

1 T
672.822
COL

MECANISMOS BÁSICOS EN LA GENERACIÓN DE RITMO THETA
POR EL SISTEMA SEPTO-HIPOCÁMPICO

Luis V. Colom
Tesis de Doctorado



ME 08981

I
612.822 COL
Mecanismos básicos en la ...
Colom Scalona, Luis V



FC08981

RESUMEN

La generación del ritmo theta por el hipocampo depende de una compleja coactivación de varias estructuras interrelacionadas. El hipocampo no solo puede normalmente generar ritmo theta, sino que puede también oscilar en el rango de la frecuencia theta (3-12 Hz) sin ninguna aferencia rítmica. La habilidad del hipocampo de oscilar en este rango de frecuencias depende de un delicado balance entre la activación de fibras aferentes excitatorias colinérgicas y la activación de fibras inhibitorias GABAérgicas. Las fibras colinérgicas y GABAérgicas constituyen la mayor parte del contingente de fibras que el hipocampo recibe del *septum medialis* (SM). La coactivación de estas fibras es necesaria para la generación del ritmo theta por el hipocampo. En condiciones fisiológicas la integridad del SM es necesaria para la generación del ritmo theta por el hipocampo. El hipocampo y el SM tienen poblaciones de neuronas rítmicas altamente correlacionadas. Las unidades elementales en la generación del ritmo theta hipocámpico son las neuronas piramidales y granulosas rítmicas. Las neuronas rítmicas del SM y del hipocampo están sincronizadas durante la generación del ritmo theta. Las población de células rítmicas del SM sincroniza a la población de células rítmicas hipocámpicas. La sincronización de las células septales es necesaria para mantener una salida sincrónica que permite la generación de actividad rítmica por el hipocampo. El sincronismo de las células septales depende de vías ascendentes provenientes del tronco encefálico y desaparece si esas aferencias son bloqueadas. Un región nodal en la transmisión de información del tronco encefálico al sistema septo-hipocámpico está ubicada en el hipotálamo posterior, en un área que comprende los núcleos hipotalámicos posteriores y supramamilares (HP-SUM).

INTRODUCCIÓN

El ritmo theta, mecanismos sincronizantes y los osciladores en el sistema septo-hipocámpico

La formación hipocámpica está compuesta por un grupo de estructuras filogenéticamente antiguas, que constituyen una gran parte del cerebro de mamíferos primitivos (ej. ratas, gatos) y permanece como una parte importante del lóbulo temporal en los primates.

El ritmo theta es un potencial de campo de forma casi sinusoidal, generado por grandes poblaciones neuronales que oscilan sincrónicamente a frecuencias de 3-12 Hz en la formación hipocámpica, constituyendo la actividad rítmica de mayor amplitud que puede ser registrada en el cerebro de mamíferos primitivos. Este ritmo está también presente en el hipocampo de primates y aunque no ha sido demostrado en el hipocampo humano, la presencia en este último de neuronas rítmicas oscilando en el rango de la frecuencia theta, sugiere la existencia de mecanismos sincronizantes similares (Steward and Fox, 1991; Isokawa-Akesson, Wilson and Babb, 1987; Isokawa-Akesson, Babb and Wilson, 1987).

Es pertinente mencionar algunos conceptos generales acerca del fenómeno de ritmicidad, extraídos de la revisión: "Basic mechanisms of cerebral rhythmical activities." (Mecanismos básicos de las actividades rítmicas cerebrales) de Steriade, Gloor, Llinás, Lopez da Silva y Mesulam (1990). Sincronización es un estado en el cual dos o más osciladores muestran la misma frecuencia debido a ciertas formas de cointeracción. No hay necesidad de decidir entre las dos partes de una alternativa: si las propiedades intrínsecas de neuronas individualmente son esenciales para la génesis de las ondas cerebrales de diferentes frecuencias, o si dichos ritmos emergen básicamente de interacciones sinápticas entre grandes grupos de poblaciones neuronales.

Algunas neuronas del sistema nervioso central muestran oscilaciones espontáneas *in vitro*, aun después de bloquear la transmisión sináptica. Otros tipos de neuronas pueden ser llevados a un estado oscilatorio inyectando intracelularmente corrientes, cuando están bañadas por medios especiales, debido a sus conductancias iónicas especiales. Las propiedades electrofisiológicas intrínsecas de neuronas talámicas, neocorticales y archicorticales les permiten oscilar dentro de diferentes espectros de frecuencias y muchos de los patrones de los ritmos electroencefalográficos

(EEG) básicos requieren conductancias especiales de sodio, calcio y potasio diferentes de las que convencionalmente participan en la generación de los potenciales de acción. Existe ahora una amplia evidencia de que, bajo condiciones experimentales impuestas, neuronas aisladas pueden mostrar oscilaciones, usualmente dentro de una banda de frecuencia de 1 a 20 Hz.

En el cerebro intacto sin embargo, las propiedades intrínsecas de células individuales están controladas por influencias provenientes de marcapasos sincronizantes o simplemente por ciertas redes neuronales cuyas conexiones determinan fuerzas que se superponen a las propiedades individuales de las neuronas. La noción de sincronización en el EEG presupone la coactivación de un grupo grande de neuronas, adquiriendo la suma de los eventos sinápticos provenientes de este grupo suficiente magnitud como para poder ser registrados con electrodos de baja resistencia colocados dentro del cerebro o sobre el cuero cabelludo. El rol de las redes sinápticas en la génesis de varios ritmos electroencefalográficos es enfatizado por el hecho de que los distintos grupos neuronales, a pesar de que sus elementos constituyentes tienen esencialmente las mismas propiedades electrofisiológicas y las mismas conductancias iónicas, oscilan a frecuencias diferentes. También importa destacar que algunas oscilaciones electroencefalográficas de los sistemas tálamo-corticales desaparecen cuando son desconectados de sus marcapasos de ritmo a pesar de que las neuronas individualmente mantienen sus oscilaciones intrínsecas.

Los sistemas sincronizantes pueden ser visualizados como un único marcapaso o como múltiples estructuras interconectadas, presentando propiedades de ritmicidad cada elemento constituyente del conjunto. Para algunos tipos de oscilaciones cerebrales, como los husos (spindles), el marcapaso está localizado dentro del núcleo reticular talámico, constituido por neuronas químicamente homogéneas con las conexiones necesarias para asegurar la propagación de ritmicidad a todos los núcleos talámicos de proyección cortical. El criterio para clasificar a un grupo celular como un marcapaso único es la pérdida de oscilaciones en las estructuras conectadas al marcapaso y la presencia de oscilaciones en el marcapaso desconectado de todas sus entradas sinápticas. Un ejemplo de sistemas de sincronización múltiples es probablemente el involucrado en la generación de las ondas theta, las cuales se originan en una serie de estaciones del sistema límbico sinápticamente acopladas. En el caso de estos sistemas, donde cada elemento tiene propiedades de marcapaso, el punto de inicio de la actividad rítmica puede

cambiar de momento a momento de acuerdo a la actividad de sus distintas partes en los distintos estados conductuales del animal, pero característicamente en dichos sistemas sincronizantes la lesión de cualquiera de sus partes no previene la ocurrencia de ritmicidad en el resto. Este concepto de sistemas sincronizantes múltiples trabajando juntos para la generación del ritmo theta no excluye la idea de que ciertas áreas (como el SM) jueguen un rol crítico en la generación de ritmicidad, pero enfatiza la necesidad de múltiples estructuras con capacidad de generar ritmos o afectar críticamente los procesos rítmicos para la generación normal de ritmicidad.

La formación hipocámpica

Anatomía

La formación hipocámpica es una parte filogenéticamente antigua de la corteza que durante el desarrollo es desplazada desde la superficie al interior del cerebro. En los mamíferos inferiores, como los roedores y felinos, se curva debajo de la neocorteza del lóbulo temporal (ejemplo: la corteza entorrinal) o debajo de la neocorteza de los lóbulos occipital, parietal y temporal (ejemplo: hipocampo propio, giro dentado (GD) y complejo subicular). En los primates toda la formación hipocámpica está restringida al lóbulo temporal (figura 1).

La formación hipocámpica consiste de cuatro partes principales: 1) el área entorrinal (*entorhinalis*), 2) el complejo subicular (*subiculum*, *presubiculum*, *postsubiculum* y *parasubiculum*), 3) el hipocampo propio o cuerno de Ammón (*cornu Ammonis*) y 4) el GD (*gyrus dentatus*). Debe destacarse sin embargo que algunos autores como Lopez da Silva, Witter, Boeijinga y Lohman (1990) solamente incluyen en la formación hipocámpica a las partes 2, 3 y 4 excluyendo a la corteza entorrinal.

El término hipocampo es usado para referirse al hipocampo propio y al GD, y fue creado debido a la semejanza que muestran dichas áreas con el caballito de mar (*hippo-campus* en griego) en cortes histológicos.

Este estudio se centrará en el estudio del hipocampo haciendo solamente referencias ocasionales al área entorrinal y al complejo subicular.

El hipocampo constituye una gran parte del cerebro en los mamíferos inferiores y una parte importante del lóbulo temporal en los primates. El tamaño absoluto del hipocampo se incrementa con el desarrollo filogenético. Así por ejemplo, Stephan (1966) demostró que el hipocampo del hombre es dos veces

más grande que el de los monos, el cual a su vez es dos veces más grande que el de insectívoros (ejemplo: puercoespín).

En contraste con la neocorteza el hipocampo es una estructura relativamente simple. Está compuesta de dos tipos celulares principales (las células piramidales y granulosas) distribuidas en capas discretas, con aferencias y eferencias altamente organizadas en forma laminar (figura 2). El hipocampo en los mamíferos inferiores es una estructura larga, con forma de herradura, extendiéndose casi desde el septum hasta el lóbulo temporal. En las especies superiores es progresivamente desplazado hacia el lóbulo temporal y se restringe a dicho lóbulo en los primates.

El hipocampo se compone, como decíamos anteriormente, de dos regiones: 1) el hipocampo propio o cuerno de Ammón y 2) el GD. El cuerno de Ammón ha sido dividido en cuatro subregiones por Lorente de Nó (1934): CA1, CA2, CA3 y CA4, y en dos regiones por Ramón y Cajal (1911): 1) región superior y 2) región inferior. CA1 es equivalente a la región superior y CA3 a la región inferior. CA2 es un área pequeña de transición entre CA1 y CA3. Es todavía motivo de debate si CA4 pertenece al hipocampo propio, como originalmente pensó Lorente de Nó, o al GD. Nosotros seguiremos la opinión de Amaral (1978) quién reconoce CA4 y la parte más medial de CA3 (CA3c) como parte del GD y no del cuerno de Ammón. Por lo tanto denominaremos a CA4 como la región hilar del GD o simplemente *hilus*. La célula más frecuente en CA1, CA2 y CA3 es la célula piramidal. Las células piramidales de estas áreas se ubican en paralelo, sus cuerpos celulares se disponen formando una capa definida: el estrato piramidal (*stratum pyramidale*). La principal célula en el giro dentado es la célula granulosa. Estas células se ubican también en paralelo y forman una capa de gran densidad: el estrato granuloso (*stratum granulare*). En la región hilar este arreglo en paralelo se pierde, la distribución celular es irregular y las células piramidales tan prevalentes en el cuerno de Ammón se interponen con más de 20 tipos de células no piramidales, incluyendo a células granulosas. El arreglo en paralelo de las células principales en la mayor parte del hipocampo y la distribución laminar de aferencias y eferencias es importante en el procesamiento de información por dicha estructura y es también un elemento crítico en la generación de potenciales de campo de gran amplitud por el hipocampo, ya que permite la sumación espacial de los potenciales sinápticos de la mayoría de sus neuronas.

En un corte transversal del hipocampo (perpendicularmente a su eje principal) las células principales aparecen distribuidas en dos semicírculos que se miran desde su parte abierta, pero que no se confrontan perfectamente, de tal manera que uno de los dos extremos de cada semicírculo es también el centro del otro. Ambos semicírculos tienen dimensiones diferentes, constituyendo el más grande la capa de células piramidales del hipocampo propio y el más pequeño la capa de células granulosas del dentado.

La organización intrínseca es remarcablemente similar todo a lo largo del hipocampo. Las neuronas eferentes principales del hipocampo son las células piramidales. Las células piramidales más grandes se extienden desde el *hilus* del dentado todo a través de la curvatura lateral del hipocampo, constituyendo las regiones CA3 y CA2 de Lorente de Nó o la región inferior de Ramón y Cajal. Las células piramidales pequeñas se extienden desde el final de la curvatura lateral del hipocampo hasta la línea media, constituyendo la región CA1 de Lorente de Nó o la región superior de Ramón y Cajal. Las células piramidales en las regiones CA1, CA2 y CA3 se disponen en una capa celular única, que es típica de la archicorteza, sector de la corteza que aparece primero en la filogenia. De los ángulos del cuerpo triangular de las células piramidales emergen tres dendritas principales, la más desarrollada se dirige hacia el centro del semicírculo del hipocampo propio ramificándose extensamente y determinando la capa llamada *stratum radiatum* (estrato radiado) por la distribución radial de sus dendritas, las otras dos dendritas viajan oblicuamente, también ramificándose, hacia la superficie del hipocampo determinando la capa llamada *stratum oriens* (estrato oriental), el axón de las células piramidales nace de la parte del cuerpo celular que mira a la superficie del hipocampo, viaja superficialmente determinando una capa llamada *alveus* por su color blanco y abandona de manera variable al hipocampo propio de acuerdo al área estudiada. El GD contiene el segundo tipo celular principal del hipocampo: la célula granulosa. Estas células son unipolares con una dendrita que se extiende alejándose del centro del GD (capa molecular del dentado) y un axón que viaja hacia dicho centro (hacia la región hilar) y luego penetra la región CA3 donde establece sinapsis con células piramidales. Estos axones reciben el nombre de fibras musgosas y se distribuyen a través de la región CA3 formando un claro haz de fibras. La región CA2, de acuerdo con Lorente de Nó (1934), consiste de células piramidales grandes que no reciben fibras musgosas. La existencia de

esta región como una entidad con características particulares es todavía discutida y autores como Blackstad (1956) niegan su existencia.

La organización intrínseca del hipocampo es simple en comparación con la neocorteza. La principal vía de pasaje a través del hipocampo consiste en un circuito trisináptico. Este circuito es mayoritariamente preservado cuando el hipocampo se corta transversalmente, debido a su arreglo laminar y perpendicular al eje mayor del mismo. Muchas de las aferencias al hipocampo terminan en las células granulosas. Dichas células granulosas proyectan enteramente a la región CA3 ipsilateral, donde establecen sinapsis con las células piramidales que en turno mandan proyecciones hacia afuera del hipocampo, principalmente a la región lateral del complejo septal y una rama colateral del axón hacia CA1. Estas fibras colaterales, llamadas colaterales de Schaffer, terminan estableciendo sinapsis con las dendritas apicales (las que proyectan hacia el centro del semicírculo hipocámpico) de las células piramidales de las regiones CA1 homolateral y contralateral. Los axones de las células piramidales de CA1 proyectan primariamente hacia la región cortical adyacente: el subículo, constituyendo la principal eferencia del hipocampo.

Si bien este circuito trisináptico ha sido bien estudiado, estudios fisiológicos detallados de las interneuronas hipocámpicas y de sus conexiones sinápticas han sido escasos a pesar de sus excelentes descripciones anatómicas (Ramón y Cajal, 1911; Lorente de Nó, 1934).

En adición a las células piramidales y granulosas, muchos otros tipos de células han sido descriptos morfológicamente en las regiones del cuerno de Ammón y del GD, la mayoría de estas neuronas tienen axones que se ramifican localmente y son llamadas interneuronas o neuronas de circuito local. Es necesario también mencionar que si bien la principal célula hipocámpica que manda un axón hacia regiones cerebrales extrahipocámpicas es la célula piramidal de las regiones CA1, CA2 y CA3, también existen en dichas regiones células con proyecciones extrahipocámpicas que no son células piramidales (Chronister y De France, 1979).

Lacaille, Kunkel y Schwartzkroin (1989) identificaron electrofisiológicamente tres tipos de interneuronas en la región CA1: 1) las células en cesta del *stratum pyramidale*, 2) las interneuronas del *stratum oriens-alveus* y 3) las interneuronas del *stratum lacunosum-moleculare*. Todas estas células son interneuronas inhibitorias. Las células en cesta y las interneuronas del estrato *oriens/alveus* generan inhibición en neuronas que están

sinápticamente en una posición previa o posterior a ellas en el circuito (inhibición "feed-back" y "feed-forward" respectivamente), mientras que las células del *stratum lacunosum-moleculare* sólo inhiben a neuronas que están por delante en el circuito.

Las interneuronas del hipocampo usan GABA como neurotransmisor, constituyendo aproximadamente el 12% de la población neuronal del hipocampo propio y 60% de la población neuronal de la región hilar de acuerdo con Misgeld y Frostcher (1986) y Seress y Ribak (1983). Estas neuronas controlan grandes poblaciones de células principales a través de sus extensas ramificaciones (Gamrani, Ontoniente, Seguela; Gaffard y Calas, 1986). Freund y Antal (1988) y Freund, Gulyás, Acsády, Görös y Tóth (1990) demostraron que las neuronas GABAérgicas septales y las neuronas serotoninérgicas del *septum* o del *raphe* inervan selectivamente a las interneuronas hipocámpicas GABAérgicas, pudiendo entonces ejercer un control global sobre la actividad hipocámpica.

El grado de convergencia-divergencia existente en un sistema es una importante característica a considerar cuando se estudian potenciales de campo y la función de la estructura. En el ratón cada célula piramidal hipocámpica recibe y establece unos 18.000 contactos sinápticos (compárese con un promedio de 5.000 por neurona en la corteza no hipocámpica del mismo animal). Es también probable que cada célula piramidal hipocámpica reciba señales de y mande información a 18.000 neuronas (Braitenberg y Schuz, 1983). Esa convergencia/divergencia es por supuesto bienvenida en un sistema que genera potenciales de campo y actividades celulares altamente sincrónicas.

En adición a las características del circuito determinadas por sus conexiones neuronales a través de sinapsis químicas, las propiedades eléctricas del tejido y los contactos celulares que involucran sinapsis eléctricas juegan un rol importante en los procesos sincronizantes.

Una de las características del hipocampo que puede hacerlo particularmente vulnerable a la actividad epiléptica y contribuir al desarrollo de sincronismo entre sus células en condiciones fisiológicas, es el reducido volumen de su espacio extracelular (McBain, Traynelis y Dingledine, 1990). El espacio extracelular en el estrato piramidal de CA1 es el más bajo de todo el cuerno de Ammón, el estrato piramidal de la región CA3 y el estrato granuloso del dentado tienen volúmenes ligeramente superiores a los de CA1 pero todavía claramente inferiores a los de otras regiones del cerebro. Estos volúmenes bajos de espacio extracelular facilitan las interacciones celulares a través de

potenciales de campo. El bajo volumen extracelular es responsable de la alta resistencia extracelular (R) hallada en las capas celulares mencionadas. Las células están, en dichas capas, densamente empaquetadas creando distancias intercelulares pequeñas. Entonces, corrientes eléctricas (I) generadas en una célula van a tender a generar importantes cambios de voltaje (V) en las células vecinas más próximas ($V=R \times I$), contribuyendo por lo tanto a la sincronización y a la propagación de señales en la población neuronal local.

Otro factor a considerar en la propagación de la excitación y la sincronización de neuronas, es la existencia de sinapsis eléctricas a través de las uniones de contacto estrecho (gap junctions) (Dudek, Andrew, MacVicar, Snow and Taylor, 1983). El colorante fluorescente Lucifer yellow (amarillo diablo) puede pasar de una célula a otra en diversas poblaciones neuronales, presumiblemente usando las uniones de contacto estrecho. Este acoplamiento celular, demostrado por la inyección de colorante, ocurre en el hipocampo *in vivo* e *in vitro*. Cuando se inyecta el colorante en una neurona, se tiñen frecuentemente dos o tres neuronas y el sitio de acoplamiento parece estar entre los somas y/o las dendritas proximales de las neuronas visualizadas. Aunque cierta fracción del acoplamiento observado con esta técnica puede ser un artefacto, la presencia de una reducción significativa en el acoplamiento celular, cuando se aplican tratamientos que bajan el pH intracelular y afectan el pasaje de señales a través de las uniones de contacto estrecho, argumenta de que por lo menos una parte del colorante pasa a través de las uniones de contacto estrecho y que las uniones intercelulares no son artefacto. Datos anatómicos sugieren también de que por lo menos algunas uniones de contacto estrecho están presentes en las neuronas hipocámpicas de mamíferos, pudiendo algunas de estas uniones proporcionar un fuerte acoplamiento electrotónico entre pequeños grupos de neuronas (Dudek, Andrew, Mac vicar, Snow y Taylor).

Las aferencias que establecen contacto sináptico con las dendritas de las células granulosas están organizadas de acuerdo a un patrón altamente laminar (Swanson y Cowan, 1977). Las fibras originadas en el hipocampo propio terminan más cercanas al cuerpo celular de las células granulosas que las fibras provenientes de la corteza entorrinal, las que a su vez están separadas del soma por las aferencias septales, que son las que terminan en la región más proximal de las dendritas de las células granulosas. Aferencias a las células piramidales del hipocampo propio también tienen un patrón laminar. En el caso

de las células piramidales las aferencias septales terminan también más proximalmente al soma que las provenientes de la corteza entorrinal y entre ambas aparecen nuevamente fibras originadas en otras regiones del cuerno de Ammón.

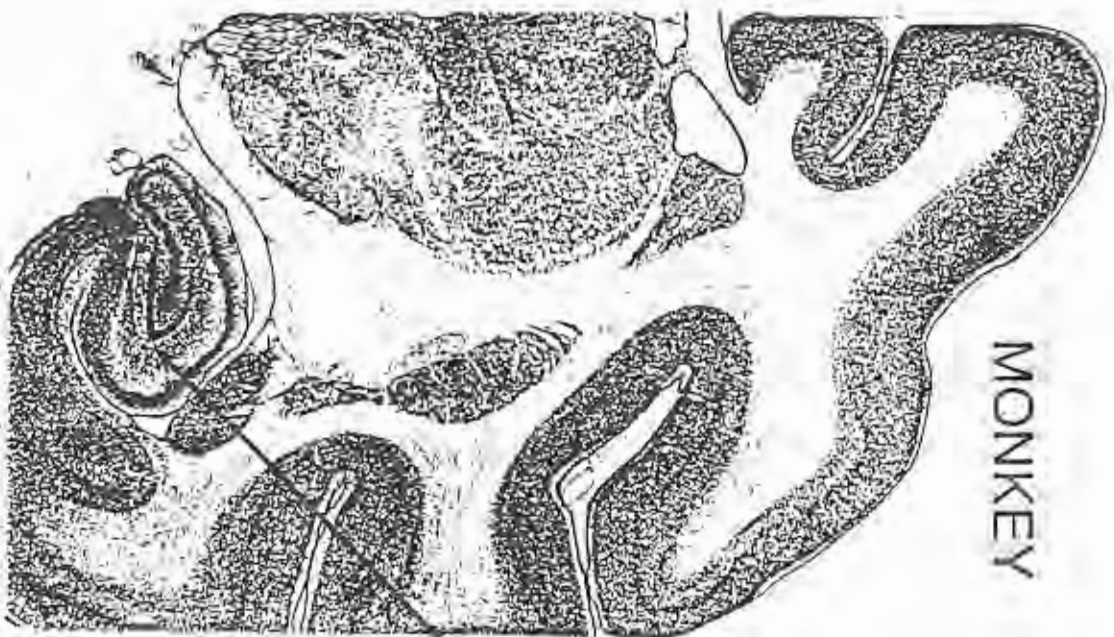
Las dos principales aferencias al hipocampo provienen de la corteza entorrinal y de la parte medial del complejo septal (*septum medialis*). Estas dos proyecciones difieren entre ellas en varios aspectos significativos. En números, la proyección proveniente de la corteza entorrinal claramente supera a la septal, contactando con más del 70% del árbol dendrítico de las células granulosas y también un porcentaje alto de las dendritas de las células piramidales. La microscopía electrónica ha mostrado que en algunas regiones del hipocampo las terminales axónicas provenientes de la corteza entorrinal llegan a generar el 90% de las sinapsis locales. Las fibras septales son claramente minoritarias en relación a las entorrinales y muestran una clara preferencia por la parte proximal de las dendritas de las células granulosas y piramidales (sin embargo una minoría de estas fibras se distribuye de una manera más difusa en el árbol dendrítico de las neuronas hipocámpicas). Las fibras septales llegan al hipocampo a través del *fórnix*, teniendo la aferencia septal una organización similar en ratas, gatos y monos, a pesar de la distinta ubicación de las citadas especies en la escala filogenética (Lynch, Rose y Gall, 1978).

La mayor parte de las fibra que salen del hipocampo viajan por el complejo subicular y la corteza entorrinal donde establecen conexiones sinápticas. La principal excepción a este patrón es una proyección directa al *septum lateral*.

La principal célula de proyección del hipocampo es la célula piramidal, sin embargo no todas las células de proyección son piramidales, Chronister y De France (1979) demostraron que algunas de las proyecciones hipocámpicas se originan en células no piramidales. El complejo septal está innervado por ambos tipos de células: neuronas piramidales innervan el *septum lateral* y en cierta extensión el *septum medial* mientras que las fibras provenientes de neuronas no piramidales están restringidas al área del *septum medial-banda diagonal de Broca* (SM-BDB) (Alonso y Kohler, 1982).

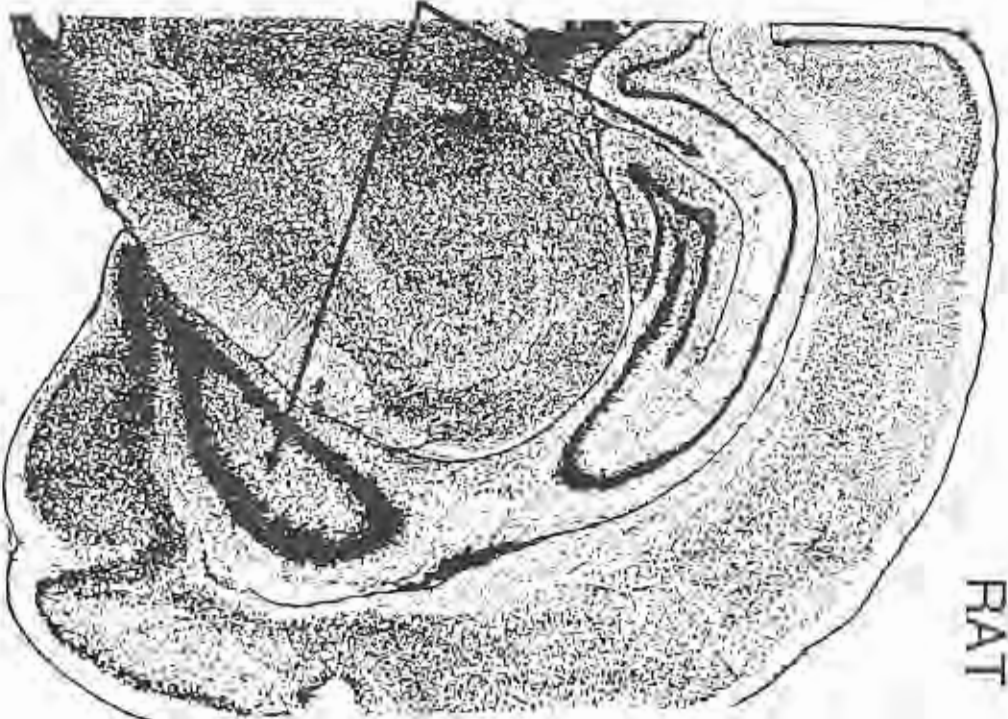
Fisiología

Fisiología celular



MONKEY

HIPPOCAMPUS



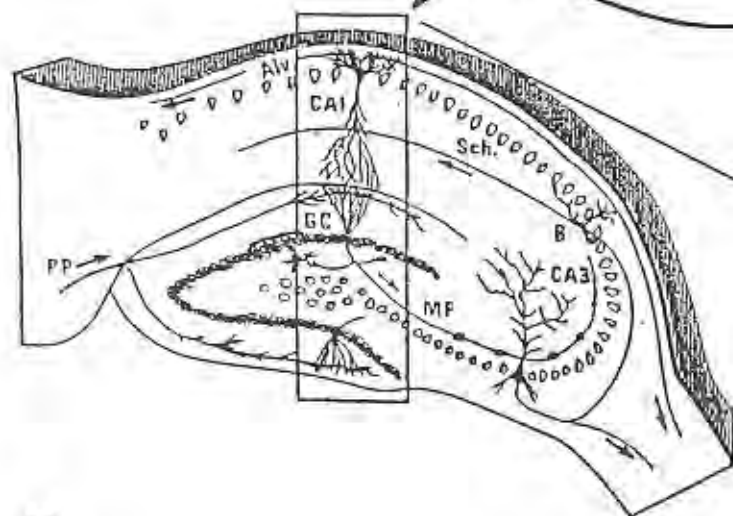
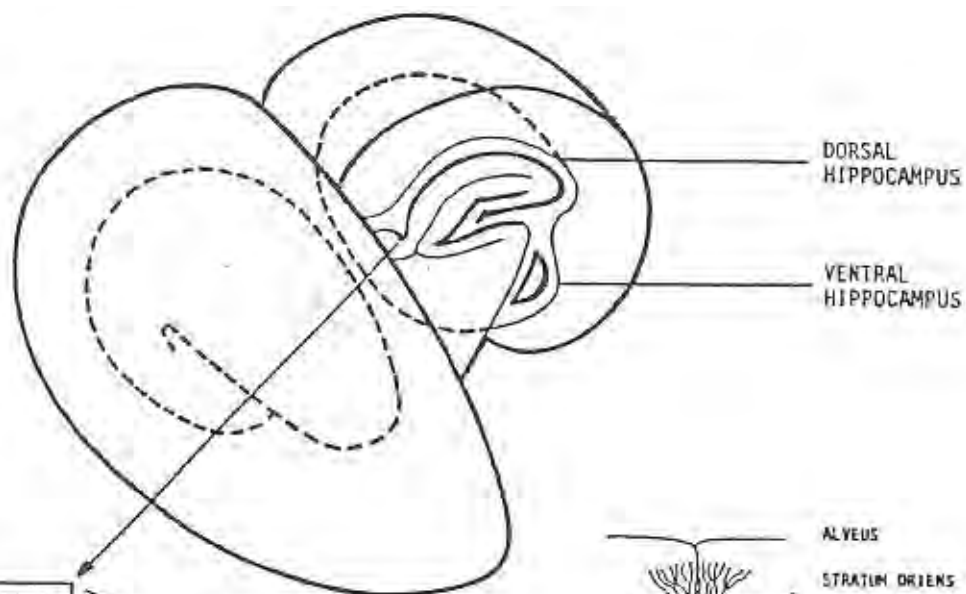
RAT

Figura 1. Cortes transversales de cerebros de mono y rata. Obsérvese que el hipocampo del mono (izquierda) está completamente ubicado dentro del lóbulo temporal mientras que el de la rata (derecha) se extiende mucho más extensamente debajo del manto de la neocorteza.

Cada subregión del hipocampo (CA1, CA2, CA3 y el GD) contiene poblaciones de neuronas que poseen características únicas. La riqueza de las propiedades intrínsecas y la modulación sináptica de dichas propiedades hacen que las neuronas de estas regiones exhiban una amplia variedad de patrones de descarga. Las células piramidales de la región CA3 descargan espontáneamente en salvas de espigas. Las espigas son potenciales de acción sodio dependientes, montados sobre grandes depolarizaciones subyacentes, que son debidas a lentas conductancias de calcio voltaje sensitivas. Una conductancia de potasio, calcio sensitiva es crítica para repolarizar la célula, ya que la conductancia de calcio es inactivada muy lentamente y por lo tanto tiende a mantener la célula depolarizada. Bajo "condiciones normales" en la rebanada de hipocampo, las salvas intrínsecas no están sincronizadas en las diferentes neuronas del área CA3. Si se hace disparar sincrónicamente a las células de CA3 (por intermedio de la estimulación eléctrica de aferencias hipocámpicas) los potenciales de acción de las células de CA3 se suman para producir claras salvas en los registros de potenciales de campo. La actividad sincrónica también puede ser inducida bloqueando la inhibición provista por las interneuronas hipocámpicas. Esta gran tendencia a disparar en salvas puede explicar la alta susceptibilidad del área CA3 a generar actividad epileptiforme.

Como mencionábamos en el párrafo anterior, bajo "condiciones normales" *in vitro* se registran potenciales de campo espontáneos a pesar de que células individuales pueden disparar espontáneamente en cualquier región del hipocampo. Cuando los potenciales sinápticos inhibitorios (PPSI) son bloqueados, espontáneas descargas en salva pueden ser registradas no solamente en CA3 sino también en CA1 y CA2. Schwartzkroin and Prince (1980) fueron los primeros en argumentar que la actividad sincrónica en CA1 estaba conducida por la actividad de la región CA2/CA3, ya que un corte a través del estrato radiado, que secciona las fibras que proyectan desde CA2/CA3 a CA1, abole la actividad espontánea en el área CA1 mientras que dicha actividad continua en las áreas CA2/CA3.

A



B

C

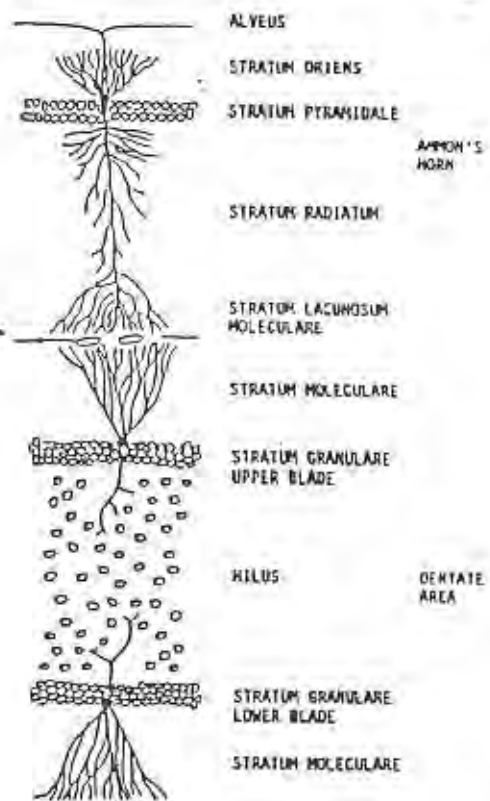


Figura 2. A: Forma y ubicación del hipocampo en el hemisferio cerebral de la rata. B: Corte transversal a nivel del hipocampo dorsal. C: Laminación de la corteza hipocámpica.

A pesar de que la región CA2/CA3 esté disparando sincrónicamente en salvas, la región CA1 no lo hace a menos que sus PPSI hayan sido previamente bloqueados. Un experimento interesante para demostrar las diferencias de comportamiento de las neuronas de estas dos regiones fue llevado a cabo por Mesher y Schwartzkroin (1980), estos investigadores aplicaron en las distintas sub-regiones de la rebanada de hipocampo penicilina disuelta en pequeñas gotas de agar y produjeron solamente efectos focales de la droga, ya el agar enlentese la difusión de penicilina a regiones lejanas. Cuando así se aplicó penicilina en las áreas CA2/CA3 sus células dispararon salvas espontáneas, actividad que no se propagó a las células del área CA1 (a diferencia de lo que ocurre cuando se agrega penicilina al medio de perfusión de la rebanada de hipocampo). Lo que se trata de destacar aquí es que las células del área CA1 se comportan de una manera distinta a las células de las áreas CA2/CA3, probablemente debido a circuitos inhibitorios más potentes y que por lo tanto las células de CA1 no disparan en salvas a menos que dichos circuitos sean bloqueados.

Algunas características de las aferencias hipocámpicas sugieren que estas son muy poderosas. Primero, el circuito trisináptico es enteramente excitatorio. Segundo, una gran parte de las aferencias hipocámpicas hacen sinapsis *en passant* (pasando a través) de tal manera que un único axón puede contactar muchas células blanco. Tercero, las células piramidales al tener una alta constante de espacio, los potenciales sinápticos se propagan por el soma y dendritas con relativamente poco decremento; por lo tanto aún señales en las dendritas lejanas pueden ser remarcablemente efectivas en activar estas neuronas. En efecto, Andersen (1975) cortando progresivamente las aferencias a las dendritas de las células piramidales, demostró que la activación de tan sólo 3% de las aferencias de una célula piramidal es necesaria para hacerla disparar un potencial de acción. A pesar de esta aparente eficacia de las aferencias excitatorias y de las conductancias intrínsecas depolarizantes, la actividad espontánea de las células piramidales en la rebanada de hipocampo es bien baja. Esta carente o mínima actividad espontánea se debe a que: 1) las

aferencias a las células piramidales están cortadas y 2) los potenciales postsinápticos excitatorios (PPSEs) son seguidos por largos y poderosos PPSIs (Dingledine y Langmoen, 1980). Los PPSIs son el resultado de la inhibición recurrente producida por la excitación de interneuronas inhibitorias adyacentes. La activación de estas interneuronas es producida por la descarga de la célula piramidal (feed-back inhibition) (Schwartzkroin, 1986). Un importante porcentaje de estas interneuronas inhibitorias son GABAérgicas. La liberación de GABA por las terminales axónicas de estas interneuronas cambia separadamente dos tipos de conductancias en las células piramidales, creando el típico PPSI con dos valles. Primero, un gran incremento en la conductancia al cloro produce el componente inicial del PPSI y reduce significativamente la resistencia de entrada de la célula, creando una nueva zona con baja resistencia para otras corrientes. Segundo, una apertura más tardía de canales de potasio genera el componente más tardío y de mayor duración del PPSI, que si bien es de menor intensidad, prolonga enormemente en el tiempo la zona de baja resistencia. Como los terminales inhibitorios y sus receptores están estratégicamente localizados en el soma celular o en la parte más proximal de las dendritas primarias, su efecto es máximo, haciendo que las depolarizaciones provenientes de sinapsis excitatorias más lejanas se atenúen marcadamente y muchas pierden efectividad. Muchas interneuronas no necesitan ser activadas por las células piramidales para cumplir su labor inhibitoria ya que son excitadas directamente por las fibras aferentes al hipocampo (feed-forward inhibition). Estos procesos inhibitorios hacen que la excitación de las células piramidales sea auto-limitada (Lacaille, Kunkel y Schwartzkroin, 1989).

Una región del hipocampo: el *hilus*, puede controlar la excitabilidad del resto del hipocampo a través del circuito trisináptico. Las neuronas hiliares envían axones que hacen contacto sináptico con neuronas piramidales homolaterales y contralaterales. Ciertas neuronas hiliares tienden a inhibir las células granulosas cercanas a través de una vía recurrente inhibitoria, ya que las células hiliares reciben a su vez sinapsis excitatorias de estas mismas células granulosas (por intermedio del sistema de fibras musgosas). Sesenta por ciento de las neuronas hiliares son GABAérgicas y rítmicas. PPSI gigantes pueden ser inducidos en las células principales cuando drogas bloqueadoras de la excitación glutaminérgica se aplican focalmente en el *hilus*. Esta acción es probablemente debida a la liberación de GABA, rítmicamente y en salvas, por las interneuronas hiliares (Müller y Misgeld, 1980).

Las interacciones celulares a través de sinapsis químicas no son las únicas a ser consideradas cuando se estudian los procesos sincronizantes, las propiedades eléctricas del tejido y la transmisión de señales usando sinapsis eléctricas son también importantes para la sincronización de las actividades hipocámpicas. Un reducido espacio extracelular y la presencia de uniones de contacto estrecho (que sugiere la existencia de transmisión eléctrica entre células) son dos elementos que contribuyen a la generación de poderosos potenciales de campo eléctrico y por lo tanto a una sincronización rápida entre las neuronas hipocámpicas. La importancia de estos efectos de campo en la sincronización de las neuronas hipocámpicas fue demostrada por Snow y Dudek (1982). Estos autores mostraron que aún con la transmisión de información a través de sinapsis químicas bloqueada, rebanadas de hipocampo podían generar actividad epileptiforme. Con más detalle, rebanadas extraídas del hipocampo de ratas se mantuvieron en un medio conteniendo magnesio y baja concentración de calcio, medio que bloquea la transmisión de información a través de sinapsis químicas. Después de 30 a 60 minutos de incubación en este medio observaron salvas espontáneas de espigas que pudieron ser registradas extracelularmente. Taylor y Dudek (1982) demostraron (usando la misma preparación) que a pesar del bloqueo de la transmisión química, la estimulación eléctrica antidrómica de células piramidales podía disparar post-descargas de hasta 9 segundos de duración. Durante este período las neuronas individuales mostraron estar sincronizadas con los potenciales de campo registrados extracelularmente. Medidas del potencial de membrana (colocando un electrodo intracelular y otro extracelular muy cercano), demostraron que los potenciales de campo eléctrico contribuyen a dicha sincronía (efapsis). Sinapsis eléctricas y cambios en el potasio extracelular pueden también contribuir a a sincronizar las células hipocámpicas. En conclusión, las interacciones eléctricas por sí solas pueden sincronizar y hacer descargar a las neuronas hipocámpicas y probablemente juegan un rol importante en los procesos fisiológicos y patológicos que implican sincronización de neuronas por el hipocampo (por ejemplo: el ritmo theta y la actividad epileptiforme, respectivamente).

El ritmo theta

Actividad sincrónica en el rango de la frecuencia theta (ritmo theta) puede ser registrada en muchas partes del cerebro pero solamente tres áreas generadoras de este ritmo han sido postuladas: 1) el hipocampo, 2) la corteza

entorrinal y 3) la corteza cingular; de estas tres áreas postuladas sólo las dos primeras han sido claramente confirmadas como generadores de ritmo theta (Alonso y García-Austt, 1987a, 1987b; Bland, 1986; Colom, Christie y Bland, 1988).

Los potenciales de campo registrados en el hipocampo de mamíferos inferiores como la rata o el gato pueden ser clasificados en:

- 1) Un ritmo sinusoidal lento, cuya frecuencia normalmente oscila entre 3 y 7 Hz en el conejo, perro y gato, y entre 6 y 12 Hz en la rata y el cobayo. Este ritmo fue originalmente denominado theta porque las frecuencias registradas en animales agudos (bajo anestesia) se superponían a las frecuencias del ritmo theta electroencefalográfico (4 a 7 Hz). Con la realización de experimentos crónicos se registraron frecuencias superiores a la theta y es por esa razón que autores como Vanderwolf prefieren llamar a este ritmo actividad rítmica lenta (rhythmic slow activity o RSA, en inglés). En esta tesis se mantendrá la terminología de ritmo theta.
- 2) Ondas lentas de gran amplitud con una frecuencia dominante que es más baja que la del ritmo theta. A veces estas ondas se encuentran mezcladas con espigas agudas de 50 a 100 milisegundos de duración. Vanderwolf denomina a este estado: actividad irregular de gran amplitud (large irregular activity o LIA, en inglés).
- 3) Un patrón desincronizado de alta frecuencia y baja amplitud que raramente dura más de 1 segundo o 2 en la rata, pero puede ser más duradero en el conejo y gato, Vanderwolf llama a este patrón: actividad irregular de pequeña amplitud (small irregular activity o SIA, en inglés).

Estos patrones se encuentran en animales moviéndose libremente, pero por lo menos el ritmo theta y las grandes ondas lentas se pueden registrar desde el hipocampo de animales bajo anestesia (alcohol, cloroformo, hidrato de cloral, éter, halotano, ketamina y uretano han sido utilizados en el registro de dichos potenciales de campo).

El ritmo theta, en el animal despierto, es registrado cuando el animal camina, corre, nada, salta, escaba, manipula un objeto con las patas delanteras, mueve la cabeza lateralmente, mueve las patas delanteras, se encabrita o cambia de postura (patrones motores de tipo 1 de acuerdo con Vanderwolf).

Durante la inmovilidad alerta o cuando el animal se lame, masca, castañetea los dientes, estornuda, vocaliza sonidos, tiembla, se lava la cara, se rasca, hace movimientos pendulares de pelvis, eyacula, defeca, orina o

presenta piloerección el ritmo theta nunca aparece (patrones motores tipo 2 de Vanderwolf).

Los patrones enumerados son generales a todas las especies estudiadas, si bien fueron originalmente descritos en la rata (Vanderwolf, 1969). Existen sin embargo algunas claras diferencias entre especies, así el conejo presenta ritmo theta cuando es expuesto a estímulos visuales, auditivos o táctiles (Whishaw, 1976), mientras que la rata nunca presenta ritmo theta en esas condiciones.

El ritmo theta es también prominente durante el sueño paradójal en todos los animales mencionados anteriormente. Debe destacarse que el ritmo theta aparece durante ese período del sueño, a pesar de que el animal esté completamente inmóvil o sólo alguna pequeña contracción muscular pueda observarse (Vanderwolf y Robinson, 1978).

Evidencias farmacológicas sugieren que podría haber dos tipos distintos de ritmo theta (Kramis, Vanderwolf y Bland, 1975). Bajo ciertas circunstancias el ritmo theta puede ser abolido cuando se aplican sistémicamente drogas anti-muscarínicas (sulfato de atropina o hidrobromuro de escopolamina) pero en otras circunstancias el ritmo theta puede ser muy resistente a estas drogas. El ritmo theta que ocurre cuando el animal está inmóvil y despierto (en el conejo, cuando se lo estimula sensorial o sensitivamente) o durante la anestesia (en la rata, conejo y demás especies previamente mencionadas) es sensitivo a las drogas muscarínicas, mientras que el theta que acompaña a la locomoción y a otros movimientos asociados al ritmo theta es resistente a estas drogas. El ritmo theta atropina-sensitivo tiene una frecuencia baja (habitualmente de 4 a 9 Hz) y es resistente a los anestésicos, ya que puede ser observado durante la anestesia. El ritmo theta atropina-resistente tiene usualmente una frecuencia más alta (de 7 a 12 Hz) y es sensible a los anestésicos, ya que los movimientos y este tipo de ritmo theta (de acuerdo a Vanderwolf) desaparecen con la anestesia. Lo cierto es que una combinación de atropina y éter, u otro de los anteriormente citados anestésicos, bloquea la aparición del ritmo theta (Vanderwolf, Kramis y Robinson, 1978).

De acuerdo con la evidencia citada, Vanderwolf y colegas (Vanderwolf, Kramis y Robinson, 1978) clasifican al ritmo theta como: tipo 1, relacionado a movimientos, no-colinérgico y tipo 2, que ocurre durante la inmovilidad y tiene un componente colinérgico.

Estos dos tipos de ritmo theta pueden también ser observados durante el sueño paradójal. En esta etapa del sueño, los movimientos son fuertemente suprimidos a través de influencias descendentes que actúan sobre las motoneuronas espinales y fibras aferentes provenientes de la periferia que hacen sinapsis con ellas. A pesar de esta inhibición se observan periódicamente contracciones fásicas de la musculatura somática (muscular twitches, en inglés) como resultado de salvas descendentes de excitación que logran activar a las motoneuronas. Si la actividad hipocámpica se monitoriza durante el sueño paradójal en la rata, el ritmo theta es virtualmente continuo, pero frecuencias más altas (8 Hz) ocurren durante las contracciones musculares fásicas, mientras que la frecuencia descende en los intervalos entre movimientos fásicos (6-7 Hz). Cuando el sueño paradójal ocurre en ratas tratadas con sulfato de atropina, el ritmo theta continúa acompañando a los movimientos musculares pero desaparece en los intervalos donde no se observa ninguna actividad muscular (Vanderwolf, Kramis y Robinson, 1978). Por lo tanto parecería que tanto en el sueño paradójal como en la vigilia un ritmo theta atropina-resistente acompaña a los movimientos y un ritmo theta atropina-sensitivo está presente en ciertos tipos de inmovilidad.

No todos los autores están de acuerdo con la idea de que existen dos tipos distintos de ritmos theta. Vertes (1981, 1986) argumenta en favor de un solo tipo de ritmo theta. Su teoría es apoyada por: 1) la no identificación de dos sistemas anatómicamente distintos responsables de la generación de ritmo theta atropina-resistente y ritmo theta atropina-sensitivo, 2) la incapacidad de lesiones hipotalámicas o de tronco encefálico en eliminar un tipo de ritmo theta sin abolir el otro, 3) la falta de éxito en la búsqueda de neurotransmisores involucrados en el ritmo theta no colinérgico. El grupo de Vanderwolf argumenta en contra de un único ritmo theta, agregando a la evidencia presentada previamente en este capítulo, una serie de experimentos que sugieren que el neurotransmisor serotonina estaría involucrado en la generación de theta tipo 1 (Vanderwolf, 1988). Es mi opinión que estos experimentos son no categóricos y una mayor investigación en el área es necesaria para aclarar el tema.

