. Se sugiere así que el favorecer un mecanismo como la depresión por sobre la potenciación contribuye a disminuir el efecto de deterioro en la transmisión sináptica (Foster, 1999)

Decidimos comprobar y comparar, en animales viejos, un mecanismo de plasticidad sináptica en hipocampo como la LTD. Como hemos explicado en los materiales y métodos de este capítulo probamos los protocolos clásicos de inducción de

LTD por estimulación de baja frecuencia y con pares de pulsos. Con ninguno de los protocolos conseguimos producir la LTD en animales viejos, algo que si conseguimos tanto en animales muy jóvenes (2 meses de edad) como en animales adultos (4 meses de edad) (Figura 53)

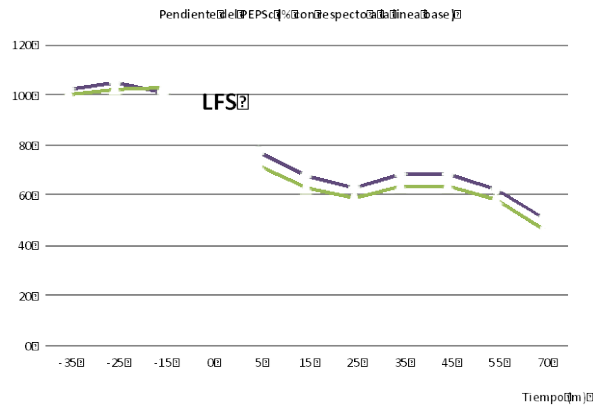


Figura 53: LTD en animales jóvenes (2 meses de edad, en verde; media de n=4) y adultos (4 meses de edad, violeta; n=4). En ambos casos muestra una disminución superior al 40%, (siendo algo inferior en animales jóvenes) con respecto a la línea base y continua disminuyendo hasta estabilizarse en torno a las 2 horas de registro (no se muestran estos datos)

En animales viejos, en cambio, obtuvimos un descenso en el slope del PEPSC inferior al 5% (n=3), lo que no puede considerarse LTD.

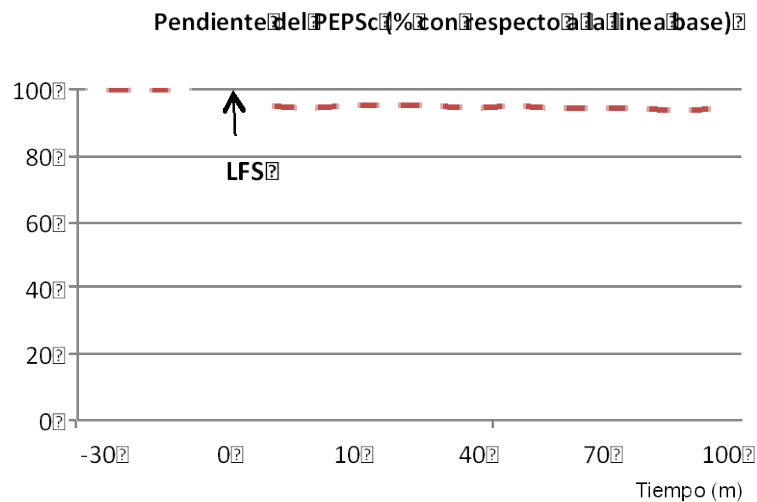


Figura 54: Intento de provocar LTD en animales viejos (21 meses de edad, media de n=3) con LFS de pares de pulsos.

Mientras que en jóvenes y adultos esa disminución se encuentra cercana al 40 % y se mantiene por horas (n=4 en cada caso). Al utilizar el protocolo estándar de 900Hz

el resultado fue incluso mas desconcertante dado que no solo no obtuvimos LTD, sino que generamos una pequeña LTP, cercana al 20% y muy estable (n=4)

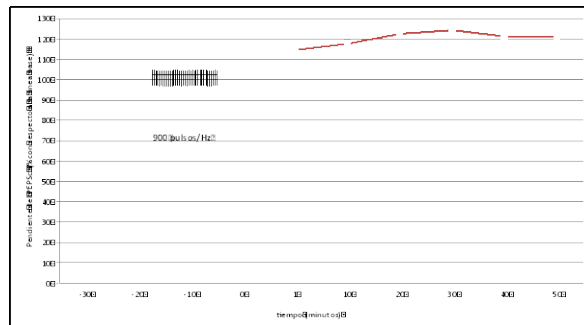


Figura 55: Intento de induccion e LTD en animales viejos con el método mas utilizado (LFS de 900Hz), n=4. Podemos observar no solo que no conseguimos producirla sino que además observamos una LTP de un 20-30%.

En animales adultos de control si observamos una LTD con una disminución de entre 35-45% (no se muestran esos datos)

Finalmente intentamos provocar la LTD por medios químicos, inyectando NMDA (n=9), a la zona del estrato radiado donde el PEPSc era máximo. En este caso sorprendentemente obtenemos el mismo resultado, una potenciación de la respuesta cercana al 20% y muy estable durante al menos dos horas. Si que existe una pequeña disminución del PEPSc durante los primero 5 minutos aproximadamente de registro, pero ocasionado probablemente mas por el efecto en el tejido de la inyección de liquido que por otra cosa.

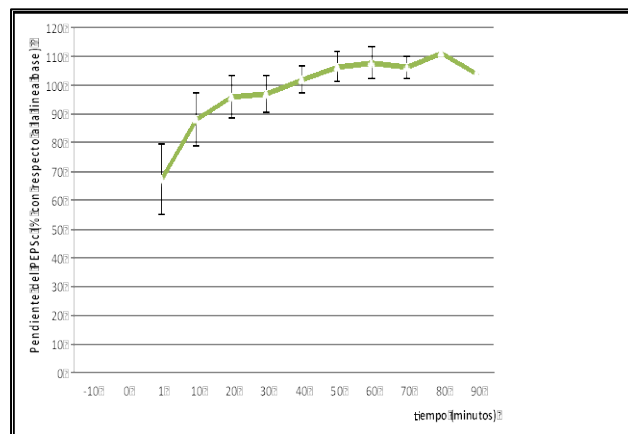


Figura 56: Intento de Induccion de LTD por inyeccion de NMDA en animales viejos (edades 19-22 meses; media de n=4)

Para corroborar que no fuera un efecto provocado por un simple cambio osmótico al agregar un volumen de una solución salina al tejido, inyectamos el mismo volumen pero de cloruro de sodio en este caso sin NMDA. Aquí el resultado fue el

esperado, los primeros 5-10 minutos de registro el PEPSc disminuyó mucho de tamaño recuperándose enseguida y manteniéndose igual al momento previo a la inyección, mostrando así que este efecto de potenciación que observamos no se debe solo al movimiento mecánico de tejido o al choque osmótico.

En resumen no pudimos provocar LTD en ninguno de los animales viejos con ninguno de los protocolos elegidos, a pesar de la bibliografía que muestra a este mecanismo reforzado con el envejecimiento e incluso lo pondera como el responsable de muchas de las capacidades disminuidas que podemos ver en animales envejecidos.

5.5 DISCUSION

Los estudios anatómicos y electrofisiológicos muestran que el hipocampo de ratas envejecidas presenta algunos cambios como ser la pérdida de sinapsis en el GD, pero especialmente en lo que se refiere a las sinapsis de la vía perforante a las regiones principales. Esto pudimos observarlo como una disminución en la potencia absoluta de este generador por sobre todos los demás. Pequeños cambios como estos podrían ser los responsables de los déficits asociados al envejecimiento.

Aunque también vimos cambios en las potencias y varianzas de los demás generadores necesitaríamos probablemente un número mucho mayor de animales para llegar a resultados estadísticos mas robustos.

Algunos autores argumentan que la llamada plasticidad sináptica al ser una función de la propia actividad sináptica puede ver modificados los umbrales para su generación dependiendo de la actividad neuronal de la propia población aferente, de los protocolos de inducción o de los cambios intrínsecos dependientes de actividad en el nivel del calcio intracelular, necesario para la producción de estos fenómenos (Artola y Singer, 1993) Pero lo observado en nuestros experimentos no nos permite aseverar que esas dificultades que presentan los animales sean ocasionadas por un umbral mas bajo en la inducción de ciertas plasticidades sinápticas ni por una potenciación de otras plasticidades tampoco.

