



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

COMUNICACIÓN BIDIRECCIONAL ENTRE EL GIRO DENTADO Y EL ÁREA CA3
DEL HIPOCAMPO

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
FRANCO ORTIZ CABALLERO

TUTOR PRINCIPAL: DR. RAFAEL GUTIÉRREZ AGUILAR
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
DR. JOSÉ BARGAS DÍAZ, INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR
DR. JOSÉ FERNANDO PEÑA ORTEGA, INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. JUNIO 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo de tesis fue realizado bajo la tutoría del Dr. Rafael Gutiérrez Aguilar. Todos los experimentos y análisis fueron realizados en su laboratorio en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), Unidad Sur.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Rafael Gutiérrez Aguilar por su apoyo y paciencia para llevar a cabo este proyecto.

A los miembros del comité tutor: Dr. José Bargas Díaz y Dr. José Fernando Peña Ortega por su apoyo y excelente retroalimentación a lo largo de estos años.

A los miembros del sínodo (en orden alfabético): Dr. Víctor Hugo de Lafuente Flores, Dra. Carolina Escobar Briones, Dra. Martha Lilia Escobar Rodríguez y Dr. Juan Fernández Ruiz por su revisión y retroalimentación puntual al presente trabajo.

Al Dr. Elias Manjarrez López, al Dr. Jesús Tapia y a Andrea Ibarra Chaoul por su ayuda en el desarrollo de rutinas de análisis en una etapa temprana del proyecto.

A mis compañeros de laboratorio: Diana Ixmatlahua, Bianca Vizcarra, Úrsula Franco y Karel Zapfe por su ayuda y apoyo. A la Dra. Gisela Gómez Lira por su asistencia y apoyo.

A Sara Méndez Ibáñez por su excelente asistencia administrativa.

Al Conacyt por haberme otorgado una beca doctoral, al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas y a la UNAM por haberme otorgado los recursos y apoyo necesarios para llevar a cabo este proyecto.

A mis padres y hermanos por su apoyo incondicional.

Contenido

Resumen	7
Antecedentes	9
1 Introducción	13
1.1 Formación hipocampal	13
1.1.1 Corteza entorrinal	14
1.1.2 Giro dentado	16
1.1.3 Hipocampo	18
1.1.4 Proyecciones de CA3 hacia el giro dentado	21
1.2 Oscilaciones rápidas (100 – 200 Hz) y ultra-rápidas (250 – 600 Hz)	22
1.2.1 Mecanismos subyacentes de las oscilaciones rápidas (100 – 200 Hz)	24
1.2.2 Mecanismos subyacentes de las oscilaciones ultra-rápidas en el hipocampo (250 – 600 Hz) ..	25
1.2.3 Sincronización de la actividad eléctrica osciladora entre el giro dentado y el hipocampo	27
1.2.4 Medidas de acople de la actividad eléctrica osciladora entre dos estructuras cerebrales	30
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	33
3. HIPÓTESIS	34
4. OBJETIVO	35
4.1 Objetivos particulares	35
5. MÉTODOS	36
5.1 Preparación in vitro	36
5.2 Registros electrofisiológicos	37
5.3 Procesamiento de los datos y análisis	39
5.3.1 Detección de electrodos con actividad de interés	39
5.3.2 Detección de oscilaciones ultra-rápidas	44
5.3.3 Conectividad causal en términos de Granger	47
5.3.4 Simulaciones de Montecarlo	49
6. RESULTADOS	51
6.1 Registro de oscilaciones ultra-rápidas en el hipocampo y en el giro dentado	51
6.2 Sitio de inicio de las oscilaciones ultra-rápidas	69
6.3 Propagación de los eventos de alta frecuencia	71
6.4 Los eventos de alta frecuencia en CA3 causan, en términos de Granger, a los eventos de alta frecuencia en el giro dentado	74
6.5 Conexiones funcionales bidireccionales entre el giro dentado y CA3	80

7. DISCUSIÓN	84
7.1 Registro de actividad de alta frecuencia en el hipocampo y el giro dentado	84
7.2 Sitio de inicio de los eventos de alta frecuencia	86
7.3 Mecanismos de generación de las oscilaciones de alta frecuencia	86
7.4 Propagación de los eventos de alta frecuencia	89
7.5 Propagación de los eventos de alta frecuencia hacia el giro dentado	90
7.6 Conexiones Granger de CA3 al giro dentado	91
7.7 Mecanismos de propagación hacia el giro dentado	92
7.8 Implicaciones funcionales	94
8. CONCLUSIÓN	97
9. REFERENCIAS	98

Lista de abreviaturas

al	alveus
CE	Corteza entorrinal
cg	capa granular del giro dentado
cm	capa molecular del giro dentado
cp	capa piramidal del hipocampo
fh	fisura hipocampal
FM	fibras musgosas
GD	giro dentado
CA1	Cuerno de Ammon, área CA1
CA2	Cuerno de Ammon, área CA2
CA3	Cuerno de Ammon, área CA3
GABA	Ácido γ -aminobutírico
h	hilus
ha	haz angular
LCRA	Líquido cefalorraquídeo artificial
Para	parasubiculo
Pre	presubiculo
sl	<i>Stratum lucidum</i>
sl-m	<i>Stratum lacunosum moleculare</i>
so	<i>Stratum oriens</i>
sr	<i>Stratum radiatum</i>
SWRs	Sharp Wave ripples

Resumen

El hipocampo es capaz de generar actividad eléctrica osciladora en diferentes bandas de frecuencia, mismas que se asocian a diferentes estados conductuales o procesos cognitivos. Los mecanismos de generación son distintos para cada banda. Un patrón de especial interés para el presente trabajo de tesis es el conocido como oscilaciones de alta frecuencia asociado a ondas agudas (Sharp Wave Ripples o SWRs en inglés) con una frecuencia de oscilación entre 140 y 200 Hz. Este patrón es fisiológico y se le ha asociado ampliamente con la consolidación y transferencia de información del hipocampo a la neocorteza. Sin embargo, puede alcanzar una mayor frecuencia de oscilación en pacientes con epilepsia del lóbulo temporal al inicio de las crisis o durante eventos interictales. A este patrón con frecuencias de hasta 600 Hz se le conoce como de oscilaciones ultra-rápidas y se le considera un biomarcador de la zona epileptógena. Para estudiar este tipo de actividad osciladora desarrollamos un modelo de lesión de la corteza que proyecta al hipocampo (corteza entorrinal) *in vivo*, que desinhibe al hipocampo para generar este tipo de oscilaciones *in vitro*. Estas oscilaciones son generadas por las áreas CA3 medial y CA3 distal, pero no siguen una propagación topográficamente ordenada y pueden propagarse tanto a CA1 como al giro dentado. Uno de los principales objetivos de este trabajo fue elucidar un posible mecanismo de propagación de esta actividad al giro dentado ya que esta estructura inerva ampliamente a CA3, y CA3 inerva escasamente al giro dentado. Con el uso de una matriz cuadrada con tecnología CMOS registramos, con 4096 microelectrodos, rebanadas del hipocampo *in vitro* y analizamos la actividad de campo y multicelular de todas las áreas

simultáneamente. Con la prueba de causalidad de Granger, demostramos que la mayoría de los eventos generados en CA3 se propagan al hilus y del hilus al giro dentado; sin embargo, un hallazgo relevante de este trabajo es haber determinado que también hay eventos que se propagan directamente al giro dentado de manera antidrómica, lo cual pone de manifiesto mecanismos que permiten esta propagación y revelan una influencia de CA3 sobre el giro dentado.

Antecedentes

Normalmente se ha descrito al hipocampo como un circuito trisináptico compuesto por tres sinapsis glutamatérgicas en el cual la información fluye en una sola dirección. La primera sinapsis en el circuito es aquella que forman la vía perforante, compuesta por los axones provenientes de la corteza entorrinal, con las células granulares del giro dentado. La segunda sinapsis la forman los axones de las células granulares, denominados fibras musgosas, con las dendritas apicales de las células piramidales del área CA3, y la tercera sinapsis la forman los axones de éstas últimas, denominados colaterales de Schaffer, con las células piramidales del área CA1 (Andersen, 2007). Sin embargo, este concepto ha sido reconsiderado, ya que la corteza entorrinal puede hacer sinapsis directamente con las células piramidales de CA3 y CA1. Igualmente, las células piramidales de CA3 no solo proyectan a CA1, sino que se conectan extensamente unas con otras. Otro dato es que la mayoría de los blancos sinápticos de las células granulares son interneuronas y no las células piramidales de CA3 (Acsády y cols., 1998), y finalmente, hay evidencia anatómica y fisiológica de una proyección de CA3 hacia el giro dentado (Scharfman, 2007), lo cual podría implicar un flujo de información bidireccional.

La primera evidencia anatómica de una proyección de CA3 al giro dentado fue presentada por Li y cols. Ellos marcaron células piramidales de CA3 con biocitina para reconstruirlas y encontraron que algunos axones provenientes de estas células, principalmente de CA3c, se extendían hacia el hilus y terminaban en la capa granular y la capa molecular del giro dentado, lo cual sugería una proyección directa de CA3 al giro dentado (Li y cols., 1994). Por otro lado, Scharman demostró la existencia de una proyección disináptica funcional entre CA3 y el giro dentado, misma que se encuentra

enmascarada por la inhibición. Al estimular la fimbria y registrar de forma intracelular tanto células granulares del giro dentado como células musgosas en el hilus, observó un potencial post-sináptico inhibitor en las células granulares. Cuando bloqueó los receptores GABA_A con bicuculina (10 μ M) y estimuló la fimbria, observó un potencial post-sináptico excitador en las células granulares, al igual que despolarizaciones epileptiformes espontáneas tanto en células granulares como en células musgosas. Estas despolarizaciones ocurrían primero en las células musgosas seguidas de las células granulares, lo cual sugería una proyección disináptica glutamatérgica de CA3 al giro dentado que normalmente se encuentra enmascarada por la inhibición (Scharfman, 1994a). Funcionalmente se desconoce el papel de esta proyección; sin embargo, en modelos computacionales, y de acuerdo a hipótesis que proponen a CA3 como un autoasociador capaz de completar patrones de información y al giro dentado como un separador de estos patrones, la inclusión de proyecciones de CA3 hacia el giro dentado aumenta la capacidad de separación de patrones del giro dentado (Scharfman y Myers, 2016).

Por otro lado, existe evidencia electrofisiológica y anatómica de la presencia de sinapsis mixtas eléctricas-químicas entre las fibras musgosas y las dendritas apicales de algunas células piramidales del área CA3 (Hamzei-Sichani y cols., 2012; Vivar y cols., 2012). La estimulación eléctrica de la capa molecular del giro dentado normalmente evoca un potencial post-sináptico excitador en una célula piramidal de CA3 con una latencia de 4.5 ms. Sin embargo, en el 5% de las células piramidales de CA3 registradas, el potencial post-sináptico excitador es precedido de un pre-potencial (*spikelet*) de origen eléctrico con una latencia de 3.9 ± 0.1 ms (Vivar y cols., 2012).

Los *spikelets* se caracterizan por ser despolarizaciones evocadas en forma de “todo o nada” con una amplitud de 4-10 mV y una cinética más rápida que la de los potenciales de acción sinápticos mediados por transmisión química y que, en ocasiones, pueden producir un potencial de acción. Estos persisten durante el bloqueo de la transmisión química y son suprimidos por carbenoxolona, un bloqueador inespecífico de uniones comunicantes. Debido a la naturaleza de las sinapsis eléctricas, y dependiendo de la composición molecular de las proteínas que forman la unión comunicante, es posible que la corriente fluya en ambas direcciones y haya, de igual manera, una comunicación bidireccional entre las células granulares del giro dentado y las células piramidales de CA3.

Otra evidencia que sugiere una comunicación bidireccional entre las células piramidales de CA3 y las células granulares del giro dentado es la aparición de oscilaciones de alta frecuencia (250-600 Hz) en el giro dentado durante crisis epilépticas y eventos interictales. Estas oscilaciones, reportadas en 1999 en pacientes con epilepsia del lóbulo temporal (Bragin y cols., 1999), son consideradas una versión degenerada de un patrón de oscilación de menor frecuencia (100-250 Hz) denominado *Sharp-wave ripples* y relacionado con la consolidación de la memoria. Las oscilaciones de alta frecuencia también se consideran un biomarcador de zonas epileptógenas, se inician en el área CA3 y se observan de forma casi simultánea en el giro dentado (Bragin y cols., 2010; Bragin y cols., 2002).

Se han desarrollado varios modelos animales para el estudio de estas oscilaciones *in vitro*. Algunos interfieren con la transmisión GABAérgica al bloquear los receptores GABA_A (D'Antuono y cols., 2005). En otros se aumenta la concentración

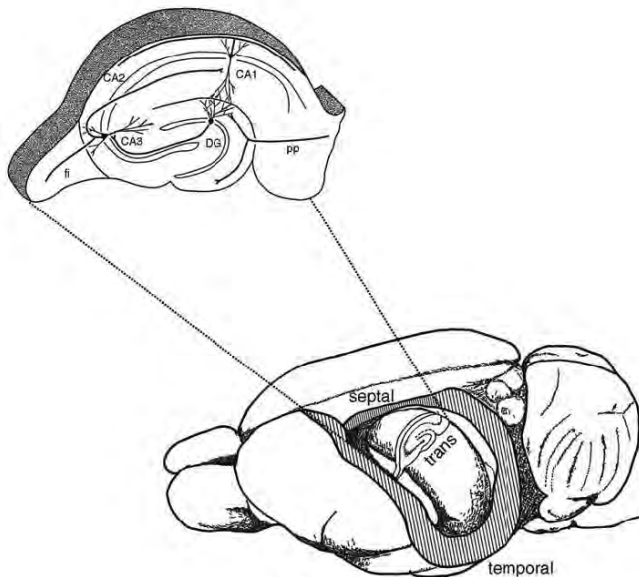
extracelular de potasio (Dzhala y Staley, 2004). Sin embargo, se desconoce el mecanismo por el cual estas oscilaciones se propagan al giro dentado. En el presente trabajo de tesis se desarrolló un modelo de lesión cortical que desinhibe al hipocampo al cortar fibras inhibitorias de la corteza entorrinal al hipocampo (Melzer y cols., 2012) y da origen a este tipo de oscilaciones de alta frecuencia. Este modelo no interfiere farmacológicamente con la inhibición en el giro dentado o hipocampo ni modifica directamente la concentración extracelular de potasio y lo usamos como herramienta para determinar los posibles mecanismos de propagación de las oscilaciones de alta frecuencia de CA3 hacia el giro dentado.

1 Introducción

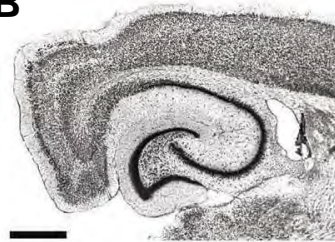
1.1 Formación hipocampal

La formación hipocampal, que se encuentra en el lóbulo temporal de ambos hemisferios, pertenece al sistema límbico y está formada por la corteza entorrinal, el giro dentado, el hipocampo, que a su vez se subdivide en áreas CA3, CA2 y CA1, el subículo, el presubículo y el parasubículo (ver figura 1). Juega un papel importante en la memoria declarativa y conceptual en humanos (Scoville y Milner, 1957), mientras que en roedores sus funciones están relacionadas principalmente con la orientación espacial (O'Keefe y Dostrovsky, 1971).

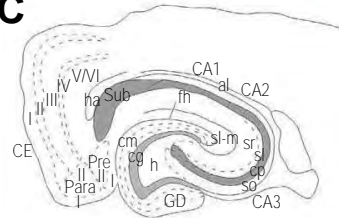
A



B



C



D



Figura 1. Formación hipocampal. (A) Ejes septo-temporal y transversal de la formación hipocampal. (B) Sección horizontal teñida con Nissl. (C) Esquema que muestra las varias regiones, capas y áreas de la formación hipocampal. (D) Sección teñida con sulfuro de plata de Timm. al, alveus; CE, corteza entorrinal; cg, capa granular del giro dentado; cm, capa molecular del giro dentado; cp, capa piramidal del hipocampo; fh, fisura hipocampal; giro dentado, giro dentado; h, hilus o capa celular polimórfica; ha, haz angular; Para, parasubículo; Pre, presubículo; sl, *stratum lucidum* de CA3; so, *stratum oriens* del hipocampo; sr, *stratum radiatum* del hipocampo; sl-m, *stratum lacunosum moleculare* del hipocampo; Números romanos: áreas corticales. Barra en B = 500 micrómetros, aplicar para los paneles C y D (Tomado de Amaral y Lavenex, 2007).

1.1.1 Corteza entorrinal

La corteza entorrinal es una estructura de relevo entre la neocorteza y el hipocampo, se encuentra localizada en el lóbulo temporal y se subdivide de acuerdo a sus proyecciones hacia el giro dentado en corteza entorrinal medial y corteza entorrinal lateral (Canto y cols., 2008). La corteza entorrinal medial proyecta a la capa molecular medial del giro dentado mientras que la corteza entorrinal lateral proyecta a la capa molecular superficial del giro dentado. Tanto la corteza entorrinal medial como la corteza entorrinal lateral se subdividen en seis capas. La capa I es la más externa y contiene neuronas horizontales, así como neuronas multipolares, siendo éstas últimas las de mayor densidad. Las neuronas multipolares son GABAérgicas y proyectan a la capa II, mientras las neuronas horizontales, también GABAérgicas proyectan a las capas más profundas. La capa II

contiene células piramidales y células en forma de estrella. Estas últimas tienen una mayor densidad en comparación con las primeras y proyectan tanto al giro dentado como al área CA3 del hipocampo. Esta capa también contiene una población de interneuronas conformada por neuronas multipolares, células en canasta, células en forma de candelabro y células bipolares horizontales. Estas últimas, a pesar de ser consideradas interneuronas locales, también proyectan al hipocampo (Germroth y cols., 1991). La capa III es más amplia y contiene células piramidales con y sin espinas dendríticas. De igual forma contiene células en forma de estrella, neuronas bipolares y neuronas multipolares. Estas últimas son GABAérgicas y sus axones, además de proyectar a neuronas de la misma capa y otras capas, proyectan al hipocampo. La capa IV, también llamada *Lamina dissecans*, contiene principalmente fibras de paso, aunque también se han observado células piramidales dispersas al igual que neuronas bipolares. La capa V se encuentra estratificada y se subdivide en Va, que contiene células piramidales grandes a medianas, Vb y Vc, que contienen células piramidales pequeñas con una alta densidad. En esta capa también hay células horizontales y multipolares. Finalmente la capa VI está compuesta principalmente por fibras. También contiene células multipolares y se han observado células piramidales en la corteza entorrinal medial (Canto y cols., 2008).

Todas las capas de la corteza entorrinal proyectan a diferentes partes de la formación hipocampal, incluyendo el giro dentado, áreas CA3 CA2, CA1 y el subículo. Sus proyecciones terminan en dendritas de células principales y en interneuronas. En el giro dentado, éstas terminan en la capa molecular medial y superficial y provienen principalmente de la capa II, de células en forma de estrella, aunque también se ha observado que capas más profundas de la corteza entorrinal proyectan a la capa

molecular proximal del giro dentado (Deller y cols., 1996). El área II también proyecta al *Stratum lacunosum moleculare* en CA3 y CA2. La capa III proyecta a CA1 y el subículo y éstas últimas proyectan a áreas profundas de la corteza entorrinal (Canto y cols., 2008).

1.1.2 Giro dentado

El giro dentado es la primera vía de entrada de la corteza al hipocampo y está compuesto por tres capas: la capa molecular, la capa granular y la capa celular polimórfica o hilus.

La capa molecular se divide en proximal, medial y superficial y en ella se encuentran las dendritas de las células granulares; las principales células del giro dentado. Esta capa contiene pocas interneuronas GABAérgicas y algunas colinérgicas (Blaker y cols., 1988; Frotscher y cols., 2000; Romo-Parra y cols., 2003). Además, contiene axones provenientes de las células piramidales de la capa II de la corteza entorrinal, que en su conjunto son conocidos como vía perforante. Liberan glutamato como neurotransmisor y terminan en la capa molecular medial y superficial del giro dentado. El giro dentado recibe su mayor entrada sináptica de la corteza entorrinal a través de la vía perforante. La capa molecular proximal (más cercana al soma) recibe la entrada de fibras comisurales de asociación provenientes de las células musgosas en el hilus (Andersen, 2007). Esta capa también contiene algunos tipos de interneuronas.

Justo debajo de la capa molecular se encuentra la capa granular, formada por los somas de las células granulares. Las capas molecular y granular forman una estructura en forma de U en el hipocampo ventral, o V en el hipocampo dorsal que encierra a la

tercera capa, la capa celular polimórfica o hilus. Las células en esta última capa son variadas. Incluyen células musgosas que son glutamatérgicas (Soriano y Frotscher, 1994) y una amplia variedad de interneuronas GABAérgicas. Estas interneuronas, así como las células musgosas inervan a las células granulares.

Los axones de las células granulares se denominan fibras musgosas, son amielínicos y tienen tres tipos de terminaciones: 1) los botones gigantes, 2) las extensiones filopodales que se originan en los botones gigantes, y 3) las varicosidades *en passant*. Los botones gigantes tienen un tamaño de 4 a 8 micrometros y terminan en las células musgosas del hilus y en las células piramidales de CA3, mientras que las extensiones filopodales y las varicosidades *en passant* (2-3 micrometros) inervan a interneuronas del hilus y CA3 (Acsády y cols., 1998). Las fibras musgosas corren a lo largo del área CA3, en el *stratum lucidum*, donde hacen sinapsis con las dendritas apicales de las células piramidales. Una célula piramidal del área CA3 puede recibir hasta 50 entradas sinápticas provenientes de las fibras musgosas (Amaral y cols., 1990; Claiborne y cols., 1986), mientras que las interneuronas reciben hasta 50 veces más contactos de las fibras musgosas comparado con las células piramidales de CA3 (Acsády et al., 1998b). Es por ello que se ha propuesto que los principales blancos sinápticos de las fibras musgosas son las interneuronas y no las células piramidales de CA3.

1.1.3 Hipocampo

El hipocampo se divide en tres áreas: CA3, CA2 y CA1. Sus células principales son las células piramidales, cuyos somas forman la capa piramidal que se extiende a todas las áreas del hipocampo. Por encima de la capa piramidal se extienden tres estratos: el *Stratum lucidum*, que corresponde únicamente al área CA3, el *Stratum radiatum* y el *Stratum lacunosum moleculare*. En estos estratos se encuentran las dendritas apicales de las células piramidales. Por debajo de la capa piramidal se extiende el *Stratum oriens* y el *Stratum alveus*. En estos estratos se encuentran las dendritas basales de las células piramidales.

Las células piramidales del hipocampo también se encuentran inervadas por una variedad de interneuronas, y mientras que las primeras se encuentran organizadas en una sola capa, éstas últimas no tienen una organización aparente y se encuentran distribuidas en todas las áreas y estratos del hipocampo. Conforman aproximadamente el 10 por ciento de todas las células en el hipocampo y presentan una gran diversidad morfológica y funcional (Freund y Buzsáki, 1996; Somogyi y Klausberger, 2005).

El hipocampo se ha descrito tradicionalmente como un circuito trisináptico compuesto por sinapsis glutamatérgicas secuenciales donde el flujo de información es unidireccional. La corteza entorrinal proyecta hacia el giro dentado a través de la vía perforante. El giro dentado proyecta hacia CA3 a través de las fibras musgosas, y finalmente el área CA3 proyecta sus axones, denominados Colaterales de Schaffer hacia el área CA1 (ver figura 2).

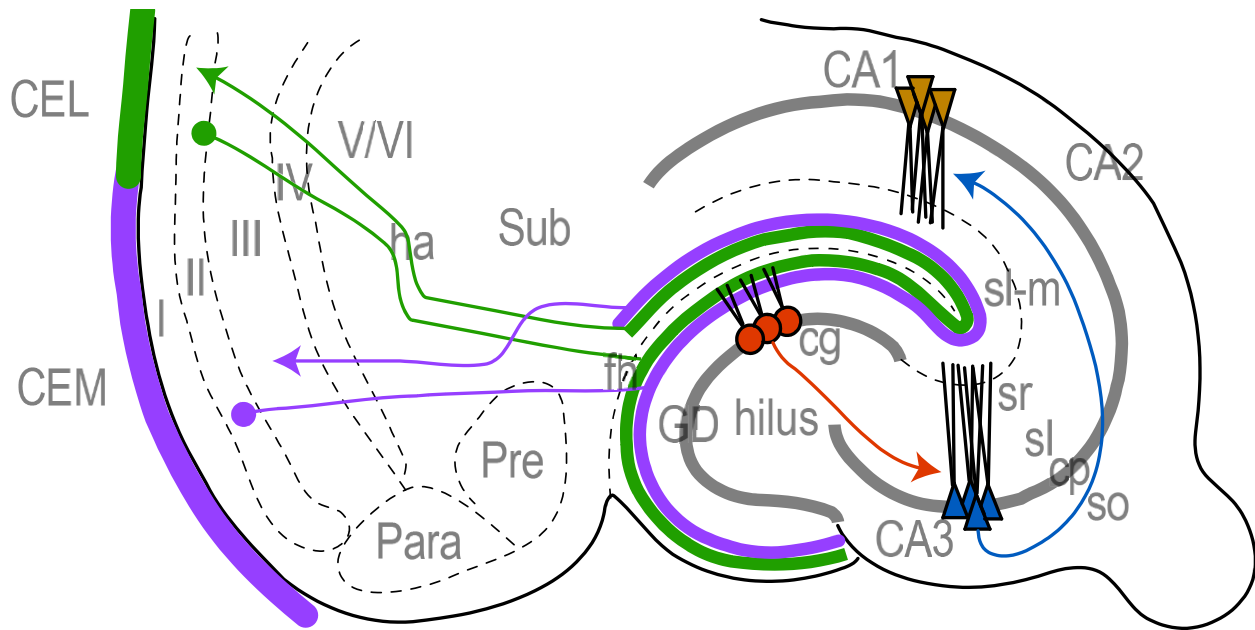


Figura 2. Esquema de las conexiones en el circuito trisináptico. Las células de la capa II tanto de la corteza entorrinal lateral (CEL) como de la corteza entorrinal medial (CEM) proyectan (vía perforante) a las células granulares del giro dentado, éstas a su vez proyectan (fibras musgosas) a CA3 y CA3 proyecta (colaterales de Schaffer) a CA1.

Hoy en día se sabe que el circuito es más complejo, pues las células piramidales de CA3 también reciben una entrada sináptica proveniente de la capa II de la corteza entorrinal que termina en la parte más distal de las dendritas apicales, esto es, en el *Stratum lacunosum moleculare*. Además de ser inervadas tanto por el giro dentado como por la corteza entorrinal, las células piramidales del CA3 se conectan extensamente unas con otras. Esto se conoce como las colaterales de asociación de CA3 (Ishizuka y cols., 1990; Li y cols., 1994). Esta extensa red de conexiones recurrentes ha dado pie a hipótesis del funcionamiento del área CA3 como una red auto-asociativa involucrada en el almacenamiento y evocación de la información (Bennett y cols., 1994; Rolls, 1996). Un

efecto secundario de esta extensa interconectividad es que el área CA3 es altamente excitable y susceptible de generar actividad epiléptica cuando la inhibición se suprime.

Por otro lado, los axones de las células piramidales de la parte proximal de CA3 (la más cercana al giro dentado) se arborizan extensamente en el hilus, haciendo contacto con interneuronas y células musgosas que, a su vez, hacen sinapsis con las células granulares del giro dentado (ver figura 3), por lo cual se ha sugerido que hay una proyección de CA3 hacia el giro dentado (Scharfman, 1994a, 1996; Scharfman, 2007). Finalmente, hay diversas interneuronas que modulan la transmisión sináptica en el circuito (Acsády y cols., 1998).

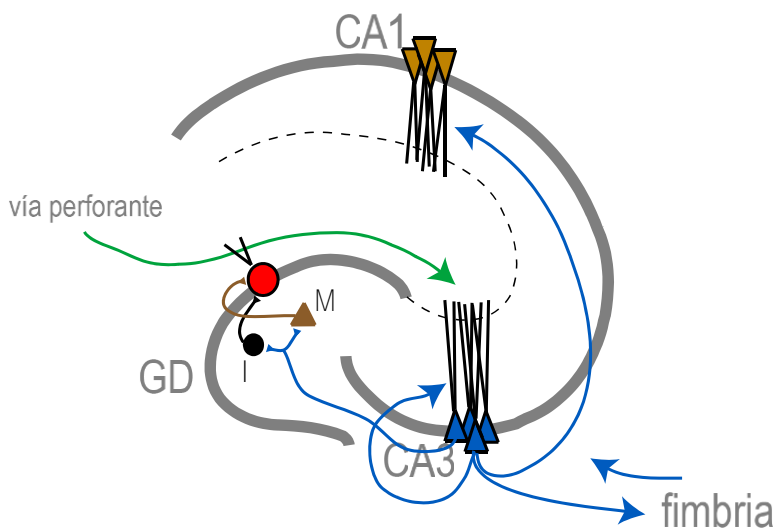


Figura 3. Conexiones alternas al circuito trisináptico. Además de proyectar y recibir conexiones de la fimbria, CA3 se conecta consigo mismo a través de fibras recurrentes. CA3 también proyecta hacia el hilus haciendo conexiones con interneuronas y células musgosas que al mismo tiempo establecen conexiones con células granulares del giro dentado. I, interneurona; M, célula musgosa.

Una de las características de las células piramidales del área CA3 es que son capaces de generar ráfagas de potenciales de acción, es decir, potenciales de acción de forma repetida en un intervalo corto de tiempo (aproximadamente 100 ms) montados en una onda despolarizante. Aunque las células piramidales del área CA1 también son capaces de generar disparos en ráfaga, éstos son más prominentes en CA3. Cada ráfaga sigue una regla de todo o nada en su generación y la frecuencia de disparo de los potenciales de acción que la componen oscila en el rango de 100 a 300 Hz (Traub y Miles, 2008; Wong y Prince, 1979, 1981)

1.1.4 Proyecciones de CA3 hacia el giro dentado

Evidencia anatómica

La evidencia anatómica indica que los axones de la parte proximal de CA3 proyectan colaterales hacia en el hilus (Ishizuka y cols., 1990; Li y cols., 1994). Li y cols. (1994) encontraron que la mayoría de las colaterales recurrentes de una célula piramidal en CA3 permanecen en el mismo sub-campo (CA3a, b o c) en que se encuentra la célula de la cual provienen. Todas las células que registraron proyectaban algunas colaterales al hilus. Las células piramidales de la parte proximal de CA3 (CA3c, la más cercana al giro dentado) presentaron numerosas proyecciones al hilus. Una célula piramidal de esta región del hipocampo dorsal cruzó la capa granular y terminó en la parte proximal de la capa molecular del giro dentado, mientras que varias células piramidales del hipocampo ventral, de igual forma, cruzaron la capa granular y terminaron en la parte proximal de la capa molecular del giro dentado, sugiriendo una proyección de CA3 hacia el giro

dentado. También encontraron distribuciones concentradas de fibras colaterales de CA3, lo cual sugiere que algunas células reciben una mayor inervación que otras.

Evidencia funcional

El estudio de una proyección funcional de CA3 al giro dentado provino de la observación de despolarizaciones simultáneas de células piramidales y células musgosas en presencia de antagonistas de receptores GABA_A. Dada la proximidad de estos dos tipos de células, era posible que dicha interacción fuera mediada por transmisión efáptica. Sin embargo, al bloquear los receptores AMPA/kainato, se observó un decremento en la amplitud de los potenciales postsinápticos excitadores en las células granulares del giro dentado, lo cual sugería una proyección polisináptica excitadora entre CA3 y el giro dentado mediada por las células musgosas (Scharfman, 1994a).

1.2 Oscilaciones rápidas (100 – 200 Hz) y ultra-rápidas (250 – 600 Hz)

Además de las bandas de oscilación ampliamente estudiadas (0.1 – 100 Hz), existen oscilaciones de mayor frecuencia denominadas oscilaciones rápidas y ultra-rápidas. Estas oscilaciones normalmente son transitorias y de corta duración. A las oscilaciones rápidas se les denomina *ripples* y fueron descubiertas en el hipocampo de la rata. Ocurren cuando ésta se encuentra en reposo, tomando agua o acicalándose. Tienen una frecuencia de oscilación de 100 a 200 Hz y normalmente se les encuentra superpuestas en una onda aguda de mayor amplitud con un componente espectral de

aproximadamente 1 Hz; de ahí que se les conozca como *Sharp-wave ripples* (Buzsáki, 1989; ver figura 4).

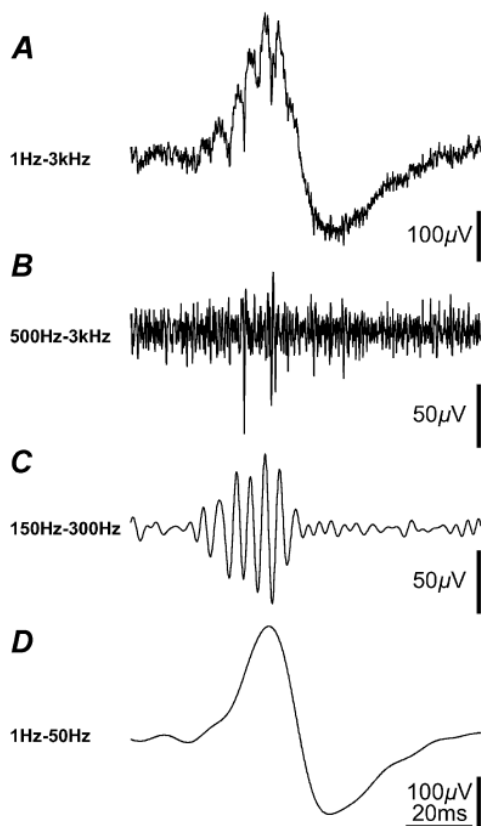


Figura 4. Componentes de frecuencia de los *Sharp-wave ripples*. En A se muestra un trazos crudo de un *Sharp-wave ripple* registrado en la capa piramidal de CA1. En B se muestra actividad unitaria cuando se filtra la actividad de alta frecuencia. En C se usó un filtro pasabandas para mostrar la actividad osciladora característica de los ripples. En D se muestra la actividad de baja frecuencia que constituye a la onda aguda. Tomado de Maier y cols., 2003.

En cambio, las oscilaciones ultra-rápidas presentan una frecuencia de oscilación de 250 a 600 Hz. Ocurren de forma normal en la neocorteza y, en dicho caso, se relacionan con el procesamiento de información sensorial (Barth, 2003). Sin embargo, su ocurrencia en otras áreas como el hipocampo se relaciona con la epileptogénesis (Engel y cols., 2009;

Jiruska y cols., 2010), por lo cual han sido consideradas un biomarcador de focos epilépticos (Jacobs y cols., 2009, 2010). A este tipo de oscilaciones se les denomina *fast ripples*.

1.2.1 Mecanismos subyacentes de las oscilaciones rápidas (100 – 200 Hz)

Este tipo de oscilaciones se inicia en el sistema de fibras colaterales recurrentes de CA3 y se propaga a CA1, subículo, parasubículo y corteza entorrinal. Es el más sincrónico ya que varios miles de neuronas disparan sincrónicamente en una ventana temporal menor a cinco milisegundos. La evidencia experimental indica que contribuyen a la consolidación de la memoria al transferir la información del hipocampo a la neocorteza durante periodos de inactividad, o bien, durante el sueño (Buzsáki, 1989; Foster y Wilson, 2006).

Durante los *Sharp-wave ripples* se incrementa la sincronía tanto de las células piramidales como de las interneuronas; sin embargo, el nivel de excitación es mayor que el de inhibición y éste último no es capaz de contrarrestar al primero, lo cual resulta en una elevada excitación transitoria que aparece como una onda aguda (Ylinen y cols., 1995). Las ondas agudas en el área CA1 reflejan la activación de dendritas apicales y basales que es causada por la actividad sincrónica de las colaterales de Schaffer (Ylinen y cols., 1995).

Los *ripples* no son una respuesta pasiva a impulsos de alta frecuencia provenientes del área CA3, sino que son generados por las células piramidales del área CA1. En una primera instancia, la actividad sincrónica proveniente de CA3 resulta en una

fuerte despolarización de las dendritas de las células piramidales de CA1. En una segunda instancia, la tasa de disparo de las interneuronas incrementa considerablemente, principalmente de las interneuronas en canasta y de las interneuronas en candelabro; pueden mantener una frecuencia de hasta 200 Hz de forma transitoria (Ylinen y cols., 1995). Estas polarizaciones antagónicas compiten entre sí, generando fluctuaciones rápidas del potencial de membrana alrededor del potencial de equilibrio del cloro a través de la activación de receptores GABA_A en células piramidales del área CA1 (Ylinen y cols., 1995). Las interneuronas encadenan a las células piramidales de CA1 en una oscilación transitoria de alta frecuencia y ajustan el tiempo de disparo de los potenciales de acción de las células piramidales (Ylinen y cols., 1995).