Sí es clara la existencia de una correlación entre la aparición de ritmo theta y ciertos actos motores del animal. Esta relación fue también investigada por Velluti y Buño en 1977. Estos autores hallaron que las ratas tienden a apretar una palanca (activando un circuito que le produce una sensación placentera al animal) en una relación de fase fija con el ritmo theta. Si bien Buño

y Velluti, así como el grupo de Vanderwolf especulan que la existencia del ritmo theta podría ser importante para la generación de actos motores normales, es de destacar que la evidencia presentada hasta ahora muestra claras correlaciones entre ritmo theta y diversos actos motores del animal, pero que no existe al presente, evidencia de una relación causal entre el ritmo theta y el acto motor, ni que dicho ritmo sea necesario para mantener el repertorio motor normal del animal.

Un nuevo e interesante correlato funcional del ritmo theta ha sido establecido últimamente con el fenómeno de potenciación sináptica de larga duración (long term potentiation o LTP, en inglés). Este fenómeno se observa cuando se estimula eléctricamente la parte presináptica de una vía neuronal, con ciertos patrones temporales especiales, registrándose entonces un aumento en la eficacia sináptica, que se expresa en la postsinapsis por un claro incremento de la amplitud de los potenciales sinápticos. El correlato entre esta potenciación sináptica y el ritmo theta, fue demostrado *in vitro* en las sinapsis de las fibras comisurales de Schaffer sobre las células piramidales de CA1 (Larson, Wong y Linch, 1986; Rose y Dunwiddie, 1989; Larson y Linch, 1988) e *in vivo* para las sinapsis de la vía perforante sobre las células granulosas (Greenstein *et al.*, 1988). En la región de CA1 la inducción de potenciación es máximamente efectiva cuando el intervalo entre estímulos es aproximadamente 200 ms. (5 Hz), patrón que corresponde a la frecuencia del ritmo theta fisiológico. En el GD una clara potenciación de la eficacia sináptica, sólo pudo ser obtenida cuando el patrón de estimulación consistió en trenes cortos, con frecuencias internas de 100 Hz y separados por intervalos de 200 ms, cayendo nuevamente el intervalo entre trenes en el rango de las frecuencias theta. El mecanismo íntimo de la potenciación es todavía discutido. Parecería que los trenes de alta frecuencia generan una respuesta débil en receptores glutaminérgicos del tipo N-metil-D-aspartato (NMDA), esta respuesta es amplificada cuando los estímulos son aplicados con un patrón que se sobrepone al de la frecuencia theta. Larson y Linch (1989) plantean que esta amplificación ocurre debido a que a la frecuencia theta se suprimen los PPSI y por ende se produce una prolongación de la depolarización de las neuronas estimuladas. Esto produciría un incremento en el influjo de calcio, que a su vez llevaría a una mayor liberación de neurotransmisor y produciría al final la potenciación sináptica descrita. Existe también evidencia de que el ritmo theta puede causar depolarizaciones duraderas y estables en las dendritas de las células piramidales (Nuñez *et al.*,

1987), hallazgo que es compatible con la hipótesis mencionada anteriormente. La idea de que el ritmo theta estuviese involucrado en la generación de cambios plásticos en los circuitos hipocámpicos (como los de la potenciación sináptica a largo plazo) sugiere que este ritmo podría participar en los procesos de la memoria.

La patología humana también provee evidencia de que el hipocampo está envuelto en los procesos de la memoria. La examinación de las estructuras incluidas en el lóbulo temporal de pacientes con la enfermedad de Alzheimer, revela patrones específicos de patología celular en el subículo, la formación hipocámpica y la corteza entorrinal. Este daño aísla al hipocampo, desconectándolo de sus mayores aferencias y eferencias y podría ser la causa de los problemas de memoria que constituyen uno de los síndromes cardinales de la enfermedad de Alzheimer (Hyman, Van Hoesen, Damasio y Barnes, 1986). Degeneración selectiva de las neuronas colinérgicas en regiones del cerebro que incluyen el hipocampo, ha sido también demostrada (Coyle, Price y Delong, 1983), sugiriendo también un rol del hipocampo y de ciertos circuitos colinérgicos en los procesos de la memoria.

Los sitios de origen del ritmo theta

La distribución de la amplitud y fase del ritmo theta ha sido demostrada moviendo un microelectrodo de registro desde la superficie a la profundidad del hipocampo o desde una parte del hipocampo hacia otra. Los primeros estudios fueron realizados por Green y colegas en conejos curarizados (Green, Maxwell, Schindler y Stumpf, 1960). Estos autores compararon los potenciales registrados por un microelectrodo moviéndose a través de CA1 con los registrados por un electrodo contralateral fijo a nivel del estrato oriens de CA1 (ritmo theta control). El ritmo theta registrado desde el microelectrodo en movimiento mostró dos máximos, uno en fase con el ritmo theta control, que se localizó a nivel del estrato *oriens/pyramidale*, y otro 180° fuera de fase y localizado más profundamente a nivel del estrato *lacunosum-moleculare* de CA1 (estrato que limita con el dentado). La amplitud de este segundo máximo fue aproximadamente el doble de la del máximo más superficial.

Bland, Andersen y Ganes (1975), Bland y Whishaw (1976) y Winson (1976a, 1976b) mostraron que los ritmos theta registrados desde el área CA1 y desde la región del GD estaban aproximadamente 180° fuera de fase. En el conejo, moviéndose libremente o anestesiado con uretano, y en la rata,

anestesiada con el mismo anestésico o curarizada, estos autores hallaron un perfil de ritmo theta caracterizado por dos máximos (en el estrato oriens de CA1 y en la capa molecular del dentado) separados por una zona en la que no pudieron registrar ritmo theta y que denominaron "zona nula"; inmediatamente debajo de esta zona se encontraba el área donde el ritmo theta cambiaba de fase. Winson (1974) demostró en la rata moviéndose libremente, un segundo perfil caracterizado por un cambio gradual de fase a través del estrato radiado y sin una zona nula debajo de la capa de células piramidales.

Feenstra y Holsheimer (1979) desarrollaron un modelo para explicar los hallazgos experimentales. El modelo consiste en dos capas de dipolos acoplados que generan dos fuentes sincrónicas de actividad theta. La zona donde la fase se invierte se encontraría en algún lugar en medio de estos dipolos-generadores. La magnitud del potencial de campo generado, así como la localización de la máxima amplitud del ritmo theta, dependería de la potencia relativa de estos dos dipolos.

Leung (1984) sugiere un modelo de dos dipolos espacialmente distintos pero que generan potenciales de campo que se superponen. Los potenciales de campo generados en la rata anestesiada con uretano o curarizada serían debidos a la activación de fibras inhibitorias que terminarían en el soma de las células piramidales. El autor llama a este modelo dipolo 1. El dipolo 1 tiene una amplitud máxima en las dendritas basales y en la parte distal de las dendritas apicales, una zona nula distintiva y una inversión de fase en el lado apical de la capa de células piramidales. El dipolo 2 es producido por excitación rítmica de fibras excitatorias que terminarían en las dendritas distales más la misma inhibición somática descrita en el modelo 1 (que ocurriría con cierto desfase temporal en relación a la excitación) para producir el cambio de fase gradual que se observa en la rata moviéndose libremente. La labor experimental de Leung sugiere que el dipolo 1 podría explicar el ritmo theta tipo 2, probablemente originándose en la proyección colinérgica septo-hipocámpica, y que el dipolo 2 podría explicar el ritmo theta tipo 1, que probablemente provendría de proyecciones originadas en el septum medial y en la corteza entorrinal.

A pesar de éstos y otros estudios, aún existe controversia acerca de los lugares de generación de ritmo theta dentro del hipocampo (así como también acerca de las fuentes extrahipocámpicas de ritmo theta). Petsche y Stumpf (1960) reportaron un pico de amplitud de ritmo theta a nivel del área CA3, pero

estudios posteriores llevados a cabo por Bland, Andersen y Ganes (1975), y Bland y Whishaw (1976) fallaron en encontrar theta en esta área. Si hay theta en la región CA3, el registro de ritmo theta en las regiones CA1 y GD no es dependiente de la generación de theta en la región CA3. Esto fue demostrado por Whishaw y Sutherland (1982), ya que estos autores pudieron registrar theta en las regiones de CA1 y del dentado después de haber destruido la región de CA3/CA4 con ácido kaínico. La existencia de un generador en el dentado también es sujeto de controversia. Whishaw, Bland y Bayer (1978) demostraron que una dramática reducción de la población de células granulosas, producida por irradiación-X de ratas recién nacidas, no afectaba la amplitud o frecuencia del theta registrado extracelularmente. Este hallazgo podría sugerir que no existe una relación lineal entre la amplitud o frecuencia de un potencial de campo y el número de células que lo alimentan, y pone en duda la hipótesis clásica de dos generadores hipocámpicos de ritmo theta a nivel de CA1 y del dentado.

Stewart y Fox (1991) demostraron recientemente que el ritmo theta está presente en el lóbulo temporal de primates anestesiados. En los primates el ritmo theta tiene una frecuencia de 7 a 9 Hz. Esta frecuencia es algo superior a la registrada en la rata anestesiada (4 a 5 Hz).

Registro de neuronas relacionadas al ritmo theta

Ranck (1973) trabajando con ratas moviéndose libremente, clasificó a las células hipocámpicas, de acuerdo a sus patrones de descarga. Este autor encontró dos grandes grupos celulares: 1) "Células theta" que disparan cuando el ritmo theta está presente en el hipocampo, particularmente durante los movimientos o el sueño paradójal. Estas células decargan en la forma de potenciales de acción "simples" (cada potencial de acción separado claramente del precedente y con la misma amplitud). 2) "Células de espiga compleja" (complex spike cells, en inglés) que descargan en salvas de 2 a 6 potenciales de acción de amplitud decreciente y con intervalos entre espigas no mayores de 5 ms. Estas últimas células descargan usualmente a muy baja frecuencia y son activadas cuando el animal se encuentra en una particular localización en el espacio.

La identificación de las células theta y de descarga compleja como tipos neuronales bien definidos, ha sido sujeto de controversia. Bland, Andersen, Ganes y Sveen (1980) estudiaron las descargas de células identificadas

fisiológicamente, durante el ritmo theta en conejos anestesiados. Las células granulosas del dentado fueron identificadas por su respuesta ortodrómica a la estimulación de la vía perforante (axones provenientes de la corteza entorrinal); las células piramidales de las áreas CA1 y CA3 fueron identificadas usando estimulación antidrómica desde el *alveus* y desde las colaterales de Schaffer respectivamente; las células en cesto (interneuronas inhibitorias) fueron identificadas por una respuesta característica a la estimulación ortodrómica incremental. Las descargas de muchas células hipocámpicas estuvieron correlacionadas con los potenciales de campo generados por esta estructura. Pocas células estuvieron activas espontáneamente durante la actividad irregular. Con la aparición de ritmo theta (4 a 6 Hz) la actividad unitaria se incrementó en frecuencia, teniendo las células granulosas del dentado el umbral más bajo para activarse. Ritmo theta de gran amplitud y alta frecuencia se correlacionó con descargas rítmicas y en salva de estas células, llegándose a registrar frecuencias de disparo de hasta 2-3 espigas por salva. Las células piramidales, con umbral de activación más elevado, mostraron espigas complejas mezcladas con espigas simples. El análisis de correlación cruzada demostró que virtualmente todas las células granulosas del dentado y las piramidales del área CA1 tenían una relación de fase fija con el ritmo theta, descargando preferencialmente durante la fase negativa del ritmo theta registrado localmente. Las células piramidales de CA3 y las células en cesto mostraron las correlaciones más débiles con el ritmo theta. Los autores proponen "una regla de tamaño" (size principle, en inglés) para explicar el hecho de que neuronas pequeñas (células granulosas y piramidales de CA1) fueron más fácilmente activadas y/o mejor correlacionadas con el ritmo theta que las neuronas grandes (células piramidales de CA3 y células en cesto). Estos experimentos sugieren que las células granulosas son "las células theta" y que las células piramidales son las células que descargan "en espigas complejas".

Núñez, García-Austt y Buño (1987), y Muñoz, Núñez y García-Austt (1990) en ratas anestesiadas, tiñeron e identificaron las células después de registrarlas intracelularmente, demostrando claramente que las células rítmicas ("células theta") eran las células piramidales de la región del cuerno de Ammón y las células granulosas de la región del GD.

El grupo de García-Austt había realizado previamente extensos estudios demostrando correlaciones de neuronas hipocámpicas y extrahipocámpicas con el ritmo theta. García-Austt y colaboradores (García-Austt, 1984) describieron



208901

tres tipos de patrones de descarga de neuronas hipocámpicas con diferentes correlaciones funcionales con el ritmo theta; el mismo esquema de clasificación fue aplicado posteriormente al septum medial y a la corteza entorrinal. El tipo 1 de descarga, representó aproximadamente el 20% de las neuronas registradas, es rítmico a la frecuencia theta y las descargas ocurren con una relación de fase fija al ritmo theta. El tipo 2, registrado en cerca del 40% de las neuronas registradas, no es rítmico pero tiene una relación temporal fija con el ritmo theta. Las correlaciones cruzadas entre el ritmo theta y los tipos celulares 1 y 2 mostraron picos periódicos en ambos casos, a pesar de que un grupo de neuronas era rítmico y el otro no lo era. El tipo 2 de descarga podría ser funcionalmente importante transmitiendo información acerca del ritmo theta en un modo difícil de visualizar a menos que se usen estudios estadísticos como los de la función de correlación cruzada. El tipo 3 de descarga, registrado en aproximadamente 40% de las neuronas hipocámpicas, no es rítmico y no presenta ninguna relación de fase fija en la correlación con el ritmo theta. Los estudios de este grupo de investigadores en el septum medial mostraron neuronas con los mismos patrones de descarga pero con un porcentaje más alto de células rítmicas. En el septum medial las proporciones halladas fueron: tipo 1-74%, tipo 2-19% y tipo 3-7%.

Colom, Ford y Bland (1987), y Colom y Bland (1987) clasificaron a las células hipocámpicas de acuerdo a los patrones de descarga registrados durante los dos potenciales de campo característicos de la rata anestesiada: el ritmo theta y la actividad irregular. Estos trabajos demostraron que en el hipocampo existían dos poblaciones distintas de neuronas: una activada durante el ritmo theta y otra inhibida durante dicho ritmo. Estos dos grupos fueron denominados células theta-activadas (theta-on, en inglés) y células theta-inactivadas (theta-off, en inglés) respectivamente. Las células theta-activadas incrementaban su descarga durante el ritmo theta y se corresponden a las células theta descritas por Ranck (1973) en la rata moviéndose libremente. Las células theta-inactivadas fueron descritas por primera vez por Colom, Ford y Bland (1987), y Colom y Bland (1987). Las células theta-activadas y theta-inactivadas presentan distintas farmacologías. Las células theta-activadas son susceptibles a manipulaciones del sistema colinérgico mientras que las células theta inactivadas se muestran resistentes a dichas manipulaciones. Esta resistencia a manipulaciones colinérgicas de las células theta-inactivadas fue demostrada de la manera descrita a continuación. En ratas anestesiadas con

uretano la administración sistémica de sulfato de atropina (droga que bloquea las sinapsis colinérgicas de tipo muscarínico) bloquea toda actividad theta, inclusive la producida por estimulación de sistemas ascendentes que se originan en el tronco encefálico o en la periferia por estimulación sensorial. Una estación sináptica importante en estos sistemas ascendentes se encuentra en el área de los núcleos supramamilares y de los núcleos hipotalámicos posteriores (SUM-HP). La estimulación de la región SUM-HP genera ritmo theta e inhibe poderosamente a las células theta-inactivadas. La administración de sulfato de atropina bloquea la generación de ritmo theta pero no la inhibición de las células theta-inactivadas. Los autores sugirieron que un sistema GABAérgico podría ser responsable por los cambios de descarga de estas células. Dentro de cada una de las poblaciones neuronales mencionadas existen dos subtipos celulares principales: células de descarga constante o tónica y células de descarga fásica. La palabra fásica se refiere aquí a que estas neuronas no descargan constantemente sino "fásicamente" durante breves períodos en los que se disparan 1 o más potenciales de acción; como estos potenciales de acción ocurren en una fase fija del ritmo theta estas células son también rítmicas. Debe destacarse aquí, que todo ritmo de baja frecuencia siempre implica neuronas que descargan fásicamente. Este mismo esquema clasificatorio fue extendido al área del septum medial, donde se encontraron poblaciones celulares similares (Ford, Colom y Bland, 1989).

Mizomury, Barnes y McNaughton (1990) hallaron células theta-activadas y theta-inactivadas en ratas jóvenes y adultas moviéndose libremente. Estos autores demostraron que las descargas de estos dos tipos de células eran moduladas de una manera diferente por el movimiento. Las células theta-activadas incrementaban su descarga cuando la rata ejercía algún movimiento "voluntario" (conducta tipo 1 de Vanderwolf), mientras que las células theta-inactivadas decrecían su frecuencia de disparo sometidas a las mismas circunstancias.

Isokawa-Akesson, Babb y Wilson (1987) y Isokawa-Akesson, Wilson y Babb (1987) registraron neuronas en hipocampos de pacientes despiertos que sufrían de epilepsia del lóbulo temporal. Usando registros extracelulares de células únicas y estudiando el patrón de descarga con medios estadísticos como los de la función de autocorrelación, estos autores encontraron tres patrones principales de descarga. El primer patrón consistía en células que disparaban en salvas de potenciales de acción de alta frecuencia (100 a 300 Hz)

y que ocurrían de una manera no rítmica. El segundo patrón fue el de células que disparaban rítmicamente, pero no en salvas con frecuencias de 1 a 10 Hz. El tercer patrón correspondió a células que descargaban rítmicamente y en salvas, los intervalos entre las salvas oscilaron entre 0.5 y 10 Hz entre las distintas neuronas registradas. Estos hallazgos demuestran la existencia de poblaciones de células rítmicas en el hipocampo de humanos que descargan en el rango de la frecuencia theta con características similares a las registradas en mamíferos inferiores.

Halgren (1991), registrando neuronas de hipocampos humanos encontró unidades que descargaban durante movimientos de la lengua y/o las manos. Solamente movimientos con un alto grado de esfuerzo fueron efectivos. Este investigador también halló que ciertas unidades hipocámpicas cambiaban su frecuencia de disparo segundos antes de que el paciente apretara ciertos controles con sus manos, mostrando que el hipocampo humano (como el de los roedores) es fuertemente influenciado por el movimiento.

Aunque analizados por varios investigadores, los mecanismos celulares que participan en la generación del ritmo theta permanecen controvertidos. En neuronas hipocámpicas de descarga rítmica, Fujita y Sato (1964), encontraron oscilaciones del potencial de membrana a la misma frecuencia del ritmo theta y con una relación de fase fija con dicho ritmo registrado extracelularmente. De aquí en adelante llamaremos a estas oscilaciones de potencial de membrana "ritmo theta intracelular". Fujita y Sato encontraron que corrientes hiperpolarizantes incrementaban la amplitud del ritmo theta intracelular e interpretaron dicho resultado como evidencia de que el ritmo theta consistía principalmente de PPSEs. Spencer y Kandel, Andersen y Eccles (1962) propusieron que una inhibición recurrente estaba involucrada en la generación del ritmo theta hipocámpico. Artemenko (1973) postuló que el ritmo theta consistía de PPSIs regularmente distribuidos; sus experimentos demostraron que el ritmo theta intracelular de células piramidales del área CA1 invertía su fase (usando como referencia al ritmo theta registrado extracelularmente por un electrodo lejano) cuando un PPSI, evocado por estimulación eléctrica, revertía su fase por la aplicación de corrientes hiperpolarizantes o difusión intracelular del ión cloro, sugiriendo que PPSI participaban en las oscilaciones. Nuñez, García-Austt y Buño (1987), registrando células piramidales de las áreas CA1-CA3, identificadas por inyección intracelular del colorante fluorescente Lucifer Yellow, no observaron disminución o inversión de fase en el theta intracelular

cuando inyectaron corriente en la célula registrada, concluyendo por lo tanto que PPSIs no eran esenciales en la generación del ritmo theta intracelular y que PPSEs deberían ser los principales componentes de este ritmo. Los mismos autores observaron depolarizaciones sostenidas de membrana (proporcionales a la amplitud del ritmo theta) sobre las que se montaban lentas depolarizaciones rítmicas, en las que a su vez se montaban salvas apretadas de potenciales de acción. Estas observaciones fueron interpretadas como que la información proveniente del septum medial dirigía (o se sobreponía) a un ritmo endógeno hipocámpico de espigas lentas en células tónicamente depolarizadas. Inyecciones de pulsos de corriente pudieron disparar depolarizaciones rítmicas y potenciales de acción en salvas rítmicas en ausencia de ritmo theta, demostrando que estos eventos dependían de características intrínsecas de la membrana de las células piramidales.

Muñoz, Nuñez y García-Austt (1987), registrando células granulosas en el GD, también identificadas por inyección de Lucifer Yellow, registraron eventos similares a los anteriormente discutidos y llegaron a similares conclusiones.

Región septal

Anatomía

El cuerpo principal de la región septal yace entre los cuernos anteriores de los ventrículos laterales, aunque se prolonga ventralmente para formar una considerable parte de la región preóptica del hipotálamo. Como la región septal y el hipocampo comparten extensivamente conexiones bilaterales, estas estructuras son frecuentemente referidas juntas formando parte de un único sistema funcional.

El área septal puede ser parcelada en 4 divisiones sobre la base de su citoarquitectura y conexiones (Swanson, Köhler y Bjöklund, 1987). La división lateral consiste del núcleo septal lateral; la división medial consiste dorsalmente del núcleo septal medial y ventralmente del núcleo de la banda diagonal de Broca (BDB), (ambas estructuras forman una masa celular más o menos continua); la división posterior consiste de los núcleos septo-fimbrial y triangular; y por último la división ventral consiste de los núcleos de la cama de la estría terminal y del núcleo de la cama de la comisura anterior.

Esquemáticamente, las divisiones lateral, medial y posterior del área septal están particularmente asociadas con la formación hipocámpica mientras que la división ventral se relaciona primariamente con la amígdala.

Raisman en 1966, reportó que el septum medial (pero no el lateral) se proyecta sobre el hipocampo propio y el GD. Estudios de Lewis y Shute (1967) y Shute y Lewis (1967) usando el método histoquímico de acetil colinesterasa demostraron que la formación hipocámpica recibe inervación colinérgica del área del SM-BDB a través del fórnix, de la fimbria y del alveus. Otros estudios (Rye, Wainer, Mesulam, Mufson y Saper, 1984; y Levey, Rye, Mesulam y Mufson, 1985) proporcionaron más evidencia de que la vía septo-hipocámpica utiliza acetilcolina como neurotransmisor y demostraron que el componente colinérgico constituye aproximadamente el 50% de la vía. Las fibras colinérgicas establecen contacto con células piramidales, granulosas e interneuronas. Alonso y Kohler (1982), y Kohler, Chan-Palay y Wu (1984) demostraron que el principal componente del remanente 50% de la vía septo-hipocámpica es GABAérgico. Panula, Revuelta, Cheney, Wu y Costa (1984) observaron neuronas GABAérgicas (GAD-positivas) en el área septal. Freund y Antal (1988) demostraron que los axones de células GABAérgicas del complejo SM-BDB establecen contacto con interneuronas hipocámpicas GABAérgicas.

La región CA1-CA3 del hipocampo propio proyecta al septum lateral (SL), el SL se conecta extensamente con el área del SM-BDB; las células de esta última región mandan axones principalmente al GD pero también al hipocampo propio, cerrando así el circuito septo-hipocámpico.

Tombol y Petsche (1969) estudiaron la región septal usando las técnicas de tinción de Golgi. Ellos encontraron 2 tipos celulares diferentes: 1) células medianas y grandes con axones que presumiblemente se proyectan al hipocampo y 2) pequeñas células que se parecen a las neuronas tipo II de Golgi.

Fisiología

El SM ha sido considerado el marcapaso del ritmo theta hipocámpico por la mayoría de los autores trabajando en el área. Esta consideración se basa en que: 1) lesiones del núcleo SM abolen el ritmo theta hipocámpico (Green y Arduini, 1954), 2) el SM tiene una población de neuronas rítmicas que descargan a la frecuencia theta (Petsche, Stumpf y Gogolak, 1962), 3) la ritmicidad de estas células se mantiene después de la desconexión con el hipocampo (Vinogradova *et al.*, 1980) y 4) la rebanada de septum contiene una población de células que continúan descargando rítmicamente a pesar de estar completamente aisladas de otras estructuras (Vinogradova *et al.*, 1980).

Petsche, Stumpf y Gogolak, (1962) describieron 2 tipos de neuronas en el SM del conejo: neuronas "A" que disparaban más o menos al azar y neuronas "B" que descargaban rítmicamente y con una relación constante de fase con el ritmo theta. El hecho de que distintas neuronas septales descargaran rítmicamente pero en diferentes fases del ritmo theta creó ciertos problemas a la noción de marcapaso septal. Gogolak, Petsche, Stumpf y Sterc (1968), intentaron aclarar el problema superponiendo los histogramas de intervalos de las neuronas septales que disparaban en salvas rítmicas, cuando superponían estos distintos histogramas se encontraron que el la salida global del SM reproducía una curva con forma similar a la del ritmo theta. Entonces a pesar de que las neuronas disparan individualmente en distintas fases del ritmo theta hipocámpico la distribución de frecuencias de sus decargas podría todavía dar cuenta de una salida septal adecuada para dirigir al ritmo theta hipocámpico.

Morales, Roig, Macadar y Budelli (1971) estudiaron la relación funcional entre las neuronas septales y los potenciales de campo hipocámpicos durante el ciclo de vigilia-sueño en ratas crónicamente implantadas que se movían libremente. Durante el sueño paradójico y cuando el animal se movía durante la vigilia, el registro de potenciales de campo del hipocampo mostró ritmo theta y un porcentaje importante de las neuronas septales descargaron en salvas rítmicas. El histograma de correlación cruzada del ritmo theta hipocámpico y las unidades septales mostró un patrón sinusoidal sugiriendo una relación funcional entre ambos.

Dutar, Lamour y Jobert (1985) y Dutar, Lamour, Rascol y Jobert (1986) demostraron que casi la mitad de las neuronas septales que proyectan al hipocampo, disparan en salvas rítmicas y son excitadas por la acetilcolina. La presencia de PPSEs de corta latencia cuando el hipocampo es estimulado sugiere que estas mismas neuronas reciben una entrada excitatoria mono o oligosináptica desde el hipocampo.

Markram y Segal (1989), caracterizaron las células del SM en rebanadas de cerebro de rata mediante registro intracelular. Estos autores confirmaron la existencia de 2 poblaciones de neuronas: colinérgicas y no colinérgicas. El hecho más saliente de las neuronas colinérgicas fue la presencia de un postpotencial hiperpolarizante lento; los potenciales de acción fueron de más larga duración (con un componente de calcio) cuando fueron comparadas con las neuronas no colinérgicas. Las neuronas colinérgicas exhibieron una actividad rítmica lenta en contraposición con salvas de potenciales de acción a

alta frecuencia de las neuronas no colinérgicas. Estas salvas de alta frecuencia parecerían depender de características intrínsecas de la membrana de las neuronas no colinérgicas. Los autores plantearon que la importancia de los postpotenciales hiperpolarizantes podría estar en dirigir la actividad fásica de otras neuronas septales y en limitar la excitación colinérgica de las neuronas hipocámpicas.

Stevens, Gallagher y Shinnick-Gallagher (1984) y Gallagher, Stevens, Twery y Shinnick-Gallagher (1987) hicieron registros intracelulares en rebanadas de la región dorsolateral (parte superior del área SL) del septum de ratas. Las neuronas de esta región cerebral dispararon potenciales de acción cortos, tetrodotoxina sensitivos, seguidos por un postpotencial hiperpolarizante. La estimulación del SM resultó en la invasión antidrómica de las neuronas septales dorsolaterales, mientras que la estimulación de las fibras que transcurren por el fimbria-fórnix resultó en: 1) PPSEs excitatorios o potenciales de acción y 2) PPSIs con un componente temprano y uno tardío. La evidencia experimental obtenida por estos autores sugiere que el primer componente de los PPSIs es producido por la activación de receptores tipo $GABA_A$ y el segundo por la activación de receptores $GABA_B$. Existe evidencia experimental que neuronas del SM que se proyectan al hipocampo mandan colaterales axónicas al SL, creando un circuito septal intrínseco (del SM al SL y de allí al SM nuevamente) que podría actuar como modulador de la transmisión de información por el sistema septo-hipocámpico. Es importante recordar aquí que más de la mitad de las neuronas del SM que proyectan al hipocampo son colinérgicas y que probablemente muchas de las colaterales de estas neuronas que inervan al SL sean colinérgicas. Hasuo, Gallagher y Shinnick-Gallagher (1987) estudiaron la acción de la acetilcolina en rebanadas del septum dorsolateral, y demostraron que esta droga, actuando sobre receptores muscarínicos (del tipo M1), lleva a la desinhibición al producir un decremento en la liberación de GABA. Estos datos apoyan la idea de que el área dorsolateral del septum actúa en mecanismos integradores y no es una simple estación de relevo sináptico.

Vinogradova, Brahnzik, Karanov y Zhadina (1980) realizaron registros extracelulares de los núcleos septales en conejos no anestesiados. Estos autores usaron las siguientes preparaciones: 1) núcleos septales intactos, 2) interrupción completa de las conexiones con el hipocampo y 3) sección basal completa que interrumpía las fibras provenientes del tronco encéfalico. Sus

hallazgos más significativos fueron a nuestro criterio los detallados a continuación. La frecuencia media de descarga de las neuronas del SL se incrementaba aproximadamente 2 veces después de la desconexión con el hipocampo sugiriendo una naturaleza inhibitoria de la proyección hipocampo-septal; salvas a la frecuencia theta continuaron registrándose en las neuronas septales y la proporción de neuronas que descargaban en salvas aumentó de 28% a 42% mientras que la frecuencia de potenciales de acción en cada salva permaneció incambiada. La frecuencia de neuronas con descarga regular "marcapaso símil" se incrementó de 0% a 26% en el SL después de la desconexión con el hipocampo. Después del corte basal las neuronas del SM incrementaron su frecuencia de descarga al doble y si bien en esta preparación la proporción de neuronas descargando en salvas permaneció básicamente incambiada (25%), la frecuencia media de las salvas decreció significativamente. Las neuronas del SM con actividad "marcapaso símil" se incrementaron al 21% en la preparación deaferentada basalmente (6% en el SM intacto). El mismo grupo trabajando *in vitro* con rebanadas del área septal de cobayos demostró que: 1) las neuronas septales registradas poseían una actividad espontánea relativamente alta, 2) la mayoría de las neuronas (64%) tenían actividad altamente regular y 3) el 22% de las neuronas mantenían actividad rítmica en salvas.

Koller, Siebler, Schmalenvbach y Muller (1990) encontraron que neuronas septales cultivadas *in vitro* no mostraban actividad rítmica en salvas. Aunque este resultado puede recibir diversas interpretaciones, sugiere que la ritmicidad de las neuronas septales depende de circuitos intraseptales y no de propiedades intrínsecas de la membrana de estas neuronas.

La corteza entorrinal

Desde los estudios de Ramón y Cajal (1911) y Lorente de Nó (1933, 1934) se conoce que la principal aferencia al hipocampo proviene de la corteza entorrinal. Evidencias anatómicas (Krettek y Price, 1977) y fisiológicas (Boeijinga y Van Groen, 1984) han demostrado que la corteza entorrinal es la mayor puerta de entrada de información sensorial al hipocampo.

Generación de ritmo theta por la corteza entorrinal

Las aferencias al hipocampo que no provienen del septum han sido consideradas no rítmicas. Sin embargo la corteza entorrinal, origen del mayor

número de fibras aferentes al hipocampo, muestra ritmo theta en las mismas condiciones que el hipocampo. Alonso y García-Austt (1987a) demostraron que los perfiles eléctricos de la corteza entorrinal durante el ritmo theta presentaban una inversión de fase de 180° en la parte superficial de la capa III. Este ritmo podría ser consecuencia del ritmo theta hipocámpico o ser generado independientemente. La terminación de fibras septales en las capas II y III de la corteza entorrinal junto con la inversión de fase en esta área sugiere que el septum juega un rol en la generación del ritmo theta entorrinal. Alonso y García-Austt (1987b) encontraron también células rítmicas en la capa II de la corteza entorrinal. Es probable que parte de esta proyección lleve información rítmica, ya que las células de las capas II y III las que se proyectan sobre el hipocampo. Entonces sobre el hipocampo convergería información rítmica no sólo desde el septum sino también desde la corteza entorrinal.

Vanderwolf y Leung (1983) reportaron que lesiones de la corteza entorrinal de ratas abolían el theta tipo 1 (atropina sensitivo) pero dejaban el tipo 2 intacto (atropina resistente). La evidencia para esta suposición consistió en que la administración de atropina o escopolamina en animales con lesiones de la corteza entorrinal abolía completamente al ritmo theta hipocámpico. Sin la administración de estas drogas las ratas continuaban produciendo cierta actividad theta cuando se movían, pero fueron también hallados patrones anormales de actividad de campo hipocámpica.

Alonso y Llinás (1989) reportaron oscilaciones rítmicas de membrana, Na^+ dependientes, en registros intracelulares de células de la capa II de rebanadas de corteza entorrinal. Estas células fueron identificadas como neuronas estelares por inyección intracelular de colorante. Estos experimentos prueban la existencia de un ritmo theta generado localmente en la corteza entorrinal.

El tronco encefálico

Muchos núcleos del tronco encefálico mandan aferencias a la formación hipocámpica. Experimentos de estimulación y lesión demostraron que varios de estos núcleos controlan la generación del ritmo theta y la actividad celular del hipocampo. Por lo tanto, el tronco encefálico puede afectar globalmente la función hipocámpica y los estados conductuales influenciados o dependientes de dicha función.

Rol del tronco encefálico en la generación de ritmo theta

Green y Arduini (1954) en su estudio inicial, no solamente describieron la actividad theta hipocámpica, sino que también reportaron que el ritmo theta hipocámpico podía ser generado por estimulación eléctrica de la formación reticular del tronco encefálico. Varios estudios indican que dentro de la formación reticular existen áreas cuya estimulación genera sincronización en el hipocampo (ritmo theta) y otras en las que la estimulación produce desincronización en el hipocampo (actividad rápida e irregular). Estos estudios, con algunas pocas excepciones, indican que la región pontina medial es la fuente de sincronización hipocámpica; el rol del rafe medial como fuente de desincronización hipocámpica es más discutido (Vertes, 1982).

Está bien documentado que el efecto del tronco encefálico sobre el hipocampo está mediado por el SM-BDB (Gogolak, Petsche, Sterc y Stumpf, 1967; Vertes, 1982). Un sistema desincronizante originado en el rafe medial y que asciende a través del haz medio del cerebro anterior (middle forebrain bundle) fue planteado por Vertes (1981) (el rol del rafe medial como parte de los sistemas desincronizantes es puesto en duda por los estudios de Vanderwolf y Baker, 1986). Vertes en el mismo estudio describe a un sistema sincronizante, cursando rostralmente a través del mesencéfalo desde su origen en la formación reticular pontina. La demostración de que pocas fibras pontinas llegan al área septal sugirió de que el efecto de la formación reticular sobre el septum debería ser mediado por una vía polisináptica y que deberían existir estaciones sinápticas intermedias. Áreas de relevo sináptico han sido postuladas en el hipotálamo posterior. Vertes (1981) piensa que el mejor candidato para un núcleo intermediario es el núcleo supramamilar (SUM). Esta conclusión se funda en la demostración de: 1) un intenso marcado bilateral del SUM después de la inyección en el SM de peroxidasa de rabanita y 2) una proyección importante desde la formación reticulada pontina (núcleo *pontis oralis*) al SUM usando técnicas autorradiográficas. Bland (1971) halló que la estimulación del área de los núcleos hipotalámicos dorsomedial y posterior (DM-PH) producía theta de máxima frecuencia y amplitud (cuando era comparada con la estimulación de otras áreas hipotalámicas). Bland (1971, 1986) postula que el DM-PH sería el núcleo intermediario. Debe destacarse que la región del DM-PH está ubicada ligeramente anterior y algo superior al SUM y que es probable que en ambas áreas, las fibras que viajan desde el tronco encefálico al SM, establezcan importantes sinapsis de relevo.

Bibliografia

- Alonso, A. & Garcia-Austt, E. (1987a). Neuronal sources of theta rhythm in the entorhinal cortex of the rat I. Laminar distribution of theta field potentials. *Exp. Brain Res.*, 67, 493-501.
- Alonso, A. & Garcia-Austt, E. (1987b). Neuronal sources of theta rhythm in the entorhinal cortex of the rat II. Phase relations between unit discharges and theta field potentials. *Exp. Brain Res.*, 67, 502-509.
- Alonso, A. and Kohler, C. (1982). Evidence for separate projections of hippocampal pyramidal and non-pyramidal neurons to different parts of the septum of the rat. *Neuroscience Letters*, 31, 209-214.
- Alonso, A. and Llinas R. R. (1989). Subthreshold Na^+ -dependent theta-like rhythmicity in stellate cells of entorhinal cortex layer III. *Nature*, 342, 175-177.
- Amaral, D. G. (1978). A Golgi study of cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 182, 851-914.
- Andersen, P. (1975). Organization of hippocampal neurons and their interconnections. In R. L. Issacson and K. H. Pribram (Eds.) *The Hippocampus*, 155-175. Plenum Press: New York.
- Andersen, P. and Eccles, J. C. (1962). Inhibitory phasing of neuronal discharge. *Nature*, 196, 645-647.
- Artemenko, D. P. (1973). Participation of hippocampal neurons in theta-waves generation. *Neurophysiology*, 4, 409-415.
- Blackstad, T. W. (1956). Commissural connections of the hippocampal region in the rat with special reference to their mode of termination. *J. Comp. Neurol.*, 105, 417- 538.
- Bland, B. H. (1971). Diencephalic and hippocampal mechanisms of motor activity in the rat. Doctoral dissertation, University of Western Ontario.
- Bland, B. H. (1986). The physiology and pharmacology of hippocampal theta rhythms. *Progress in Neurobiology*, 26, 1-54.
- Bland, B. H., Andersen, P. & Ganes, T. (1975). Two generators of hippocampal theta activity in rabbits. *Brain Res.*, 94, 199-218.
- Bland, B. H., Andersen, P., Ganes, T. & Sveen, O. (1980). Automated analysis of rhythmicity of physiologically identified hippocampal formation neurons. *Expl. Brain Res.*, 38, 205-219.

- Bland, B. H. & Whishaw, J. Q. (1976). Generators and topography of hippocampal theta (RSA) in the anaesthetized and freely moving rat. *Brain Res.*, 118, 259-280.
- Bland, B. H. & Colom, L. V. (1989). Preliminary observations of the physiology and pharmacology of hippocampal theta-off cells. *Brain Res.*, 505, 303-336.
- Boijinga, P. H. & Van Groen T. H. (1984). Inputs from the olfactory bulb to the entorhinal cortex in the cat II. Physiological studies. *Exp. Brain Res.*, 57, 40-48.
- Braitenberg, V. & Schuz, A. (1983). Some anatomical comments on the hippocampus. In W. Seifert (Ed.), *Neurobiology of the Hippocampus*, 21-37. Academic Press: New York.
- Buño, W. Jr., & Velluti, J. C. (1977). Relationships of hippocampal theta cycles with bar pressing during self-stimulation. *Physiol. and Behav.*, 19, 615-621.
- Chronister, R. B. & De France, J. F. (1979). Organization of projection neurons of the hippocampus. *Exp. Neurol.*, 66, 309-532.
- Coyle, J. T., Price, D. L. & DeLong, R. (1983). Alzheimer disease: A disorder of cholinergic innervation, *Science*, 219, 1184-1190.
- Colom, L. V & Bland, B.H. (1987). State dependent spike train dynamics of hippocampal formation neurons: Evidence for theta-on and theta-off cells. *Brain Res.*, 422, 277-286.
- Colom, L. V., Christie, B. R. & Bland, B. H. (1988). Cingulate cell discharge patterns related to hippocampal EEG and their modulation by muscarinic and nicotinic agents. *Brain Res.*, 460, 329-338.
- Colom, L. V., Ford, R. D., & Bland, B. H. (1987). Hippocampal formation neurons code the level of activation of the cholinergic septo-hippocampal pathway. *Brain Res.*, 410, 12-20.
- Dingledine, R., Langmoen, I. A. (1980). Conductance changes and inhibitory actions of hippocampal recurrent IPSPs. *Brain Res.*, 185, 277-287.
- Dudek, F. E., Andrew, R. D., MacVicar, B. A., Snow, R. W. & Taylor, C. P. (1983). Recent evidence for a possible significance of gap junctions and electrotonic synapses in the mammalian brain. *Basic mechanisms of neuronal hyperexcitability*, 31-73. Alan R. Liss, Inc.: New York.
- Dutar, P., Lamour Y., & Jobert, A. (1985). Septohippocampal neurons in the rat: An *in vivo* intracellular study. *Brain Res.*, 340, 135-142.

- Dutar, P., Lamour, Y., Rascol O., Jobert, A. (1986). Septohippocampal neurons in the rat: Further study of their physiological and pharmacological properties. *Brain Res.*, 365, 325-334.
- Feenstra, B. W. A. and Holsheimer, J. (1979). Dipole-like neuronal sources of theta rhythm in dorsal hippocampus dentate gyrus and cingulate cortex of urethane-anaesthetized rat. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.*, 47, 532-538.
- Ford, R. D., Colom, L. V. & Bland, B. H. (1989). The classification of medial septum- diagonal band cells as theta-on or theta-off in relation to hippocampal EEG states. *Brain Res.*, 193, 269-282.
- Fujita, Y. & Sato, T. (1964). Intracellular records from hippocampal pyramidal cells in rabbits during theta rhythm activity. *J. Neurophysiol.*, 27, 1011-1026.
- Freund, T. F. & Antal, M. (1988). GABA-containing neurons in the septum control inhibitory interneurons in the hippocampus. *Nature*, 336, 170-173.
- Freund, T. F., Gulyas, A. I., Acsady, L., Gorcs, T. & Toth K. (1990). Serotonergic control of the hippocampus via local inhibitory interneurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87, 8501-8505.
- Gallagher, J. P., Stevens, D. R., Twery, M. J., & Shinnick-Gallagher, P. (1987). Inhibition of synaptic and spontaneous activity recorded intracellularly from dorsolateral septal nucleus (DLSN) neurons in an *in vitro* rat slice preparation. Inactivation of hypersensitive neurons, 233-239. Alan R. Liss Inc.: New York.
- Gamrani, H. B., Ontoniente, B., Seguela, P., Geffard, M., & Calas, A. (1986). Gamma- aminobutyric acid-immunoreactivity in the rat hippocampus. A light and electron microscopic study with anti-GABA antibodies. *Brain Res.*, 364, 30-38.
- Garcia-Austl, E. (1984). Hippocampal level of neural integration. In Reinoso-Suarez, F. & C. Ajmone-Marsan (Eds.), *Cortical integration*, 91-104. Raven Press: New York.
- Gogolak, G., Petsche, H., Sterc, J. & Stumpf, C. (1967). Septum cell activity in the rabbit under reticular stimulation. *Brain Res.*, 5, 508-510.
- Gogolak, G., Stumpf, C., Petsche, H. & Sterc, J. (1968). The firing pattern of septal neurons and the form of hippocampal theta wave. *Brain Res.*, 7, 201-207.

- Green, J. D., Maxwell, D. S., Schindler, W. J. & Stumpf, C. (1960). Rabbit EEG "theta" rhythm: Its anatomical source and relation to activity in single neurons. *J. Neurophysiol.*, 23, 403-420.
- Greenstein, Y. J., Pavlides, C., & Winson, J. (1988). Long-term potentiation in dentate gyrus is preferentially induced at theta rhythm periodicity. *Brain Res.*, 438, 331- 334.
- Halgren, E. (1991). Firing of human hippocampal units in relation to voluntary movements. *Hippocampus*, 1, 153-162.
- Hasuo, H. Gallagher, J. P. & Shinnick-Gallagher, P. (1988). Disinhibition in the rat septum mediated by M1 muscarinic receptors, *Brain Res.*, 438, 323-327.
- Hyman, B. T., Van Hoesen, G. W., Damasio, A. R. & Barnes, C. L. (1984). Alzheimer's disease: Cell-specific pathology isolates the hippocampal formation. *Science*, 225, 1168-1170.
- Isokawa-Akesson, M., Babb, T. L. & Wilson, C. L. (1987). Physiology of hippocampal neurons in humans and lower mammals. In J. Engel, Jr. et al (Eds.), *Fundamental mechanisms of human brain function*, 15-25. Raven Press: New York.
- Isokawa-Akesson, M., Wilson, C. L. & Babb, T. L. (1987). Diversity in periodic pattern of firing in human hippocampal neurons. *Exp. Neurol.*, 98, 137-151.
- Kohler, C., Chan-Palay, V. & Wu, J. Y. (1984). Septal neurons containing glutamic acid decarboxylase immunoreactivity project to the hippocampal region of the rat brain. *Anat. Embryol.*, 169, 41-44.
- Koller, H. Siebler, M., Schmalenbach, C. & Muller, H. W. (1990). Electrophysiological properties of rat septal region neurons during development in culture. *Brain Res.*, 509, 85-90.
- Kramis, R. C., Vanderwolf, C. H. and Bland, B. H. (1975). Two types of hippocampal rhythmical slow activity in both the rabbit and the rat: Relation to behaviour and effects of atropine, diethyl ether, urethane, and pentobarbital. *Exp. Neurol.*, 49, 58-85.
- Kretter, J. E. & Price, J. L. (1977). Projections from the amygdaloid complex and adjacent olfactory structures to the entorhinal cortex and to the subiculum in the rat and cat. *J. Comp. Neurol.*, 177, 723-752.
- Lacaille, J. C., Kunkel, D. D. and Schwartzkroin, P. A. (1989). Electrophysiological and morphological characterization of hippocampal

- interneurons. *The Hippocampus- New Vistas*, 285-303. Alan R. Liss, Inc.: New York.
- Larson, J. & Lynch, G. (1989). Theta pattern stimulation and the induction of LTP: The sequence in which synapses are stimulated determines the degree to which the potentiate. *Brain Res.*, 49, 49-58.
- Larson, J., Wong, D. & Lynch, G. (1986). Patterned stimulation at the theta frequency is optimal for thm induction of hippocampal long-term potentiation. *Brain Res.*, 368, 347-350.
- Leung, L. S. (1984). Theta rhythm during REM and waking: Correlations between power, phase and frequency. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.*, 58, 553-564.
- Lewis, P. R. & Shute, C. C. D. (1967). The cholinergic limbic system; projections to the hippocampal formation, medial cortex, nuclei of the ascending reticular system and the subfornical organ supraoptic crest. *Brain Res.*, 90, 521-540.
- Lynch, G., Rose, G., & Gall, C. (1978). Anatomical and functional aspects of the septo- hippocampal projections. *Functions of the Septo-Hippocampal System*, 5-43. CIBA Foundation Symposium 58 (New Series).
- Lopez da Silva, F. H., Witer, M. P., Boeijinga, P. H. & Lohman, A. H. M. (1990). Anatomic organization and physiology of the limbic cortex. *Physiol. Rev.*, 70, 453- 511.
- Lorente de Nó, R. (1933). Studies on the structure of the cerebral cortex I. the area entorhinalis. *Psychol. Neurol.*, 45, 381-437.
- Lorente de Nó, R. (1934). Studies of the structure of the cerebral cortex II. continuation of the study of the ammonic system. *Psychol. Neuron.*, 46, 113-177.
- Markram, H. & Segal, M. (1990). Electrophysiological characteristics of cholinergic and non-cholinergic neurons in the rat medial septum-diagonal band complex. *Brain Res.*, 513, 171-174.
- McBain, C. J., Traynelis, S. F. & Dingledine, R. (1990). Regional variation of extracellular space in the hippocampus. *Science*, 249, 674-677.
- Misgeld, U. & Frotscher, M. (1986). Postsynaptic-GABAergic inhibition of non-pyramidal neurons in the guinea-pig hippocampus. *Neuroscience*, 19, 193-206.