Una vez mas comprobamos en nuestro experimentos que los cambios sinápticos relacionados con el envejecimiento, al menos en hipocampo de ratas, son mucho mas sutiles y específicos de lo esperado. Aparentemente, los grandes déficits que pueden

comprobarse al intentar que un animal realice una tarea de memoria, por ejemplo, no se deben ni a una pérdida importante de conexiones entre zonas, ni a una disminución en número de neuronas, y ni siquiera a una potenciación en la depresión a largo plazo (explicación que pareciera válida para argumentar que los animales viejos “olvidan mas rápido”).

No existiría un deterioro global ni gradual del cerebro durante el envejecimiento normal, la mayoría de estudios apuntan a la idea de que incluso hay una preservación generalizada de sus funciones y como dijimos anteriormente, los cambios que ocurren estarían limitados a regiones específicas, al menos en hipocampo (Barnes, 1994). También podría ocurrir que existieran varios procesos compensatorios ya que el número de células principales en hipocampo se mantiene inalterado durante toda la vida de un animal, ni hay grandes cambios en las propiedades físicas de estas. Evidentemente las variaciones tienen que producirse a nivel de conectividad o respuesta, pero nuestros resultados, junto con muchos estudios previos ya mencionados, parecieran indicar que los nodos en la red se mantienen vinculados incluso hasta edades avanzadas, aunque cualquier cambio en la dinámica de la red pudiera afectarla causando estos déficits.

Discusión y Conclusiones

6.1 CONCLUSIONES

1. ACI permite separar efectivamente generadores en registros de actividad LFP, con multielectrodos lineales, describir sus características espaciotemporales y cuantificar su contribución específica al LFP nativo durante actividad irregular.
2. Es posible diferenciar no solo actividad neuronal de artefactos, sino los distintos componentes sinápticos de la propia actividad neuronal. Como algunas vías son difíciles de identificar, por su escasa contribución relativa al total de actividad LFP es ventajosa la utilización de otras técnicas adicionales complementarias como AFC, reconstrucción del LFP virtual específico de subpoblación aferente, y el “cebado” con potenciales provocados subumbrales de vías excitadoras conocidas (Entorrino-hipocampal y CA3-CA1).
3. La presencia de oscilaciones dominantes en el LFP, como el ritmo theta, dificulta la observación de actividad de poblaciones con actividad más débil pero con un ACI aun se consigue acceder a la evolución temporal irregular (o no) de otros generadores con menor contribución en varianza relativa al LFP, tales como el de Schaffer o la VP.
4. Durante un LFP irregular cada banda o dominio de frecuencias analizados muestran actividad en todos los generadores sinápticos y viceversa. Esto indica una composición multiorigen, la mezcla de generadores puede enmascarar la estructura temporal de las señales originales.
5. Las bandas de frecuencia durante actividad irregular contienen partes irreconocibles de la información original que no han sido seleccionadas por alguna característica neurofisiológica relevante.
6. Cada generador tiene una firma propia de frecuencias la cual es característica de cada generador entre estados (irregular y theta , pero no existen bandas de frecuencias especialmente asociadas a un generador específico, salvo durante los episodios theta en el generador L-M de CA1.

7. La interrupción de la entrada CA3 contralateral afecta principalmente a las redes inhibitorias, disminuyendo, en la mayoría de los casos, la tasa de descarga. La inactivación de esta vía causa una importante disminución de la actividad en el generador del estrato L-M y el generador de la VP (contralateral a la lesión). Esto apunta a la idea de que dos vías de procesamiento aparentemente distantes podrían tener una relación funcional más estrecha de la que se puede inferir anatómicamente.
8. Por su parte estudios previos han reportado que la lesión de la corteza entorrinal, ocasionan actividad LFP anormal y persistente en animales despiertos (Suzuki y Smith 1988). Nuestra principal observación indica que el origen de tales anomalías sería una consecuencia multisináptica centrada en redes locales inhibitorias de la FD, puesto que la alteración más notable es un cambio del patrón temporal en el generador GCsom.
9. La inactivación de los núcleos septales y sistemas retículo-ascendentes de paso ocasiona una disminución marcada de la actividad LFP específicamente en la región CA1, con una notable disminución de la potencia de los generadores de esta región, el de Schaffer y el de LM. El potente efecto sobre el generador LM, era esperable por ser éste el generador LFP que despliega actividad rítmica theta, cuyo marcapasos reside en los núcleos septales.
10. Los estudios realizados en hipocampo de animales viejos muestran que uno de los cambios mas importante, tiene relación con una pérdida de sinapsis en el GD, especialmente en las sinapsis de la vía perforante a las regiones principales. Nosotros pudimos comprobarlo como una disminución poblacional en la potencia absoluta de este generador por sobre todos los demás.
11. A pesar de que algunos autores argumentan que la llamada plasticidad sináptica al ser una función de la propia actividad sináptica pueden modificarse sus umbrales para su generación, y que esto se ve exacerbado y relacionado con el envejecimiento. Con nuestros experimentos no pudimos observarlo, lo que sostiene aun mas la idea que los cambios sinápticos relacionados con el envejecimiento, al menos en hipocampo de ratas, son mucho mas sutiles y específicos de lo esperado.

6.2 CONSIDERACIONES FINALES

Al enfrentarnos a un sistema complejo, dinámico y activo, el cual genera una enorme cantidad de información, deberíamos plantearnos primeramente el conocer en profundidad sus integrantes y las relaciones entre ellos. Esto facilitaría el comprender esa información y el aprovechar cualquier método que nos permita el acceso a la misma.

Esa es la gran ventaja con la que ahora contamos con un método tan efectivo como ACI. El hipocampo, como cualquier otra estructura cerebral, presenta conexiones anatómicas y funcionales entre las distintas regiones que lo conforman y con las demás estructuras con las que se relaciona. El conocer con mas hondura estas vías, así como el aprovechar características sinápticas y eventos que son propios de cada una de ellas (ritmo theta, Sharp waves, potenciales sinápticos, entre otros), nos ha dado la posibilidad de sacarle el máximo provecho a este método y permitir una primera caracterización de las principales subpoblaciones de hipocampo.

La información ha estado disponible en nuestros sistemas de registro desde hace mucho tiempo gracias a los LFPs, solo que no podíamos acceder a ella. No podemos obvia, además, la cantidad de tiempo invertido en intentar entender e incluso en darle entidad a pequeños eventos aislados, olvidándonos de la actividad real.

ACI nos permitirá entender un poco mas sobre el procesamiento que realizan las neuronas y las poblaciones que ellas forman así como comenzar a revisar muchos viejos y arraigados conceptos. Pero también es importante que conozcamos y tengamos en cuenta sus limitaciones.

Para una correcta separación de los generadores es imprescindible la distribución espacial diferenciada de las corrientes transmembrana a lo largo del eje somato-dendrítico de las células principales, sin importar tanto su patrón de activación temporal.

Esto nos ha permitido separar y diferenciar vías excitadoras conocidas como puede ser el caso de Schaffer o la Vía Perforante. Además, el poder manipular su activación

nos ha permitido describir sus características espaciotemporales e incluso cuantificar su contribución específica al LFP nativo durante actividad irregular.

El ACI puede separar eficientemente señales que provengan de sitios diferentes y que estén contenidas en el mismo registro (Choi et al, 2005). Los mismos principios matemáticos son aplicables a registros de actividad eléctrica intracerebral (Makarov et al., 2010), y puede ser aplicado en infinidad de situaciones. Nos ha permitido separar actividad neuronal de artefactos (comúnmente presentes en los registros de actividad).

Es importante el poder incluir en nuestros análisis otros métodos para favorecer la identificación de los generadores del LFP, como puede ser el “cebar” las vías sinápticas que estemos buscando, el determinar la naturaleza excitadora o inhibidora de las mismas mediante farmacología o técnicas como el AFC.