1.2.2 Mecanismos subyacentes de las oscilaciones ultra-rápidas en el hipocampo (250 – 600 Hz)

La pérdida neuronal es un fenómeno normalmente observado en pacientes con esclerosis y epilepsia del lóbulo temporal y algunos estudios lo han relacionado con la aparición de *fast ripples* (Staba y cols., 2007). Sin embargo, esta no es una condición necesaria para su ocurrencia, ya que pueden ser inducidos mediante la administración de la toxina del tétanos en modelos animales de epilepsia sin que haya pérdida neuronal (Jiruska y cols., 2010).

La génesis de estas oscilaciones aún se desconoce; sin embargo, diversos estudios han descrito su mecanismo en modelos animales de epilepsia. A diferencia de los *Sharp-wave ripples*, que son oscilaciones de alta frecuencia espacial y temporalmente coordinadas, los *fast ripples* son generados por pequeños grupos de

neuronas principales que disparan ráfagas de potenciales de acción fuera de fase unos con otros y que no dependen de mecanismos de inhibición (Le Van Quyen y cols., 2008). La inhibición mantiene la actividad de alta frecuencia circunscrita a sitios focales; sin embargo, no es necesaria para su generación (Bragin y cols., 2002).

Las células piramidales de las áreas CA3 y CA1 del hipocampo pueden disparar ráfagas de potenciales de acción tanto por mecanismos intrínsecos como por mecanismos sinápticos, de forma espontánea o ante la inyección de corriente (Cohen y Miles, 2000; Wong y Prince, 1981). Tienen una frecuencia de disparo de 100 a 300 Hz, por lo que una hiper-sincronización de las células piramidales no explicaría frecuencias de oscilación de hasta 600 Hz (Köhling y Staley, 2011). Sin embargo se ha propuesto que los desfases entre los potenciales de acción de los diferentes grupos neuronales pueden generar componentes armónicos y de alta frecuencia (Foffani y cols., 2007).

En el presente trabajo de tesis reportamos que las oscilaciones de muy alta frecuencia pueden inducirse en un corto plazo (1-2 horas) después de una lesión mecánica puntual en la corteza entorrinal que no involucra al hipocampo (Ortiz y Gutiérrez, 2015). Se desconoce el mecanismo por el cual esta lesión genera oscilaciones de muy alta frecuencia; sin embargo, la incubación del tejido en líquido cefalorraquídeo artificial alto en magnesio y bajo en calcio, o libre de sodio, inmediatamente después de realizar la lesión previene su generación, lo que indica que son dependientes de actividad. Recientemente se reportó la existencia de proyecciones recíprocas inhibitorias entre la corteza entorrinal y el hipocampo que coordinan la actividad entre estas dos estructuras (Basu y cols., 2016; Melzer y cols., 2012). La disección de estas proyecciones

por la lesión presumiblemente ocasiona un desarreglo en la actividad coordinada del hipocampo y, por ende, su desinhibición.

En la literatura hay diversos estudios que describen cómo el bloqueo de los receptores GABA_A en rebanadas de hipocampo desinhibe al área CA3 y provoca el inicio de ráfagas de potenciales de acción que se propagan hacia el giro dentado. Se describió que al bloquear los receptores ionotrópicos a glutamato AMPA y kainato, la actividad desaparece, lo cual sugiere una vía de propagación de CA3 al giro dentado mediada por receptores glutamatérgicos y que se encuentra enmascarada por la inhibición (Scharfman, 1994a).

1.2.3 Sincronización de la actividad eléctrica osciladora entre el giro dentado y el hipocampo

Tanto el giro dentado como las áreas CA3-CA1 del hipocampo han sido descritas como osciladores independientes capaces de generar oscilaciones gamma que se sincronizan entre sí durante periodos cortos de tiempo (Csicsvari y cols., 2003). Esto revela un acople fisiológico entre la actividad osciladora del giro dentado y el hipocampo. Este acople, se presume, es mediado por interacciones de red, ya que la fase de las ondas gama en CA3-CA1 correlaciona con el disparo de interneuronas en el giro dentado, además hay de un ligero desfase de las ondas gama en CA3-CA1 con respecto a las ondas gama en el giro dentado (Csicsvari y cols., 2003). Por otro lado, la potencia de las oscilaciones gama en el hipocampo correlacionan positivamente con la incidencia de oscilaciones de alta frecuencia (ripples) en el CA1, pues esta actividad influye directamente en la generación de potenciales de acción en ráfaga de CA3 (Sullivan y cols., 2011).

1.2.3.1 Interacciones efápticas

Los potenciales de campo pueden inducir una despolarización transmembranal en las neuronas, fenómeno conocido como transmisión efáptica. Mientras el potencial de campo difiere de sitio a sitio, se puede formar un campo eléctrico. Dicho campo tiene efectos en el potencial de membrana de las neuronas vecinas a través de un acople efáptico (ver figura 5). La magnitud de un acople efáptico es relativamente pequeña y la influencia que puede tener sobre una célula es mínima. Sin embargo, si cada célula dispara un potencial de acción, la suma de estas respuestas puede llegar a ser significativa.

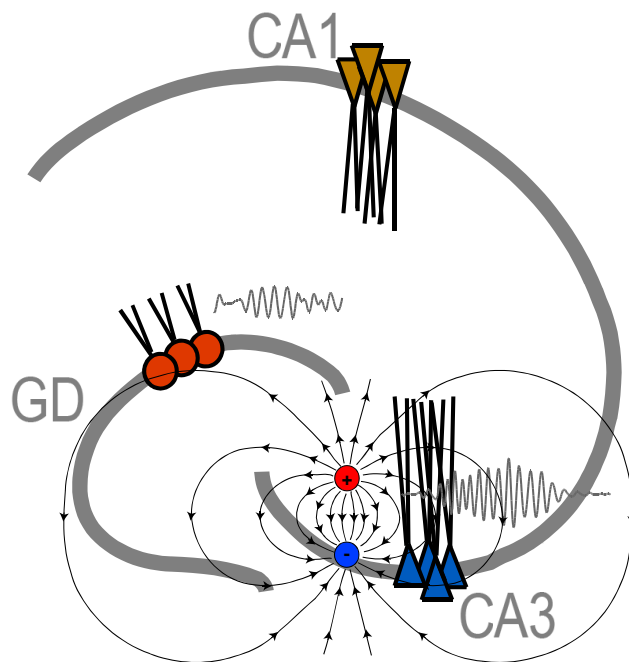


Figura 5. Esquema de un posible acople efáptico entre CA3 y el giro dentado. Las neuronas activas en CA3 generan campos eléctricos que pueden inducir el flujo de corriente en células granulares del giro dentado sin ningún acople eléctrico directo (p. ej. uniones comunicantes) o transmisión química. Este acople es indirecto y ocurre a través de campos eléctricos en el espacio extracelular.

Las interacciones efápticas ocurren además de cualquier acople sináptico, sea éste químico o eléctrico. A pesar de que, bajo condiciones fisiológicas, las interacciones efápticas no pueden generar potenciales de acción cuando la membrana se encuentra en reposo, las interacciones efápticas pueden afectar el curso temporal de disparo de neuronas individuales que están siendo despolarizadas (Chan y cols., 1988; Chan y Nicholson, 1986; Ozen y cols., 2010; Radman y cols., 2007), así como el disparo de poblaciones neuronales bajo condiciones patológicas (Deans y cols., 2007; Ghai y cols., 2000; Jefferys y Haas, 1982; Noebels y Prince, 1978).

El efecto del acople efáptico depende de la fuerza y frecuencia del campo eléctrico, siendo los campos eléctricos de mayor fuerza y menor frecuencia los que mayores efectos tienen en el potencial transmembranal (Deans y cols., 2007).

1.2.3.2 Mecanismos de acople eléctrico

Las uniones comunicantes son un mecanismo que también facilita la sincronía tanto en interneuronas como en células principales (Draguhn y cols., 1998; Galarreta y Hestrin, 2001; Katsumaru y cols., 1988; Schmitz y cols., 2001). Éstas son uniones de baja resistencia que median el acople entre células adyacentes del mismo tipo, y en algunos casos entre células principales de diferentes estructuras (Hamzei-Sichani y cols., 2012;

Vivar y cols., 2012), como ha sido reportado entre CA3 y las fibras musgosas del giro dentado (ver figura 6), y facilitan la ocurrencia sincrónica de espigas de forma uni o bidireccional, dependiendo de la naturaleza del acople.

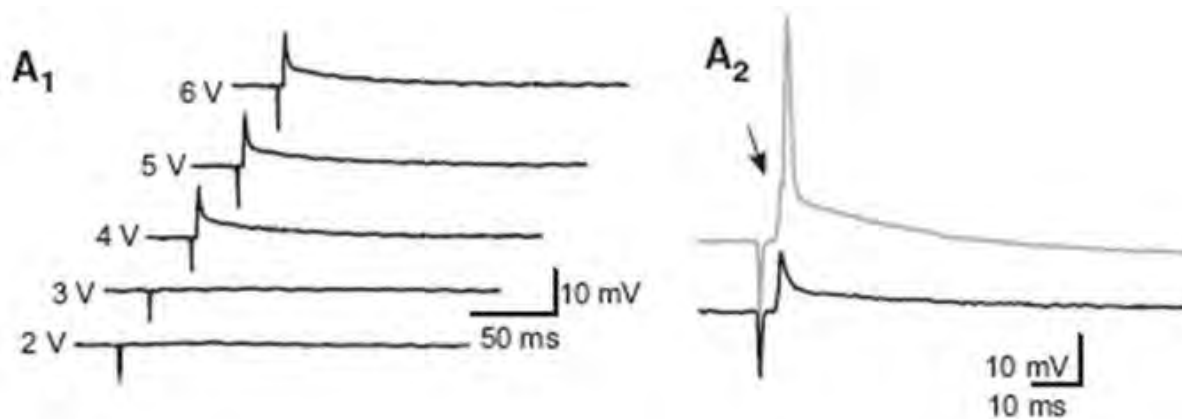


Figura 6. Acople eléctrico entre las fibras musgosas y células piramidales de CA3. A1) La estimulación eléctrica de las fibras musgosas a diferentes intensidades evoca una espícula, respuesta de todo o nada mediada por un acople eléctrico, en una célula piramidal durante el bloqueo de la transmisión química. A2) Intensidades más fuertes provocan una potencial de acción en la célula piramidal que es precedido por la espícula (flecha). El acople eléctrico tiene una cinética más rápida que la respuesta química. Tomada de Vivar y cols. 2012.

1.2.4 Medidas de acople de la actividad eléctrica osciladora entre dos estructuras cerebrales

Las formas en que dos o más estructuras cerebrales se encuentran relacionadas son diversas. La conectividad estructural es una de ellas e implica una conexión física que une a dos neuronas, por ejemplo una sinapsis química o eléctrica. Por otro lado pueden existir conexiones funcionales, no necesariamente estructurales, que implican una dependencia estadística en la actividad de dos neuronas sin asumir nada acerca de cómo se da esta dependencia (Feldt y cols., 2011). Dos neuronas se encuentran

funcionalmente conectadas si podemos predecir el disparo de una con base en el disparo de la otra. Las conexiones funcionales no implican relaciones de causalidad. Si la activación de dos neuronas se encuentra temporalmente correlacionada, esto no quiere decir que la activación de una sea necesaria para la activación de la otra o que la estimulación de la primera provocará el disparo en la segunda. La conectividad funcional se encuentra determinada por el disparo sincrónico de las neuronas.

Existe un tercer tipo de conectividad: la conectividad efectiva. La conectividad efectiva se refiere a la influencia directa, y por tanto causal, que una neurona tiene sobre otra. Una neurona puede causar el disparo de otra, ya sea mediante una conexión mono o poli-sináptica, y la perturbación de la actividad de una afecta la actividad de la otra.

La dependencia de un tren de espigas de otro emerge de múltiples procesos fisiológicos; por ejemplo, la interacción y entradas comunes. La posibilidad de combinaciones es virtualmente interminable. La integración funcional usualmente se infiere usando correlaciones de medidas de la actividad neuronal de diferentes áreas cerebrales. La conectividad funcional denota simplemente la presencia de dichas correlaciones. Sin embargo; estas correlaciones pueden emerger de distintas formas, por ejemplo, de respuestas evocadas por un estímulo común o reflejar oscilaciones inducidas por estímulos mediados por conexiones sinápticas.

No existe un consenso para caracterizar el acople neuronal entre dos poblaciones de neuronas. La sincronización de la actividad de dos poblaciones de neuronas puede ser generada por una variedad de factores y dependiendo del tipo de las interacciones se han utilizado diversas medidas. Dichas interacciones pueden ser lineales, para lo cual se ha utilizado medidas de correlación cruzada y coherencia; o bien, las interacciones

pueden ser no lineales, para lo cual se han utilizado medidas de información mutua y correlación no lineal. Todas estas medidas arrojan resultados muy similares, siendo las no lineales las más sensibles (David y cols., 2004). Las simulaciones de Montecarlo son también una alternativa a los métodos lineales.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El giro dentado es capaz de generar oscilaciones ultra-rápidas por manipulaciones farmacológicas o por el aumento en la concentración iónica del potasio extracelular que modifican el comportamiento de la red tanto en CA3 como en el giro dentado.

En un modelo de desinhibición del hipocampo por lesión cortical, las oscilaciones ultra-rápidas registradas en el giro dentado sólo ocurren cuando ocurren en CA3 y, por tanto, presentan un desfase con respecto a éste último. Esto sugiere una propagación de esta actividad de CA3 al giro dentado, aparentemente en contra del sentido en el que las sinapsis entre estas dos estructuras funcionan. En este modelo, la ocurrencia de oscilaciones ultra-rápidas en CA3 parece ser una condición necesaria, pero no suficiente para que ocurran en el giro dentado, ya que pueden ocurrir únicamente en CA3 y no en el giro dentado. En el presente trabajo se busca responder si las oscilaciones ultra-rápidas registradas en CA3 originan a las oscilaciones registradas en el giro dentado, así como elucidar el posible mecanismo.

3. HIPÓTESIS

Dada la evidencia de conexiones monosinápticas y polisinápticas químicas, así como monosinápticas eléctricas de CA3 hacia el giro dentado, es posible que la actividad entre CA3 y el giro dentado fluya de forma bidireccional y la actividad de alta frecuencia se propague de CA3 al giro dentado.

4. OBJETIVO

Determinar si las oscilaciones ultra-rápidas originadas en el área CA3 se propagan hacia el giro dentado, así como el posible mecanismo de propagación.

4.1 Objetivos particulares

1. Determinar, mediante un modelo de lesión cortical que desinhibe el área CA3, la posible propagación de oscilaciones ultra-rápidas de CA3 hacia el giro dentado.
2. Determinar la contribución de la transmisión química y eléctrica en la propagación de esta actividad.
3. Determinar si existen conexiones funcionales entre el giro dentado y CA3 y si son bidireccionales.

5. MÉTODOS

5.1 Preparación *in vitro*

Se usaron ratas Wistar de 25 a 30 días de edad que se anestesiaron con pentobarbital sódico (50 mg/kg). Una vez retirados los huesos temporal, occipital y parietal, se hizo una lesión *in situ* en la corteza entorrinal, paralela al eje horizontal con tijeras de microcirugía en las siguientes coordenadas (de Bregma): anteroposterior, de -5.3 a -6.8; lateral, de la superficie del cerebro a 6; altura, entre 4 y 6, ver (figura 7). Posteriormente la rata fue decapitada y el cerebro fue removido rápidamente y colocado en líquido cefalorraquídeo artificial (LCRA) con sacarosa a una temperatura de aproximadamente 4° C. La composición del líquido cefalorraquídeo artificial fue la siguiente (en mM): sacarosa, 210; KCl, 2.8; MgSO₄, 4; NaH₂PO₄, 1.25; NaHCO₃, 26; glucosa, 10; CaCl₂, 1; y MgCl₂, 1; a 4° C; pH 7.35. Éste se mantuvo oxigenado todo el tiempo con carbógeno (O₂, 95%; CO₂, 5%). Posteriormente se prepararon rebanadas horizontales de hipocampo-corteza entorrinal de un grosor de 350 micrómetros con un vibratomo (Leica VT1200) manteniendo el cerebro sumergido en LCRA con sacarosa a una temperatura de 4° C. Tras la obtención de las rebanadas, éstas fueron transferidas a un contenedor con pozos individuales e incubadas a 37° C con LCRA normal oxigenado con la siguiente composición (en mM): NaCl, 129; KCl, 3; NaH₂PO₄, 1.25; MgSO₄, 1.8; CaCl₂, 1.6; glucosa, 10; y NaHCO₃, 20; pH 7.35, hasta ser usadas para los registros electrofisiológicos.

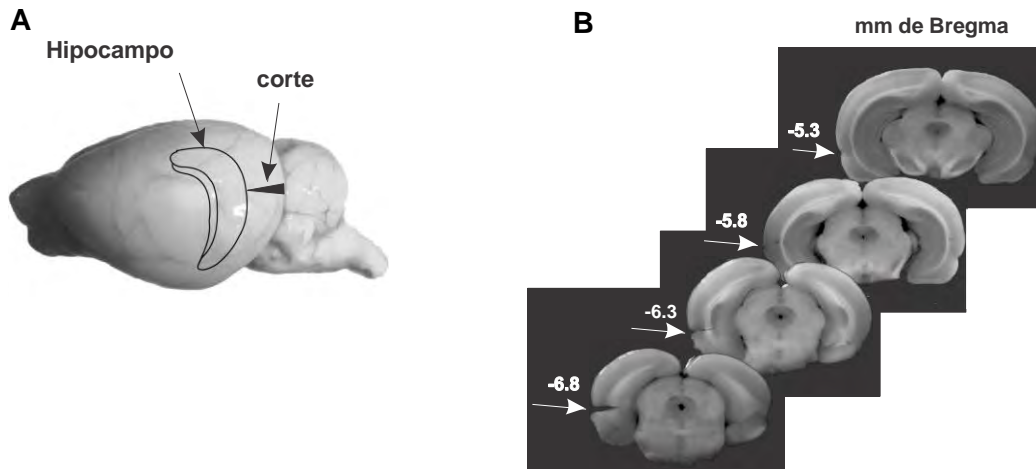


Figura 7. Lesión cortical que desinhibe al hipocampo. A) Fotografía de un cerebro de rata con un esquema que muestra el hipocampo y el sitio donde se realizó la lesión en la corteza entorrinal. B) Fotografías de una serie de cortes en la dirección anteroposterior que muestran la extensión de la lesión. Nótese que ésta no alcanza al hipocampo.

5.2 Registros electrofisiológicos

Se realizaron registros electrofisiológicos (2 horas después de haber realizado la lesión) con microelectrodos de burosilicato (Ortiz y Gutiérrez, 2015) llenos con NaCl (155 mM) para registrar de forma simultánea la actividad extracelular tanto de la capa piramidal de CA3 como de la capa granular del giro dentado. Las rebanadas fueron registradas en una cámara de registro de interfase líquido/aire y las señales fueron digitalizadas a 10 KHz (Digidata, Molecular Devices) y adquiridas con Axoscope y PClamp 9 (Molecular Devices). Se usó un amplificador de 2 canales (Neuro Data, Inc) y las señales adquiridas fueron analizadas con Matlab. Una vez establecido el modelo de desinhibición, se realizaron registros electrofisiológicos de campo con una matriz multielectrodo de alta densidad (3-Brain Co.) que permite el registro simultáneo con 4096

electrodos a una frecuencia de muestreo de 7 kHz (ver figura 8). Las rebanadas fueron perfundidas constantemente con LCRA normal oxigenado a una velocidad de 12 ml/min y una temperatura de $34 \pm 0.5^\circ \text{C}$. Se registró actividad espontánea de forma continua durante 5 minutos. Los registros también se realizaron con una solución baja en calcio con la siguiente composición (en mM): NaCl, 125; KCl, 5; NaH_2PO_4 , 1.25; CaCl_2 , 0.2; MgCl_2 , 1; NaHCO_3 , 26; y glucosa, 10, seguida de la aplicación de mefloquina ($10 \mu\text{M}$), un bloqueador de uniones comunicantes conformadas por la conexina 36.

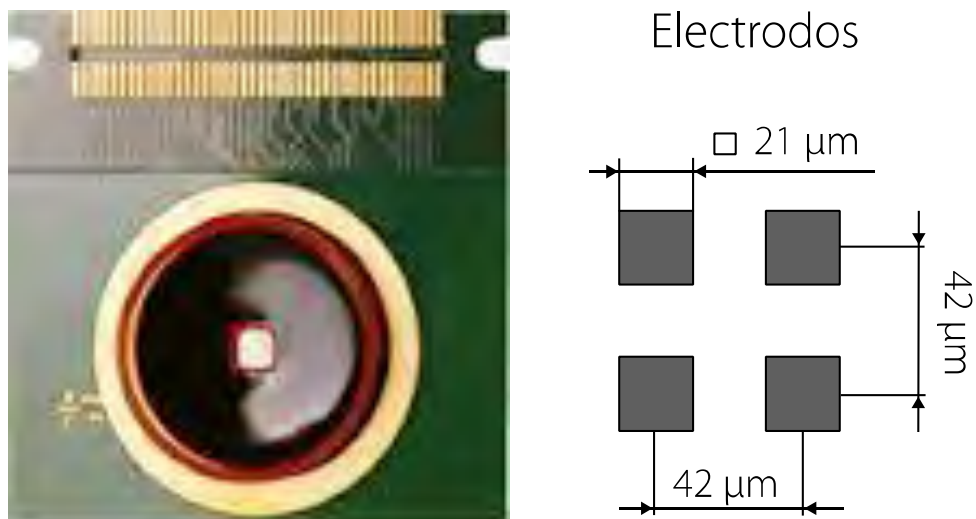


Figura 8. Cámara de registro. La cámara de registro viene integrada en un chip C-MOS. El área activa se encuentra al centro en la fotografía de la izquierda y está conformada por 4096 electrodos dispuestos en una matriz de 64×64 . Cada electrodo registra cambios en la actividad eléctrica del tejido a una frecuencia de muestreo de 7 KHz. Los electrodos miden 21 micras por lado y la distancia del centro de uno a otro es de 42 micras como se muestra en el esquema de la derecha.

5.3 Procesamiento de los datos y análisis

5.3.1 Detección de electrodos con actividad de interés

Se define actividad de interés a la actividad periódica, de corta duración y que sobrepasa el nivel de ruido basal. Para identificar aquellos electrodos que registraron actividad de interés se midió la desviación estándar de la actividad registrada en cada uno de los 4096 electrodos en ventanas sucesivas de 50 milisegundos durante los 5 minutos de registro. Si la desviación estándar de la señal en una ventana dada sobrepasaba 2 desviaciones estándar respecto a la amplitud de la señal basal, las coordenadas del electrodo eran guardadas para análisis posteriores. Cabe notar que la señal no siempre es homogénea y la ventana puede coincidir con un momento en el que no se registra señal eléctrica. Esto se debe a que algunos electrodos no están en contacto con la solución durante o en algún momento del registro, normalmente por burbujas de aire. En este caso el valor de la señal es cero. La señal también puede saturarse por características intrínsecas al aparato de registro. En este caso la señal alcanza valores superiores a los 4000 μV . El ruido basal promedio es de -80 a 80 μV y en el tejido desinhibido ocurren eventos de alta frecuencia intermitentes cuya amplitud sobrepasa la del ruido basal.

Posteriormente se construyeron histogramas de la desviación estándar por ventana. Estos histogramas normalmente presentan 3 distribuciones, salvo en el caso de que no haya electrodos saturados o electrodos sin señal (ver figura 9).

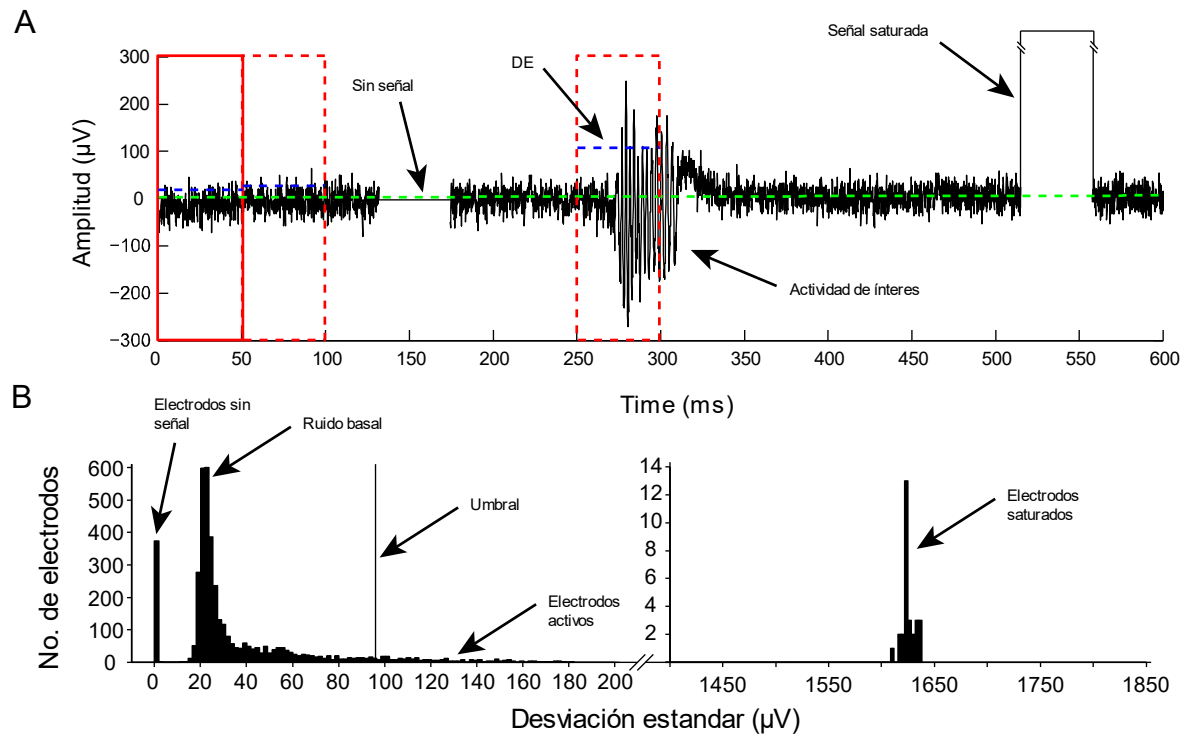


Figura 9. Detección de electrodos activos. A) Registro electrofisiológico que muestra las diferentes características de la señal. Se usan ventanas de 50 ms en cada electrodo para calcular la desviación estándar (DE) de la amplitud de la señal. La línea punteada verde indica le media y la líneas punteadas azules la DE en esa ventana. **B)** Histograma de las DE de todos los electrodos en una ventana donde ocurre actividad de interés. En el histograma se observan electrodos sin señal, electrodos con ruido basal, electrodos que detectan el evento y electrodos saturados.

Una de estas distribuciones corresponde a electrodos sin señal, otra a electrodos con señal, y la última a electrodos saturados. El umbral para detectar electrodos con actividad de alta frecuencia es igual al promedio de las DE en esa ventana más dos DE de ese promedio. Los electrodos saturados no se toman en cuenta ya que impiden observar claramente la actividad de fondo. Cuando se reestablecen a cero es posible observar claramente los electrodos que registran actividad de alta frecuencia (ver figura 10).

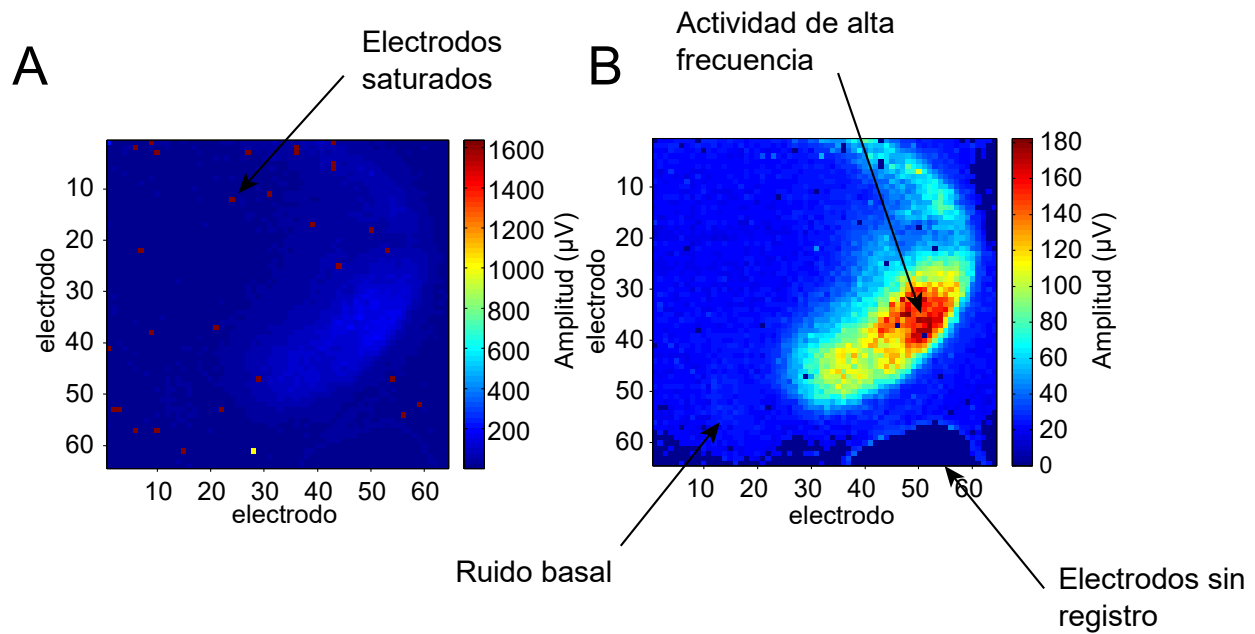


Figura 10. Ajuste de los electrodos saturados a cero. Dado que la amplitud de los electrodos saturados es muy grande, éstos ensombrecen el mapa de color de voltaje (A). B es el mapa de color de voltaje una vez que el valor de los electrodos saturados se ajusta a cero. Ahora es posible observar los electrodos que registran actividad de alta frecuencia, así como los electrodos sin señal. Nótese cómo los electrodos que registran actividad de alta frecuencia toman la forma del hipocampo.

En la figura 11 se muestran los electrodos que sobrepasan el umbral de detección. Hay muchos electrodos fuera de las áreas de interés, por lo que se seleccionan manualmente aquellos electrodos que registran la capa piramidal y todos sus estratos dendríticos

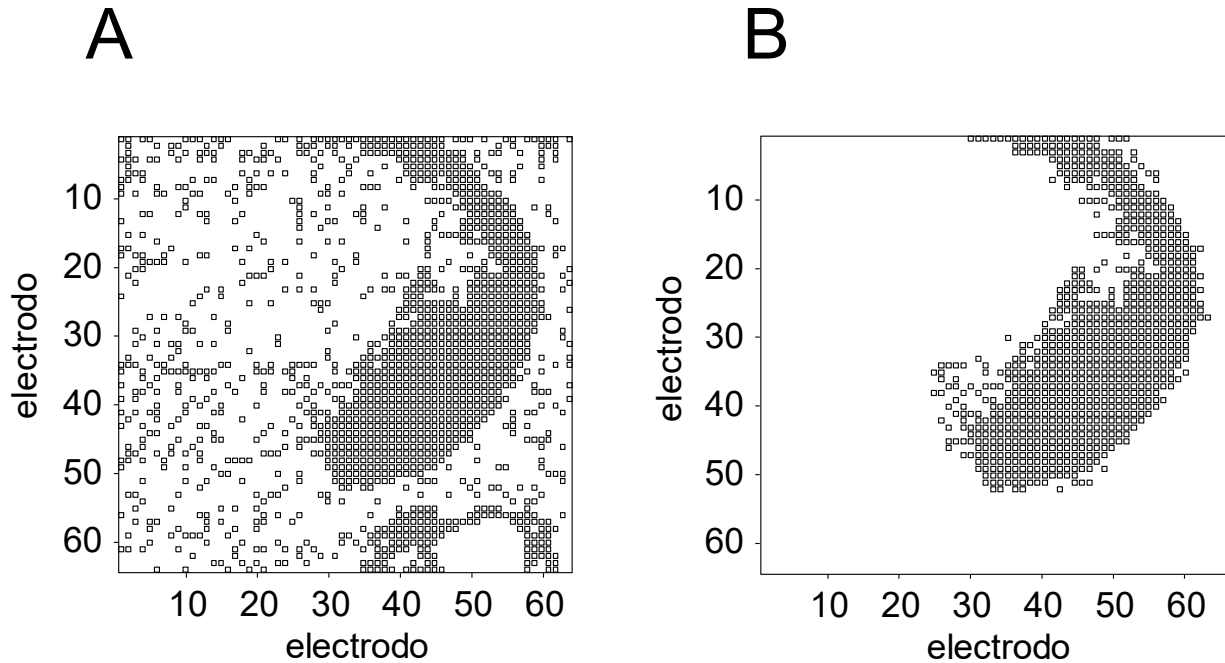


Figura 11. Selección manual de electrodos con actividad de alta frecuencia. A) Electrodoos que sobrepasan el umbral de detección. Nótese que hay electrodos que detectan una amplitud mayor a 2 DE en algún momento. Aquellos que no están en la capa piramidal del hipocampo o alguno de sus estratos son descartados. En B se muestra la selección manual de electrodos con actividad de alta frecuencia.

Las señales de alta frecuencia en el giro dentado no son inicialmente detectadas por su baja amplitud. Para poder detectarlas, se seleccionó un área que cubre al giro dentado (ver figura 12) y se ejecuta nuevamente el algoritmo descrito arriba únicamente para el área seleccionada, que modifica el umbral de detección selectivamente. Los electrodos detectados se cotejan con una fotografía de la rebanada y se seleccionan aquellos correspondientes a la capa granular del giro dentado e hilus.

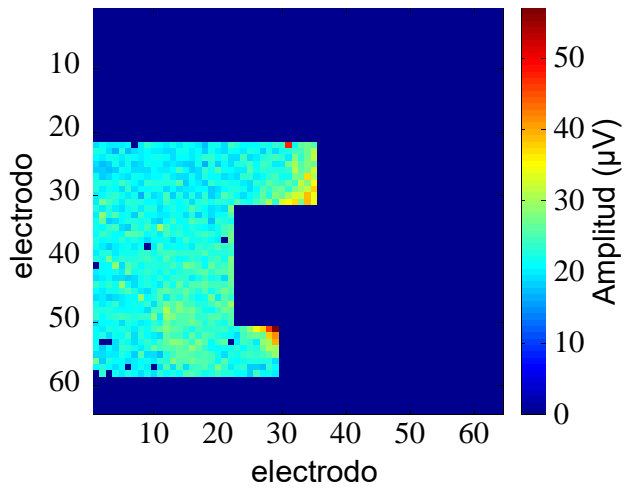
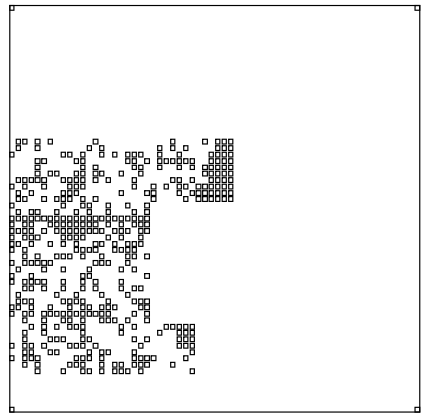
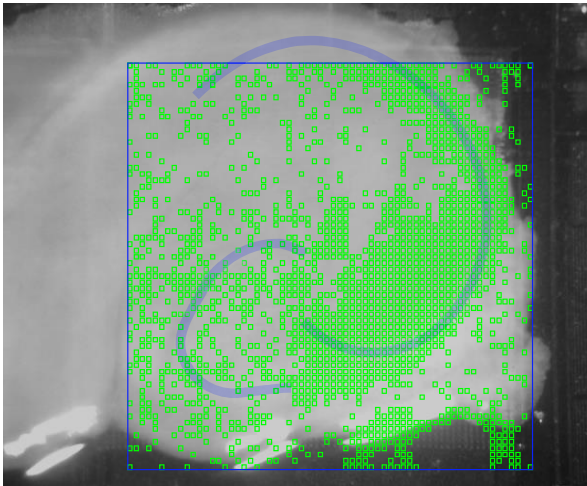
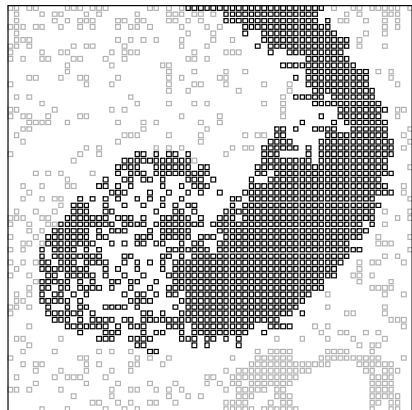
A**B****C****D**

Figura 12. Selección de electrodos activos en el giro dentado. A) Se selecciona un área que cubre al giro dentado para correr nuevamente el algoritmo de detección de actividad de alta frecuencia. B) Electrodo detectados por el algoritmo. C) Los electrodos detectados se cotejan con la fotografía de la rebanada correspondiente a ese experimento y se seleccionan manualmente aquellos correspondientes al giro dentado e hilus. D) Los electrodos seleccionados manualmente correspondientes al giro dentado, hilus e hipocampo se muestran en negro, mientras que los electrodos espurios detectados por el algoritmo se muestran en color gris.