- Mizomuri, S. J. Y., Barnes, C. A. & MacNaughton, B. L. (1990). Behavioral correlates of theta-on and theta-off cells recorded from hippocampal formation of mature young and aged rats. *Exp. Brain Res.*, 80, 365-373.
- Morales, F. R., Roig, J. A., Monti, J. M., Macadar, O. & Budelli, R. (1971). Septal unit activity and hippocampal EEG during the sleep-wakefulness cycle of the rat. *Physiol. & Behav.*, 6, 563-567.
- Muller, W. & Misgeld, V. (1990). Inhibitory role of dentate hilus neurons in guinea pig hippocampal slice. *Journal of Neurophysiology*, 64, 44-56.
- Muñoz, M. D., Nuñez, A. & Garcia-Austt, E. (1990). *In vivo* intracellular analysis of rat dentate granule cells. *Brain Res.*, 509, 91-98.
- Nuñez, A., Garcia-Austt, E. & Buño, W., Jr. (1987). Intracellular theta-rhythm generation in identified hippocampal pyramids. *Brain Res.*, 416, 289-300.
- Panula, P., Revuelta, A. V., Cheney, D. L., Wu, J. V. & Costa, E. (1984). An immunohistochemical study on the location of GABAergic neurons in the septum. *J. Comp. Neurol.*, 222, 69-80.
- 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. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.*, 19, 25-33.
- Raisman, G. (1966). The connections of the septum. *Brain*, 89, 317-348.
- Ramón Y Cajal, S. (1911). *Histology du système nerveux de l'homme et des vertébrates*, tome II. A. Maloine, Paris.
- Ranck, J. B., Jr. (1973). Studies on single neurons in dorsal hippocampal formation and septum in unrestrained rats I. Behavioral correlates and firing repertoires. *Exp. Neurol*, 41, 461-555.
- Rye, D. B., Wainer, B. H., Mesulam, M. M., Mufson, E. J., & Saper, C. B. (1984). Cortical projections arising from the basal forebrain: A study of cholinergic and non-cholinergic components employing combined retrograde tracing and immunohistochemical localization of choline acetyltransferase. *Neuroscience*, 13, 627-643.
- Schwartzkroin, P. A. (1986). Hippocampal slices in experimental and human epilepsy. In A. V. Delgado-Escueta, A. A. Ward, D. M. Woodbury, R. J. Porter (Eds.), *Advances in neurology*, Vol. 44. Basic mechanisms of the epilepsies: Molecular and cellular approaches, XX-XX. Raven Press: New York.

- Schwartzkroin, P. A. & Prince, D. A. (1980). Changes in excitatory and inhibitory synaptic potentials leading to epileptogenic activity. *Brain Res.*, 183, 61-76.
- Seress, L. & Ribak, C. E. (1983). GABAergic cells in the dentate gyrus appear to be local circuit and projection neurons. *Expl. Brain Res.*, 50, 173-182.
- Shute, C. C. D. & Lewis, P. R. (1967). The ascending cholinergic reticular system: Neocortical, olfactory, & subcortical projections. *Brain Res.*, 90, 497-520.
- Snow, R. W. & Dudek, F. E. (1984). Synchronous epileptiform bursts without chemical transmission in CA2, CA3 and dentate areas of the hippocampus. *Brain Res.*, 298, 382-385.
- Steriade, M., Gloor, P., Llinás, R. R., Lopez da Silva, F. A., Mesulam, M. M. (1990). Basic mechanisms of cerebral rhythmical activities. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.*, 76, 481-508.
- Stevens, D. R., Gallagher, J. P. & Shinnick-Gallagher, P. (1984). Intracellular recordings from rat dorsolateral septal neurons, *in vitro*. *Brain Res.*, 305, 353-356.
- Stephan, H. (1966). Größenänderungen im olfaktorischen und limbischen system während der phylogenetischen Entwicklung der Primaten. In Hassler R. and H. Stephan (Eds.), *Evolution of the forebrain*, 377-388. Georg Thieme, Stuttgart.
- Steriade, M., Gloor, P., Llinás, P. R., Lopez da Silva, F. H., & Mesulam, M. M. (1990). Basic mechanisms of cerebral rhythmic activities. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.*, 76, 481-508.
- Stewart, M. & Fox, S. E. (1991). Hippocampal theta activity in monkeys. *Brain Res.*, 538, 59-63.
- Swanson, L. W. & Cowan, W. M. (1977). An autoradiographic study of the organization of the efferent connections in the hippocampal formation in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 172, 49-84.
- Swanson, L. W., Kohler, C. & Bjorklund, A. (1987). The limbic region I: The septohippocampal system. In A. Bjorklund, T. Hokfelt, & L. W. Swanson (Eds.), *Handbook of chemical neuroanatomy*, Vol. 5: Integrated systems of the CNS, 125-277.
- Taylor, C. P. & Dudek, F. E. (1982). Synchronous neural after discharges in rat hippocampal slices without active chemical synapses. *Science*, 218, 810-812.

- Tombol, T. & Petsche, H. (1969). The histological organization of the pacemaker for the hippocampal theta rhythm in the rabbit. *Brain Res.*, 12, 414-426.
- Vanderwolf, C. H. (1969). Hippocampal electrical activity and voluntary movement in the rat. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.*, 26, 407-418.
- Vanderwolf, C. H. (1988). Cerebral activity and behaviour: Control by central cholinergic and serotonergic systems. *International Review of Neurobiology*, 30, 225-331.
- Vanderwolf, C. H. & Baker, G. B. (1986) Evidence that serotonin mediates non-cholinergic neocortical low voltage fast activity, non cholinergic hippocampal rhythmical activity and contributes to intelligent behavior. *Brain Res.*, 374, 342-356.
- Vanderwolf, C. H., Kramis, R., & Robinson, T. E. (1978). Hippocampal electrical activity during waking behaviour and sleep: Analyses using centrally acting drugs. *Functions of the septo hippocampal system*, 199-221. CIBA foundation symposium 58 (New Series).
- Vanderwolf, C. H. & Leung, L. S. (1983). Hippocampal rhythmical slow activity: A brief history and the effects of entorhinal lesions and phenocyclidine. In G. W. Seiffert (Ed.), *Neurobiology of the hippocampus*, 275-302. Academic Press: New York.
- Vertes, R. P. (1981). An analysis of ascending brainstem systems involved in hippocampal synchronization and desynchronization. *J. Neurophysiol.*, 46, 1140- 1159.
- Vertes, R. P. (1982). Brain stem generation of hippocampal EEG. *Prog. in Neurobiol.*, 19, 159-186.
- Vinogradova, O. S., Brahnzik, E. S., Karanov, A. N. & Zhadina, S. D. (1980). Neuronal activity of the septum following various types of deafferentation. *Brain Res.*, 187, 353-368.
- Wainer, B. H., Levey, A. I., Rye, B. B., Mesulam, M-M, & Mufson, E. J. (1985). Cholinergic and non-cholinergic septohippocampal pathways. *Neurosci. Lett.*, 54, 45-52.
- Whishaw, I. Q. (1976). The effects of alcohol and atropine on EEG and behaviour in the rabbit. *Psychopharmacology*, 45, 83-90.
- Whishaw, I. Q., Bland, B. H. & Bayer, S. A. (1978). Postnatal hippocampal granule cell agenesis in the rat: Effects on two types of rhythmical slow activity (RSA) in two hippocampal generators. *Brain Res.*, 146, 249-268.

- Whishaw, J. Q., & Sutherland, R. J. (1982). Sparing of rhythmic slow activity (RSA or theta) in two hippocampal generators after kainic acid CA3 and CA4 lesions. *Exp. Neurol.*, 75, 711-728.
- Winson, J. (1974). Patterns of hippocampal theta rhythm in the freely moving rat. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.*, 36, 291-301.
- Winson, J. (1976a). Hippocampal theta rhythm I. Depth profiles in the curarized rat. *Brain Res.*, 103, 57-70.
- Winson, J. (1976b). Hippocampal theta rhythm II. Depth profiles in the freely moving rabbit. *Brain Res.*, 103, 71-79.

ANTECEDENTES AL TEMA PRESENTADO EN ESTA TESIS

Generación de ritmicidad por el hipocampo

Rowntree y Bland (1986) hallaron que microinfusiones de agentes colinérgicos en el hipocampo de ratas anesthesiadas con uretano, provocaban la generación de ritmo theta hipocámpico. El agonista colinérgico carbacol y la anticolinesterasa eserina generaron ritmo theta cuando fueron inyectadas en CA1, CA3 y el GD. El efecto de las drogas colinérgicas fue antagonizado con sulfato de atropina, demostrando que la activación de receptores muscarínicos era esencial para la generación de ritmo theta en las condiciones estudiadas. Estos resultados proveen información acerca del sitio de acción de drogas colinérgicas en el ritmo theta tipo 2, que ocurre cuando el animal está inmóvil o anestesiado.

Se ha postulado que las diferencias farmacológicas entre los dos tipos de ritmo theta (tipo 1 relacionado con el movimiento y tipo 2 que ocurre durante la inmovilidad o cuando el animal está anestesiado) reside en las aferencias septales al hipocampo. Este postulado se basa en el hallazgo de que el septum manda al hipocampo fibras colinérgicas y GABAérgicas que terminan en CA1 y el dentado, áreas que intervendrían en la generación de ritmo theta por el hipocampo (véase las revisiones de: Bland, 1986 y Bland y Colom, 1993)

Buzsaki, Leung y Vanderwolf (1983) sugirieron que las entradas colinérgicas responsables de la generación de ritmo theta en el hipocampo son de origen septal y que las no colinérgicas, responsables del ritmo theta hipocámpico acetilcolina independiente, se originan en la corteza entorrinal. Dicha formulación implica que las drogas colinérgicas actuarían a nivel hipocámpico.

Otros investigadores que apoyan la idea de que las células septales funcionan como marcapaso del ritmo theta hipocámpico sostienen que las drogas colinérgicas actuarían a nivel del septum medial. Así, Macadar, Roig, Monti y Budelli (1970) reportaron que la droga antimuscarínica escopolamina abolía no solamente el ritmo theta hipocámpico sino también la ritmicidad de las células septales. Más aún, Dutar, Whishaw y Szerb (1979) reportaron que la inyección sistémica de sulfato de atropina abolía a nivel del hipocampo el incremento en la liberación de acetilcolina que se observaba normalmente durante la estimulación sensorial, pero no abolía el incremento en la liberación de acetilcolina observado durante los actos motores del animal. Estos autores

interpretaron sus hallazgos como indicación de que la estimulación sensorial activaría una vía al septum con un eslabón colinérgico (al menos) mientras que que las actividades motoras activan al septum a través de una vía no colinérgica. Dutar *et al.* concluyen que la principal acción de las drogas colinérgicas ocurre a nivel de estructuras que mandan aferencias al hipocampo pero no en el hipocampo mismo.

El estudio de Rowntree y Bland (1986) sugiere que esta conclusión podría estar equivocada. La actividad theta pudo ser generada con infusiones intrahipocámpicas de agentes colinérgicos y bloqueo con infusiones intrahipocámpicas de agentes anticolinérgicos. Estos resultados indican que receptores colinérgicos en el hipocampo están directamente involucrados en la generación de ritmo theta (por lo menos en las condiciones experimentales de los autores). Otros dos hallazgos deben ser enfatizados de este trabajo: 1) las infusiones de microlitros de carbacol o eserina en áreas localizadas del hipocampo resultaron en la aparición de un ritmo theta extendido a distintas regiones de ambos hipocampos (imposible de diferenciar del ritmo theta que ocurre en condiciones fisiológicas), 2) la infusión continua (no rítmica) de agentes colinérgicos pudo generar una actividad hipocámpica rítmica. Rowntree y Bland (1986) sugieren que la entrada rítmica septal no sería necesaria para la generación del ritmo theta hipocámpico.

Estos experimentos sugieren la posibilidad de que el hipocampo podría tener la maquinaria para generar ritmo theta. Para avanzar en esta dirección otros experimentos fueron realizados por el grupo de Bland. Konopacki *et al.* (1987, 1988) iniciaron una serie de experimentos usando rebanadas de hipocampo y tratando de determinar si el hipocampo podía generar actividad rítmica en esas condiciones de deaferentación. La aplicación de carbacol produjo trenes de ondas que se parecieron al ritmo theta fisiológico. La amplitud de estos trenes de oscilaciones fue mayor en el dentado que en CA1, como ocurre en la preparación *in vivo*. Sulfato de atropina antagonizó esta actividad theta simil también como ocurre *in vivo*. Estos resultados proveen por primera vez evidencia de que las neuronas hipocámpicas son capaces de producir actividad rítmica sincronizada estando aisladas de las aferencias septales (y de todo otro tipo de aferencias). Cuando las rebanadas de hipocampo fueron cortadas de tal modo que las regiones de CA1 y del dentado fueron separadas, ambas áreas demostraron capacidad de generar actividad theta simil independientemente. En estos experimentos la relación de fase fija

observada en condiciones fisiológicas entre ambos generadores desapareció, en su lugar cambios de fase de 0° a 180° entre ambas regiones fueron observadas. Frecuentemente ambas áreas generadoras oscilaban a frecuencias diferentes, con el GD mostrando una clara tendencia a oscilar a frecuencias más altas que la región de CA1. Esta diferencia entre la preparación *in vitro* e *in vivo* fue interpretada como resultado de la falta de aferencias septales en la rebanada de hipocampo, postulando los autores una función septal de sincronización entre las distintas áreas hipocámpicas, cada una con características intrínsecas de marcapaso cuando expuestas a una excitación basal adecuada.

El desarrollo de la actividad theta en rebanadas de hipocampo extraídas de ratas en crecimiento, fue estudiado por el mismo grupo. La aparición inicial de los trenes de oscilaciones se observó en las rebanadas obtenidas de ratas de 8 días de edad; observándose a partir de ese momento un constante incremento en la amplitud de la actividad theta símil. Este patrón de desarrollo *in vitro* se asemeja muchísimo al desarrollo del ritmo theta *in vivo*.

Los siguientes hechos: 1) el ritmo *in vitro* tiene una naturaleza colinérgica-muscarínica y puede ser bloqueado completamente con sulfato de atropina como el theta tipo 2 descrito *in vivo*, 2) las mismas áreas generadoras existen *in vitro* e *in vivo* (una tercer área generadora fue demostrada en la región CA3c de la rebanada de hipocampo), 3) cronologías similares existen entre el desarrollo de la actividad rítmica *in vitro* e *in vivo*, sugieren que el ritmo observado *in vitro* podría estar determinado por mecanismos intrahipocámpicos similares a los responsables del ritmo theta observado *in vivo*.

A pesar de estas similitudes, diferencias entre las preparaciones *in vivo* e *in vitro* deben ser siempre consideradas. Así por ejemplo, las rebanadas cortadas perpendicularmente al eje mayor del hipocampo (transversales) tienen menos inhibición que el hipocampo intacto (Knowles y Schwartzkroin, 1981). Entonces la excitación y propagación de los procesos excitatorios deberían ser más fáciles en la rebanada transversal de hipocampo que en el hipocampo intacto.

En la preparación *in vivo* la deaferentación septal suprime 2 efectos: 1) la acción principalmente excitatoria de las fibras colinérgicas del SM y 2) la acción inhibitoria de las fibras GABAérgicas del mismo origen.

Las acciones colinérgicas en las células piramidales pueden ser resumidas así: 1) depolarización de membrana por bloqueo de una corriente de

K⁺ (Benardo y Prince, 1982; Madison, Lancaster y Nicoll, 1987), 2) desaparición del postpotencial hiperpolarizante por bloqueo de la corriente de K⁺ AHP (Bernardo y Prince, 1982; Cole y Nicoll, 1984), 3) bloqueo de la corriente M de K⁺ (Halliwell y Adams, 1982), 4) desinhibición, actuando a nivel de interneuronas inhibitorias probablemente a través de una depresión en la liberación del neurotransmisor desde las terminales inhibitorias (Haas, 1981; Krnjevic, Reiffenstein y Ropert, 1980, 1981; Ben-ari, Krnjevic, Reinhardt y Ropert, 1981) y 5) depresión de los PPSEs a través de inhibición presináptica (Hounsgaard, 1978). Entonces, las acciones colinérgicas sobre las células son predominantemente excitadoras y claramente complejas.

Las fibras septales GABAérgicas establecen contacto presináptico principalmente con interneuronas GABAérgicas inhibitorias (Freund y Antal, 1988), entonces la supresión de las aferencias septales produce un incremento de los procesos inhibitorios intrahipocámpicos.

Globalmente, la supresión de las aferencias septales *in vivo* crea un hipocampo "super-inhibido", a través de interneuronas GABAérgicas trabajando en exceso y de la carencia de una influencia colinérgica principalmente excitatoria. Esta situación nunca se logra en la rebanada transversa de hipocampo ya que muchos de los circuitos inhibitorios intrahipocámpicos están dañados e inoperantes.

Generación de descargas rítmicas por las células septales

Uno de los hechos menos discutidos en la fisiología hipocámpica es que en la preparación *in vivo*, es necesaria la integridad del área septal para la aparición de ritmo theta (Bland 1986). Lo que queda por establecer es la naturaleza de la aferencia septal necesaria para la generación del ritmo theta hipocámpico. Específicamente interesa determinar los tipos de circuitos necesarios para la generación de ritmo theta por la formación hipocámpica: 1) intraseptales, 2) entre los diversos núcleos septales como el SM y el SL y 3) entre el área septal y la formación hipocámpica.

Los estudios utilizando lesiones localizadas, demostraron la importancia del área septal en la generación de ritmo theta hipocámpico y sugirieron que la actividad celular en el septum medial debería estar relacionada con dicho ritmo. Petsche, Stumpf y Gogolack (1962) demostraron la existencia de células septales que disparaban en salvas rítmicas, y en fase con el ritmo theta hipocámpico. Más aún, estas células continuaron disparando en salvas rítmicas

durante una descarga epiléptica a nivel del hipocampo y durante el periodo de depresión postictal. Las observaciones de estos autores llevaron a excluir a la retroalimentación hipocámpica como una etapa necesaria para el disparo rítmico de las células septales y a proponer a las células rítmicas del SM como marcapasos en la producción del ritmo theta hipocámpico. La existencia en el área del SM de una población de células no rítmicas fue demostrada por los mismos autores.

Varios estudios corroboraron y extendieron los hallazgos citados previamente (Bland, 1986). Mientras que la descripción de los tipos celulares relacionados al ritmo theta hipocámpico ha sido importante, futuros progresos vendrán del conocimiento de las propiedades de las redes neuronales que permiten la generación de dicho ritmo. Por lo tanto, es necesario el estudio de las interacciones celulares a nivel del hipocampo y del septum para mejorar nuestro conocimiento de los mecanismos generadores del ritmo theta. Un método aceptado para el estudio de interacciones neurales es el registro simultáneo de la actividad de varias neuronas y la posterior evaluación de posibles interacciones, mediante la correlación cruzada de los trenes de potenciales de acción. Los resultados son inspeccionados buscando posibles signos de coherencia (Perkel, Gerstein y Moore, 1967; More, Segundo, Perkel y Levitan, 1970). El investigador usa los tiempos relativos entre las descargas de los elementos registrados, e infiere interacciones funcionales entre neuronas vecinas. Los análisis de correlación hacen posible: 1) el análisis de la forma, amplitud y polaridad de potenciales postsinápticos que acoplan a las células registradas realizando simples registros extracelulares, 2) inferir la existencia de otras neuronas en la red (por ejemplo, neuronas que constituyen una fuente común de excitación a los elementos registrados) y 3) hacer planteos precisos sobre la descarga de estas últimas células, aún sin ninguna muestra directa de su actividad (Moore, Segundo, Perkel y Levitan, 1970).

Bibliografía

- Benardo, L. A. & Prince, D. A. (1982). Ionic mechanisms of cholinergic excitation in mammalian hippocampal pyramidal cells. *Brain Res.*, 249, 333-344.
- Ben-ari, Y., Krnjevic, K., Reinhardt, W. & Ropert, N. (1981). Intracellular observations on the disinhibitory action of acetylcholine in the hippocampus. *Neurosci.*, 6, 2475- 2484.

- Buzsáki, G., Leung, L. S. & Vanderwolf, C. H. (1983). Cellular basis of hippocampal EEG in the behaving rat. *Brain Res. Rev.*, 6, 139-171.
- Cole, A. E. & Nicoll, R. A. (1984). Characterization of a slow cholinergic post-synaptic potential recorded *in vitro* from the rat hippocampal pyramidal cells. *J. Physiol (Lond)*, 352, 173-188.
- Dudar, J. D., Whishaw, I. Q., & Szerb, J. C. (1979). Release of acetylcholine from the hippocampus of freely moving rats during sensory stimulation and running. *Neuropharmacol.*, 18, 673-678.
- Freund, T. F. & Antal, M. (1988). GABA-containing neurons in the septum control inhibitory interneurons in the hippocampus. *Nature*, 336, 170-173.
- Halliwel, J. V. & Adams, P. R. (1982). Voltage-clamp analysis of muscarinic excitation in hippocampal neurons. *Brain Res.*, 250, 71-92.
- Haas, L. H. (1981). Cholinergic disinhibition in hippocampal slices of the rat. *Brain Res.*, 233, 200-204.
- Hounsgaard, J. (1978). Presynaptic inhibitory action of the acetylcholine in area CA1 of the hippocampus. *Expl. Neurol.*, 62, 787-797.
- Knowles, W. D. & Schwartzkroin, P. A. (1981). Local circuit synaptic interactions in hippocampal brain slice. *J. Neurosci.*, 1, 318-322.
- Konopacki, J., Bland, B. H., MacIver, M. B., & Roth, S. H. (1987). Cholinergic theta rhythm in transected hippocampal slices: Independent CA1 and dentate generators. *Brain Res.*, 436, 217-222.
- Konopacki, J., Bland, B. H., & Roth, S. H. (1987). Phase shifting of CA1 and dentate EEG "theta" in hippocampal formation slices. *Brain Res.*, 417, 399-402.
- Konopacki, J., Bland, B. H., & Roth, S. H. (1988). Carbacol-induced EEG theta in hippocampal formation slices: Evidence for a third generator of theta in CA3C area. *Brain Res.*, 451, 33-42.
- Konopacki, J., Bland, B. H., & Roth, S. H. (1988). Evidence that activation of *in vitro* hippocampal theta rhythm involves only muscarinic receptors. *Brain Res.*, 455, 110-114.
- Konopacki, J., Bland, B. H., & Roth, S. H. (1988). The development of carbacol-induced EEG theta examined in hippocampal formation slices. *Developmental Brain Res.*, 38, 229-232.
- Konopacki, J., MacIver, M. B., Bland, B. H., & Roth, S. H. (1987). Theta in hippocampal slices: Relation to synaptic responses of dentate neurons. *Brain Res. Bull.*, 18, 25-27.

- Konopacki, J., MacIver, M. B., Roth, S. H., & Bland, B. H. (1987). Carbacol-induced EEG theta activity in hippocampal brain slices. *Brain Res.*, 405, 196-198.
- Krnjevic, K., Reiffenstein, R. J., & Ropert, N. (1980). Disinhibitory action of acetylcholine in the hippocampus. *J. Physiol. (London)*, 38, 73-74.
- Krnjevic, K., Reiffenstein, R. J., & Ropert, N. (1981). Disinhibition action of acetylcholine in the rat's hippocampus: Extracellular observations. *Neuroscience*, 6, 2465-2474.
- Macadar, O., Roig, J. A., Monti, J. M., & Budelli, R. (1970). The functional relationship between septal and hippocampal unit activity and hippocampal theta rhythm. *Physiol. Behav.*, 5, 1443-1449.
- Madison, D. V., Lancaster, B. & Nicoll, R. A. (1987). Voltage clamp analysis of cholinergic action in the hippocampus. *J. Neurosci.*, 7, 733-741.
- Moore, G. P., Segundo, J. P., Perkel, D. H., & Levitan, H. (1970). Statistical signs of synaptic interaction in neurons. *Biophysical Journal*, 10, 876-900.
- Perkel, D. H., Gerstein, J. L., & Moore, G. P. (1967). Neuronal spike trains and stochastic point processes I. The single spike train. *Biophys. J.*, 7, 391-418.
- 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 arousal activity by the septum cells. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.*, 19, 25-33.
- Rowntree, C. I. & Bland, B. H. (1986). An analysis of cholinceptive neurons in the hippocampal formation by direct microinfusion. *Brain Res.*, 362, 98-113.

SIGNIFICADO

LLinás en una publicación en 1988 concluye: "especialmente durante el desarrollo, oscilaciones y resonancia le permiten a unidades elementales del sistema nervioso central (SNC) estar entrelazadas en estados funcionales capaces de representar y transformar marcos de referencia externos en conectividad neuronal. En adición a estas propiedades, oscilación y resonancia generan estados globales como los ritmos de vigilia-sueño y probablemente estados emocionales y de atención. Aunque las vías nerviosas sensitivas entregan mensajes al SNC que son básicamente invariables en relación a un dado estímulo sensitivo, la manera en que el SNC trata a estos mensajes depende del estado funcional de cada estación de relevo. Entonces, más que un simple espejo del mundo externo, el SNC incorpora un diálogo entre los estados internos generados por la actividad eléctrica intrínseca de las células nerviosas y su conectividad, y la información que llega al cerebro desde los sentidos. Este último punto puede ser también significativo en la patología del SNC si uno considera que alteraciones de este marco de referencia intrínseco puede ser importante en ciertas patologías neurológicas y condiciones psiquiátricas".

El foco de este proyecto es el estudio de los mecanismos que participan en la generación del ritmo theta hipocámpico. La serie de experimentos presentados en esta tesis pretende expandir nuestro conocimiento de: 1) la actividad theta, la más característica actividad de campo eléctrico exhibida por el cerebro de muchos mamíferos y 2) los procesos rítmicos del cerebro y los mecanismos oscilatorios responsables de dichos procesos.

Las estructuras con poblaciones de células capaces de oscilar a diferentes frecuencias en el cerebro son más comunes de lo ordinariamente creído. Ninguna estructura en el cerebro produce un campo eléctrico tan grande como el hipocampo *in vivo* o *in vitro*. El entendimiento de los mecanismos osciladores en la rebanada de hipocampo y en el sistema septo-hipocámpico *in vivo* pueden elucidar mecanismos que existen en otras estructuras más difíciles de examinar. La investigación de la sincronización, el reclutamiento y la propagación de los fenómenos excitatorios dentro de poblaciones neuronales llevado a cabo en este proyecto, aportará datos significativos para la comprensión de los fenómenos epilépticos. El estudio del procesamiento de información que se repite a la frecuencia theta nos brindará información acerca de procesos envueltos en la potenciación a largo plazo y entonces, muy probablemente en los procesos envueltos en la memoria. El entendimiento de los

circuitos colinérgicos envueltos en la generación del ritmo theta hipocámpico traerá datos útiles en el estudio de la enfermedad de Alzheimer, donde circuitos colinérgicos están claramente afectados.

Bibliografía

Llinás, R. R. (1988). The intrinsic electrophysiological properties of mammalian neurons: insights into central nervous system function. *Science*, 242, 1654-1664.

OBJETIVOS

Los objetivos de esta tesis pueden ser divididos en dos categorías:

1) A pesar de que el hipocampo genera ritmo theta, nunca ha sido estudiado como un oscilador. Las propiedades oscilatorias de una estructura son relevantes en establecer sus capacidades funcionales y sus límites. Es por lo tanto relevante la caracterización de los mecanismos que le permiten al hipocampo generar actividades rítmicas. Dos áreas generadoras de ritmo theta han sido postuladas en el hipocampo: CA1 y el GD, pero aún existe controversia acerca del rol de dichas áreas en la generación de dicho ritmo (Bland, 1986). Más obscuras aún son las conexiones funcionales de las diferentes áreas hipocámpicas y la naturaleza de las aferencias que afectan y/o le permiten la generación de ritmo theta. Desde el trabajo de Konopacki y colaboradores (1987) y Tse y MacVicar (1989) en rebanadas de hipocampo perfundidas con drogas colinérgicas, y el de Leung y Yim (1991) sobre las oscilaciones del potencial de membrana en células hipocámpicas *in vitro* es claro que el hipocampo (por lo menos en las condiciones experimentales de dichos trabajos) es capaz de oscilar en el rango de la frecuencia theta, sugiriendo que la ritmicidad observada podría ser una propiedad intrínseca de las neuronas hipocámpicas. Esta tesis se dedica a demostrar: 1) la existencia de una base celular para las oscilaciones a la frecuencia theta observadas *in vitro* y 2) que las mismas oscilaciones y actividad celular subyacente puede ser encontrada en el hipocampo septalmente deaferentado *in vivo*.

2) La integridad de las aferencias septales es crítica para la generación de ritmo theta fisiológico en el hipocampo. La naturaleza de las aferencias septales no ha sido todavía claramente demostrada. El SM da origen a fibras que establecen sinapsis con células piramidales e interneuronas en las distintas regiones hipocámpicas. Algunas de estas fibras traen información rítmica y someten a las neuronas hipocámpicas a un bombardeo sináptico rítmico (Dutar, Lamour y Jobert, 1985). Las células septales rítmicas disparan salvas de potenciales de acción a la frecuencia theta, sin embargo todavía no conocemos que mecanismos generan ritmicidad a nivel del SM y como las distintas células septales se sincronizan a la frecuencia theta. La determinación de los mecanismos generadores de ritmicidad y sincronizantes de las células del SM constituyen el segundo objetivo de esta tesis.

La siguiente es la hipótesis de trabajo que existe debajo de estos dos objetivos:

La generación de ritmo theta por el hipocampo necesita de la co-activación de múltiples estructuras interrelacionadas, cada una con ciertas propiedades de ritmicidad y marcapaso, siendo la integridad del área ("marcapaso") septal necesaria, pero no por si sola condición suficiente para generar ritmo theta a nivel del hipocampo.

Bibliografía

- Bland, B. H. (1986). The physiology and pharmacology of hippocampal theta rhythms. *Progress in Neurobiology*, 26, 1-54.
- Dutar, P., Lamour Y., & Jobert, A. (1985). Septo-hippocampal neurons in the rat: An *in vivo* intracellular study. *Brain Res.*, 340, 135-142.
- Konopacki, J., MacIver, M. B., Roth, S. H., & Bland, B. H. (1987). Carbacol-induced EEG "theta" activity in hippocampal brain slices. *Brain Res.*, 405, 196-198.
- Leung, S. L. and Yim, C. C. (1991). Intrinsic membrane potential oscillations in hippocampal neurons in vitro. *Brain Res.*, 553, 261-274.
- MacVicar, B. A. and Tse, F. W. Y. (1989). Local neural circuitry underlying cholinergic rhythmical slow activity in CA3 area of rat hippocampal slices. *J. Physiol.*, 417, 197-212.

REGISTROS INTRACELULARES DE ACTIVIDAD THETA SÍMIL EN REBANADAS DE HIPOCAMPO PERFUNDIDAS CON CARBACOL

Resumen

Registros intracelulares fueron realizados en las capas celulares de CA1, CA3 y del dentado, antes, durante y después de la perfusión del baño con 50 μ M de carbacol en la rebanada de hipocampo. En 56% de las células registradas mostraron una actividad relacionada con el ritmo theta. Así por ejemplo, estas células exhibieron oscilaciones de potencial de membrana de 5 a 28 mV y descargas rítmicas de potenciales de acción relacionadas al ritmo theta extracelular inducido por carbacol. El 44% remanente de las células registradas no mostró las mencionadas relaciones con el ritmo theta extracelular. Carbacol produjo depolarización en todas las células, en el rango de los 10 a 20 mV. Estos resultados demuestran una base celular para el ritmo theta inducido con carbacol en la rebanada de hipocampo.

Introducción

El entendimiento de la fisiología y farmacología de los ritmos theta de la formación hipocámpica se ha incrementado significativamente en los últimos años (Bland, 1986). Sin embargo, existe una carencia de datos acerca de los procesos celulares subyacentes a los ritmos theta. Más aún, no existe consenso acerca del rol de los PPSE y de los PPSI en la generación de ritmo theta. Esto no es sorprendente dadas las dificultades de mantener registros intracelulares estables por cierto tiempo en la preparación *en vivo*.

Las ventajas de la preparación *in vitro* para registros intracelulares y manipulaciones farmacológicas están bien documentadas. Konopacki y colaboradores demostraron que la aplicación de 50 μ M de carbacol en rebanadas de hipocampo resulta en la producción de trenes de ondas lentas, the apariencia muy similar al ritmo theta observado *in vivo* (Konopacki, McIver, Bland y Roth, 1987; Konopacki, McIver, Roth y Bland, 1987). La aplicación subsequente de sulfato de atropina antagonizó a la actividad theta símil inducida con carbacol. Entonces, este ritmo *in vitro* se parece al ritmo theta colinérgico de los roedores descrito *in vivo* por Kramis, Vanderwolf y Bland en 1975 y que más recientemente a sido clasificado como theta tipo 2 por dicho grupo.

A pesar de que las líneas de evidencia presentadas sólo sugieren similitudes y no necesariamente la misma naturaleza, en este trabajo esta

actividad será denominada theta símil de acuerdo a su parecido con el ritmo theta registrado *in vivo*.

El sitio de acción de los agonistas y antagonistas colinérgicos en la producción y el bloqueo del theta tipo 2 respectivamente ha sido materia de debate. Rowtree y Bland (1986) demostraron en la rata anestesiada con uretano, que la microinfusión directa de agentes colinérgicos en regiones localizadas de la formación hipocámpica resultaba en la producción o el bloqueo del ritmo theta tipo 2. Estos resultados sugirieron que el lugar de acción de la modulación colinérgica en el ritmo theta tipo 2 se encontraba en la formación hipocámpica y que la actividad rítmica proveniente del septum no era necesaria para generar ritmo theta. Los resultados citados anteriormente en la preparación *in vitro* están de acuerdo con este postulado.

Basados en datos obtenidos *in vitro* Bland postula que el SM tendría una función de mantener una fase constante entre los distintos generadores hipocámpicos de ritmo theta (Konopacki, Bland y Roth, 1988) y en crear un trasfondo de excitación tónica necesario para la generación de ritmo theta por el hipocampo. Bland y su grupo también demostraron que los generadores de las áreas CA1 y el dentado son capaces de generar actividad theta en forma independiente (Konopacki, Bland, McIver y Roth, 1987) y que probablemente existe un tercer generador de ritmo theta en el área CA3c (Konopacki, Bland y Roth, 1988). Más aún la aparición y el desarrollo del ritmo theta usando la preparación *in vitro* es claramente similar a los resultados obtenidos en estudios *in vivo* (Konopacki, Bland y Roth, 1988).

El propósito del presente estudio ha sido validar que la actividad theta símil inducida con carbacol *in vitro* puede ser un modelo útil para estudiar los mecanismos celulares responsables de la actividad rítmica hipocámpica.

Métodos

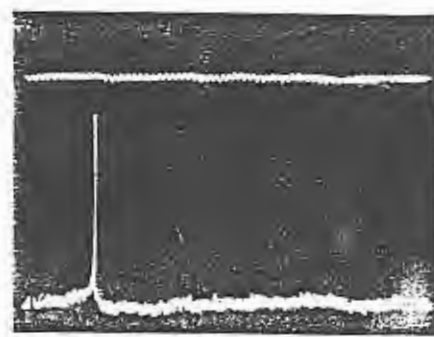
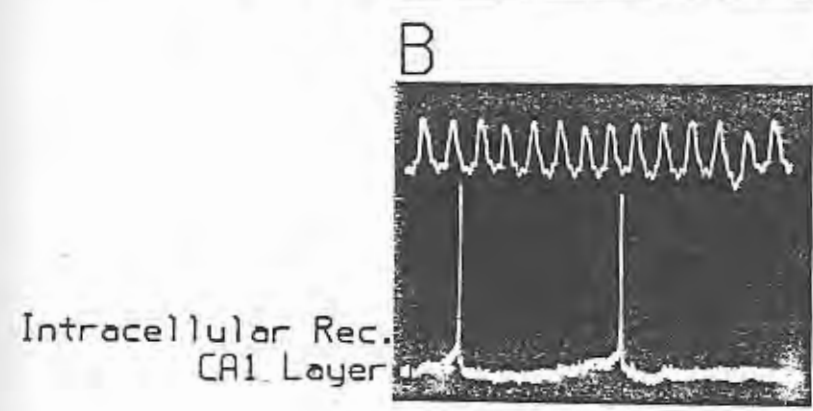
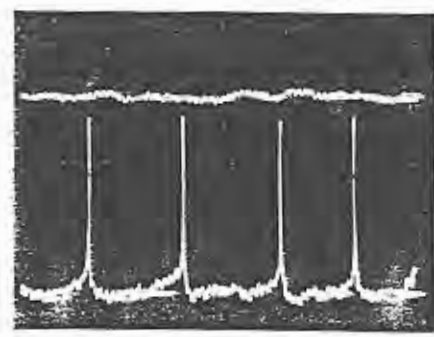
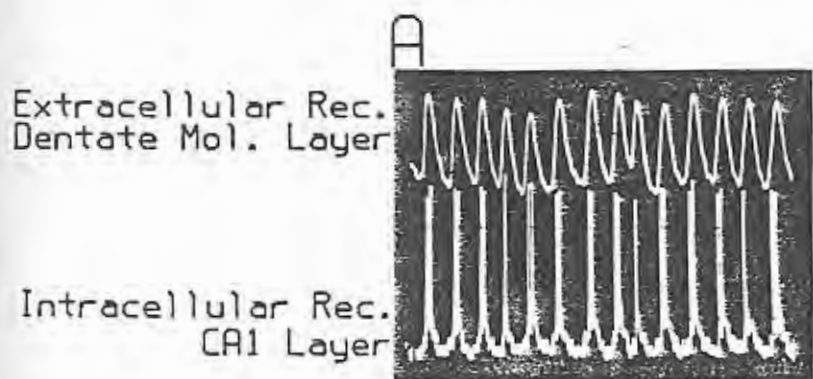
Diez y seis experimentos fueron llevados a cabo en 16 rebanadas de hipocampo obtenidas de ratas macho Sprague-Dawley (100-150 g, Biosciences Vivarium, University of Calgary). Las rebanadas de hipocampo fueron preparadas y mantenidas en la interfase gas-líquido de una cámara de perfusión previamente descrita (Konopacki, McIver, Bland y Roth, 1987; Konopacki, McIver, Roth y Bland, 1987). Soluciones preoxigenadas (95% O₂ y 5% CO₂) y calentadas (35° C) de líquido céfalo raquídeo (LCR) artificial y soluciones conteniendo carbacol fueron preparadas antes de cada experimento, usando

agua deionizada y filtrada (Millipore super Q system). Las rebanadas de hipocampo fueron perfundidas constantemente a razón de 1 ml por minuto. La actividad theta fue inducida por la perfusión de 50 μ M de solución de carbacol. Electrodo de vidrio, llenos una solución de cloruro de potasio 3 M y con una resistencia entre 80 y 120 MegOhm fueron usados para los registros intracelulares. Los electrodos se colocaron dentro de las capas celulares bajo guía visual y se avanzaron lentamente con un micromanipulador hidráulico. Un electrodo de vidrio lleno con cloruro de sodio 2 M y con una resistencia de 5 a 10 MegOhm fue usado para registro extracelular de la actividad theta. Para registros extracelulares las señales eléctricas fueron amplificadas diferencialmente usando un amplificador P-15 (Grass instruments) con un filtro de bajas frecuencias colocado a 1 Hz y uno de altas frecuencias a 10 KHz. Para registros intracelulares se usó un amplificador modelo 707 de W-P Instruments. Ambos: la actividad de campo y los registros intracelulares, fueron mostrados en un osciloscopio digital (Gould OS4020) y grabados en papel usando un impresor Gould. Las señales también fueron grabadas en cinta para posterior análisis.

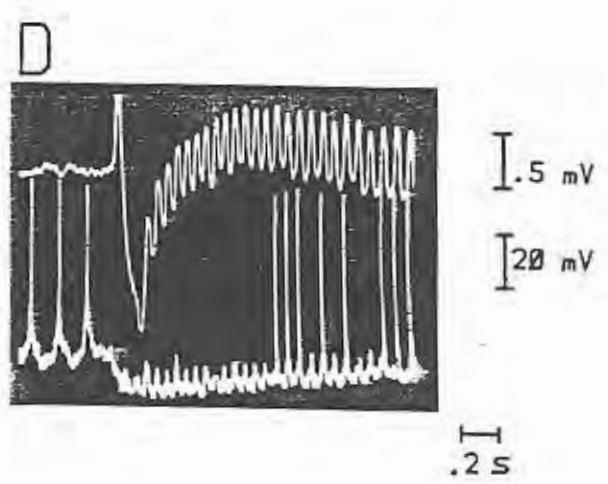
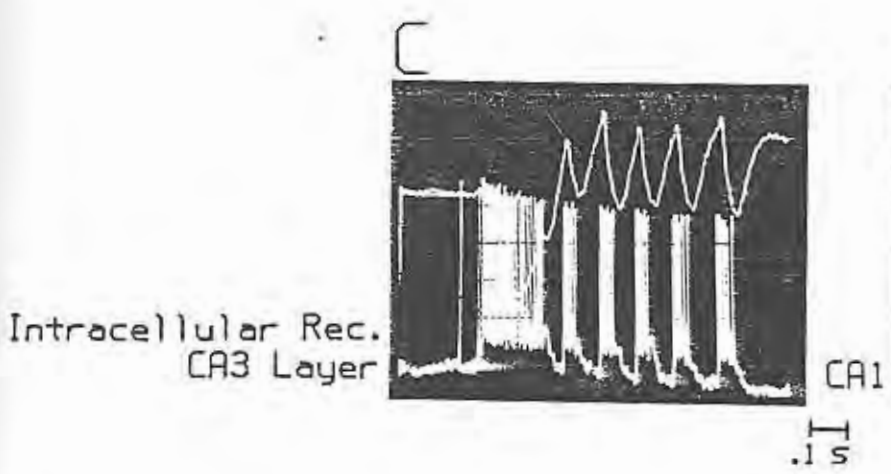
Resultados

Se obtuvieron registros intracelulares de un total de 16 células, 13 en la capa piramidal de CA1, 1 en la capa piramidal de CA3 y 2 en la capa granulosa del GD. Las 16 células fueron registradas durante las siguientes condiciones de prueba y por los siguientes tiempos: 1) condición basal (LCR normal) por un mínimo de 5 minutos; 2) período durante la perfusión del baño con 50 μ M de carbacol antes de la aparición de la actividad theta (usualmente de una duración de aproximadamente 10 minutos); 3) durante los trenes de actividad theta inducidos por carbacol, por 5 a 20 minutos. Las células registradas tuvieron potenciales de reposo en un rango de -40 a -60 mV (media= -49.77, d.s. +7.19) y potenciales de acción en un rango de 55 a 85 mV (media= 65.63, d.s.+7.5).

Nueve células (56%) estuvieron relacionadas al ritmo theta, es decir que tuvieron oscilaciones de potencial de membrana de 5 a 28 mV y descargas rítmicas de potenciales de acción relacionadas al ritmo theta extracelular



.1 s



.2 s

Figura 1. Registros intracelulares que muestran las variaciones del potencial de membrana y los patrones de descarga de células relacionadas y de células no relacionados al ritmo theta extracelular. A: el panel izquierdo muestra a una célula theta relacionada en CA1. Durante el theta extracelular el potencial de membrana de la célula mostró oscilaciones rítmicas y múltiples descargas de espigas rítmicas, que ocurrieron cercanas al pico de las depolarizaciones. El panel derecho ilustra dicha célula, en ausencia de theta extracelular, las oscilaciones del potencial de membrana desaparecieron y las descargas de espigas pasaron a ser únicas y de baja frecuencia. B: los paneles izquierdo y derecho muestran una célula de la región CA1 cuyo potencial de membrana no mostró oscilaciones en presencia o ausencia de ritmo theta extracelular. C: este panel muestra una célula theta relacionada de la región CA3. Nótese la depolarización inicial y las descargas múltiples en espigas al comienzo del ritmo theta extracelular y la posterior hiperpolarización acompañada de oscilaciones del potencial de membrana y múltiples descargas en espigas. D: este panel muestra a una célula theta relacionada de la región CA1. Nótese al comienzo del ritmo theta extracelular, la hiperpolarización inicial seguida por el retorno gradual del potencial de membrana a la línea de base. Durante la hiperpolarización cesaron las descargas en espigas pero las oscilaciones del potencial de membrana estuvieron presentes.

inducido por carbacol (figura 1A). Siete células (44%) no exhibieron estas relaciones, es decir que no tuvieron ninguna oscilación de potencial de membrana o descargas de potenciales de acción relacionadas al ritmo theta (figura 1B). No existieron diferencias de amplitud de potencial de membrana o de amplitud de potenciales de acción entre estos dos grupos celulares (ni en la calidad del ritmo theta extracelular obtenido en los distintos experimentos).

En todas las células registradas, la adición de carbacol tuvo dos efectos que aparecieron antes de la actividad rítmica. El primer efecto fue un incremento en las descargas de potenciales de acción (de 0-1 a 1-4 potenciales de acción por segundo). El segundo efecto fue una depolarización de 10 a 20 mV y larga duración.

Después de estos efectos, aparecieron los cambios relacionados a la actividad theta similar que sólo ocurrieron en 9 células. Cinco de estas células mostraron una depolarización al comienzo del tren de actividad theta. Esta

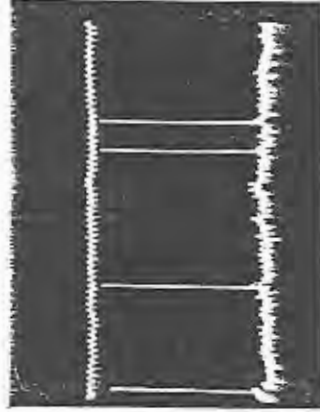
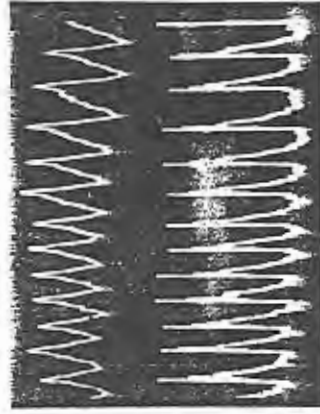
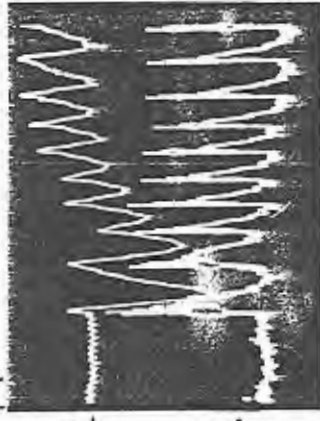
depolarización fue seguida por una hiperpolarización de menor amplitud y un retorno lento al potencial de membrana registrado antes del tren de actividad rítmica. La figura 1C muestra esta conducta, que se acompañó siempre de una descarga en salva de potenciales de acción. Siguiendo a una prolongada descarga inicial en salva, ocurrieron oscilaciones de potencial de membrana (18 a 20 mV) sobre las que se montaron salvas de potenciales de acción. Cuatro de las células theta relacionadas mostraron una hiperpolarización inicial al comienzo del tren de actividad theta, seguido por un retorno gradual al potencial de membrana observado antes del tren. La figura 1D muestra un ejemplo de esta conducta. Nótese que en esta célula las descargas de potenciales de acción cesaron durante la hiperpolarización, aún cuando persistieron las oscilaciones rítmicas del potencial de membrana y que las descargas de potenciales de acción recomenzaron cuando el potencial de membrana se aproximó a los niveles originales. La figura 2A muestra la misma célula de la figura 1C, al comienzo de otro tren de actividad rítmica theta similar, marcado nuevamente por una depolarización del potencial de membrana. Aquí las oscilaciones de potencial de membrana tuvieron la amplitud suficiente (más de 20 mV) para reducir la amplitud de los potenciales de acción que acompañaron a cada onda. Nótese en la parte derecha de la figura, que junto con el cese de las oscilaciones de potencial de membrana se observó un incremento en la amplitud de los potenciales de acción. El comienzo del tren de actividad theta similar mostrado en la célula de la figura 2B fue acompañado de una depolarización y oscilaciones de potencial de membrana de menor amplitud, se observó por lo tanto una disminución menor en la altura de los potenciales de acción. Nótese también que la ocurrencia de algunos potenciales de acción en la pendiente ascendente de las oscilaciones del potencial de membrana (paneles izquierdo y medio). La figura 2C muestra una célula del área CA1 que mostró oscilaciones de potencial de membrana de gran amplitud (28 mV) y un cese completo de las descargas de potenciales de acción, probablemente producido por una inactivación de canales de Na^+ .