Por otro lado también conseguimos acceder a la evolución temporal de los generadores , incluso de los más débiles, en momentos donde su actividad puede quedar soterrada por la presencia de oscilaciones periódicas de mayor magnitud (como es el caso del ritmo theta) Esto nos muestra que pudimos haber obviado la ocurrencia de eventos o también la actividad de poblaciones durante diferentes momentos por no haber conseguido métodos de discriminación eficaces hasta ahora de “voces” mas silenciosas. Por esta razón nos parecía importante el analizar el LFP irregular en bandas de frecuencias, tema “estrella” en este campo y al que no podíamos pasar por alto. El que un dominio de frecuencias muestre actividad en todos los generadores analizados, y viceversa, nos está hablando de una posible composición multiorigen y que el estudiarlas por separado solo nos permite ver pequeños segmentos de la realidad, y nos aleja de las características neurofisiológicas realmente relevantes de la información.

Es bastante frecuente el utilizar filtrados previos de las señales para poder obtener promedios y distintos estadísticos. Esto introduciría un error importante porque hemos visto que puede distorsionar las características espaciales de los generadores, afectándolos diferencialmente y de forma variable según la frecuencia elegida.

Cada población tendría una firma propia de frecuencias o características temporales, las cuales se mantienen una vez que conseguimos separarlos de las influencias temporales de otros generadores. Pero debemos ser conscientes que parámetros como

este son modificados por la ubicación desde donde registramos por ejemplo. Este tipo de observaciones nos ayuda a otorgarles cada vez mas identidad a los generadores que conseguimos desenmascarar, y también a comenzar a tener mas precaución y ser mas cautos con las conclusiones a las que arribamos.

El utilizar bandas de frecuencias para observar la contribución de distintas poblaciones a la actividad total solo nos da fragmentos incompletos de lo que podría estar sucediendo en nuestros registros, además de contener diversos errores estadísticos que pueden impedir una correcta observación. Menos se justifica su uso pudiendo acceder a la información de los verdaderos contribuyentes al LFP que son los generadores sinápticos.

Es evidente que este tipo de aproximaciones, y muchas otras, han sido utilizadas porque nos urge la necesidad de contestar grande preguntas como pueden ser cuales son las funciones superiores en las que está implicada la estructura que estamos estudiando, o visto de otro lado, nos acercamos al estudio de ciertas regiones supuestamente implicadas en comportamientos complejos. Pero deberíamos primero admitir que el cerebro es una pieza computacional muy compleja y sofisticada. Las estructuras que la componen, como el hipocampo en este caso, permiten que la información fluya a través de sus subregiones y este flujo no es tan sencillo de describir.

Se ha pensado durante muchísimo tiempo que la conectividad anatómica era la respuesta evidente y directa. Pero a medida que las técnicas avanzan y nos permitir mirar con mas detalle ya no lo vemos tan obvio. La típica y antigua idea descriptiva de un flujo lineal ha sido desterrada, y hoy sabemos que existen conexiones menores que constituyen a asociaciones directas e indirectas entre y dentro de cada una de las subregiones.

Si pudiéramos finalizar un estudio funcional completo de todas las subpoblaciones que conforman las distintas redes locales durante la ejecución de todas las tareas en las que está involucrado el hipocampo nos permitiría obtener una aproximación global a su verdadera función, en caso de que tuviera alguna propia. Pero está claro que esto por el momento está fuera del alcance de las técnicas actuales.

Nuestro aporte en este tema ha sido inactivarlo temporalmente de algunas de sus vías de entrada de información, para poder cuantificar transitoriamente e inferir algunos aspectos sobre la transmisión entre nodos de una red. Así, conseguimos interrumpir momentáneamente la asociación y la contribución de una zona al

procesamiento global de muchos elementos neuronales. Esto nos ha permitido por ejemplo, el pensar que dos vías de procesamiento aparentemente distantes podrían tener una relación funcional más estrecha de la que se puede inferir anatómicamente.

Al poder separar los componentes del LFP específicos de cada vía también pudimos estudiar cómo se modifica la actividad en diferentes segmentos de la red del hipocampo y sus estructuras asociadas de una manera mucho menos obvia que la que cabría esperar tras inactivación de poblaciones presinápticas concretas. Observamos alteraciones en poblaciones que constituyen estaciones posteriores a la directamente deaferentada, permitiendo monitorizar la influencia global de una población en la transferencia de la información a lo largo de distintos relés. Eso permite una nueva visión para el estudio de la dinámica poblacional en circuitos complejos.

Y el ampliar nuestros conocimientos sobre el funcionamiento de una red y el obtener datos mas precisos sobre las relaciones entre sus nodos nos permitiría también comenzar a entender que cambios se producen en esta a medida que pasa el tiempo y su funcionamiento comienza a fallar. No desde un punto de vista patológico, sino desde una mirada mecanicista natural como puede ser el envejecimiento normal del cerebro de un individuo.

Es por todos conocido, y lamentablemente esperado, que el sistema nervioso comience a sufrir cambios funcionales graduales los cuales se van acentuando con la edad. Estos cambios también se manifiestan en la actividad eléctrica de las neuronas y ocasionarían alteraciones en funciones superiores como memoria o aprendizaje, por nombrar algunos de los mas vulnerables. Cualesquiera sean estos cambios, aun estamos lejos de conocerlos en detalle y mas lejos aun de inferir en ellos para prevenirlos o retrasarlos.

Pero aun en nuestra lejanía si que podemos asegurar que se verán manifestados como alteraciones comportamentales a través de la actividad de las redes neuronales, y a ese punto podemos aproximarnos a través de ACI, y así intentar acercarnos a la evolución natural de un sistema dinámico complejo.

Aparentemente, las variaciones que sufren estas estructuras son pequeñas pero se traducen en impedimentos funcionales substanciales y podrían encontrarse de forma directa o indirecta en todos los subcampos de hipocampo. Estas alteraciones podría así

mismo, trasladarse a las redes y circuitos que estas neuronas establecen y quizás a otras estructuras del sistema nervioso.

No habría ni una pérdida importante de conexiones entre zonas, ni a una disminución en número de neuronas, y ni siquiera a una potenciación en la depresión a largo plazo (explicación que pareciera válida para argumentar que los animales viejos “olvidan mas rápido”).

El deterioro no sería global ni gradual sino que incluso se apunta a la idea de que el cerebro preservaría sus funciones de forma generalizada, y las disfunciones se limitarían a alteraciones en regiones específicas, al menos en hipocampo (Barnes, 1994), o quizás efectos compensatorios nos impidan ver con claridad. Mas allá de las especulaciones nosotros podemos concluir que al menos los nodos de la red estudiados mantienen su conectividad funcional en edades muy avanzadas y que los cambios en plasticidad sináptica, a los cuales se les atribuyen muchas consecuencias funcionales, tendrían que ser sometidos a una extensa revisión.

Nuestro objetivo general con esta Memoria, y su desarrollo, ha sido el mostrar una nueva manera de enfrentarnos al procesamiento de señales neuronales y a la información que podemos obtener de ellas. Quisimos enfocarlo desde una mirada funcional de grupos de poblaciones neuronales interconectadas formando una estructura o red, revisando enfoques y teorías tradicionales.

Para esto utilizamos innovaciones teóricas y metodológicas como la aplicación del ACI para el estudio exhaustivo del LFP en actividad irregular y la obtención de sus generadores constituyentes, el análisis sobre el significado fisiológico de las bandas de frecuencia, la utilización de deaferentaciones temporales para estudiar cambios en la transferencia de la información o la detección de cambios funcionales naturales del sistema, como los que podrían haber sido ocasionados por el “desgaste” del circuito.