La actividad de alta frecuencia tiene en promedio una amplitud de más de 200 μV en el hipocampo y es fácilmente discernible del ruido basal a simple vista, que es de aproximadamente 160 μV . Los electrodos activos se definen como aquellos electrodos cuya amplitud de la señal que registran es mayor al ruido basal y menor al ruido de saturación en algún momento del registro y forman parte de la segunda distribución en el histograma de la figura 9B y son separados por el umbral establecido. El ruido basal corresponde a desviaciones estándar menores de las señales registradas por electrodos que caen fuera del tejido y forman parte también de la segunda distribución en el histograma y caen al lado izquierdo del umbral establecido. El ruido de saturación corresponde a electrodos cuya desviación estándar de la amplitud de la señal que registran es considerablemente grande y se representa en la tercera distribución del histograma. Estos últimos electrodos pueden estar o no en contacto con el tejido.

Las señales de los electrodos correspondientes al ruido de saturación fueron descartadas para análisis subsecuentes. Posteriormente, se fijó un umbral de 2 desviaciones estándar sobre la desviación estándar promedio de cada segmento. Esto nos permitió descartar aquellos electrodos cuya señal correspondía al ruido basal. Los electrodos correspondientes a la capa piramidal y sus estratos dendríticos, hilus y capa granular fueron seleccionados manualmente.

5.3.2 Detección de oscilaciones ultra-rápidas

Para la detección de oscilaciones ultra-rápidas, primero se filtraron los trazos de cada electrodo seleccionado en la banda de frecuencia de 250 a 600 Hz (ver figura 13).

Posteriormente se rectificó la señal y se fijó un umbral de 5 desviaciones estándar con respecto al promedio de la señal y se contaron mínimo 6 picos consecutivos en una ventana de 200 milisegundos a partir del primer pico que cruzó el umbral. Esto para descartar artefactos debidos al ruido. 6 picos es el equivalente a 3 ciclos de una oscilación. Se escogió una ventana de 200 ms a partir del primer pico detectado en la cual sólo podía ocurrir un evento, ya que la duración promedio de un evento de alta frecuencia es de aproximadamente 50 ms, aunque hay algunos que duran hasta 150 ms y para evitar la detección del mismo evento 2 veces. Los eventos que cumplían con este criterio fueron cortados 150 ms antes y 150 ms después del primero pico que cruzó el umbral.

Posteriormente se determinó el tiempo exacto de inicio y final del evento de alta frecuencia. Para ello se rectificó el evento filtrado y se obtuvo la suma acumulada. Se removieron las tendencias de la suma acumulada y de la función resultante se determinó el mínimo y máximo global, que marcan el inicio y final del evento, respectivamente (ver figura 13 B).

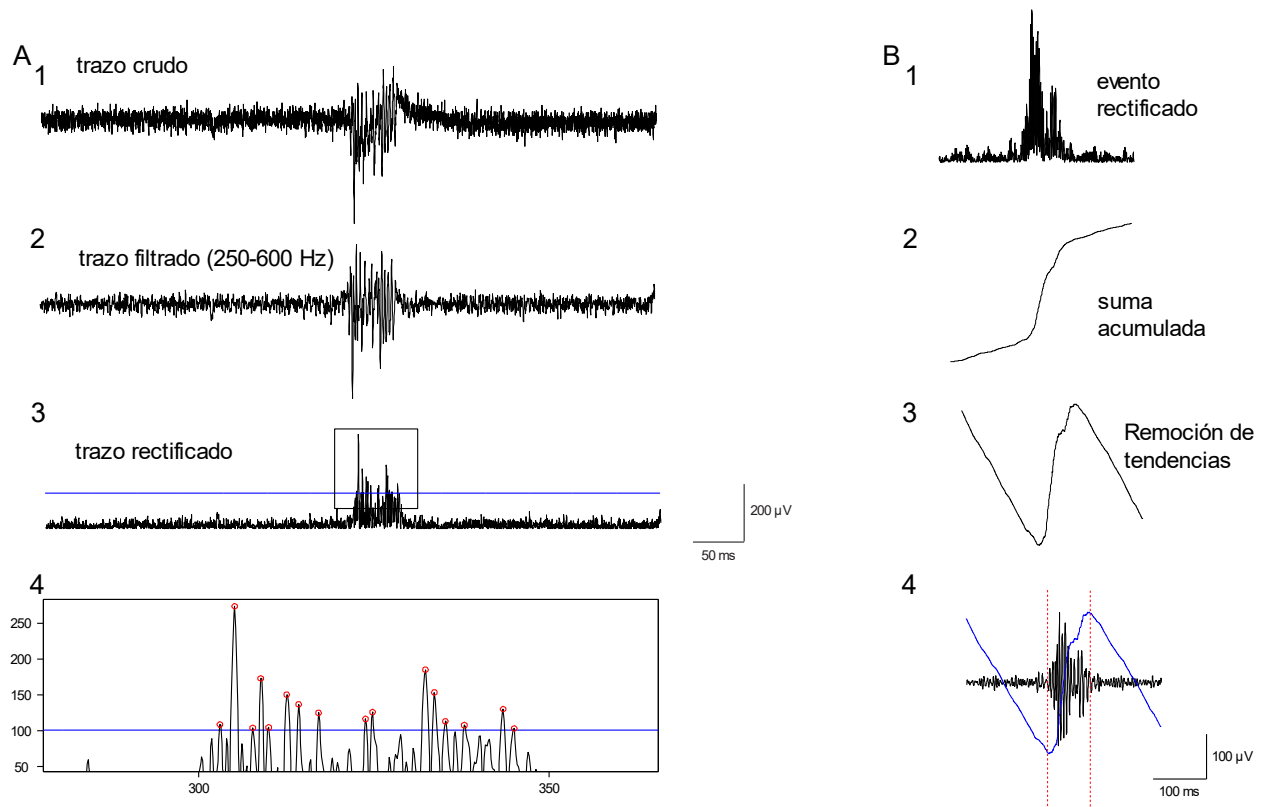


Figura 13. Detección de eventos de alta frecuencia y tiempos de inicio y final. En A1 se muestra el segmento de un trazo con un evento de alta frecuencia. A2 es el mismo segmento filtrado en la banda de 250 a 600 Hz. En este caso se filtró en esta banda para detectar posibles oscilaciones de alta frecuencia. A3 es el mismo trazo filtrado en A2, pero rectificado. A4 es la expansión del rectángulo en A3. Se estableció un umbral de 5 desviaciones estándar y los picos que rebasaran ese umbral fueron detectados. Si había mínimo 6 picos consecutivos en una ventana de 200 milisegundos, el segmento era cortado 150 milisegundos antes del primero pico que cruzaba el umbral y 150 ms después a partir del mismo pico. Una vez cortado el evento, éste se guarda tanto crudo como filtrado para después determinar el tiempo exacto del inicio y final del evento. Para ello se rectificó el evento filtrado (B1) y se obtuvo la suma acumulada (B2). Posteriormente se removieron las tendencias de la suma acumulada y se determinó el mínimo global de la función resultante, que marca el inicio del evento y el máximo global, que marca el final del evento (B4).

Con los tiempos exactos de inicio y término de los eventos pudimos determinar la duración de los mismos, así como las secuencias y tiempos de propagación de los diferentes eventos en las diferentes áreas y estratos.

5.3.3 Conectividad causal en términos de Granger

Uno de los objetivos fue determinar si los eventos de alta frecuencia se propagaban de CA3 al giro dentado. Para ello usamos la prueba de causalidad de Granger. Dadas dos series de tiempo, X_1 y X_2 , la prueba de causalidad de Granger determina si una influye en la otra. Se dice que X_2 causa a X_1 en términos de Granger si la inclusión de valores pasados de X_2 reduce el error de predicción de X_1 en un modelo de regresión lineal de X_1 y X_2 (no restringido) en comparación con un modelo que incluya únicamente valores pasados de X_1 (restringido; Granger, 1969). El término *causalidad* se usa estrictamente de acuerdo a esta descripción.

La dinámica temporal de dos series de tiempo $X_1(t)$ y $X_2(t)$, ambas de longitud T , puede ser descrita por un modelo autorregresivo binomial:

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

$$X_2(t) = \sum_{j=1}^p A_{21,j} X_1(t-j) + \sum_{j=1}^p A_{22,j} X_2(t-j) + \xi_2(t)$$

donde p es el máximo número de desfases ($p < T$), A es la matriz que contiene los coeficientes del modelo y ξ_1 , ξ_2 son los residuos (errores de predicción) para cada serie de tiempo. Si la varianza de ξ_1 (o ξ_2) se reduce por la inclusión de X_2 (o X_1) en la primera (o segunda) ecuación, entonces se dice que X_2 (o X_1) causa a X_1 (o X_2). Asumiendo que X_1 y X_2 son series de tiempo estacionarias (la media y la varianza no cambian), la

magnitud de esta interacción puede ser medida por el logaritmo del coeficiente de las varianzas del error de predicción para el modelo restringido (R) y no restringido (U):

$$F_2 \rightarrow 1 = \ln \frac{\text{var}(\xi_{1R(12)})}{\text{var}(\xi_{1U})}$$

donde $\xi_{1R(12)}$ se deriva del modelo omitiendo los coeficientes $A_{12,j}$ (para toda j) en la primera ecuación y ξ_{1U} se deriva del modelo completo.

La causalidad de Granger puede generalizarse a un modelo multivariado (condicional) donde la influencia de X_2 en X_1 se prueba en un contexto de múltiples variables adicionales $X_3 \dots X_n$. En dicho caso, X_2 causa a X_1 si se determina que X_2 reduce la varianza en el error de predicción de X_1 cuando todas las otras variables son incluidas en el modelo de regresión múltiple.

Una vez que las magnitudes de causalidad han sido calculadas es importante determinar su significancia estadística. Una interacción entre dos series de tiempo es significativa si los coeficientes A_{ij} correspondientes son significativamente diferentes de 0. Esto se puede determinar a través de la prueba F sobre la hipótesis nula $H_0 : A_{ij} = 0$. Esta prueba debe ser corregida para comparaciones múltiples. La más conservadora es la corrección de Bonferroni en la cual el umbral es $P_{\text{nom}} / n(n - 1)$, donde P_{nom} es el umbral nominal (típicamente 0.01 o 0.05). Una alternativa menos conservadora es el *false discovery rate* (FDR, por sus siglas en inglés) el cual controla la proporción esperada de hipótesis nulas rechazadas incorrectamente (error tipo I).

La prueba de causalidad de Granger ha sido usada satisfactoriamente en varios estudios para determinar conexiones neuronales (Gaillard y cols., 2009). En el caso de registros simultáneos con una matriz multielectrodo de alta densidad, se determinaron

los electrodos que registraron un evento dado y se cortaron 300 ms de la señal alrededor del evento (exactamente el mismo tiempo de registro para cada electrodo que registró el evento). Una vez hecho esto se determinaron las interacciones de causalidad en términos de Granger entre todos los pares de electrodos con un modelo condicional de regresión múltiple. Las funciones para el cálculo de la causalidad de Granger fueron escritas en Matlab y pertenecen a una librería de acceso libre desarrollada por Barnett y Seth (Barnett y Seth, 2014). Posteriormente se determinaron las interacciones correspondientes entre CA3 y giro dentado. Dado que la señal registrada en un electrodo del giro dentado podía ser causada en mayor o menor grado por varios electrodos de CA3, se escogió el par con una interacción más fuerte, medida en términos del valor de F. Entre mayor el valor de F, mayor la fuerza de la interacción.

5.3.4 Simulaciones de Montecarlo

Después del bloqueo de la transmisión sináptica química con una solución baja en calcio, permaneció actividad multiunitaria tanto en el giro dentado como en CA3. Para analizar esta actividad y determinar un posible acople eléctrico entre ambas estructuras, se usaron simulaciones de Montecarlo. En términos generales, las simulaciones de Montecarlo son un algoritmo computacional usado para generar distribuciones de probabilidad mediante el uso de valores aleatorios (Krauth, 2006).

Para la detección de espigas de la actividad multiunitaria primero se filtró la señal de cada electrodo en la banda de frecuencia de 600 a 3500 Hz y posteriormente se estableció un umbral fijo de 5 desviaciones estándar del promedio de la señal. Los

tiempos del valor máximo de cada espiga que cruzó el umbral fueron guardados para hacer las simulaciones de Montecarlo.

Se utilizó el generador de números aleatorios Marsenne Twister programado en C para revolver los intervalos inter espiga entre pares de trenes de espigas del giro dentado y CA3 que coincidían en una ventana de 5 ms. y generar la distribución de probabilidad de esos intervalos. Se escogió una ventana de 5 ms. ya que se ha reportado que la latencia entre un estímulo eléctrico en el giro dentado y la respuesta eléctrica en CA3 es de 3.9 ± 0.1 ms (Vivar y cols., 2012). La posición que ocupa el número real de espigas que coinciden en la ventana antes mencionada indica el grado de significancia dentro de la distribución y por lo tanto, una posible influencia de las espigas de un área sobre la otra. Se determinó una significancia de $p < 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1 Registro de oscilaciones ultra-rápidas en el hipocampo y en el giro dentado

La lesión de la corteza entorrinal *in situ* desinhibió al hipocampo y produjo oscilaciones ultra rápidas en el rango de 250 a 600 Hz tanto en el giro dentado como en CA3 de forma espontánea en los registros con la cámara de interfase líquido/aire (ver figura 14). Esta actividad fue dependiente de la actividad ya que si las rebanadas eran incubadas en una solución baja en calcio (0.2 mM) y alta en magnesio (7 mM) no se presentaba la desinhibición.

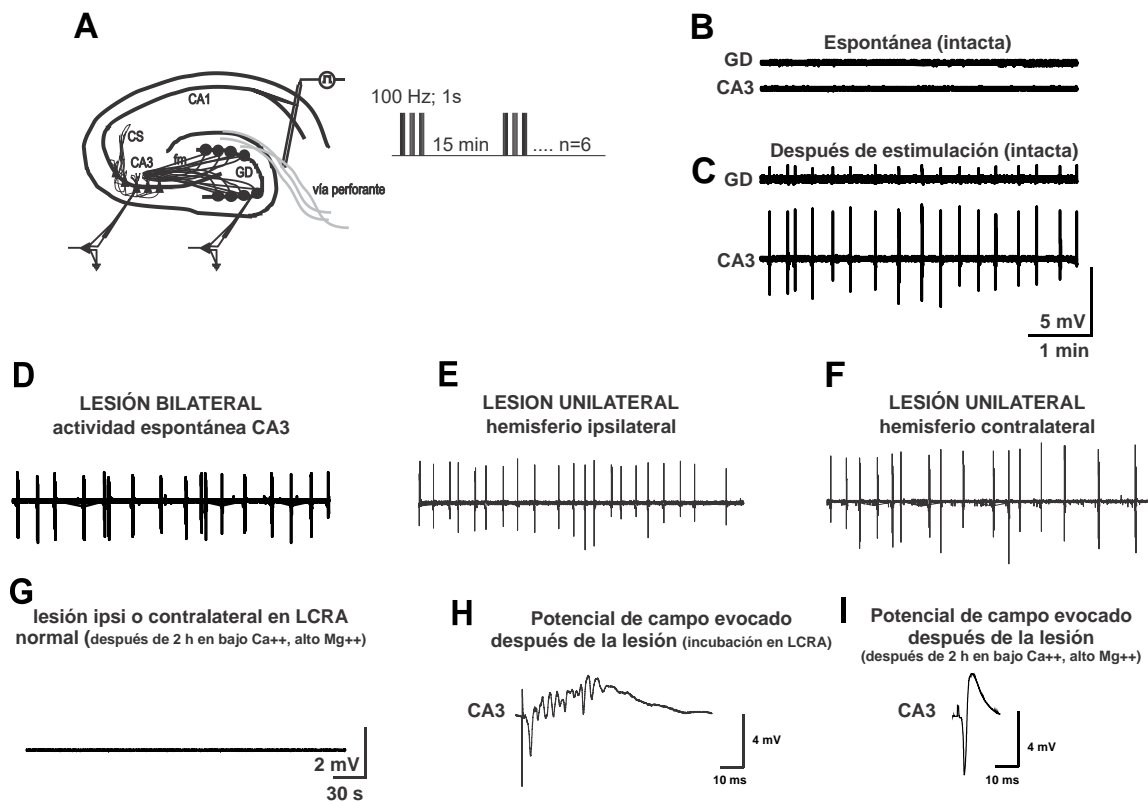


Figura 14. Registro de actividad espontánea antes y después de la lesión uni o bilateral de la corteza entorrinal. A) Esquema de una rebanada transversal del hipocampo donde se muestran los sitios de estimulación (vía perforante) y registro (giro dentado y CA3). B) Registro de actividad espontánea en la preparación intacta. C) Registro de actividad espontánea en la preparación intacta después de estimular a alta frecuencia. D) Registro de actividad espontánea en CA3 después de lesionar bilateralmente la corteza entorrinal. Obsérvese la aparición de eventos interictales después de la lesión. E, F) Registro de eventos interictales espontáneos en ambos hemisferios después de una lesión unilateral. G) La incubación de las rebanadas en LCRA con bajo calcio y alto magnesio durante 2 horas previene la aparición de eventos interictales. H) La estimulación del giro dentado evoca una respuesta epileptiforme en rebanadas de cerebros lesionados e incubadas en LCRA normal, mientras que la estimulación del giro dentado evoca una respuesta normal en rebanadas de cerebros lesionados en incubadas en bajo calcio y alto magnesio (I).

El filtrado de la señal y cómputo de espectros de potencia reveló que en los eventos interictales registrados y generados debido a la lesión de la corteza entorrinal se encontraban superpuestas oscilaciones de alta frecuencia en la banda de 250-600 Hz (ver figura 15).

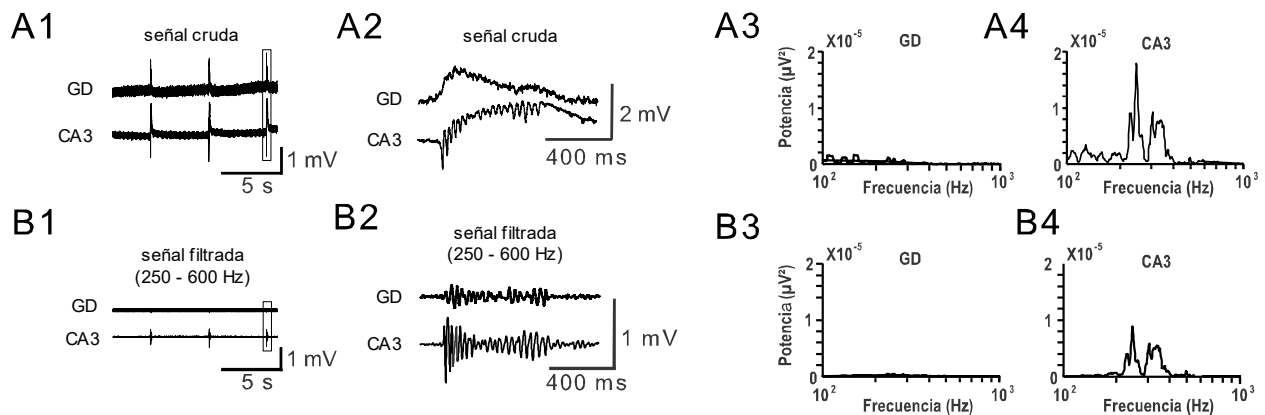


Figura 15. Registro de oscilaciones ultra rápidas en la cámara de interfase líquido aire. A1 muestra el registro simultáneo de eventos de alta frecuencia tanto en el giro dentado como en CA3. A2 es una ampliación del recuadro en A1. B1 y B2 muestran la misma señal que en A1 y A2, pero filtrada en el rango de 250 a 600 Hz. Nótese que permanece actividad osciladora tanto en CA3 como en el giro dentado. Los espectros de potencia en A3, A4, B3 y B4 confirman que se trata de oscilaciones ultra rápidas.

Por otro lado, en la figura 16 se muestra el registro de actividad espontánea control con la matriz de microelectrodos de alta densidad de una rebanada sin lesión. Nótese que el giro dentado permanece en su mayoría silente mientras que únicamente aparece actividad multiunitaria en la capa piramidal de CA3 y CA1. El análisis de la actividad registrada con la matriz de microelectrodos de alta densidad mostró que la desinhibición se expresa como generación de eventos de alta frecuencia de corta duración en la capa piramidal de CA3 y CA1 así como en todos sus estratos dendríticos desde el *Stratum lacunosum moleculare* hasta el *Stratum oriens* en 9 rebanadas obtenidas de 7 ratas, mientras que únicamente en 4 rebanadas, este tipo de actividad también se observó en la capa granular del giro dentado y el hilus (ver figura 17). Esta actividad de alta frecuencia normalmente se observa 2 horas después de haber realizado la lesión y 5 minutos después de colocar la rebanada en la matriz de registro.

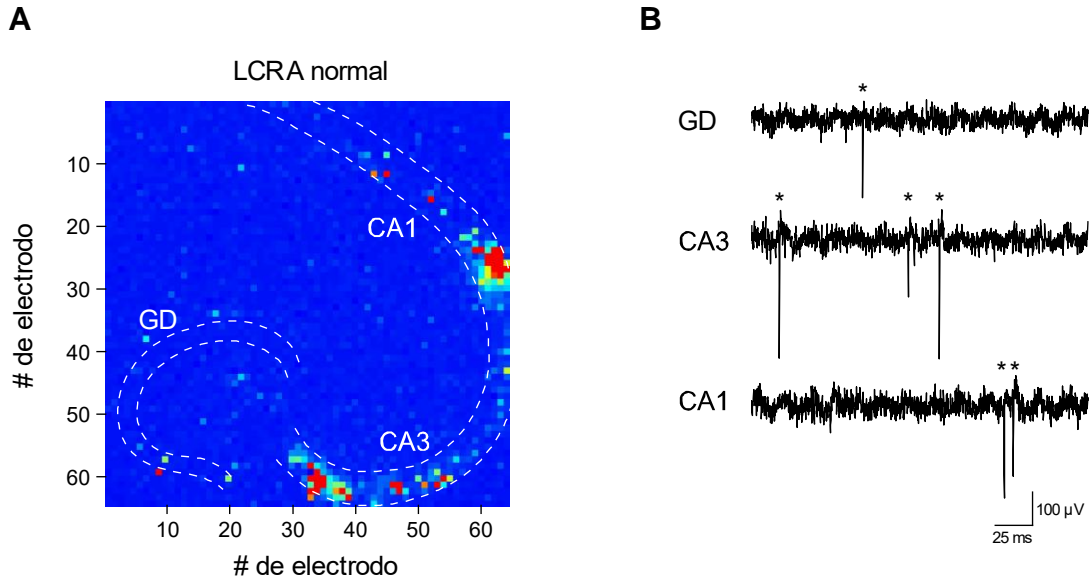


Figura 16. Registro de actividad espontánea control con la matriz de microelectrodos de alta densidad. A) Mapa de voltaje de una rebanada sin lesión. B) La actividad registrada es actividad multiunitaria. Los asteriscos indican espigas unitarias extracelulares en el giro dentado, CA3 y CA1.

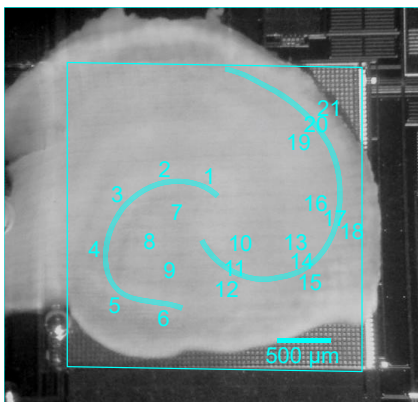
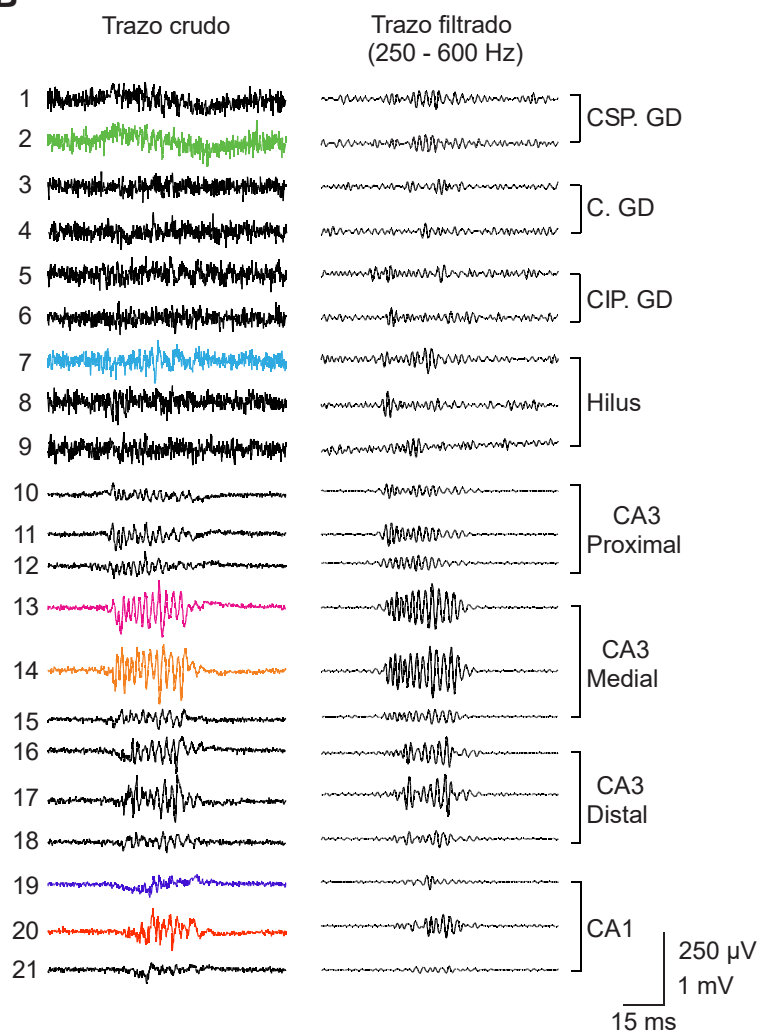
A**B**

Figura 17. Registro de oscilaciones ultra-rápidas en diferentes estrados del hipocampo y giro dentado. En A se muestra una fotografía de una rebanada de hipocampo sobre la matriz de electrodos. La capa granular del giro dentado, así como la capa piramidal de CA3 y CA1 están marcadas en color cian. Los números indican algunos sitios de registro de un evento de alta frecuencia. En B se muestran los trazos de los diferentes sitios de registro indicados en la fotografía en A. En la columna izquierda se muestran trazos crudos y en la columna derecha los mismos trazos, pero filtrados en la banda de 250 a 600 Hz. Nótese que en los trazos filtrados permanecen las oscilaciones de alta frecuencia en todas las áreas registradas. CSP. giro dentado, capa suprapiramidal del giro dentado; C. giro dentado, cresta del giro dentado; CIP. giro dentado, capa infrapiramidal del giro dentado. La barra de calibración de 250 μ V corresponde únicamente a los trazos 1 a 9 y la barra de calibración de 1 mV corresponde al resto de los trazos.

Estos eventos ocurrieron de forma intermitente con una incidencia aproximada de 0.35 Hz para el hipocampo y de 0.12 Hz para el giro dentado e hilus (ver figura 18).

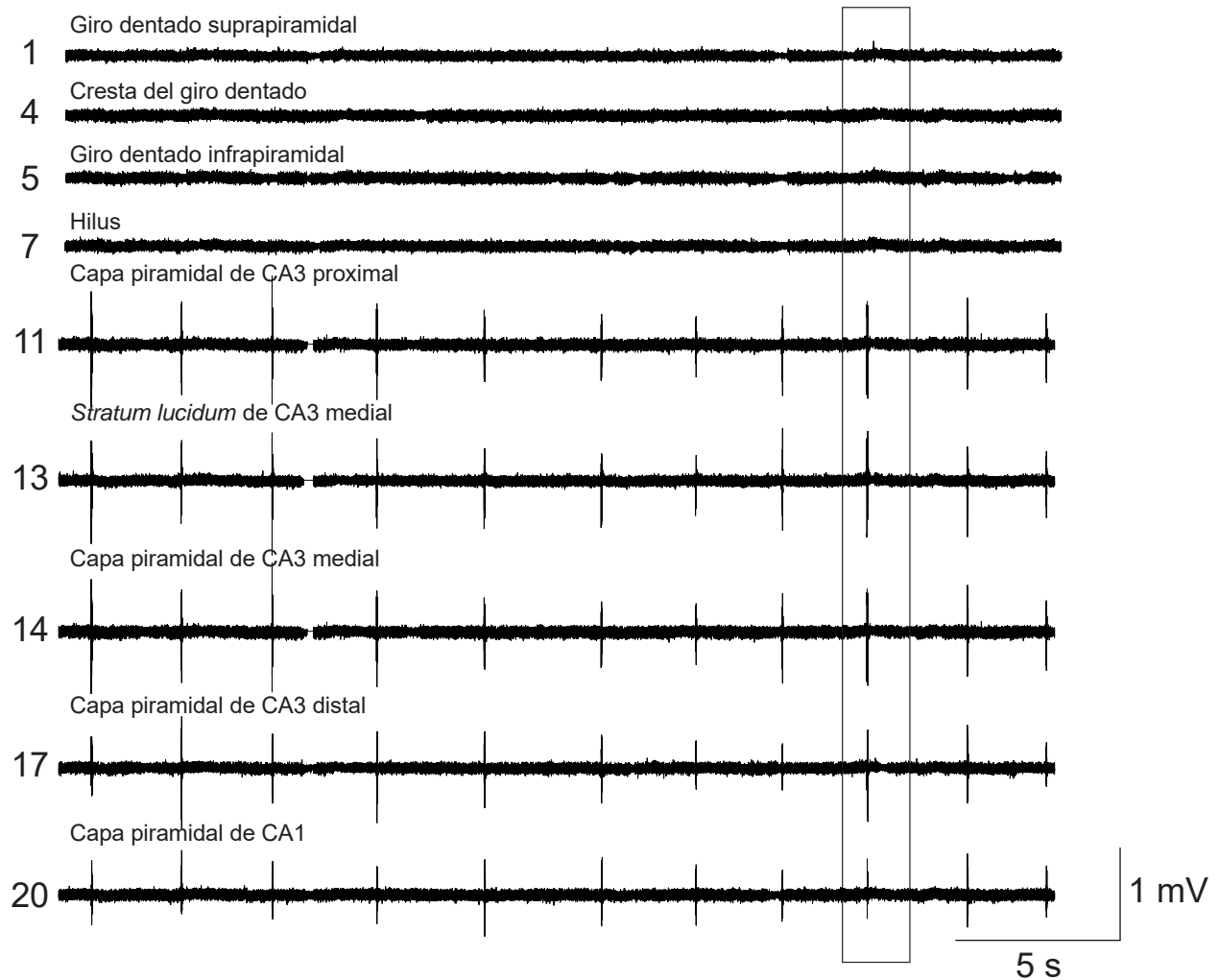


Figura 18. Registro continuo de eventos de alta frecuencia. Los eventos de alta frecuencia duran en promedio 50 ms y suceden de forma intermitente. En CA3 tienen una incidencia promedio de 0.35 Hz, en CA1 de 0.34 Hz y en el giro dentado e hilus de 0.12 Hz. Los registros que se muestran en la figura son tomados de diferentes estratos del giro dentado e hipocampo. Tanto los registros como los números a la izquierda de los registros corresponden a los sitios indicados en la figura 13. El rectángulo indica el segmento del cual fueron tomados los trazos de la figura 13.

Para corroborar que en su contenido espectral hubiera oscilaciones de alta frecuencia en el rango de 250 – 600 Hz, realizamos espectros de potencia de los eventos cortados sin filtrar. Los espectros de potencia muestran un pico en el rango de 250 a 600 Hz en los estratos de ambas estructuras, lo cual indica la presencia de oscilaciones de alta frecuencia del tipo *fast ripples* (ver figura 19).

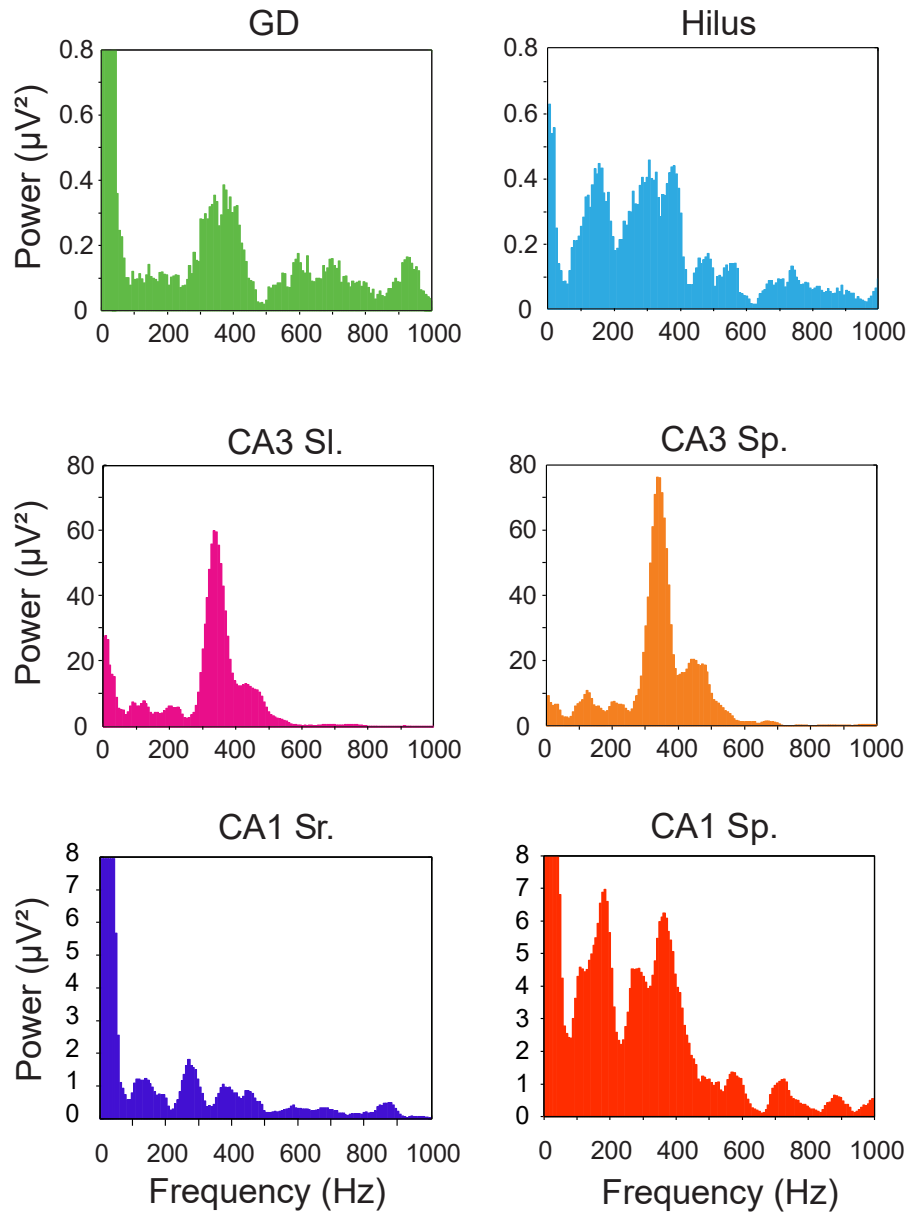


Figura 19. Espectros de potencia de los eventos de alta frecuencia en diferentes estratos. Los espectros de potencia fueron calculados de los trazos crudos y el color corresponde al color de los trazos crudos mostrados en la figura 13. Nótese que en todas las áreas registradas hay un pico en el rango de 250 a 600 Hz, lo cual las clasifica como oscilaciones de alta frecuencia conocidas como *fast ripples*.

Una vez determinada la presencia de oscilaciones ultra-rápidas en los eventos detectados, se determinó el área en que ocurrían (giro dentado, hilus, CA3 o CA1), su incidencia, amplitud, duración y frecuencia de oscilación (ver figura 20). Nótese que los eventos tuvieron una menor incidencia en el giro dentado y el hilus en comparación con CA3 y CA1. La amplitud también fue menor en el giro dentado e hilus mientras que la duración y frecuencia de oscilación fue muy similar en todas las estructuras. En la columna izquierda de la figura 20, las cajas representan el segundo y tercer cuartil donde se concentran la mayoría de los datos y las líneas punteadas la desviación estándar de la media aritmética. La línea roja dentro de la caja es la mediana y por su corrimiento hacia abajo podemos inferir que no se trata de una distribución normal. Obsérvese que al final de la desviación estándar superior hay una cola de puntos en la mayoría de los casos y estos datos pueden llegar a tener valores muy altos. De ahí que ensombrezcan la concentración de los datos en la gráfica y se muestre un acercamiento a las cajas en la columna derecha de la figura. Los datos que forman la cola no son datos aislados. Estos forman parte de una distribución *log-normal*. En este tipo de distribuciones los datos no se agrupan en torno a la media aritmética como en la distribución normal, sino que se cargan hacia la izquierda y muestran una cola a la derecha con un decaimiento exponencial. Es común encontrar estas distribuciones en los sistemas complejos, como el cerebro. Estas distribuciones se convierten a distribuciones normales mediante el cálculo de los logaritmos de los datos, éstos se grafican en un histograma y se ajusta una curva normal. La media geométrica y desviación estándar multiplicativa/divisiva se calculan con las siguientes formulas:

$$\bar{x}^* = \exp\left(\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \log(x_i)\right)$$

$$\sigma^* = \exp\left(\left[\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n \left[\log\left(\frac{x_i}{\bar{x}^*}\right)\right]^2\right]^{\frac{1}{2}}\right)$$

A diferencia de las distribuciones normales, la desviación o error estándar se reporta como “*/” (por/entre); es decir, la desviación estándar multiplicativa/divisiva. La figura 21 muestra un ejemplo de la distribución de la amplitud de los eventos registrados en CA3 y los resultados de la medición de todos los parámetros medidos se encuentran en la Tabla 1.