Discusión

Los resultados descriptos demuestran que la actividad theta similar registrada *in vitro* no es un epifenómeno sin base celular. El modelo de actividad theta similar inducida por carbacol en la rebanada de hipocampo, parecería entonces adecuado para el estudio de los mecanismos celulares subyacentes al ritmo

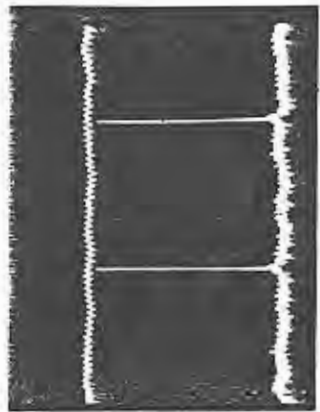
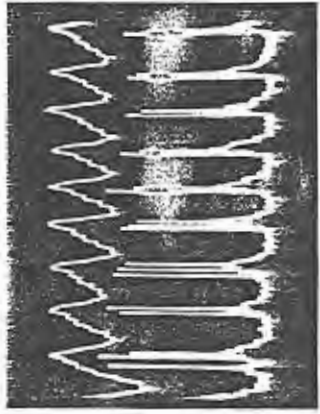
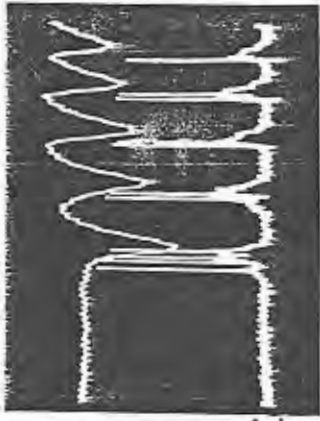
A

Extracellular Rec.
Dentate Mol. Layer



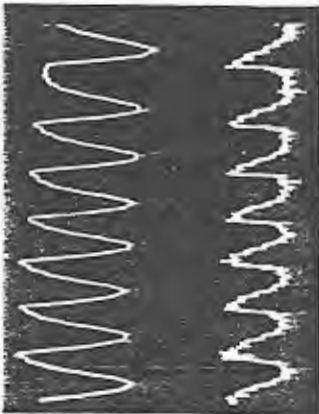
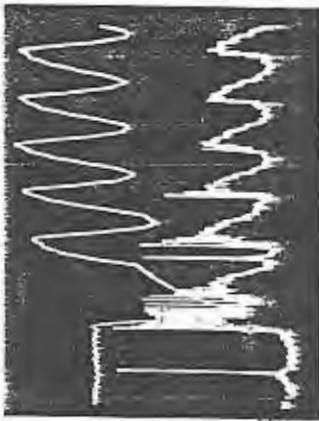
B

Intracellular Rec.
Granular Layer



C

Intracellular Rec.
CA1 Layer



1.5 mV

20 mV

1 s

desaparecen las ondas de
la depolarización es menor

Figura 2. Relaciones entre las oscilaciones de potencial de membrana y las descargas en espiga de células theta relacionadas. A: la misma célula que en la figura 1C, al comienzo de otro tren de theta. Los tres paneles representan secciones de registros continuos, llenando de izquierda a derecha. Nótese que las oscilaciones intracelulares fueron suficientemente grandes (mayores que 25 mV) para atenuar la amplitud de las salvas de espigas. B: un ejemplo de una célula del dentado mostrando oscilaciones de potencial de membrana de menor amplitud y una menor reducción en el número y altura de las sucesivas descargas de espigas. C: Un ejemplo de una célula de CA1 con oscilaciones de potencial de membrana de gran amplitud (28 mV) y completa desaparición de las descargas en espigas.

theta colinérgico *in vivo*, por su similitud con este último ritmo y por ofrecer todas las ventajas concomitantes a la preparación *in vitro*.

Los resultados mostrados en la presente publicación son semejantes a algunos reportados *in vivo* usando registros intracelulares. El reporte más temprano en la literatura de registros intracelulares en la formación hipocámpica es el de Fujita y Sato en 1964. Estos autores encontraron un ritmo theta intracelular de 5 a 36 mV en células hipocámpicas de conejos curarizados y argumentaron que los principales responsables en la generación del ritmo theta eran los PPSEs, ya que la hiperpolarización de las células estudiadas resultó en un aumento de la amplitud del ritmo y la depolarización de las mismas células en una reducción de la amplitud del mismo. Apoyando el argumento de que los PPSIs no estaban involucrados, Fujita y Sato hallaron que la difusión de Cl^- intracelular no resultó en una reversión de fase del ritmo theta intracelular cuando se lo comparaba al ritmo theta extracelular registrado simultáneamente. Artemenko (1973) sin embargo, usando la misma preparación experimental, presentó argumentos que apoyan la idea de que los PPSIs en el soma de las células piramidales juegan un rol prioritario en la generación del ritmo theta intracelular. Andersen (1980) realizó registros intracelulares de células granulosas del GD de conejos. Este autor sugirió que el nivel de activación de las aferencias a estas células durante el ritmo theta es un factor importante a considerar cuando se intenta describir los mecanismos subyacentes a dicho ritmo. Andersen concluyó que los mecanismos del ritmo theta intracelular pueden ser visualizados como una sumación de potenciales sinápticos

sincrónicos y de ondas depolarizantes de larga duración; cuando ritmo theta de alta frecuencia es observado, estas ondas depolarizantes se asocian a descargas en salva de potenciales de acción y son seguidas por hiperpolarizaciones post-activación. Trabajando con ratas anestesiadas con uretano Fox, Wolfson y Ranck (1983) y Leung y Yim (1986) presentaron datos en apoyo de que los PPSIs constituyen el mayor factor subyacente al ritmo theta (sólo el ritmo theta colinérgico o tipo 2 de Vanderwolf fue estudiado). En contraste con estos autores Nuñez, García-Austt y Buño (1987) usando ratas anestesiadas con uretano y curarizadas argumentan que el ritmo theta intracelular es reflexión de PPSEs y de potenciales lentos. Estos autores concluyen que las características biofísicas de la membrana de la neurona piramidal son particularmente importantes en la generación del ritmo theta intracelular. Aunque nosotros no hayamos evaluado la contribución de PPSEs y PPSIs en la generación de ritmo theta *in vitro* los registros aquí presentados son muy similares a los de Nuñez *et al.*

La aplicación iontoforética de de L-glutamato depolariza a las células piramidales (Dingledine, 1983). Recientemente Konopacki *et al.* (1987) mostró que la aplicación de glutamato por si sola no es suficiente para producir actividad theta símil *in vitro*, ya que la aplicación de glutamato en la rebanada de hipocampo genera actividad epileptiforme pero no oscilaciones rítmicas del potencial de membrana. Estos datos también sugieren que la depolarización de las células hipocámpicas puede ser condición necesaria pero no suficiente para la generación de actividad theta símil *in vitro*.

En relación a los cambios producidos por la aplicación de carbacol en el potencial de membrana de células hipocámpicas, nuestros hallazgos apoyan investigaciones previas. Está bien documentado que la aplicación de acetilcolina o carbacol produce una depolarización del potencial de membrana (Haas, 1982; Krnjevic, Pumain y Renaud, 1971) y un incremento de la resistencia de entrada que no fue medido en este trabajo. Otras acciones de la acetilcolina son el bloqueo de la hiperpolarización (AHP, en inglés) que sigue al potencial de acción (Bernardo y Prince, 1982) y el bloqueo de la corriente M (I_m) voltaje dependiente (Halliwell y Adams, 1982). Madison, Lancaster y Nicoll (1987) recientemente demostraron que de dos corrientes de K^+ , Ca^{++} activadas, (I_{AHP} y I_C) en las células piramidales del hipocampo, sólo la I_{AHP} es sensible a la aplicación de drogas colinérgicas. Siendo la I_{AHP} 10 veces más sensible a la aplicación de carbacol que la corriente I_m . Estos autores también demostraron

que ni el bloqueo de I_{AHP} ni el de I_m puede dar cuenta de la producción del PPSE lento que se observa durante la aplicación de carbacol. Los autores concluyen que los potenciales PPSEs lentos serían generados por el bloqueo de una corriente base de K^+ , voltaje independiente.

En resumen, el presente estudio demuestra que existen correlatos intracelulares a la actividad theta símil inducida por carbacol en la rebanada de hipocampo. Esta preparación será un modelo valioso para el estudio de los mecanismos celulares y las propiedades de red subyacentes a actividades rítmicas y a actividades que producen grandes potenciales de campo en general.

Bibliografía

- Andersen, P., Participating neurons and mechanisms underlying theta activity in unanesthetized rabbits, *Prog. Brain Res.*, 54 (1980) 371-380.
- Artemenko, D.P., Role of hippocampal neurons in theta wave generation, *Neurophysiology*, (1973) 409-415.
- Bernardo, L.S. and Prince, D.A., Ionic mechanisms of cholinergic excitation in mammalian hippocampal pyramidal cells, *Brain Research*, 249 (1982) 333-344.
- Bland, B.H., The physiology and pharmacology of hippocampal formation theta rhythms, *Prog. Neurobiol.*, 26 (1986) 1-54.
- Dingledine, R., Excitatory amino acids: modes of action on hippocampal pyramidal cells, *Federation Proc.*, 42 (1983) 2881-2885.
- Fox, S.E., Wolfson, S. and Ranck, J.B., Jr., Investigating the mechanisms of hippocampal theta rhythms: approaches and progress. In W. Seifert (Ed.), *Neurobiology of the Hippocampus*, Academic Press London, 1983, pp 303-319.
- Fujita, Y. and Sato, T., Intracellular records from hippocampal pyramidal cells in rabbits uring theta rhythm activity, *J. Neurophysiol.*, 27 (1964) 1011-1025.
- Haas, H.L., Cholinergic disinhibition in hippocampal slices of the rat, *Brain Research*, 33 (1982) 200-204.
- Halliwel, J.V. and Adams, P.R., Voltage-clamp analysis of muscarinic excitation in hippocampal neurons, *Brain Research*, 250 (19 82) 71-92.
- Konopacki, J., Bland, B.H. and Roth, S.H., Phase shifting of CA1 and dentate EEG theta in hippocampal formation slices, *Brain Research*, 417 (1987) 399-402.

- Konopacki, J., Bland, B.H. and Roth, S.H., The development of carbachol-induced EEG theta examined in hippocampal formation slices, *Dev. Brain Research*, 38 (1988) 229-232.
- Konopacki, J., Bland, B.H. and Roth, S.H., Carbachol-induced EEG theta in hippocampal formation slices: evidence for a third generator of theta in CA3C area, *Brain Research*, 451 (1988) 33-42.
- Konopacki, J., Bland, B.H. and Roth, S.H., Evidence that activation of *in vitro* hippocampal theta rhythm only involves muscarinic receptors, *Brain Research*, 455 (1988) 110-114.
- Konopacki, J., Bland, B.H., MacIver, M.B. and Roth, S.H., Cholinergic theta rhythm in transected hippocampal slices: independent CA1 and dentate generators, *Brain Research*, 436 (1987) 217-222.
- Konopacki, J., MacIver, M.B., Bland, B.H. and Roth, S.H., Theta in hippocampal slices: relation to synaptic responses of dentate neurons, *Brain Res. Bull.*, 18 (1987) 25-27.
- Konopacki, J., MacIver, M.B., Roth, S.H. and Bland, B.H., Carbachol-induced EEG theta activity in hippocampal brain slices, *Brain Research*, 405 (1987) 196-198.
- Kramis, R., Vanderwolf, C.H. and Bland, B.H., Two types of hippocampal rhythmical slow activity (RSA) in both the rabbit and the rat: relations to behaviour and effects of atropine, diethyl ether, urethane and pentobarbital, *Exp. Neurol.*, 49 (1975) 58-85.
- Krnjevic, K., Pumain, R. and Renaud, L., The mechanism of excitation by acetylcholine in the cerebral cortex, *J. Physiol.*, 215 (1971) 247-268.
- Leung, L.W.S. and Yim, C.V., Intracellular records of theta rhythm in hippocampal CA1 cells of the rat, *Brain Research*, 267 (1986) 323-327.
- Madison, D.V., Lancaster, B. and Nicoll, R.A., Voltage clamp analysis of cholinergic action in the hippocampus, *J. Neurosci.*, 7 (1987) 733-741.
- Núñez, A., Garcia-Austt, E. and Buño, Jr., W., Intracellular O-rhythm generation in identified hippocampal pyramids, *Brain Research*, 416 (1987) 289-300.
- Rowntree, C.I. and Bland, B.H., An analysis of cholinceptive neurons in the hippocampal formation by direct microinfusion, *Brain Research*, 362 (1986) 98-113.

INTERACCIONES CELULARES EN EL SEPTUM MEDIAL EN RELACIÓN A LA ACTIVIDAD DE CAMPO HIPOCÁMPICA Y LOS EFECTOS DE ATROPINA

Resumen

Pares de neuronas fueron simultáneamente registradas (con un único electrodo) en el SM y la rama vertical de la BDB (rvBDB) fueron estudiados durante la ocurrencia de las actividades de campo espontáneas de la formación hipocámpica y después de la inyección sistémica de sulfato de atropina. Los dos tipos de actividad de campo registrados fueron el ritmo theta colinérgicamente mediado (tipo 2 de Vanderwolf) y la actividad irregular de gran amplitud. Este estudio tuvo tres objetivos: 1) determinar si neuronas vecinas en el SM-rvBDB tenían mayor probabilidad de tener similares propiedades de descarga; 2) determinar la existencia y tipos de interacciones funcionales entre pares de neuronas, usando el análisis de correlación cruzada; 3) determinar los efectos del sulfato de atropina en las propiedades de descarga y en las interacciones entre las neuronas del SM-rvBDB. De las 143 neuronas registradas, 133 (93%) estuvieron relacionadas al ritmo theta hipocámpico y fueron clasificadas como neuronas theta-activadas o theta inactivadas. Las neuronas theta-activadas mostraron un incremento significativo en la frecuencia media de descarga durante el ritmo theta comparada a la frecuencia media de descarga durante la actividad irregular de campo hipocámpica y/o un incremento lineal en la frecuencia de descarga con los incrementos de la frecuencia theta. Las neuronas theta-inactivadas mostraron un incremento significativo de la frecuencia de descarga durante la actividad irregular de campo hipocámpica comparada a la frecuencia media de descarga durante el ritmo theta y/o un decremento lineal de la frecuencia de descarga con los incrementos de la frecuencia theta. Las remanentes 10 (7%) neuronas fueron clasificadas como no relacionadas al ritmo theta. Un análisis de probabilidad, llevado a cabo separadamente sobre cada uno de los criterios de la clasificación, mostró que algunos de estos criterios podían ser usados para predecir características de neuronas vecinas. Las neuronas que tenían frecuencias de descargas más altas durante el ritmo theta o la actividad irregular hipocámpica y las neuronas que seguían o no con su frecuencia de descarga los cambios de frecuencia del ritmo theta hipocámpico tendieron a encontrarse próximas. Neuronas rítmicas y no rítmicas tendieron a encontrarse completamente mezcladas y los patrones de

descarga rítmica o no rítmica no permitieron predecir la ritmicidad de neuronas vecinas. La presencia de ritmicidad fue sin embargo el principal determinante de la ocurrencia de correlaciones entre las neuronas de los pares registrados. Correlaciones cruzadas de los trenes de potenciales de acción de los pares de neuronas revelaron que el 50% de los 36 pares de neuronas rítmicas-rítmicas estaban correlacionados durante ambos, el ritmo theta y la actividad irregular del hipocampo. Las características de estas funciones de correlación cruzada (fuertes correlaciones simétricas con agudos picos o valles) sugirieron que ambas neuronas compartían entradas excitatorias o inhibitorias. El 50% remanente de los pares de neuronas rítmicas mostraron correlaciones solamente durante el ritmo theta hipocámpico. Diez y siete (68%) de los 25 pares que consistían de una neurona rítmica y una neurona no rítmica mostraron correlaciones durante el ritmo theta hipocámpico solamente. Los 12 pares de neuronas no rítmicas no mostraron ningún tipo de correlación, ni durante el ritmo theta ni durante la actividad irregular hipocámpica. La inspección visual o el análisis de Fourier determinaron claramente que la administración sistémica de sulfato de atropina abolió toda la actividad de campo theta en la formación hipocámpica. Después de la administración de sulfato de atropina, veinte y tres de las 32 (71.9%) neuronas rítmicas continuaron descargando rítmicamente, mientras que las remanentes 9 neuronas (28.1%) pasaron a tener un patrón irregular de descarga. Los efectos del sulfato de atropina en la interacción entre pares de neuronas pareció depender de 2 factores: 1) la naturaleza de la interacción en la condición pre-droga (ritmo theta y actividad irregular hipocámpica) y 2) de si las neuronas descargaron rítmicamente o no después de la administración de sulfato de atropina. Pares de neuronas que estuvieron correlacionados durante el ritmo theta y la actividad irregular del hipocampo estuvieron siempre correlacionados después de la administración de sulfato de atropina, independientemente del efecto de la droga en cada una de las neuronas del par. Pares de neuronas que solamente estaban correlacionadas durante el ritmo theta estuvieron correlacionadas después de la administración de sulfato de atropina siempre que al menos una de las neuronas del par permaneciera rítmica. Estos datos sugieren que hay una sub-población de neuronas rítmicas en el SM-rvBDB (aproximadamente 50%), activadas durante el ritmo theta o la actividad irregular hipocámpica, que recibe y comparte entradas excitatorias e inhibitorias, que provienen probablemente de vías ascendentes (sincronizantes o

desincronizantes). La exacta naturaleza del control que la salida de estas neuronas del SM-rvBDB ejerce sobre la actividad de campo y celular de la formación hipocámpica permanece por determinarse.

Introducción

Una de las más indisputadas premisas en el área de la fisiología hipocámpica es que la integridad de la región del SM-rvBDB es crítica para la aparición del ritmo theta en la formación hipocámpica del animal intacto (Bland, 1986). Este hecho básico fue establecido por Green y Arduini (1954) y ha sido reafirmado subsecuentemente por muchos autores (Andersen *et al.*, 1979; Bland y Bland, 1986; Donovik, 1968; Kolb y Whishaw, 1977; Myher, 1975; Petsche y Stumpf, 1960; Petsche *et al.*, 1962; Rawlins *et al.*, 1979; Sainsbury y Bland, 1981). Todos estos autores usaron lesiones en la región septal para estudiar la importancia de los núcleos septales en la fisiología hipocámpica. A pesar de estos estudios, el rol que juegan los circuitos del SM-rvBDB en la generación de la actividad de campo theta por la formación hipocámpica permanece por ser establecido. Distintas aproximaciones experimentales han sugerido posibles roles para el SM-rvBDB en la generación del ritmo theta hipocámpico.

Los estudios de lesión citados anteriormente demostraron la importancia del SM-rvBDB en la generación del ritmo theta hipocámpico y sugirieron que la actividad neuronal del SM-rvBDB debería estar relacionada al ritmo theta. En efecto, Petsche *et al.* (1962) demostraron que este era el caso. Estos autores fueron los primeros en demostrar la existencia de neuronas en el SM-rvBDB que disparaban en salvas, rítmicamente y en fase con la actividad theta hipocámpica. Más aún, muchas de estas neuronas continuaban disparando en salvas rítmicas durante la depresión post-ictal que seguía a descargas epilépticas hipocámpicas. Estas observaciones llevaron a los autores a proponer que las neuronas del SM-rvBDB que disparaban en salvas rítmicas actuaban como marcapaso para la producción de la actividad theta por la formación hipocámpica. Petsche *et al.* (1962) también demostraron que el SM-rvBDB tenía una población de neuronas no rítmicas. La existencia de ambas, neuronas rítmicas y no rítmicas ha sido validada desde entonces por muchos autores (Alonso *et al.*, 1987; Apostol y Creutzfeldt, 1974; Bland y Ford, 1988; Brazhnik y Vinogradova, 1988; Colom y Bland, 1988; Dutar *et al.*, 1987; Ford *et al.*, 1989; García-Sánchez *et al.*, 1978; Gaztelu y Buño, 1982; Lamour *et al.*, 1984;

Macadar *et al.*, 1970; Morales *et al.*, 1971; Ranck, 1976; Steward y Fox, 1989; Vinogradova *et al.*, 1980; Wilson *et al.*, 1976). Trabajando con el grupo de Bland, entre 1985 y 1990 registré neuronas relacionadas con el ritmo theta en la formación hipocámpica, la corteza cingular posterior y el SM-rvBDB de ratas anestesiadas con uretano. Los dos patrones principales de actividad de campo generada por el hipocampo en estas preparaciones fueron el ritmo theta y la actividad irregular de larga amplitud (Bland, 1986). Una larga proporción de neuronas en la formación hipocámpica, la corteza cingular posterior y el SM-rvBDB presentó características de descarga que respondieron a los cambios en la actividad de campo hipocámpica. Análisis de las características de las descargas durante el ritmo theta y la actividad irregular hipocámpica permitió el desarrollo de un grupo de criterios para clasificar a las neuronas relacionadas al ritmo theta. El grupo de Bland en varios estudios (Bland y Colom, 1988; Colom y Bland, 1987; Colom *et al.*, 1988; Ford *et al.* 1989) presentó evidencia de que estas neuronas comprendían dos poblaciones, denominadas neuronas theta-activadas y neuronas theta-inactivadas, cada una de las cuales comprendía a la vez varios subtipos. Las neuronas theta-activadas incrementaban su actividad durante el ritmo theta (en comparación a la actividad irregular) y las neuronas theta inactivadas decrecían su actividad durante el ritmo theta hipocámpico (en comparación a la actividad irregular). Esta clasificación comprende los aspectos cruciales de las descripciones de las neuronas septales hechas previamente por otros investigadores, y también documenta la existencia de una nueva clase de neurona relacionada al ritmo theta (neuronas-theta inactivadas).

Mientras una primera etapa importante para el entendimiento del rol del SM-rvBDB en la generación del ritmo theta hipocámpico es la descripción de los tipos neuronales relacionados al ritmo theta, el avance en el entendimiento de la función septal debe provenir del estudio de las propiedades de estas neuronas en los circuitos que forman. Un método aceptado de estudiar la interacción neuronal es el registro simultáneo de trenes de potenciales de acción provenientes de varias neuronas en diversas condiciones experimentales. Estos registros son subsecuentemente evaluados, correlacionando los trenes de potenciales de acción de pares de neuronas e inspeccionando los resultados buscando posibles signos de coherencia (Moore *et al.*, 1970; Perkel *et al.*, 1967; Wiegner y Wierzbicka, 1987).

El SM-rvBDB envía proyecciones colinérgicas y GABAérgicas a la formación hipocámpica (Baisden *et al.*, 1984; Kohler *et al.*, 1984; Leung, 1985;

Mesulam *et al.*, 1977; Panula *et al.*, 1984; Nyakas *et al.*, 1987; Freund y Antal, 1988). En la rata anestesiada con uretano la administración de antagonistas muscarínicos, como el sulfato de atropina, abole el ritmo theta (Bland, 1986). Como en este trabajo se estudiaron las interacciones entre las neuronas septales, era de considerable interés determinar la acción del sulfato de atropina en las neuronas y en las interacciones neuronales del SM-rvBDB.

El presente estudio tuvo tres objetivos: 1) determinar si neuronas vecinas en el SM-rvBDB tenían una alta probabilidad de tener similares propiedades de descarga (el hecho de que las neuronas fueron registradas simultáneamente con un único microelectrodo nos permitió inferir que esas neuronas estaban realmente próximas); 2) determinar la posible relación funcional existente entre pares de neuronas del SM-rvBDB (clasificadas de acuerdo a nuestros criterios como neuronas theta-activadas o theta-inactivadas) usando la técnica de análisis de correlación cruzada; 3) determinar el efecto del sulfato de atropina en las propiedades de descarga de las neuronas del SM-rvBDB y en las interacciones neuronales.

Desde que estos experimentos agudos fueron llevados a cabo usando ratas anestesiadas con uretano, solamente el ritmo theta tipo 2 (colinérgicamente mediado) fue estudiado (Bland, 1988). Algunos de estos resultados fueron previamente presentados en una comunicación a un congreso (Colom y Bland, 1988).

Material y métodos

Los datos fueron obtenidos de 48 ratas macho de capucha negra (250-400 g) provistas por el Servicio para el Cuidado de Animales de la Universidad de Calgary. Las ratas fueron inicialmente anestesiadas con halotano mientras cánulas yugulares y traqueales eran colocadas. El halotano fue entonces discontinuado y uretano (.8 g/ml) fue administrado vía la cánula yugular hasta lograr niveles apropiados de anestesia para los subsecuentes procedimientos quirúrgicos y experimentales. Con los niveles de anestesia usados, los animales oscilaron espontáneamente entre el ritmo theta y la actividad irregular hipocámpica. La actividad de campo hipocámpica fue registrada desde un electrodo en el *stratum moleculare* de la formación hipocámpica. La temperatura del cuerpo fue mantenida a 37°C y el ritmo cardíaco fue constantemente monitorizado durante el experimento.

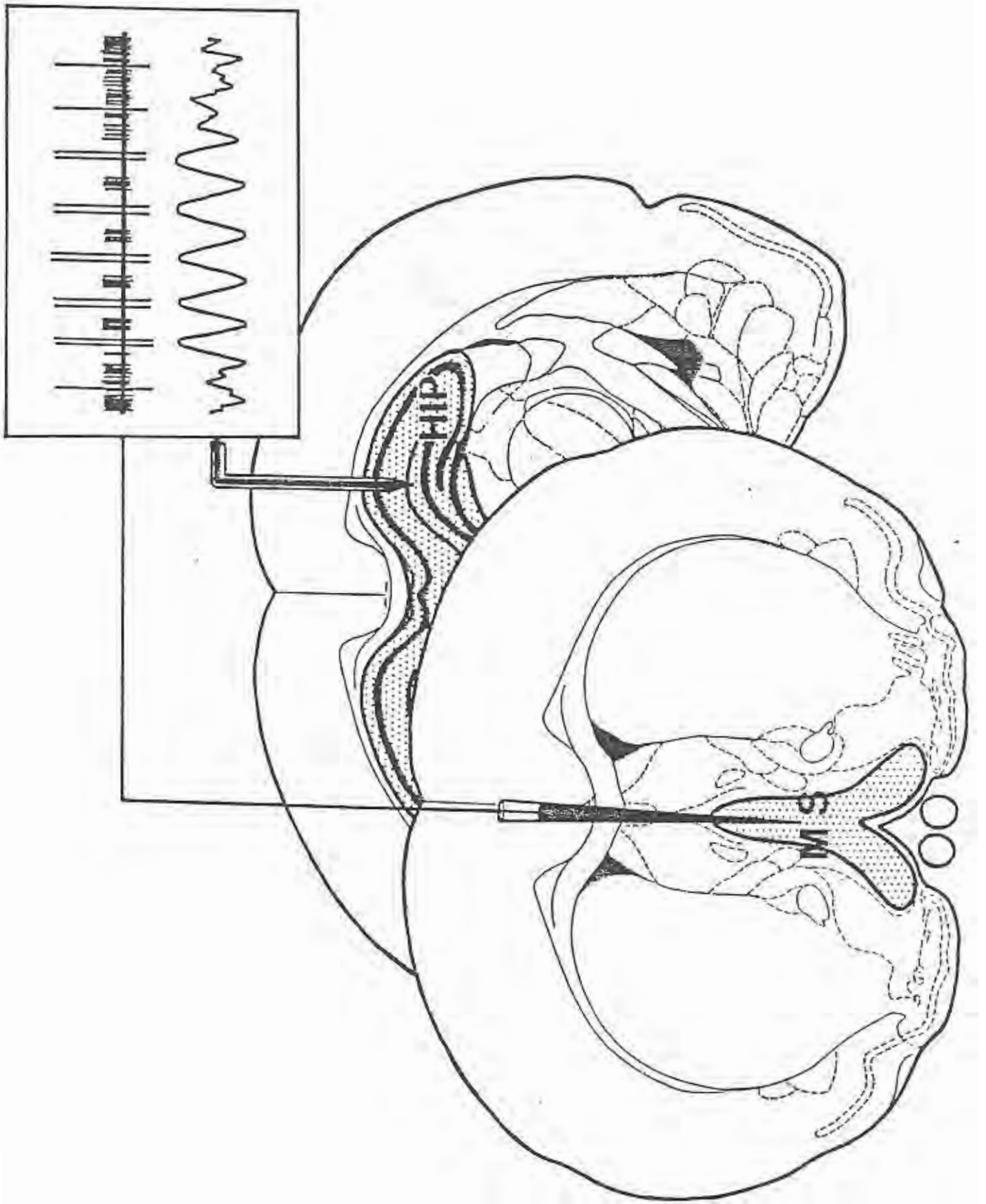


Figura 1. Representación diagramática del dispositivo de registro. Un microelectrodo de tungsteno se colocó en el *stratum moleculare* (hoja superior) del dentado para registrar la actividad de campo hipocámpica. Dos células fueron registradas simultáneamente usando un microelectrodo de vidrio ubicado en el complejo nuclear del SM-BDB. La célula con el potencial de acción de mayor amplitud fue siempre la primera en ser aislada.

Las ratas fueron colocadas en un instrumento estereotáxico con el plano entre bregma y lambda nivelado horizontalmente. Un alambre no aislado de tungsteno fue colocado en la corteza, anterior a bregma, cumpliendo la función de electrodo de referencia. El marco estereotáxico fue conectado a tierra. Un electrodo (.2-.5 MegOhm) de tungsteno fue colocado en la capa molecular del dentado (3.3 mm posterior a bregma, 2 mm lateral a la línea media y 2.8 mm a la superficie dural) de la formación hipocámpica derecha para registrar la actividad hipocámpica de campo. Las coordenadas usadas para los registros septales fueron: .5 mm anterior a bregma, .0-.5 mm lateral a la línea media y 4.8-6.5 mm ventral a la superficie dural. Pares de neuronas fueron registrados con microelectrodos de vidrio (5-10 MegOhm) llenados con *sodium acetate* .5 M y pontamina azul cielo al 2%. Una representación diagramática del sistema de registro es mostrada en la figura 1. Se intentó en cada trayecto marcar el sitio de por lo menos uno de los pares de neuronas registrados. Siguiendo a la perfusión y fijación del cerebro, secciones congeladas (40 μ m) fueron tomadas serialmente y montadas sobre portaobjetos de vidrio para ser subsecuentemente teñidas con tionina y analizadas en el microscopio.

Las señales provenientes del cerebro fueron amplificadas y expuestas de la manera descrita previamente (Colom y Bland, 1987). Todas las señales fueron almacenadas en un video-grabador FM para subsecuente análisis en la computadora.

Procedimiento de prueba

Como la actividad hipocámpica osciló espontáneamente entre el ritmo theta y la actividad irregular, se pudo evitar el aislamiento de las neuronas exclusivamente en un estado y así una posible selección sesgada de las neuronas muestradas. Una vez que la primera neurona fue aislada el electrodo no fue movido por 10 minutos, permitiendo que la punta del electrodo y el

cerebro alcanzaran una relación estable. El microelectrodo fue entonces movido lentamente en pasos de $.2-1 \mu\text{m}$ hasta que una segunda neurona fue visible en el registro. Cuando una segunda neurona fue aislada con una aceptable amplitud (con la primera neurona todavía presente) la sesión de registro comenzó. El registro continuó hasta que por lo menos 10 minutos de ritmo theta y 10 minutos de actividad irregular hipocámpica fueron obtenidos, incluyendo varias transiciones de un estado al otro. Ocasionalmente, durante el estado de actividad irregular hipocámpica, fueron llevadas a cabo ligeras presiones táctiles en la cola de la rata para producir una transición hacia el ritmo theta. Esta maniobra aseguró que las muestras de ritmo theta incluyeran la variedad más amplia posible de frecuencias. Los efectos de la atropina fueron estudiados en 19 pares de neuronas (38 neuronas). La droga fue administrada a través de la cánula yugular (inyectando en la cánula yugular de "silastic" con una aguja hipodérmica número 26). La atropina fue inyectada en etapas de .1 cc hasta que toda la actividad de campo theta fue abolida (5-10 mg/kg). La abolición de la actividad rítmica fue confirmada por la imposibilidad de producir ritmo theta con fuertes presiones táctiles en la cola de la rata.

Análisis de datos

Los datos fueron analizados después de terminados los experimentos de la manera previamente descripta (Bland y Bland, 1986; Colom y Bland, 1987). La actividad de campo hipocámpica acompañando a la actividad neuronal fue sometida a un análisis de Fourier y clasificada como theta o actividad irregular de acuerdo a los siguientes criterios: 1) el ritmo theta fue definido como una actividad sinusoidal-símil con un pico de frecuencia a 2-8 Hz y un ancho de banda estrecho; 2) la actividad irregular fue definida como actividad irregular de gran amplitud con una amplia banda de frecuencias (.5 -25 Hz) (Leung *et al.*, 1982; Macadar *et al.*, 1970). Los registros de las neuronas de cada par fueron pasados a través de dos discriminadores de ventana. Ventanas separadas fueron cuidadosamente establecidas para cada neurona. La identidad separada de cada neurona fue verificada usando un programa de sorteo de espigas (Salganicoff *et al.*, 1988). Con este programa se arribó a las mismas conclusiones que con la separación visual de elementos neuronales basada en la amplitud y la forma de las espigas. La ritmicidad fue confirmada de tres maneras: 1) a través del histograma de intervalos de primer orden de las espigas, neuronas que disparaban en salvas rítmicas mostraron una distribución

bimodal de picos, con un segundo pico usualmente más pequeño y un intervalo entre ambos picos que correspondió a la frecuencia theta; 2) a través de histogramas de autocorrelación de los trenes de espigas, una correlación plana indicaba un patrón de descarga arrítmica, mientras que una correlación con picos repetidos a intervalos regulares indicaba un patrón de descarga rítmico; si el intervalo del histograma de la autocorrelación se sobreponía con el período del ciclo del ritmo theta, entonces la ritmicidad de la neurona era igual a la del ritmo theta; 3) a través de correlaciones cruzadas entre las descargas de las neuronas y la simultánea actividad rítmica o irregular del hipocampo; muestras de 30 segundos mostraron cambios mínimos en la frecuencia de la actividad de campo y fueron consideradas estacionarias. Análisis de correlación cruzada fueron también llevados a cabo entre las neuronas del par.

La dimensión de linear *versus* no linear (la relación de las descargas neuronales a los cambios en la frecuencia theta) fue probada estadísticamente a través de una simple regresión lineal, que relacionó la descarga neuronal a la frecuencia del ritmo theta (programa SPSS11). El computador fue usado para calcular la frecuencia theta y la frecuencia de la descarga neuronal en muestras de un segundo cada una. Se usaron las parejas de resultados en el análisis de regresión. En dicho análisis las descargas celulares fueron "regresadas" sobre las frecuencias theta para cada célula. Los valores de R^2 y las pendientes fueron calculados y la significancia del valor de R^2 fue probada usando un test de randomización no paramétrico (Edgington, 1987). El nivel de significancia fue establecido para valores de p mayores que .01.

La probabilidad de encontrar una segunda neurona con las mismas características de la primera fue probada con una prueba exacta de Fisher (2 colas) (Siegel y Castellan, 1988). Diferencias en la frecuencia media de descarga (mínimo período de muestreo: 100 segundos) entre los estados de ritmo theta y actividad irregular fueron comprobados usando pruebas-t (t-tests, en inglés) independientes (los valores de significancia fueron establecidos para p menores que .01).

Resultados

La histología reveló que en todas las 48 ratas, el electrodo que fue usado para monitorizar el ritmo theta en la formación dorsal hipocámpica estaba adecuadamente localizado en la hoja superior de la capa molecular del dentado. La amplitud del ritmo theta fue de 1 mV en todos los casos. El examen

histológico también confirmó la localización medial en todos los trayectos de los electrodos en el SM-rvBDB. Se encontraron veinte y siete marcas azules que indicaron la localización de la punta del electrodo. Las marcas localizadas a varias profundidades estuvieron siempre cerca de la línea media (la máxima distancia de la línea media fue de de .7 mm). Se concluyó entonces que los 73 pares registrados se encontraban localizados a través de la extensión dorso-ventral de la región medial del núcleo SM-rvBDB. En un experimento, una tercera neurona analizable apareció en el registro cierto tiempo después que la segunda neurona fue aislada. Dado el orden temporal de su aparición, las 3 neuronas fueron tratadas como tres pares independientes.

Los datos son presentados en 2 formatos para las condiciones de prueba pre-atropina y durante la aplicación de atropina. Primero presentaré los datos como 143 neuronas individuales, clasificadas como theta-activadas y theta-inactivadas de acuerdo a la presencia de diferencias significativas en: 1) la frecuencia media de descarga entre los estados theta y de actividad irregular, y/o 2) la presencia de incrementos/decrementos lineales de la frecuencia de descarga durante el ritmo theta (linearidad). Un tercer criterio, la presencia o ausencia de ritmicidad fue usado para clasificar las neuronas theta-activadas y theta-inactivadas en fásicas (rítmicas) y tónicas (no-rítmicas). Las neuronas fueron clasificadas como no relacionadas al ritmo theta si sus frecuencias medias de descarga no variaban significativamente: 1) durante el ritmo theta y la actividad irregular, o 2) con los cambios en la frecuencia theta. El segundo formato presenta los datos en pares de neuronas. Para determinar si las neuronas con similares propiedades de descarga mostraban una tendencia a ser registradas juntas y las relaciones funcionales que ocurrían entre estos pares de neuronas, los criterios para clasificarlas como theta-activadas o theta-inactivadas (frecuencia media de descarga, linearidad) así como el criterio de descripción del patrón de descarga (fásica o tónica) fueron analizados independientemente.

Clasificación individual de neuronas

Neuronas theta-activadas

Las neuronas fueron clasificadas como theta-activadas si satisfacían 1 de 2 criterios: la descarga media fue significativamente mayor durante el ritmo theta que durante la actividad irregular, 2) la frecuencia de descarga se incrementó linealmente, en forma positiva, con los incrementos en la frecuencia theta

(neuronas lineales). Dentro de esta definición de neuronas theta-activadas existían 2 subtipos de neuronas, nombradas fásicas y tónicas. Las neuronas fásicas disparaban de una manera rítmica, con sus descargas relacionadas a la fase del ritmo theta. Las neuronas tónicas descargaban de una manera regular o irregular, pero siempre sin una relación consistente entre sus descargas y la fase del ritmo theta. Noventa y nueve de las 143 neuronas (69.2%) fueron clasificadas como theta-activadas. Setenta y dos de las 99 neuronas theta-activadas (72.7%), fueron del subtipo fásico y 27 del subtipo tónico (27.3%). Finalmente de las 72 neuronas theta-activadas fásicas, 45 fueron lineales y 16 no lineales. Once de las 27 neuronas theta-activadas fásicas fueron lineales y 16 no lineales. La proporción de los subtipos de las neuronas theta activadas están resumidas en la tabla 1. Treinta y cinco de las 45 neuronas theta-activadas fásicas y lineales (theta-activadas-FL) tuvieron una descarga media significativamente más alta durante el ritmo theta (p menor que .01). Cinco de las remanentes neuronas theta-activadas FL tuvieron diferencias no significativas en la descarga media y las cinco restantes tuvieron medias significativamente más altas durante la actividad irregular. Todas las 45 neuronas theta-activadas-FL tuvieron pendientes lineales positivas significativas (p menor que .001). Todas las 27 neuronas theta-activadas fásicas no lineales (theta-activadas-FNL) tuvieron descargas medias significativamente más altas durante el ritmo theta (p menor que .01). Diez de las 11 neuronas theta-activadas tónicas lineales (theta-activadas-TL) tuvieron descargas medias significativamente más altas durante el ritmo theta (p menor que .01). Una neurona tuvo diferencias no significativas entre las frecuencias medias de descarga durante el ritmo theta y la actividad irregular. Todas las 11 neuronas theta-activadas-TL tenían pendientes significativas lineares positivas (p menor que .001). Todas las 16 neuronas theta-activadas tónicas no lineales (theta-activadas-TNL) tuvieron descargas medias significativamente más altas durante el ritmo theta (p menor que .01). La tabla 2 resume los datos correspondientes a los subtipos de neuronas theta activadas.

Neuronas-theta inactivadas

Neuronas fueron clasificadas como theta-inactivadas si cumplían 1 de 2 criterios: 1) la frecuencia media de descarga durante el ritmo theta fue considerablemente menor que durante la actividad irregular, 2) la frecuencia de descarga se incrementaba cuando la frecuencia theta decrecía en una manera

linear negativa. Como en las las neuronas theta-activadas, dentro de la definición de neuronas theta-inactivadas se encontraron dos subtipos básicos. El primer subtipo fue denominado fásico. Neuronas fásicas descargaban de una manera rítmica, con la descarga relacionada a la fase del ritmo theta. El segundo subtipo fue denominado tónico, significando que las neuronas descargaban en una manera no rítmica, sin relación de fase con el ritmo theta. Treinta y cuatro de 143 neuronas (23.8%) fueron clasificadas como theta inactivadas. Diez y siete de estas 34 neuronas theta-inactivadas (50%) fueron agrupadas como fásicas y 17 (50%) como tónicas. Finalmente, de las 17 neuronas theta-inactivadas fásicas, una fue considerada como neurona theta-inactivada fásica linear (theta-inactivada-FL) y 16 fueron consideradas fásicas no lineales (theta-inactivadas-FNL). Cinco de las neuronas theta-inactivadas tónicas fueron lineales (theta-inactivadas-TL) y 12 fueron no lineales (theta-inactivadas-TNL). Las proporciones de los subtipos de las neuronas theta-inactivadas se resumen en la tabla 2. La neurona theta-inactivada-FL que tuvo una frecuencia media de descarga más alta durante la actividad irregular tuvo también una pendiente linear negativa significativa. Todas las 16 neuronas theta-inactivadas-NL tuvieron frecuencias medias de descarga significativamente más altas durante la actividad irregular que durante el ritmo theta (p menor que .01). Cuatro de las remanentes neuronas theta-inactivadas-TL tuvieron una frecuencia media de descarga no significativamente diferente durante el ritmo theta y la actividad irregular. Todas las 5 neuronas theta-inactivadas tuvieron pendientes lineales negativas significativas (p menor que .001). Todas las 12 neuronas theta-inactivadas-TNL tuvieron frecuencias medias de descarga más altas durante la actividad irregular que durante el ritmo theta. El resto del grupo de datos para las neuronas theta-inactivadas está resumido en la tabla 3.

Neuronas no relacionadas

Las neuronas ubicadas en esta categoría no cumplían los criterios para ser clasificadas como neuronas theta-activadas o theta-inactivadas. Esto es, que no se encontraron diferencias significativas entre las frecuencias medias de descarga durante el theta y la actividad irregular, ni pendientes significativas en los análisis de regresión. Como fue establecido en un estudio previo (Ford *et al.*, 1989) neuronas en esta categoría pudieron ser fásicas o tónicas. Diez de las 143 neuronas registradas (7%) fueron clasificadas como no relacionadas.

Tabla 1. Proporciones de células theta-activadas, theta-inactivadas y no relacionadas en el SM-BDB

	theta-activadas (n)	theta-inactivadas (n)	no relacionadas (n)	sub-total (n)
Fásicas				
Lineales	45	1	—	46
Nonlineales	27	16	5	48
Subtotal	72	17	5	94
Tónicas				
Lineales	11	5	—	16
Nonlineales	16	12	5	33
Subtotal	27	17	5	49
Total	99	34	10	143

Tabla 2. Células theta activadas, resumen de los datos

	R ²	b (espigas/s/Hz)	Frecuencia de descarga: (espigas/s)	Frecuencia de descarga: (espigas/s)
Fásicas Lineales (n=45)				
Media	0.19	7.00	17.20	9.82
D.S.	0.12	4.11	9.79	0.44
Mínima	0.03	1.24	2.78	0.19
Máxima	0.44	23.47	59.29	8.72
Fásicas No Lineales (n=27)				
Media	--	--	15.81	7.81
D.S.	--	--	9.49	6.05
Mínima	--	--	1.85	0.08
Máxima	--	--	38.80	18.83
Tónicas Lineales (n=11)				
Media	0.16	5.17	18.60	0.82
D.S.	0.05	3.40	14.74	12.94
Mínima	0.09	2.05	2.32	0.14
Máxima	0.24	13.64	43.10	39.00
Tónicas No Lineales (n=16)				
Media	--	--	11.13	6.25
D.S.	--	--	10.77	7.89
Mínima	--	--	0.88	0.21
Máxima	--	--	38.13	26.84

Tabla 3. Células theta inactivadas, resumen de los datos

	R ²	b (espigas/s/Hz)	Frecuencia de descarga: (espigas/s)	Frecuencia de descarga: (espigas/s)
Fásicas Lineales (n=1)	0.06	-2.45	10.70	27.80
Fásicas No Lineales (n=16)				
Media	—	—	16.14	25.92
D.S.	—	—	13.25	16.32
Mínima	—	—	2.05	7.19
Máxima	—	—	41.55	58.80
Tónicas Lineales (n=5)				
Media	0.19	-3.03	4.06	8.88
D.S.	0.18	1.61	4.07	10.04
Mínima	0.07	-1.67	0.40	1.90
Máxima	0.42	-4.47	10.24	26.62
Tónicas No Lineales (n=12)				
Media	—	—	5.78	13.83
D.S.	—	—	7.54	11.85
Mínima	—	—	0.37	1.92
Máxima	—	—	26.30	40.61

A

CELL #2

CELL #2

CELL #2

0 LIA

L NL

P T

0	26	7
LIA	3	7

L	15	9
NL	7	23

P	22	13
T	8	11

CELL #1

CELL #1

CELL #1

P - PHASIC

T - TONIC

L - LINEAR

NL - NON-LINEAR

0 - HIGHEST DISCHARGE DURING 0

LIA - HIGHEST DISCHARGE DURING LIA

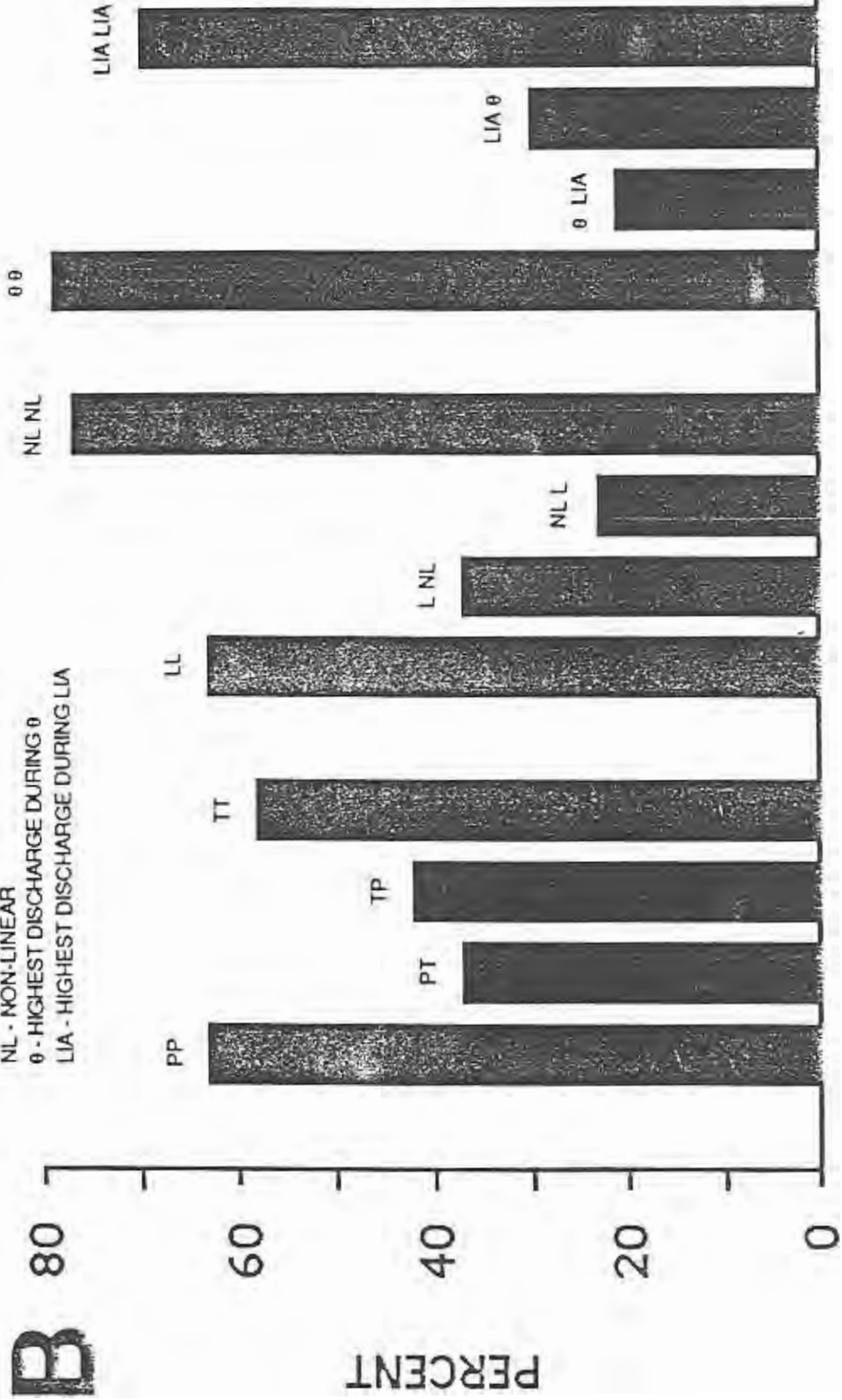


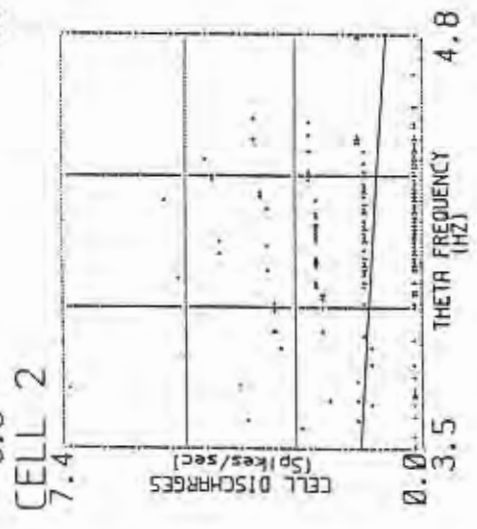
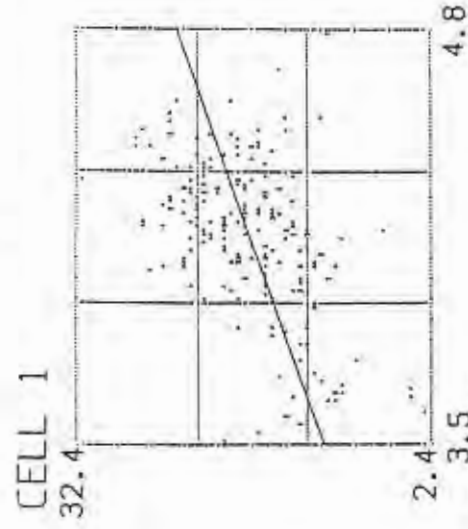
Figura 2. A: distribución de los pares de células para cada uno de los criterios probados por la prueba exacta de Fisher (presencia o ausencia de ritmicidad, presencia o ausencia de pendientes significativas en las regresiones lineales, diferencias significativas de descargas media entre el ritmo theta y la actividad irregular). B: representación gráfica de la distribución de los pares de células agrupados por los criterios mostrados en A. La barra para cada combinación de células es expresada como el porcentaje del número total de casos en el cual esa categoría ocurrió primero.