- Adams MM, Donohue HS, Linville MC, Iversen EA, Newton IG, Brunso-Bechtold JK. (2010) Age-related synapse loss in hippocampal CA3 is not reversed by caloric restriction. *Neuroscience* Dec 1;171(2):373-82.
- Adey WR. (1977) .The sensorium and the modulation of cerebral states: tonic environmental influences on limbic and related systems. *Ann N Y Acad Sci.* 290:396-420.
- Adey, WR. (1966). Neurophysiological correlates of information transaction and storage in brain tissue. In E. Stellar and J. Sprague (Eds) *Progress In Physiological Psychology*, Academic Press, New York, Vol1, pp.1-43.
- Alonso A, García-Austt E. (1987) Neuronal sources of theta rhythm in the entorhinal cortex of the rat. I. Laminar distribution of theta field potentials. *Exp Brain Res.* 67(3):493-501.
- Amaral DG, Kurz J. (1985) An analysis of the origins of the cholinergic and noncholinergic septal projections to the hippocampal formation of the rat. *J Comp Neurol.* Oct 1;240(1):37-59.
- Amaral DG, Witter MP. (1989) The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience.* 31(3):571-91.
- Andersen P. (1960a) Interhippocampal impulses. II. Apical dendritic activation of CA1 neurons. *Acta Physiol Scand.* Mar 18;48:178-208.
- Andersen P. (1960b) Interhippocampal impulses. III. Basal dendritic activation of CA3 neurons. *Acta Physiol Scand.* Mar 18;48:209-30
- Andersen P, Bliss TV, Skrede KK. (1971) Unit analysis of hippocampal population spikes. *Exp Brain Res.* 13(2):208-21.
- Andersen P, Bland HB, Myhrer T, Schwartzkroin PA. (1979) Septo-hippocampal pathway necessary for dentate theta production. *Brain Res* Apr 6;165(1):13-22.
- Anderson P, Lomo T. (1966) Mode of activation of hippocampal pyramidal cells by excitatory synapses on dendrites. *Exp Brain Res.* 2(3):247-60.
- Arnoldi HM, Brauer W. (1996) Synchronization without oscillatory neurons. *Biol Cybern.* Mar;74(3):209-23.
- Belitski A, Gretton A, Magri C, Murayama Y, Montemurro MA, Logothetis NK, Panzeri S. (2008) Low-frequency local field potentials and spikes in primary visual cortex convey independent visual information. *J Neurosci.* May 28;28(22):5696-709.
- Bell AJ, Sejnowski TJ. (1995) An information-maximization approach to blind separation and blind deconvolution. *Neural Comput.* Nov;7(6):1129-59.
- Bennett TL. (1969) Hippocampal theta activity and learning: a reply to Douglas. *Psychol Rep.* Apr;24(2):580-2.
- Bennett TL. (1970) Hippocampal EEG correlates of behavior. *Electroencephalogr Clin*

Neurophysiol. Jan;28(1):17-23

Berger, H. (1929) Über das Elektrenkephalogramm des Menschen (En el EEG de humanos) *Archive für Psychiatrie und Nervenkrankheiten*.

Bernard C, Wheal HV. (1994) Model of local connectivity patterns in CA3 and CA1 areas of the hippocampus. *Hippocampus*. Oct;4(5):497-529.

Blackstad, T. W. (1956). Commissural connections of the hippocampal region in the rat, with special reference to their mode of termination. *Journal of Comparative Neurology*, 105(3), 417-537.

Bland BH. (1986) The physiology and pharmacology of hippocampal formation theta rhythms. *Prog Neurobiol.* 26(1):1-54

Bliss TV, Lomo T. (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol.* Jul;232(2):331-56.

Bragin A, Jando G, Nadasdy Z, Hetke J, Wise K, Buzsáki G. (1995) Gamma (40–100 Hz) oscillation in the hippocampus of the behaving rat. *J. Neurosci.* 15:47–60

Brankack J, Stewart M, Fox SE. (1993) Current source density analysis of the hippocampal theta rhythm: associated sustained potentials and candidate synaptic generators. *Brain Res.* Jul 2;615(2):310-27.

Brown BB. (1968) Frequency and phase of hippocampal theta activity in the spontaneously behaving cat. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 24:53–62

Brown GD, Yamada S, Sejnowski TJ. (2001) Independent component analysis at the neural cocktail party. *Trends Neurosci.* Jan;24(1):54-63

Bullock TH, McClune MC, Achimowicz JZ, Iragui-Madoz VJ, Duckrow RB, Spencer SS. (1995) Temporal fluctuations in coherence of brain waves. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec 5;92(25):11568-72.

Bullock TH, McClune MC, Enright JT. (2003) Are the electroencephalograms mainly rhythmic? Assessment of periodicity in wide-band time series. *Neuroscience.* 121(1):233-52.

Burgess N, O'Keefe J. (1996) Cognitive graphs, resistive grids, and the hippocampal representation of space. *J Gen Physiol.* Jun;107(6):659-62.

Burke SN, Barnes CA. (2010) Senescent synapses and hippocampal circuit dynamics. *Trends Neurosci.* Mar;33(3):153-61.

Buzsáki G, Grastyán E, Kellényi L, Czopf J. (1979) Dynamic phase-shifts between theta generators in the rat hippocampus. *Acta Physiol Acad Sci Hung.* 53(1):41-5.

Buzsáki G, Leung LS, Vanderwolf CH. (1983) Cellular bases of hippocampal EEG in the behaving rat. *Brain res* 287: 139-171.

Buzsáki G. (1984) Feed-forward inhibition in the hippocampal formation. *Prog Neurobiol.* 22(2):131-53

Buzsáki G, Chrobak JJ. (1995) Temporal structure in spatially organized neuronal ensembles: a role for interneuronal networks. *Curr. Opin. Neurobiol.* 5(4):504–10

Buzsáki G. (1996) The hippocampo-neocortical dialogue. *Cereb Cortex.* Mar-Apr;6(2):81-92.

Buzsáki G. (1997) Functions for interneuronal nets in the hippocampus. *Can J Physiol Pharmacol.* May;75(5):508-15

Canals S, López-Aguado L, Herreras O. (2005) Synaptically recruited apical currents are required to initiate axonal and apical spikes in hippocampal pyramidal cells: modulation by inhibition. *J Neurophysiol.* Feb;93(2):909-18

Canton R. (1875) *British Medical Journal*

Carroll RC, Lissin DV, von Zastrow M, Nicoll RA, Malenka RC. (1999) Rapid redistribution of glutamate receptors contributes to long-term depression in hippocampal cultures. *Nat Neurosci.* May;2(5):454-60.

Castellanos NP, Makarov VA. (2006) Recovering EEG brain signals: Artifact suppression with wavelet enhanced independent component analysis. *Journal of Neuroscience Methods* 158: 300-312,

Choi, S., Cichocki, A., Park, H. M., & Lee, S. Y. (2005). Blind source separation and independent component analysis: a review. *Neural Information Processing - Letters and Reviews*, 6,1–57.

Churchill JD, Tharp JA, Wellman CL, Sengelaub DR, Garraghty PE. (2004) Morphological correlates of injury-induced reorganization in primate somatosensory cortex. *BMC Neurosci.* Nov 8;5:43.

Coleman JR, Lindsley DB. (1977) Behavioral and hippocampal electrical changes during operant learning in cats and effects of stimulating two hypothalamic--hippocampal systems. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* Mar;42(3):309-31.

Colgin LL, Denninger T, Fyhn M, Hafting T, Bonnevie T, Jensen O, Moser MB, Moser EI. (2009) Frequency of gamma oscillations routes flow of information in the hippocampus. *Nature.* Nov 19;462(7271):353-7.

Corkin S. (2002) What's new with the amnesic patient H.M.? *Nat Rev Neurosci.* Feb;3(2):153-60

Csicsvari J, Jamieson B, Wise KD, Buzsáki G. (2003) Mechanisms of gamma oscillations in the hippocampus of the behaving rat. *Neuron.* Jan 23;37(2):311-22.

Delgado-Garcia JM, Del Pozo F, Spencer RF, Baker R. (1988) Behavior of neurons in the abducens nucleus of the alert cat--III. Axotomized motoneurons. *Neuroscience.* Jan;24(1):143-60.

Delorme A, Makeig S. (2004) EEGLAB: an open source toolbox for analysis of single-trial EEG dynamics including independent component analysis. *J Neurosci Methods.* Mar 15;134(1):9-21.

Di S, Baumgartner C, Barth DS. (1990) Laminar analysis of extracellular field potentials in rat vibrissa/barrel cortex. *J Neurophysiol.* Apr;63(4):832-40.

Dudek SM, Bear MF.(1992) Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A*. May 15;89(10):4363-7.

Dudek SM, Bear MF. (1993) Bidirectional long-term modification of synaptic effectiveness in the adult and immature hippocampus. *J Neurosci*. Jul;13(7):2910-8.