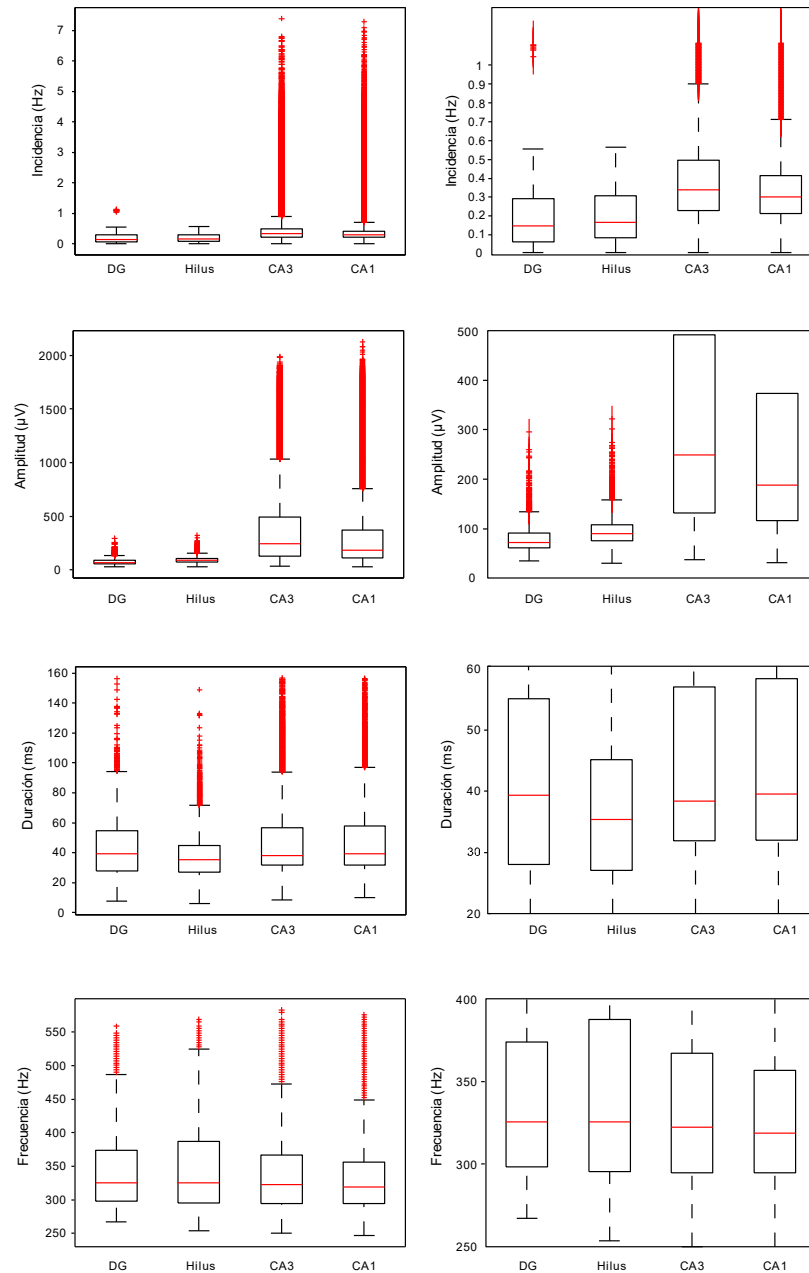


Figura 20. Parámetros de las oscilaciones de alta frecuencia. Incidencia, amplitud, duración y frecuencia de oscilación de las oscilaciones de alta frecuencia medidas en el giro dentado, el hilus, CA3 y CA1. La incidencia y amplitud fue menor en el giro dentado y el hilus comparadas con CA3 y CA1, mientras que la duración y la frecuencia de oscilación fue relativamente la misma en las 4 áreas. Los paneles en la columna de la izquierda muestran una cola en la distribución de los datos en casi todas las áreas de los parámetros medidos, lo cual significa que se trata de distribuciones log-normal. Los paneles de la columna derecha muestran un acercamiento a las cajas donde se concentran los datos.

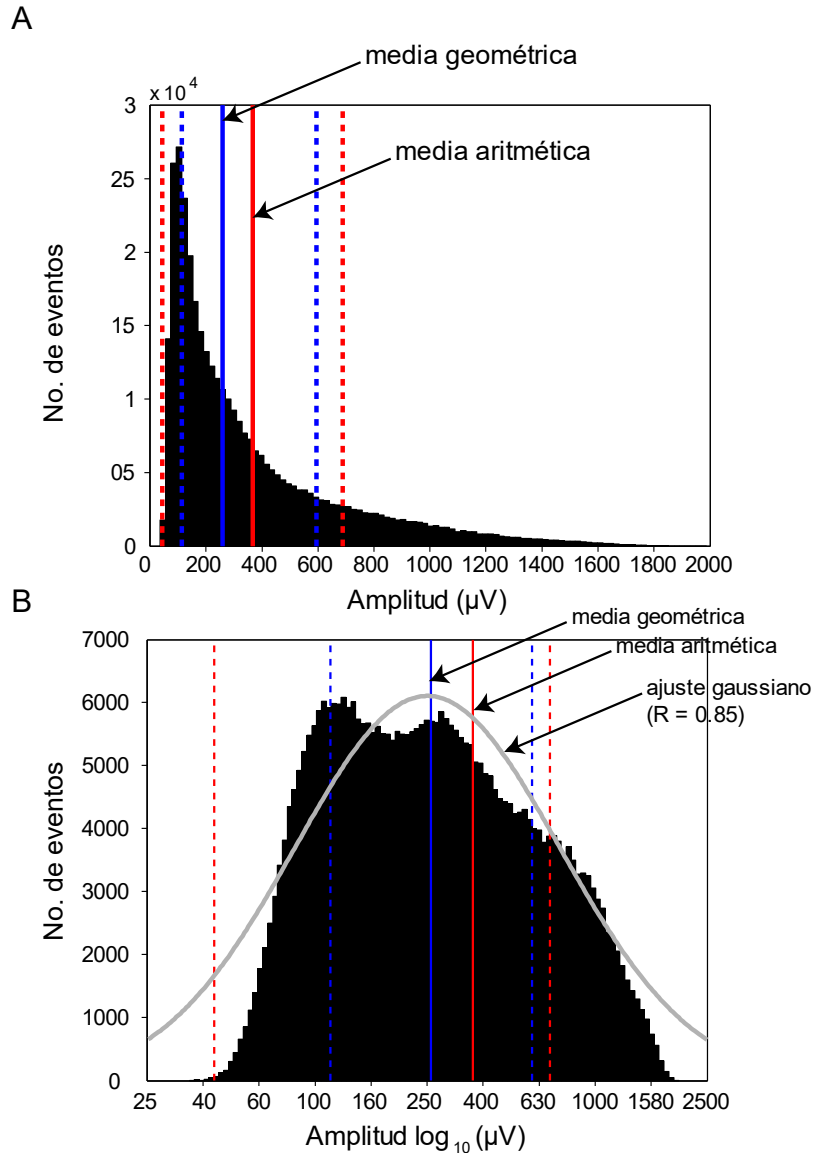
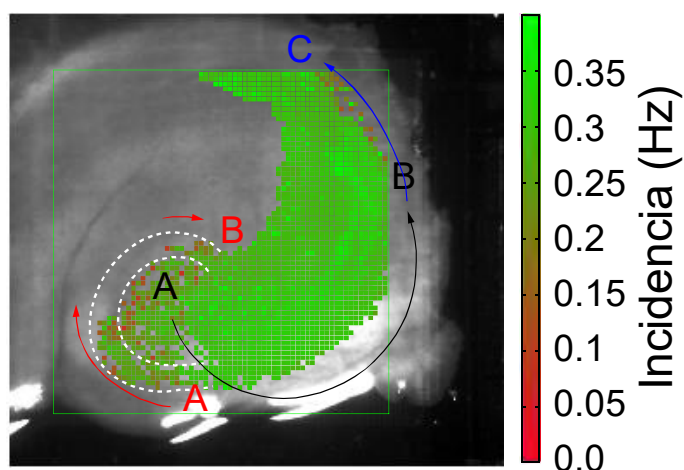


Figura 21. Ejemplo de la distribución log-normal de la amplitud de las oscilaciones de alta frecuencia en CA3. A) La distribución de las amplitudes de las oscilaciones de alta frecuencia en CA3 no sigue una distribución normal y la media aritmética \pm la desviación estándar no refleja el valor típico de los datos y su dispersión. Una mejor medida de centralidad es la media geométrica \pm la desviación estándar. B) Cuando se grafica el histograma de los logaritmos de los datos (en este caso se graficaron los logaritmos base 10), se puede ajustar una curva gaussiana. Nótese que la media geométrica cae en el centro de la curva y la desviación estándar multiplicativa/divisiva de la media geométrica se vuelve simétrica y se puede apreciar mejor la dispersión de los datos.

Una manera de visualizar la organización de los parámetros medidos fue construir mapas topográficos de éstos, como se muestra en las figuras 22-25. Mientras que todos los eventos detectados en CA3 y CA1 contenían oscilaciones de alta frecuencia, en el giro dentado los eventos con altas frecuencias tuvieron una menor incidencia, además de que no cubrían la totalidad de la capa granular. Es importante hacer notar que los eventos en el giro dentado sólo se presentaron cuando también ocurrieron en CA3. Los eventos de alta frecuencia normalmente cubrían la hoja suprapiramidal o infrapiramidal del giro dentado, el hilus y parte de la cresta. En el hipocampo, éstos cubrían la capa piramidal de CA3, CA1 y todos sus estratos dendríticos (giro dentado, n=4; hilus = 4, CA3, n=9; CA1, n=8). En el caso de CA3 y CA1 es importante resaltar que los valores más altos de incidencia, duración y frecuencia de oscilación se encuentran en las capas dendríticas proximales apicales y basales tanto de CA3 como de CA1. En el caso de la duración, los valores más altos se encuentran en las dendritas apicales distales de CA3. En el caso de la amplitud, los valores más altos se encuentran en la capa piramidal de CA3 y CA1, donde se encuentran las somas de las células piramidales. La amplitud es mayor en los segmentos medial y distal de CA3, así como en la parte inicial de CA1 próxima a CA3. En cuanto al giro dentado e hilus no hay una distribución topográfica aparente de los parámetros medidos. En los paneles A2 de las figuras 22-25, se muestran los valores de cada parámetro ordenando los electrodos según su disposición anatómica. En el giro dentado e hilus se ordenaron en un gradiente que va de la hoja infrapiramidal a la hoja suprapiramidal, y en el hipocampo se ordenaron de CA3 proximal a CA1. De esta manera se aprecian mejor los valores numéricos y los cambios en los mismos en las diferentes regiones. En el giro dentado se muestra un total de 154

electrodos que corresponde al experimento con el mayor número de electrodos que registraron oscilaciones de alta frecuencia, en el hilus un total de 294 electrodos, en CA1 un total de 646 y en CA3 se muestra un total de 708 electrodos.

A1



A2

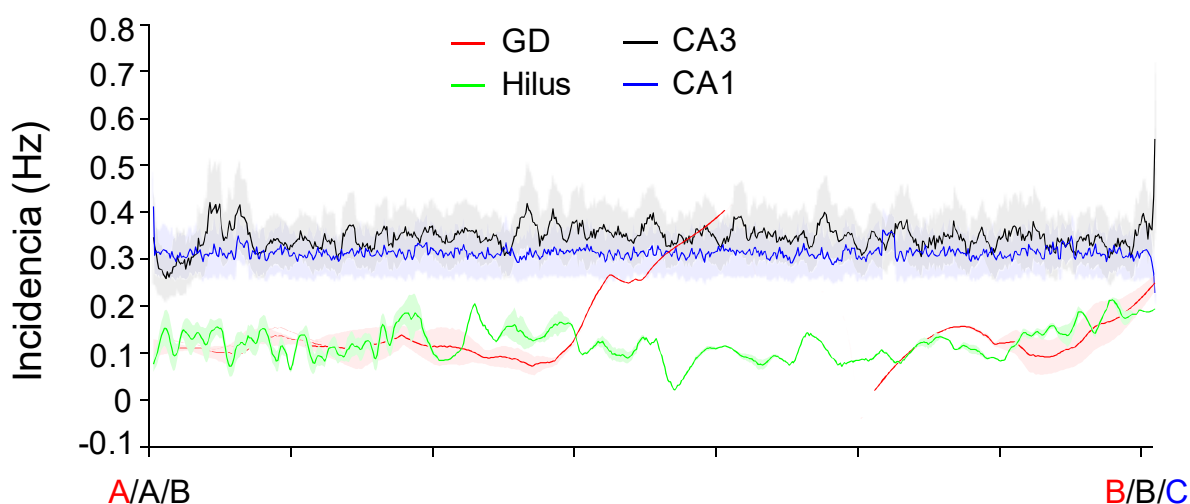
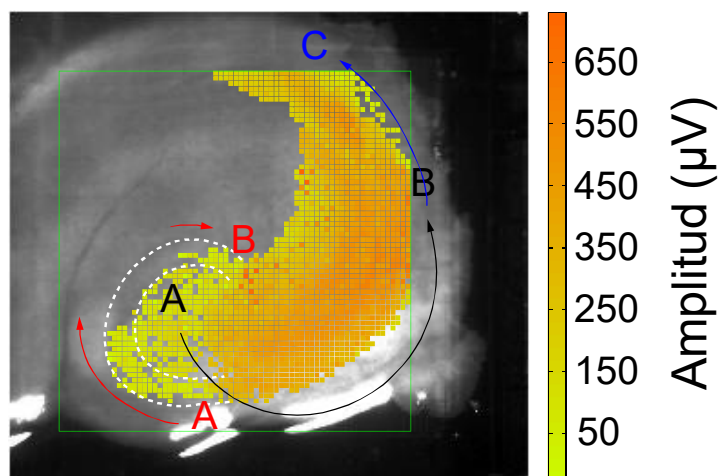


Figura 22. Distribución topográfica de la incidencia de las oscilaciones de alta frecuencia. A1) Mapa topográfico de la incidencia de las oscilaciones de alta frecuencia tanto en el giro dentado (n=4), hilus (n=4), CA3 (n=9) y CA1 (n=8). En casi la totalidad de la cresta y parte de la hoja suprapiramidal del giro dentado no se registraron oscilaciones de alta frecuencia y la distribución topográfica de las mismas en el giro dentado e hilus es heterogénea. En CA3 y CA1 los valores más altos se concentran en el Stratum lucidum/Stratum radiatum y Stratum oriens. A2) Valores promedio medidos de acuerdo al siguiente ordenamiento de los electrodos: en CA3 se ordenaron empezando de CA3 proximal para terminar en CA3 distal; en CA1 se ordenaron comenzando donde termina CA3 distal para terminar en el borde de la zona de registro de la matriz de electrodos en dirección hacia el subículo; y en el giro dentado e hilus se ordenaron comenzando de la hoja infrapiramidal para terminar en la hoja suprapiramidal. Esto permite apreciar mejor diferencias entre estructuras y subestructuras.

A1



A2

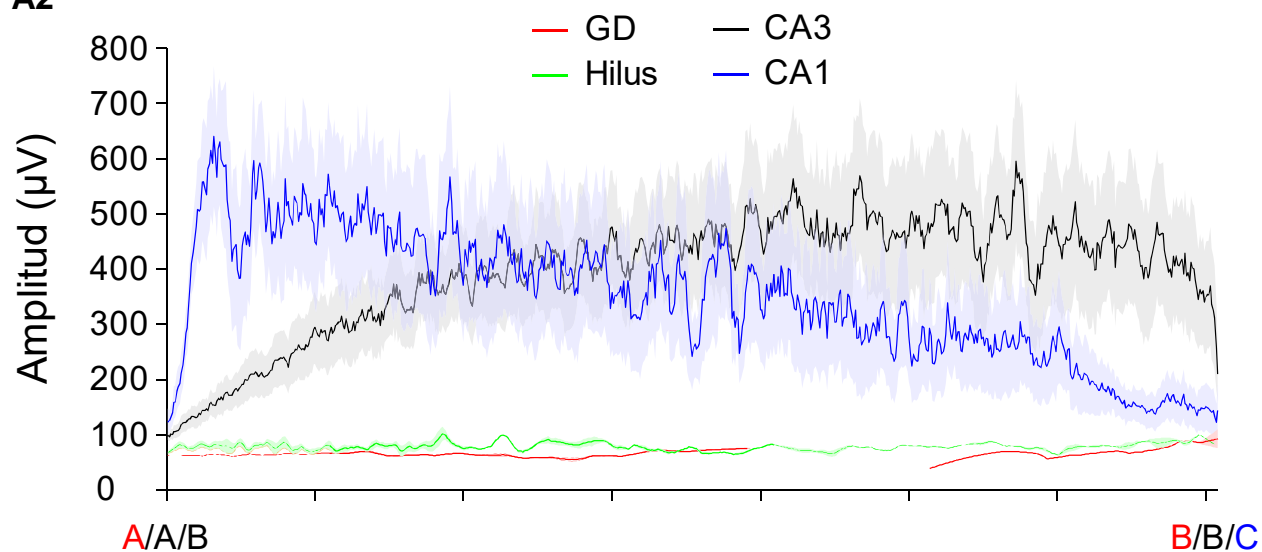
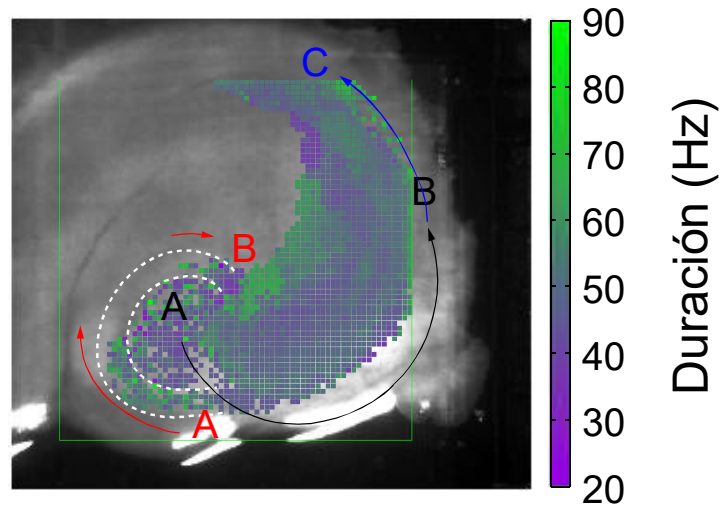


Figura 23. Distribución topográfica de la amplitud de las oscilaciones de alta frecuencia. A1) Mapa topográfico de la amplitud de las oscilaciones de alta frecuencia tanto en el giro dentado (n=4), hilus (n=4), CA3 (n=9) y CA1 (n=8). La distribución topográfica en el giro dentado e hilus es heterogénea. En CA3 y CA1 los valores más altos se concentran en la capa piramidal. A2) Valores promedio medidos de acuerdo al ordenamiento de los electrodos mencionado en la figura 17.

A1



A2

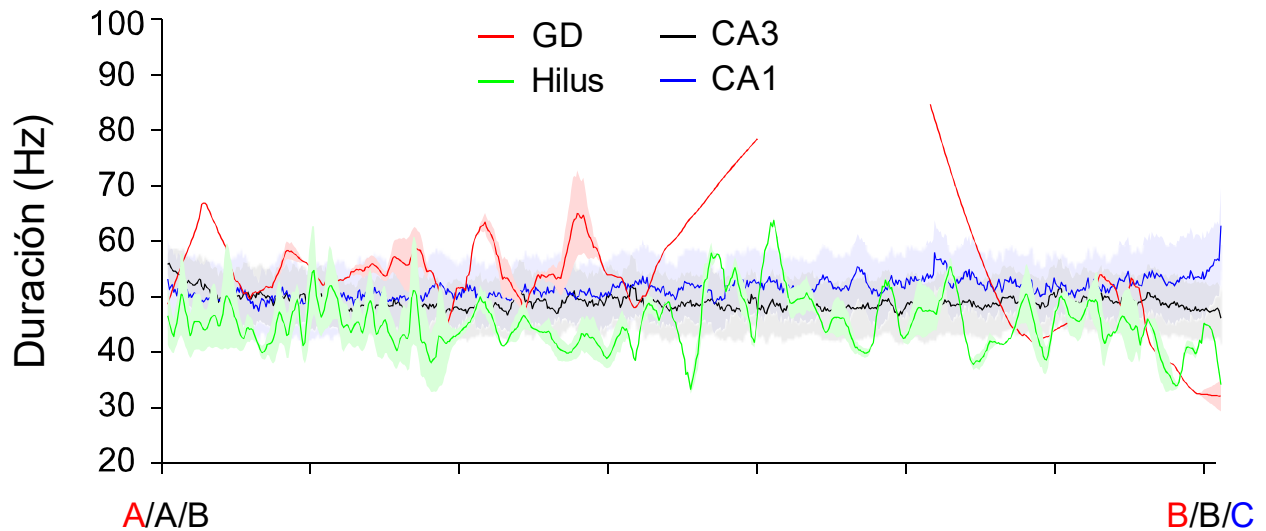
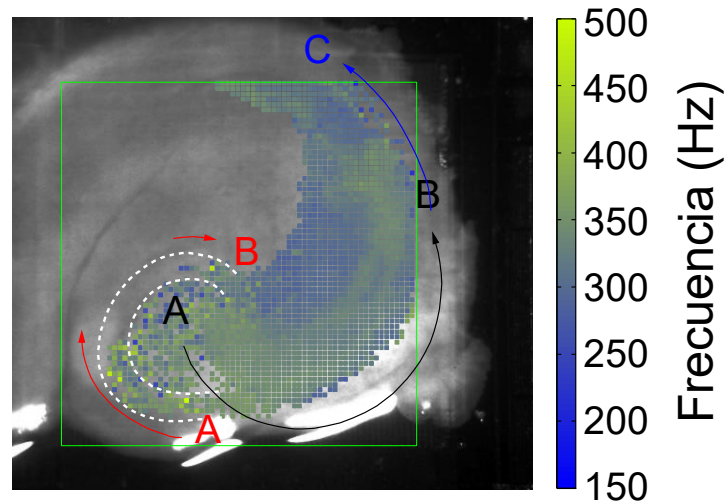


Figura 24. Distribución topográfica de la duración de las oscilaciones de alta frecuencia. A1) Mapa topográfico de la duración de las oscilaciones de alta frecuencia tanto en el giro dentado (n=4), hilus (n=4), CA3 (n=9) y CA1 (n=8). La distribución topográfica en el giro dentado e hilus es heterogénea. En CA3 y CA1 los valores más altos se concentran en el Stratum lucidum/Stratum radiatum y Stratum oriens. A2) Valores promedio medidos de acuerdo al ordenamiento de los electrodos mencionado en la figura 17.

A1



A2

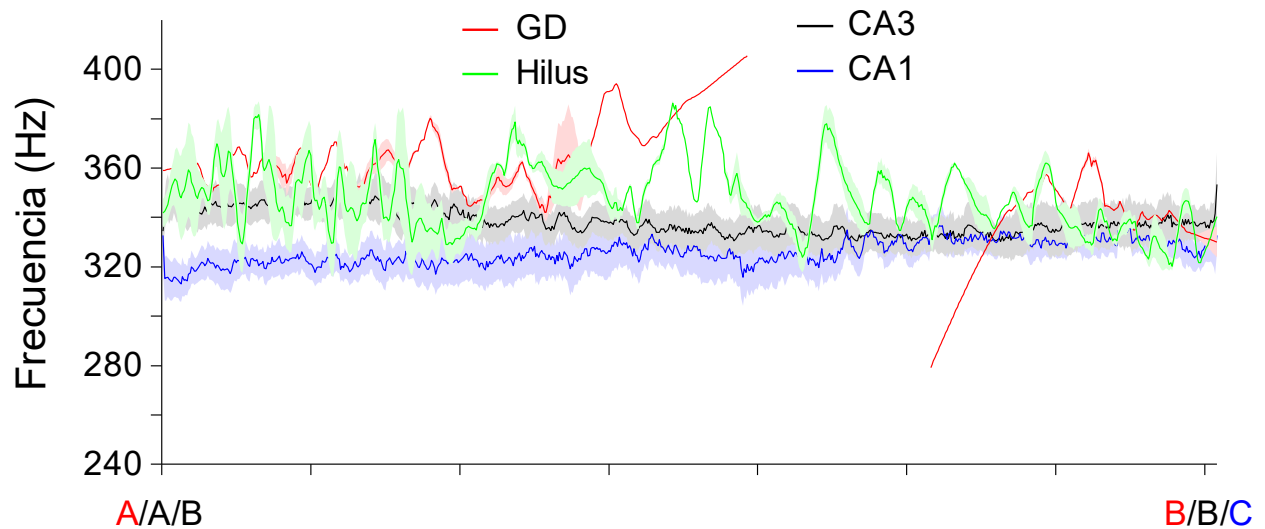


Figura 25. Distribución topográfica de la frecuencia de oscilación de las oscilaciones de alta frecuencia. A1) Mapa topográfico de la frecuencia de oscilación de las oscilaciones de alta frecuencia tanto en el giro dentado (n=4), hilus (n=4), CA3 (n=9) y CA1 (n=8). La distribución topográfica en el giro dentado e hilus es heterogénea. En CA3 y CA1 los valores más altos se concentran en el Stratum lucidum/Stratum radiatum y Stratum oriens. A2) Valores promedio medidos de acuerdo al ordenamiento de los electrodos mencionado en la figura 17.

Tabla 1. Características de las oscilaciones de alta frecuencia

	giro dentado	Hilus	CA3	CA1
# de rebanadas	4 / 9	4 / 9	9 / 9	8 / 9
# total de eventos registrados	308	316	977	876
# promedio de electrodos que registraron un evento	42 ± 11 (25 -75)	97 ± 61 (21 - 171)	469 ± 45 (332 – 708)	365 ± 81 (96 – 651)
Area cubierta (mm²)	0.075 ± 0.02	0.096 ± 0.06	0.83 ± 0.08	0.64 ± 0.14
Incidencia (Hz)	0.12 */ 2.7 (0.004 – 1.14)	0.15 */ 2.4 (0.004 – 0.56)	0.35 */ 1.85 (0.004 – 7.39)	0.34 */ 1.99 (0.005 – 7.28)
Amplitud (µV)	74.1 */ 1.4 (32.32 – 294.36)	89.3 */ 1.3 (27.7 – 320.5)	259.7 */ 2.29 (35.55 – 1988)	218.6 */ 2.28 (29.7 – 2126.8)
Duración (ms)	39.3 */ 1.6 (7.69 – 154.43)	35.1 */ 1.5 (6.1 – 150.1)	41.6 */ 1.46 (8.4 – 156.65)	42.2 */ 1.47 (9.83 – 156.51)
Frecuencia de oscilación (Hz)	338.7 */ 1.2 (267.4 – 558.9)	340.5 */ 1.2 (253.7 – 569.2)	334.3 */ 1.17 (250.3 – 582.9)	330.4 */ 1.16 (256.9 – 576)

6.2 Sitio de inicio de las oscilaciones ultra-rápidas

El siguiente paso fue describir el comportamiento de las oscilaciones de alta frecuencia, en particular, su propagación. Para determinar su propagación, primero se determinó su sitio de inicio. Se tomaron en cuenta los eventos filtrados en el rango de 250 – 600 Hz y se tomó como sitio de inicio el primer electrodo que detectó la oscilación de alta

frecuencia. Se encontró que la mayoría de las oscilaciones ultra-rápidas iniciaban en CA3 (977 eventos observados en 9 rebanadas), particularmente CA3 medial (85.1 ± 15.6) y CA3 distal (82.6 ± 28.2), seguidos de CA3 proximal (43.4 ± 10.8). En CA1 también hubo electrodos que registraron primero el evento (11.7 ± 3.2 ; 876 eventos observados en 8 rebanadas) e incluso un número muy pequeño en el giro dentado (1.2 ± 0.6 ; 308 eventos observados en 4 rebanadas) e hilus (2.8 ± 1.6 ; 316 eventos observados en 4 rebanadas; ver figura 26). Todos los eventos fueron analizados en un lapso de 5 minutos.

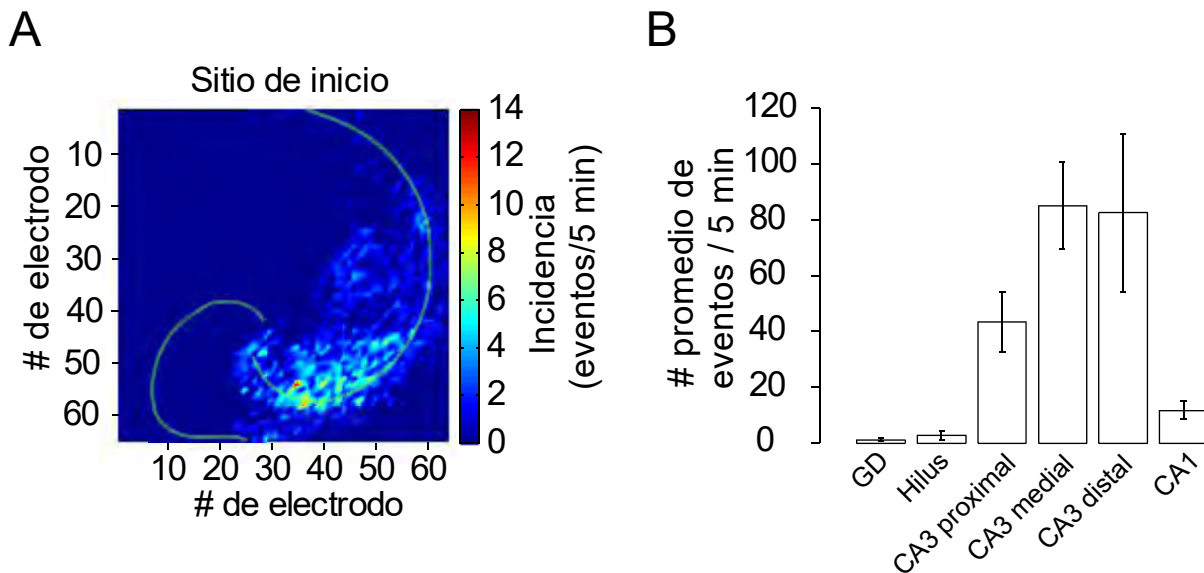


Figura 26. Sitios de inicio de las oscilaciones ultra-rápidas. A) Mapa de los electrodos que detectaron el inicio de las oscilaciones ultra-rápidas. B) Número promedio de eventos de alta frecuencia que inician en el giro dentado (n=4), hilus(n=4), CA3 (n=9) y CA1 (n=8). La gran mayoría de los eventos iniciaron en CA3, específicamente CA3 media y CA3 distal.

6.3 Propagación de los eventos de alta frecuencia

Una vez determinados los sitios de inicio de los eventos de alta frecuencia, estudiamos su propagación. La figura 27 muestra la propagación temporal de un evento de alta frecuencia representativo. Éste normalmente inicia en CA3 y se propaga de forma bidireccional tanto a CA1 como al giro dentado. En el milisegundo 6 podemos apreciar cómo hay una propagación de CA3 medial a CA3 distal, así como un incremento rápido en la amplitud del voltaje en CA3 distal. El evento también se propaga hacia las dendritas apicales. En el milisegundo 10, el evento se ha propagado hacia CA1 y hacia CA3 proximal. En los milisegundos 14, 18 y 22 se observa cómo el evento ha invadido al giro dentado al mismo tiempo que hay una reactivación de CA3 proximal en el milisegundo 22, y finalmente comienza a desvanecerse en todas las áreas.

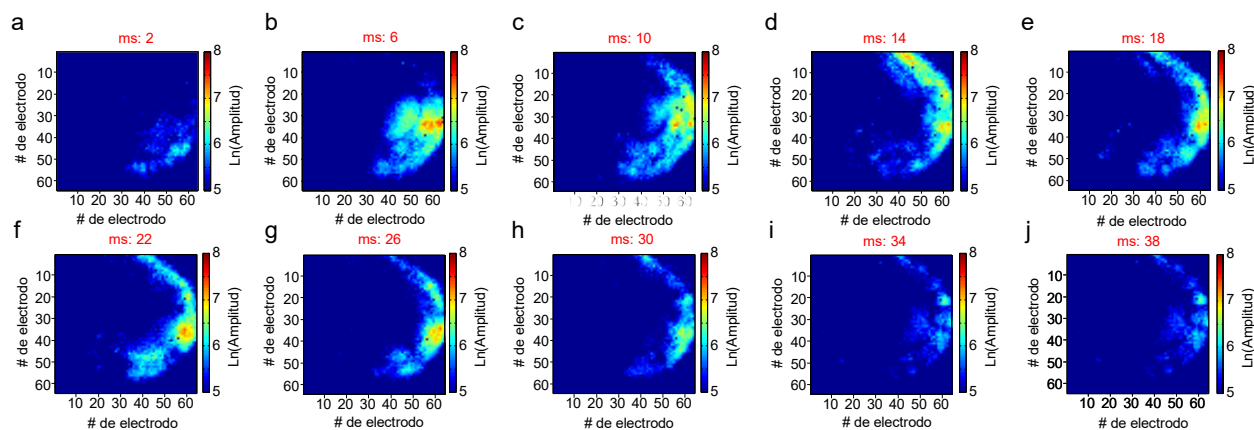


Figura 27. Inicio y propagación de las oscilaciones ultra-rápidas en el hipocampo y giro dentado. Serie temporal de un evento de alta frecuencia a partir del momento en que fue detectado. Cada cuadro representa la amplitud absoluta en un segmento del evento con una duración de 4 ms. La leyenda encima de cada cuadro (en color rojo) indica el tiempo medio en cada segmento temporal. Se puede apreciar que el evento comienza en el área CA3 y se propaga tanto a CA1 como al giro dentado. En el panel d (ms. 14) se aprecia cuando el evento comienza a ser detectado por electrodos en el giro dentado.

La figura 28 muestra la propagación de 86 eventos sobrepuestos de un experimento. Podemos observar el inicio de los eventos principalmente en la parte dendrítica de CA3 medial y CA3 distal, posteriormente se propagan tanto a CA3 proximal y CA1, invaden el hilus y al giro dentado y terminan principalmente en CA1.

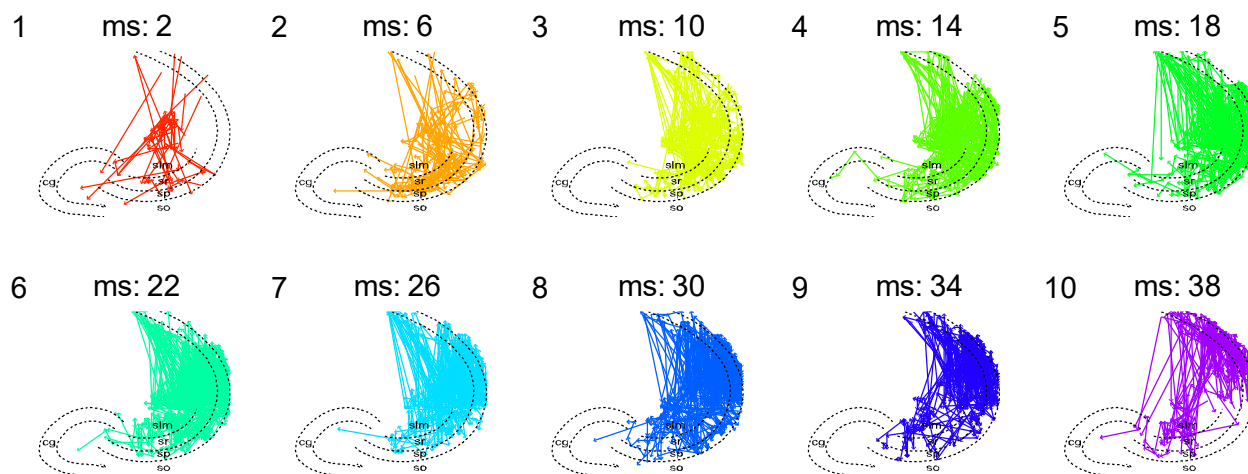


Figura 28. Inicio y propagación de las oscilaciones ultra-rápidas en el hipocampo y giro dentado de varios eventos sobrepuestos. Serie temporal 86 eventos de alta frecuencia sobrepuestos de un experimento. Cada imagen representa la propagación de los eventos sobrepuestos en ese momento en específico. Los vértices de las líneas indican los electrodos que detectaron los diferentes eventos en ese momento y las líneas indican la propagación (indicada con una flecha) temporal de un electrodo a otro. Al igual que la figura anterior, los eventos comienzan mayoritariamente en el *Stratum lacunosum moleculare* de CA3 distal. En el ms. 6 se aprecia que éstos se propagan hacia el *Stratum lucidum* y hacia CA1. En el ms. 14 y 18 alcanzan el giro dentado. En los ms. 22 y 26 se aprecia una ligera reactivación de algunos sitios de CA3. En los ms. subsiguientes, los eventos se propagan a CA1 y la mayoría termina en esta área.