Cuatro de estas neuronas fueron fásicas y 6 tónicas. La gran media de la frecuencia de descarga de este grupo fue de 7.01 espigas/s (D.S.= $\pm$ 9.19, rango .45-27.89) y durante la actividad irregular fue de 7.16 espigas/s (D.S.= $\pm$ 9.38, rango .14 -27.28).

Pares de neuronas

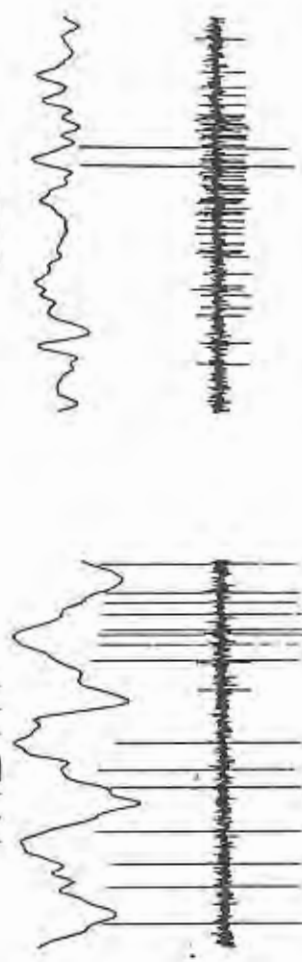
Características de los elementos neuronales que determinan su emparejamiento

Fueron analizados 54 de un total de 73 pares de neuronas, agrupándolos de acuerdo a los tres criterios mencionados. El cuadrante derecho de la figura 2A muestra la distribución de los pares de neuronas, usando el criterio de presencia o ausencia de ritmicidad. Haciendo el planteo verbalmente: dado que la primera neurona fuera fásica, ¿cual es la probabilidad de que la segunda neurona sea también fásica?, o inversamente dado que la primera neurona fuera tónica, ¿cual es la probabilidad de que la segunda neurona sea también tónica?. El mismo planteo puede ser hecho para pares compuestos por neuronas de diferente clase (una fásica y una tónica, por ejemplo). La prueba exacta de Fisher fue usada para estudiar estas probabilidades, ya que la distribución de neuronas fásicas y tónicas en el SM-rvBDB no era equivalente (por ejemplo, 60% de las neuronas fueron fásicas y 40% fueron tónicas). El cuadrante medio de la figura 2A da la distribución de pares de neuronas, usando el criterio presencia o ausencia de linealidad. El cuadrante derecho da la distribución de pares de neuronas usando el criterio de frecuencias medias de descarga significativamente más altas durante el ritmo theta o la actividad

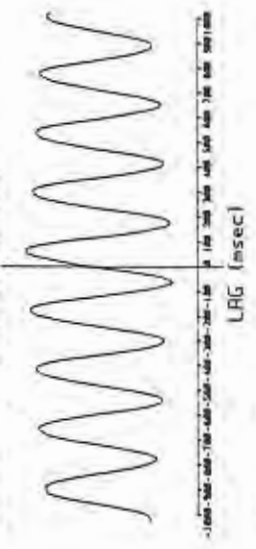


LIA

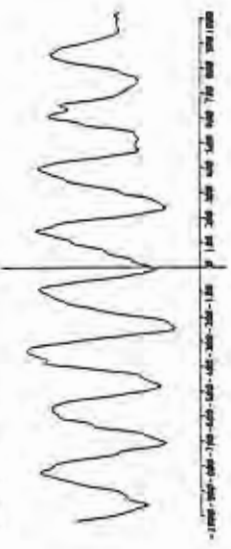
THETA



CELL 1 CROSS CORRELATION



CELL 2



1 VS 2 UNIT CROSS CORRELATION



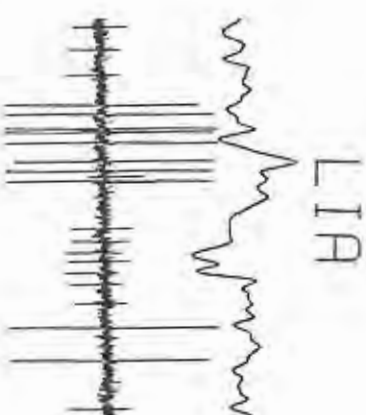
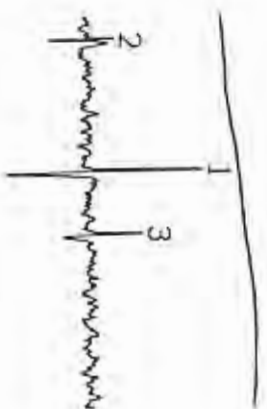
Figura 3. Ejemplos analógicos y análisis del par número 51, compuesto por una célula theta-activada y una theta-inactivada. Los registros analógicos en la parte superior de la figura muestran la relación entre los patrones de descarga de una célula theta-activada (1) y una theta-inactivada (2) y la actividad de campo registrada simultáneamente en la formación hipocámpica. Las funciones de correlación cruzada para el ritmo theta y la actividad irregular están ubicadas debajo de los registros analógicos. La correlación cruzada entre la célula 1 y el ritmo theta fue fuerte (estando cerca de +1 y -1), con la célula descargando a medio camino entre los picos positivos y negativos del ritmo theta. La correlación cruzada entre la célula 2 y el ritmo theta fue más débil (debido a la existencia de menos descargas), con la célula descargando en el pico negativo. La correlación cruzada entre las células 1 y 2 durante el ritmo theta mostró un desfase extendido simétricamente desde el origen a +1 y -1 segundo. No existieron correlaciones significativas durante la actividad irregular. En análisis de regresión lineal se muestra en la parte izquierda de la figura. La Célula 1 mostró una pendiente positiva significativa y la 2 una pequeña pendiente negativa no significativa.

irregular. La figura 2B es la representación gráfica de las respectivas distribuciones de neuronas. Las barras para cada combinación expresan el porcentaje del número total de casos en los que la categoría ocurrió primero. Por ejemplo, el porcentaje de combinaciones (22) de una neurona fásica con otra fásica fue expresado como el porcentaje del número total de casos en los cuales una neurona fásica fue primero registrada (22+13). Nótese que los pares de neuronas con características similares tienen más altos porcentajes para los criterios de linealidad y frecuencias de descargas medias que los pares de neuronas disimilares. La diferencia entre pares similares y disimilares no fue tan grande para el criterio de ritmicidad. En efecto, la prueba exacta de Fisher reveló diferencias significativas entre pares similares y no similares para los criterios de linealidad y frecuencia media de descarga (p menor que .05) pero no para el criterio de ritmicidad. Entonces, habría iguales oportunidades de registrar pares de neuronas fásico-fásicos, tónico-tónicos o fásico-tónicos en el SM-rvBDB. Sin embargo, había una alta probabilidad de que 2 neuronas con relaciones lineales con la actividad de campo theta pudieran ser registradas juntas y también que 2 neuronas no lineales pudieran ser registradas juntas.

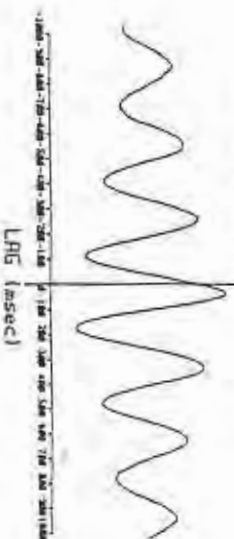
Neuronas con altas frecuencias medias de descarga durante el ritmo theta tenían alta probabilidad de ser registradas juntas y lo mismo ocurría con neuronas que tenían frecuencias medias de descarga más altas durante la actividad irregular.

Interacciones entre neuronas del SM-rvBDB

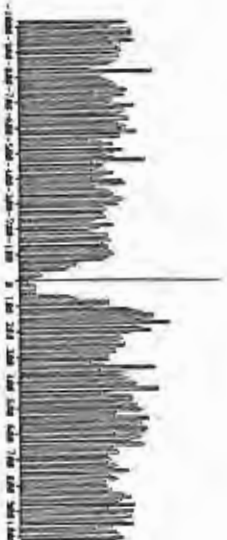
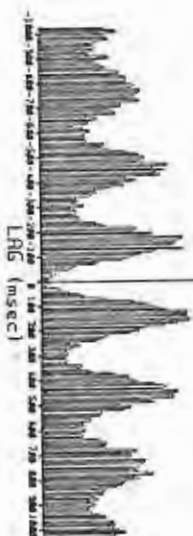
Correlaciones cruzadas entre los trenes de espigas y el simultáneo ritmo theta o actividad irregular, fueron llevadas a cabo para cada neurona de cada par analizado. Los trenes de espigas fueron entonces, correlacionados durante el ritmo theta y la actividad irregular. La figura 3 ilustra el análisis de un par de neuronas theta-activada/theta-inactivada. La parte superior izquierda muestra a las neuronas, theta-activada (1) y theta-inactivada (2) del par de neuronas N° 51, claramente diferenciadas por el tamaño y la forma de sus potenciales de acción. El panel medio ilustra que durante el estado theta, la neurona theta-activada descargó de una manera rítmica mientras que la neurona theta-inactivada estaba casi silenciosa. El panel sobre la derecha ilustra que durante el estado de actividad irregular la neurona theta-activada disminuyó sus descargas mientras que la neurona theta-inactivada incrementó su frecuencia de descarga. Aunque la descarga media fue en una amplia muestra de 7.39 espigas/segundo, la neurona theta-inactivada descargaba ocasionalmente en salvas como es mostrado aquí. Las correlaciones cruzadas ilustradas entre la neurona 1 y la actividad rítmica hipocámpica, revelaron que esta neurona descargaba de una manera altamente rítmica durante la actividad theta, a medio camino entre los picos positivos y negativos, y sin ninguna relación de fase con la actividad irregular. Correspondientes correlaciones son mostradas para la neurona 2, revelando que esta neurona descargaba durante la parte negativa del ritmo theta y que cuando disparaba durante la actividad irregular lo hacía sin correlación con ella. Las regresiones lineales para estas 2 neuronas se muestran en la parte izquierda de la figura. La neurona 1 tuvo una pendiente positiva significativa ($b = 10.00$ espigas/segundo/Hz; $R^2 = .168$) mientras que la neurona N° 2 tuvo una débil pendiente negativa no significativa ($b = .587$ espigas/segundo/Hz; $R^2 = .012$). La figura 4 muestra los resultados de un experimento donde 3 neuronas theta-activadas fueron registradas simultáneamente. Estas neuronas son las N° 23-1, 23-2 y 24-1 y son mostradas como 1, 2 y 3 respectivamente. Como puede ser visto en la parte izquierda del registro analógico, las 3 neuronas fueron fácilmente distinguibles por la amplitud



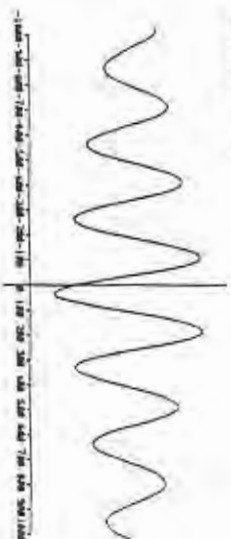
CELL 1 CROSS CORRELATION



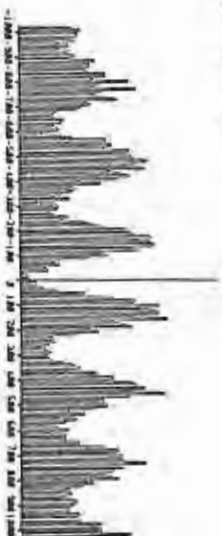
1 VS 2 UNIT CROSS CORRELATION



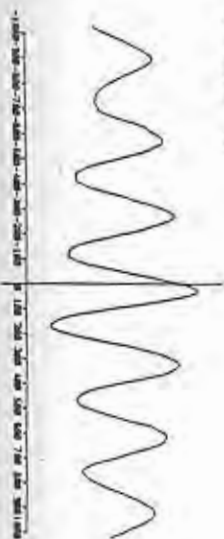
CELL 2



2 VS 3



CELL 3



1 VS 3

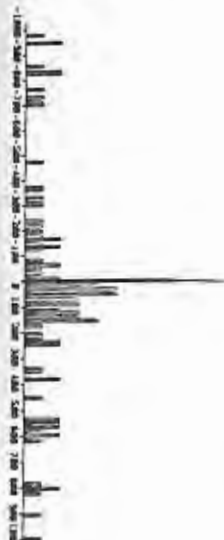
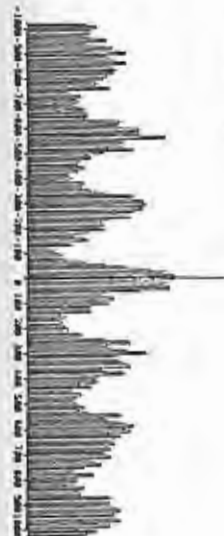
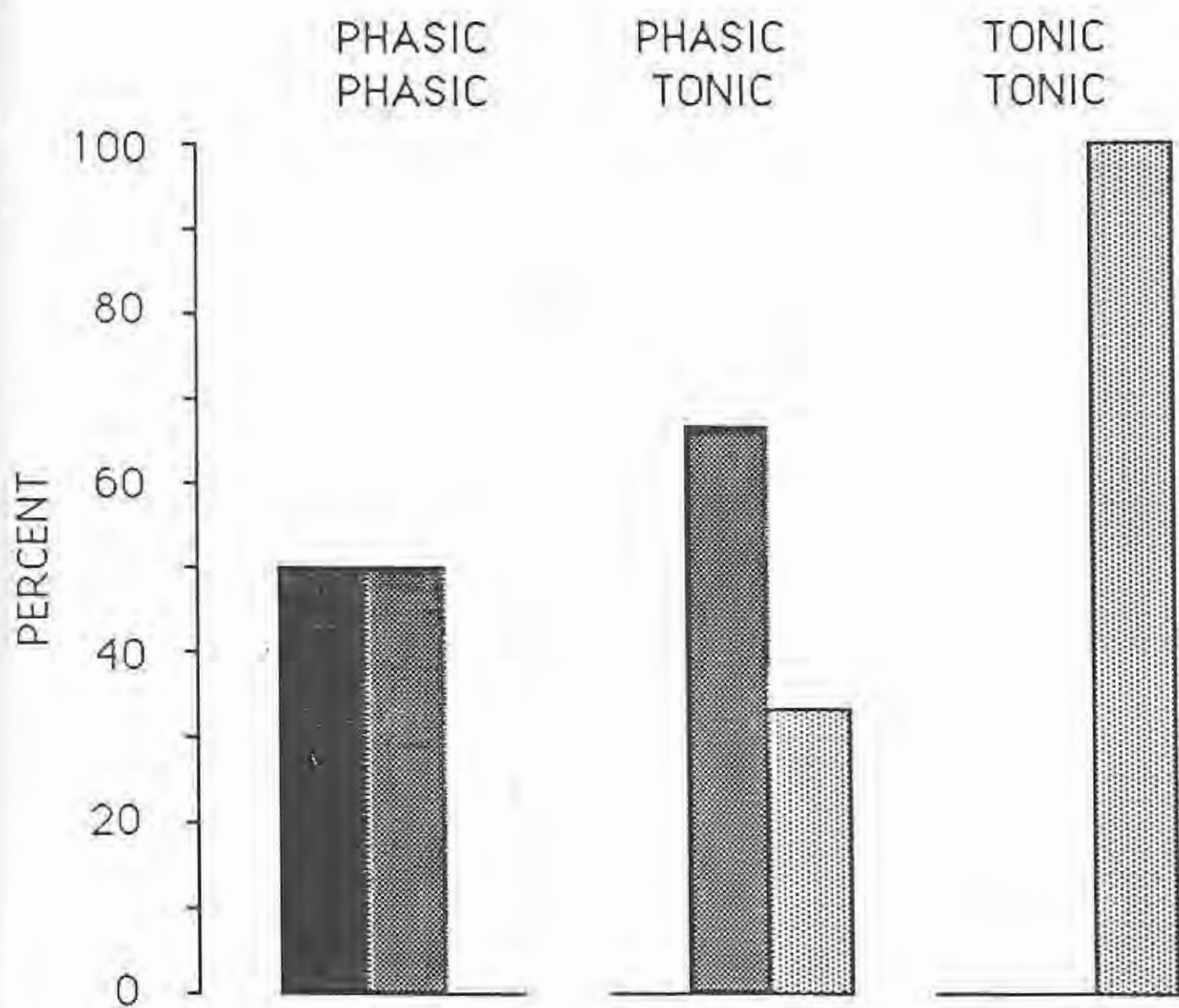


Figura. 4 Ejemplos analógicos y análisis de tres células theta activadas simultáneamente registradas (23-1, 23-2 y 24-1). Los registros analógicos de la parte superior de la figura muestran la relación entre los patrones de descarga de las células y el potencial de campo registrado simultáneamente en la formación hipocámpica. La función de correlación cruzada mostró fuertes correlaciones (rango cercano a -1 y +1) entre cada célula y la actividad theta (parte izquierda de la figura). Las células 1 y 3 descargaron cerca del pico positivo del ritmo theta y la célula 2 cerca del pico negativo. Ninguna de estas células estuvieron correlacionadas con la actividad irregular (no mostrado). Las correlaciones cruzadas entre las células durante el ritmo theta y la actividad irregular se muestran debajo de los respectivos registros analógicos. Los tres posibles pares de células mostraron estar correlacionados durante el ritmo theta y la actividad irregular (las células 1 vs. 2 y 2 vs. 3 mostraron valles primarios durante el ritmo theta y la actividad irregular, la célula 1 vs 3 mostró un pico primario durante el ritmo theta y la actividad irregular).

y forma de sus potenciales de acción. Las partes media y derecha del registro analógico muestran los patrones de descarga de estas neuronas durante el ritmo theta y la actividad irregular respectivamente. Las 3 neuronas fueron muy rítmicas, con las neuronas 1 y 3 descargando cerca del pico positivo del ritmo theta y la neurona 2 descargando cerca del pico negativo. El análisis de correlación cruzada entre las varias combinaciones de neuronas reveló que cada par estaba altamente correlacionado tanto durante el ritmo theta como durante la actividad irregular. Análisis similares llevados a cabo para todos los 73 pares de neuronas revelaron que una única característica influenciaba el establecimiento de correlaciones cruzadas entre neuronas: la presencia o ausencia de ritmicidad. La figura 5 ilustra esta relación gráficamente. De los 36 pares de neuronas fásico-fásicos, 18 pares tuvieron sus descargas altamente correlacionadas tanto con el ritmo theta como con la actividad irregular, mientras que los restantes 18 pares estuvieron correlacionados solamente durante el ritmo theta. Diez y siete de los 25 pares (68%) que consistían de una neurona fásica y una tónica estuvieron correlacionados solamente durante el ritmo theta, mientras que los 8 pares remanentes no mostraron ninguna correlación en sus patrones de descarga. Correlaciones no fueron encontradas durante ningún



CROSS CORRELATED DURING Θ AND LIA



CROSS CORRELATED DURING Θ ONLY



NOT CROSS CORRELATED

Figura 5. Representación gráfica de los resultados de las correlaciones cruzadas de los trenes de espigas de los 54 pares de células. La única característica que determinó la ocurrencia de correlación fue la presencia de ritmicidad.

patrón de actividad de campo hipocámpica para los pares de neuronas tónico-tónicos.

En 12 de los 18 pares de neuronas fásico-fásicos las correlaciones mostraron un decremento (valle) alrededor del origen, en la probabilidad de descarga de la segunda neurona. Este valle estuvo presente en la función de correlación durante el ritmo theta y la actividad irregular. Los repetidos picos y valles de la correlación que se extendieron simétricamente desde el origen durante el ritmo theta desaparecieron en la correlación llevada a cabo durante la actividad irregular. Los remanentes 6 pares de neuronas fásico-fásicos tuvieron un incremento (pico) en la frecuencia de descarga alrededor del origen. De nuevo, este pico estuvo presente en las correlaciones tanto durante el ritmo theta como durante la actividad irregular. La potencia de la correlación fue alta en todos los 18 pares de neuronas fásica-fásica que se mantuvieron correlacionadas durante el ritmo theta y la actividad irregular, las correlaciones durante la actividad irregular fueron ligeramente más débiles que las observadas durante el ritmo theta. Treinta y cinco de los pares de neuronas con 1 o con las 2 de las neuronas del par rítmicas, estuvieron correlacionadas durante el ritmo theta pero no durante la actividad irregular. Veinte y tres de estos pares de neuronas tuvieron picos alrededor del origen y los 12 remanentes tuvieron valles igualmente localizados.

Efectos de la atropina

Actividad de campo hipocámpica

La administración sistémica de aproximadamente 5-10 mg/Kg de sulfato de atropina abole la aparición espontánea de ritmo theta, así como el producido por estimulación sensorial. El análisis de Fourier revela la ausencia de picos de frecuencia, al igual que durante la actividad irregular hipocámpica. Como el análisis de Fourier promedia sobre tiempo, también fueron llevados a cabo análisis espectrales de tiempos sucesivos. Mientras que en la actividad de campo obtenida bajo atropina había ocasionales sugerencias de la existencia de

Tabla 4. Resumen de las células (N = 38) testadas con atropina

Células Theta- Activadas	R ²	b (espigas/s)	Frecuencia de descarga (espigas/s)		
			Theta	Actividad irregular	ATSO ₄
Fásicas Lineales (n=16)					
Media	0.22	6.73	19.37	14.17	18.96
D.S.	0.12	2.99	7.11	8.87	9.68
Mínima	0.06	2.22	5.07	1.27	5.23
Máxima	0.42	14.19	29.39	30.72	33.05
Fásicas No Lineales (n=8)					
Media	—	—	19.93	11.15	15.03
D.S.	—	—	7.35	6.34	9.80
Mínima	—	—	8.05	2.87	5.78
Máxima	—	—	30.83	18.83	33.73
Tónicas No Lineales (n=3)					
Media	—	—	8.00	2.57	10.57
D.S.	—	—	5.97	1.84	14.23
Mínima	—	—	1.20	0.60	1.56
Máxima	—	—	12.39	4.24	3.18
Células Theta- Inactivadas					
Fásicas Lineales (n=1)					
	0.06	-2.45	10.70	27.80	34.13
Fásicas No Lineales (n=5)					
Media	—	—	24.54	40.23	33.57
D.S.	—	—	13.98	14.16	16.83
Mínima	—	—	8.03	20.54	19.33
Máxima	—	—	40.30	58.80	60.96
Tónicas No Lineales (n=2)					
Media	—	—	4.29	6.60	5.56
D.S.	—	—	2.03	1.16	1.84
Mínima	—	—	2.85	5.74	4.26
Máxima	—	—	5.72	7.38	6.86
Células No Relacionadas (n=3)					
Media	—	—	9.60	10.34	12.47
D.S.	—	—	7.70	8.92	10.40
Mínima	—	—	0.72	0.14	0.55
Máxima	—	—	14.43	16.65	19.82

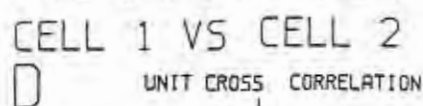
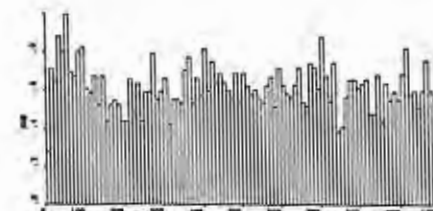
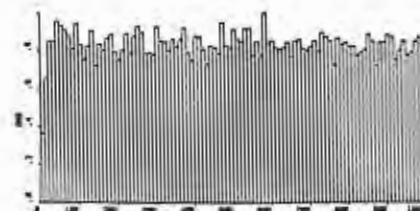
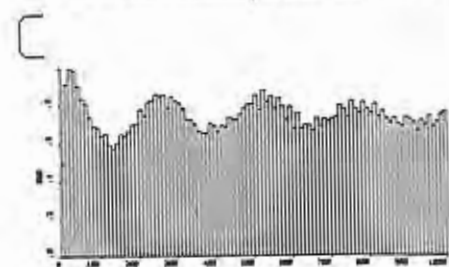
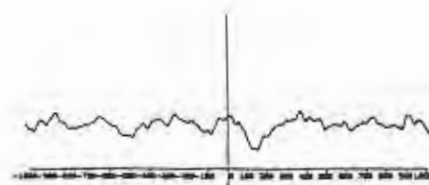
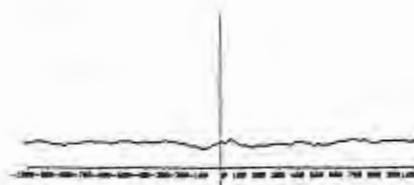
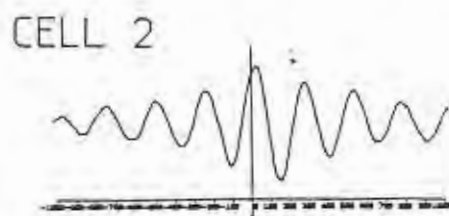
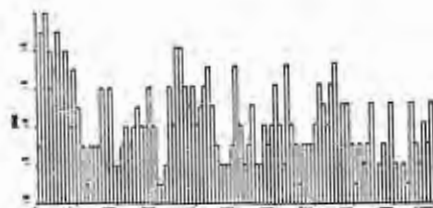
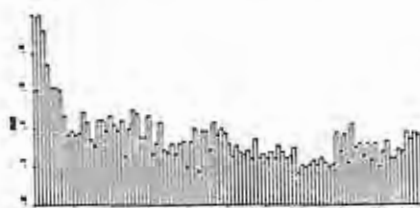
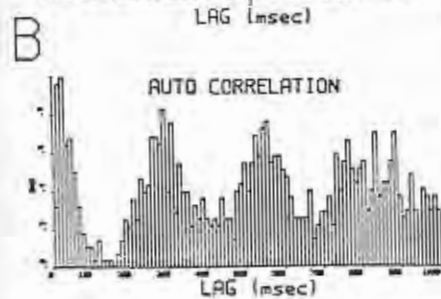
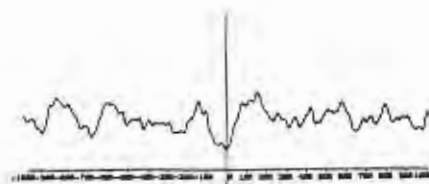
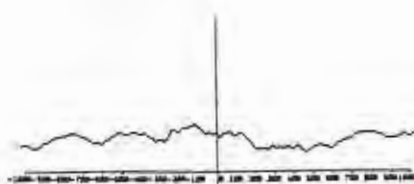
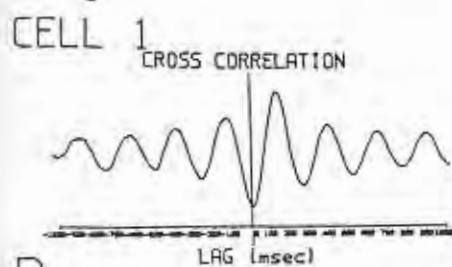
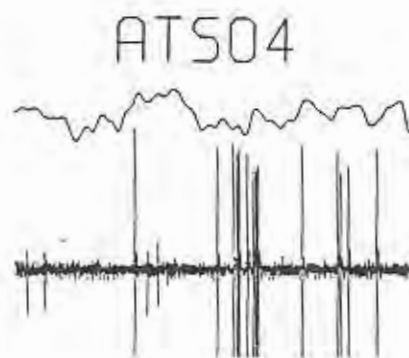
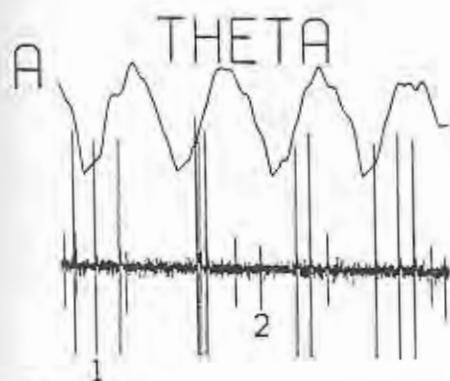


Figura 6. Registros analógicos y análisis del par de células activadas nº 11. A: Los ejemplos analógicos muestran la relación entre los patrones de descarga de la célula theta-activada 1 (célula grande) y la célula theta-activada 2 (célula pequeña) y los potenciales de campo registrados simultáneamente en el hipocampo, para las condiciones B: Correlaciones cruzadas y autocorrelaciones para la célula 1, para las condiciones theta, actividad irregular y ATSO₄, respectivamente (de izquierda a derecha). Note que la célula 1 fue rítmica solamente durante el ritmo theta. C: Correlaciones cruzadas y autocorrelaciones para la célula 2, como en B. Note que la célula 2 fue rítmica solamente durante el ritmo theta. D: Correlaciones cruzadas entre la célula 1 y la célula 2 para las mismas condiciones que en B. Note que las células estuvieron fuertemente correlacionadas durante las condiciones theta y ATSO₄, mostrando un valle prominente alrededor del origen. Durante la condición de actividad irregular fue observada una correlación más débil, pero del mismo tipo.

más picos entre 1 a 3 Hz, en relación a la actividad irregular hipocámpica, en general estas dos actividades de campo fueron claramente comparables.

Actividad neuronal

Fue investigado el efecto de una dosis sistémica de atropina (suficiente para abolir la actividad de campo theta en la formación hipocámpica) sobre las propiedades de descarga de 19 pares de neuronas (38 neuronas). Con respecto al patrón de descarga 32 neuronas fueron fásicas (rítmicas) y 6 fueron tónicas (no-rítmicas). Veinte y tres de las 32 neuronas fásicas continuaron descargando de una manera fásica después de la administración de sulfato de atropina. Sin embargo la ritmicidad que fue observada después de la administración de la droga, nunca fue tan marcada como la encontrada en la misma neurona durante el ritmo theta (figura 7). Las remanentes 9 neuronas (28.1%) perdieron su ritmicidad después de la administración de sulfato de atropina. Todas las 6 neuronas tónicas continuaron descargando de una manera tónica siguiendo al tratamiento con la droga. El análisis de regresión lineal y las frecuencias de descarga durante theta, actividad irregular y después de la administración de sulfato de atropina se resumen para las neuronas, distribuidas de acuerdo a nuestra clasificación, en la tabla 4. La frecuencia media de descarga de los

distintos grupos de neuronas después de la administración de sulfato de atropina tendió a acercarse a la condición previa con la frecuencia más alta de descarga (theta, actividad irregular).

Interacción entre las neuronas del SM-rvBDB

Pares de neuronas fásicas

Catorce de las 19 pares registrados después de la administración de sulfato de atropina fueron fásico-fásicos (f-f). Antes de la administración de la droga, 6 de estos pares estuvieron correlacionados durante el ritmo theta y la actividad irregular (43%), mientras que 8 de estos pares estuvieron correlacionados solamente durante el ritmo theta (57%). Siguiendo a la administración de sulfato de atropina 13 de los 14 (93%) pares f-f estuvieron correlacionados. Esta cifra incluye 7 pares f-f que estuvieron previamente correlacionados durante el ritmo theta solamente. Los 6 pares f-f que estuvieron previamente correlacionados durante el ritmo theta y la actividad irregular, permanecieron correlacionados después de la administración de sulfato de atropina, independientemente del efecto que tuvo la droga en los patrones de descarga de las neuronas. En 3 de estos pares, ambas neuronas permanecieron fásicas, 2 pares tuvieron 1 neurona fásica y en 1 par ambas neuronas pasaron a descargar irregularmente. La figura 6 nos da un ejemplo de un par f-f que permaneció correlacionado después de la administración de sulfato de atropina, aún después que la ritmicidad de ambas neuronas fue abolida. Los ejemplos análogos de la figura 6A muestran que las neuronas descargan rítmicamente y fuera de fase durante el ritmo theta y arrítmicamente y fuera de fase durante la actividad irregular y después de la inyección de atropina. El análisis de correlación cruzada de la figura 6B, mostró que la neurona n° 1 descargaba en el pico negativo de las ondas theta, mientras que la autocorrelación reveló el patrón rítmico de dicha descarga. El análisis de correlación cruzada de la figura 6C mostró que la neurona n° 2 descargaba cerca del pico positivo de la onda theta, mientras que la autocorrelación reveló su patrón rítmico de descarga. La figura 6D mostró que ambas neuronas estaban fuertemente correlacionadas durante el ritmo theta, revelándose a través del valle observado cerca del origen de la función de correlación, una relación de descargas fuera de fase. Las figuras 6B y 6C muestran células que no estuvieron correlacionadas durante la actividad irregular y que descargaron

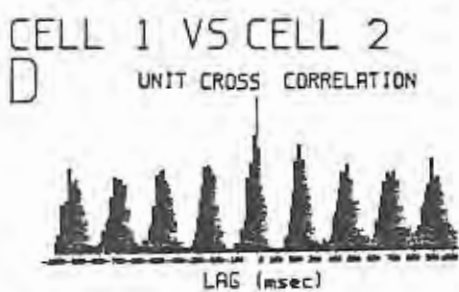
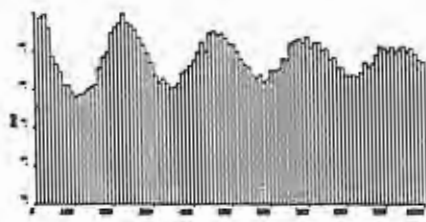
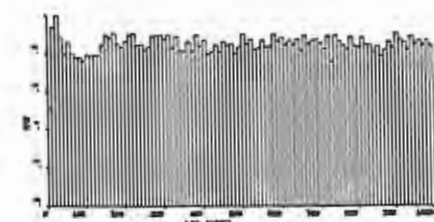
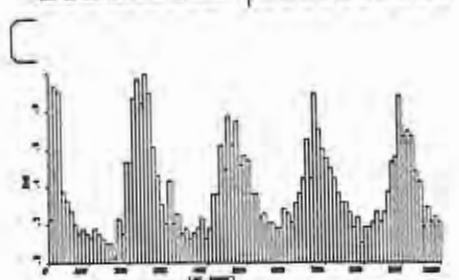
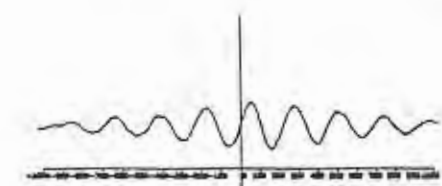
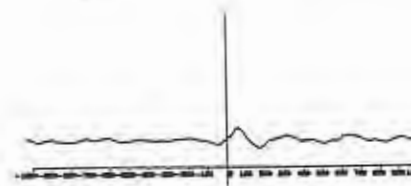
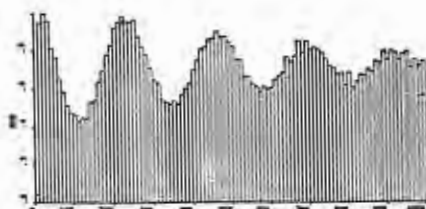
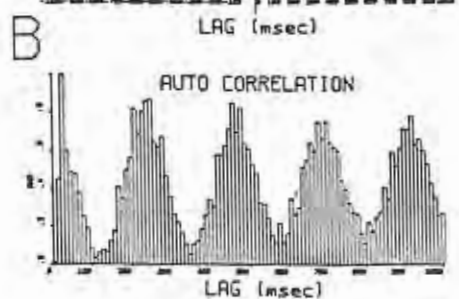
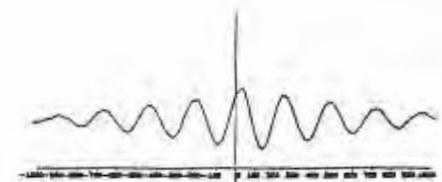
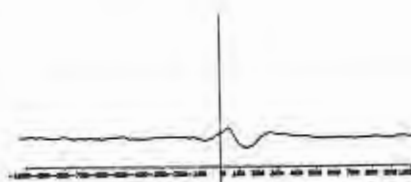
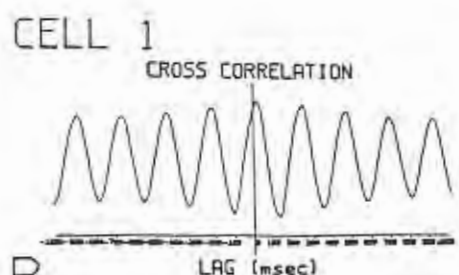
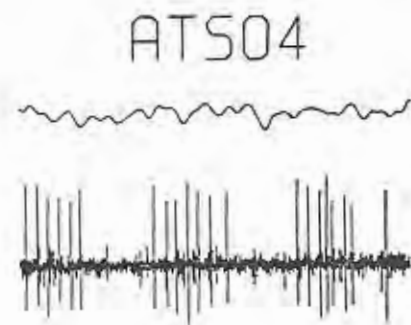
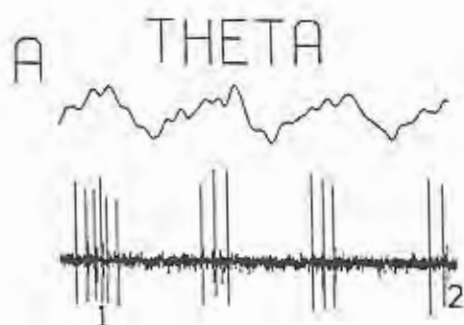


Figura 7. Registros analógicos y análisis del par de células theta-activadas nº 13. A: Los registros analógicos muestran la relación entre los patrones de descarga de las células theta activadas 1 (célula grande) y 2 (célula pequeña) y la actividad de campo registrada simultáneamente en el hipocampo para las condiciones theta, actividad irregular y ATSO_4 , respectivamente. B: Correlaciones cruzadas y autocorrelaciones para la célula 1, para las condiciones theta, actividad irregular y ATSO_4 , respectivamente (de izquierda a derecha). Nótese que la célula 1 fue rítmica durante el ritmo theta y la condición ATSO_4 , pero no durante la actividad irregular. C: Correlaciones cruzadas y autocorrelaciones para la célula 2, como en B. Nótese que la célula 2 fue rítmica durante el ritmo theta y la condición ATSO_4 , pero no durante la actividad irregular. D: Correlaciones cruzadas entre la célula 1 y la célula 2 para las mismas condiciones que en B. Nótese que las células estuvieron fuertemente correlacionadas durante las condiciones theta y ATSO_4 , mostrando un pico prominente alrededor del origen. Durante la condición de actividad irregular no se observó ninguna correlación significativa.

de una manera no rítmica. La figura 6D muestra que a pesar de que ninguna de las neuronas estuvo individualmente correlacionada con la actividad irregular y que ambas descargaron de una manera no rítmica durante este estado, sus descargas estuvieron claramente correlacionadas. Después de la administración de sulfato de atropina el análisis mostró que ambas neuronas continuaron descargando de una manera no rítmica, que existió una correlación débil con la actividad de campo correspondiente (figura 6B y figura 6C) y que ambas neuronas continuaron correlacionadas (figura 6D). Esta correlación no fue tan fuerte como la encontrada durante el ritmo theta.

De los 8 pares f-f que estuvieron correlacionados durante el ritmo theta pero no durante la actividad irregular, 7 estuvieron correlacionados después de la administración de sulfato de atropina. En 6 de estos 7 pares, ambas neuronas del par descargaron rítmicamente después de la administración de sulfato de atropina y en el par remanente 1 neurona descargó rítmicamente. En el par f-f que no se correlacionó después de la administración de la droga, ambas neuronas descargaron arrítmicamente en la condición post-atropina. La figura 7 da un ejemplo de un par f-f donde ambas neuronas fueron rítmicas y se correlacionaron durante el ritmo theta pero no durante la actividad irregular.

Obsérvese que después de la administración de sulfato de atropina las 2 neuronas descargaron rítmicamente y que ambas descargas estuvieron correlacionadas. El análisis de correlación entre ambas neuronas (figura 7B) mostró una fuerte correlación positiva (pico) durante el ritmo theta, cerca del origen de la función de correlación. Las figuras 7B y 7C muestran que ninguna de las neuronas estuvo correlacionada con la actividad irregular y que ambas descargaron de una manera no rítmica. La figura 7D muestra que ambas neuronas no se correlacionaron durante la actividad irregular. Después de la administración de sulfato de atropina, el análisis reveló que las 2 neuronas se correlacionaron fuertemente con la correspondiente actividad de campo y que ambas descargaron rítmicamente (figura 7B y figura 7C). El análisis de correlación cruzada desmostró en esta condición una correlación fuertemente positiva (pico) entre las descargas de ambas.

Tres pares tónico-fásicos (t-f) y un par tónico-tónico (t-t) fueron estudiados después de la administración de sulfato de atropina. Dos de los pares t-f estuvieron correlacionados durante el ritmo theta y el remanente no mostró ninguna correlación previamente a la administración de la droga. De los 2 pares t-f correlacionados durante el ritmo theta, 1 par no se correlacionó después de la administración de sulfato de atropina; haciéndose arrítmica la neurona fásica en esta condición. Las descargas del otro par t-f se correlacionaron después de la administración de la droga y la neurona fásica descargó rítmicamente en esta condición. Finalmente el par de neuronas t-t no se correlacionó durante ninguna condición.

Discusión

Las conclusiones del presente estudio se basan fuertemente en un claro establecimiento de identidades separadas para las neuronas simultáneamente registradas. Los siguientes métodos garantizan la discusión más adelante presentada. Primero, un par de neuronas no fue registrado hasta que la neurona más pequeña fue claramente discernible del nivel de ruido de fondo. Segundo, todos nuestros pares de neuronas fueron nuevamente analizados usando un programa basado en un sistema de clasificación de ondas y el resultado fue idéntico (Salganicoff *et al.*, 1988). Tercero, y más importante criterio, un histograma de intervalos entre las espigas fue llevado a cabo para cada neurona. Se corroboró con este método la inexistencia de intervalos más cortos

que el período refractario y se aseguró entonces que la segunda neurona no estaba incluida en la primera.

En el presente estudio, Neuronas theta-relacionadas en la región del SM-rvBDB fueron clasificadas de acuerdo a un grupo de criterios previamente establecidos como theta-activadas o theta-inactivadas (Bland y Ford, 1988; Ford *et al.* 1989). De las 143 neuronas registradas, 133 (93%) fueron clasificadas como theta-relacionadas y 10 (7%) como no relacionadas.

Estudios de los 54 pares de neuronas (usando un análisis de probabilidad separado para cada uno de los criterios de clasificación de las neuronas) reveló que algunos de los criterios servían para predecir si las neuronas de cada par iban a tener propiedades de descarga similares. Esto es, neuronas tendían a estar cercanas si tenían frecuencias de descarga más altas durante el ritmo theta o la actividad irregular y/o si variaban o no sus frecuencias de descarga en relación a los cambios de frecuencia del ritmo theta. El análisis de probabilidad reveló sin embargo que el patrón de descarga (fásico o tónico) no servía para predecir las características de las neuronas próximas. Esto significaba que si la primera neurona aislada descargaba en salvas rítmicas, la probabilidad de que la segunda neurona fuera rítmica o no lo fuera era similar. Como se mencionó en la sesión de métodos, el análisis de probabilidad tenía que ser capaz de corregir por la condición de que se encontraron más neuronas rítmicas descargando en salvas (fásicas) que neuronas no rítmicas (tónicas) en el SM-rvBDB. El hecho de que la proximidad de neuronas no se relacionaba al patrón de descarga apoya trabajos anteriores (Gaztelu y Buño, 1982; Lamour *et al.*, 1984; Ranck, 1986; Wilson *et al.*, 1976). Estos estudios mostraron que neuronas rítmicas que descargaban en salvas, neuronas no rítmicas que descargaban en salvas y neuronas que no descargaban en salvas se hallaban mezcladas y cerca de la línea media del SM-rvBDB, sin una clara tendencia a estar agrupadas de acuerdo al patrón de descarga. Nosotros no conocemos ninguna literatura previa relevante a nuestra sugestión de que las neuronas se encontraban en clara proximidad de acuerdo a sus frecuencias de descarga durante el ritmo theta o la actividad irregular, y/o de acuerdo a los cambios de sus frecuencias de descarga en relación a los cambios de la frecuencia del ritmo theta. La mayoría de los estudios realizados anteriormente clasificaron a las neuronas del SM-rvBDB de acuerdo simplemente a su patrón de descarga (Alonso *et al.*, 1987; Apostol y Creutzfeldt, 1974; Brazhnik y Vinogradova, 1988; Dutar *et al.*, 1986; Dutar *et al.*, 1987; García Sanchez *et al.*, 1978; Gaztelu y

Buño, 1982; Lamour *et al.*, 1984; Macadar *et al.*, 1970; Morales *et al.*, 1971; Petsche *et al.*, 1965; Ranck, 1976; Stewart y Fox, 1989; Vinogradova *et al.*, 1980).