Düzel E, Penny WD, Burgess N. (2010) Brain oscillations and memory. *Curr Opin Neurobiol*. Apr;20(2):143-9.

Eckhorn R. (1994) Oscillatory and non-oscillatory synchronizations in the visual cortex and their possible roles in associations of visual features. *Prog Brain Res*.102:405-26.

Einevoll GT, Pettersen KH, Devor A, Ulbert I, Halgren E, Dale AM. (2007) Laminar population analysis: estimating firing rates and evoked synaptic activity from multielectrode recordings in rat barrel cortex. *J Neurophysiol*. Mar;97(3):2174-90.

Elazar Z, Adey WR. (1967) Spectral analysis of low frequency components in the electrical activity of the hippocampus during learning. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. Sep;23(3):225-40.

Elul R. (1971) The genesis of the EEG. *Int Rev Neurobiol*. Jul;15:227-72

Escudero J, Hornero R, Abásolo D, Fernández A, López-Coronado M. (2007) Artifact removal in magnetoencephalogram background activity with independent component analysis. *IEEE Trans Biomed Eng*. Nov;54(11):1965-73.

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

Fisahn A, Pike FG, Buhl EH, Paulsen O. (1998). Cholinergic induction of network oscillations at 40 Hz in the hippocampus in vitro. *Nature* 394:186–89

Fisahn A, Contractor A, Traub RD, Buhl EH, Heinemann SF, McBain CJ. (2004). Distinct roles for the kainate receptor subunits GluR5 and GluR6 in kainate-induced hippocampal gamma oscillations. *J. Neurosci*. 24(43):9658–68

Frederickson CJ, Smylie CS, Howell GA, Lenig RB. (1978) Movement-dependent and movement-independent changes in hippocampal RSA in cats. *Brain Res Bull*. Sep-Oct;3(5):559-62.

Frederickson CJ, Lenig RB, Frederickson MH. (1980) Hippocampal RSA in cats during cued and noncued delayed response performance. *Behav Neural Biol*. Apr;28(4):383-91

Freeman JA, Nicholson C. (1975) Experimental optimization of current source-density technique for anuran cerebellum. *J Neurophysiol*. Mar;38(2):369-82

Freeman WJ, Zhai J. (2009) Simulated power spectral density (PSD) of background electrocorticogram (ECoG). *Cogn Neurodyn*. Mar;3(1):97-103.

Freund TF. (2003) Interneuron Diversity series: Rhythm and mood in perisomatic inhibition. *Trends Neurosci*. Sep;26(9):489-95.

Fries P, Reynolds JH, Rorie AE, Desimone R. (2001). Modulation of oscillatory neuronal

synchronization by selective visual attention. *Science* 291(5508):1560–63

Frotscher M, Léránth C. (1985) Cholinergic innervation of the rat hippocampus as revealed by choline acetyltransferase immunocytochemistry: a combined light and electron microscopic study. *J Comp Neurol*. Sep 8;239(2):237-46.

Fujita Y, Sakata H. (1962) Electrophysiological properties of CA1 and CA2 apical dendrites of rabbit hippocampus. *J Neurophysiol*. Mar;25:209-22.

Fujita Y. (1963) [Unit activity and theta rhythm in the hippocampus]. *No To Shinkei*. Mar 1;15:271-4

Fujita Y, Sato T.(1964) Intracellular records from hippocampal pyramidal cells in rabbit during theta rhythm activity. *J Neurophysiol*. Nov;27:1012-25.

Geinisman Y, Ganeshina O, Yoshida R, Berry RW, Disterhoft JF, Gallagher M. (2004) Aging, spatial learning, and total synapse number in the rat CA1 stratum radiatum. *Neurobiol Aging*. Mar;25(3):407-16.

Gloor P. (1985) Neuronal generators and the problem of localization in electroencephalography: application of volume conductor theory to electroencephalography. *J Clin Neurophysiol*. Oct;2(4):327-54.

Gogolak G, Petsche H, Stumpf C. (1963) [The development of hippocampal theta rhythm in rabbits]. *Pflugers Arch Gesamte Physiol Menschen Tiere*. 277:166-77.

Gogolák G, Stumpf C, Petsche H, Sterc J. (1968) The firing pattern of septal neurons and the form of the hippocampal theta wave. *Brain Res*. Feb;7(2):201-7

Gray CM. (1994). Synchronous oscillations in neuronal systems: mechanisms and functions. *J. Comput. Neurosci*. 1:11–38

Green JD, Arduini AA. (1954) Hippocampal electrical activity in arousal. *J Neurophysiol*. Nov;17(6):533-57.

Green KF, Rawlins JN. (1979) Hippocampal theta in rats under urethane: generators and phase relations. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. Oct;47(4):420-9.

Grenier F, Timofeev I, Steriade M. (2001) Focal synchronization of ripples (80-200 Hz) in neocortex and their neuronal correlates. *J Neurophysiol*. Oct;86(4):1884-98.

Haider B, McCormick DA. (2009) Rapid neocortical dynamics: cellular and network mechanisms. *Neuron*. Apr 30;62(2):171-89.

Hasselmo ME, Schnell E, Barkai E. (1995) Dynamics of learning and recall at excitatory recurrent synapses and cholinergic modulation in rat hippocampal region CA3. *J Neurosci*. Jul;15(7 Pt 2):5249-62.

Hasselmo ME, Bodelón C, Wyble BP. (2002) A proposed function for hippocampal theta rhythm: separate phases of encoding and retrieval enhance reversal of prior learning. *Neural Comput*. Apr;14(4):793-817.

Henrie JA, Shapley R. (2005) LFP power spectra in V1 cortex: the graded effect of stimulus contrast. *J Neurophysiol*. Jul;94(1):479-90.

- Henze DA, Wittner L, Buzsáki G. (2002) Single granule cells reliably discharge targets in the hippocampal CA3 network in vivo. *Nat Neurosci.* Aug;5(8):790-5.
- Herreras O, Solís JM, Martín del Río R, Lerma J. (1987) Characteristics of CA1 activation through the hippocampal trisynaptic pathway in the unanaesthetized rat. *Brain Res.* Jun 9;413(1):75-86.
- Herreras O, Solís JM, Herranz AS, Martín del Río R, Lerma J. (1988a) Sensory modulation of hippocampal transmission. II. Evidence for a cholinergic locus of inhibition in the Schaffer-CA1 synapse. *Brain Res.* Oct 4;461(2):303-13.
- Herreras O, Solís JM, Muñoz MD, Martín del Río R, Lerma J. (1988b) Sensory modulation of hippocampal transmission. I. Opposite effects on CA1 and dentate gyrus synapses. *Brain Res.* Oct 4;461(2):290-302.
- Herreras O. (1990) Propagating dendritic action potential mediates synaptic transmission in CA1 pyramidal cells in situ. *J Neurophysiol.* Nov;64(5):1429-41.
- Heynen AJ, Abraham WC, Bear MF. (1996) Bidirectional modification of CA1 synapses in the adult hippocampus in vivo. *Nature.* May 9;381(6578):163-6.
- Heynen AJ, Quinlan EM, Bae DC, Bear MF. (2000) Bidirectional, activity-dependent regulation of glutamate receptors in the adult hippocampus in vivo. *Neuron.* Nov;28(2):527-36.
- Hollingsworth EB, McNeal ET, Burton JL, Williams RJ, Daly JW, Creveling CR. (1985) Biochemical characterization of a filtered synaptoneurosome preparation from guinea pig cerebral cortex: cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-generating systems, receptors, and enzymes. *J Neurosci.* Aug;5(8):2240-53.
- Hölscher C, Schmidt WJ. (1994) Quinolinic acid lesion of the rat entorhinal cortex pars medialis produces selective amnesia in allocentric working memory (WM), but not in egocentric WM. *Behav Brain Res* Aug 31;63(2):187-94.
- Holsheimer J. (1987) Electrical conductivity of the hippocampal CA1 layers and application to current-source-density analysis. *Exp Brain Res.* 67(2):402-10.
- Hopfield JJ. (1982) Neural networks and physical systems with emergent collective computational abilities. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Apr;79(8):2554-8.
- Hsu KS, Huang CC, Liang YC, Wu HM, Chen YL, Lo SW, Ho WC. (2002) Alterations in the balance of protein kinase and phosphatase activities and age-related impairments of synaptic transmission and long-term potentiation. *Hippocampus*;12(6):787-802.
- Ikeda S, Toyama K. (2000) Independent component analysis for noisy data--MEG data analysis. *Neural Netw.* Dec;13(10):1063-74.
- Iriarte J, Urrestarazu E, Valencia M, Alegre M, Malanda A, Viteri C, Artieda J. (2003) Independent component analysis as a tool to eliminate artifacts in EEG: a quantitative study. *J Clin Neurophysiol* Jul-Aug;20(4):249-57.
- Ishizuka N, Weber J, Amaral DG. (1990) Organization of intrahippocampal projections originating from CA3 pyramidal cells in the rat. *J Comp Neurol.* May 22;295(4):580-623.
- Jarrard LE. (1978) Selective hippocampal lesions: differential effects on performance by rats of a