Otra forma de visualizarlo fue graficar los tiempos de inicio del evento a partir del comienzo de éste (ver figura 29). Una propagación similar se observó en todos los experimentos.

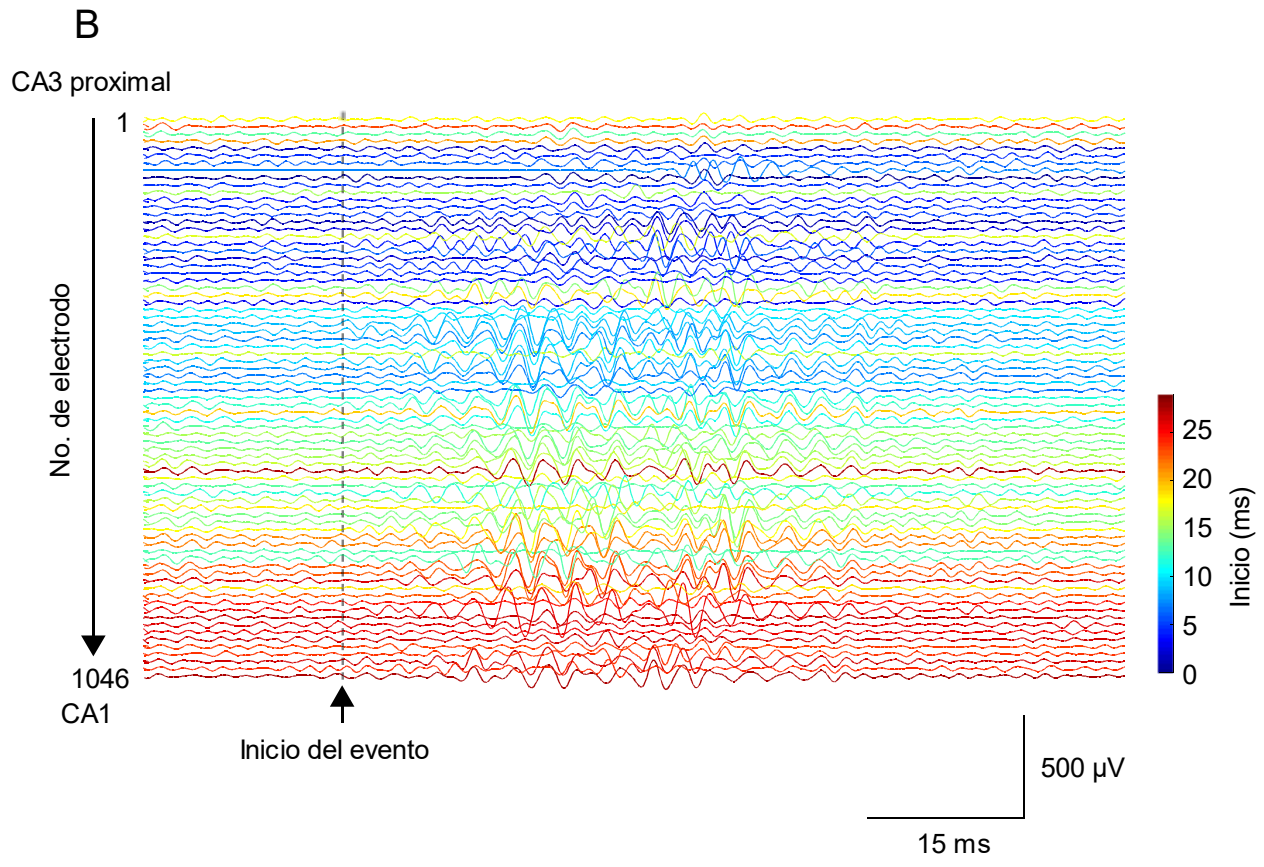
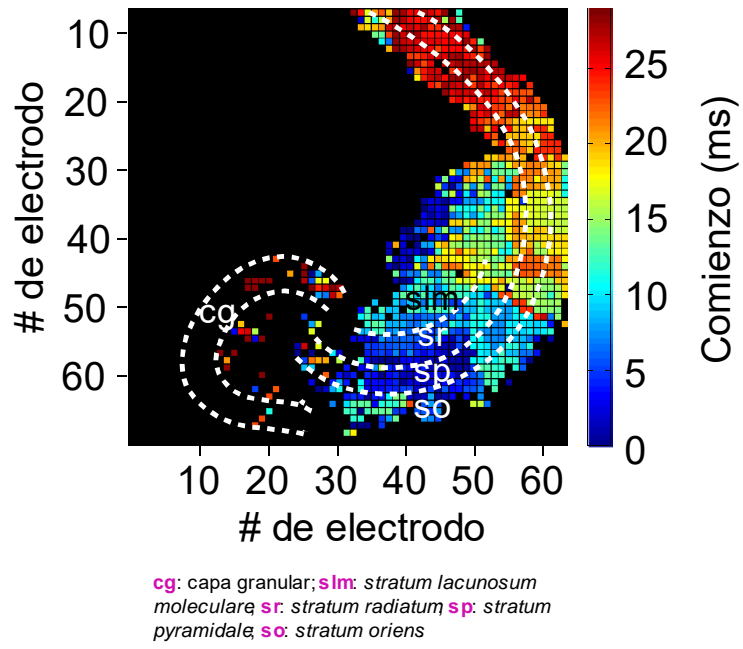


Figura 29. Propagación de las oscilaciones ultra-rápidas por electrodo. A) Mapa topográfico de la propagación de un evento de alta frecuencia. La gráfica ilustra el orden de registro de los diferentes electrodos que registraron el evento comenzando con el primero que lo registró. En este evento en particular, el evento comenzó en CA3 medial/proximal y en el *Stratum locunosum moleculare* para propagarse tanto a CA1 como al giro dentado e hilus sin un orden aparente. Nótese que hay una detección temprana del evento en algunos electrodos del hilus y el giro dentado. En B se muestra el ordenamiento de los trazos de los electrodos que detectaron el evento comenzando por CA3 proximal y terminando en CA1 para el caso del hipocampo y comenzando en la hoja infrapiramidal para terminar en la hoja suprapiramidal para el caso del hilus y el giro dentado. Los trazos de éstos últimos se encuentran al principio de la figura. Se grafican uno de cada quince trazos.

6.4 Los eventos de alta frecuencia en CA3 causan, en términos de Granger, a los eventos de alta frecuencia en el giro dentado

Uno de los objetivos de este trabajo de tesis fue determinar si las oscilaciones de alta frecuencia registradas en el giro dentado eran causadas por CA3. Para ello utilizamos la prueba de causalidad de Granger. Esta prueba nos dio como resultado 9 tipos de diferentes interacciones entre las diferentes áreas: CA3 <> CA3, CA3 > hilus, CA3 > GD, hilus <> hilus, hilus > CA3, hilus > GD, GD <> GD, GD > hilus y GD > CA3 donde la cabeza de flecha marca la dirección de la interacción. El panel A de la figura 30 es la matriz de interacciones significativas ($p > 0.05$) entre pares de electrodos de CA3, giro dentado e hilus en un evento registrado en las áreas mencionadas por 573 electrodos de un experimento representativo. La mayoría de las interacciones sucede entre pares de electrodos de CA3. Esto tiene sentido si consideramos que CA3 se encuentra altamente interconectado entre sí y, por ende, el evento, que por lo general también inicia en CA3, se propaga de un sitio a otro dentro de CA3 y el sitio al que se propaga puede marcar el sitio siguiente que causa al siguiente sitio y así sucesivamente. Cabe notar que sitios en

CA3 pueden causar en términos de Granger el evento en el hilus y en el giro dentado y que sitios en el hilus y el giro dentado también tienen influencia sobre el evento en CA3. No hay una especificidad en cuanto a los sitios donde suceden las interacciones Granger; es decir, suceden aleatoriamente y no en estratos específicos (ver figura 30B). Trazos representativos correspondientes a estas interacciones se muestran en el panel C de la figura 30.

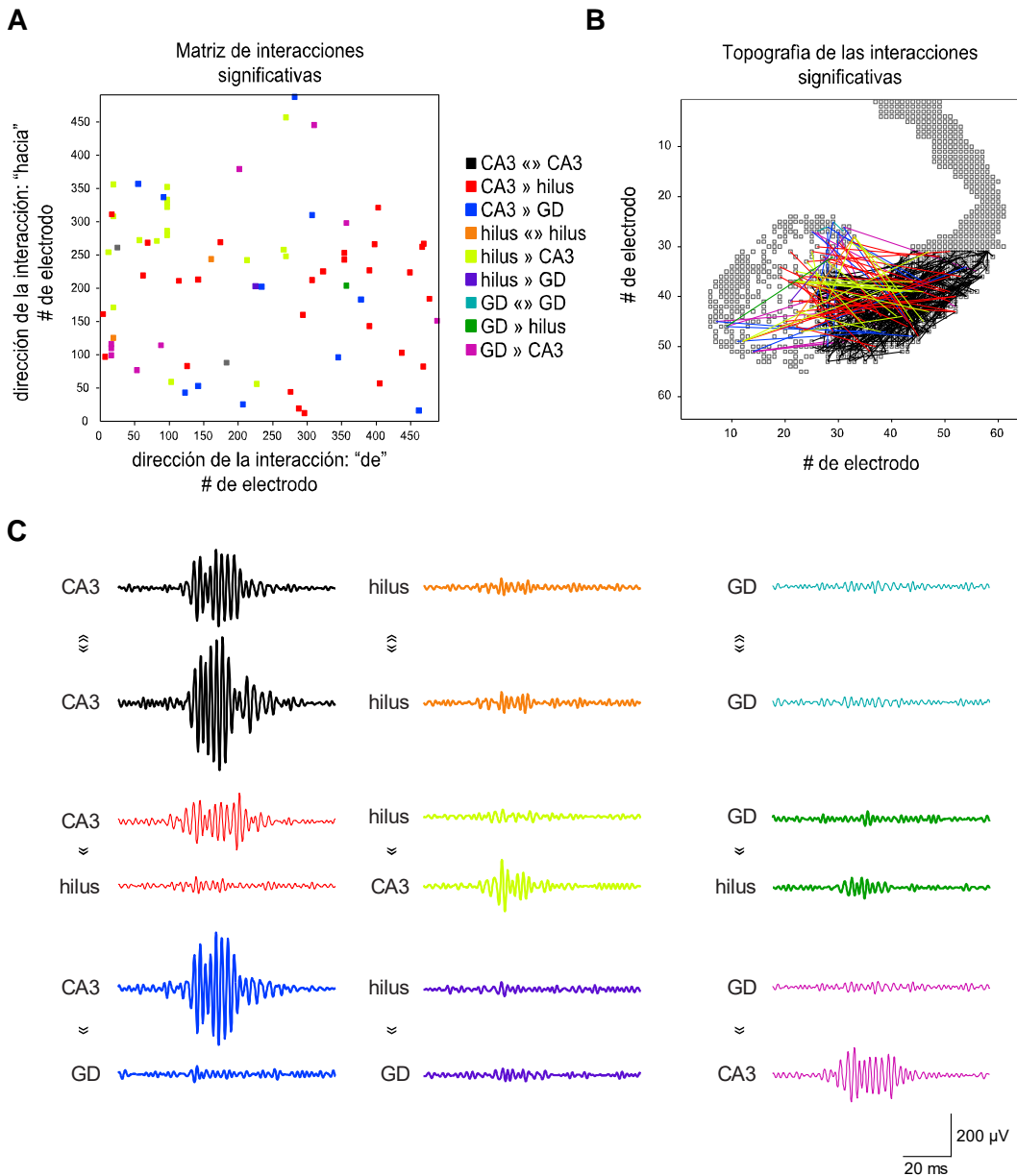


Figura 30. Matriz de interacciones significativas Granger. En el panel A se muestra la matriz de interacciones significativas para un evento que fue registrado por 491 electrodos. Cada punto representa una interacción significativa entre ese par de electrodos (las interacciones entre pares de electrodos de CA3 no se muestran por ser muy numerosas) y la dirección de la interacción se denota por el número de electrodo en el eje "x", que indica el electrodo cuya señal causa a la señal en el número de electrodo en el eje "y". Nótese que el evento puede ser registrado en CA3, el hilus y el giro dentado, por lo tanto las interacciones pueden estar conformadas por pares de electrodos CA3-CA3, CA3-GD, CA3-hilus, hilus-hilus, hilus-CA3, hilus-GD, GD-GD, GD-hilus y GD-CA3. El mismo par de electrodos pueden influir uno en el otro de forma recíproca y con diferente magnitud. CA1 no se incluyó en el análisis. En B se muestran las interacciones en A, pero con un arreglo topográfico de acuerdo al hipocampo. En C se muestran trazos

representativos correspondientes a esas interacciones; es decir los trazos de los eventos en un área que causaron a los eventos en otra. El color del trazo corresponde al color de la leyenda de interacciones en el panel A. Los números de los electrodos en la matriz de interacciones significativas en A no corresponden a las coordenadas de los electrodos de la matriz de registro en B.

La prueba de causalidad de Granger muestra que hay interacciones directas entre CA3 y el giro dentado y en un evento dado, suceden en promedio 4.7 ± 0.3 de estas interacciones (ver figura 31). Por otro lado, puede ser que los eventos se propaguen de CA3 al hilus y del hilus al giro dentado. Las interacciones promedio entre CA3 y el hilus son 14 ± 0.9 y entre el hilus y el giro dentado de 0.7 ± 0.1 . Las interacciones promedio de CA3 al giro dentado siguen siendo mayores que las interacciones promedio del hilus al giro dentado, lo cual nos indica una influencia directa de CA3 sobre el giro dentado (ver figura 31).

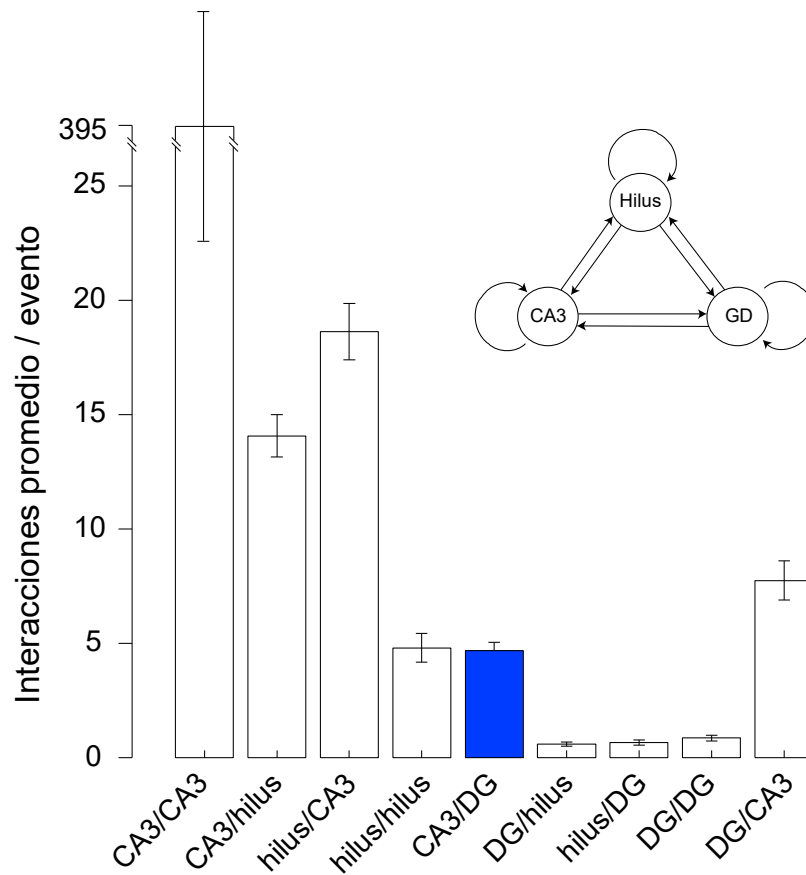


Figura 31. Interacciones Granger promedio. Las barras muestran el número de interacciones Granger promedio por evento de alta frecuencia entre CA3, el hilus y el giro dentado. El mayor número de interacciones sucede entre CA3 consigo mismo; sin embargo también hay una influencia directa de CA3 sobre el giro dentado y del giro dentado sobre CA3.

Hay evidencia de conexiones directas entre CA3 y el giro dentado (Li y cols., 1994), así como de conexiones indirectas (Scharfman, 2007) que podrían mediar la propagación de los eventos de alta frecuencia de CA3 al giro dentado. En la figura 32 se muestra la relación que hay entre la latencia y la distancia de los eventos causantes y causados en términos de Granger. La regresión lineal concuerda con un retardo de propagación de aproximadamente 0.1 m/s para la actividad que se propaga de CA3 hacia el giro dentado, pasando por el hilus; igual al reportado para la propagación de actividad de campo

epileptiforme, salvo para las interacciones hilus <> hilus, hilus > GD y GD <> GD (Qiu y cols., 2015). Por otro lado, existe evidencia de conexiones mixtas eléctricas y químicas entre las fibras musgosas de células granulares del giro dentado y las células piramidales de CA3 (Vivar y cols., 2012). Es posible que haya uniones comunicantes entre CA3 y el giro dentado que permitan la propagación de los eventos de alta frecuencia de un área a la otra.

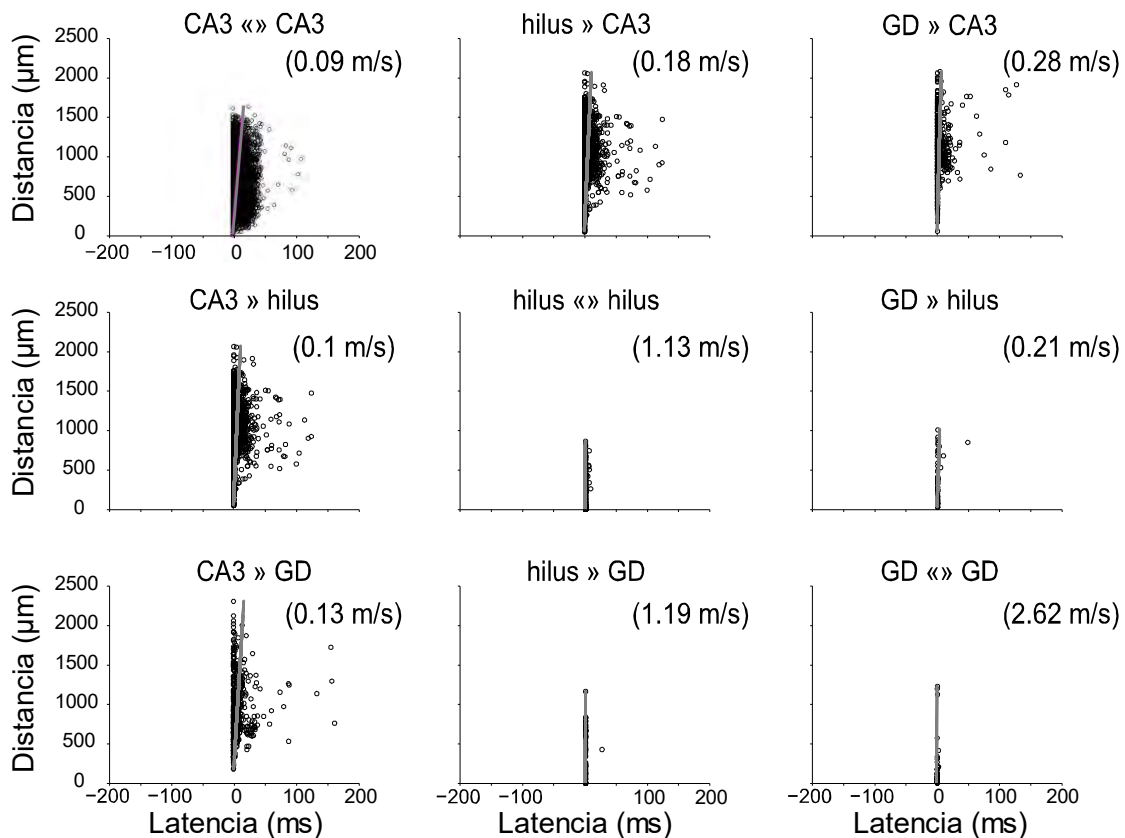


Figura 32. Velocidad de propagación de las interacciones Granger entre las diferentes áreas. Cada panel muestra la dispersión de la latencia, medida en el punto máximo de la correlación cruzada entre las señales de cada par de electrodos, en función de la distancia en las diferentes áreas. La regresión lineal nos permitió obtener un valor predictivo de la velocidad de propagación de la actividad de alta frecuencia para cada una de las áreas.

6.5 Conexiones funcionales bidireccionales entre el giro dentado y CA3

Para explorar un posible acople eléctrico entre CA3 y el giro dentado se bloqueó la transmisión química mediante una solución de registro baja en calcio (0.2 mM; n=3). Los eventos de alta frecuencia desaparecieron en 3 rebanadas de un total de 3 a las que se perfundió con esta solución, lo cual concuerda con reportes anteriores acerca de la dependencia de las oscilaciones ultra-rápidas de la transmisión química, y permaneció actividad multi-unitaria en todas las rebanadas (ver figura 33). Esta actividad se tomó en cuenta para hacer simulaciones de Montecarlo y determinar la distribución de probabilidad de los intervalos inter espiga entre espigas del giro dentado y CA3 que coincidieran en una ventana de 5 ms. La distribución de probabilidad arrojada por las simulaciones de Montecarlo es interpretada como el conjunto de posibles intervalos inter espiga y fue determinada revolviendo los mismos 1000 veces mediante un generador de números aleatorios Marsenne Twister. El lugar que ocupan los intervalos inter-espiga reales, coincidentes en la ventana antes mencionada, determina la significancia de las espigas coincidentes. Se determinó una significancia de $p \leq 0.05$.

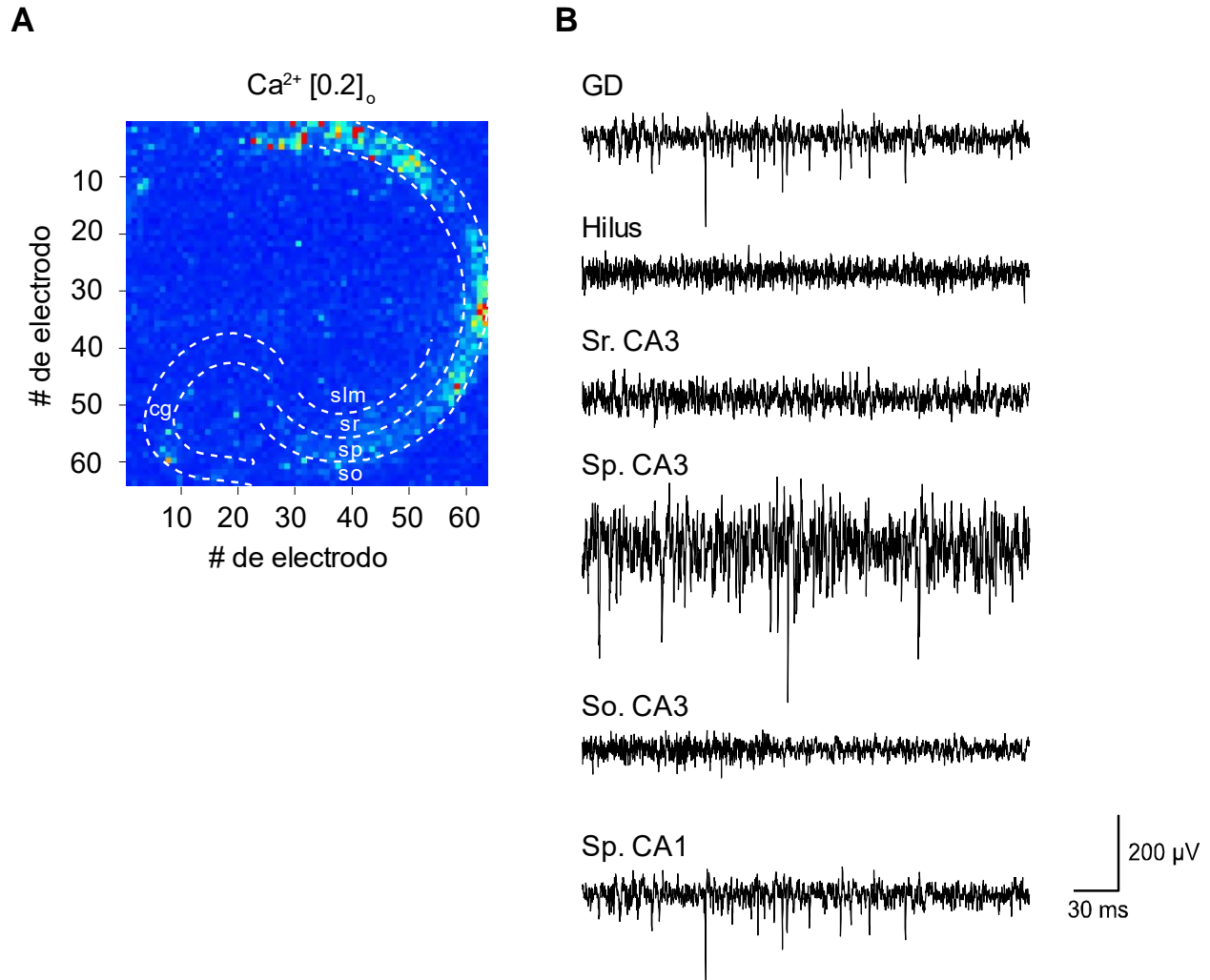


Figura 33. Actividad multi-unitaria remanente después de bloquear la transmisión química. Se bloqueó la transmisión química con una solución de registro baja en calcio (0.2 mM, n=3). En A se muestra el mapa de voltaje donde se observa que la actividad osciladora de alta frecuencia ha cesado y en su lugar permanece actividad multi-unitaria, principalmente en la capa piramidal del hipocampo y en algunas partes de la capa granular del giro dentado. En el hilus y estratos dendríticos no hay actividad. En B se muestran trazos representativos de la actividad multi-unitaria registrada en los diferentes estratos del giro dentado y CA3.

Encontramos que había conexiones funcionales entre el giro dentado y CA3 y viceversa. Estas fueron más prominentes en la dirección del giro dentado a CA3 (n=3; ver figura 34). Para explorar la participación de un acople eléctrico, se perfundió mefluoquina (n=3), un bloqueador específico de uniones comunicantes formadas por la conexina 36. Se observó una reducción en la incidencia de conexiones en ambas direcciones; sin embargo, ésta no fue significativa (n=3).

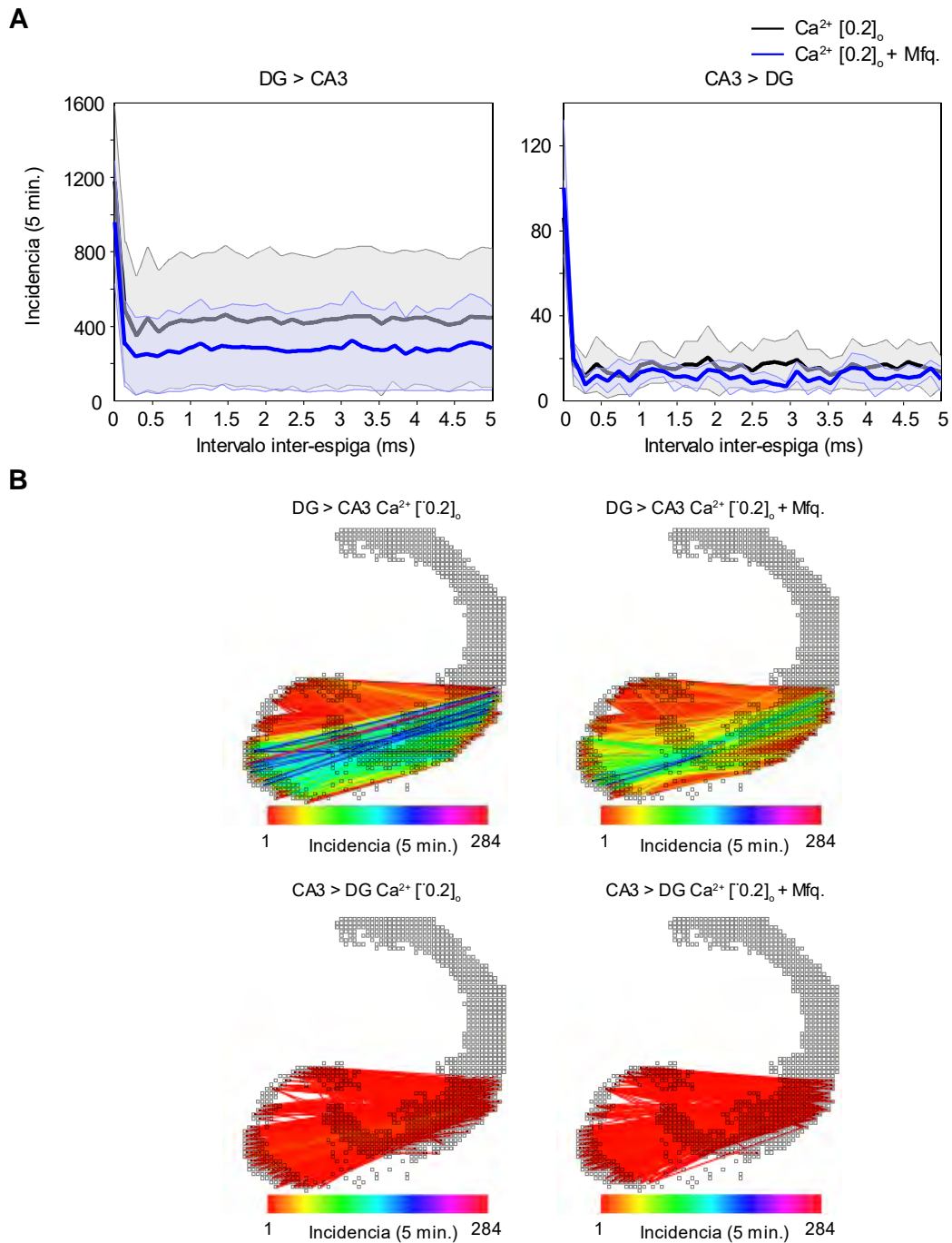


Figura 34. Conexiones funcionales entre el giro dentado y CA3. A) El número de conexiones funcionales con la transmisión química bloqueada entre el giro dentado y CA3 es mayor en la dirección del giro dentado a CA3 en un intervalo inter-espiga de 0 a 5 ms (n=3). La aplicación de mefluoquina no tuvo un efecto significativo sobre el número de conexiones funcionales. B) muestra la topografía de estas conexiones. Se observa que hay una mayor incidencia en la hoja infrapiramidal del giro dentado.

7. DISCUSIÓN

En el hipocampo la información fluye normalmente del giro dentado a CA3; estructuras capaces de generar actividad osciladora de baja (p. ej. theta) y alta frecuencia (p. ej. gamma alta tanto para el giro dentado como para CA3 y oscilaciones en el rango de 90 a 250 Hz en el caso de CA3) tanto de forma independiente como de forma coordinada. Las oscilaciones de alta frecuencia en el rango de 250 a 600 Hz, asociadas a focos epilépticos en el hipocampo, se registran en el 44 – 48 % de las veces de forma simultánea en el giro dentado cuando éstas ocurren en CA3 en un modelo de lesión cortical sin el uso de estimulación eléctrica o agentes farmacológicos (Ortiz y Gutiérrez, 2015, esta tesis). La evidencia experimental indica que la parte proximal de CA3 también proyecta hacia el giro dentado (Scharfman, 2007), lo cual sugiere que ésta podría ser una vía de propagación de los eventos de alta frecuencia de CA3 al giro dentado. En el presente trabajo de tesis, mediante un modelo de desinhibición del hipocampo por lesión cortical que produce oscilaciones de alta frecuencia conocidas como *fast ripples* sin el uso de agentes farmacológicos o de estimulación eléctrica (Ortiz y Gutiérrez, 2015) se muestra evidencia de una propagación retrógrada de estas oscilaciones de CA3 al giro dentado.

7.1 Registro de actividad de alta frecuencia en el hipocampo y el giro dentado

Los estudios sobre este tipo de actividad típicamente han sido hechos *in vivo* con microelectrodos de múltiple contacto (tetrodos, 16 contactos) que cubren áreas como CA1 y el giro dentado (Bragin y cols., 2007), o con microelectrodos de un solo contacto

colocados en diferentes áreas como la corteza entorrinal, el giro dentado, CA3 y CA1 (Bragin y cols., 2000; Bragin y cols., 2005; Bragin y cols., 2002; Bragin y cols., 2004; Bragin y cols., 2003). Esta actividad ha sido inducida mediante la inyección intraperitoneal de kainato para inducir crisis epilépticas. También ha sido estudiada *in vitro* registrando tanto potenciales de campo como la actividad intracelular y ha sido inducida mediante el bloqueo de los receptores GABA_A con picrotoxina (D'Antuono y cols., 2005), o mediante el incremento de la concentración extracelular de potasio (Dzhala y Staley, 2004).

Es importante recalcar que, en el presente trabajo, el método para inducir oscilaciones de alta frecuencia fue una lesión cortical *in situ*, antes de extraer el cerebro para realizar la preparación de rebanadas y no se usó estimulación eléctrica, agentes farmacológicos, que cambien la inhibición GABAérgica, ni se alteró la concentración extracelular de iones como el potasio. Este tipo de actividad puede deberse a que la lesión cortico-cortical interrumpe posibles vías inhibitorias de la corteza entorrinal que controlan las oscilaciones del hipocampo (Melzer y cols., 2012; Ortiz y Gutiérrez, 2015). Es importante hacer mención que la actividad de muy alta frecuencia generada por la desinhibición es dependiente de actividad ya que si se incuban las rebanadas inmediatamente después de su preparación en una solución alta en magnesio y baja en calcio, las oscilaciones de alta frecuencia no ocurren.

Encontramos que una vez iniciada la actividad de alta frecuencia, ésta se propagaba hacia CA1, CA3 proximal, hilus y giro dentado. La propagación de dicha actividad es espacialmente discontinua y asincrónica.

7.2 Sitio de inicio de los eventos de alta frecuencia

En estudios anteriores se ha determinado que la actividad eléctrica epileptiforme inicia en el área CA3 y que si éste se aísla del resto del hipocampo, puede seguir generando dicha actividad de forma independiente de otras estructuras. Por otro lado, cuando se aísla CA1, éste raramente genera oscilaciones de alta frecuencia, normales o patológicas (Foffani y cols., 2007). También se ha determinado que ocurren de forma casi simultánea en el giro dentado (Scharfman, 1994a) y, en el caso de su inducción con picrotoxina, estas pueden ser generadas por el giro dentado independientemente de CA3 o la corteza entorrinal (D'Antuono y cols., 2005).

El uso de matrices de alta densidad de microelectrodos nos permitió determinar el sitio de inicio de los eventos de alta frecuencia. Estos inician normalmente en el área CA3 medial y CA3 distal, y raramente en el hilus, CA1 o el giro dentado.

7.3 Mecanismos de generación de las oscilaciones de alta frecuencia

Una lesión en la corteza entorrinal desencadena oscilaciones de alta frecuencia en el hipocampo. Cabe notar que en las diferentes capas de la corteza entorrinal hay una variedad de interneuronas GABAérgicas que coordinan la actividad en y entre las diferentes capas. También hay interneuronas que proyectan directamente al hipocampo (Canto y cols., 2008; Melzer y cols., 2012).

Las células piramidales de CA3 generan disparos en ráfaga de forma intrínseca, actividad que es coordinada por la amplia red de interneuronas GABAérgicas. En una

preparación desinhibida Miles y Wong (Miles y Wong, 1983) demostraron que una sola célula piramidal es capaz de desencadenar un evento interictal ante la inyección de corriente. Una vez que la célula desencadena el evento, la actividad de ésta recluta a más células y hay una acumulación de excitación que una vez que alcanza cierto umbral, es observada como un fenómeno de red, como lo demuestran estudios más recientes (de la Prida y cols., 2006).

La especificidad anatómica respecto al origen de este tipo de actividad puede ser influida por varios aspectos. Primero, en CA3 proximal el árbol axonal normalmente se encuentra constreñido alrededor de la célula de la cual emerge (con la excepción de aquellas células que proyectan hacia el hilus y el giro dentado) y escasamente proyecta fibras hacia CA3 medial y distal. Por otro lado, los árboles axonales de estas dos últimas sub-regiones proyectan fibras colaterales que se conectan extensamente entre sí. Es por ello que se ha sugerido que CA3 proximal no participa en las proyecciones de asociación de CA3 (Witter, 2007). Esto por sí solo no explica que los eventos interictales se generen preferentemente en estas sub-regiones; sin embargo, la probabilidad de que una célula piramidal reciba y emita un mayor número de conexiones sinápticas provenientes de o hacia otras células piramidales y, por ende desencadene el evento, es mayor.