Sería de obvio interes poder relacionar a la anatomía del SM-rvBDB las propiedades de descarga de estos pares, infortunadamente esto no fue posible. El área de registro fue muy pequeña y el tamaño de nuestras marcas (cuando se logró marcar) fue de aproximadamente de 500 μm . Lo mejor que pudimos concluir es que neuronas con ciertas propiedades de descarga yacen en clara proximidad una de otra en la región medial del SM-rvBDB, mientras que neuronas con patrones de descarga fásicos o tónicos tienen probabilidades iguales de estar en clara proximidad en esta región.

Se mostró aquí que las relaciones funcionales entre pares de neuronas, demostradas por el análisis de correlación cruzada, eran dependientes de la ritmicidad. La mitad de los pares fuertemente rítmicos se correlacionaron durante el ritmo theta y la actividad irregular. La mitad remanente de estos pares se correlacionaron solamente durante el ritmo theta. Casi 70% de los pares constituidos por una neurona fásica y una tónica se correlacionaron durante el ritmo theta solamente. Uno de esos pares se correlacionó también durante la actividad irregular. Ninguno de los pares de neuronas tónicas se correlacionó durante el ritmo theta o la actividad irregular. Trabajos previos sobre el análisis de las interacciones sinápticas entre neuronas han demostrado, que ciertas características de las correlaciones cruzadas dependen de las propiedades de las sinapsis y de hechos estadísticos del patrón de descarga de cada neurona (Moore *et al.*, 1970; Perkel *et al.*, 1967; Wiegner y Wierzbicka, 1987). Estos autores distinguieron 2 características de la función de correlación cruzada y las nombraron: efectos primarios y secundarios. Los efectos primarios de un particular arreglo sináptico estaban dados por un pico o valle cerca del origen, desplazados de este origen de acuerdo a la velocidad de conducción y/o al retardo sináptico entre los elementos presinápticos y postsinápticos del par analizado. Los efectos secundarios estaban dados por las características estructurales de la correlación que ocurrían más lejos del origen. Estos efectos estaban determinados por la estructura temporal de los trenes de espigas de la neuronas pre y post sináptica. Efectos secundarios que ocurrían simétricamente alrededor del origen reflejaban la estructura de autocorrelación de la neurona de entrada mientras que aquellos que ocurrían en la parte derecha de la correlación reflejaban la estructura de la neurona de salida. En casos de una vía

de entrada común a ambos elementos del par, los efectos siempre serían simétricos. En nuestro estudio, los pares de neuronas que mostraron una correlación en el ritmo theta y en la actividad irregular fueron los que tenían, presumiblemente, las más fuertes correlaciones funcionales. Es importante notar que la correlación que se observó durante la actividad irregular, ocurrió a pesar de que cada neurona individualmente no mostró ninguna correlación con dicha actividad. Las características de las funciones de correlación para estos pares de neuronas (fuertes correlaciones simétricas con marcados picos o valles ocurriendo alrededor del origen) sugería que estos pares compartían una entrada neural común. En 12 de los 18 pares fásico-fásicos correlacionados durante el ritmo theta y la actividad irregular valles primarios ocurrieron en la función de correlación cruzada, sugiriendo una relación de excitación-inhibición compartida. Valles primarios son producidos cuando una neurona falla consistentemente en descargar cuando una segunda dispara. Cuando 2 neuronas están siendo simultáneamente registradas por un mismo microelectrodo, valles pueden ser producidos artificialmente por la superposición de espigas. Nosotros buscamos cuidadosamente en nuestros registros y encontramos que superposiciones ocurrían muy raramente. Los restantes 6 pares mostraron picos primarios, sugiriendo que compartían entradas excitatorias o inhibitorias.

Treinta y cinco pares de neuronas se correlacionaron sólo durante el ritmo theta. Veinte y tres de esas funciones de correlación mostraron picos primarios ocurriendo en el origen, mientras que las 12 restantes mostraron valles en el origen. Desde que estos pares se correlacionaron en un estado solamente, las relaciones funcionales fueron aquí más especulativas. Una posibilidad a considerar en los 35 casos donde la correlación sólo ocurrió durante el ritmo theta, es que dicha correlación pudo ser debida simplemente a que las neuronas descargaron más durante el ritmo theta que durante la actividad irregular. El análisis de estos 35 pares reveló que esta posibilidad no explicaba la correlación en 29 de los 35 pares, dado que en estos casos las frecuencias de descarga fueron más altas durante la actividad irregular o no significativamente diferentes entre ambos estados.

La administración sistémica de sulfato de atropina (10-20 mg/kg) abolió el ritmo theta producido espontáneamente o por presión sobre la piel de la cola de la rata, sustituyéndolo por una actividad de apariencia similar a la actividad irregular observada previamente a la administración de la droga. El análisis de

Fourier falló en revelar picos en cualquier frecuencia. El análisis espectral de tiempo mostró un aspecto similar al de la actividad irregular. Sin embargo, estos datos son todavía inadecuados para apoyar la conclusión de que la actividad de campo observada con sulfato de atropina es idéntica a la actividad irregular. En efecto, Stewart y Fox (1989), usando neuronas del SM-rvBDB como disparador en promedios de actividad de campo y unitaria hipocámpica, demostraron recientemente un componente atropina resistente de la actividad de campo theta. El theta residual, de amplitud baja (aproximadamente unos 600 μ V) mantuvo una relación de fase de 180° entre CA1 y el dentado. Existe la posibilidad de que el ritmo theta en la rata anestesiada con uretano tenga 2 componentes colinérgicos, uno mediado por receptores muscarínicos y el otro por receptores nicotínicos. Sin embargo, es poco probable que esta posibilidad pueda explicar los resultados de Stewart y Fox desde que la administración sistémica de nicotina en la rata anestesiada con uretano resultó en trenes de theta de solamente 20-30 segundos de duración. En adición, las descargas de neuronas fásicas y tónicas fueron abolidas durante la administración de nicotina (Bland y Colom, 1988). En el presente momento es difícil evaluar el significado que el componente residual atropina resistente pueda tener en este estudio. La necesidad de determinar las relativas potencias de las entradas atropina resistentes y atropina sensitivas a la formación hipocámpica se hace imperiosa, tanto en la rata anestesiada con uretano como en el animal moviéndose libremente. Hay amplia evidencia documentando el rol de la mediación colinérgica en el ritmo theta en la rata anestesiada con uretano. Agonistas colinérgicos como eserina y carbacol producen largos trenes de theta acompañados de descargas de neuronas hipocámpicas fásicas y tónicas. La subsecuente administración de sulfato de atropina abole tanto la actividad de campo como los patrones típicos de descarga de las neuronas hipocámpicas fásicas y tónicas (Bland y Colom, 1988). Más aún, la administración de sulfato de atropina abole la relación lineal que existe entre los niveles de estimulación eléctrica del hipotálamo dorsomedial-posterior y las frecuencias de descarga de las neuronas hipocámpicas fásicas lineares (Colom *et al.*).

En el presente estudio, 23/32 (71.9%) de las neuronas fásicas probadas con sulfato de atropina continuaron descargando con un patrón fásico. Este resultado es casi idéntico al recientemente reportado por Stewart y Fox (1989). Estos autores encontraron que 22/33 (66.7%) de las neuronas rítmicas en el SM-rvBDB continuaban disparando en salvas rítmicas a la frecuencia theta

después de la administración de sulfato de atropina. En el presente estudio, el sulfato de atropina no tuvo ningún efecto significativo en las frecuencias medias de descarga de los distintos grupos neuronales considerados. Después de la aplicación de sulfato de atropina, existió una tendencia en las neuronas a acercarse a la frecuencia de descarga más alta de la condición pre-droga. Así por ejemplo, si la célula era una neurona theta activada con una frecuencia media de descarga más alta durante el ritmo theta, en comparación a la actividad irregular, la frecuencia media de descarga después de la administración de sulfato de atropina se acercó a la frecuencia media registrada durante el ritmo theta.

Nuestros datos sobre interacciones neuronales sugieren la existencia de efectos complejos del sulfato de atropina. Pares de neuronas fásico-fásicos que estuvieron correlacionados durante el ritmo theta y la actividad irregular permanecieron correlacionados después de la administración de sulfato de atropina, independientemente de los efectos de la droga en los patrones individuales de las neuronas. De hecho, en un caso donde ambas neuronas pasaron a descargar irregularmente con la administración de sulfato de atropina, la correlación entre ambas neuronas se hizo más fuerte con la droga que durante la actividad irregular. Siete de los 8 pares fásico-fásicos que estuvieron correlacionados durante el ritmo theta pero no durante la actividad irregular, se correlacionaron después de la administración de sulfato de atropina. En estos casos parecería que el factor crítico fue la ritmicidad que ocurrió después de la administración de la droga. En 6 de 7 pares, ambas neuronas descargaron rítmicamente con sulfato de atropina y en el par remanente 1 neurona fue rítmica. En el caso donde 1 par de neuronas fásico-fásico no se correlacionaron después la administración de sulfato de atropina, ninguna neurona mostró ritmicidad después de la administración de la droga. Aún en el caso de 1 par fásico-tónico, si una de las neuronas se mantenía rítmica después de la administración de la droga, las neuronas del par podían estar correlacionadas. Neuronas tónicas nunca se hicieron rítmicas con la administración de sulfato de atropina y por lo tanto no se observaron nunca correlaciones entre dichas neuronas después de la administración de la droga.

Estos datos sugieren que existe una sub-población crítica de neuronas fásicas theta-activadas y theta-inactivadas (aproximadamente 50%) en el SM-rvBDB que comparten entradas excitatorias e inhibitorias. Una posibilidad es que estas entradas provengan de vías ascendentes sincronizantes y

desincronizantes (vease Vertes, 1986). La naturaleza exacta del control que estas neuronas y otras del SM-rvBDB ejercen sobre la actividad de campo y neuronal hipocámpica, está todavía por ser determinada.

Bibliografía

- Alonso, A., Gaztelu, J.M., Buño, Jr., W. and Garcia-Austt, E. (1987) Cross correlation analysis of septohippocampal neurons during θ -rhythm. *Brain Res.* 413:135-146.
- Andersen, P., Bland, B.H., Myhrer, T. and Schwartzkroin, P. (1979) Septohippocampal pathway necessary for dentate theta production. *Brain Res.* 165:13-22.
- Apostol, G. and Creutzfeldt, O. D. (1974) Cross correlation between the activity of septal units and hippocampal EEG during arousal. *Brain Res.* 67:65-75.
- Baisden, R.H., Woodruff, M.L. and Hoover, D.B. (1984) Cholinergic and non-cholinergic septohippocampal projections: A double-label horseradish peroxidase- acetylcholinesterase study in the rabbit. *Brain Res.* 290:146-151.
- Bland, B.H. (1986) The physiology and pharmacology of hippocampal formation theta rhythms. *Prog. Neurobiol.* 26:1-54.
- Bland, S.K. and Bland, B.H. (1986) Medial septal modulation of hippocampal theta cell discharges. *Brain Res.* 375:102-116.
- Bland, B.H. and Colom, L.V. (1988) Responses of phasic and tonic hippocampal theta-on cells to cholinergics: differential effects of muscarinic and nicotinic activation. *Brain Res.* 440:167-171.
- Bland, B.H. and Ford, R.D. (1988) Theta-on, theta-off cells in the medial septum and vertical limb of the diagonal band. *Proc. Can. Fed. Biol. Soc.* 31:120.
- Brazhnik, E.S. and Vinogradova, O.S. (1988) Modulation of the afferent input to septal neurons by cholinergic drugs. *Brain Res.* 451:1-2.
- Colom, L.V. and Bland, B.H. (1987) State-dependent spike train dynamics of hippocampal formation neurons: Evidence for theta-on and theta-off cells. *Brain Res.* 422:277-286.
- Colom, L.V. and Bland, B.H. (1988) Functional connectivity between pairs of medial septal neurons. *Soc. Neurosci. Abstr.* 14: 127.
- Colom, L.V., Christie, B.R. and Bland, B.H. (1988) Cingulate cell discharge patterns related to hippocampal EEG and their modulation by muscarinic and nicotinic agents. *Brain Res.* 460:329-338.

- Colom, L.V., Ford, R.D. and Bland, B.H. (1987) Hippocampal formation neurons code the level of activation of the cholinergic septo-hippocampal pathway. *Brain Res.* 410:12-20.
- Donovik, P.J. (1968) Effects of localized septal lesions on hippocampal EEG activity and behavior in rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 66:569-578.
- Dutar, P., Lamour, Y., Rascol, O. and Jobert, A. (1986) Septohippocampal neurons in the rat: further study of their physiological and pharmacological properties. *Brain Res.* 365:325-334.
- Dutar, P., Rascol, O., Jobert, A. and Lamour, Y. (1987) Modulation of the excitability of septohippocampal terminals in the rat: relation to neuronal discharge rate. *Brain Res.* 418: 98-110.
- Edgington, E.S. (1987) *Randomization Tests*. New York: Dekker.
- Ford, R.D., Colom L.V. and Bland, B.H. (1989) The classification of medial septum-diagonal band cells as theta-on or theta-off in relation to hippocampal EEG states. *Brain Res.* 493:269-282.
- Freund, T.F. and Antal, M. (1988) GABA containing neurons in the septum control inhibitory interneurons in the hippocampus *Nature (Lond.)*, 336:170-173.
- García-Sánchez, J.L., Buño, Jr., W., Fuentes, J. and García-Austt, E. (1978) Non-rhythmical hippocampal units, theta-rhythm and afferent stimulation. *Brain Res. Bull.* 3:213-219.
- Gaztelu, J.M. and Buño, JR. W. (1982) Septo-hippocampal relationships during EEG theta rhythm. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.* 54:375-387.
- Green, J.D. and Arduini, A. (1954) Hippocampal electrical activity in arousal. *J. Neurophysiol.* 17:533-557.
- Kohler, C., Chan-Palay, V. and Wu, J.-Y. (1984) Septal neurons containing glutamic acid decarboxylase immunoreactivity project to the hippocampal region in the rat brain. *Anat. Embryol.*, 169:41-44.
- Kolb, B. and Whishaw, I.Q. (1977) Effects of brain lesions and atropine on hippocampal and neocortical electroencephalograms in the rat. *Expl. Neurol.* 56:1-22.
- Lamour, Y., Dutar, P. and Jobert, A. (1984) Septo-hippocampal and other medial septum-diagonal band neurons: electrophysiological and pharmacological properties. *Brain Res.* 309:227-239.

- Leung, L.S. (1984) Theta rhythm during REM and waking: Correlations between power, phase and frequency. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.* 58:553-564.
- Leung, L.S. (1985) Spectral analysis of hippocampal EEG in the freely moving rat: Effects of centrally active drugs and relations to evoked potentials, electroencephalogr. *Clin. Neurophysiol.*, 60:65-77.
- Leung, L.S., Lopes Da Silva, F.H., and Wadman, W.J. (1982) Spectral characteristics of hippocampal EEG in the freely moving rat. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.* 54:203-219.
- Macadar, O., Roig, J.A., Monti, J.M. and Budelli, R. (1970) The functional relationship between septal and hippocampal unit activity and hippocampal theta rhythm. *Physiol. Behav.* 5: 1443-1449.
- Mesulam, M., Van Hoesen, G. and Rosene, D.G. (1977) Substantia innominata, septal area and nuclei of the diagonal band in rhesus monkey: Organization of afferents and their acetylcholinesterase histochemistry. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 3:202.
- Monmaur, P., Haucine, O. and Delacour, J. (1979) Experimental dissociation between wakefulness and paradoxical sleep hippocampal theta. *Physiol. Behav.* 23:471-479.
- Morales, F.R., Roig, J.A., Monti, J.M., Macadar, O. and Budelli, R. (1971) Septal unit activity and hippocampal EEG during the sleep-wakefulness cycle of the rat. *Physiol. Behav.* 6: 563-567.
- Moore, G.P., Segundo, J.P., Perkel, D.H. and Levitan, H. (1970) Statistical signs of synaptic interaction in neurons. *Biophys. J.* 10:876-900.
- Myhrer, T. (1975) Locomotor avoidance and maze behavior in rats with selective disruption of hippocampal output. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 89:759-777.
- Nyakas, C., Luiten, P.G.M., Spencer, D.G., and Traber, J. (1987) Detailed projection patterns of septal and diagonal band efferents to the hippocampus in the rat with emphasis on innervation of CA1 and dentate Gyrus. *Brain Res. Bull.*, 18:533-545.
- Panula, P., Revuelta, A.V., Cheney, D.L. Wu, J.-Y. and Costa, E. (1984) An immunohistochemical study on the location of GABA-ergic neurons in rat septum. *J. Comp. Nuerol.*, 222:69-80.
- Perkel, D.H., Gerstein, G.L. and Moore, G.P. (1967) Neuronal spike trains and stochastic point processes. 1. The single spike train. *Biophys. J.* 7:391-418.

- Petsche, H., Gogolak, G. and Van Zwieten, P.A. (1965) Rhythmicity of septal cell discharges at various levels of reticular excitation. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.* 19:25-33.
- Petsche, H. and Stumpf, C. (1960) Topographic and Toposcopic study of origin and spread of the regular synchronized arousal pattern in the rabbit. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.* 12:589-600.
- Petsche, H., Stumpf, Ch. and Gogolak, G. (1962) The significance of the rabbit's septum as a relay station between the midbrain and the hippocampus. 1. The control of hippocampal arousal activity by the septum cells. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.* 14:202-211.
- Ranck, Jr., J.B. (1976) Behavioral correlates and firing repertoires of neurons in septal nuclei in unrestrained rats. In: DeFrance, J.D. (Ed.) *The Septal Nuclei*. Plenum Press, New York, pp. 423-462.
- Rawlins, J.N.P., Feldon, J. and Gray, J.A. (1979) Septo-hippocampal connections and the hippocampal theta rhythm. *Expl. Brain Res.* 37:49-63.
- Sainsbury, R.S. and Bland, B.H. (1981) The effects of selective septal lesions on theta production in CA1 and the dentate gyrus of the hippocampus. *Physiol. Behav.* 26:1097-1101.
- Salganicoff, M., Sarna, M., Sax, L. and Gerstein, G.L. (1988) Unsupervised waveform classification of multi-neuron recordings: A real-time, software-based system. I. algorithms and implementation. *J. Neurosci. methods.* 25: 181-187.
- Siegel, S. and Castellan, Jr., J.N. (1988) *Non parametric Statistics For The Behavioral Sciences*. New York: McGraw-Hill.
- Stewart, M. and Fox, S.E. (1989) Two populations of rhythmically bursting neurons in rat medial septum are revealed by atropine. *J. Neurophysiol.* 61:982-993.
- Stewart, M. and Fox, S.E. (1989) Detection of an atropine-resistant component of the hippocampal theta rhythm in urethane-anaesthetized rats. *Brain Res.* 500:55-60.
- Vertes, R.P. (1986) Brainstem modulation of the hippocampus: Anatomy, physiology and significance. In R.L. Isaacson and K. Pribram (Eds.), *The Hippocampus*, Vol IV, Plenum, New York, pp. 41-75.
- Vinogradova, O.S., Brazhnik, E.S., Karanov, A.M. and Zhadina, S.D. (1980) Neuronal activity of the septum following various types of de-afferentation. *Brain Res.* 187:353-368.

- Wiegner, A.W. and Wierzbicka, M.M. (1987) A method for assessing significance of peaks in cross correlation histograms. *J. Neurosci. Meth.* 22:125-131.
- Wilson, C.L., Motter, B.C. and Lindsley, D.B. (1976) Influences of hypothalamic stimulation upon septal and hippocampal electrical activity in the cat. *Brain Res.* 107:55-68.

MICROINFUSION INTRAHIPOCÁMPICA DE CARBACOL Y BICUCULINA *IN VIVO* INDUCE OSCILACIONES THETA SÍMILES EN EL HIPOCAMPO SEPTALMENTE DEAFERENTADO

Resumen

Fue demostrado previamente que las rebanadas de hipocampo pueden ser inducidas a generar trenes de oscilaciones theta similares mediante la perfusión de carbacol en el baño de perfusión. Hasta ahora sin embargo, no era posible generar una actividad similar mediante microinfusiones de carbacol en el hipocampo septalmente deaferentado, pero de otra manera intacto. En el presente estudio se reporta la primera demostración *in vivo* de oscilaciones theta similares en el hipocampo septalmente deaferentado. Ratas fueron anestesiadas con uretano e implantadas con cánulas de microinfusión en la región del SM-rvBDB y en uno o múltiples sitios del *stratum moleculare* de la *fascia dentata*. Se inyectó procaina hidrociorada en el SM-rvBDB, para producir una anestesia reversible, que duró en promedio unos 20 minutos. Microinfusiones aisladas de carbacol o bicuculina durante el período de anestesia septal fallaron en producir oscilaciones theta similares. La combinación de carbacol y bicuculina durante el período de anestesia septal produjo trenes de oscilaciones theta similares muy similares a las visualizadas en la rebanada de hipocampo. Las oscilaciones fueron bloqueadas con la administración intravenosa de sulfato de atropina y tuvieron los mismos perfiles en profundidad que el ritmo theta. Se demostró que las neuronas theta activadas descargaban en salvas rítmicas sincrónicas a las oscilaciones. Parece entonces que la entrada septal provee a los circuitos intrahipocámpicos de un balance crítico de excitación colinérgica e inhibición GABAérgica, que les permite oscilar a la frecuencia theta.

Introducción

En los últimos 20 años una importante cantidad de investigaciones han apuntado a la elucidación de los mecanismos de sincronía neural y de hiperexcitabilidad en el cerebro. Durante este tiempo, los mecanismos en la sincronización de potenciales de campo corticales y los eventos epileptiformes han sido extensamente estudiados (Dudek, Snow y Taylor, 1986). A pesar de este interés no han sido recolectados demaciados datos acerca de los osciladores del cerebro y sus interacciones. Sólo recientemente un extensivo

esfuerzo ha sido dedicado al estudio de los mecanismos básicos de las actividades rítmicas cerebrales (Steriade, Gloor, Llinás, Lopes da Silva y Mesulam, 1990). Un ejemplo bien documentado de ritmicidad cerebral es el ritmo theta hipocámpico, el potencial de campo rítmico de mayor amplitud producido por el cerebro de mamíferos. Si bien muchos estudios han demostrado la importancia de la entrada del septum medial en la generación de los potenciales de campo hipocámpicos, su rol exacto no está claro. Este estudio apunta a clarificar la función del septum medial en la generación de potenciales de campo oscilatorios por el hipocampo.

La región del SM-rvBDB constituye una mayor fuente de aferencias a la formación hipocámpica. La mayoría de las fibras que forman la vía septo-hipocámpica alcanza la formación hipocámpica vía del *fórnix* (Lopes da Silva, Witter, Boeijinga y Lohman, 1990). Estos autores señalaron que las proyecciones septo-hipocámpicas constituyen "un sistema conservador", significando que la organización global es similar en ratas, gatos y monos.

Técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas han demostrado que una porción de estas proyecciones son colinérgicas. (Shute y Lewis, 1963, 1967; Lewis y Shute, 1967; Lewis, Shute y Silver, 1967; Bagnoli, Beaudet, Stella y Cuenod, 1981; Crutcher, Madison y Davis, 1981; Alonso y Kohler, 1984; Rye, Weiner, Mesulam, Mufson y Saper, 1984; Woolf, Eckenstein y Butcher, 1984; Amaral y Kurz, 1985; Wainer, Levey, Rye, Mesulam y Mufson, 1985). Actualmente se estima que el componente colinérgico representa aproximadamente el 50% de la vía septo-hipocámpica. Lesiones de la región del SM-rvBDB resultan en una pérdida de tinción para acetilcolinesterasa en la formación hipocámpica (Lewis y Shute, 1967; Mellgren y Szrebro, 1973; Storm-Mathisen, 1978) y en un decremento significativo de la actividad hipocámpica de colina acetiltransferasa (Lewis y Shute, 1967; Fonnun, 1970; Storm-Mathisen, 1978).

Se estima que un 30% de la proyección septo-hipocámpica es GABAérgica (Alonso y Kohler, 1984; Baisden, Woodruff y Hoover, 1984; Kohler, Chan-Palay y Wu, 1984; Panula, Revuelta, Cheney, Wu y Costa, 1984; Rye, Wainer, Mesulan, Mufson y Saper, 1984; Amaral y Kurz, 1985; Wainer, Levey, Rye, Mesulam y Mufson, 1985; Nyakas, Luiten, Spencer y Traber, 1987). Los axones de las neuronas GABAérgicas septales terminan principalmente en neuronas GABAérgicas no piramidales (interneuronas) de la formación

hipocámpica (Freund y Antal, 1988), muchas de estas interneuronas también contienen péptidos (Gulyas, Gorcs y Freund, 1990).

La región del SM-rvBDB es crítica para la aparición de actividad de campo theta en la formación hipocámpica del animal intacto. Lesiones del SM-rvBDB resultan en una abolición completa del ritmo theta en la formación hipocámpica (Bland, 1986). El bloqueo resersible del SM-rvBDB mediante microinfusión de procaína hidrociorada abole el ritmo theta espontáneo y el inducido por estimulación eléctrica de la región de los núcleos hipotalámicos dorso-mediales y posteriores (Smythe, Christie y Colom, 1991; Lawson y Bland, 1991). A pesar de la demostrada importancia de la región del SM-rvBDB en la generación del ritmo theta por el cerebro intacto, fue demostrado recientemente que ondas theta similares pueden ser generadas mediante la perfusión del baño de rebanadas de hipocampo con carbacol 50 μ M (Konopacki, MacIver, Bland y Roth, 1987; Konopacki, MacIver, Roth y Bland, 1987; Konopacki, Bland y Roth, 1987; Konopacki, Bland, Mac Iver y Roth, 1987; Konopacki, Bland y Roth, 1988 a, b, c). Más aún, registros intracelulares en esta preparación demostraron la presencia de un ritmo theta intracelular y descargas celulares sincrónicas que se correlacionaban con la aparición de actividad theta en el potencial de campo extracelular (Bland, Colom, Konopacki y Roth, 1988).

El propósito del presente trabajo fue investigar la posibilidad de generar actividad de campo theta en la preparación *in vivo* durante la supresión reversible del SM-rvBDB, mediante la microinfusión de carbacol directamente en el hipocampo (tratando de generar condiciones análogas a las presentes en los experimentos realizados con rebanadas de hipocampo). Rebanadas de hipocampo (particularmente rebanadas transversas) tienen menos circuitos inhibitorios intactos (Knowles y Schwartzkroin, 1981; Amaral y Witter, 1989) en comparación al hipocampo intacto. Por ello, una serie de experimentos utilizando el GABA_A antagonista bicuculina fueron también llevados a cabo.

Materiales y métodos

Los datos fueron obtenidos de 58 ratas macho de capucha negra (250-400 g), suministradas por el servicio encargado del cuidado de los animales de la Universidad de Calgary. Las ratas fueron inicialmente anestesiadas con halotano mientras cánulas traqueales y yugulares eran insertadas. Halotano fue entonces discontinuado y uretano fue administrado usando la vía yugular para mantener un nivel adecuado de anestesia durante el resto de los

procedimientos quirúrgicos y experimentales. Al nivel más bajo del anestésico usado los animales produjeron ritmo theta continuamente. A un nivel medio la actividad de campo espontáneamente osciló entre el ritmo theta y la actividad irregular. Al nivel más profundo de anestesia usado, los animales produjeron solamente actividad irregular. La temperatura fue mantenida a 37°C y la frecuencia cardíaca fue monitorizada constantemente a través del experimento.

Las ratas fueron colocadas en el instrumento estereotáxico con el plano entre bregma y lambda nivelado horizontalmente. Un alambre de tungsteno no aislado, colocado en la corteza anterior a bregma, sirvió como electrodo indiferente. El marco estereotáxico fue conectado a tierra. Un electrodo de tungsteno, denominado electrodo de referencia, (0.2-0.5 MegOhm) fue colocado en el hipocampo dorsal, en la capa molecular del dentado (3.0 mm posterior to bregma, 2.0 mm lateral a la línea media y 2.6-2.8 ventral a la superficie dural), para el registro de la actividad hipocámpica. Un tubo guía para la cánula de infusión fue implantado ligeramente posterior al electrodo de referencia (aguja hipodérmica número 23, 4.5 mm posterior a bregma, 2.5 mm lateral). La cánula de infusión consistió en una aguja hipodérmica número 30 ajustada a un tubo de polietileno (intramedic, PE 50). La punta de la cánula de infusión se extendía 2 mm por debajo del tubo guía, terminando a 2.8 mm de la superficie dural. Registros neuronales fueron llevados a cabo en el hipocampo izquierdo (3.0-3.3 mm posterior a bregma, 2-2.5 lateral a la línea media), empezando justo debajo de la superficie alvear y continuando ventralmente hasta la capa inferior de neuronas granulosas del dentado. Las neuronas fueron registradas con microelectrodos de vidrio (4-6 MegOhm) llenos con acetato de sodio .5 M y pontamina azul cielo al 2%. Una segunda cánula de infusión fue colocada en la región del SM-rvBDB, .0.5 mm anterior a bregma, 0.0 mm lateral a la línea media y 5.5-6.0 mm ventral a la superficie dural. Una representación diagramática de los sitios de registro e infusión en el cerebro se muestra en la figura 1. La presión de infusión fue generada y mantenida por una bomba de infusión. Carbacol (10 µg/µl) y bicuculina (10 µg/µl) fueron infundidos a una razón de 0.5 µl/min, mientras que procaína hidrociorada (10% por peso, pH 6.6) fue infundida a una razón de 1 µl/min. La localización de la punta del microelectrodo fue marcada pasando 50 µA de corriente por 10 min (5 min anodal, 5 min catodal). Secciones congeladas del cerebro (40 µm) fueron extraídas serialmente y montadas en portaobjetos de vidrio para la subsecuente tinción con tiónina. Las señales cerebrales fueron amplificadas y mostradas de

Hippocampal Field Electrode

Cell Electrode

MS/vDBB
Cannula

Hippocampal
Cannula

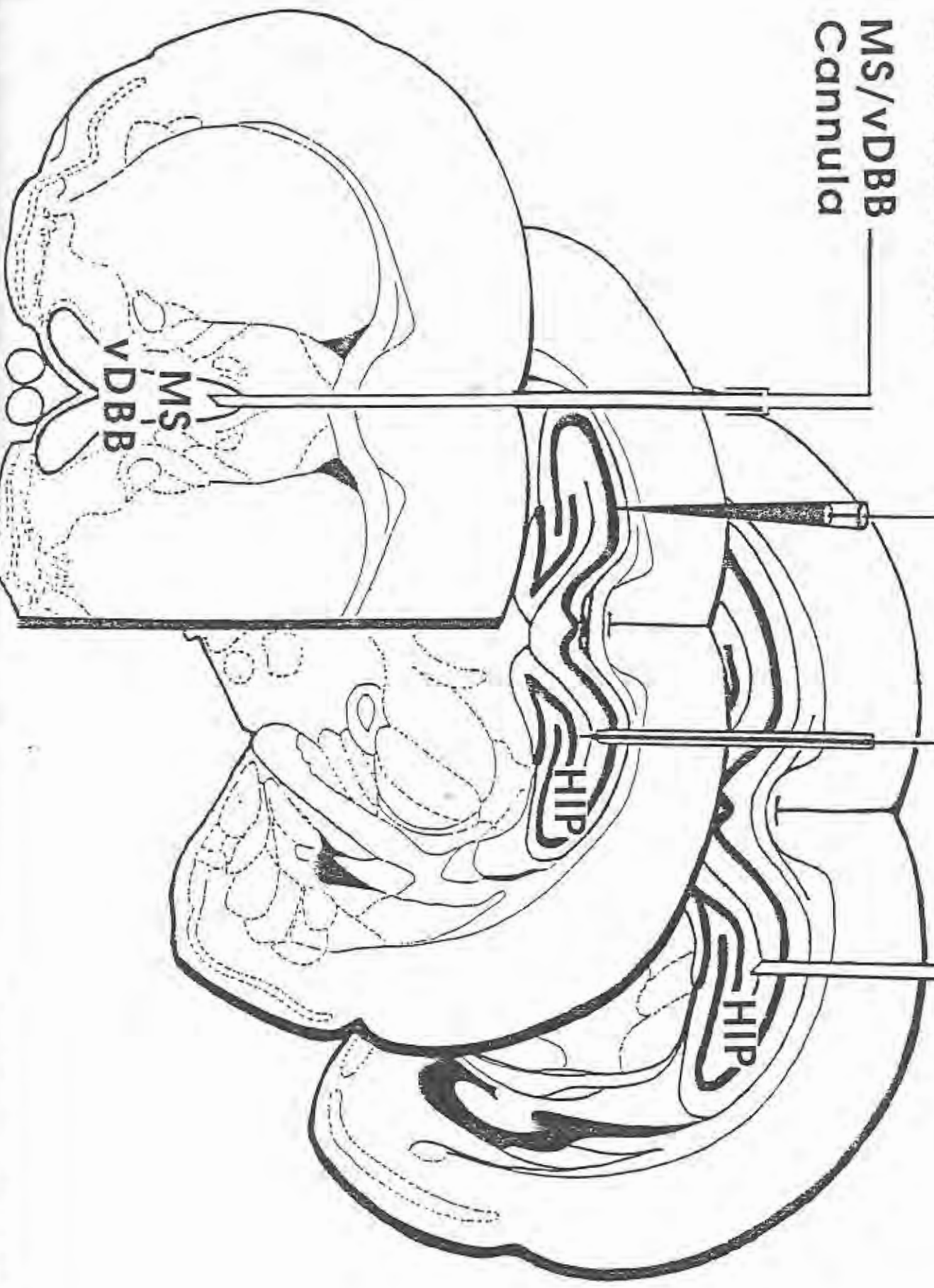


Figura 1. Representación diagramática de los lugares de infusión y registro en el cerebro.

la manera previamente descrita en esta tesis (Colom y Bland, 1987; Bland y Colom, 1989). Todas las señales fueron almacenadas en un grabador modulado en frecuencia (FM) para el subsecuente análisis en la computadora.

La primera serie de experimentos procedieron en el orden descrito a continuación. Primero, actividad de campo theta fue generada por microinfusión directa de carbacol en la formación hipocámpica (en un único sitio o en dos, en este último caso se usó un sitio en cada hipocampo). Luego, procaína fue microinfundida dentro del SM-rvBDB para producir una inactivación reversible de esta región, deaferentando funcionalmente al hipocampo de su entrada septal. Siguiendo a esta serie de experimentos, el efecto de la infusión única de bicuculina fue evaluada durante la supresión del SM-rvBDB. Finalmente el efecto de infusiones hipocámpicas, hechas secuencialmente, de carbacol y bicuculina (durante la supresión con procaína del SM-rvBDB), fue evaluado. Como esta manipulación resultó en la producción de trenes recurrentes de actividad theta símil de gran amplitud, una serie de perfiles de profundidad fueron llevados a cabo a través de la corteza y de la formación hipocámpica para tratar de elucidar el origen de la actividad. El efecto de la administración intravenosa de sulfato de atropina (5 mg/kg) sobre los trenes de actividad theta símil fue evaluado en 3 experimentos. En una serie final de experimentos, las neuronas theta activadas y la actividad de campo hipocámpica fueron registradas en condiciones basales (ritmo theta y actividad irregular espontáneos, SM-rvBDB intacto), durante la supresión del SM-rvBDB y siguiendo a la microinfusión de carbacol y bicuculina (con el SM-rvBDB suprimido).

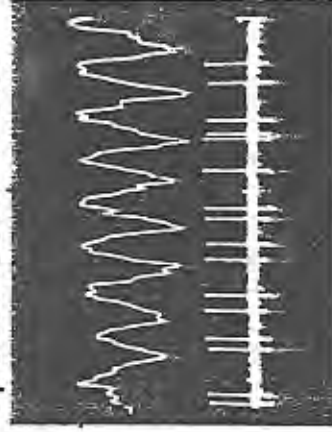
Los datos fueron analizados en la manera descrita anteriormente en esta tesis (Bland, Colom y Ford, 1990; Colom y Bland, 1987). La actividad de campo hipocámpica fue introducida en un analizador de señales de dos canales, para obtener espectros de frecuencia con la amplitud expresada en decibeles (dB).

Resultados

MS/vDBB Intact
Spontaneous LIA



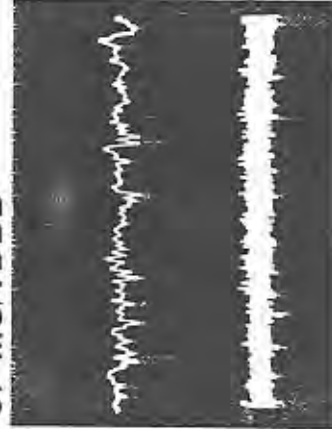
MS/vDBB Intact
Spontaneous Theta



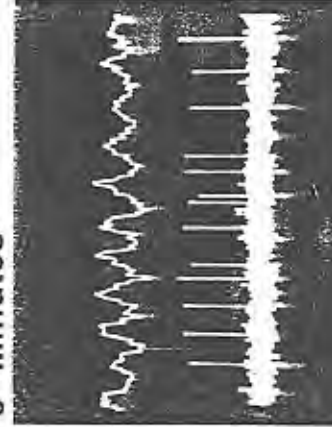
MS/vDBB Intact
Carbachol Theta



Procaine Suppression
of MS/vDBB



MS/vDBB Recovering
5 Minutes



MS/vDBB Recovering
10 Minutes



0.5 mV

0.5 mV

0.2 sec

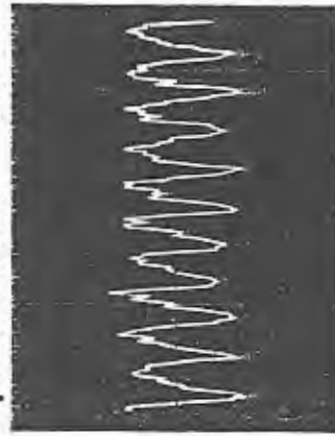
Figura 2. Registros analógicos simultáneos de la actividad de campo de la capa molecular del dentado (trazo superior) y una célula theta-activada fásica de CA1 (trazo inferior) durante las condiciones pre- y post-procaína.

La histología reveló en cada una de las 58 ratas usadas, que el electrodo de referencia, usado para monitorizar la actividad de campo hipocámpica, estaba precisamente posicionado en el *stratum moleculare* del *gyrus dentatus*. Un total de 18 neuronas fásicas theta activadas fueron registradas, 10 después de la infusión de carbacol y 8 después de la infusión de carbacol y bicuculina. Trece de las neuronas fueron localizadas en la capa piramidal de la región CA1 y 5 en la capa granulosa del dentado, de acuerdo a la relación de fase entre los trenes rítmicos de potenciales de acción de estas neuronas y la actividad local de campo hipocámpica. La localización de 8 de las 18 neuronas theta activadas fue también determinada mediante la localización de marcas de pontamina azul cielo en la histología, 5 de estas marcas se encontraron en la capa piramidal de la región CA1 y 3 en la capa superior de células granulosas del dentado.

Intentos de generar actividad de campo theta con microinfusiones de carbacol durante la supresión con procaína del SM-rvBDB.

En un animal ligeramente anestesiado con el SM-rvBDB intacto la actividad de campo registrada desde el *stratum moleculare* del *gyrus dentatus*, osciló entre periodos de ritmo theta y actividad irregular. Microinfusiones de carbacol en la región del *stratum moleculare* del *gyrus dentatus* (aún en animales profundamente anestesiados) resultó en continuos trenes de theta, con una frecuencia dosis dependiente que osciló entre 4.5 y 8 Hz. Ejemplos de actividad theta espontánea e inducida por carbacol son mostrados en la figura 2. Microinfusiones de carbacol en la región del *stratum moleculare* del *gyrus dentatus* resultaron en continuos trenes de actividad de campo theta acompañada de descargas rítmicas neuronales que duraron más de 1 hora. La microinfusión de procaína en el SM-rvBDB durante la actividad de campo y descargas celulares rítmicas a la frecuencia theta producidas por carbacol, resultó en la completa supresión de la actividad de campo theta y en una casi completa supresión de las descargas celulares registradas (primer panel, segunda fila, figura 2). A los 5 minutos de la infusión de procaína empezaron a

MS/vDBB Intact
Spontaneous Theta

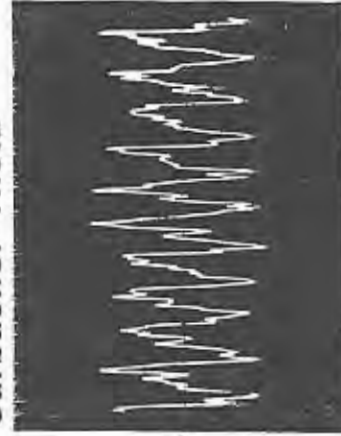


Dentate
Molecular Layer

Procaine Suppression
of MS/vDBB
Bicuculline

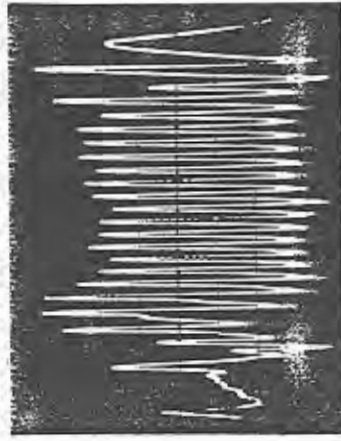


MS/vDBB Intact
Carbachol Theta



Dentate
Molecular Layer

Procaine Suppression
of MS/vDBB
Carbachol + Bicuculline



10.5 mV

0.2 sec

A

Ep. between 16/9

Figura 3. Los efectos de microinfusiones intrahipocámpicas de bicuculina solamente (panel superior derecho) y de carbachol más bicuculina (panel inferior derecho) durante la supresión con procaína del SM-BDB. Los paneles superiores muestran el ritmo theta espontáneo (panel superior izquierdo), la supresión del SM-BDB (panel superior medio) y la adición de bicuculina (panel superior derecho). Los paneles inferiores muestran el ritmo theta espontáneo (panel inferior izquierdo), la supresión del SM-BDB (panel inferior medio) y la adición de carbachol y bicuculina (panel inferior derecho).

registrarse simultáneamente actividad de campo theta de baja amplitud y algunas descargas aisladas de la neurona en relación con cada onda theta. A los 10 minutos de la infusión de procaína, la amplitud del ritmo theta se incrementó así como el número de descargas por cada onda theta de la neurona registrada simultáneamente. Un total de 10 neuronas fásicas theta activadas fueron registradas durante la condición pre-droga y después de la aplicación de carbachol. La descarga media durante el ritmo theta espontáneo fue de 6.93 ± 0.83 Hz (rango 1.68-11.0) y durante la actividad espontánea irregular fue de 2.39 ± 0.52 Hz (rango 0.0-6.45). La descarga media resultante de la microinfusión de carbachol fue de 15.94 ± 1.14 Hz (rango 7.40-32.40). En 7 neuronas que sobrevivieron a la condición carbachol, la microinfusión de procaína en el SM-rvBDB durante el ritmo theta generado por la infusión de carbachol, resultó en una frecuencia media de descarga de 1.09 ± 0.72 Hz (rango 0.0-3.30). Todas las 5 neuronas que sobrevivieron hasta que el SM-rvBDB se recuperó de la procaína, retornaron a las frecuencias de descarga pre-infusión para el ritmo theta a los 30-60 minutos después de la infusión de la droga (frecuencia media de descarga 6.62 ± 1.39 Hz).

Un número de manipulaciones experimentales fueron llevadas a cabo en un intento de generar actividad de campo theta con microinfusiones de carbachol, durante el bloqueo reversible del SM-rvBDB con procaína. La cánula con la que se infundió carbachol se colocó lo más cerca posible del sitio de registro en el hipocampo y en distintas posiciones con respecto a la estructura laminar del hipocampo. En adición, grandes cantidades de carbachol (30-50 μ g) fueron infundidas en uno o múltiples sitios de uno o ambos hipocampos. Ninguna de estas maniobras pudo generar actividad de campo theta o actividad rítmica en las neuronas registradas durante la supresión del SM-rvBDB con

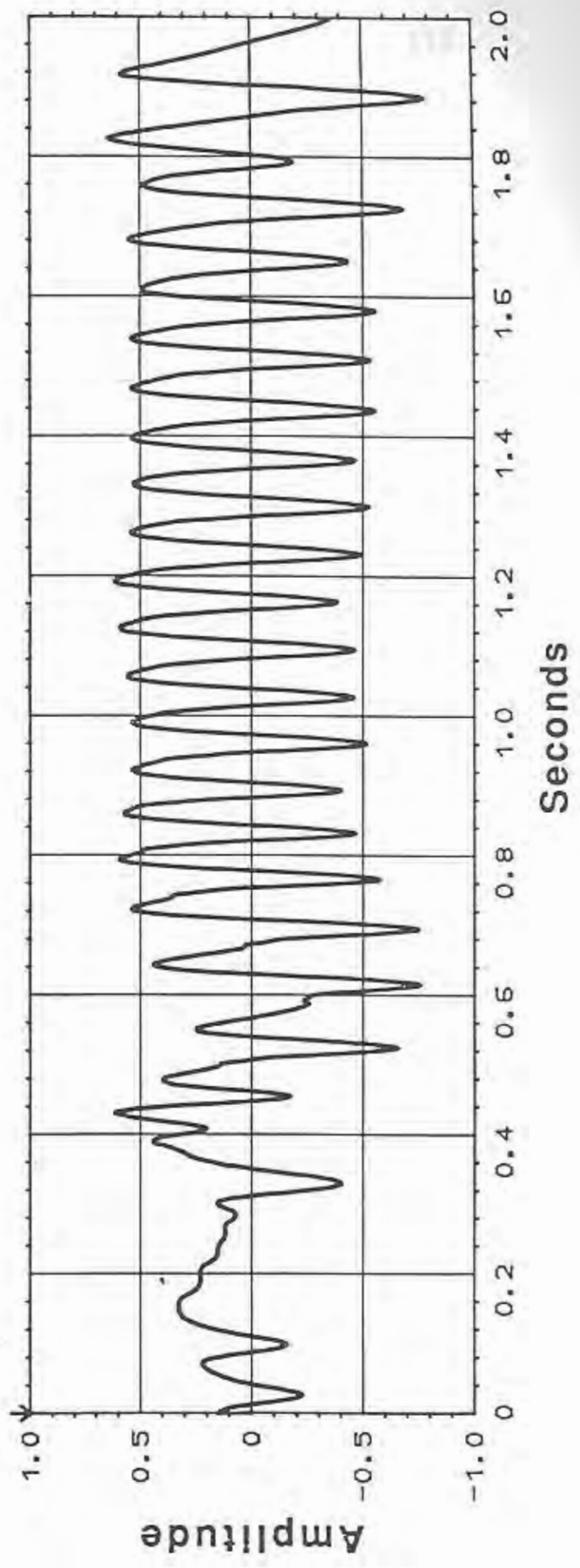
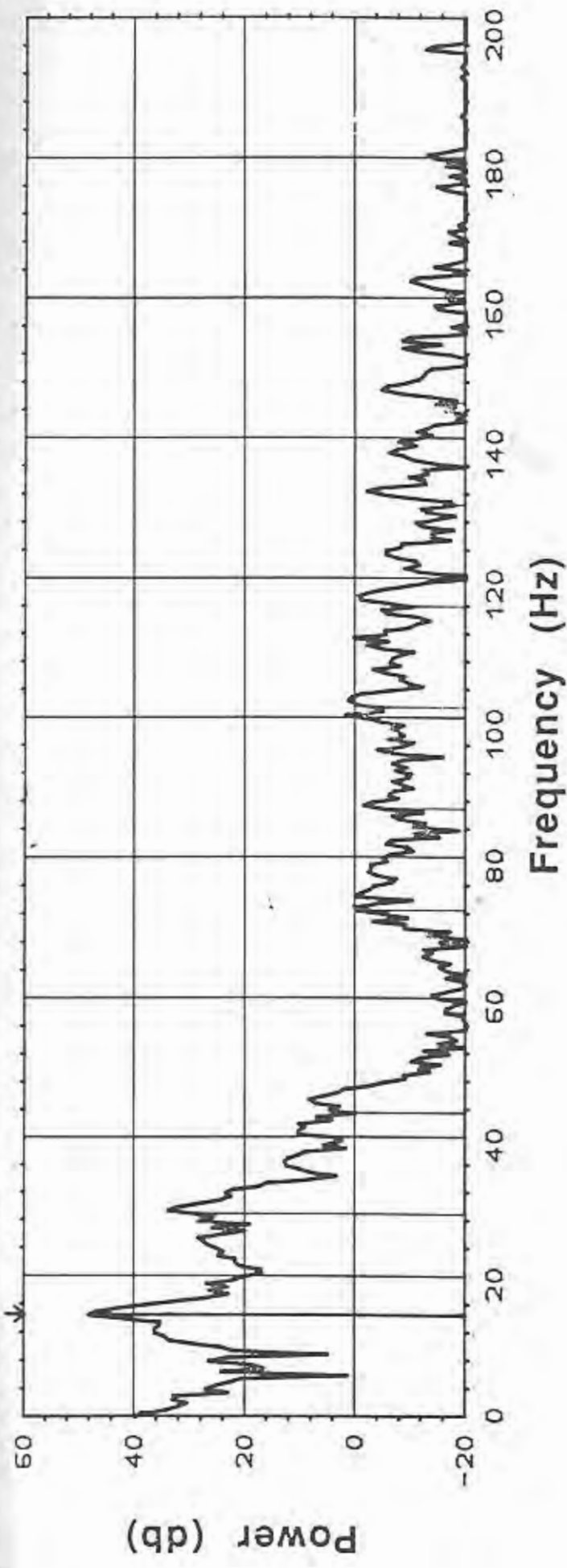


Figura 4. Análisis de espectro de frecuencias (panel superior) y un típico tren de oscilaciones theta símil (panel inferior).

procaína. Considerando que el hipocampo septalmente deaferentado *in vivo* tiene los mecanismos inhibitorios intactos en contraposición a la preparación *in vitro* donde están claramente disminuidos, una serie de experimentos fueron llevados a cabo bloqueando los receptores GABA_A con bicuculina.