- spatial task with preoperative versus postoperative training. *J Comp Physiol Psychol. Dec;92(6):1119-27.*
- Jarrard LE, Okaichi H, Steward O, Goldschmidt RB. (1984) On the role of hippocampal connections in the performance of place and cue tasks: comparisons with damage to hippocampus. *Behav Neurosci. Dec;98(6):946-54.*
- Jarrard LE., (1995). What does the hippocampus really do? *Behav Brain Res.5 Nov;71(1-2):1-10.*
- Jenkins J, Heckers S, Mesulam M, Wiley RG, Berger-Sweeney J (1993) Effects of 192 IgG-saporin-induced medial septal lesions on hippocampal activity in free-moving rats. *Soc Neurosci Abstr 19:412*
- Jones S, Yakel JL. (1999) Inhibitory interneurons in hippocampus. *Cell Biochem Biophys. 31(2):207-18.*
- Jung KY, Kim JM, Kim DW, Chung CS. (2005) Independent component analysis of generalized spike-and-wave discharges: primary versus secondary bilateral synchrony. *Clin Neurophysiol. Apr;116(4):913-9*
- Jung, R., Kornmuller, A. (1938) Ein methodik der abteilung lokalsierter potential schwankingen aus subcorticalen hirnyebieten. *Arch. Psychiat. Neuroenkr. 109: 1-30.*
- Jung TP, Makeig S, McKeown MJ, Bell AJ, Lee TW, Sejnowski TJ. (2001) Imaging Brain Dynamics Using Independent Component Analysis. *Proc IEEE Inst Electr Electron Eng. Jul 1;89(7):1107-1122.*
- Kandel A, Buzsáki G. (1997) Cellular-synaptic generation of sleep spindles, spike-and-wave discharges, and evoked thalamocortical responses in the neocortex of the rat. *J Neurosci. Sep 1;17(17):6783-97.*
- Kelly KM, Nadon NL, Morrison JH, Thibault O, Barnes CA, Blalock EM. (2006) The neurobiology of aging. *Epilepsy Res. Jan;68 Suppl 1:S5-20.*
- Kemp IR, Kaada BR. (1975) The relation of hippocampal theta activity to arousal, attentive behaviour and somato-motor movements in unrestrained cats. *Brain Res. Sep 23;95(2-3):323-42.*
- Kemp N, McQueen J, Faulkes S, Bashir ZI. (2000) Different forms of LTD in the CA1 region of the hippocampus: role of age and stimulus protocol. *Eur J Neurosci. Jan;12(1):360-6.*
- Kesslak JP, Gage FH 3rd. (1986) Recovery of spatial alternation deficits following selective hippocampal destruction with kainic acid. *Behav Neurosci Apr;100(2):280-3.* Erratum in: *Behav Neurosci 1987 Oct;101(5):633.*
- Kocsis B, Bragin A, Buzsáki G. (1999) Interdependence of multiple theta generators in the hippocampus: a partial coherence analysis. *J Neurosci. Jul 15;19(14):6200-12.*
- Kohonen T. (1987) Adaptive, associative, and self-organizing functions in neural computing. *Appl Opt. Dec 1;26(23):4910-8*
- Komorowski RW, Manns JR, Eichenbaum H. (2009) Robust conjunctive item-place coding by hippocampal neurons parallels learning what happens where. *J Neurosci. Aug 5;29(31):9918-29.*
- Korovaichuk A, Makarova J, Makarov VA, Benito N, Herreras O. (2010) Minor contribution of

- principal excitatory pathways to hippocampal LFPs in the anesthetized rat: a combined independent component and current source density study. *J Neurophysiol.* Jul;104(1):484-97.
- Kreiman G, Hung CP, Kraskov A, Quiroga RQ, Poggio T, DiCarlo JJ. (2006) Object selectivity of local field potentials and spikes in the macaque inferior temporal cortex. *Neuron.* Feb 2;49(3):433-45.
- Kumar A, Foster TC. (2007) Shift in induction mechanisms underlies an age-dependent increase in DHPG-induced synaptic depression at CA3 CA1 synapses. *J Neurophysiol.* Nov;98(5):2729-36
- Lasztóczy B, Tukker JJ, Somogyi P, Klausberger T. (2011) Terminal field and firing selectivity of cholecystokinin-expressing interneurons in the hippocampal CA3 area. *J Neurosci.* Dec 7;31(49):18073-93.
- Laubach M, Shuler M, Nicolelis MA. (1999) Independent component analyses for quantifying neuronal ensemble interactions. *J Neurosci Methods.* Dec 15;94(1):141-54.
- Lee MG, Chrobak JJ, Sik A, Wiley RG, Buzsáki G (1994) Hippocampal theta activity following selective lesion of the septal cholinergic system. *Neuroscience* 62:1033–1047.
- Leung LS. (1984) Theta rhythm during REM sleep and waking: correlations between power, phase and frequency. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* Dec;58(6):553-64.
- Leung LW, Yim CY. (1991) Intrinsic membrane potential oscillations in hippocampal neurons in vitro. *Brain Res.* Jul 12;553(2):261-74.
- Leung LS. (1992) Fast (beta) rhythms in the hippocampus: a review. *Hippocampus.* Apr;2(2):93-8.
- Leung LS, Roth L, Canning KJ. (1995) Entorhinal inputs to hippocampal CA1 and dentate gyrus in the rat: a current-source-density study. *J Neurophysiol.* Jun;73(6):2392-403.
- Leung LS. (1998) Generation of theta and gamma rhythms in the hippocampus. *Neurosci Biobehav Rev.* Mar;22(2):275-90
- Liberson WT, Cadilhac D, Cadilhac J. (1954) Experimental hippocampal crisis. *Montp Med.* Jun;45(6):515-47.
- Liu J, Newsome WT. (2006) Local field potential in cortical area MT: stimulus tuning and behavioral correlations. *J. Neurosci.* Jul 26;26(30):7779-90.
- Llinás RR. (1988) The intrinsic electrophysiological properties of mammalian neurons: insights into central nervous system function. *Science.* Dec 23;242(4886):1654-64.
- Lomber SG. (1999) The advantages and limitations of permanent or reversible deactivation techniques in the assessment of neural function. *J Neurosci Methods.* Jan;86(2):109-17.
- Lømø T. (1971) Patterns of activation in a monosynaptic cortical pathway: the perforant path input to the dentate area of the hippocampal formation. *Exp. Brain Res* 12: 18–45.
- Lopes da Silva FH, Witter MP, Boeijinga PH, Lohman AH. (1990) Anatomic organization and physiology of the limbic cortex. *Physiol Rev.* Apr;70(2):453-511
- Lopes da Silva FH, Wieringa HJ, Peters MJ. (1991) Source localization of EEG versus MEG: empirical comparison using visually evoked responses and theoretical considerations. *Brain*

Topogr. Winter;4(2):133-42.

López-Aguado L, Ibarz JM, Herreras O. (2000) Modulation of dendritic action currents decreases the reliability of population spikes. *J Neurophysiol.* Feb;83(2):1108-14.

López-Aguado L, Ibarz JM, Herreras O. (2001) Activity-dependent changes of tissue resistivity in the CA1 region in vivo are layer-specific: modulation of evoked potentials. *Neuroscience.*108(2):249-62.