Otro aspecto importante a tomar en cuenta es el papel de la inhibición. Recordemos que en el modelo de lesión cortical se plantea que se cortan fibras GABAérgicas entre la corteza entorrinal y el hipocampo que desencadenan las oscilaciones de alta frecuencia en el hipocampo. Se plantea que el sistema de fibras colaterales recurrentes de CA3 es capaz de generar estas oscilaciones de forma espontánea en todo momento y que la inhibición es un mecanismo que lo previene de

hacerlo. La inhibición coordinada junto con otros sistemas de neurotransmisión, como las fibras colinérgicas provenientes del septum, permiten que ante diferentes estados conductuales haya ventanas temporales en las cuales aumente la excitación de las células piramidales de CA3 o, bien, se debilite la inhibición y emerjan oscilaciones de alta frecuencia. Esta hipótesis tiene sentido ante la evidencia de que después del bloqueo de la transmisión glutamatérgica, tanto los *SPWRs* como los *fast ripples* desaparecen o su incidencia y amplitud son marcadamente reducidas (Hofer y cols., 2015; Papatheodoropoulos y Kostopoulos, 2002a, 2002b). Esto ha llevado a plantear que los *fast ripples* son una versión extrema de los *SWRs*, donde la inhibición perisomática que moldea el evento fisiológico está ausente (Gulyás y Freund, 2015).

Cuando nosotros usamos una solución baja en calcio para bloquear la transmisión química, los eventos de alta frecuencia desaparecieron y solo permaneció actividad multiunitaria con una alta incidencia y baja amplitud confinada a la capa piramidal de CA3 y CA1 y a la capa granular del giro dentado. El que en el giro dentado haya permanecido actividad multiunitaria así como en CA3 y CA1 se debe muy probablemente a la activación de corrientes persistentes de sodio por el bajo calcio. Esta corriente participa en la generación de ráfagas de potenciales de acción (Su y cols., 2001); sin embargo, al no existir una vía por la cual se propague la actividad de una neurona a otra, es imposible que se sincronicen un número mínimo de neuronas para generar *SPWRs* o bien, grupos de neuronas desfasados unos de otros para generar *fast ripples*.

7.4 Propagación de los eventos de alta frecuencia

Una vez determinado el sitio de inicio de los eventos de alta frecuencia, estudiamos su propagación y advertimos que ésta no era espacialmente uniforme; es decir, no siempre iniciaban en el mismo sitio y, aunque así fuera, nunca seguían la misma trayectoria de propagación. Se sabe, por ejemplo, que las ondas teta en el hipocampo son ondas que viajan del polo septal al polo temporal de forma desfasada (Lubenov y Siapas, 2009). De igual forma, las *SWRs* siguen un patrón de propagación que va del polo septal al polo temporal (Patel y cols., 2013; Ylinen y cols., 1995), mismo que obedece a un mecanismo de red bien coordinado. Este mecanismo parece ser mediado por interneuronas GABAérgicas inmunoreactivas a parvalbumina, ya que se sabe que son capaces de interconectar redes inhibitorias en el hipocampo mediadas por la inhibición sináptica de acción rápida (Fukuda y cols., 1996). Podemos decir entonces que la actividad osciladora en el hipocampo es un tipo de actividad que se propaga espacialmente de forma coordinada y con cierto desfase.

En el caso de las oscilaciones ultra-rápidas, éstas no inician en un sitio y se propagan de ahí a otro de forma espacialmente continua y coordinada, sino que varios sitios, espacialmente discontinuos y sin patrón alguno, pueden activarse y continuar con la propagación del evento de forma simultánea. Esto explica, y concuerda con estudios anteriores en los que se registran frecuencias por encima de 250 Hz y casi de hasta 600 Hz y que no pueden generarse monotónicamente por neuronas que disparen en ráfaga de forma coordinada, ya que la máxima frecuencia de disparo de una neurona piramidal es de aproximadamente 300 Hz. Por tanto, estas frecuencias sólo se explican por

disparos desfasados de grupos de neuronas, generando un solapamiento de las frecuencias que genera cada grupo y por ende, un registro de frecuencias de hasta 600 Hz (Foffani y cols., 2007).

7.5 Propagación de los eventos de alta frecuencia hacia el giro dentado

Una vez que determinamos que el inicio y propagación de los eventos de alta frecuencia no se encuentran espacial ni temporalmente coordinados, observamos que estos eventos también ocurrían en el giro dentado de forma casi simultánea y con características muy similares, salvo una menor amplitud y en sitios restringidos del giro dentado. Uno de nuestros objetivos fue determinar si los eventos de alta frecuencia se propagaban de CA3 al giro dentado.

Una observación muy importante fue que en el modelo de lesión cortical, el giro dentado puede presentar oscilaciones de muy alta frecuencia únicamente cuando éstas aparecen en el hipocampo; es decir, jamás se observaron en el giro dentado cuando había ausencia de ellas en CA3, lo cual sugiere una propagación de CA3 al giro dentado.

Primeramente descartamos una posible propagación de CA1 a la corteza entorrinal y de regreso al giro dentado. CA1 proyecta a áreas profundas de la corteza entorrinal como el área V, y ésta a su vez proyecta a áreas superficiales de la corteza entorrinal como el área II, misma que proyecta hacia el giro dentado, haciendo posible un bucle de propagación. Habría 4 sinapsis en el camino, CA3-CA1, CA1-capa V, capa V-capa II y capa II – giro dentado, lo cual equivaldría a una latencia de 15 a 20 milisegundos aproximadamente. Esto concuerda con algunas latencias observadas en

el giro dentado a partir del inicio del evento en CA3; sin embargo, descartamos que haya un bucle de propagación por 2 razones. Primero, en algunos experimentos se removió la corteza entorrinal, lo cual impide que se forme dicho bucle y, sin embargo, se observaron eventos de alta frecuencia en el giro dentado. Segundo, hay eventos que suceden en el giro dentado cuya latencia es de 5 a 10 milisegundos a partir del inicio del evento en CA3, lo cual descarta la posible propagación de estos eventos en un bucle formado por 4 sinapsis.

7.6 Conexiones Granger de CA3 al giro dentado

El análisis de conectividad causal en términos de Granger arrojó evidencia de conexiones funcionales directas entre CA3 y el giro dentado. CA3 establece conexiones anatómicas, directas (Li y cols., 1994) o indirectas (Scharfman, 2007), con el giro dentado que podrían mediar la propagación de los eventos de alta frecuencias de una estructura a la otra. Esta no es una conexión latente que se activa en condiciones patológicas como es el caso de las oscilaciones de alta frecuencia. Existe cada vez más evidencia acerca de un papel funcional de las proyecciones de CA3 al giro dentado. Estudios sugieren que hay una interacción recíproca entre el giro dentado y CA3 (Scharfman y Myers, 2016). La influencia del giro dentado sobre CA3 es ampliamente conocida; sin embargo, CA3 puede influir sobre la actividad osciladora del giro dentado a bajas frecuencias (Hsiao y cols., 2016). También hay evidencia de la activación del giro dentado durante la generación de altas frecuencias fisiológicas (100 200 Hz) en CA3 y CA1 (Penttonen y

cols., 1997), así como de altas frecuencias patológicas (D'Antuono et al., 2005). En este último caso cabe aclarar que las oscilaciones de alta frecuencia en estos estudios fueron generadas mediante un agente farmacológico como 4-AP, bicuculina o picrotoxina, o mediante el aumento en la concentración de potasio extracelular, lo cual interfiere con la transmisión sináptica GABAérgica o altera el potencial de reposo de las neuronas. En el modelo de desinhibición por lesión cortical que empleamos, ésta se logra sin interferir con la transmisión GABAérgica.

Además de las interacciones de CA3 al giro dentado, se estudiaron las interacciones entre CA3 y el hilus e hilus y giro dentado, todas en ambas direcciones. El análisis de regresión lineal de la latencia de los eventos en las diferentes áreas en función de la distancia arrojó valores (aproximadamente 0.1 m/s) que concuerdan con los reportados en la literatura para una propagación de la actividad de campo en condiciones epileptiformes (Qiu y cols., 2015).

7.7 Mecanismos de propagación hacia el giro dentado

Los efectos de campo pueden influir en el potencial transmembranal de las neuronas, afectando su actividad de disparo. Debido a las velocidades de propagación arrojadas por los análisis de causalidad de Granger y correlación cruzada, este parece ser el mecanismo de propagación de la actividad de alta frecuencia de CA3 al giro dentado; sin embargo, cabe la posibilidad de una propagación electrotónica mediada por un acople eléctrico.

Se ha reportado que, además de la desinhibición de las células piramidales en CA3 por el corte de fibras GABAérgicas, el disparo irregular de ráfagas de potenciales de acción en estas células se debe a grandes fluctuaciones del potencial de membrana causadas por la actividad sináptica aumentada (Foffani y cols., 2007). Cuando se cambió la solución de registro a una solución de registro baja en calcio para bloquear la transmisión química, los eventos de alta frecuencia desaparecieron y en su lugar permaneció actividad multiunitaria, sin la capacidad para sincronizarse y causar las oscilaciones de alta frecuencia, poniendo de manifiesto el papel de la transmisión química en la generación de las oscilaciones de alta frecuencia en CA3.

La actividad multiunitaria también permaneció en el giro dentado y para estudiar una posible influencia mutua de la actividad multiunitaria de CA3 y giro dentado mediada por uniones comunicantes, se realizaron simulaciones de Montecarlo tomando en cuenta los intervalos interespiga de CA3 y giro dentado en una ventana de 5 ms. Con este análisis se determinó que hay conexiones funcionales entre CA3 y el giro dentado y viceversa, siendo éstas más prominentes en la dirección de giro dentado a CA3. Cuando se aplicó mefluoquina, se observó una ligera reducción en el número de conexiones funcionales en ambas direcciones que no fue significativa. Esto puede deberse a que una solución baja en calcio activa a la corriente persistente de sodio, que influye en la generación de ráfagas de potenciales de acción, tanto en CA3 como en el giro dentado (Su y cols., 2001). En este caso el giro dentado pasó de ser una estructura silente a una estructura con actividad autosostenida, lo cual podría explicar la actividad multiunitaria en el giro dentado después de bloquear la transmisión química. La actividad autosostenida en el giro dentado podría ensombrecer la posible influencia de la actividad

de una estructura en la otra. Esto no descarta la posible propagación antidrómica de despolarizaciones en el *Stratum lucidum* con la generación de potenciales de acción ectópicos, como ha sido sugerido (Bähner y cols., 2011; Keros y Hablitz, 2005), así como por potenciales de acción producto de interacciones CA3-fibra musgosa por uniones comunicantes (Hamzei-Sichani y cols., 2012; Nagy, 2012; Vivar y cols., 2012).

7.8 Implicaciones funcionales

El flujo de información en el hipocampo ha sido representado como un circuito trisináptico donde la información fluye de forma unidireccional. Esta representación sigue vigente; sin embargo, en los últimos años ha habido descubrimientos que agregan complejidad al circuito. Uno de estos descubrimientos propone al giro dentado como una entrada indirecta al hipocampo, como una compuerta (Heinemann y cols., 1992).

Uno de los argumentos de esta propuesta es que CA3 se divide en regiones, CA3 proximal, CA3 medial y CA3 distal, y que las células y conexiones en éstas son heterogéneas y cumplen diferentes funciones. Hay evidencia de que CA3 medial y CA3 distal cumplen el papel de completamiento de patrones mientras que CA3 proximal, que tiene una estrecha relación con el giro dentado, cumple el papel de asistir al giro dentado en la modificación o codificación de nuevos patrones.

Funcionalmente, la heterogeneidad en la morfología y conexiones de las células piramidales de CA3 tiene relevancia. Se ha planteado que CA3 proximal, junto con el giro dentado, ayuda a codificar la nueva información entrante del mundo exterior,

mientras que CA3 medial y distal evocan la información ya almacenada (Lee y cols., 2015).

La actividad en conjunto del giro dentado y el hipocampo normalmente se refleja en actividad osciladora que puede ser de diferentes bandas de frecuencia. Un aspecto muy importante de esta actividad osciladora es que viaja tanto a lo largo del eje longitudinal como del eje transversal de forma ordenada. La forma de esta actividad es la de una onda que tiene un desfase diferente en cada punto por el que viaja y a su paso recluta células formando diferentes ensambles.

Las oscilaciones de alta frecuencia asociadas a focos epilépticos en cambio, rompen con este esquema de organización y se propagan de forma aleatoria en el hipocampo alcanzando al hilus y al giro dentado. En un paciente con epilepsia del lóbulo temporal, esto implica que no pueda o tenga dificultades para evocar recuerdos, ya que las células en el hipocampo no tienen los mecanismos necesarios para coordinar su actividad y formar los ensambles neuronales necesarios que forman el recuerdo. Es bien sabido que el patrón de disparo reciente en un ensamble de células, que es diferente a todos los anteriores y posiblemente codifique una nueva experiencia, es repetido de forma inversa durante las oscilaciones de alta frecuencia en el rango de 100 – 200 Hz denominadas *ripples* y que son una parte del mecanismo de la consolidación de la memoria (Foster y Wilson, 2006; Lopez-Pigozzi y cols., 2016). Para la consolidación de la memoria son necesarios tres patrones de oscilación y el acople fisiológico entre ellos: los *ripples*, las oscilaciones lentas y los husos del sueño; el primero en el hipocampo y los dos últimos en la neocórtex (Diekelmann y Born, 2010). Recientemente se demostró que las descargas epileptiformes interictales en el hipocampo pueden evocar

husos del sueño en la corteza prefrontal y que la frecuencia y nivel de sincronización correlaciona con el grado de déficit de la memoria (Gelinas y cols., 2016). En este caso no es posible determinar si ya había un patrón de disparo formado por una experiencia reciente, que no pudo ser transmitido de forma adecuada a la corteza prefrontal. Por otro lado, un punto muy importante es que la propagación de la actividad de alta frecuencia en el rango de los *fast ripples* al giro dentado podría impedir que se codifiquen nuevos patrones de experiencias recientes, lo cual explicaría de igual forma los déficits de memoria que presentan los pacientes con epilepsia del lóbulo temporal.

Otro punto importante es que el modelo de lesión cortical empleado en el presente trabajo para desinhibir al hipocampo es un modelo de epileptogénesis que tiene efectos inmediatos en la actividad osciladora del hipocampo. La actividad osciladora de alta frecuencia que describimos sucede durante eventos interictales y representa un biomarcador temprano de la zona epileptógena en humanos (Bragin y cols., 1999) que podría ser intervenido para prevenir el desarrollo de focos epilépticos (Ortiz y Gutiérrez, 2015) y los efectos secundarios de la epilepsia como déficits de memoria.

8. CONCLUSIÓN

En el presente trabajo de tesis se registraron cientos de sitios en el hipocampo y el giro dentado, lo cual nos permitió conocer a gran detalle el comportamiento y características de las oscilaciones de alta frecuencia en el rango de 250 a 600 Hz que suceden en zonas epileptógenas. La heterogeneidad de las células piramidales de CA3 y la forma en que están conectadas da pie al inicio de estas oscilaciones en la parte medial y distal de CA3. Su propagación es desordenada y los experimentos realizados en este trabajo de tesis demuestran que la actividad de red en CA3 puede influir directamente sobre la actividad de red del giro dentado sin la influencia de agentes farmacológicos o cambios en las concentraciones iónicas que afectan la actividad de red de ambas estructuras. Los resultados indican que esta influencia se debe principalmente a interacciones sinápticas, así como a efectos de campo; sin embargo, no se descarta una propagación mediada por uniones comunicantes.

9. REFERENCIAS

- Acsády, L., Kamondi, A., Sík, A., Freund, T., & Buzsáki, G. (1998). GABAergic cells are the major postsynaptic targets of mossy fibers in the rat hippocampus. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *18*(9), 3386–3403.
- Amaral, D. G., Ishizuka, N., & Claiborne, B. (1990). Neurons, numbers and the hippocampal network. *Progress in Brain Research*, *83*, 1–11.
- Andersen, P. (Ed.). (2007). *The hippocampus book*. Oxford ; New York: Oxford University Press.
- Bähner, F., Weiss, E. K., Birke, G., Maier, N., Schmitz, D., Rudolph, U., ... Draguhn, A. (2011). Cellular correlate of assembly formation in oscillating hippocampal networks in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(35), E607-616.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1103546108>
- Barnett, L., & Seth, A. K. (2014). The MVGC multivariate Granger causality toolbox: a new approach to Granger-causal inference. *Journal of Neuroscience Methods*, *223*, 50–68.
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2013.10.018>
- Barth, D. S. (2003). Submillisecond synchronization of fast electrical oscillations in neocortex. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *23*(6), 2502–2510.
- Basu, J., Zaremba, J. D., Cheung, S. K., Hitti, F. L., Zemelman, B. V., Losonczy, A., & Siegelbaum, S. A. (2016). Gating of hippocampal activity, plasticity, and memory by entorhinal cortex long-range inhibition. *Science (New York, N.Y.)*, *351*(6269), aaa5694.
<https://doi.org/10.1126/science.aaa5694>
- Bennett, M. R., Gibson, W. G., & Robinson, J. (1994). Dynamics of the CA3 pyramidal neuron autoassociative memory network in the hippocampus. *Philosophical Transactions of the Royal*

Society of London. Series B, Biological Sciences, 343(1304), 167–187.

<https://doi.org/10.1098/rstb.1994.0019>

Blaker, S. N., Armstrong, D. M., & Gage, F. H. (1988). Cholinergic neurons within the rat hippocampus: response to fimbria-fornix transection. *The Journal of Comparative Neurology, 272(1)*, 127–138.

<https://doi.org/10.1002/cne.902720109>

Bragin, A., Engel, J., Wilson, C. L., Fried, I., & Buzsáki, G. (1999). High-frequency oscillations in human brain. *Hippocampus, 9(2)*, 137–142. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1063(1999)9:2<137::AID-HIPO5>3.0.CO;2-0)

[1063\(1999\)9:2<137::AID-HIPO5>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1063(1999)9:2<137::AID-HIPO5>3.0.CO;2-0)

Bragin, A., Wilson, C. L., & Engel, J. (2000). Chronic epileptogenesis requires development of a network of pathologically interconnected neuron clusters: a hypothesis. *Epilepsia, 41 Suppl 6*, S144-152.

Bragin, Anatol, Azizyan, A., Almajano, J., Wilson, C. L., & Engel, J. (2005). Analysis of chronic seizure onsets after intrahippocampal kainic acid injection in freely moving rats. *Epilepsia, 46(10)*, 1592–1598. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2005.00268.x>

Bragin, Anatol, Engel, J., & Staba, R. J. (2010). High-frequency oscillations in epileptic brain. *Current Opinion in Neurology, 23(2)*, 151–156. <https://doi.org/10.1097/WCO.0b013e3283373ac8>

Bragin, Anatol, Mody, I., Wilson, C. L., & Engel, J. (2002). Local generation of fast ripples in epileptic brain. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience, 22(5)*, 2012–2021.

Bragin, Anatol, Wilson, C. L., Almajano, J., Mody, I., & Engel, J. (2004). High-frequency oscillations after status epilepticus: epileptogenesis and seizure genesis. *Epilepsia, 45(9)*, 1017–1023.

<https://doi.org/10.1111/j.0013-9580.2004.17004.x>

Bragin, Anatol, Wilson, C. L., & Engel, J. (2003). Spatial stability over time of brain areas generating fast ripples in the epileptic rat. *Epilepsia, 44(9)*, 1233–1237.

- Bragin, Anatol, Wilson, C. L., & Engel, J. (2007). Voltage depth profiles of high-frequency oscillations after kainic acid-induced status epilepticus. *Epilepsia*, *48 Suppl 5*, 35–40.
<https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2007.01287.x>
- Buckmaster, P. S., Strowbridge, B. W., Kunkel, D. D., Schmiede, D. L., & Schwartzkroin, P. A. (1992). Mossy cell axonal projections to the dentate gyrus molecular layer in the rat hippocampal slice. *Hippocampus*, *2*(4), 349–362. <https://doi.org/10.1002/hipo.450020403>
- Buzsáki, G. (1989). Two-stage model of memory trace formation: a role for “noisy” brain states. *Neuroscience*, *31*(3), 551–570.
- Buzsáki, G. (2006). Capítulo 6. Synchronization by oscillation. En *Rhythms of the brain*. Oxford ; New York: Oxford University Press.
- Canto, C. B., Wouterlood, F. G., & Witter, M. P. (2008). What does the anatomical organization of the entorhinal cortex tell us? *Neural Plasticity*, *2008*, 381243. <https://doi.org/10.1155/2008/381243>
- Chan, C. Y., Hounsgaard, J., & Nicholson, C. (1988). Effects of electric fields on transmembrane potential and excitability of turtle cerebellar Purkinje cells in vitro. *The Journal of Physiology*, *402*, 751–771.
- Chan, C. Y., & Nicholson, C. (1986). Modulation by applied electric fields of Purkinje and stellate cell activity in the isolated turtle cerebellum. *The Journal of Physiology*, *371*, 89–114.
- Claiborne, B. J., Amaral, D. G., & Cowan, W. M. (1986). A light and electron microscopic analysis of the mossy fibers of the rat dentate gyrus. *The Journal of Comparative Neurology*, *246*(4), 435–458.
<https://doi.org/10.1002/cne.902460403>
- Cobb, S. R., Buhl, E. H., Halasy, K., Paulsen, O., & Somogyi, P. (1995). Synchronization of neuronal activity in hippocampus by individual GABAergic interneurons. *Nature*, *378*(6552), 75–78.
<https://doi.org/10.1038/378075a0>

- Cobb, S. R., Halasy, K., Vida, I., Nyiri, G., Tamás, G., Buhl, E. H., & Somogyi, P. (1997). Synaptic effects of identified interneurons innervating both interneurons and pyramidal cells in the rat hippocampus. *Neuroscience*, *79*(3), 629–648.
- Cohen, I., & Miles, R. (2000). Contributions of intrinsic and synaptic activities to the generation of neuronal discharges in in vitro hippocampus. *The Journal of Physiology*, *524 Pt 2*, 485–502.
- Csicsvari, J., Jamieson, B., Wise, K. D., & Buzsáki, G. (2003). Mechanisms of gamma oscillations in the hippocampus of the behaving rat. *Neuron*, *37*(2), 311–322.
- D’Antuono, M., de Guzman, P., Kano, T., & Avoli, M. (2005). Ripple activity in the dentate gyrus of disinhibited hippocampus-entorhinal cortex slices. *Journal of Neuroscience Research*, *80*(1), 92–103. <https://doi.org/10.1002/jnr.20440>
- David, O., Cosmelli, D., & Friston, K. J. (2004). Evaluation of different measures of functional connectivity using a neural mass model. *NeuroImage*, *21*(2), 659–673. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2003.10.006>
- de la Prida, L. M., Huberfeld, G., Cohen, I., & Miles, R. (2006). Threshold behavior in the initiation of hippocampal population bursts. *Neuron*, *49*(1), 131–142. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.10.034>
- Deans, J. K., Powell, A. D., & Jefferys, J. G. R. (2007). Sensitivity of coherent oscillations in rat hippocampus to AC electric fields. *The Journal of Physiology*, *583*(Pt 2), 555–565. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.137711>
- Deller, T., Martinez, A., Nitsch, R., & Frotscher, M. (1996). A novel entorhinal projection to the rat dentate gyrus: direct innervation of proximal dendrites and cell bodies of granule cells and GABAergic neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *16*(10), 3322–3333.

- Diekelmann, S., & Born, J. (2010). The memory function of sleep. *Nature Reviews. Neuroscience*, *11*(2), 114–126. <https://doi.org/10.1038/nrn2762>
- Dolorfo, C. L., & Amaral, D. G. (1998). Entorhinal cortex of the rat: topographic organization of the cells of origin of the perforant path projection to the dentate gyrus. *The Journal of Comparative Neurology*, *398*(1), 25–48.
- Draguhn, A., Traub, R. D., Schmitz, D., & Jefferys, J. G. (1998). Electrical coupling underlies high-frequency oscillations in the hippocampus in vitro. *Nature*, *394*(6689), 189–192. <https://doi.org/10.1038/28184>
- Dzhala, V. I., & Staley, K. J. (2004). Mechanisms of fast ripples in the hippocampus. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *24*(40), 8896–8906. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3112-04.2004>
- Engel, J., Bragin, A., Staba, R., & Mody, I. (2009). High-frequency oscillations: what is normal and what is not? *Epilepsia*, *50*(4), 598–604. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2008.01917.x>
- Feldt, S., Bonifazi, P., & Cossart, R. (2011). Dissecting functional connectivity of neuronal microcircuits: experimental and theoretical insights. *Trends in Neurosciences*, *34*(5), 225–236. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2011.02.007>
- Foffani, G., Uzcategui, Y. G., Gal, B., & Menendez de la Prida, L. (2007). Reduced spike-timing reliability correlates with the emergence of fast ripples in the rat epileptic hippocampus. *Neuron*, *55*(6), 930–941. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.07.040>
- Foster, D. J., & Wilson, M. A. (2006a). Reverse replay of behavioural sequences in hippocampal place cells during the awake state. *Nature*, *440*(7084), 680–683. <https://doi.org/10.1038/nature04587>
- Foster, D. J., & Wilson, M. A. (2006b). Reverse replay of behavioural sequences in hippocampal place cells during the awake state. *Nature*, *440*(7084), 680–683. <https://doi.org/10.1038/nature04587>

- Freund, T. F., & Buzsáki, G. (1996). Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*, *6*(4), 347–470.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1063\(1996\)6:4<347::AID-HIPO1>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1063(1996)6:4<347::AID-HIPO1>3.0.CO;2-I)
- Frotscher, M., Vida, I., & Bender, R. (2000). Evidence for the existence of non-GABAergic, cholinergic interneurons in the rodent hippocampus. *Neuroscience*, *96*(1), 27–31.
- Fukuda, T., Aika, Y., Heizmann, C. W., & Kosaka, T. (1996). Dense GABAergic input on somata of parvalbumin-immunoreactive GABAergic neurons in the hippocampus of the mouse. *Neuroscience Research*, *26*(2), 181–194.
- Gaillard, R., Dehaene, S., Adam, C., Clémenceau, S., Hasboun, D., Baulac, M., ... Naccache, L. (2009). Converging intracranial markers of conscious access. *PLoS Biology*, *7*(3), e61.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000061>
- Galarreta, M., & Hestrin, S. (2001). Electrical synapses between GABA-releasing interneurons. *Nature Reviews. Neuroscience*, *2*(6), 425–433. <https://doi.org/10.1038/35077566>
- Gelinas, J. N., Khodagholy, D., Thesen, T., Devinsky, O., & Buzsáki, G. (2016). Interictal epileptiform discharges induce hippocampal-cortical coupling in temporal lobe epilepsy. *Nature Medicine*, *22*(6), 641–648. <https://doi.org/10.1038/nm.4084>
- Germroth, P., Schwerdtfeger, W. K., & Buhl, E. H. (1991). Ultrastructure and aspects of functional organization of pyramidal and nonpyramidal entorhinal projection neurons contributing to the perforant path. *The Journal of Comparative Neurology*, *305*(2), 215–231.
<https://doi.org/10.1002/cne.903050205>
- Ghai, R. S., Bikson, M., & Durand, D. M. (2000). Effects of applied electric fields on low-calcium epileptiform activity in the CA1 region of rat hippocampal slices. *Journal of Neurophysiology*, *84*(1), 274–280.
- Granger, C. W. J. (1969). Investigating Causal Relations by Econometric Models and Cross-spectral Methods. *Econometrica*, *37*(3), 424. <https://doi.org/10.2307/1912791>

- Gulyás, A. I., & Freund, T. T. (2015). Generation of physiological and pathological high frequency oscillations: the role of perisomatic inhibition in sharp-wave ripple and interictal spike generation. *Current Opinion in Neurobiology*, *31*, 26–32.
<https://doi.org/10.1016/j.conb.2014.07.020>
- Gutiérrez, R. (2016). The plastic neurotransmitter phenotype of the hippocampal granule cells and of the moss in their messy fibers. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, *73*, 9–20.
<https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2015.11.007>
- Hamzei-Sichani, F., Davidson, K. G. V., Yasumura, T., Janssen, W. G. M., Wearne, S. L., Hof, P. R., ... Rash, J. E. (2012). Mixed Electrical-Chemical Synapses in Adult Rat Hippocampus are Primarily Glutamatergic and Coupled by Connexin-36. *Frontiers in Neuroanatomy*, *6*, 13.
<https://doi.org/10.3389/fnana.2012.00013>
- Heinemann, U., Beck, H., Dreier, J. P., Ficker, E., Stabel, J., & Zhang, C. L. (1992). The dentate gyrus as a regulated gate for the propagation of epileptiform activity. *Epilepsy Research. Supplement*, *7*, 273–280.
- Hofer, K. T., Kandrács, Á., Ulbert, I., Pál, I., Szabó, C., Héja, L., & Wittner, L. (2015). The hippocampal CA3 region can generate two distinct types of sharp wave-ripple complexes, in vitro. *Hippocampus*, *25*(2), 169–186. <https://doi.org/10.1002/hipo.22361>
- Hsiao, Y.-T., Zheng, C., & Colgin, L. L. (2016). Slow gamma rhythms in CA3 are entrained by slow gamma activity in the dentate gyrus. *Journal of Neurophysiology*, *116*(6), 2594–2603.
<https://doi.org/10.1152/jn.00499.2016>
- Ishizuka, N., Weber, J., & Amaral, D. G. (1990). Organization of intrahippocampal projections originating from CA3 pyramidal cells in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, *295*(4), 580–623.
<https://doi.org/10.1002/cne.902950407>

- Jacobs, J., Levan, P., Châtillon, C.-E., Olivier, A., Dubeau, F., & Gotman, J. (2009). High frequency oscillations in intracranial EEGs mark epileptogenicity rather than lesion type. *Brain: A Journal of Neurology*, *132*(Pt 4), 1022–1037. <https://doi.org/10.1093/brain/awn351>
- Jacobs, J., Zijlmans, M., Zelmann, R., Chatillon, C.-E., Hall, J., Olivier, A., ... Gotman, J. (2010). High-frequency electroencephalographic oscillations correlate with outcome of epilepsy surgery. *Annals of Neurology*, *67*(2), 209–220. <https://doi.org/10.1002/ana.21847>
- Jefferys, J. G., & Haas, H. L. (1982). Synchronized bursting of CA1 hippocampal pyramidal cells in the absence of synaptic transmission. *Nature*, *300*(5891), 448–450.
- Jiruska, P., Finnerty, G. T., Powell, A. D., Lofti, N., Cmejla, R., & Jefferys, J. G. R. (2010). Epileptic high-frequency network activity in a model of non-lesional temporal lobe epilepsy. *Brain: A Journal of Neurology*, *133*(Pt 5), 1380–1390. <https://doi.org/10.1093/brain/awq070>
- Katsumaru, H., Kosaka, T., Heizmann, C. W., & Hama, K. (1988). Gap junctions on GABAergic neurons containing the calcium-binding protein parvalbumin in the rat hippocampus (CA1 region). *Experimental Brain Research*, *72*(2), 363–370.
- Keros, S., & Hablitz, J. J. (2005). Ectopic action potential generation in cortical interneurons during synchronized GABA responses. *Neuroscience*, *131*(4), 833–842. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.12.010>
- Köhling, R., & Staley, K. (2011). Network mechanisms for fast ripple activity in epileptic tissue. *Epilepsy Research*, *97*(3), 318–323. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2011.03.006>
- Krauth, W. (2006). *Statistical mechanics: algorithms and computations*. Oxford: Oxford Univ. Press.
- Lassalle, J. M., Bataille, T., & Halley, H. (2000). Reversible inactivation of the hippocampal mossy fiber synapses in mice impairs spatial learning, but neither consolidation nor memory retrieval, in the Morris navigation task. *Neurobiology of Learning and Memory*, *73*(3), 243–257. <https://doi.org/10.1006/nlme.1999.3931>

- Le Van Quyen, M., Bragin, A., Staba, R., Crépon, B., Wilson, C. L., & Engel, J. (2008). Cell type-specific firing during ripple oscillations in the hippocampal formation of humans. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *28*(24), 6104–6110. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0437-08.2008>
- Lee, H., Wang, C., Deshmukh, S. S., & Knierim, J. J. (2015). Neural Population Evidence of Functional Heterogeneity along the CA3 Transverse Axis: Pattern Completion versus Pattern Separation. *Neuron*, *87*(5), 1093–1105. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.07.012>
- Lee, I., & Kesner, R. P. (2004). Encoding versus retrieval of spatial memory: double dissociation between the dentate gyrus and the perforant path inputs into CA3 in the dorsal hippocampus. *Hippocampus*, *14*(1), 66–76. <https://doi.org/10.1002/hipo.10167>
- Li, X. G., Somogyi, P., Ylinen, A., & Buzsáki, G. (1994). The hippocampal CA3 network: an in vivo intracellular labeling study. *The Journal of Comparative Neurology*, *339*(2), 181–208. <https://doi.org/10.1002/cne.903390204>
- Lopez-Pigozzi, D., Laurent, F., Brotons-Mas, J. R., Valderrama, M., Valero, M., Fernandez-Lamo, I., ... Menendez de la Prida, L. (2016). Altered Oscillatory Dynamics of CA1 Parvalbumin Basket Cells during Theta-Gamma Rhythmpathies of Temporal Lobe Epilepsy. *eNeuro*, *3*(6). <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0284-16.2016>
- Lubenov, E. V., & Siapas, A. G. (2009). Hippocampal theta oscillations are travelling waves. *Nature*, *459*(7246), 534–539. <https://doi.org/10.1038/nature08010>
- Maier, N., Nimrich, V., & Draguhn, A. (2003). Cellular and network mechanisms underlying spontaneous sharp wave-ripple complexes in mouse hippocampal slices. *The Journal of Physiology*, *550*(Pt 3), 873–887. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.044602>
- McCormick, D. A., & Pape, H. C. (1990). Properties of a hyperpolarization-activated cation current and its role in rhythmic oscillation in thalamic relay neurones. *The Journal of Physiology*, *431*, 291–318.

- Melzer, S., Michael, M., Caputi, A., Eliava, M., Fuchs, E. C., Whittington, M. A., & Monyer, H. (2012). Long-range-projecting GABAergic neurons modulate inhibition in hippocampus and entorhinal cortex. *Science (New York, N.Y.)*, *335*(6075), 1506–1510.
<https://doi.org/10.1126/science.1217139>
- Miles, R., & Wong, R. K. (1983). Single neurones can initiate synchronized population discharge in the hippocampus. *Nature*, *306*(5941), 371–373.
- Myers, C. E., & Scharfman, H. E. (2011). Pattern separation in the dentate gyrus: a role for the CA3 backprojection. *Hippocampus*, *21*(11), 1190–1215. <https://doi.org/10.1002/hipo.20828>
- Nagy, J. I. (2012). Evidence for connexin36 localization at hippocampal mossy fiber terminals suggesting mixed chemical/electrical transmission by granule cells. *Brain Research*, *1487*, 107–122.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.05.064>
- Noebels, J. L., & Prince, D. A. (1978). Development of focal seizures in cerebral cortex: role of axon terminal bursting. *Journal of Neurophysiology*, *41*(5), 1267–1281.
- O'Keefe, J., & Dostrovsky, J. (1971). The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Research*, *34*(1), 171–175.
- Ortiz, F., & Gutiérrez, R. (2015). Entorhinal cortex lesions result in adenosine-sensitive high frequency oscillations in the hippocampus. *Experimental Neurology*, *271*, 319–328.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.06.009>
- Ozen, S., Sirota, A., Belluscio, M. A., Anastassiou, C. A., Stark, E., Koch, C., & Buzsáki, G. (2010). Transcranial electric stimulation entrains cortical neuronal populations in rats. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *30*(34), 11476–11485.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5252-09.2010>
- Papatheodoropoulos, C., & Kostopoulos, G. (2002a). Spontaneous GABA(A)-dependent synchronous periodic activity in adult rat ventral hippocampal slices. *Neuroscience Letters*, *319*(1), 17–20.