Intentos de generar actividad de campo theta con infusiones de carbachol y bicuculina, durante la supresión con procaína del SM-rvBDB.

Algunos experimentos fueron llevados a cabo para determinar los efectos en el hipocampo de infusiones de bicuculina solamente, durante la supresión con procaína del SM-rvBDB. El panel superior derecho de la figura 3 ilustra la típica actividad epileptiforme en respuesta a la infusión de bicuculina. El patrón usual consistió en períodos donde la actividad de campo estuvo deprimida alternando con una serie de espigas epileptiformes. La siguiente serie de experimentos consistió de microinfusiones de bicuculina en el mismo sitio donde se había previamente infundido carbachol. Los resultados de este procedimiento se muestran en el panel inferior derecho de la figura 3. El patrón típico consistió en trenes de oscilaciones sincrónicas de 1 a 5 segundos en duración, alternando con actividad de campo claramente disminuida. Las oscilaciones tuvieron de 3 a 6 mV de amplitud y frecuencias que oscilaron entre 8 y 15 Hz. El comienzo de los trenes de oscilaciones fue a veces pero no siempre señalado por una breve descarga de tipo epileptiforme (100 a 200 ms de duración). La mayoría de estas oscilaciones fueron de forma casi sinusoidal pero en algunos experimentos una onda aguda apareció superpuesta a las típicas ondas sinusoidales. La mayoría de los trenes fueron estacionarios (por ejemplo: la frecuencia de las oscilaciones no varió sobre la duración del tren), pero en algunos experimentos las oscilaciones empezaron con una frecuencia alta y declinaron a una frecuencia más baja en aproximadamente 1 segundo. Un análisis de potencia de frecuencias de un tren de oscilaciones es mostrado en la figura 4. El panel inferior muestra el registro analógico del tren, en este caso durando 1.4 segundos. El panel superior muestra el análisis de potencia de frecuencias del tren. La potencia del primer pico (marcado por una pequeña flecha y un cursor) fue de 48.1 dB, con una frecuencia de 14.5 Hz. Una segunda

armónica puede ser claramente visualizada, ligeramente por encima de los 28 Hz.

Debido a la gran amplitud de las oscilaciones fue necesario llevar a cabo una serie de perfiles de profundidad para determinar su sitio de origen. Como se muestra en la figura 5, se hizo avanzar un electrodo en movimiento desde la superficie cortical, pasando a través del hipocampo hasta llegar al tálamo. Cada 100 μm se registró un tren de oscilaciones, que se comparó con el registro simultáneo de un electrodo de referencia fijo localizado en el *stratum moleculare* del dentado. La figura 5 ilustra los perfiles resultantes de 3 experimentos, todos los cuales mostraron una inversión de fase en el *stratum radiatum*. Estos perfiles de profundidad fueron muy similares a los de la actividad de campo theta registrada en animales en las mismas condiciones de anestesia. La administración intravenosa de sulfato de atropina (5 mg/kg) bloqueó las oscilaciones theta similares en estos 3 experimentos. La actividad de campo remanente, después de la administración de sulfato de atropina, consistió de espigas y ondas en un patrón que se pareció al producido por la inyección de bicuculina solamente.

Correlación de las descargas de las neuronas theta activadas con las oscilaciones sincrónicas producidas por carbacol y bicuculina.

El efecto de la infusión de procaína en el SM-rvBDB sobre las propiedades de descarga de las neuronas theta activadas fue previamente discutido (figura 2). La depresión de las descargas de las neuronas theta activadas se correlacionó con la abolición de la actividad de campo theta. La recuperación de las descargas de las neuronas theta activadas también fue paralela a la recuperación de la actividad de campo theta. Fue por lo tanto de interés determinar si las descargas de las neuronas theta activadas se correlacionaban con los trenes de oscilaciones sincrónicas producidos durante la supresión procaínica del SM-rvBDB por carbacol y bicuculina. Un total de 8 neuronas theta activadas fueron registradas bajo estas condiciones (4 en CA1 y 4 en el dentado). La microinfusión de procaína en el SM-rvBDB resultó en una reducción casi total de descarga de las 8 neuronas. Con la adición de bicuculina y carbacol, las neuronas raramente descargaron durante los episodios de actividad de campo deprimida que alternaron con los trenes de oscilaciones. Sin embargo, al comienzo de los trenes las neuronas descargaron en salvas de 100 a 200 mseg. de duración, correlacionadas con la actividad de campo

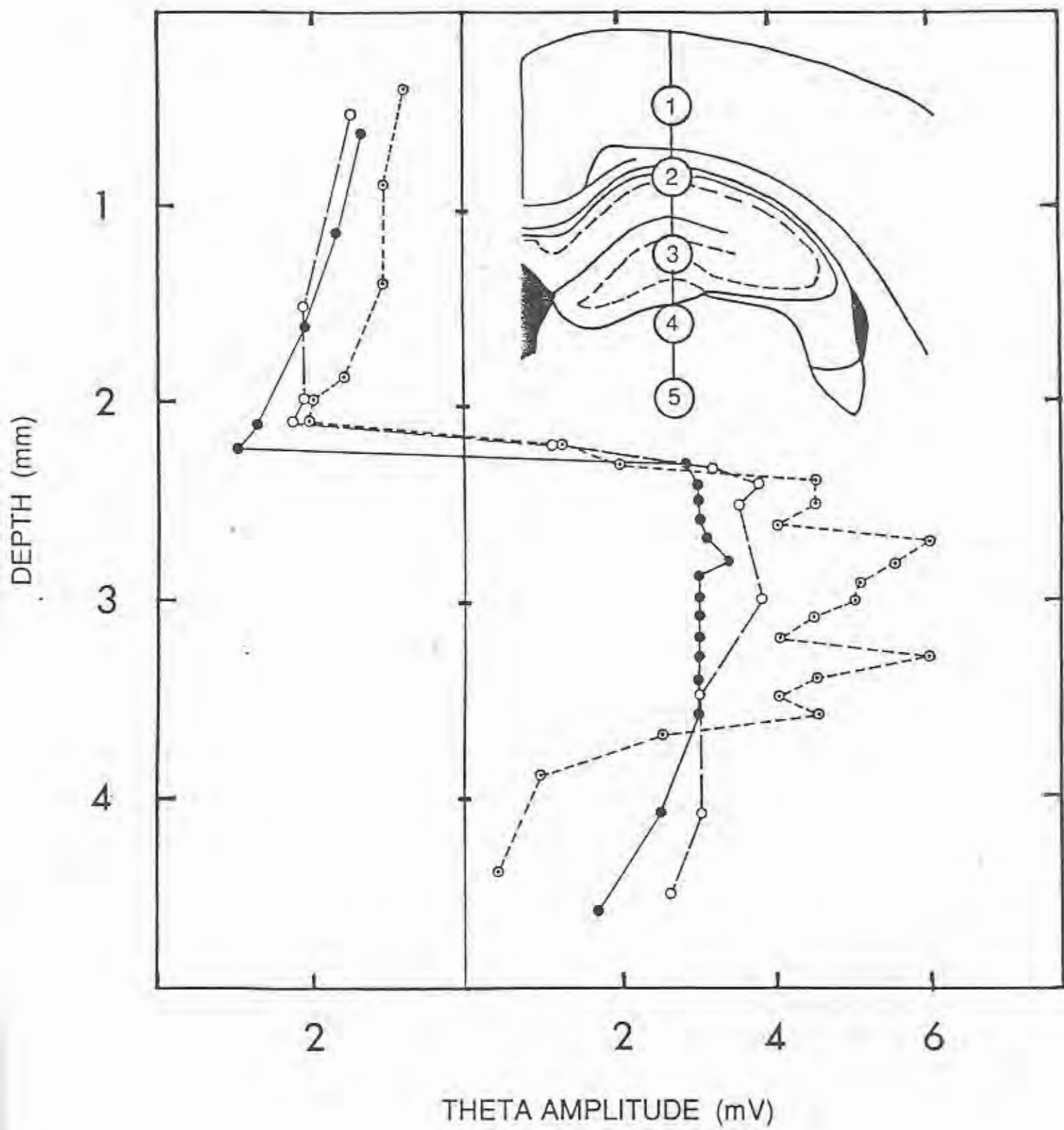


Figura 5. Perfiles de profundidad de oscilaciones theta similares de tres experimentos separados. Nótese un máximo de amplitud en el *stratum oriens*, una rápida inversión de fase en el *stratum radiatum* y un segundo máximo encima del *stratum granulosum*.

epileptiforme similar que señalaba el comienzo del tren. Durante el tren las neuronas descargaron en salvas de potenciales de acción que se correlacionaron a cada onda de las oscilaciones de campo (figura 6).

Discusión

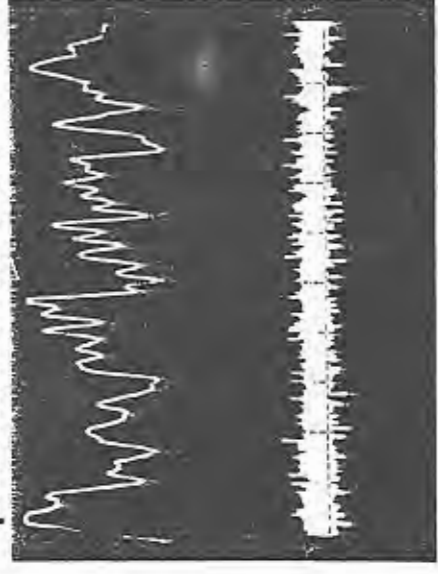
Trabajos previos demostraron que la perfusión de rebanadas transversales de hipocampo con carbacol producía oscilaciones de campo rítmicas, con una frecuencia que se sobreponía a la frecuencia theta. Similarmente, el hipocampo del animal intacto anestesiado con uretano podía producir ritmo theta cuando carbacol era infundido dentro del hipocampo (Rowntree y Bland, 1986). A pesar de estos experimentos, hasta ahora no había sido posible producir oscilaciones rítmicas cuando la región septal era bloqueada mediante diversas maniobras experimentales. El presente trabajo demuestra que una combinación de carbacol y bicuculina puede producir actividad de campo theta similar en un hipocampo septalmente deaferentado.

Los resultados presentados aquí pueden ser relacionados empíricamente y teóricamente a la observación de actividad theta similar en la rebanada de hipocampo perfundida con carbacol. La actividad oscilatoria en ambos casos fue muy similar. Las características compartidas incluyen la frecuencia (8-15 Hz *in vivo* versus 5-12 Hz *in vitro*) y duración (1-5 segundos *in vivo* versus 1-10 segundos *in vitro*). Más aún, ambas preparaciones compartieron ciertas características farmacológicas, ya que en ambos casos las oscilaciones fueron bloqueadas por la administración de sulfato de atropina. Anfortunadamente, una comparación directa de amplitudes es difícil de hacer debido a la distinta naturaleza de ambas preparaciones. En la preparación usada en este trabajo, el electrodo de registro fue colocado en el medio de tejido nervioso intacto, orientado perpendicularmente a las capas neuronales. En la rebanada de hipocampo, el electrodo fue colocado cerca de la superficie y con una orientación paralela a las láminas neuronales. A pesar de ello, amplitudes mayores de 500 μ V fueron registradas en ambos casos, sugiriendo que grandes

MS/vDBB Intact
Spontaneous Theta

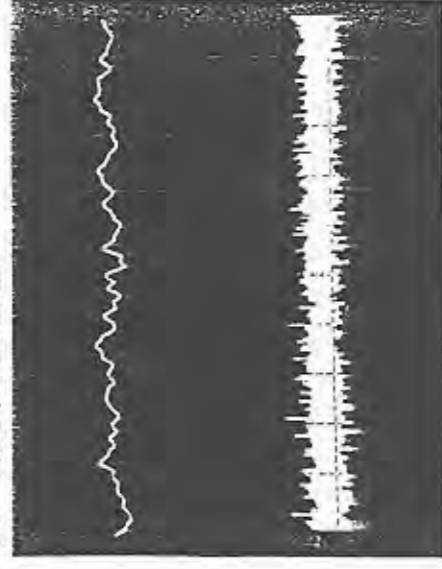


MS/vDBB Intact
Spontaneous LIA

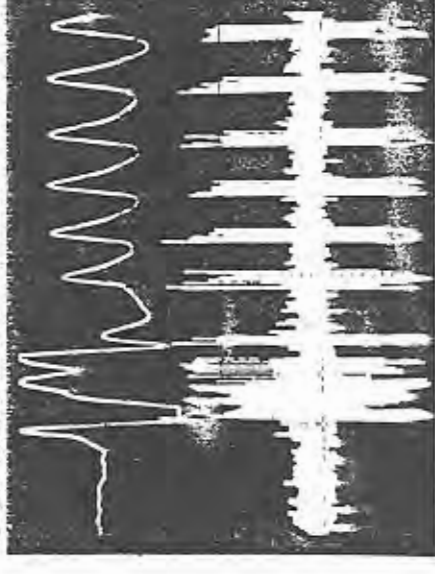


Dentate
Molecular Layer
CA1 Layer
Theta-on Cell

Procaine Suppression
of MS/vDBB



Procaine Suppression
of MS/vDBB
Carbachol + Bicuculline



2.0 mV

0.5 mV

0.2 sec

Figura 6. Efectos de infusiones de carbacol y bicuculina sobre la actividad de campo y una célula theta activada. Se muestran, durante las condiciones pre- y postprocaína, registros analógicos de la actividad de campo hipocámpica registrada desde la capa molecular del dentado (trazo superior) y una célula theta activada fásica de la región CA1 (trazo inferior).

poblaciones neuronales se hallaban disparando sincrónicamente. En adición la marcada reducción de amplitud de la actividad de campo desincronizada que ocurrió entre trenes de oscilaciones, provee aún más evidencia para un mecanismo común en ambas preparaciones. Esta falta de actividad irregular de gran amplitud entre los trenes de actividad rítmica, sugiere que la entrada septal también es necesaria para la generación de la actividad hipocámpica no oscilatoria.

Un posible mecanismo para la expresión de actividad oscilatoria en ambas preparaciones es un grado disminuido de actividad inhibitoria GABAérgica. La organización de la corteza hipocámpica es tal que posee una inusualmente poderosa inhibición recurrente y hacia adelante (Ashwood, Lancaster y Wheal, 1984; Buzsaki, 1984; Kawaguchi y Hama, 1988; Lacaille, Muller, Kunkel y Schwartzkroin, 1987; Frotscher, 1989). Freund y Antal (1988) demostraron que las interneuronas hipocámpicas reciben la mayoría de los axones septales GABAérgicos. Smythe *et al.* (1991) demostraron que el balance hipocámpico de inhibición/excitación se interrumpía durante la deaferentación septal, ya que las neuronas hipocámpicas theta inactivadas (putativas interneuronas GABAérgicas) se disinhibían. Similares efectos sobre neuronas theta inactivadas, siguiendo a la inactivación irreversible del área septal, fueron reportados en animales moviéndose libremente por Mizumori, Barnes y McNaughton (1990). La inactivación septal en cerebros de otra manera intactos puede crear entonces un hipocampo "superinhibido". En la rebanada de hipocampo, la ausencia de la entrada septal no produce el mismo efecto porque muchos de los árboles dendríticos de las interneuronas GABAérgicas corren paralelos al eje mayor del hipocampo y por lo tanto son seccionados cuando se corta transversalmente. La rebanada transversa de hipocampo contiene pues una reducida población funcional de interneuronas inhibitorias. Esta diferencia en la potencia de los procesos inhibitorios, podría explicar porque en la preparación *in vivo* septalmente deaferentada fue necesario agregar al carbacol

infusiones intrahipocámpicas de un antagonista GABAérgico para producir actividad oscilatoria. La actividad oscilatoria rítmica observada en este estudio se parece al ritmo theta espontáneo en: 1) su frecuencia, 2) su perfil a través del hipocampo y 3) en la relación mantenida entre la actividad oscilatoria de campo y las descargas de neuronas rítmicas hipocámpicas. Las frecuencias theta, espontáneas o evocadas, van de 3 a 12 Hz. El rango de frecuencias observadas en este estudio fueron de 5 a 15 Hz. Existe pues, una clara superposición en las distribución de frecuencias. El perfil de profundidad de los trenes fue virtualmente idéntico al del ritmo theta. La inversión de fase ocurrió en el *stratum radiatum* con máximos en el *stratum oriens* y en el *stratum moleculare*. La única clara diferencia entre ambos procesos oscilatorios fue la amplitud. Las oscilaciones registradas en este estudio tuvieron hasta 3 veces la amplitud del ritmo theta. Esto sugiere que la población de neuronas rítmicas disparó más sincrónicamente o que más neuronas rítmicas se activaron por la disminución de la inhibición.

Las neuronas fásicas theta activadas que dispararon con una relación de fase fija con el ritmo theta evocado por las infusiones de carbacol, también mostraron una relación de fase fija cuando se empleó carbacol y bicuculina. Otros tipos de actividad transitoria theta similares, como el producido por nicotina, no mostraron este tipo de relación (Bland y Colom, 1988). Por lo tanto esa relación de fase fija puede ser tomada como evidencia de que el tipo de oscilaciones producido por carbacol y bicuculina es muy similar al del ritmo theta.

Evidencia adicional que apoya la naturaleza theta similar de estas oscilaciones, fue aportada cuando la combinación de drogas se inyectó en la preparación con el septum intacto. Como fue mencionado previamente, el ritmo theta y las oscilaciones theta similares fueron observados alternativamente. Esto significa que dichas oscilaciones fueron distintas al ritmo theta, aunque probablemente compartieron el mismo circuito neuronal con dicho ritmo. Este argumento no podría haberse planteado, si las oscilaciones se hubieran observado superpuestas a la actividad normal de campo hipocámpica.

En resumen el hipocampo demostró la capacidad de oscilar en el rango de las frecuencias theta (durante la inactivación reversible del septum medial) siguiendo a microinfusiones intrahipocámpicas de carbacol y bicuculina. Estas oscilaciones no fueron iguales al ritmo theta espontáneo pero probablemente compartieron un mecanismo común de generación con dicho ritmo. Los trabajos

realizados previamente en la rebanada de hipocampo perfundida con carbacol y el discutido aquí, son interpretados como evidencias de que la formación hipocámpica tiene redes neuronales con capacidad de oscilar a la frecuencia theta. Bajo condiciones fisiológicas en el cerebro intacto, las aferencias septales dirigen la producción del ritmo theta y de la actividad irregular en el hipocampo. Más aún la naturaleza de esta entrada septal parece depender de un balance crítico entre circuitos colinérgicos y GABAérgicos.

Bibliografía

- Alonso, A., and C. Kohler (1984). A study of the reciprocal connections between the septum and the entorhinal area using anterograde and retrograde axonal transport methods in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 225:327-343.
- Amaral, D.G., and J. Kurz (1985). An analysis of the origins of the cholinergic and noncholinergic septal projections to the hippocampal formation of the rat. *J. Comp. Neurol.* 240:37-59.
- Amaral, D.G., and M.P. Witter (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience.* 31:571-591.
- Ashwood, T.J., B. Lancaster, and H.V. Wheal (1984). *In vivo* and *in vitro* studies on putative interneurons in the rat hippocampus: possible mediators of feed-forward inhibition. *Brain Res.* 293:279-291.
- Bagnoli, P., A. Beaudet, M. Stella, and M. Cuenod (1981). Selective retrograde labelling of cholinergic neurons with [3H] choline. *J. Neurosci.* 1:691-695.
- Baisden, R.H., M.L. Woodruff, and D.B. Hoover (1984). Cholinergic and non-cholinergic septo-hippocampal projections: a double label horseradish peroxidase- acetylcholinesterase study in the rabbit. *Brain Res.* 290:146-151.
- Bland, B.H. (1986). The physiology and pharmacology of hippocampal formation theta rhythms. *Prog. Neurobiol.* 26:1-54.
- Bland, B.H., and L.V. Colom (1988). Responses of phasic and tonic hippocampal theta-on cells to cholinergics: differential effects of muscarinic and nicotinic activation. *Brain Res.* 440:167-171.
- Bland, B.H., and L.V. Colom (1989). Preliminary observations on the physiology and pharmacology of hippocampal theta-off cells. *Brain Res.* 505:333-336.

- Bland, B.H., L.V. Colom, and R.D. Ford (1990). Responses of septal theta-on and theta-off cells to activation of the dorsomedial-posterior hypothalamic region. *Brain Res. Bull.* 24:71-79.
- Bland, B.H., L.V. Colom, J. Konopacki, and S.H. Roth (1988). Intracellular records of carbachol-induced theta rhythm in hippocampal slices. *Brain Res.* 447:364-368.
- Buzsaki, G. (1984). Feed-forward inhibition in the hippocampal formation. *Prog. Neurobiol.* 22:131-153.
- Colom, L.V., and B.H. Bland (1987). State-dependent spike train dynamics of hippocampal formation neurons: Evidence for theta-on and theta-off cells. *Brain Res.* 422:277-286.
- Colom, L.V., S. Nassif-Caudarella, and B.H. Bland (1990). Oscillatory properties of the hippocampal formation following reversible blockade of the medial septum. *Soc. Neurosci. Abstr.* 16:1097.
- Crutcher, K.A., R. Madison, and J.N. Davis (1981). A study of the rat septo-hippocampal pathway using anterograde transport of horseradish peroxidase. *Neuroscience.* 6:1961-1973.
- Dudek, F.E., R.W. Snow, and C.P. Taylor (1986). Role of electrical interactions in synchronization of epileptiform bursts. In Delgado-Escueta, A.V., A.A. Ward Jr., D.M. Woodbury, and R.J. Porter (ed.) V44, pp. 593-617, *Advances in Neurology*. Raven Press, New York.
- Fonnum, F. (1970). Topographical and subcellular localization of choline acetyltransferase in rat hippocampal region. *J. Neurochem.* 17:1029-1037.
- Freund, T.F., and M. Antal (1988). GABA-containing neurons in the septum control inhibitory interneurons in the hippocampus. *Nature.* 336:170-173.
- Frotscher, M. (1989). Mossy fibre synapses on glutamate decarboxylase-immunoreactive neurons: evidence for feed-forward inhibition in the CA3 region of the hippocampus. *Expl. Brain Res.* 75:441-445.
- Gulyas, A.I., T.J. Gorcs, and T.F. Freund (1990). Innervation of different peptide-containing neurons in the hippocampus by GABAergic septal afferents. *Neuroscience.* 37:31-44.
- Kawaguchi, Y., and K. Hama (1988). Physiological heterogeneity of nonpyramidal cells in rat hippocampal CA1 region. *Expl. Brain Res.* 72:494-502.
- Knowles, W.D., and P.A. Schwartzkroin (1981). Local circuit synaptic interactions in hippocampal brain slice. *J. Neurosci.* 1: 318-322.

- Kohler, C., V. Chan-Palay, and J.Y. Wu (1984). Septal neurons containing glutamic acid decarboxylase immunoreactivity project to the hippocampal region in the rat brain. *Anat. Embryol.* 169:41-44.
- Konopacki, J., B.H. Bland, M.B. MacIver, and S.H. Roth (1987). Cholinergic theta rhythm in transected hippocampal slices: Independent CA1 and dentate generators. *Brain Res.* 436:217-222.
- Konopacki, J., B.H. Bland, and S.H. Roth (1987). Phase shifting of CA1 and dentate EEG theta in hippocampal formation slices. *Brain Res.* 417:399-402.
- Konopacki, J., B.H. Bland, and S.H. Roth (1988). Carbacol-induced EEG theta in hippocampal formation slices: Evidence for a third generator of theta in CA3c area. *Brain Res.* 451:33-42.
- Konopacki, J., B.H. Bland, and S.H. Roth (1988). Evidence that activation of *in vitro* hippocampal theta rhythm involves only muscarinic receptors. *Brain Res.* 455:110-114.
- Konopacki, J., B.H. Bland, and S.H. Roth (1988). The development of carbacol-induced EEG theta examined in hippocampal formation slices. *Developmental Brain Res.* 38:229-232.
- Konopacki, J., M.B. MacIver, B.H. Bland, and S.H. Roth (1987). Theta in hippocampal slices: Relation to synaptic responses of dentate neurons. *Brain Res. Bull.* 18:25-27.
- Konopacki, J., M.B. MacIver, S.H. Roth, and B.H. Bland (1987). Carbacol-induced EEG theta activity in hippocampal brain slices. *Brain Res.* 405:196-198.
- Lacaille, J.-C., A.L. Mueller, D.D. Kunkel, and P.A. Schwartzkroin (1987). Local circuit interactions between oriens/alveus interneurons and CA1 pyramidal cells in hippocampal slices: electrophysiology and morphology. *J. Neurosci.* 7:1979-1993.
- Lewis, P.R., and C.C.D. Shute (1967). The cholinergic limbic system; projections to hippocampal formation, medial cortex, nuclei of the ascending reticular system and the subfornical organ supraoptic crest. *Brain Res.* 90:521-540.
- Lewis, P.R., C.C.D. Shute, and A. Silver (1967). Confirmation from choline acetylase analyses of a massive cholinergic innervation to the rat hippocampus. *J. Physiol. Lond.* 191:215-224.

- Lopes Da Silva, F.H., M.P. Witter, P.H. Boeijinga, and A.H.M. Lohman (1990). Anatomic organization and physiology of the limbic cortex. *Physiol. Rev.* 70:453-511.
- Mellgren, S.I. and B. Szrebro (1973). Changes in acetylcholinesterase and distribution of degenerating fibres in the hippocampal region after septal lesions in the rat. *Brain Res.* 52:19-36.
- Mizumori, S.J.Y., C.A. Barnes, and B.L. McNaughton (1990). Behavioral correlates of theta-on and theta-off cells recorded from hippocampal formation of mature young and aged rats. *Exp. Brain Res.* 80:365-373.
- Nyakas, C., P.G.M. Luiten, D.D. Spencer, and J. Traber (1987). Detailed projections of septal and diagonal band efferents to the hippocampus in the rat with emphasis on innervation of CA1 and dentate gyrus. *Brain Res. Bull.* 18:533-545.
- Panula, P., A.V. Revuelta, D.L. Cheney, J.-V. Wu, and E. Costa (1984). An immunohistochemical study on the location of GABA-ergic neurons in the septum. *J. Comp. Neurol.* 222:69-80.
- Rowntree, C.I. and Bland, B.H. (1986). An analysis of cholinceptive neurons in the hippocampal formation by direct microinfusion. *Brain Res.* 362:98-113.
- Rye, D.B., B.H. Wainer, M.M. Mesulam, E.J. Mufson, and C.B. Saper (1984). Cortical projections arising from the basal forebrain: a study of cholinergic and non- cholinergic components employing combined retrograde tracing and immunohistochemical localization of choline acetyltransferase. *Neuroscience.* 13:627-643.
- Shute, C.C.D., and P.R. Lewis (1963). Cholinesterase-containing systems of the brain of the rat. *Nature.* 199:1160-1164.
- Shute, C.C.D., and P.R. Lewis (1967). The ascending cholinergic reticular system: neocortical, olfactory and subcortical projections. *Brain Res.* 90:497-520.
- Smythe, J.W., B.R. Christie, L.V. Colom, V.H. Lawson, and B.H. Bland (1991). Hippocampal theta field activity and theta-on/theta-off cell discharges are controlled by an ascending hypothalamo-septal pathway. *J. Neurosci.* 11: 2241-2248.
- Steriade, M., P. Gloor, P.R. Llinás, F.H. Lopes da Silva, and M.M. Mesulam (1990). Basic mechanisms of cerebral rhythmic activities. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.* 76:481-508.

- Stewart, M. and S.E. Fox (1990). Do septal neurons pace the hippocampal theta rhythm? *Trends in Neurosci.* 13:163-168.
- Storm-Mathisen, J. (1978). Localization of putative transmitters in the hippocampal formation. In K. Elliot and J. Whelan (ed.) V58, pp 199-221, *Functions of the septohippocampal system*, Elsevier, Amsterdam.
- Wainer, B.H., A.I. Levey, D.B. Rye, M.M. Mesulam, and E.J. Mufson (1985). Cholinergic and non-cholinergic septohippocampal pathways. *Neurosci. Lett.* 54:45-52.
- Woolf, N.J., F. Eckenstein, and L. Butcher (1984). Cholinergic systems in the rat brain. 1. Projections to the limbic telencephalon. *Brain Res. Bull.* 13:751-784.

IMPORTANCIA DE LOS NÚCLEOS HIPOTALÁMICOS POSTERIORES Y SUPRAMAMILARES EN LA GENERACIÓN DEL RITMO THETA HIPOCÁMPICO

Resumen

Los experimentos con PHA-L y HRP demostraron que: 1) el área del HP-SUM manda un importante contingente de fibras al SM-rvBDB y fibras que establecen sinapsis directamente con el *gyrus dentatus* de la formación hipocámpica y 2) recibe y manda fibras a áreas del tronco encefálico que pueden afectar la sincronía de la actividad de campo hipocámpica (raphe medial, sustancia gris periacueductal).

Neuronas del SM-rvBDB fueron registradas y agrupadas en pares. El bloqueo del HP hizo que desaparecieran las fuertes correlaciones que existían durante el ritmo theta y/o la actividad irregular hipocámpica en los pares neuronas registrados en el SM-rvBDB. También desapareció el comportamiento rítmico de neuronas que presentaron descargas rítmicas correlacionadas al ritmo theta y de neuronas que siempre descargaron rítmicamente a pesar de los cambios en la actividad de campo hipocámpica.

Estos experimentos establecen que el hipotálamo posterior, a través de conexiones sinápticas ascendentes y descendentes, se ubica estratégicamente en el trayecto de las vías sincronizantes y desincronizantes ascendentes del tronco encefálico. Estas conexiones le permiten jugar un rol crítico en la generación de ritmicidad por las neuronas septales y por el hipocampo. La necesidad del hipotálamo posterior para la generación de ritmo theta hipocámpico descarta al septum medial como estructura marcapo único en la generación de dicho ritmo.

Introducción general

Al final de este documento voy a citar 2 grupos de experimentos que apoyan directa o indirectamente la hipótesis de esta tesis: *la generación de ritmo theta por el hipocampo necesita de la co-activación de múltiples estructuras interrelacionadas, cada una con ciertas propiedades de ritmicidad y marcapaso y siendo la integridad del área (marcapaso) septal si bien necesaria, no por si sola condición suficiente para generar ritmo theta a nivel del hipocampo.*

Cuando en esta tesis se estudió la población de neuronas del septum medial, dicha población mostró un alto grado de sincronía. La función de correlación cruzada sugirió que dicha sincronía dependía de una entrada común a las neuronas registradas. Fue planteado entonces que las neuronas septales eran probablemente sincronizadas por un sistema ascendente originado en el tronco encefálico (Colom y Bland, 1991).

Trabajos previos (véase: Bland, 1985; Bland y Colom, 1992) sugerían que la región hipotalámica posterior podría jugar un rol crítico en la generación del ritmo theta hipocámpico. Bland (1971) halló que el área del cerebro que mostraba el umbral más bajo para la generación de ritmo theta hipocámpico (mediante estimulación eléctrica) se encontraba en el hipotálamo posterior (HP). Vertes (1988) estudiando los sistemas sincronizantes ascendentes encontró que los axones que se originaban en áreas que sincronizaban o desincronizaban los potenciales de campo hipocámpicos, como el núcleo *pontis oralis* (PO) y el *raphe medialis* (RM) respectivamente, establecían contactos sinápticos en el área del núcleo supramamilar (SUM). Las áreas ocupadas por los núcleos HP y SUM están muy próximas, no existiendo ningún grupo neuronal interpuesto entre ambos núcleos. Kirk y McNaughton (1991) demostraron la existencia de neuronas rítmicas en el SUM; las neuronas que estos autores registraron no sólo disparaban en fase con ritmo theta hipocámpico sino que además seguían disparando rítmicamente cuando el área del SM-rvBDB era anestesiada con procaina! En esta parte de la tesis trataré de demostrar que este complejo (PH-SUM) constituye un nodo crítico en las vías sincronizantes ascendentes, un área cuya integridad es necesaria para la generación del ritmo theta hipocámpico. Para probar la importancia de esta área fueron llevados a cabo 2 grupos distintos de experimentos. La exposición que sigue será entonces dividida en una primera parte donde se estudian las conexiones del área y una segunda donde se estudia el rol de este grupo de núcleos en la generación del ritmo theta hipocámpico.

Experimentos anatómicos

Introducción

Este grupo de experimentos fue llevado a cabo en el laboratorio de R.P. Vertes en el Center for Complex Systems de la Florida Atlantic University.

Los datos presentados anteriormente sugieren que el HP podría ejercer una influencia moduladora significativamente importante sobre la actividad

PHAL injection in the posterior hypothalamic nucleus demonstrates direct septal terminations

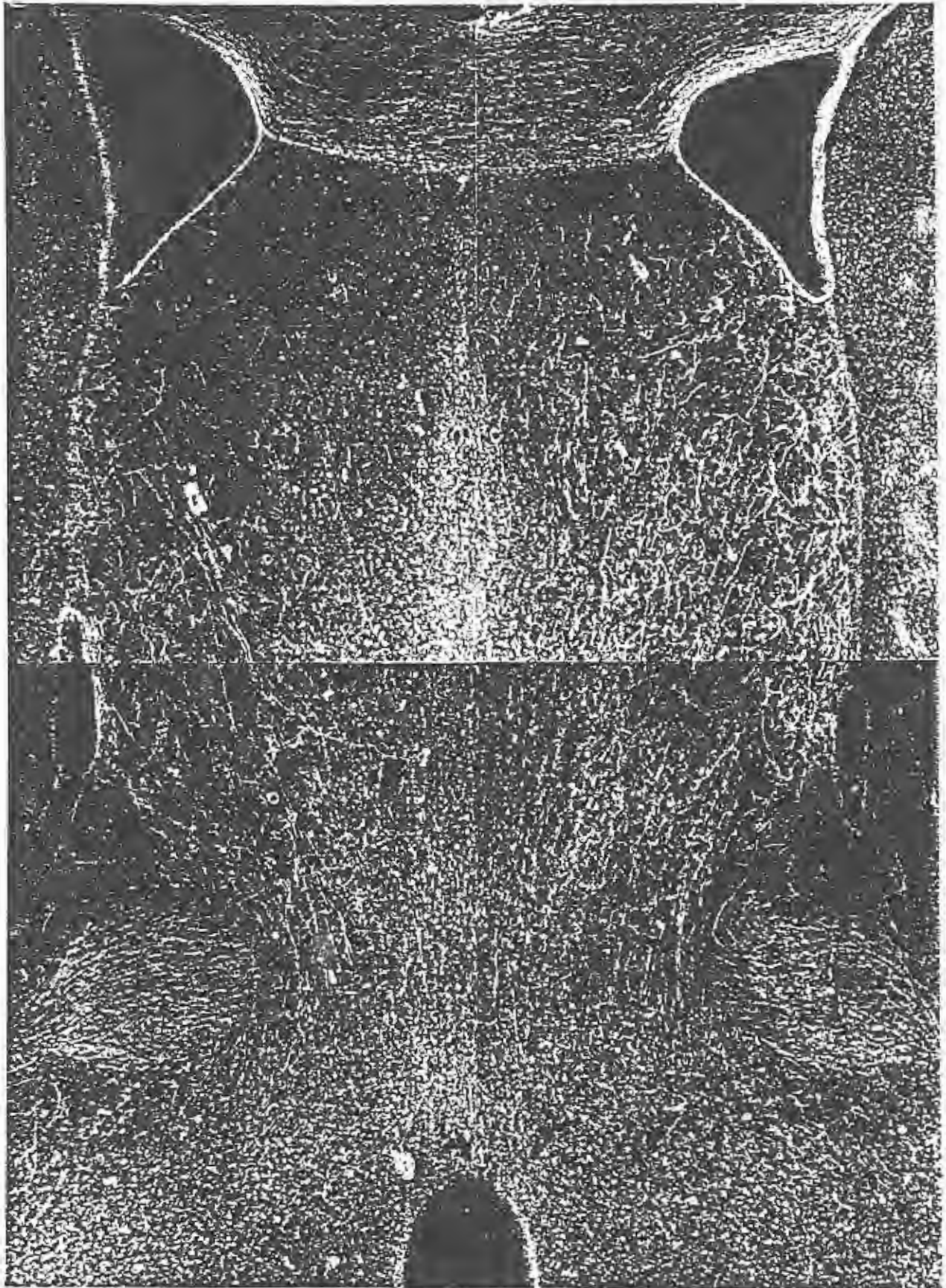


Figura 1. La inyección de PHA-L en el hipotálamo posterior demuestra terminaciones directas en los núcleos SM-BDB y SL.

septo-hipocámpica. La hipótesis formulada para la realización de estos experimentos fue: dada esta capacidad moduladora del HP, sus neuronas deberán proyectarse fuertemente a las áreas del SM-rvBDB y/o a la formación hipocámpica. El objetivo de este trabajo basado en el trazador anterógrado PHA-L fue entonces examinar las proyecciones del HP de la rata.

Métodos

Ratas Sprague-Dawley pesando 200-300 gramos fueron anestesiadas con uretano o pentobarbital. En todos los animales fueron colocados estereotáxicamente electrodos bipolares en ambos hipocampos para registrar la actividad de campo. En un primer grupo de experimentos (4 casos) en los que el anestésico usado fue uretano, 2 alambres de tungsteno (100 μm diámetro) cubiertos por una resina aislante salvo en la superficie de corte fueron pegados a ambos lados de una cánula (calibre 30 de diámetro), para ser usados como electrodo bipolar de estimulación. La cánula fue conectada, a través de un tubo de polietileno, a una bomba de microinyección Harvard. Los alambres fueron cuidadosamente alineados con el borde de la cánula y cortados bajo microscopio, creándose entonces un dispositivo que permitía la estimulación eléctrica o química de áreas claramente superpuestas. Este dispositivo fue colocado estereotáxicamente encima de los núcleos HP (línea media, 3.3 mm posterior a bregma) y descendido mientras se estimulaba el cerebro (100 μAmp , 0.1 ms de duración de los pulsos, 100 Hz de frecuencia de los pulsos y 5 s de duración del tren) hasta que el mejor sitio para la generación de ritmo theta hipocámpico fue encontrado. Cuando se llegó a la conclusión de que la punta del dispositivo estaba ubicada en el área con más bajo umbral para la generación de ritmo theta hipocámpico y que dicha área generaba las más altas frecuencias en el rango theta de todo el trayecto, comenzó la inyección del trazador anterógrado: biotinilated anti-*phaseolus vulgaris* agglutinin (PHA-L) (Vector laboratories, 2.5%, 50 μl solución). PHA-L se aplicó pasando a través del electrodo corriente positiva (5-10 μA , pulsos de 2 segundos, intervalos de 2 segundos, durante 30-40 minutos). Después que la histología confirmó en estos 4 casos que la punta del dispositivo usado estaba en el área de los núcleos HP,

Higher magnification of septal terminations

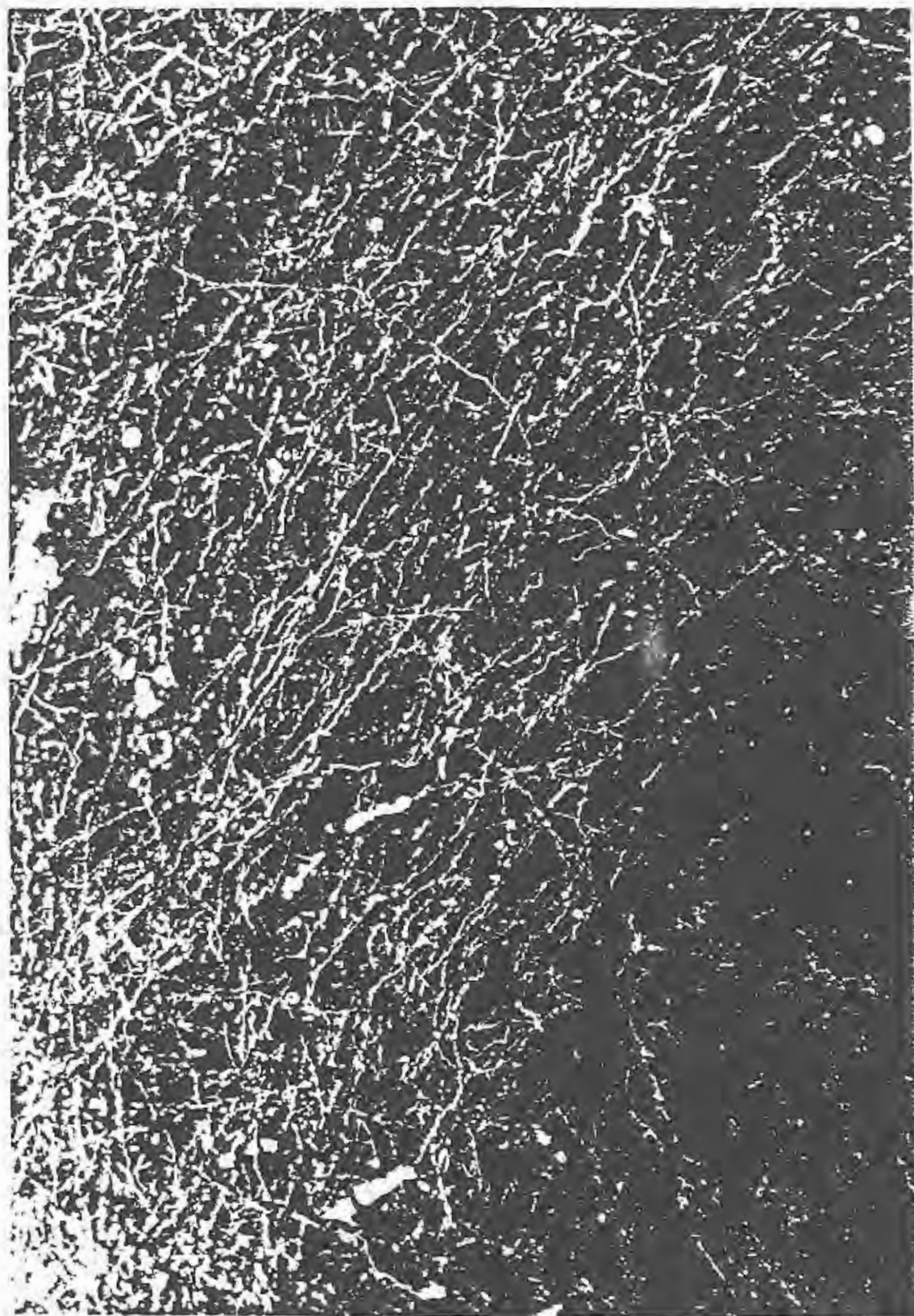


Figura 2. Terminaciones septales vistas con mayor magnificación.

se empezó un segundo grupo de experimentos. Diez y seis animales fueron anestesiados con pentobarbital y cánulas cargadas con PHA-L fueron colocadas estereotáxicamente directamente (sin control electrofisiológico) en el área del HP (línea media-0.5 mm lateral, 3.3 mm posterior y 9 mm en profundidad desde la superficie del cráneo). Entonces se procedió a la inyección de PHA-L de la manera mencionada anteriormente. En los dos grupos de experimentos, después de terminar las maniobras mencionadas, los electrodos, electrodos-cánulas y/o cánulas fueron cuidadosamente removidos del cerebro del animal, la piel suturada y antibióticos administrados por vía sistémica para la prevención de infecciones. Después de 7 días, tiempo considerado necesario y suficiente para que el transporte axoplásmico llevara el trazador hasta las terminales axónicas, se procedió con el resto del protocolo. Los animales fueron profundamente anestesiados con pentobarbital y perfundidos, a través de una cánula colocada en el ventrículo izquierdo, con una solución salina (pH 7.4). Se procedió a pasar la solución fijativa (paraformaldeído al 2.5% y glutaraldeído al 0.05%, en un buffer de fosfato a pH 7.6) cuando el líquido de perfusión, que salía del sistema circulatorio del animal a través de un orificio abierto en la aurícula derecha, empezó a salir claro. Por último se pasaron 150 ml de glucosa al 10%, se extrajo el cerebro, se lo colocó en una solución de glucosa al 30% y se lo dejó a 4^o centígrados durante la noche. Al siguiente día se procedió con un micrótopo a cortar el cerebro en rebanadas transversales de 50 μ m de espesor. Las rebanadas fueron incubadas primero en un diluyente (suero de conejo al 10% y Tritón-X100 al 1% en PBS) por 1 hora y luego en el antisuero primario dirigido contra PHA-L (anti-PHA-L de cabra, diluido 1:500, laboratorios Vector) por 12 a 24 horas. Al siguiente día las secciones fueron lavadas 5 veces cada 5 minutos en PBS y luego incubadas en el antisuero secundario (conejo anti-oveja IgG, dilución 1:500) por 2 horas. Las secciones se lavaron nuevamente 5 veces cada 5 minutos en PBS y se incubaron en una solución peroxidasa-antiperoxidasa (PAP, de origen de cabra, 1:250 dilución) por 2 horas. Se repitieron las 2 últimas incubaciones (IgG anti-oveja y PAP), reduciendo ambos tiempos de incubación a 1 hora. Se lavó nuevamente, se incubaron las secciones en 3-3 diaminobenzidina (DAB) por 10 minutos, en 3-3 diaminobenzidina (DAB) más H₂O₂ por 5 minutos y se procedió a la lavada

final. Se montaron las secciones en portaobjetos recubiertos con gelatina, se las dejó secar y se las cubrió con cubreobjetos. El tejido se examinó buscando células marcadas (en el hipotálamo posterior) y fibras y varicosidades (en todo el cerebro). Se usaron ópticas de campo brillante y campo oscuro.

Resultados

Todos los casos estudiados mostraron un grupo de neuronas marcadas en el área hipotalámica posterior alrededor del sitio de la inyección. La mayor parte de las fibras marcadas cursaron dorsalmente al sitio de la inyección. El principal resultado de estos experimentos, dado la hipótesis planteada, fue el hallazgo de densas proyecciones del hipotálamo posterior al área septal. Fibras marcadas se distribuyeron masivamente a través de la extensión rostro-caudal del septum. Se encontraron abundantes fibras marcadas en el septum medial, septum lateral y la rama vertical de la banda diagonal de Broca. Un intenso marcado de axones fue observado además en la formación reticular talámica (núcleos de la línea media e intralaminares) y en el tronco encefálico, principalmente en el área gris periacueductal mesencefálica y en los núcleos del rafe dorsal. Las figuras 1, 2 y 3 muestran ejemplos de axones marcados en las dos primeras regiones.