López-Aguado L, Ibarz JM, Varona P, Herreras O. (2002) Structural inhomogeneities differentially modulate action currents and population spikes initiated in the axon or dendrites. *J Neurophysiol.* Nov;88(5):2809-20.

Lorente de Nó, R. (1934). Studies on the structure of the cerebral cortex II. Continuation of the study of the Ammonic system. *Journal of Psychology and Neurology*, 46, 113-177.

Lorente de Nó R. (1947) A study of nerve physiology. *Stud Rockefeller Inst Med Res Repr.* 131:1-496.

Macleay, P.D., Horwitz, N.H. & Robinson, F. (1952). Olfactory-like responses in pyriform area to non-olfactory stimulation. *Yale Journal of Biological Medicine*, 25, 159-172.

Magee JC, Johnston D. (1995) Synaptic activation of voltage-gated channels in the dendrites of hippocampal pyramidal neurons. *Science.* Apr 14;268(5208):301-4.

Makarov VA, Makarova J, Herreras O. (2010) Disentanglement of local field potential sources by independent component analysis. *J Comput Neurosci.* Dec;29(3):445-57.

Makarova J, Makarov VA, Herreras O. (2010) Generation of sustained field potentials by gradients of polarization within single neurons: a macroscopic model of spreading depression. *J Neurophysiol.* May;103(5):2446-57

Makarova J, Ibarz JM, Makarov VA, Benito N, Herreras O. (2011) Parallel readout of pathway-specific inputs to laminated brain structures. *Front Syst Neurosci.* 5:77

Makeig S, Debener S, Onton J, Delorme A. (2004) Mining event-related brain dynamics. *Trends Cogn Sci.* May;8(5):204-10.

Manahan-Vaughan D. (1997) Group 1 and 2 metabotropic glutamate receptors play differential roles in hippocampal long-term depression and long-term potentiation in freely moving rats. *J Neurosci.* May 1;17(9):3303-11.

Manahan-Vaughan D, Braunewell KH. (1999) Novelty acquisition is associated with induction of hippocampal long-term depression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jul 20;96(15):8739-44.

Mann EO, Paulsen O. (2005) Mechanisms underlying gamma ('40 Hz') network oscillations in the hippocampus--a mini-review. *Prog Biophys Mol Biol.* Jan;87(1):67-76.

Marr D. (1971) Simple memory: a theory for archicortex. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* Jul 1;262(841):23-81.

Maxwell, J.C. (1865) A Dynamical Theory of the Electromagnetic Field. F.R.S.

McBain CJ. (1998) A short-term mechanism of plasticity for interneurons? *J Physiol.* Sep 1;511

(Pt 2):331.

McBain CJ, Fisahn A. (2001) Interneurons unbound. *Nat Rev Neurosci.* Jan;2(1):11-23.

Mitzdorf U. (1985) Current source-density method and application in cat cerebral cortex: investigation of evoked potentials and EEG phenomena. *Physiol Rev.* Jan;65(1):37-100

Mizumori SJ, Barnes CA, McNaughton BL.(1989) Reversible inactivation of the medial septum: selective effects on the spontaneous unit activity of different hippocampal cell types. *Brain Res.* Oct 23;500(1-2):99-106.

Moeller F, LeVan P, Gotman J. (2011) Independent component analysis (ICA) of generalized spike wave discharges in fMRI: comparison with general linear model-based EEG-fMRI. *Hum Brain Mapp.* Feb;32(2):209-17

Montemurro MA, Rasch MJ, Murayama Y, Logothetis NK, Panzeri S. (2008) Phase-of-firing coding of natural visual stimuli in primary visual cortex. *Curr Biol.* Mar 11;18(5):375-80.

Montgomery SM, Buzsáki G. (2007) Gamma oscillations dynamically couple hippocampal CA3 and CA1 regions during memory task performance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Sep 4;104(36):14495-500.

Montgomery SM, Betancur MI, Buzsáki G. (2009) Behavior-dependent coordination of multiple theta dipoles in the hippocampus. *J Neurosci.* Feb 4;29(5):1381-94.

Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J. (1982) Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature.* Jun 24;297(5868):681-3.

Mouraux A, Iannetti GD. (2008) Across-trial averaging of event-related EEG responses and beyond. *Magn Reson Imaging.* Sep;26(7):1041-54.

Muller RU, Kubie JL. (1987) The effects of changes in the environment on the spatial firing of hippocampal complex-spike cells. *J Neurosci.* Jul;7(7):1951-68.

Muller RU, Kubie JL, Saypoff R. (1991) The hippocampus as a cognitive graph (abridged version). *Hippocampus* Jul;1(3):243-6.

Nicholson C, Llinas R. (1971) Field potentials in the alligator cerebellum and theory of their relationship to Purkinje cell dendritic spikes. *J Neurophysiol.* Jul;34(4):509-31

Nicholson C, Freeman JA. (1975) Theory of current source-density analysis and determination of conductivity tensor for anuran cerebellum. *J Neurophysiol.* Mar;38(2):356-68.

Nicholson DA, Yoshida R, Berry RW, Gallagher M, Geinisman Y. (2004) Reduction in size of perforated postsynaptic densities in hippocampal axospinous synapses and age-related spatial learning impairments. *J Neurosci.* Sep 1;24(35):7648-53.

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

O'Keefe J., Nadel L., (1978) The Hippocampus as a Cognitive Map. *Clarendon Press, Oxford.*

O'Keefe J, Nadel L, Willner J. (1979) Tuning out irrelevancy? Comments on Solomon's temporal mapping view of the hippocampus. *Psychol Bull.* Nov;86(6):1280-9.

- O'Reilly RC, McClelland JL. (1994) Hippocampal conjunctive encoding, storage, and recall: avoiding a trade-off. *Hippocampus*. Dec;4(6):661-82.
- Onteniente B, Tago H, Kimura H, Maeda T. (1986) Distribution of gamma-aminobutyric acid-immunoreactive neurons in the septal region of the rat brain. *J Comp Neurol*. Jun 15;248(3):422-30.
- Onton J, Westerfield M, Townsend J, Makeig S. (2006) Imaging human EEG dynamics using independent component analysis. *Neurosci Biobehav Rev*. 30(6):808-22.
- Paxinos, G. & Watson, C. (1998). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, London.
- Pesaran B, Pezaris JS, Sahani M, Mitra PP, Andersen RA. (2002) Temporal structure in neuronal activity during working memory in macaque parietal cortex. *Nat Neurosci*. Aug;5(8):805-11.
- Petsche H, Stumpf C. (1960) Topographic and toposcopic study of origin and spread of the regular synchronized arousal pattern in the rabbit. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. Aug;12:589-600.
- Petsche H, Stumpf C, Gogolak G. (1962) The significance of the rabbit's septum as a relay station between the midbrain and the hippocampus. I. The control of hippocampus arousal activity by the septum cells. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. Apr;14:202-11.
- Petsche H, Gogolak G, Vanzwieten PA. (1965) Rhythmicity of septal cells discharges at various levels of reticular excitation. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. Jul;19:25-33.
- Purpura DP. (1959) Nature of electrocortical potentials and synaptic organizations in cerebral and cerebellar cortex. *Int Rev Neurobiol*. 1:47-163.
- Rall W. (1962a) Theory of physiological properties of dendrites. *Ann N Y Acad Sci*. Mar 2;96:1071-92.
- Rall W. (1962b) Electrophysiology of a dendritic neuron model. *Biophys J*. Mar;2(2 Pt 2):145-67.
- Ramón y Cajal, S. (1902). Sobre un ganglio especial de la corteza esfeno-occipital. *Trab del Lab de invest Biol Univ Madrid*, 1, 189-201.
- Ranck JB Jr. (1973) Studies on single neurons in dorsal hippocampal formation and septum in unrestrained rats. I. Behavioral correlates and firing repertoires. *Exp. Neurol*. Nov;41(2):461-531.
- Rapp PR, Gallagher M. (1996) Preserved neuron number in the hippocampus of aged rats with spatial learning deficits. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Sep 3;93(18):9926-30.
- Rappelsberger P, Pockberger H, Petsche H. (1981) Current source density analysis: methods and application to simultaneously recorded field potentials of the rabbit's visual cortex. *Pflugers Arch*. Jan;389(2):159-70.
- Rasmussen T, Schliemann T, Sørensen JC, Zimmer J, West MJ. (1996) Memory impaired aged rats: no loss of principal hippocampal and subicular neurons. *Neurobiol Aging*. Jan-Feb;17(1):143-7.
- Rawlins JN, Feldon J, Gray JA. (1979) Septo-hippocampal connections and the hippocampal theta

rhythm. *Exp Brain Res*. Sep;37(1):49-63.