- Papatheodoropoulos, C., & Kostopoulos, G. (2002b). Spontaneous, low frequency (approximately 2-3 Hz) field activity generated in rat ventral hippocampal slices perfused with normal medium. *Brain Research Bulletin*, 57(2), 187–193.
- Patel, J., Schomburg, E. W., Berényi, A., Fujisawa, S., & Buzsáki, G. (2013). Local generation and propagation of ripples along the septotemporal axis of the hippocampus. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 33(43), 17029–17041. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2036-13.2013>
- Penttonen, M., Kamondi, A., Sik, A., Acsády, L., & Buzsáki, G. (1997). Feed-forward and feed-back activation of the dentate gyrus in vivo during dentate spikes and sharp wave bursts. *Hippocampus*, 7(4), 437–450. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1063\(1997\)7:4<437::AID-HIPO9>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1063(1997)7:4<437::AID-HIPO9>3.0.CO;2-F)
- Qiu, C., Shivacharan, R. S., Zhang, M., & Durand, D. M. (2015). Can Neural Activity Propagate by Endogenous Electrical Field? *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 35(48), 15800–15811. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1045-15.2015>
- Radman, T., Su, Y., An, J. H., Parra, L. C., & Bikson, M. (2007). Spike timing amplifies the effect of electric fields on neurons: implications for endogenous field effects. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(11), 3030–3036. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0095-07.2007>
- Ringach, D. L. (2009). Spontaneous and driven cortical activity: implications for computation. *Current Opinion in Neurobiology*, 19(4), 439–444. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2009.07.005>
- Rodriguez, E., George, N., Lachaux, J. P., Martinerie, J., Renault, B., & Varela, F. J. (1999). Perception's shadow: long-distance synchronization of human brain activity. *Nature*, 397(6718), 430–433. <https://doi.org/10.1038/17120>

- Rolls, E. T. (1996). A theory of hippocampal function in memory. *Hippocampus*, 6(6), 601–620.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1063\(1996\)6:6<AID-HIPO5>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1063(1996)6:6<AID-HIPO5>3.0.CO;2-J)
- Romo-Parra, H., Vivar, C., Maqueda, J., Morales, M. A., & Gutiérrez, R. (2003). Activity-dependent induction of multitransmitter signaling onto pyramidal cells and interneurons of hippocampal area CA3. *Journal of Neurophysiology*, 89(6), 3155–3167. <https://doi.org/10.1152/jn.00985.2002>
- Scharfman, H. E. (1994a). EPSPs of dentate gyrus granule cells during epileptiform bursts of dentate hilar “mossy” cells and area CA3 pyramidal cells in disinhibited rat hippocampal slices. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 14(10), 6041–6057.
- Scharfman, H. E. (1994b). Evidence from simultaneous intracellular recordings in rat hippocampal slices that area CA3 pyramidal cells innervate dentate hilar mossy cells. *Journal of Neurophysiology*, 72(5), 2167–2180.
- Scharfman, H. E. (1996). Conditions required for polysynaptic excitation of dentate granule cells by area CA3 pyramidal cells in rat hippocampal slices. *Neuroscience*, 72(3), 655–668.
- Scharfman, Helen E. (2007). The CA3 “backprojection” to the dentate gyrus. *Progress in Brain Research*, 163, 627–637. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(07\)63034-9](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(07)63034-9)
- Scharfman, Helen E., y Myers, C. E. (2016). Corruption of the dentate gyrus by “dominant” granule cells: Implications for dentate gyrus function in health and disease. *Neurobiology of Learning and Memory*, 129, 69–82. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2015.09.005>
- Schmitz, D., Schuchmann, S., Fisahn, A., Draguhn, A., Buhl, E. H., Petrasch-Parwez, E., ... Traub, R. D. (2001). Axo-axonal coupling. a novel mechanism for ultrafast neuronal communication. *Neuron*, 31(5), 831–840.
- Scoville, W. B., & Milner, B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 20(1), 11–21.

- Somogyi, P., & Klausberger, T. (2005). Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus. *The Journal of Physiology*, 562(Pt 1), 9–26.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.078915>
- Soriano, E., & Frotscher, M. (1994). Mossy cells of the rat fascia dentata are glutamate-immunoreactive. *Hippocampus*, 4(1), 65–69. <https://doi.org/10.1002/hipo.450040108>
- Staba, R. J., Frigetto, L., Behnke, E. J., Mathern, G. W., Fields, T., Bragin, A., ... Engel, J. (2007). Increased fast ripple to ripple ratios correlate with reduced hippocampal volumes and neuron loss in temporal lobe epilepsy patients. *Epilepsia*, 48(11), 2130–2138. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2007.01225.x>
- Su, H., Alroy, G., Kirson, E. D., & Yaari, Y. (2001). Extracellular calcium modulates persistent sodium current-dependent burst-firing in hippocampal pyramidal neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 21(12), 4173–4182.
- Sullivan, D., Csicsvari, J., Mizuseki, K., Montgomery, S., Diba, K., & Buzsáki, G. (2011). Relationships between hippocampal sharp waves, ripples, and fast gamma oscillation: influence of dentate and entorhinal cortical activity. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 31(23), 8605–8616. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0294-11.2011>
- Traub, R. D., Whittington, M. A., Colling, S. B., Buzsáki, G., & Jefferys, J. G. (1996). Analysis of gamma rhythms in the rat hippocampus in vitro and in vivo. *The Journal of Physiology*, 493 (Pt 2), 471–484.
- Traub, Roger D., & Miles, R. (2008). *Neuronal networks of the hippocampus*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Treves, A., & Rolls, E. T. (1992). Computational constraints suggest the need for two distinct input systems to the hippocampal CA3 network. *Hippocampus*, 2(2), 189–199.
<https://doi.org/10.1002/hipo.450020209>

- Treves, A., & Rolls, E. T. (1994). Computational analysis of the role of the hippocampus in memory. *Hippocampus*, 4(3), 374–391. <https://doi.org/10.1002/hipo.450040319>
- Turner, D. A., Li, X. G., Pyapali, G. K., Ylinen, A., & Buzsáki, G. (1995). Morphometric and electrical properties of reconstructed hippocampal CA3 neurons recorded in vivo. *The Journal of Comparative Neurology*, 356(4), 580–594. <https://doi.org/10.1002/cne.903560408>
- Vivar, C., Traub, R. D., & Gutiérrez, R. (2012). Mixed electrical-chemical transmission between hippocampal mossy fibers and pyramidal cells. *The European Journal of Neuroscience*, 35(1), 76–82. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07930.x>
- Wang, X. J., & Buzsáki, G. (1996). Gamma oscillation by synaptic inhibition in a hippocampal interneuronal network model. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 16(20), 6402–6413.
- Whittington, M. A., Traub, R. D., & Jefferys, J. G. (1995). Synchronized oscillations in interneuron networks driven by metabotropic glutamate receptor activation. *Nature*, 373(6515), 612–615. <https://doi.org/10.1038/373612a0>
- Witter, M. P. (2007). Intrinsic and extrinsic wiring of CA3: indications for connective heterogeneity. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 14(11), 705–713. <https://doi.org/10.1101/lm.725207>
- Wong, R. K., & Prince, D. A. (1979). Dendritic mechanisms underlying penicillin-induced epileptiform activity. *Science (New York, N.Y.)*, 204(4398), 1228–1231.
- Wong, R. K., & Prince, D. A. (1981). Afterpotential generation in hippocampal pyramidal cells. *Journal of Neurophysiology*, 45(1), 86–97.
- Ylinen, A., Bragin, A., Nádasdy, Z., Jandó, G., Szabó, I., Sik, A., & Buzsáki, G. (1995). Sharp wave-associated high-frequency oscillation (200 Hz) in the intact hippocampus: network and

intracellular mechanisms. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 15(1 Pt 1), 30–46.



Entorhinal cortex lesions result in adenosine-sensitive high frequency oscillations in the hippocampus



Franco Ortiz^{a,b}, Rafael Gutiérrez^{a,*}

^a Department of Pharmacobiology, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Mexico City 14330, México

^b Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México D.F. 04510, México

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 February 2015

Received in revised form 19 May 2015

Accepted 7 June 2015

Available online 10 June 2015

Keywords:

Entorhinal cortex

CA3

Dentate gyrus

Ripples

Fast ripples

High frequency oscillations

Cortical trauma

Adenosine

ABSTRACT

Entorhinal cortex (EC) projections to the hippocampus run along the perforant path and activate the hippocampal area CA3 and the dentate gyrus (DG), which, in turn, drives CA3. Because cortical trauma damages the source of inputs to the hippocampus, we hypothesize that such an event can be reflected in immediate alterations of the hippocampal oscillatory activity. We here explore whether acute, localized disruption of EC–EC connectivity is involved in the generation or modulation of high frequency oscillations (HFOs) in the hippocampus. We conducted *in vitro* electrophysiological recordings in CA3 and DG of combined EC–hippocampal transversal slices prepared from intact brains and from brains with a spatially defined, transversal cut of the EC made *in situ*, 2 h before *in vitro* recordings commenced. We also determined if pharmacological manipulations of the adenosine system modulated the fast oscillatory activity. EC–hippocampal slices prepared from brains, in which a transversal lesion of the EC was uni- or bilaterally conducted *in situ*, displayed spontaneous epileptiform events with superimposed ripples (150–250 Hz) and fast ripples (>250 Hz), whereas those obtained from non-lesioned brains *did not have* spontaneous HFOs. However, in the latter, high frequency stimulation applied to the perforant path produced ripple activity in area CA3. Spontaneous fast ripples were prevented by conducting the slicing procedure and incubating the slices both in a Na⁺-free medium and in a low Ca⁺⁺-high Mg⁺⁺ medium for an hour before recording commenced, under normal Na⁺ concentration. Activation of A₁, but not A₂, receptors produced a strong inhibition of the incidence and spectral power of fast ripples but did not change their intrinsic frequency. Our data show that the disruption of EC-to-EC connections can immediately disinhibit hippocampal CA3 area to generate HFOs on top of epileptiform events, probably constituting an irritating focus long before overt epileptic activity can be detected behaviorally. Therefore, the activation of the adenosinergic system can possibly be regarded as an immediate intervention strategy to avoid epileptogenesis.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Traumatic brain injury (TBI) and its consequences have been difficult to address experimentally, mainly because TBI patients often present a variety of lesions that differ in severity and distribution. Thus, animal models of TBI may not replicate this span of lesions. On the other hand, the latter can be designed to directly address the effects of specific lesions in order to rule out their involvement in a more complex and realistic case. Although TBI usually refers to a damage affecting the brain function resulting from non-penetrating loading of the contact and non-contact type (O'Connor et al., 2011), indentation and damage to very restricted cortical areas (for a review on military TBI see Risdall and Menon, 2011) resulting in deafferentation may shed light into their functional interactions in health and disease. One of the

consequences of TBI is post-traumatic epilepsy, although its development in human patients can take weeks or years. In clear contrast to human cases, where the worst case scenario is a concussion that leads to tissue damage with diffuse axonal injury and intracranial hemorrhage, animal models can replicate the causes of the injury (Frey et al., 2009) as well as produce controlled, more severe “axonal injury”, like the deafferentation of entorhinal cortex (EC)-to-EC connections that we here study.

High frequency oscillations (ripples and fast ripples) constitute events reflecting high synchrony physiological patterns in the nervous system (Sullivan et al., 2011). Fast ripples (>250 Hz) were considered a biomarker of epileptic activity in the hippocampus and entorhinal cortex, signaling its point of origin (Bragin et al., 1999), however they possess distinct characteristics with respect to events in the ripple frequency range (up to 250 Hz; Sullivan et al., 2011). Although initiation of interictal and ictal activity in the hippocampus can be independent of the EC (Dzhala and Staley, 2003), in combined EC–hippocampal slices, seizure-like activity is generated primarily in the entorhinal and perirhinal cortices and from there it propagates to hippocampal areas

* Corresponding author at: Department of Pharmacobiology, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Calzada de los Tenorios No. 235, México D.F. 14330, México.

E-mail address: rafagut@cinvestav.mx (R. Gutiérrez).

CA1 and CA3 (Jones and Heinemann, 1988; de Guzman et al., 2004; Avoli et al., 2002; Avoli and de Curtis, 2011). Moreover, experimental and human studies in temporal lobe epilepsy have shown neuronal cell loss in layer III of the EC (Du et al., 1993, 1995), which may facilitate reentrant activation of the hippocampal–EC loop via disinhibition of local networks in CA1 (Empson and Heinemann, 1995). Thus, hippocampal lesions themselves are not a prerequisite for HFOs to appear (Jiruska et al., 2010). Because the dentate gyrus (DG) regulates the flow of normal and pathological information between the EC and the hippocampus proper (Buzsáki et al., 1983; Heinemann et al., 1992; Krook-Magnuson et al., 2015), post-traumatic alterations can be reflected in the DG-to-CA3 synapse (Santhakumarm et al., 2003; Heinemann et al., 1992). Furthermore, it has been shown that in a model of TBI, where an injury is provoked by fluid percussion over the parietal cortex, hilar neurons of both hippocampi die as fast as 4 h after the concussion, possibly leading to hyperexcitability in the DG (Lowenstein et al., 1992). Thus, changes in excitability and network interactions in the cortex may precede the involvement of the hippocampus during the development of temporal lobe epilepsy (de Curtis and Paré, 2004; Lowenstein et al., 1992). For example, long range projecting GABAergic cells from the EC to the hippocampus (Germroth et al., 1989; Melzer et al., 2012) may be tonically suppressing the expression of HFOs of the hippocampus.

We here present data supporting the proposal that EC lesions disrupt a tonic inhibitory control of the EC on the hippocampal circuitry responsible for generating epileptiform events containing ripple and fast ripple activity and that by disrupting EC-to-EC projections, the hippocampal circuitry is functionally reorganized along its axis. With field recordings of EC–hippocampal slices *in vitro* we here show that epileptiform events with fast ripple activity appeared after conducting a uni- or bilateral transversal lesion of the EC *in situ*, in adult rats. By contrast, slices obtained from non-lesioned rats did not have spontaneous fast ripples, but could be *originated* after 4–6 trains of an LTP-induction stimulation protocol over the perforant path *in vitro*. High frequency oscillations could be suppressed by adenosine A₁ receptors (A₁Rs) but not by adenosine A_{2A} receptors (A_{2A}Rs). Our results suggest that the oscillatory activity of the hippocampus can be immediately altered by EC-to-EC disruption, thus, displaying epilepsy-related fast ripples probably through a functional disinhibition (Jiruska et al., 2010).

2. Materials and methods

The Ethics Committee for Animal Research of our institution approved all experimental procedures, which were performed in adherence to the “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (NIH 8th

edition 2011). We used transversal, combined EC–hippocampus slices (400 μ m) obtained from adult (230 g) Wistar rats (Gutiérrez, 2000). Some brains (see Results) were subjected to a uni- or bilateral lesion of the EC (Fig. 1A) *in situ*, before being taken out of the skull for the preparation of the slices. Also, to evoke HFOs in combined EC–hippocampal slices from intact brains, we stimulated the perforant path with a repeated LTP-inducing stimulation protocol (Gutiérrez, 2002), hereafter called high frequency stimulation (HFS). To deliver this HFS, we used a bipolar electrode placed over the perforant path to provide trains of 0.1 ms pulses at 100 Hz, with a duration of 1 s, and an intertrain interval of 1 min delivered every 15 min without varying the stimulus intensity, until sharp waves with an amplitude of at least 0.2 mV were apparent (see results in Fig. 2C) (Gutiérrez, 2002; Behrens et al., 2005). Stimuli were provided with a Grass S11 stimulator through a photoelectric stimulus-isolating unit (PSIU 6; Grass Technologies, Warwick, RI) connected to a bipolar (tip separation 50 μ m), glass-insulated platinum wire (25 μ m) electrode. The current intensity, at which the trains were delivered, was determined for each experiment with an input–output curve; the stimulation current was fixed at the value that evoked 60% of the maximal field response under normal ACSF perfusion.

The EC was uni- or bilaterally cut with microsurgery scissors (500 μ m tip; WPI, cat. 501777) after rapid removal of the skull and chilling the brain with several drops of ACSF at 4 °C, *in situ*. The cut on each hemisphere was performed at the following coordinates taken from the adult rat brain atlas (Paxinos and Watson, 1997): AP, from –5.3 to –6.8 (from Bregma); L, from the surface of the brain to 6; H, between 4 and 6, while the brain was still embedded in the skull. Performing the cuts *in situ* allowed us to maintain the stiffness of the brain, which warranted its steady position while cutting, and thereby, the repeatability of the lesions.

The brains were next removed, submerged in oxygenated artificial cerebrospinal fluid (ACSF) containing (in mM): NaCl, 124; KCl, 3; NaH₂PO₄, 1.25; MgSO₄, 2; CaCl₂, 2; NaHCO₃, 26; and glucose 10; pH 7.35 and cut with a Vibroslicer (Leica VT1200) in transversal slices of 400 μ m thickness. A group of rats (see Results) were deeply anesthetized (Pentobarbital, 50 mg/kg⁻¹, i.p.) and intracardially perfused with the following solution (in mM): sucrose, 210; KCl, 2.8; MgSO₄, 2; NaH₂PO₄, 1.25; NaHCO₃, 26; glucose, 10; CaCl₂, 1; MgCl₂, 1; at 4 °C; the brains were removed and slices were obtained while the tissue was submerged in 4 °C sucrose-containing ACSF.

Slices of both groups of rats (*i.e.*, intracardially perfused or not) were kept submerged either in the recording, normal ACSF or in a low-Ca⁺⁺, high Mg⁺⁺-containing solution with the following composition (in mM): NaCl, 125; KCl, 2.5; NaH₂PO₄, 1.25; MgCl₂, 4; CaCl₂, 1; NaHCO₃, 25; glucose, 10; ascorbic acid, 0.4; pH 7.35, at room temperature at

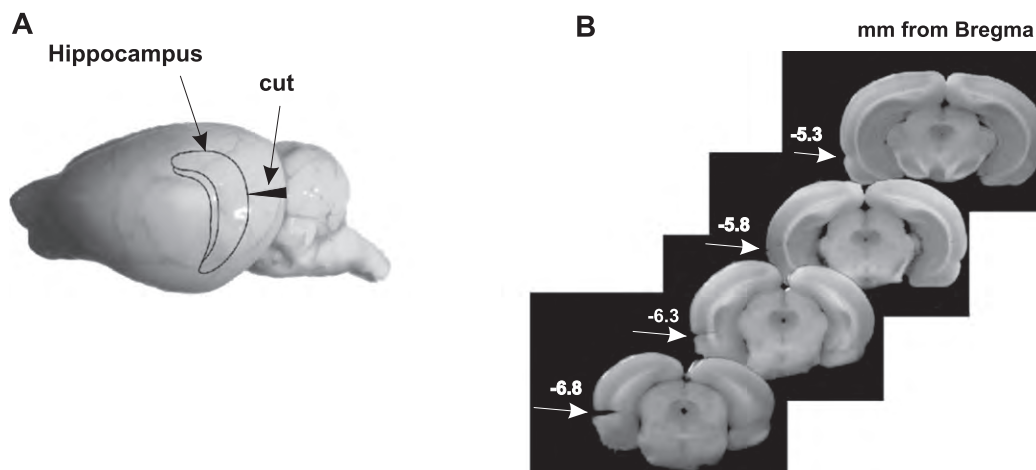


Fig. 1. Lesion of the entorhinal cortex. A) Photograph of a rat brain with a schematic view of the hippocampus and the location where the entorhinal cortex was cut. B) Photographs of a series of coronal brain slices prepared in an antero-posterior direction indicating the extent of the cut (arrows).

least for 1 h before they were transferred to the air–liquid interface recording chamber.

2.1. Electrophysiological experiments

For recording, slices were transferred to a liquid-to-air recording interface chamber and were constantly perfused ($1.5\text{--}2\text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$) with oxygenated, normal ACSF at $34 \pm 0.5\text{ }^\circ\text{C}$ for an hour before recordings commenced. Extracellular field activity was recorded with glass microelectrodes ($5\text{--}10\text{ M}\Omega$) filled with NaCl (155 mM) placed over the pyramidal cell layer of CA3 area and over the granular cell layer of the DG (Fig. 2A). Signals were digitized at 10 KHz (Digidata, Molecular Devices) and acquired with the Axoscope/pClamp 9 Software (Molecular Devices).

From the beginning of the recordings (2 to 2.5 h after the lesion and/or removal of the brain from the skull), 10 samples of 20 s of spontaneous activity were notch filtered at 60 Hz and acquired every 10 s for as long as the experiment lasted, usually >2–3 h. After acquisition, Axoscope files were exported to MATLAB 7.0 for analysis (R14; MathWorks, Inc.). We determined the incidence of interictal-like events, and conducted FFT and wavelet analysis of the events in bins of 1 s, under the different experimental conditions. Group plots are expressed as the mean \pm s.e.m. The drugs used were diluted at the desired concentration in the ACSF, they were: adenosine (100 μM ; Sigma), the A_1 antagonist DPCPX (8-cyclopentyl-1,3-

dipropylxantine; 100 nM; Sigma), and the A_{2A} antagonist CSC (1,3,7-trimethyl-8-(3-clorostiryl)xanthine; 200 nM, Sigma).

3. Results

3.1. Anatomical lesion

The type of cut performed in our experiments disrupted EC to EC connections (Paxinos and Watson, 1997; Fig. 1). Digital photographs (7.2 megapixels per frame) of the tissue were obtained after slicing the brain of 5 rats in transversal and coronal directions to establish the height, depth and width of the lesion. Fig. 1A depicts the localization of the hippocampus with respect to the whole brain and where the cut was made, and Fig. 1B depicts the extent of the cortical cut in a series of coronal slices along the AP axis.

3.2. Fast ripples induced by HFS in control slices

Recordings of spontaneous activity in slices from intact brains ($n = 6$) did not present interictal-like events or HFO (Fig. 2B). However, sharp-wave ripple complexes with an oscillatory frequency of $184 \pm 23\text{ Hz}$ and amplitude of $2.7 \pm 1.8\text{ mV}$ appeared after applying $1.8 \pm 0.3\text{ HF}$ stimuli to the perforant path (mean \pm s.e.m.; $n = 6$; see Figs. 2C; 3A, C; and 4A, D). These events could turn into epileptiform events with superimposed fast ripples (>250 Hz) if 2–4 additional

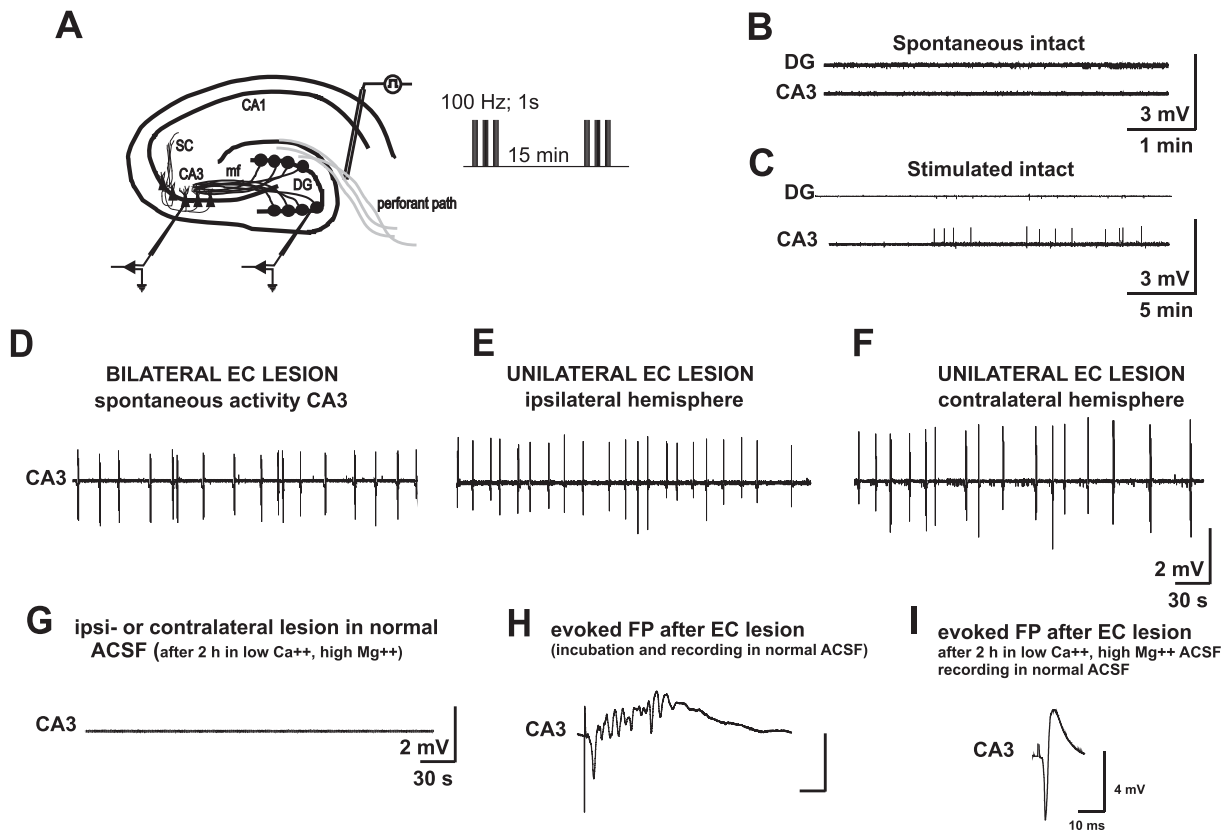


Fig. 2. A) Schematic drawing of a transversal slice of the hippocampus indicating the sites of stimulation (perforant path) and recordings (DG and CA3). The stimulation protocol consisted of 3 high frequency trains of 1 s, at 100 Hz, with pulses of 0.1 ms, intertrain interval of 1 min, every 15 min (Gutiérrez, 2002). B) Traces of spontaneous activity of the DG and CA3 of a hippocampal slice obtained from a naïve, control rat. C) Traces obtained in a hippocampal slice of a naïve, control rat that was subjected to the repeated stimulation protocol described in A. Note the presence of interictal-like events induced by the perforant path stimulation. D) Same type of traces obtained in a hippocampal slice from a bilaterally lesioned brain. Note the presence of spontaneous interictal-like events induced by cortical lesion. E, F) Interictal-like events were observed in slices of both hippocampi after unilateral entorhinal cortex (EC) lesions. G) Blockage of chemical neurotransmission with low Ca^{2+} medium just after preparing the hippocampal slices prevented interictal-like events in slices from lesioned brains. H) Single pulse stimulation of the DG in slices of lesioned brains, incubated and recorded in normal ACSF produced epileptiform responses in CA3, whereas slices of lesioned brains incubated for 2 h in low Ca^{2+} medium after slice preparation displayed normal responses to single pulse stimulation in the presence of normal ACSF (I).

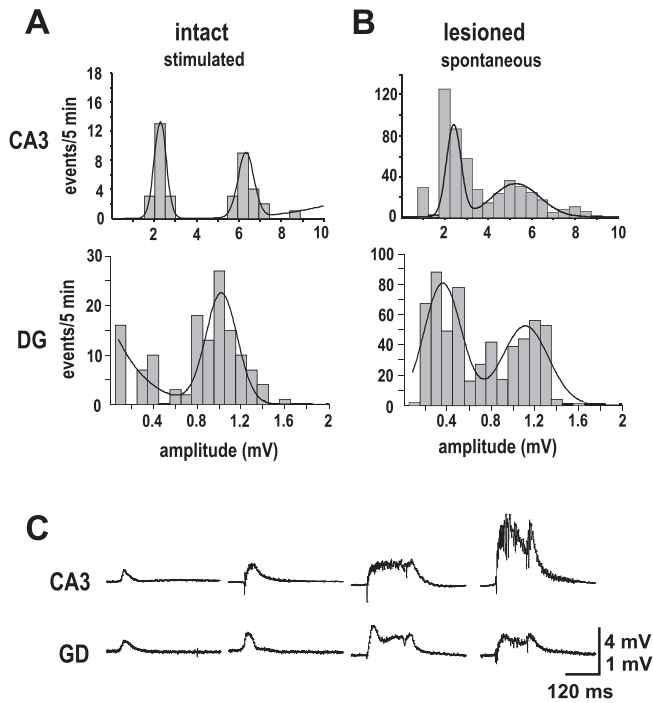


Fig. 3. Amplitude and time distribution of interictal-like events in the different experimental conditions. A) Histograms of interictal-like events evoked by HFS clustered around different amplitude values in CA3 and DG in slices of non-lesioned brains. Y axis depicts the frequency of the events per 5 min ($n = 4$). B) In slices from brains with EC cuts, the number of spontaneous interictal-like events was higher than that evoked in A while amplitudes did not seem to differ between the groups ($n = 20$). C) Raw traces of the different types of events.

high frequency stimuli were delivered; this was observed in the 6 slices (see Figs. 2C, 3A, C, 4A).

3.3. Consequences of EC lesions

We found continuous interictal-like events containing fast ripple activity from the beginning of the recordings, upon placing the electrodes in CA3 and the DG, in 19 out of 20 slices from bilaterally lesioned brains. It is noteworthy that this activity was observed in the slices irrespective of their septo-temporal origin. The only slice that did not have high amplitude spontaneous activity was stimulated as described producing fast ripple activity after 2 HFS trains. We next conducted experiments on slices of both hippocampi obtained from 4 unilaterally lesioned brains. Interestingly, all slices, both ipsi- and contralateral to the lesion ($n = 12$; 3 slices from each rat), presented spontaneous fast ripple activity from the beginning of the recordings (Fig. 2 D, E, F), which commenced 2 h after the slicing procedure. These results suggest that the lesion of the EC disinhibited or directly produced a barrage of hyperexcitation sensitizing the ipsi- and contralateral hippocampi. To gain insight into this possibility, we performed the lesions in 1) brains perfused with sucrose, which prevents excitability during the cut; the slices were obtained and incubated in low Ca^{++} , high Mg^{++} -containing ACSF for an hour before recordings commenced, 2) in brains sliced in normal, chilled ACSF after which slices were incubated in low Ca^{++} , high Mg^{++} -containing ACSF for an hour until transferred to the recording chamber for another hour in normal ACSF until recordings commenced, and 3) in brains sliced in normal, chilled ACSF, and incubated in normal ACSF before being transferred to the recording chamber.

Slices obtained from brains perfused in either sucrose-based ACSF or normal ACSF ($n = 6$), but later incubated for an hour in low Ca^{++} , high Mg^{++} -containing ACSF, did not show spontaneous HFOs (Fig. 2G) and the evoked responses were typical of slices with normal excitability

(Fig. 2I). By contrast, slices from brains perfused and incubated in normal ACSF showed spontaneous HFOs ($n = 4$) and the evoked responses had epileptiform characteristics (Fig. 2H).

3.4. Characteristics of the interictal-like events

As already described, in slices from intact brains, no HFOs or interictal-like events were observed; however, interictal-like events could be induced by HFS trains. They had amplitude values that ranged from 1 to 9 mV in CA3 ($n = 4$ rats, at least 2 slices per rat were tested), whereas in the DG they ranged between 0.1 and 1.6 (Fig. 3A). This activity remained for as long as recordings lasted (usually 2–3 h). Their amplitude distribution and incidence are summarized in Fig. 3. In the experiments conducted on slices obtained from bilaterally lesioned brains, the amplitude distribution fluctuated around 2 amplitude ranges in CA3: from 1 to 3.5 and from 3.5 to 9 mV, whereas in the DG they fluctuated from around 0.1 to 0.7 and from 0.7 to 1.8 mV (Fig. 3B; $n = 20$). Although the amplitude range did not differ significantly from the control slices, the incidence of the fast ripples was markedly increased (Fig. 3A, B). The characteristic waveform of the events in each amplitude range is depicted in Fig. 3C. This type of events remained for as long as the recordings lasted without change in morphology. We next determined the spectral characteristics of these events in the different groups by conducting FFT and wavelet analyses from the raw signals (Fig. 4A₁₋₂, B₁₋₂). High frequency stimulation produced ripples (150–250 Hz) that could turn into fast ripples (>250 Hz) with further stimulation (not shown) in CA3 in control slices (Fig. 4A₄, B₄), while no such activity was observed in the DG (Fig. 4A₃, B₃).

We next analyzed the activity of slices obtained from lesioned brains. Interestingly, we found no difference between the activity recorded from 12 slices from uni- and that of 20 slices from bilaterally lesioned brains, so we pooled them together. These slices had epileptiform events with fast ripples, with a mean oscillating frequency of 326.9 ± 63.6 Hz, some of which also showed components in the 100–250 Hz range in CA3 (Fig. 4B₄). However, only 48% of these slices had oscillations in the fast ripple range also in the DG with a mean oscillating frequency of 299.6 ± 45.3 Hz (Fig. 4B₃). Thus, the DG displayed fast ripples only when they could be observed in CA3. This means that the presence of fast ripple activity in CA3 is necessary but not sufficient to induce fast ripple activity in the DG. Fast ripples could be isolated by filtering the raw signal between 250 and 600 Hz (Fig. 4C₁₋₄) and were not observed in the DG if they were absent in CA3. They had a mean duration of 133 ± 14 ms (fast ripples taken from 14 slices; no statistical difference was observed, $p > 0.5$). Fig. 4D and E depict wavelet analysis of ripples and fast ripples, respectively, where frequencies of ≥ 500 Hz were apparent in the latter.

3.5. Adenosine inhibition of interictal-like events with fast ripple activity

Adenosine is an endogenous neuroprotectant and anticonvulsant that reduces neuronal excitation during hypoxia, ischemia and seizures (Boison, 2007). We therefore hypothesized that due to its protective action, it could exert an inhibitory effect on ripple and fast ripple-containing interictal-like events. Adenosine completely blocked the ripple activity evoked by 2 trains of HFS in slices from intact brains (not shown). By contrast, in slices from bilaterally-lesioned brains, adenosine completely suppressed interictal-like events with fast ripples (250–600 Hz) in CA3 as well as in the DG in 3 out of 5 slices (Fig. 5A₁₋₂) while it had a partial and reversible inhibitory effect in the remaining two slices: in CA3 it reduced the events' incidence by $18 \pm 9\%$ and amplitude by $18 \pm 2\%$, while there were no changes in the DG. Interestingly, the spectral peak power was strongly reduced by $82 \pm 13\%$ in CA3 while no detectable changes were observed in the DG. Taking the results of all experiments together, a total reduction of $62 \pm 27\%$ in fast ripple incidence was observed in CA3, amplitude reduction of $76 \pm 9\%$ in CA3 and $54 \pm 22\%$ in DG and most notably, reduction in fast ripple

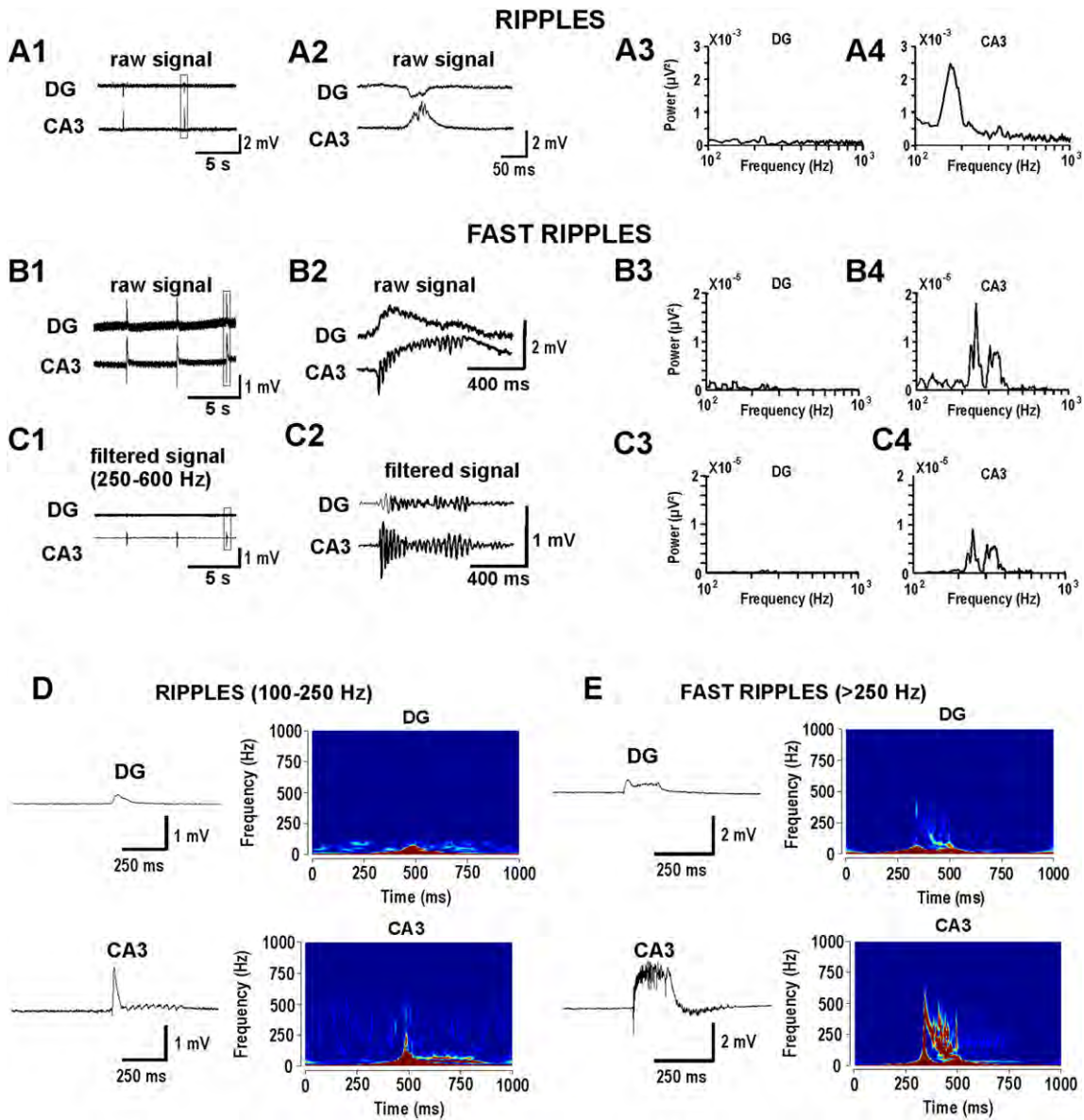


Fig. 4. Analysis of ripples and fast ripples; frequency and time distribution. A1) Stimulus-induced sharp-wave ripples recorded in CA3 of an *in-vitro* stimulated slice (2 HF stimuli). Their occurrence was at 1 or 2 every 5 s. A2) depicts a sharp-wave ripple at an expanded scale. Notice that it is not apparent in the DG. Power spectra of the DG (A3) and CA3 (A4) showing that the power of the ripple in CA3 peaked at around 180 Hz. B1) Spontaneous fast ripples recorded in the DG and CA3 of a slice obtained from a lesioned brain. B2) depicts the ripple at an expanded scale. Power spectra of the DG (B3) and CA3 (B4) showing components at around 250 Hz and others close to 400 Hz. C1) Filtering the signal with a bandwidth of 250–600 Hz isolates the fast ripple in both structures (C2). The frequency components of the filtered signals are depicted in C3 and C4 for DG and CA3, respectively. Raw trace and corresponding wavelet of a ripple evoked in a slice stimulated with two HF trains *in vitro* (D) and a spontaneous fast ripple obtained from a slice of a lesioned brain (E). Notice that HF activity is apparent in the DG only when it appears in CA3.

peak power of $97 \pm 0.3\%$ in CA3 and $76 \pm 32\%$ in DG (Fig. 5 B₁₋₃), all of which were statistically significant ($p < 0.5$). The mean oscillating frequency did not change significantly either with the perfusion of adenosine or after its wash out (CA3: 329.4 ± 93.7 Hz; DG: 303.1 ± 55.2 Hz, and CA3: 319.7 ± 50.4 Hz; DG: 344.9 ± 57.5 Hz, respectively).