Discusión

Vertes (1992) en un grupo independiente de experimentos inyectó PHA-L en el núcleo SUM, encontrando un patrón similar de proyecciones, con una sola diferencia importante: neuronas del SUM proyectan directamente al *gyrus dentatus* de la formación hipocámpica, neuronas del HP no. A la clara proximidad anatómica de las áreas HP y SUM mencionada anteriormente se agrega ahora un patrón casi calcado de proyecciones hacia otras estructuras encefálicas, se consideró por lo tanto claramente justificado el agrupar a ambas áreas bajo el nombre de: complejo HP-SUM. Usando marcadores retrógrados como la peroxidasa de rabanita (HRP) Vertes (1992, Vertes y Colom, en preparación) demostraron que esta área recibe importante proyecciones de áreas del tronco encefálico envueltas en la sincronización y desincronización de la actividad de campo hipocámpica (por ejemplo: PO y RM, respectivamente). Estas proyecciones eferentes y aferentes ubican al área del PH-SUM en una posición crítica para controlar los sistemas ascendentes del tronco encefálico y por lo tanto modular la generación del ritmo theta.

**PHAL injection in the posterior hypothalamic
nucleus demonstrates direct thalamic reticular
terminations**

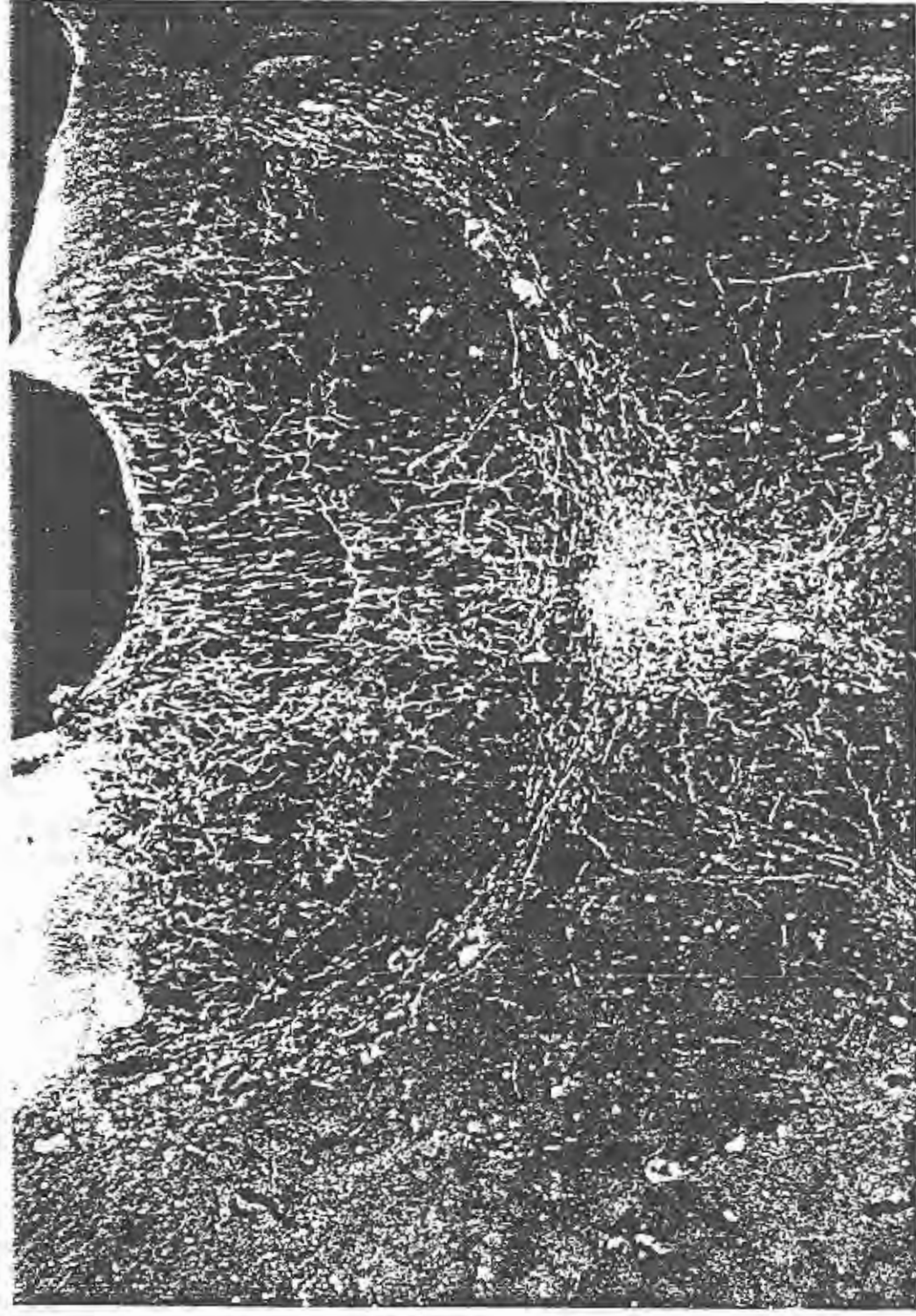


Figura 3. La inyección de PHA-L en el hipotálamo posterior demuestra terminaciones reticulares talámicas directas.

Experimentos electrofisiológicos

Introducción

Como se mencionó en la introducción general de este capítulo, las neuronas septales disparan sincrónicamente debido a la existencia de aferencias sincronizantes. Dichas aferencias podrían provenir desde el hipocampo vía el septum lateral o del tronco encefálico a través de una vía ascendente. La primera opción no parece muy probable dados que los datos recogidos por Vinogradova (1980) muestran que la desconexión septo-hipocámpica incrementa la proporción de neuronas rítmicas septales. Colom y Bland (1991) postularon que la sincronización de las células septales provendría de influencias sincronizantes ascendentes del tronco encefálico. El PH-SUM ocupa una posición nodal en las vías ascendentes. La hipótesis a probar con los experimentos descritos a continuación fue que las neuronas del SM-rvBDB son sincronizadas por vías ascendentes que pasan por la región del HP-SUM.

Métodos

Ratas encapuchadas (hooded rats) pesando 250-350 gramos fueron anestesiadas con uretano. El protocolo de esta anestesia fue descrito anteriormente en esta tesis. Electrodo monopolares fueron ubicados bilateralmente en el *stratum moleculare* del *gyrus dentatus* para registrar la actividad de campo hipocámpica. Un electrodo bipolar de estimulación fue bajado hacia el área del núcleo PO del tronco encefálico, estimulando eléctricamente durante el trayecto. El electrodo se dejó fijo en el sitio donde se obtuvo el umbral más bajo de estimulación y la frecuencia más alta del ritmo theta. Un dispositivo cánula-electrodo, como el descrito en la sesión anterior, fue usado para estimular eléctricamente e inyectar drogas en la misma área. Dicho dispositivo fue bajado al área del HP, usando procedimientos previamente descritos. La cánula fue cargada con procaína hidrociorada al 10%. La inyección de 1-2 μ l del anestésico local fue generalmente suficiente para bloquear completamente el ritmo theta hipocámpico inducido por estimulación

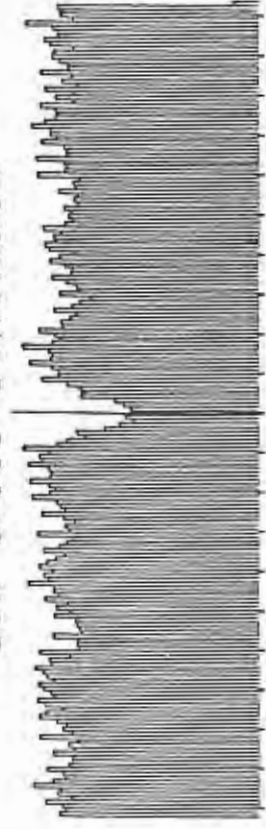
Dentate
Molecular Layer

Medial Septal
Cells

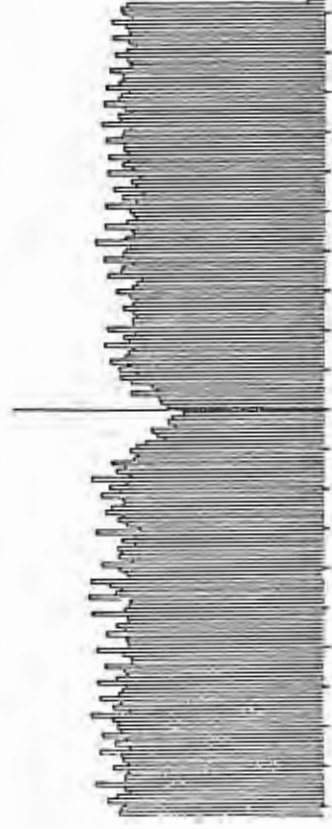
Spontaneous Theta - Posterior Hypothalamic Nuclei Intact



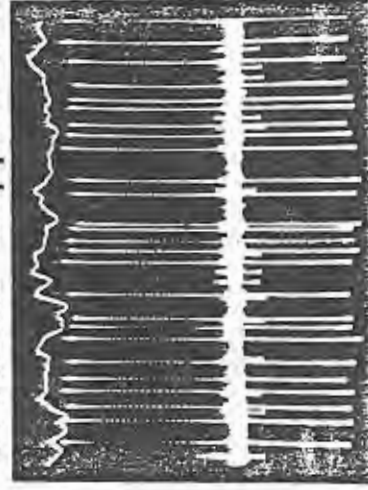
Cell Cross Correlation



Spontaneous LIA - Posterior Hypothalamic Nuclei Intact



Procaine Suppression of Posterior Hypothalamic Nuclei



.1 sec

-1 0 +1
Sec

Figura 4. Los paneles izquierdos muestran los registros analógicos de un par de neuronas rítmicas del SM-BDB y la actividad de campo registrada simultáneamente en el hipocampo durante el ritmo theta (panel superior izquierdo), la actividad irregular (panel medio izquierdo) y la supresión con procaína de los núcleos hipotalámicos posteriores. Los paneles derechos muestran las correlaciones entre ambas células en los tres estados. Nótese que ambas células estuvieron correlacionadas durante el ritmo theta (panel superior derecho) y la actividad irregular (panel medio derecho) y que dicha correlación desapareció con la supresión de los núcleos hipotalámicos posteriores (panel inferior derecho).

eléctrica del núcleo PO. La histología confirmó en todos los casos que la punta del dispositivo cánula-electrodo se hallaba en el área HP. En el tronco encefálico, la punta del electrodo de estimulación se encontró siempre ubicada en el área del PO. Microelectrodos de registro de vidrio (5-10 MegOhm), llenados con acetato de sodio 0.5 M y pontamina azul cielo al 2%, fueron usados para registrar la actividad neuronal y marcar el sitio de registro en el SM-rvBDB. Las coordenadas y procedimientos para alcanzar el SM-rvBDB fueron descritos anteriormente en esta tesis (Colom y Bland, 1991). Una vez que las coordenadas del SM-rvBDB fueron alcanzadas el electrodo continuó siendo descendido lentamente hasta que la primera neurona registrada apareció en la pantalla del osciloscopio y/o fue oída a través del monitor de audio. Se dejaron pasar 5 minutos para que el electrodo alcanzara mayor estabilidad con el tejido cerebral que lo rodeaba. Entonces el descenso continuó muy lentamente (en pasos de 0.2-1 μ m) hasta que los potenciales de acción de la primera neurona alcanzaran máxima amplitud o aparecieran descargas de una segunda neurona en la pantalla del osciloscopio y/o en el monitor de audio. Otros 5 minutos se dejaron pasar, nuevamente tratando de alcanzar la máxima estabilidad posible de registro. Entonces si los potenciales de acción de la segunda neurona tenían suficiente amplitud para ser claramente diferenciados del ruido de fondo y de los potenciales de acción de la primera neurona la sesión de registro comenzó, de lo contrario se continuó el descenso a la búsqueda de nuevas neuronas e intentando alcanzar nuevamente las condiciones descriptas. Al final de la sesión de registro 50 μ Amp de corriente

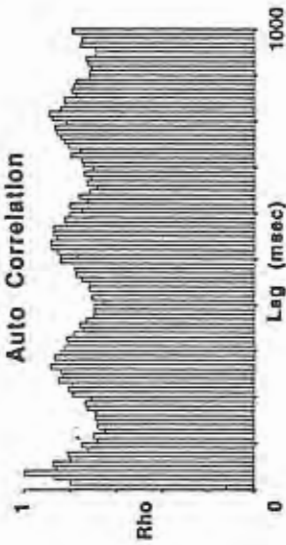
Spontaneous Theta



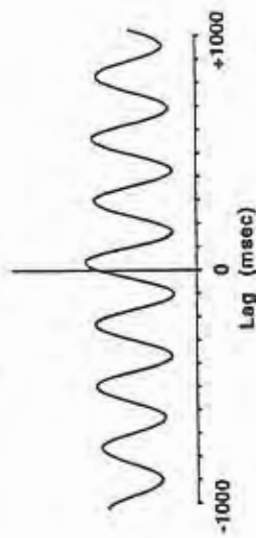
Dentate
Molecular Layer

Medial Septal
Cell

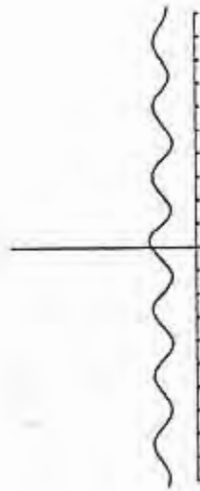
Auto Correlation



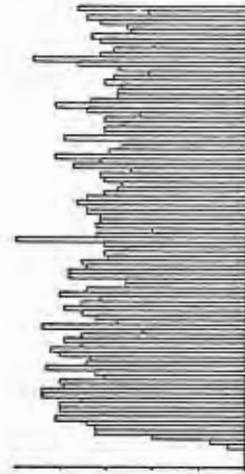
Cross Correlation



Spontaneous LIA



Procaine Suppression of Hypothalamus



.1 sec

Figura 5. Los paneles izquierdos muestran los registros analógicos de una neurona del SM-BDB y de la actividad de campo registrada simultáneamente en el hipocampo durante el ritmo theta (panel superior izquierdo), la actividad irregular (panel medio izquierdo) y la supresión con procaína de los núcleos hipotalámicos posteriores (panel inferior izquierdo). Nótese que la neurona mostró ritmicidad durante el ritmo theta y la actividad irregular hipocámpica, pero que la ritmicidad desapareció con la supresión procaínica de los núcleos hipotalámicos posteriores. Los paneles centrales muestran las autocorrelaciones de la célula durante ritmo theta (panel superior medio), la actividad irregular (panel central) y la supresión procaínica de los núcleos hipotalámicos posteriores. Los paneles derechos muestran las correlaciones de la célula en los tres estados.

fueron pasados a través del electrodo, 5 min en cada polaridad, para marcar el área con el colorante de pontamina.

Resultados

Veinte neuronas fueron registradas, 12 fueron agrupadas en pares. Las características de las neuronas registradas fueron similares a las descritas anteriormente. Marcas de azul de pontamina verificaron que las neuronas registradas se encontraron en el septum medial a menos de .5 mm de la línea media en 6 experimentos. Los efectos del bloqueo con procaína hidrociorada del HP estuvieron dados por la completa desaparición: 1) del ritmo theta hipocámpico, espontáneo o el producido por estimulación táctil de la cola del animal, 2) de las correlaciones en los pares neuronas del SM-rvBDB que presentaron correlaciones durante el ritmo theta y/o la actividad irregular hipocámpica (2 pares presentaron correlaciones durante ambos estados, 2 sólo durante el ritmo theta) (figura 4) y 3) de la descarga rítmica en las neuronas que presentaban descargas rítmicas en salvas con relación de fase fija al ritmo theta (14 neuronas) (figura 5), incluyendo neuronas que descargaron rítmicamente durante el ritmo theta y la actividad irregular hipocámpica (2 neuronas).

Discusión

Analizaré ahora brevemente el significado de estos dos hallazgos. La desaparición de la correlación cruzada entre las neuronas septales prueba que

una vía ascendente las sincroniza, como había sido postulado anteriormente en esta tesis. Esta entrada ascendente sincroniza a estas neuronas durante el ritmo theta y durante la actividad irregular hipocámpica. La existencia de un grupo de neuronas o axones en pasaje en el HP que mantienen el sincronismo de las neuronas septales queda también demostrada. Experimentos preliminares, en los que la inyección de carbachol en el HP generó ritmo theta hipocámpico, sugieren que algunas neuronas colinoceptivas estarían envueltas en este efecto (hasta el momento no han sido descritas neuronas colinérgicas en el área del HP). La desaparición de ritmicidad de las neuronas septales, especialmente la desaparición de ritmicidad en las neuronas septales que mantuvieron un patrón de descarga rítmico durante el ritmo theta y la actividad irregular hipocámpica, prueba que: *el septum medial no constituye un marcapaso aislado sino un eslabón en una cadena de estructuras marcapasos, cuya integridad es necesaria para la generación del ritmo theta hipocámpico.*

Bibliografía

- Bland, B.H. (1986) The physiology and pharmacology of the hippocampal formation theta rhythms. Prog. Neurobiol., 26, 1-54.
- Bland, B.H. and Colom, L.V. (1993) Extrinsic and intrinsic properties underlying oscillation and synchrony in limbic cortex. Prog. Neurobiol., in press.
- Colom, L.V. and Bland, B.H. (1991) Medial septal cell interactions in relation to hippocampal field activity and the effects of atropine. Hippocampus, 1, 15-30.
- Kirk, I.J. and McNaughton, N. (1991) Supramammillary cell firing and hippocampal rhythmical slow activity. Neuroreport, 2, 723-725.
- Vertes, R.P. (1988) Brainstem afferents to the basal forebrain of the rat. Neuroscience, 24, 907-935.
- Vertes, R.P. (1992) PHA-L Analysis of projections from the supramammillary nucleus in the rat. J. Comp. Neurol., 326, 595-622.
- Vinogradova, O. S., Brahnznik, E. S., Karanov, A. N. & Zhadina, S. D. (1980). Neuronal activity of the septum following various types of deafferentation. Brain Res., 187, 353-368.

CONCLUSIONES

Las áreas del tronco encefálico envueltas en la generación del ritmo theta hipocámpico han sido revisadas por Vertes (1992). El autor concluye que la actividad sincronizada (theta) es generada por el núcleo *pontis oralis* y que la actividad desincronizada es generada por el núcleo *median raphe*. Si bien el rol desincronizante de los sistemas serotoninérgicos que se originan en los núcleos del raphe ha sido puesto recientemente en duda por Vanderwolf y Baker (1986) (autores que atribuyen a estos núcleos una acción opuesta, considerándolos entonces como parte de los sistemas sincronizantes), el núcleo *pontis oralis* sigue presentándose como el principal candidato en la generación de sincronía por el tronco encefálico. Junto a este núcleo actuarían sinérgicamente grupos mesencéfalo-pontinos de neuronas colinérgicas (Vertes, Colom y Fortin, 1993). Vertes (1982) sugiere que estos sistemas sincronizantes ejercen sus influencias sobre la formación hipocámpica vía el hipotálamo posterior, específicamente a través del SUM. La necesidad de una estación de relevo se sustenta en la rareza de las proyecciones del tronco encefálico al área septal, parece por lo tanto necesario postular una vía di o polisináptica y la existencia de por lo menos una estación sináptica en la vía. Los estudios anatómicos de Vertes (1982) y electrofisiológicos de Bland (1971, 1986) y Bland y Colom (1993) sugieren que dicha estación de relevo estaría ubicada en el hipotálamo posterior.

Las dos entradas principales a la región del septum medial vienen del hipocampo, vía el septum lateral y del tronco encefálico, vía la región del hipotálamo posterior.

Vinogradova, Brahznic, Karanov y Zhadina (1980), registrando extracelularmente en el complejo septal de conejos no anestesiados, demostraron que la interrupción de las conexiones hipocámpicas incrementaba en el septum lateral la frecuencia media de descarga y el porcentaje de neuronas descargando en salvas rítmicas sin alterar significativamente la frecuencia media de la descarga en salva. Cortes debajo del septum, que seccionaban las aferencias provenientes del tronco encéfalo, incrementaron en el septum medial la frecuencia media de descarga, decrementaron la frecuencia media de la descarga en salva sin cambiar el porcentaje de neuronas descargando en salvas rítmicas. El análisis de este estudio sugiere la posibilidad de influencias hipocámpicas tónicas sobre las neuronas septales. Así también, al ser no necesaria la integridad de las conexiones hipocampo-septales para el

mantenimiento de ritmicidad en las neuronas septales, parece claro que influencias inhibitorias fásicas hipocámpicas no son críticas para la producción de salvas por las neuronas septales.

¿Que influencias ejercen las entradas a la región septal medial en los procesos sincronizantes de dicha región?

El estudio de Vinogradova *et al.* (1980) demuestra que las vías ascendentes ejercen influencias modulatorias sobre el área septal.

Los estudios realizados en esta tesis demuestran que las relaciones funcionales entre pares de neuronas septales, revelada por el análisis de correlación cruzada, es dependiente de la propiedad de ritmicidad de dichas neuronas. Solamente los pares de neuronas rítmicas estuvieron siempre correlacionados, a pesar de que la actividad de campo hipocámpica osciló entre el ritmo theta y la actividad irregular. La mitad de los pares de neuronas que mostraron clara ritmicidad se correlacionaron durante ambos estados hipocámpicos. Las neuronas remanentes se correlacionaron solamente durante el ritmo theta o no se correlacionaron. Las neuronas que mostraron correlaciones durante el ritmo theta y la actividad irregular, fueron las que tuvieron las correlaciones funcionales más fuertes. Es también importante notar que la correlación que fue observada durante la actividad irregular, ocurrió a pesar de que las neuronas integrantes de dichos pares no mostraron ninguna relación con la actividad irregular. Las características de las funciones de correlación cruzada de los pares de neuronas rítmicas correlacionadas durante ambos estados fueron: fuertes correlaciones simétricas con agudos picos o valles ocurriendo alrededor del origen, sugiriendo entonces que dichas neuronas compartían una entrada común. La misma clase de correlación (pico o valle) se mantuvo a pesar de los cambios en la actividad de campo hipocámpica. En 2/3 de estos pares valles primarios ocurrieron, sugiriendo una relación de excitación-inhibición compartida. En el 1/3 remanente de los pares de neuronas fueron observados picos primarios, sugiriendo entradas excitatorias o inhibitorias compartidas. Esta entrada sincronizante probablemente arrive desde el tronco encefálico ya que el hipocampo parece ejercer principalmente una influencia tónica inhibitoria sobre las neuronas septales (Vinogradova, Brahznic, Karanov y Zhadina, 1980).

El estudio de pares de neuronas septales también mostró otros resultados importantes. Asumiendo que las neuronas registradas simultáneamente por un microelectrodo están en clara proximidad, se puede

tratar de predecir la característica de la segunda neurona conociendo la característica de la primera. Las neuronas que se encontraron en clara proximidad tenían como característica común: 1) una frecuencia de descarga más alta durante el ritmo theta o durante la actividad irregular, o 2) una frecuencia de descarga que variaba o no en relación a los cambios de frecuencia del ritmo theta. Patrones de descarga rítmicos o no rítmicos no sirvieron para predecir proximidad. Estos resultados constituyen la primera evidencia de que las neuronas septales tienden a agruparse de acuerdo a alguna de sus características electrofisiológicas.

Aunque está claramente determinada la necesidad de un área septal intacta para la generación de ritmo theta, la posibilidad de que las neuronas septales tengan distintas influencias en la generación de ritmos theta colinérgicos y no colinérgicos necesita ser clarificada. Entonces, es importante determinar la potencia relativa de las entradas responsables por el ritmo theta atropina-sensitivo y el ritmo theta atropina-resistente, en el animal anestesiado y en el animal en movimiento libre. El estudio presentado aquí mostró que 72% de las neuronas rítmicas examinadas después de la administración de sulfato de atropina continuaron descargando con un patrón rítmico. Estos resultados son casi idénticos a los reportados por Stewart y Fox (1989). Estos autores encontraron que el 66% de las neuronas rítmicas del área septal medial continuaban disparando en salvas, a la frecuencia theta, después de la administración de sulfato de atropina. El hecho de que el sulfato de atropina en el animal anestesiado abole completamente al ritmo theta hipocámpico y la rítmicidad en el 28-33% de las neuronas septales, sugiere que esas neuronas atropino-sensitivas juegan un rol crítico en la generación del ritmo theta atropino-sensitivo (tipo 2, de acuerdo a Vanderwolf).

Hasta ahora han sido descriptas las características de una población rítmica de neuronas septales, probablemente sincronizadas por una entrada ascendente proveniente del tronco encefálico. Ya que el bloqueo del área septal (y por consiguiente de las neuronas rítmicas aquí descriptas) abole al ritmo theta hipocampo, la actividad rítmica de las neuronas septales es necesaria para la generación del ritmo theta hipocámpico y de la descarga rítmica de las neuronas hipocámpicas. Pero, ¿que rol ejerce el área septal medial en la generación del ritmo theta hipocámpico? Varios grupos sugirieron que el área septal medial tendría un rol de marcapaso sobre el ritmo theta hipocámpico (Green y Arduini, 1954; Petsche y Stumpf, 1960; Petsche, Stumpf y Gogolak,

1962). Sin embargo el ritmo theta hipocámpico no parece estar generado por un sistema simple con un sólo marcapaso. Datos acumulados recientemente sugieren que los sistemas responsables de la generación de ritmo theta estarían formados por una serie de estaciones sinápticamente acopladas en el sistema nervioso central (Steriade, Gloor, Llinás, Lopez da Silva y Mesulam, 1990). Varias de estas estaciones (núcleos, estructuras cerebrales) tendrían propiedades de marcapaso y la generación de la actividad sincronizada dependería de la actividad simultánea de todas estas estructuras.

¿Que estructuras de este sistema sincronizante son capaces de generar ritmicidad? Vinogradova et al. (1980) mostraron que las neuronas de rebanadas de septum poseían una actividad espontánea relativamente alta 22% de estas neuronas mostraron disparos en salvas rítmicas. Este trabajo junto con los experimentos de deaferentación *in vivo* del mismo grupo claramente sugirieron un rol de marcapaso para la región septal medial.

Los estudios aquí presentados juntos con el trabajo Kirk and McNaughton (1991) sobre el SUM sugieren la existencia de 2 estructuras nuevas con actividad marcapaso: el hipocampo y el complejo hipotalámico posterior (HP-SUM). Analizaremos ahora los experimentos llevados a cabo en estas 2 áreas.

¿Puede el hipocampo aislado generar ritmo theta? Evidencia experimental sugiere una respuesta positiva a esta pregunta. Si reformulamos la pregunta: ¿puede el hipocampo aislado oscilar a la frecuencia theta? Podemos contestar categóricamente que este es el caso. La siguiente evidencia sostiene esta afirmación: Konopacki y colaboradores (Konopacki, MacIver, Roth y Bland, 1987; Konopacki, Bland y Roth, 1988) en una serie de experimentos demostraron que: 1) la aplicación de 50 μ M de carbacol en la rebanada de hipocampo resulta en la producción de trenes de actividad theta símil, 2) la subsecuente aplicación de sulfato de atropina antagoniza la actividad theta símil, entonces esta actividad rítmica *in vitro* se parece al ritmo theta colinérgico observado *in vivo*, 3) similares áreas generadoras existen en la rebanada de hipocampo y en la preparación *in vivo*, y 4) similares cronologías de desarrollo existen en ambas preparaciones, apareciendo la actividad rítmica en el día postnatal 8 tanto en la rebanada de hipocampo como en el animal en desarrollo. Para validar a estos experimentos es que se decidió estudiar las bases celulares de la actividad rítmica en la rebanada de hipocampo.

Registros intracelulares se realizaron en las capas piramidales de CA1 y CA3, y en la capa granulosa del giro dentado de la rebanada de hipocampo,

antes de, durante y después de la aplicación de 50 μ M de carbacol al baño de perfusión. Cincuenta y seis por ciento de las neuronas de esta muestra (9/16) estuvieron relacionadas con las oscilaciones theta similares, exhibiendo oscilaciones del potencial de membrana de 5 a 28 mV y descargas de espigas rítmicas en fase con las oscilaciones theta similares. El carbacol depolarizó a todas las neuronas registradas en un rango de 10 a 20 mV. Estos resultados que demuestran una base celular para la actividad theta similar muestran un extraordinario parecido con los de Nuñez, García-Austt y Buño (1987) *in vivo*. Estos autores registraron el ritmo theta extracelular y el potencial transmembrana de neuronas piramidales de las regiones CA1 y CA3, en ratas bajo curare y anestesia con uretano. Las neuronas piramidales fueron identificadas mediante estimulación antidrómica y tiñendolas intracelularmente con Amarillo de Lucifer. Durante el ritmo theta la mayoría de las neuronas piramidales mostraron depolarizaciones sostenidas de 10 a 20 mV y oscilaciones del potencial de membrana que consistieron en ondas casi sinusoidales de 5 a 10 mV y espigas lentas de hasta 60 mV. Espigas rápidas Na^+ dependientes y espigas lentas, probablemente Ca^{++} dependientes fueron disparadas espontáneamente o por pulsos depolarizantes. Estas observaciones sugieren que mecanismos similares estarían envueltos en la generación de oscilaciones a las frecuencias theta en las preparaciones *in vitro* y *in vivo*.

Los experimentos de Mac Vicar y Tse (1989) demostraron en la región CA3 de rebanadas transversas de hipocampo de ratas, que las oscilaciones theta similares pueden ser abolidas por: 1) la aplicación de tetrodotoxina o bloqueadores de los canales de Ca^{++} , 2) un antagonista de amplio espectro de las sinápsis glutamérgicas, 3) la elevación del Ca^{++} extracelular por encima de 7 mM, que debería bloquear los circuitos polisinápticos y la excitación recurrente entre neuronas piramidales. Estos resultados sugieren que la generación de actividad theta similar generada por carbacol en la rebanada de hipocampo, necesita de la propagación de potenciales de acción a través de una red de circuitos locales que usan receptores no-NMDA (N-metil-D-aspartato) y en los que es necesaria la excitación recurrente entre neuronas piramidales (por lo menos en la región CA3).

Los experimentos *in vitro* demuestran que las rebanadas de hipocampo pueden ser inducidas a generar trenes de actividad theta similar cuando son perfundidas con carbacol. ¿Puede ese resultado ser reproducido *in vivo*? O dicho de otra manera, ¿puede el hipocampo septalmente deaferentado oscilar

en el rango de las frecuencias theta *in vivo*? Si contestamos positivamente la interrogante, llegaremos a tener la primera evidencia de que el hipocampo tiene los circuitos necesarios para generar ritmo theta.

Para contestar esta pregunta fueron realizados una serie de experimentos en ratas anestesiadas con uretano e implantadas con cánulas de microinfusión en: 1) el área del SM-rvBDB y 2) uno o múltiples sitios de la capa molecular del giro dentado. El área septal medial fue microinfundida con procaína produciéndose un bloqueo reversible que duró en promedio unos 20 minutos. Mientras que microinfusiones separadas de carbacol y bicuculina (durante el bloqueo procaínico de la región septal) fallaron en producir oscilaciones theta similares, la combinación de ambas drogas generó claros trenes a la frecuencia theta. El sulfato de atropina abolió los trenes de oscilaciones rítmicas, mostrando que receptores muscarínicos estaban envueltos en su producción. Las oscilaciones theta similares tuvieron el mismo perfil de profundidad que el ritmo theta del animal anestesiado. Neuronas que descargaron en salvas rítmicas sincrónicas con el ritmo theta, también mostraron salvas rítmicas sincrónicas a las oscilaciones theta similares.

Estos hallazgos pueden ser relacionados claramente con la observación de actividad theta similar producida por la perfusión de carbacol en la rebanada de hipocampo. La actividad oscilatoria generada en los casos fue muy similar. Ambas oscilaciones comparten características como: 1) la frecuencia, 8-15 Hz *in vivo* versus 5-12 Hz *in vitro*; 2) la duración, 1-5 segundos *in vivo* versus 1-10 segundos *in vitro*; 3) la amplitud, aunque una comparación directa de amplitudes es difícil de realizar (dadas las diferentes condiciones de registro en ambas preparaciones), en ambos casos las oscilaciones tuvieron por lo menos 500 μ V de amplitud, sugiriendo la existencia de grandes poblaciones de neuronas disparando sincrónicamente en ambas preparaciones; 4) el hecho de ser abolidas por el sulfato de atropina, por lo tanto ambas dependen de la activación de receptores muscarínicos. Además, la marcada reducción de amplitud de la actividad de campo desincronizada observada entre los trenes de oscilaciones en ambas preparaciones, no sólo provee más evidencia para un mecanismo común, sino que también sugiere que la entrada septal es necesaria para la generación de actividad irregular en el hipocampo.

Un posible mecanismo para la expresión de actividad oscilatoria en ambas preparaciones es la disminución en la inhibición GABAérgica. El hipocampo posee poderosos sistemas de inhibición hacia adelante y recurrente

(Knowles y Schwartzkroin, 1981; Buzsaki, 1984; Lacaille, Kunkel y Schwartzkroin, 1989). Puede ser claramente postulado que el balance de inhibición ha sido interrumpido en el hipocampo durante la deaferentación septal, ya que las interneuronas GABAérgicas que normalmente reciben una entrada inhibitoria vía neuronas GABAérgicas de proyección septales, se encuentran ahora desinhibidas. La deaferentación podría entonces crear un hipocampo "super inhibido". En la rebanada transversa de hipocampo, la remoción de las aferencias septales no produce el mismo efecto ya que muchos de los árboles dendríticos de las interneuronas GABAérgicas, que corren paralelos al eje longitudinal del hipocampo, se encuentran seccionados. La rebanada de hipocampo contiene entonces, una reducida población de interneuronas inhibitorias funcionales y por lo tanto una reducida inhibición. Esta diferencia en la potencia de los procesos inhibitorios podría explicar la necesidad de inyectar un antagonista GABAérgico, en adición al carbacol, para generar oscilaciones en la preparación *in vivo*.

La actividad oscilatoria rítmica observada en este estudio se parece al ritmo theta que ocurre espontáneamente en su: 1) frecuencia, 2) perfil de profundidad a través del hipocampo y 3) relación con la actividad neuronal local. Las frecuencias del ritmo theta espontáneas o evocadas fueron de 3-12 Hz mientras que las frecuencias de los trenes de oscilaciones observadas *in vivo* fueron de 8-15, existe por lo tanto una clara superposición en la distribución de ambas frecuencias. El perfil de profundidad de los trenes de oscilaciones fue virtualmente idéntico al hallado para el ritmo theta en animales anestesiados, encontrándose una inversión de fase en el *stratum radiatum* con máximos en el *stratum oriens* y en el *stratum moleculare*. La única diferencia obvia entre ambos perfiles fue la amplitud de la actividad registrada, teniendo las oscilaciones inducidas por carbacol y bicuculina hasta 3 veces la amplitud del ritmo theta (3-6 mV *versus* 1-2 mV). Esta mayor amplitud sugiere que la misma población de neuronas rítmicas se hallaba disparando más sincrónicamente o que más neuronas rítmicas estaban disparando con el mismo grado de sincronía, durante los trenes de oscilaciones.

Las neuronas rítmicas que mostraron una relación de fase fija con el ritmo theta espontáneo o el evocado por el carbacol también mostraron una relación de fase fija con los trenes de oscilaciones producidos por la infusión de carbacol y bicuculina. Otros tipos de oscilaciones transitorias como los producidos por nicotina no mostraron la misma relación neurona-potencial de

campo (durante los trenes de actividad rítmica nicotínica las neuronas hipocámpicas se silenciaron completamente, Bland y Colom, 1988). Por lo tanto, descargas neuronales con una relación de fase fija a la actividad rítmica pueden ser tomadas como evidencia de que las oscilaciones producidas por carbacol y bicuculina son similares al ritmo theta.

Cuando la combinación de drogas fue infundida sin supresión septal, el ritmo theta y las oscilaciones theta similares fueron alternativamente observados (nunca fue encontrada ninguna superposición entre ambos eventos). Estos datos sugieren que ambas actividades rítmicas son distintas y que probablemente comparten el mismo circuito, o al menos una parte de él.

En relación al complejo HP-SUM, los experimentos con PHA-L y HRP demostraron que: 1) el área del HP-SUM manda un importante contingente de fibras al SM-rvBDB y establece sinapsis directamente con el *gyrus dentatus* de la formación hipocámpica y 2) recibe y manda fibras a áreas del tronco encefálico que pueden afectar la sincronía de la actividad de campo hipocámpico. Se registró la actividad de campo hipocámpico y las neuronas del SM-rvBDB para evaluar los efectos del complejo HP-SUM en el sistema septo-hipocámpico. El bloqueo del HP hizo que desaparecieran el ritmo theta hipocámpico, las fuertes correlaciones durante el ritmo theta y/o la actividad irregular hipocámpica de los pares neuronas del SM-rvBDB y el comportamiento rítmico de las neuronas que presentaron descargas rítmicas correlacionadas al ritmo theta y de las neuronas que descargaron constantemente en forma rítmica. Los experimentos de Kirk y McNaughton (1991) demuestran en el SUM la existencia de un alto porcentaje de neuronas rítmicas que no pierden su ritmicidad después de la deaferentación septal y plantean junto a nuestros datos la imposibilidad de seguir considerando al área septal como el único marcapaso del ritmo theta hipocámpico. Estos experimentos también ponen en evidencia la existencia de un eslabón importante en la cadena de estructuras-marcapaso responsables de la generación del ritmo theta hipocámpico en la región del PH-SUM.

Por lo tanto nosotros concluimos que la entrada proveniente del SM-rvBDB es necesaria en condiciones fisiológicas para producir ritmo theta y actividad irregular en el hipocampo. Más aún, un balance crítico entre los circuitos colinérgicos y GABAérgicos parece ser necesario para la producción del ritmo theta. La alteración de este balance en el hipocampo deaferentado *in vivo* genera un hipocampo "super inhibido" que requiere de la adición de

campo (durante los trenes de actividad rítmica nicotínica las neuronas hipocámpicas se silenciaron completamente, Bland y Colom, 1988). Por lo tanto, descargas neuronales con una relación de fase fija a la actividad rítmica pueden ser tomadas como evidencia de que las oscilaciones producidas por carbacol y bicuculina son similares al ritmo theta.

Cuando la combinación de drogas fue infundida sin supresión septal, el ritmo theta y las oscilaciones theta similares fueron alternativamente observados (nunca fue encontrada ninguna superposición entre ambos eventos). Estos datos sugieren que ambas actividades rítmicas son distintas y que probablemente comparten el mismo circuito, o al menos una parte de él.

En relación al complejo HP-SUM, los experimentos con PHA-L y HRP demostraron que: 1) el área del HP-SUM manda un importante contingente de fibras al SM-rvBDB y establece sinapsis directamente con el *gyrus dentatus* de la formación hipocámpica y 2) recibe y manda fibras a áreas del tronco encefálico que pueden afectar la sincronía de la actividad de campo hipocámpica. Se registró la actividad de campo hipocámpica y las neuronas del SM-rvBDB para evaluar los efectos del complejo HP-SUM en el sistema septo-hipocámpico. El bloqueo del HP hizo que desaparecieran el ritmo theta hipocámpico, las fuertes correlaciones durante el ritmo theta y/o la actividad irregular hipocámpica de los pares neuronas del SM-rvBDB y el comportamiento rítmico de las neuronas que presentaron descargas rítmicas correlacionadas al ritmo theta y de las neuronas que descargaron constantemente en forma rítmica. Los experimentos de Kirk y McNaughton (1991) demuestran en el SUM la existencia de un alto porcentaje de neuronas rítmicas que no pierden su ritmicidad después de la deaferentación septal y plantean junto a nuestros datos la imposibilidad de seguir considerando al área septal como el único marcapaso del ritmo theta hipocámpico. Estos experimentos también ponen en evidencia la existencia de un eslabón importante en la cadena de estructuras-marcapaso responsables de la generación del ritmo theta hipocámpico en la región del PH-SUM.

Por lo tanto nosotros concluimos que la entrada proveniente del SM-rvBDB es necesaria en condiciones fisiológicas para producir ritmo theta y actividad irregular en el hipocampo. Más aún, un balance crítico entre los circuitos colinérgicos y GABAérgicos parece ser necesario para la producción del ritmo theta. La alteración de este balance en el hipocampo deaferentado *in vivo* genera un hipocampo "super inhibido" que requiere de la adición de

bloqueadores GABAérgicos para poder oscilar. La generación de actividad theta símil por el hipocampo *in vivo* prueba que el hipocampo puede oscilar sin necesitar de la entrada septal. La naturaleza de la influencia de la salida septal sobre el ritmo theta hipocámpico en condiciones fisiológicas debe todavía ser determinada, pero es claro que el SM-rvBDB necesita de entradas que provienen del tronco encefálico y que pasan por el área HP-SUM para mantener la ritmicidad y sincronía de sus células.

Bibliografía

- Bland, B. H. (1971). Diencephalic and hippocampal mechanisms of motor activity in the rat. Doctoral dissertation, University of Western Ontario.
- Bland, B. H. (1986). The physiology and pharmacology of hippocampal theta rhythms. *Progress in Neurobiology*, 26, 1-54.
- Bland, B. H. & Colom, L. V. (1988). Responses of phasic and tonic hippocampal theta-on cells to cholinergic: Differential effects of muscarinic and nicotinic activation. *Brain Res.*, 440, 167-171.
- Bland, B. H. & Colom, L. V. (1993). Extrinsic and intrinsic properties underlying oscillation and synchrony in limbic cortex. *Progress in Neurobiology*, in press.
- Buzsáki, G. (1984). Feed-forward inhibition in the hippocampal formation. *Prog. Neurol.*, 22, 131-153.
- Green, J. D. & Arduini, A. (1954). Hippocampal electrical activity in arousal. *J. Neurophysiol.*, 17, 533-557.
- Kirk, I.J. and McNaughton, N. (1991) Supramammillary cell firing and hippocampal rhythmical slow activity. *Neuroreport*, 2, 723-725
- Knowles, W. D. & Schwartzkroin, P. A. (1981). Local circuit synaptic interactions in hippocampal brain slice. *J. Neurosci.*, 1, 318-322.
- Konopacki, J., Bland, B. H., MacIver, M. B., & Roth, S. H. (1987). Cholinergic theta rhythm in transected hippocampal slices: Independent CA1 and dentate generators. *Brain Res.*, 436, 217-222.
- Konopacki, J., Bland, B. H. & Roth, S. H. (1987). Phase shifting of CA1 and dentate EEG theta in hippocampal formation slices. *Brain Res.*, 417, 399-402.

- Konopacki, J., Bland, B. H., & Roth, S. H. (1988). Carbacol-induced EEG theta in hippocampal formation slices: Evidence for a third generator of theta in CA3C area. *Brain Res.*, 451, 33-42.
- Konopacki, J., Bland, B. H., & Roth, S. H. (1988). Evidence that activation of *in vitro* hippocampal theta rhythm involves only muscarinic receptors. *Brain Res.*, 455, 110-114.
- Konopacki, J., Bland, B. H., & Roth, S. H. (1988). The development of carbacol-induced EEG theta examined in hippocampal formation slices. *Developmental Brain Res.*, 38, 229-232.
- Konopacki, J., MacIver, M. B., Bland, B. H., & Roth, S. H. (1987). Theta in hippocampal slices: Relation to synaptic responses of dentate neurons. *Brain Res. Bull.*, 18, 25-27.
- Konopacki, J., MacIver, M. B., Roth, S. H., & Bland, B. H. (1987). Carbacol-induced EEG "theta" activity in hippocampal brain slices. *Brain Res.*, 405, 196-198.
- Lacaille, J. C., Kunkel, D. D. & Schwartzkroin, P. A. (1989). Electrophysiological and morphological characterization of hippocampal interneurons. *The Hippocampus New Vistas* (pp. 285-303). Alan R. Liss, Inc., New York.
- MacVicar, B. A., & Tse, F. Y. (1989). Local neuronal circuitry underlying cholinergic rhythmical slow activity in CA3 area of the rat hippocampal slices. *J. Physiol. (London)*, 417, 197-212.
- Nuñez, A., Garcia-Austt, E., & Buño, W., Jr. (1987). Intracellular theta rhythm generation in identified hippocampal pyramids. *Brain Res.*, 416, 289-300.
- Petsche, H., & Stumpf, C. (1960). Topographic and toposcopic study of origin and spread of the regular synchronized arousal pattern in the rabbit. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.*, 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 hippocampal arousal activity by the septum cells. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.*, 14, 202-211.
- Steriade, M., Gloor, P., Llinás, R. R., Lopez da Silva, F. H. & Mesulam, M. M. (1990). Basic mechanisms of cerebral rhythmic activities. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.*, 76, 481-508.
- Stewart, M., & Fox, S. E. (1989). Two populations of rhythmically bursting neurons in rat medial septum are revealed by atropine. *J. Neurophysiol.*, 61, 982-993.

- Vertes, R. P. (1982). Brainstem generation of hippocampal EEG. Prog. in Neurobiol., 19, 159-186.
- Vertes, R. P., Colom, L. V. and Fortin, W. (1993) Brain stem sites for the carbachol elicitation of the hippocampal theta rhythm in the rat, Exp. Brain Res.. Submitted.
- Vinogradova, O. S., Brazhnik, E. S., Karanov, A. M., & Zhadina, S. D. (1980). Neural activity of the septum following various types of deafferentation. Brain Res., 187, 353-368.

ÍNDICE

RESUMEN

2

INTRODUCCIÓN

3

El ritmo theta, los mecanismos sincronizantes y
los osciladores en el sistema septo-hipocámpico

3

La formación hipocámpica

5

Anatomía

5

Fisiología

14

Fisiología celular

14

El ritmo theta

17

Los sitios de origen del ritmo theta

22

Registro de neuronas relacionadas al ritmo theta

24

Región septal

29

Anatomía

29

Fisiología

30

La corteza entorrinal

33

Generación de ritmo theta por la corteza entorrinal

33

El tronco encefálico

34

Rol del tronco encefálico en la generación de ritmo theta

34

Bibliografía

36

ANTECEDENTES DEL TRABAJO PRESENTADO EN ESTA TESIS

45

Generación de ritmicidad por el hipocampo

45

Generación de descargas rítmicas por las células septales

48

Bibliografía

49

SIGNIFICADO

52

Bibliografía

53

OBJETIVOS

54

Bibliografía

55

REGISTROS INTRACELULARES DE ACTIVIDAD THETA SÍMIL EN
REBANADAS DE HIPOCAMPO PERFUNDIDAS CON CARBACOL

56



Resumen	56
Introducción	56
Métodos	57
Resultados	58
Discusión	61
Bibliografía	65

2 INTERACCIONES CELULARES EN EL SEPTUM MEDIAL EN RELACIÓN A LA

ACTIVIDAD DE CAMPO HIPOCÁMPICA Y LOS EFECTOS DE ATROPINA

67	
Resumen	67
Introducción	69
Material y métodos	71
Procedimiento de prueba	73
Análisis de datos	74
Resultados	75
Clasificación individual de neuronas	76
Neuronas theta-activadas	76
Neuronas theta-inactivadas	77
Neuronas no relacionadas	78
Pares de neuronas	83
Características de los elementos neuronales que determinan su emparejamiento	83
Interacciones entre neuronas del SM-rvBDB	86
Efectos de la atropina	90
Actividad de campo hipocámpica.	90
Actividad neuronal	93
Interacción entre las neuronas del SM-rvBDB	94
Pares de neuronas fásica-fásicas	94
Discusión	97
Bibliografía	103

3 LA MICROINFUSIÓN INTRAHIPOCÁMPICA DE CARBACOL Y BICUCULINA IN VIVO INDUCE OSCILACIONES THETA SÍMILES EN EL HIPOCAMPO SEPTALMENTE DEAFERENTADO

Resumen	108
Introducción	108
Materiales y métodos	110
Resultados	113
Intentos de generar actividad de campo theta con microinfusiones de carbachol durante la supresión con procaína del SM-rvBDB	115
Intentos de generar actividad de campo theta con infusiones de carbachol y bicuculina, durante la supresión con procaína del SM-rvBDB	119
Correlación de las descargas de las neuronas theta activadas con las oscilaciones sincrónicas producidas por carbachol y bicuculina	120
Discusión	122
Bibliografía	125

LA IMPORTANCIA DE LOS NÚCLEOS HIPOTALÁMICOS POSTERIORES Y SUPRAMAMILARES EN LA GENERACIÓN DEL RITMO THETA HIPOCÁMPICO

Resumen	130
Introducción general	130
Experimentos anatómicos	131
Introducción	131
Métodos	133
Resultados	136
Discusión	136
Experimentos electrofisiológicos	138
Introducción	138
Métodos	138
Resultados	142
Discusión	142
Bibliografía	143

CONCLUSIONES	145
Bibliografía	153



12680