Rogers JL, Kesner RP. (2003) Cholinergic modulation of the hippocampus during encoding and retrieval. *Neurobiol Learn Mem*. Nov;80(3):332-42.

Rosenzweig ES, Barnes CA. (2003) Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition. *Prog Neurobiol*. Feb;69(3):143-79.

Schenk F, Morris RG. (1985) Dissociation between components of spatial memory in rats after recovery from the effects of retrohippocampal lesions. *Exp Brain Res*. 58(1):11-28.

Sederberg PB, Kahana MJ, Howard MW, Donner EJ, Madsen JR. (2003) Theta and gamma oscillations during encoding predict subsequent recall. *J Neurosci*. Nov 26;23(34):10809-14.

Shapiro ML, Eichenbaum H. (1999) Hippocampus as a memory map: synaptic plasticity and memory encoding by hippocampal neurons. *Hippocampus*. 9(4):365-84.

Shimono K, Brucher F, Granger R, Lynch G, Taketani M. (2000) Origins and distribution of cholinergically induced beta rhythms in hippocampal slices. *J Neurosci*. Nov 15;20(22):8462-73.

Singer W., (2009) Distributed processing and temporal codes in neuronal networks. *Cogn Neurodyn*. 3:189-196

Smythe JW, Colom LV, Bland BH. (1992) The extrinsic modulation of hippocampal theta depends on the coactivation of cholinergic and GABA-ergic medial septal inputs. *Neurosci Biobehav Rev*. Fall;16(3):289-308.

Somogyi P, Klausberger T. (2005) Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus. *J Physiol*. Jan 1;562(Pt 1):9-26.

Squire LR. (1992) Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychol Rev*. Apr;99(2):195-231. Review. Erratum in: *Psychol Rev* 1992 Jul;99(3):582.

Suzuki SS, Smith GK. (1988) Spontaneous EEG spikes in the normal hippocampus. IV. Effects of medial septum and entorhinal cortex lesions. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. Jul;70(1):73-83.

Swanson LW, Cowan WM. (1979) The connections of the septal region in the rat. *J Comp Neurol*. Aug 15;186(4):621-55.

Szymanski FD, Garcia-Lazaro JA, Schnupp JW. (2009) Current source density profiles of stimulus-specific adaptation in rat auditory cortex. *J Neurophysiol*. Sep;102(3):1483-90

Tanskanen JM, Mikkonen JE, Penttonen M. (2005) Independent component analysis of neural populations from multielectrode field potential measurements. *J Neurosci Methods*. Jun 30;145(1-2):213-32

Thiels E, Barrionuevo G, Berger TW. (1994) Excitatory stimulation during postsynaptic inhibition induces long-term depression in hippocampus in vivo. *J Neurophysiol*. Dec;72(6):3009-16.

Thompson LT, Best PJ. (1989) Place cells and silent cells in the hippocampus of freely-behaving rats. *J Neurosci*. Jul;9(7):2382-90.

- Thomson, MA. (1975) Maturation de la réponse interhippocampique. Mise en évidence et localisation des synapses inhibitrices et excitation dans la corné d'Ammon du jeune lapin. *Electroenceph. clin. Neurophysiol.* 39, pp. 599–608
- Tömböl T, Petsche H. (1969) The histological organization of the pacemaker for the hippocampal theta rhythm in the rabbit. *Brain Res. Feb;12(2):414-26.*
- Tóth K, McBain CJ (1998) Afferent-specific innervation of two distinct AMPA receptor subtypes on single hippocampal interneurons. *Nat Neurosci.* Nov;1(7):572-8.
- Treves A, Rolls ET. (1992) Computational constraints suggest the need for two distinct input systems to the hippocampal CA3 network. *Hippocampus.* Apr;2(2):189-99.
- Vanderwolf CH. (1969) Hippocampal electrical activity and voluntary movement in the rat. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* Apr;26(4):407-18.
- Vanderwolf CH, Kramis R, Robinson TE. (1977) Hippocampal electrical activity during waking behaviour and sleep: analyses using centrally acting drugs. *Ciba Found Symp. (58):199-226.*
- Varona P, Ibarz JM, López-Aguado L, Herreras O. (2000) Macroscopic and subcellular factors shaping population spikes. *J Neurophysiol.* Apr;83(4):2192-208.
- Vertes RP. (1979) Brain stem gigantocellular neurons: patterns of activity during behavior and sleep in the freely moving rat. *J Neurophysiol. Jan;42(1 Pt 1):214-28.*
- Vigario R, Sarela J, Jousmaki V, Hamalainen M, Oja E. (2000) Independent component approach to the analysis of EEG and MEG recordings. *IEEE Trans Biomed Eng* 47: 589–593.
- Vinogradova OS, Semyonova TP, Konovalov VP. (1970) Trace phenomena in the neurons of the limbic structures. In: Pribram K, Broadbent A, editors. *Biology of memory.* New York: Academic Press. p 191–221
- Vinogradova OS, Brazhnik ES, Stafekhina VS, Kichigina VF. (1995) Modulation of septal influences on hippocampal neurons by cholinergic substances. *Neurosci Behav Physiol.* Nov-Dec;25(6):453-61.
- Vinogradova OS. (2001) Hippocampus as comparator: role of the two input and two output systems of the hippocampus in selection and registration of information. *Hippocampus.* 11(5):578-98.
- Vouimba RM, Foy MR, Foy JG, Thompson RF. (2000) 17beta-estradiol suppresses expression of long-term depression in aged rats. *Brain Res Bull.* Dec;53(6):783-7.
- Vreugdenhil M, Toescu EC. (2005) Age-dependent reduction of gamma oscillations in the mouse hippocampus in vitro. *Neuroscience.*;132(4):1151-7.
- Whishaw IQ, Vanderwolf CH. (1973) Hippocampal EEG and behavior: changes in amplitude and frequency of RSA (theta rhythm) associated with spontaneous and learned movement patterns in rats and cats. *Behav Biol.* Apr;8(4):461-84.
- Whishaw IQ, Schallert T. (1977) Hippocampal RSA (theta), apnea, bradycardia and effects of atropine during underwater swimming in the rat. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* Mar;42(3):389-96.

- Whishaw IQ, Cassel JC, Jarrad LE. (1995) Rats with fimbria-fornix lesions display a place response in a swimming pool: a dissociation between getting there and knowing where. *J Neurosci.* Aug;15(8):5779-88
- Whittington MA, Traub RD, Jefferys JG. (1995) Synchronized oscillations in interneuron networks driven by metabotropic glutamate receptor activation. *Nature.* Feb 16;373(6515):612-5.
- Wilson MA, McNaughton BL. (1993) Dynamics of the hippocampal ensemble code for space. *Science.* Aug 20;261(5124):1055-8.
- Winson J. (1974) Patterns of hippocampal theta rhythm in the freely moving rat. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* Mar;36(3):291-301.
- Witter MP, Amaral DG. (1991) Entorhinal cortex of the monkey: V. Projections to the dentate gyrus, hippocampus, and subicular complex. *J Comp Neurol.* May 15;307(3):437-59.
- Yeckel MF, Berger TW. (1990) Feedforward excitation of the hippocampus by afferents from the entorhinal cortex: redefinition of the role of the trisynaptic pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Aug;87(15):5832-6.
- Ylinen A, Bragin A, Nádasdy Z, Jandó G, Szabó I, Sik A, Buzsáki G. (1995) Sharp wave-associated high-frequency oscillation (200 Hz) in the intact hippocampus: network and intracellular mechanisms. *J Neurosci.* Jan;15(1 Pt 1):30-46.
- Zhou W, Zhou J, Zhao H, Ju L. (2005) Removing eye movement and power line artifacts from the EEG based on ICA. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* 6:6017-20.