Because A₁Rs maintain a basal inhibitory tone and mediate the inhibitory effect described in pathological conditions, like hypoxia and ischemia, we sought to find out if adenosine suppressed fast ripples through A₁R activation. First, we blocked the A₁Rs with the specific antagonist DPCPX (100 nM) and then perfused exogenous adenosine. The mere blockage of A₁Rs increased the incidence of fast ripples by $21.4 \pm 2.9\%$ (Fig. 5C₁₋₂). Adenosine perfused during A₁R blockage did not have any effect. Furthermore, the incidence of fast ripples increased up to $65.4 \pm 3.1\%$ (Fig. 5C₁₋₂) and stabilized within the following 30 min, possibly indicating a progressive blockage of A₁Rs. Neither the blockage of A₁Rs nor the subsequent perfusion of adenosine had effects on fast

ripple amplitude and peak power (Fig. 5D₁₋₃). Frequencies at which the power peaked were: CA3: 339.3 ± 72.9 Hz; DG: 325.6 ± 74.7 Hz, during A₁R blockage and CA3: 317.8 ± 65.5 Hz; DG: 310.9 ± 67.4 Hz during perfusion of adenosine. Interestingly, the incidence of fast ripples did not increase significantly during the time adenosine was perfused (15 min), which can possibly indicate that most of the A₁Rs were blocked at that time.

3.6. Differential effects of A₁ and A_{2A}R blockage on fast ripple activity

Because the blockage of A₁Rs had a disinhibitory effect, favoring the appearance of epileptiform activity, we next asked whether the inhibitory effect of endogenous adenosine was also dependent on A_{2A}R activation. Therefore, we blocked A_{2A}Rs with the specific antagonist CSC (200 nM), which by itself did not change either the incidence, or the amplitude, or the peak power of the fast ripples (Fig. 6A₁₋₂, B₁₋₃).

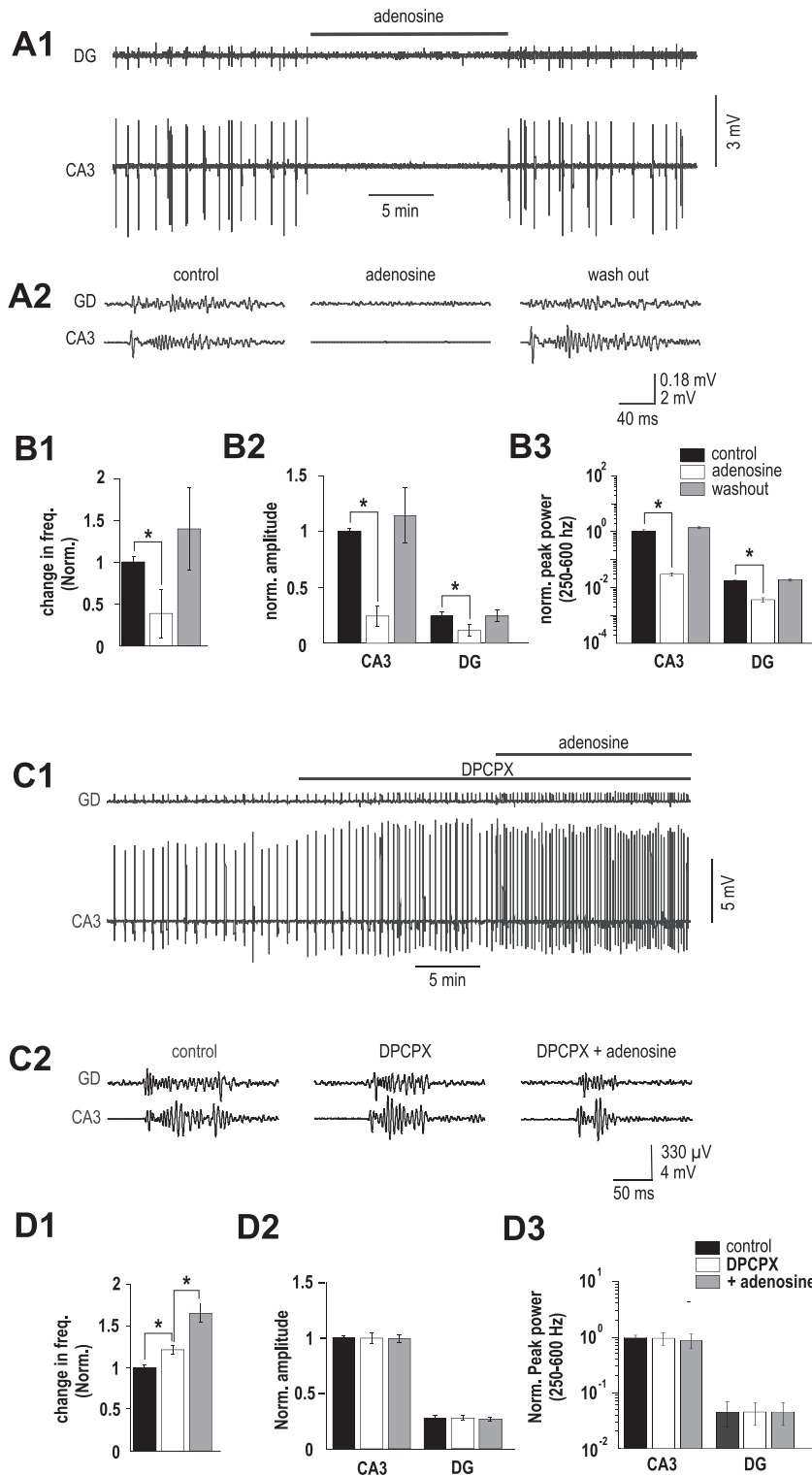


Fig. 5. Effects of selective stimulation of A_1R in frequency and amplitude of fast ripples in control and epileptic rats. A1) Activation of A_1R with adenosine inhibits spontaneous fast ripples in a hippocampal slice obtained after EC lesion. A2) Samples of fast ripples at an expanded scale, after filtering (bandwidth 250–600 Hz). B) Histograms depicting the change in frequency of appearance (B1) the change of amplitude (B2) and the change of the peak power (B3) of the fast ripples before, during and after perfusion of adenosine in hippocampal slices from lesioned brains. Asterisks signal statistically significant changes ($p < 0.05$). A clear inhibitory effect is observed in all parameters measured. C1–2) Effect of A_1R block with DPCPX produced an increase in the frequency of spontaneous fast ripples, which was further increased by the addition of adenosine to the perfusion medium. These results are summarized in the histograms shown in D1. The amplitude and peak power were not affected (D2, D3).

However, the addition of exogenous adenosine during the blockade of A_2ARs significantly reduced fast ripple incidence by $59 \pm 28\%$ ($n = 5$). This shows that inhibition is exerted through A_1R activation. As for the oscillatory frequency, we did not observe any changes when the A_2ARs

were blocked (CA3: 378.6 ± 75.1 Hz; DG: 316.3 ± 46.5 Hz) or when exogenous adenosine was perfused in the presence of CSC (CA3: 367.1 ± 66.3 Hz; DG: 331.1 ± 71.1 Hz). We next blocked both A_1Rs and A_2ARs in 8 slices that had fast ripples (Fig 6C₁₋₂) and observed an increasing

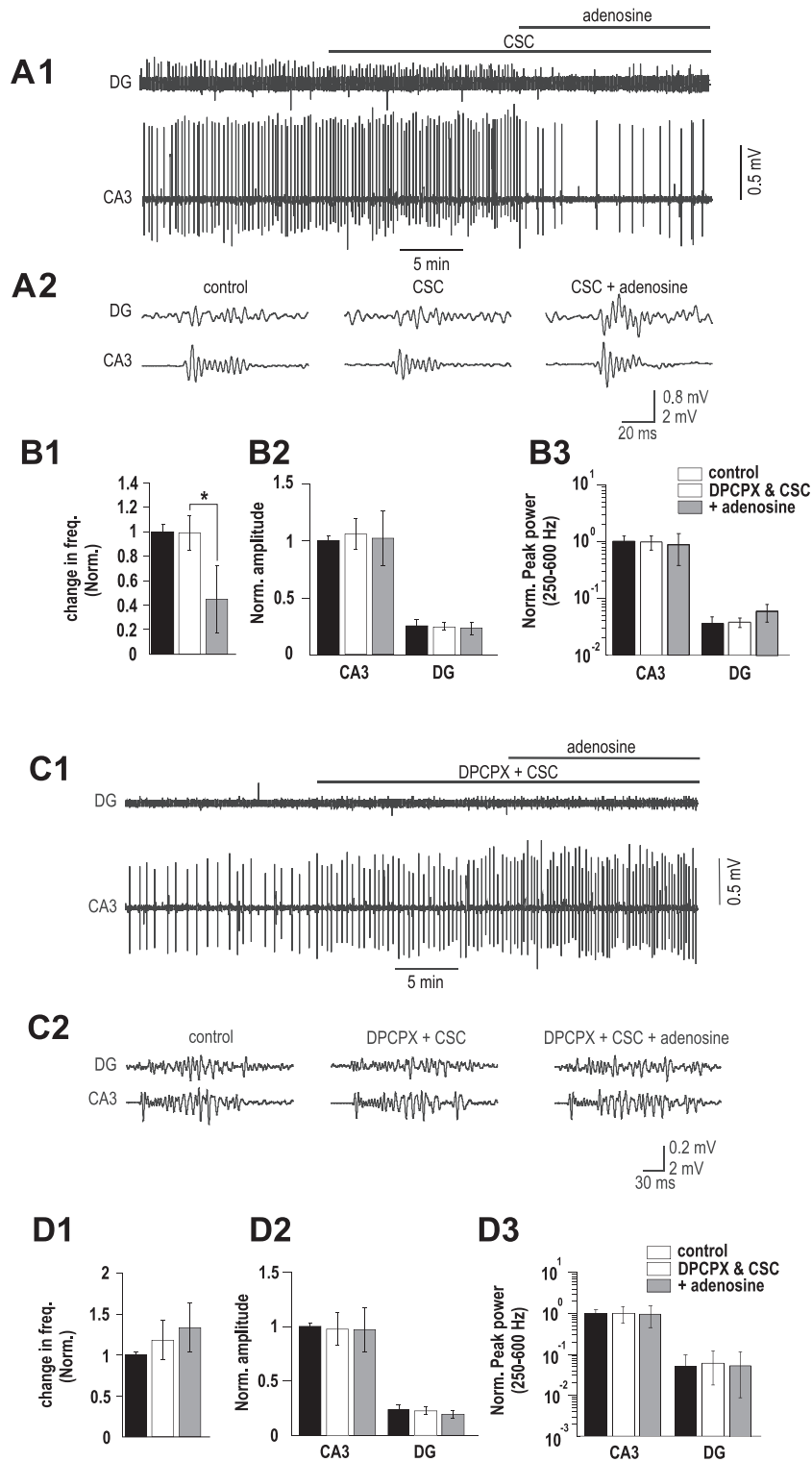


Fig. 6. Effects of selective stimulation of $A_{2A}R$ s in frequency and amplitude of fast ripples in control and epileptic rats. Inhibition of fast ripples by adenosine is independent of $A_{2A}R$ activation. A1) Effect of $A_{2A}R$ blockage with CSC on the spontaneous activity obtained in hippocampal slices after EC lesion. Note the lack of effect of CSC and an inhibition of fast ripples during adenosine perfusion. A2) Samples of fast ripples at an expanded time scale, after filtering (bandwidth 250–600 Hz). C) Histograms depicting the change in frequency of appearance (B1) the change of amplitude (B2) and the change of the peak power (B3) of the fast ripples before, during and after perfusion of adenosine. Asterisks signal statistically significant changes ($p < 0.05$). A clear inhibitory effect of selective activation of A_1R is observed in frequency occurrence of fast ripples. C1–2) Effect of $A_1R + A_{2A}R$ blockage with DPCPX + CSC produced an increase in the frequency of spontaneous fast ripples; this increase (although without statistical significance) was not prevented by the addition of adenosine to the perfusion medium. None of the effects of adenosine in the presence of blockers of both adenosine receptors were statistically significant, as depicted in the group histograms (D1, D2, D3).

tendency ($10.6 \pm 2.3\%$), although not statistically significant, in their incidence (see Fig. 6C_{1–2}, D_{1–3}). This might suggest a modulatory role of $A_{2A}R$ s, albeit minor, in the fast ripple incidence. Also, the amplitude

and peak power of the fast ripples did not change significantly (Fig. 6D_{2–3}). Finally, the main oscillation frequency was not modified when both receptors were blocked (CA3: 349.5 ± 81.3 Hz;

DG: 310.7 ± 62.3 Hz) and after addition of adenosine in the presence of the adenosine blockers (CA3: 356.1 ± 81.4 Hz; DG: 310.1 ± 63.4 Hz). Altogether, these experiments suggest that the inhibitory actions of adenosine are primarily mediated by A₁Rs.

4. Discussion

Two main conclusions derive from this work: 1) The disruption of EC–EC connections along the dorso-ventral axis of the EC disinhibits the functional architecture of the hippocampus proper, which is reflected in the generation of epileptiform events with fast ripples in CA3. This disinhibition builds-up immediately after the lesion because it can be prevented by using a sucrose-containing ACSF during and after the preparation of the transversal slices for recordings, suggesting that the emergence of high frequency oscillations is dependent on activity and on the integrity of EC-to-EC connectivity. 2) Endogenous adenosine, acting through A₁R, has a tonic inhibitory effect on HFOs of the hippocampus, while exogenously applied adenosine strongly dampens epileptiform activity.

Our results suggest that a broad inhibitory action of the EC is exerted along the hippocampus, because the disruption of the dorso-ventral cortico-cortical circuitry acts upon the longitudinal axis of the hippocampal formation as well, producing local disinhibition (Menéndez de la Prida et al., 2006). Interestingly, it has been shown that ripples “propagate smoothly” across the septal and intermediate segments of the hippocampus, but those originating in the temporal segment often remained isolated (Patel et al., 2013), suggesting that cortico-cortical connections may constitute a common control relay for the length of the structure.

This idea is supported by three experimental data: 1) combined entorhinal-cortex slices are prepared in the same direction (transverse) as the lesion was made, and slices prepared from non-lesioned brains did not present spontaneous epileptiform or HFOs unless they were stimulated, 2) combined entorhinal-cortex slices prepared from lesioned brains that were incubated in low Ca²⁺, high Mg²⁺ medium for 2 h after the lesion did not present spontaneous HFOs, suggesting that an excitatory or disinhibitory mechanism is immediately put into play after the lesion and extends along the dorso-ventral axis of the hippocampus ipsilateral to the lesion and to the contralateral hippocampus as well. 3) Finally, because bidirectional inhibitory control between the hippocampus and the EC has been described, as well as inter-DG connections (Melzer et al., 2012), we complement those findings by suggesting that the disruption of cortico-cortical connections, that ultimately extend to the hippocampus (de Curtis and Paré, 2004), can give rise to rearrangement of hippocampal networks resulting in HFOs, as has been shown after neuronal trauma and partial cortical deafferentation (Topolnik et al., 2003). Thus, not only is the EC a possible region or primary site where TLE develops by increasing its excitability, but also its damage may disrupt projections that, in turn, may disinhibit hippocampal circuits (Lévesque et al., 2011). So our studies show that excitatory activity coming from the EC, or rather disinhibition produced by its deafferentation, reorganizes the circuit within the hippocampus to produce fast ripples. Interestingly, unilateral lesions also induced HFOs in the contralateral hippocampus probably by the disinhibition of CA3 that projects to the contralateral CA3 through robust commissural connections (Li et al., 1994; Ishizuka et al., 1990).

This observation was not thoroughly analyzed so as to determine whether there was a preferential site of origin, as the one described in hyperexcitability in the work of Jiruska et al. (2010), where unilateral intrahippocampal injection of tetanus toxin showed that high frequency activity was preferably, but not exclusively generated in the hippocampal ipsilateral to the toxin injection.

The EC receives converging sensory information from olfactory and visual cortices before entering the hippocampus (Turner et al., 1998) and the activity patterns of the EC and DG can bias both ripple and fast ripple activity. This means that ripples and fast ripples are sensitive

to the previous experience of the animal (both physiological and pathological), whereby network excitability modulates its patterning (Sullivan et al., 2011). Most importantly, projections controlling slow oscillation in the DG, via the silent epochs of the EC that may produce this slow oscillation, are excised, thus producing disinhibition. We confirm that the EC tonic inhibition controls not only gamma activity (Sullivan et al., 2011), but that it strongly shapes fast ripples in the whole structure due to the complex anatomical connections along the rhinal cortices and the cortico-hippocampal connections along its septotemporal axis (Paré et al., 1992; de Curtis and Paré, 2004; Witter, 2007). Synaptic interactions can be the primary mechanism of fast ripple generation and propagation, but gap junction coupling and field interactions have also been proposed to synchronize principal cell firing for ripples and fast ripples to be generated and sustained (Jefferys et al., 2012). Interestingly, contrary to what has been found in the DG of animal models of epilepsy (for a review see Jefferys et al., 2012), fast ripples did not appear in the DG but in CA3. This suggests that the low amplitude fast ripples observed in the DG in this study, could be originated in CA3 and transmitted to the DG by CA3-hilar-DG projections or antidromically by the mossy fibers (Vivar et al., 2012; Franco et al., 2015).

Theta and gamma oscillations in the EC can be in phase with those recorded in the hippocampus (Chrobak and Buzsáki, 1998) and gamma oscillations in the dentate-hilar region disappear after surgical removal of the EC (Bragin et al., 1995). Although these authors recorded *in vivo* two weeks after the surgical removal of the EC and the activity that they analyzed was of a lower frequency range, we show here that the acute lesion of the EC-to-EC connections has an immediate disinhibitory effect on hippocampal oscillatory activity, even in the contralateral hippocampus. Thus, although long-term hyperexcitability has been observed in the hippocampus 2 days or longer after concussive head trauma (Santhakumar et al., 2001), a dysregulation of hippocampal circuitry seems to occur immediately after disruption of EC–EC connectivity. The mechanism for this seems to be the increased excitability that is produced immediately after the cut, as suggested by the fact that conducting the lesion in a protective ACSF prevents HFOs to develop. Moreover, it is known that population bursts in CA3 are biased by activity patterns present in the DG and EC (Sullivan et al., 2011). Further, the disinhibition of the hippocampal CA3 can be linked to the action of the EC projecting GABAergic interneurons, as recently described (Melzer et al., 2012). It has been described that EC lesions like the one that we conducted, produced changes in gene expression even in the hippocampus contralateral to the cortical lesion, beginning at day 4 after injury (Andersson et al., 2013). Hernández-Ortega and Arias (2012) found that unilateral EC lesions produced the rapid and sustained activation of ERK1/2 leading to neuronal dysfunction in the hippocampus, as early as 3 h after EC lesion with kainate. We here show that HFOs can be observed, *in vitro*, 2 h after cutting the EC, suggesting an immediate response of the hippocampus to EC insults. Moreover, our lesion model can be regarded as more localized than the blow to the brain or the lesion with kainate.

The endogenous anticonvulsant adenosine exerts an inhibitory tone on synaptic transmission through A₁Rs (Dunwiddie and Diao, 1994). Gamma oscillations in CA3 are depressed by adenosine, which reduces spiking rate and synchrony of action potentials during gamma oscillations (Schulz et al., 2012). In our experiments, adenosine significantly reduced the incidence of the fast ripples as well as their amplitude, and peak power. Thus, the blockage of A₁Rs increased fast ripple incidence by preventing the inhibitory action of exogenous adenosine. By contrast, the blockage of A_{2A}Rs did not change the incidence of fast ripples, their amplitude or peak power. Interestingly, the blockage of both A₁ and A_{2A} receptors had no significant effect on fast ripple incidence, amplitude or peak power in CA3 or DG and the addition of exogenous adenosine did not have further effects.

It has been shown that the activation of A_{2A}Rs facilitates hippocampal synaptic transmission by reducing the inhibitory tone of presynaptic

A₁ receptors (Lopes et al., 2002). However, it is known that A_{2A}Rs have a lower density in synaptic terminals of area CA3 as compared to that of A₁Rs (Cunha et al., 1996; Rebola et al., 2003b). We here show that the perfusion of adenosine during the blockage of A_{2A}Rs produces a greater reduction in fast ripple incidence compared to the perfusion of adenosine alone. This could explain the tendency of fast ripples to increase when both receptors were blocked, albeit in a non-significant manner. On the other hand, their incidence did not increase significantly when adenosine was perfused (15 min), which can possibly indicate that most of A₁Rs were blocked at that time. A reduced number of A₁Rs has been reported in epileptic animals (Rebola et al., 2003a). Before seizure onset, there is an increase in cellular excitability, which brings neurons near firing threshold. We hypothesize that adenosine increases the inhibitory tone, therefore decreasing excitability, preventing neurons from synchronizing and generating fast ripples. The adenosine treatment does not, however, alleviate the pathological circuits; it only masks them, as fast ripples are evidenced upon wash out of adenosine. We here provoked synaptic inhibition by a means different from that affecting GABAergic transmission (Viereckel et al., 2013). We show that, in our case, the incidence of fast ripples is diminished by adenosine but the frequency within the ripples is not.

Human patients suffering from TBI may develop epileptic seizures within weeks or months, whereby the initial pathological responses are energy depletion, cell death secondary to excitotoxicity, neuroinflammation and hyperexcitability leading to seizures (Algattas and Huang, 2013). Our model of brain injury, which comprises a well-localized lesion with deafferentation of cortico-cortical connectivity, has immediate repercussions on hippocampal activity, whereby epileptiform events with fast ripples appear spontaneously after the cut. Thus, the high frequency activity that we describe can constitute one of the earliest biomarkers of cortical lesions that may represent an underlying kindling focus. On the other hand, many patients that undergo unilateral hippocampotomy for the treatment of epilepsy can still have seizures, suggesting that our experiments using unilateral cortical lesions in a way reflect a possible underlying mechanism for bilateral enhancement of activity. Moreover, the subicular cortex has been proposed as a distributor of epileptiform activity in human epilepsy patients (Fabó et al., 2008). In our model, immediate protection of the cortical lesioned areas and the hippocampus with protective ACSF prevents this activity from appearing. This, together with the inhibitory effects of adenosine, may be regarded as an immediate intervention strategy to avoid epileptogenesis.

Finally, a note of caution to experimentalists, especially to those interested in recording hippocampal oscillations of rodent tissue *in vitro*: the cortex is easy to damage during exposure and detachment of the brain from the skull. Our data suggest that, in such cases, possible macroscopic “undetected” cortical injuries can easily induce HFOs on top of epileptiform activity in the hippocampal slices one records from. Indeed, no spontaneous HFOs were detected when the slices were prepared in the presence of protective ACSF. Therefore, procedures like detaching the hippocampus from the rest of the brain, or slicing the whole brain in a vibratome can be conducted while having the brain immersed in chilled, protective ACSF, as the one we describe.

Acknowledgments

This work was supported by grant I020/193/10 FON.INST.-29-10 and 166712 to RG from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México. We thank Dr. Mario Treviño for help in the development of computational programs for analysis, Prof. Uwe Heinemann, Prof. Detlev Boison, Prof. Francisco Velasco and the reviewers for helpful comments on earlier versions of the manuscript. We thank Mr. Benjamín Muñoz for excellent technical assistance. FO is a PhD student supported by a scholarship from CONACYT.

References

- Algattas, H., Huang, J.H., 2013. Traumatic Brain Injury pathophysiology and treatments: early, intermediate, and late phases post-injury. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 309–341.
- Andersson, D., Wilhelmsson, U., Nilsson, M., Kubista, M., Ståhlberg, A., Pekna, M., Pekny, M., 2013. Plasticity response in the contralateral hemisphere after subtle neurotrauma: gene expression profiling after partial deafferentation of the hippocampus. *PLoS One* 8, e70699.
- Avoli, M., de Curtis, M., 2011. GABAergic synchronization in the limbic system and its role in the generation of epileptiform activity. *Prog. Neurobiol.* 95, 104–132.
- Avoli, M., D'Antuono, M., Louvel, J., Kohling, R., Biagini, G., Pumain, R., D'Arcangelo, G., Tancredi, V., 2002. Network pharmacological mechanisms leading to epileptiform synchronization in the limbic system *in vitro*. *Prog. Neurobiol.* 68, 167–207.
- Behrens, C.J., van den Boom, L.P., de Hoz, L., Friedman, A., Heinemann, U., 2005. Induction of sharp wave-ripple complexes *in vitro* and reorganization of hippocampal networks. *Nat. Neurosci.* 8, 1560–1567.
- Boison, D., 2007. Adenosine as a modulator of brain activity. *Drug News Perspect.* 20, 607–611.
- Bragin, A., Jando, G., Nádasdy, Z., Hetke, J., Wise, K., Buzsáki, G., 1995. Gamma (40–100 Hz) oscillation in the hippocampus of the behaving rat. *J. Neurosci.* 15, 47–60.
- Bragin, A., Engel Jr., J., Wilson, C.L., Fried, I., Mathern, G.W., 1999. Hippocampal and entorhinal cortex high-frequency oscillations (100–500 Hz) in human epileptic brain and in kainic acid-treated rats with chronic seizures. *Epilepsia* 40, 127–137.
- Buzsáki, G., Leung, L.W., Vanderwolf, C.H., 1983. Cellular bases of hippocampal EEG in the behaving rat. *Brain Res.* 287, 139–171.
- Chrobak, J.J., Buzsáki, G., 1998. Gamma oscillations in the entorhinal cortex of the freely behaving rat. *J. Neurosci.* 18, 388–398.
- Cunha, R.A., Johansson, B., Constantino, M.D., Sebastião, A.M., Fredholm, B.B., 1996. Evidence for high affinity binding sites for the adenosine A_{2A} receptor agonist [3H]1680 in the rat hippocampus and cerebral cortex that are different from striatal A_{2A} receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 353, 261–271.
- de Curtis, M., Paré, D., 2004. The rhinal cortices: a wall of inhibition between the neocortex and the hippocampus. *Prog. Neurobiol.* 74, 101–110.
- de Guzman, P., D'antunono, M., Avoli, M., 2004. Initiation of electrographic seizures by neuronal networks in entorhinal and perirhinal cortices *in vitro*. *Neuroscience* 123, 875–886.
- Du, F., Whetsell Jr., W.O., Abou-Khalil, B., Blumenkopf, B., Lothman, E.W., Schwarcz, R., 1993. Preferential neuronal loss in layer III of the entorhinal cortex in patients with temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 16, 223–233.
- Du, F., Tore, E., Kohler, C., Lothman, E.W., Schwarcz, R., 1995. Preferential neuronal loss in layer III of the medial entorhinal cortex in rat models of temporal lobe epilepsy. *J. Neurosci.* 15, 8301–8313.
- Dunwiddie, T.V., Diao, L., 1994. Extracellular adenosine concentrations in hippocampal brain slices and the tonic inhibitory modulation of evoked excitatory responses. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 268, 537–545.
- Dzhala, V.I., Staley, K.J., 2003. Transition from interictal to ictal activity in limbic networks *in vitro*. *J. Neurosci.* 23, 7873–7880.
- Empson, R.M., Heinemann, U., 1995. The perforant path projection to hippocampal area CA1 in the rat hippocampal–entorhinal cortex combined slice. *J. Physiol.* 484, 707–720.
- Fabó, D., Maglóczy, Z., Wittner, L., Pék, A., Erőss, L., Cziráj, S., Vajda, J., Sólyom, A., Rásonyi, G., Szucs, A., Kelemen, A., Juhos, V., Grand, L., Dombóvári, B., Halász, P., Freund, T., Halgren, E., Karmos, G., Ulbert, I., 2008. Properties of *in vivo* interictal spike generation in the human subiculum. *Brain* 131, 485–499.
- Franco, L.M., Beltrán, J.Q., Tapia, J., Manjarrez, E., Gutiérrez, R., 2015. Differential frequency-dependent antidromic resonance of the Schaffer collaterals and mossy fibers. *Brain Struct. Funct.* <http://dx.doi.org/10.1007/s00429-015-1003-1> (Epub ahead of print).
- Frey, L.C., Hellier, J., Unkart, C., Lepkin, A., Howard, A., Hasebrook, K., Serkova, N., Liang, L., Patel, M., Soltész, I., Staley, K., 2009. A novel apparatus for lateral fluid percussion injury in the rat. *J. Neurosci. Methods* 177, 267–272.
- Germroth, P., Schwerdtfeger, W.K., Buhl, E.H., 1989. GABAergic neurons in the entorhinal cortex project to the hippocampus. *Brain Res.* 494, 187–192.
- Gutiérrez, R., 2000. Seizures induce simultaneous GABAergic and glutamatergic neurotransmission in the dentate gyrus–CA3 system. *J. Neurophysiol.* 84, 3088–3090.
- Gutiérrez, R., 2002. Activity-dependent expression of simultaneous glutamatergic and GABAergic neurotransmission from the mossy fibers *in vitro*. *J. Neurophysiol.* 87, 2562–2570.
- Heinemann, U., Beck, H., Dreier, J.P., Ficker, E., Stabel, J., Zhang, C.L., 1992. The dentate gyrus as a regulated gate for the propagation of epileptiform activity. *Epilepsy Res. Suppl.* 7, 273–280.
- Hernández-Ortega, K., Arias, C., 2012. ERK activation and expression of neuronal cell cycle markers in the hippocampus after entorhinal cortex lesion. *J. Neurosci. Res.* 90, 2116–2126.
- Ishizuka, N., Weber, J., Amaral, D.G., 1990. Organization of intrahippocampal projections originating from CA3 pyramidal cells in the rat. *J. Comp. Neurol.* 295, 580–623.
- Jefferys, J.G.R., Menéndez de la Prida, L., Wendling, F., Bragin, A., Avoli, M., Timofeev, I., López da Silva, F.H., 2012. Mechanisms of physiological and epileptic HFO generation. *Prog. Neurobiol.* 98, 250–264.
- Jiruska, P., Finnerty, G.T., Powell, A.D., Lofti, N., Cmejla, R., Jefferys, J.G.R., 2010. Epileptic high-frequency network activity in a model of non-lesional temporal lobe epilepsy. *Brain* 133, 1380–1390.
- Jones, R.S., Heinemann, U., 1988. Synaptic and intrinsic responses of medial entorhinal cortical cells in normal and magnesium-free medium *in vitro*. *J. Neurophysiol.* 59, 1476–1496.

- Krook-Magnuson, E., Armstrong, C., Bui, A., Lew, S., Ojala, M., Soltesz, I., 2015. In vivo evaluation of the dentate gate theory in epilepsy. *J. Physiol.* <http://dx.doi.org/10.1113/JP270056>.
- Lévesque, M., Bortel, A., Gotman, J., Avoli, M., 2011. High-frequency (80–500 Hz) oscillations and epileptogenesis in temporal lobe epilepsy. *Neurobiol. Dis.* 42, 231–241.
- Li, X.-G., Somogyi, P., Ylinen, A., Buzsáki, G., 1994. The hippocampal CA3 network: an in vivo intracellular labeling study. *J. Comp. Neurol.* 339, 181–208.
- Lopes, L.V., Cunha, R.A., Kull, B., Fredholm, B.B., Ribeiro, J.A., 2002. Adenosine A(2A) receptor facilitation of hippocampal synaptic transmission is dependent on tonic A(1) receptor inhibition. *Neuroscience* 112, 319–329.
- Lowenstein, D.H., Thomas, M.J., Smith, D.H., McIntosh, T.K., 1992. Selective vulnerability of dentate hilar neurons following traumatic brain injury: a potential mechanistic link between head trauma and disorders of the hippocampus. *J. Neurosci.* 12, 4846–4853.
- Melzer, S., Michael, M., Caputi, A., Eliava, M., Fuchs, E.C., Whittington, M.A., Monyer, H., 2012. Long-range-projecting GABAergic neurons modulate inhibition in hippocampus and entorhinal cortex. *Science* 235, 1506–1510.
- Menéndez de la Prida, L., Huberfeld, G., Cohen, I., Miles, R., 2006. Threshold behavior in the initiation of hippocampal population bursts. *Neuron* 49, 131–142.
- O'Connor, W.T., Smyth, A., Gilchrist, M.D., 2011. Animal models of traumatic brain injury: a critical evaluation. *Pharmacol. Ther.* 130, 106–113.
- Paré, D., de Curtis, M., Llinás, R., 1992. Role of the hippocampal entorhinal loop in temporal lobe epilepsy: extra- and intracellular study in the isolated guinea pig brain in vitro. *J. Neurosci.* 12, 1867–1881.
- Patel, J., Schomburg, E.W., Berényi, A., Fujisawa, S., Buzsáki, G., 2013. Local generation and propagation of ripples along the septotemporal axis of the hippocampus. *J. Neurosci.* 33, 17029–17041.
- Paxinos, G., Watson, C., 1997. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, San Diego.
- Rebola, N., Coelho, J.E., Costenla, A.R., Lopes, L.V., Parada, A., Oliveira, C.R., Soares-da-Silva, P., de Mendonça, A., Cunha, R.A., 2003a. Decrease of adenosine A1 receptor density and of adenosine neuromodulation in the hippocampus of kindled rats. *Eur. J. Neurosci.* 18, 820–828.
- Rebola, N., Pinheiro, P.C., Oliveira, C.R., Malva, J.O., Cunha, R.A., 2003b. Subcellular localization of adenosine A(1) receptors in nerve terminals and synapses of the rat hippocampus. *Brain Res.* 987, 49–58.
- Risdall, J.E., Menon, D.K., 2011. Traumatic brain injury. *Philos. Trans. R. Soc. B* 366, 241–250.
- Santhakumar, V., Ratzliff, A.D., Jeng, J., Toth, Z., Soltesz, I., 2001. Long-term hyperexcitability in the hippocampus after experimental head trauma. *Ann. Neurol.* 50, 708–717.
- Santhakumarm, V., Voipio, J., Kaila, K., Soltesz, I., 2003. Post-traumatic hyperexcitability is not caused by impaired buffering of extracellular potassium. *J. Neurosci.* 23, 5865–5876.
- Schulz, S.B., Klafz, Z.J., Rösler, A.R., Heinemann, U., Gerevich, Z., 2012. Purinergic P2X, P2Y and adenosine receptors differentially modulate hippocampal gamma oscillations. *Neuropharmacology* 62, 914–924.
- Sullivan, D., Csicsvari, J., Mizuseki, K., Montgomery, S., Diba, K., Buzsáki, G., 2011. Relationships between hippocampal sharp waves, ripples, and fast gamma oscillation: influence of dentate and entorhinal cortical activity. *J. Neurosci.* 31, 8605–8616.
- Topolnik, L., Steriade, M., Timofeev, I., 2003. Partial cortical deafferentation promotes development of paroxysmal activity. *Cereb. Cortex* 13, 883–893.
- Turner, D.A., Buhl, E.H., Hailer, N.P., Nitsch, R., 1998. Morphological features of the entorhinal–hippocampal connection. *Prog. Neurobiol.* 55, 537–562.
- Viereckel, T., Kostic, M., Bähner, F., Draguhn, A., Both, M., 2013. Effects of the GABA-uptake blocker NNC-711 on spontaneous sharp wave–ripple complexes in mouse hippocampal slices. *Hippocampus* 23, 323–329.
- Vivar, C., Traub, R.D., Gutiérrez, R., 2012. Mixed electrical–chemical transmission between hippocampal mossy fibers and pyramidal cells. *Eur. J. Neurosci.* 35, 76–82.
- Witter, M.P., 2007. The perforant path: projections from the entorhinal cortex to the dentate gyrus. *Prog. Brain Res.* 163, 43–61.